

# Osjetljivost proteina na oksidaciju i posljedice na fenotip stanice

---

Lovrić, Anita

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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:217:279946>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Anita Lovrić

**OSJETLJIVOST PROTEINA NA  
OKSIDACIJU I POSLJEDICE NA FENOTIP  
STANICE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016

---



UNIVERSITY OF ZAGREB  
FACULTY OF SCIENCE  
DIVISION OF BIOLOGY

Anita Lovrić

# **PROTEIN SUSCEPTIBILITY TO OXIDATION AND CELL PHENOTYPE ALTERATIONS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016

---

---

Ovaj je doktorski rad izrađen u Mediteranskom institutu za istraživanje života (MedILS) pod vodstvom dr. sc. Anite Kriško i prof. emeritus Miroslava Radmana, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu; Odsjeku za elektroniku, Ruđer Bošković Institut, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Hrvatska; EMBL/CRG Systems Biology Research Unit, Centre for Genomic Regulation (CRG), Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Španjolska; Universitat Pompeu Fabra (UPF), 08002 Barcelona, Španjolska; Odsijeku za molekularnu medicinu, Ruđer Bošković Institut, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Hrvatska; European Neuroscience Institute, Grisebachstraße 5, 37077 Göttingen, Njemačka; Zavodu za molekularnu biologiju, Bioinformatička grupa, Biološki odsjek, PMF, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska; Universitätsmedizin Göttingen, Institut für Zellbiochemie, Humboldtallee 23, D-37073 Göttingen.

---

## Zahvale

*Ova disertacija za mene predstavlja mnogo više od sažetka jednog istraživanja - ona je za mene stizanje na kraj jednog puta koji je bio obilježen mnogim dobrim ljudima te brojnim lijepim iskustvima. Stoga ću iskoristiti ovu stranicu da se zahvalim osobama zbog kojih mi je svaki dan u proteklih 5 godina predstavljao novi profesionalni izazov.*

---

*Zahvaljujem mentoru akademiku Miroslavu Radmanu te dr. sc. Aniti Kriško na vodstvu, povjerenju i savjetima tijekom moga rada sve ove godine, te na pruženoj prilici da ostvarim cilj na kraju ove životne cjeline.*

*Zahvaljujem i svim svojim kolegama, a najviše našoj tehničarki Tei Copic na velikoj podršci za svo vrijeme moga rada na institutu, te svim ostalim djelatnicima Mediteranskog instituta za istraživanje života u Splitu.*

*Velika hvala svima koji su svojim radom doprinjeli ovoj disertaciji te na taj način zaokružili ovo istraživanje.*

*I na kraju, hvala onima koji su najzaslužniji da ova disertacija uopće postoji. Vjerojatno ne razumiju previše od onoga što je napisano ali bez njih ova disertacija nikad nebi bila niti napisana. Mama, Tata, Braco, Seka i naravno moj Bejbi...hvala vam od sveg srca na bezuvjetnoj ljubavi i beskrajnoj podršci.*

---

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Doktorska disertacija

## OSJETLJIVOST PROTEINA NA OKSIDACIJU I POSljedICE NA FENOTIP STANICE

---

ANITA LOVRIĆ

Mediteranski institut za istraživanje života (MedILS),

Meštrovićevo šetalište 45, Split

Poznato je da karbonilacija proteina ugrožava vitalne stanične funkcije. Zbog toga, invazivne patogene bakterije moraju izdržati štetu koju uzrokuje domaćin reaktivnim kisikovim vrstama prilikom obrane. Koristeći komparativnu genomiku i druge eksperimentalne pristupe, pokazali smo da su proteini iz patogenih bakterija stekli otpornost na oksidacijski stres povećanjem strukturne stabilnosti staničnih proteina. Reprezentativni patogeni su pokazali veću otpornost na inhibiciju HSP90 šaperona, kao i proteom manje sklon oksidaciji. Zajednička karakterizacija 46 proteoma patogenih bakterija obuhvatila je 14 fizikalno-kemijskih svojstava koji imaju utjecaj na povećanu strukturnu stabilnost. Pročišćavanjem 10 reprezentativnih proteina, pokazali smo *in vitro* da su proteini s karakteristikama specifičnim za proteine patogenih bakterija, otporniji na oksidativni stres uslijed povećane stabilnosti strukture. Karakterističan sastav proteoma patogena omogućio je dizajniranje sintetičkih peptida koji su otporniji na odmatanje i na proteinsku karbonilaciju, čime je potvrđena uzročno-posljedična veza između strukturne stabilnosti i otpornosti na oksidaciju, s mogućnošću primjene u sintetskoj biologiji i antimikrobnim strategijama. Karbonilacija proteina nije povezana samo sa svojstvima proteina i staničnim propadanjem tijekom oksidacijskog stresa već i sa brojnim dobno povezanim poremećajima i starenjem. Uloga proteinskih šaperona u starenju je intrigantna i njihov potencijalni doprinos je do sada bio dodijeljen samo njihovoj središnjoj ulozi u proteostazi. Ovdje smo pokazali kako 4 proteinska šaperona iz različitih staničnih odjeljaka produljuju replikativni životni vijek (RŽV) pupajućem kvascu, zajedničkim mehanizmom koji je sličan odgovoru na kalorijsku restrikciju. Produljenje RŽV-a rezultat je povećane aktivacije kinaze Snf1 pomoću šaperona Hsp90, koja omogućava zaobilazanje signala o razini glukoze u okolini. Produljenje RŽV-a pomoću šaperona prati tzv. razdvajanje (engl. uncoupling) respiratornog lanca. Sekvenciranje genoma potvrdilo je represiju glikolize i translacije te aktivaciju glukoneogeneze i oksidacije

masnih kiselina. Naši rezultati postavljaju novu paradigmu za ulogu proteinskih šaperona: moduliranjem razine ekspresije šaperona moguće je utjecati na metabolizam stanice te posljedično na životni vijek. Očekujemo da će opisani mehanizam otvoriti nove mogućnosti za istraživanje starenja i bolesti vezanih uz starenje.

124 strane, 30 slika, 7 tablica, 180 literaturnih izvoda, jezik izvornika hrvatski

**Ključne riječi: Karbonilacija proteina, oksidacijski stres, konformacijska stabilnost, replikativni životni vijek, šaperoni**

Mentor: Prof. emeritus Miroslav Radman, red. Prof., Medicinski fakultet Necker, Pariz i Mediteranski institut za istraživanje života (MedILS), Split

Ocjenjivači:

Dr. sc. Ksenija Zahradka, viša znan. sur., Institut "Ruđer Bošković", Zagreb

Dr. sc. Dušica Vujaklija, viša znan. sur., Institut "Ruđer Bošković", Zagreb

Doc. dr. sc. Ivana Ivančić Baće, Zavod za molekularnu biologiju, PMF, Zagreb

Rad prihvaćen: 13. travnja 2016

---

# **PROTEIN SUSCEPTIBILITY TO OXIDATION AND CELL PHENOTYPE ALTERATIONS**

---

ANITA LOVRIC

Mediterranean Institute for Life Sciences (MedILS),  
Meštrovićevo šetalište 45, 21000 Split

Protein oxidation is known to compromise vital cellular functions. Therefore, invading pathogenic bacteria must resist damage inflicted by host defenses via reactive oxygen species. Using comparative genomics and experimental approaches, we provide multiple lines of evidence that proteins from pathogenic bacteria have acquired resistance to oxidative stress by an increased conformational stability. Representative pathogens exhibited higher survival upon HSP90 inhibition and a less-oxidationprone proteome. A proteome signature of the 46 pathogenic bacteria encompasses 14 physicochemical features related to increasing protein conformational stability. By purifying ten representative proteins, we demonstrate in vitro that proteins with a pathogen-like signature are more resistant to oxidative stress as a consequence of their increased conformational stability. A compositional signature of the pathogens' proteomes allowed the design of protein fragments more resilient to both unfolding and carbonylation, validating the relationship between conformational stability and oxidability with implications for synthetic biology and antimicrobial strategies.

Protein carbonylation has been associated not only with protein quality and cellular deterioration but also with a large number of age-related disorders and senescence. The involvement of protein chaperones in aging is intriguing and their potential contribution has, so far, been attributed solely to their central role in proteostasis. Here we show that four protein chaperones from different cellular compartments extend replicative lifespan (RLS) in budding yeast by a common mechanism akin to caloric restriction. The RLS extension relies on the increased direct activation of Snf1 kinase by Hsp90, thereby bypassing the signal on the environmental glucose level. The chaperone-related RLS extension is accompanied by the



respiratory chain uncoupling. A genomic approach confirmed the repression of glycolysis and translation, as well as activation of gluconeogenesis and fatty acid oxidation. Our results set a novel paradigm for the role of protein chaperones: by modulation of the chaperone expression level one can affect cellular metabolic features, and consequently, modify lifespan. We expect the described mechanism to open new avenues for research in aging and age-related diseases.

Pages 124, figures 30, tables 7, references 180, original in Croatian

**Keywords: Protein carbonylation, oxidative stress, conformational stability, replicative lifespan, chaperones**

Supervisor: Prof. Emeritus Miroslav Radman, Full Professor, Medical School „Necker–Enfants Malades“, Université Paris 5, Paris, and Director, Mediterranean Institute for Life Sciences (MedILS), Split

Reviewers:

Ksenija Zahradka, Ph.D., Senior Research Associate, Ruđer Bošković Institute, Zagreb  
Dušica Vujaklija, Ph.D., Senior Research Associate, Ruđer Bošković Institute, Zagreb  
and Associate professor, Faculty of Science, Zagreb

Ivana Ivančić Baće, Ph.D., Assistant Professor, Faculty of Science, Zagreb

---

Thesis accepted: April 13th, 2016

---

# SADRŽAJ

---

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>4</b>
2.1 Oksidacijski stres.....	4
2.1.1 Markeri oksidacijskog stresa.....	5
2.2 Slobodni radikali.....	5
2.2.1 Izvori reaktivnih kisikovih vrsta.....	7
2.2.2 Štetan učinak slobodnih radikala.....	8
2.3 Oksidacijska karbonilacija proteina.....	9
2.3.1 Karbonilacijaproteina i starenje.....	12
2.4 Genomska kompozicija nukleotida u genomu prokariota.....	12
2.5 Molekularne osnove starenja.....	13
2.6 Šaperoni.....	13
2.6.1 Uloga šaperona u smatanju proteina.....	14
2.7 KVASAC.....	16
2.7.1 Kvasac kao modelni organizam.....	16
2.7.2 Biologija kvasca.....	17
2.7.3 Pupajući kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kao modelni organizam za replikativno starenje.....	17
2.7.4 Fenomen starenja i replikativno starenje kod kvasca.....	18
2.7.5 Gubitak asimetrije.....	19
2.7.6 Kronološki i replikativni životni vijek.....	19
2.7.7 Mitohondriji i njihova uloga u procesu starenja.....	20
2.7.7.1 Razdvajanje (engl. uncoupling) elektronskog transportnog lanca.....	22
2.7.7.2 Važna uloga mitohondrija u replikativnom starenju.....	26
2.7.7.3 Respiracija.....	26
2.7.8 Kalorijska restrikcija u produljenju života.....	27
2.7.9 Osjetljivost na glukozu kod kvasca.....	29
2.7.10 SNF1/AMPK.....	31
<b>3.MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>32</b>
3.1 BAKTERIJE.....	32
3.1.1 Bakterijski sojevi.....	32

3.1.2 Hranjive podloge za uzgoj bakterija.....	32
3.1.3 Otopine.....	32
3.1.3.1 Otopine za pripremu serija razrjeđenja bakterije.....	32
3.1.3.2 Otopine za gel-elektroforezu i priprema gela agaroze.....	33
3.1.3.3 Otopine za izolaciju bakterijskih staničnih proteina.....	33
3.1.3.4 Otopine za mjerenje karbonilacije.....	33
3.1.3.5 Bradfordov reagens za određivanje koncentracije proteina.....	34
3.1.3.6 Otopine fluorokroma.....	34
3.1.4 Kemikalije i kompleti.....	35
3.1.5 Uzgoj bakterija.....	37
3.1.6 Bakterijski sojevi, plazmidi, uvjeti rasta i metode uzgoja .....	37
3.1.7 Izolacija ukupnih staničnih proteina i oksidacija <i>in vitro</i> .....	38
3.1.8 Mjerenje karbonilacije proteina i postupak s GuHCL i TMAO.....	38
3.1.9 Pročišćavanje ThyA i NadD i postupak sa GuHCl i TMAO.....	41
3.1.10 Postupak s geldanamycinom.....	41
3.1.11 Preživljenje bakterija mjerenje rezistencije pri povećanju temperature.....	42
3.1.12 Mjerenje RKV (reaktivne kisikove vrste).....	42
3.1.13 Termalna denaturacija ThyA, NadD i sintetičkih peptida.....	43
3.1.14 Dizajniranje sintetičkih peptida.....	43
3.1.15 Kvantifikacija osnovnih trendova u fizikalno-kemijskim svojstvima proteoma.....	44
3.1.16 Odabir familija gena koji pokazuju velike razlike između patogena i ne-patogena.....	46
3.2 KVASCI.....	47
3.2.1 Sojevi kvasca.....	47
3.2.2 Hranjivi mediji i uvjeti rasta.....	48
3.2.3 Mjerenje replikativnog starenja kod pupajućeg kvasca <i>S.cerevisiae</i> pomoću mikromanipulatora.....	48
3.2.4 Izolacija proteina iz kvasaca.....	50
3.2.5 Određivanje koncentracije proteina i mjerenje karbonilacije.....	50
3.2.6 Određivanje unutarstaničnog RKV-a (Reaktivnih kisikovih vrsta).....	51
3.2.7 Mjerenje respiracije.....	51
3.2.8 Protočna citometrija.....	52
3.2.9 Mjerenje membranskog potencijala mitohondrija.....	52
3.2.10 Mjerenje mitohondrijske mase određivanjem sadržaja kardiolipina.....	52
3.2.11 Mjerenje razine ATP-a.....	53

3.2.12 Izolacija RNK.....	53
3.2.13 Kvantitativni „real-time“ PCR.....	53
3.2.14 Metaboličko označavanje novo-sintetiziranih proteina s L-AHA.....	54
3.2.15 Detekcija Hsp90 i Snf1 Western analizom.....	54
3.2.16 Ko-imunoprecipitacija.....	55
3.2.17 Statističke analize.....	55
3.2.18 Mapiranje sekvenci.....	55
3.2.19 Analize diferencijalne ekspresije.....	56
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>58</b>
4.1 Proteomi patogena su rezistentniji na oksidaciju <i>in vitro</i> i HSP90 inhibiciju <i>in vivo</i> .....	58
4.2 Ulazak geldanamicina u stanicu i mjerenje RKV.....	63
4.3 Zaštitna uloga RKV-sakupljača od posljedica djelovanja geldanamicina.....	63
4.4 Patogenost je reflektirana u općim trendovima odstupanja među fizikalno-kemijskim svojstvima proteoma.....	64
4.5 Povećana strukturna stabilnost povezana je s povećanom rezistencijom na oksidaciju.....	72
4.6 Otpornost na povećanje temperature nije povezana s patogenošću vrste.....	75
4.7 PaPS obilježje je dostatno za mogućnost dizajna konformacijski stabilnih i oksidacijski rezistentnih peptida.....	77
4.8 Povećana ekspresija šaperona povećava replikativni životni vijek kod kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	80
4.9 Povećanu ekspresiju šaperona prati smanjena razina RKV-a (reaktivnih kisikovih spojeva) i oksidacijskog oštećenja proteina.....	81
4.10 Dugo-živi mutanti kvasca pokazuju povećanu respiraciju.....	82
4.11 Dugo-živi mutanti imaju karakteristike “nesparenih” mitohondrija.....	83
4.12 Različita ekspresija gena kod dugo-živućih mutanti pokazuje povećanu ekspresiju kompleksa oksidativne fosforilacije i smanjenu glikolizu.....	85
4.13 Dugo-živuće mutante karakterizira smanjena translacija.....	87
4.14 Snf1 je esencijalan za produljenje životnog vijeka kod dugo-živućih mutanata.....	88

4.15 Dugo-živuće mutante karakterizira povećan broj Hsp90-Snf1 kompleksa i fosforilirane Snf1 kinaze.....	90
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>93</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>102</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>104</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>123</b>

# 1. UVOD

---

Oksidativna oštećenja su neizbježna kod aerobnih organizama kao rezultat metaboličkih procesa koji proizvode korozivne slobodne radikale. Specifična vrsta oksidativnih oštećenja proteina koja je najdestruktivnija zbog svoje ireverzibilne prirode je karbonilacija. Akumulacija oksidativnog oštećenja u proteinima smanjuje efikasnost i preciznost vitalnih biokemijskih procesa (Kriško i Radman, 2013) te može uzrokovati ireverzibilnu i progresivnu funkcionalnu degeneraciju gotovo svih staničnih funkcija što rezultira staničnom degeneracijom i smrću (Kriško i Radman, 2013).

Ukupnoj karbonilaciji proteina pridonose tri različita faktora: 1) razina stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva, 2) razlika u rezistenciji pojedinačnih proteina na oksidativno oštećenje i 3) stopa rješavanja oštećenih proteina degradacijom i/ili agregacijom (Nystrom, 2007.). Oštećeni proteini su označeni za proteolizu od strane proteasoma i proteaze Lon, ali mogu izbjeći degradaciju i formirati agregate velike molekulske mase koji se akumuliraju tokom starenja. Takvi karbonilirani agregati mogu postati citotoksični te uzrokovati različite vrste poremećaja vezanih uz starenje, uključujući Parkinsonovu i Alzheimerovu bolest te rak (Nystrom, 2005.).

Proteine karakterizira nejednaka osjetljivost na karbonilaciju (oksidativne modifikacije), a prirodu i mehanizam osjetljivosti proteina tek treba istražiti. Pokazano je također da nativna struktura proteina štiti proteine od karbonilacije te da individualni proteini postaju podložniji karbonilaciji već kad im je struktura poremećena mutacijom samo jedne aminokiseline (Dukan i sur., 2000.).

Motivirani otvorenim pitanjima u tom području istraživanja, cilj rada bio je istražiti otpornost individualnih proteina na karbonilaciju u njihovoj nativnoj konformaciji i stanične posljedice modifikacija otpornosti proteina na karbonilaciju, a posebno opisati parametre koji doprinose povećanoj rezistenciji proteina na oksidaciju.

Istraživali smo postojanje i prirodu zajedničkih svojstava među proteomima patogenih bakterija te kakav utjecaj na spomenute proteome ima oksidativni stres koji nastaje kao posljedica obrambenog sustava domaćina tijekom invazije patogenih bakterija. Istovremeno otvoren pristup tisućama kompletnih prokariotskih sekvenci proteoma omogućio je detaljne

usporedbe njihovih karakteristika (Tekaiia i Yeramian, 2006.). Do sada, takve *in silico* studije bile su usmjerene uglavnom na proučavanje prilagodbi proteoma na ekstremne uvjete okoliša (Zeldovich i sur., 2007; Smole i sur., 2011.), dok je opća karakterizacija proteomskih obilježja komenzalnih i patogenih mikroorganizama zadobila manje pažnje.

U ovom radu, na razini pojedinačnih pročišćenih proteina te na čitavim proteomima reprezentativnih bakterijskih vrsta istražena je povezanost između fizikalno-kemijskih svojstava proteina te njihove otpornosti na karbonilaciju. Genomi bogati G+C sadržajem kodiraju za proteom s većim sadržajem aminokiselina koje destabiliziraju strukture proteina, a manje aminokiselina koje imaju stabilizirajuća svojstva. S obzirom da je u genomima patogenih bakterija povećan udio A+T nukleotida, cilj je bio istražiti otpornost proteina patogenih bakterija na oksidativni stres. Postavljena je hipoteza da povećana otpornost proteina na oksidativni stres predstavlja jedan od mehanizama obrane patogenih bakterija od imunološkog odgovora domaćina. Ekspresijom i pročišćavanjem nikotin kiselinske mononukleotid adenilil transferaze (NadD) i timidilat sintaze (ThyA) iz 10 reprezentativnih vrsta bakterija, testirana je veza između povećane konformacijske stabilnosti i rezistencije na karbonilaciju.

Dizajniranjem serije sintetskih peptida, putem jednostavnog i efektivnog proteinskog dizajna, analiziran je sadržaj aminokiselina koje su odgovorne za poremećaj stabilnosti proteina. Dobiveni rezultati u ovom istraživanju odgovorili su na pitanja zašto pojedinačni proteini u svojoj nativnoj strukturi imaju različitu rezistenciju na oksidativni stres te na koji način možemo pojedinačnim proteinima smanjiti osjetljivost na oksidaciju. Ovo istraživanje može doprinijeti u stvaranju novih terapijskih pristupa i mehanizama ubijanja patogenih bakterija te pomoći u poboljšanju liječenja oksidativnim stresom.

Karbonilacija proteina nije povezana samo s kvalitetom proteina i staničnim propadanjem već i s brojnim dobro povezanim poremećajima i starenjem.

Studije o starenju postaju sve značajnije u biomedicinskom istraživanju, fokusiranjem na mehanizme koji utječu na produljenje životnog vijeka. Naime, prijašnje molekularne teorije starenja navode kako reaktivne kisikove vrste (RKV) uzrokuju oštećenja makromolekula progresivno s vremenom, koja vode do postepenog opadanja svih staničnih funkcija (Harman, 1956.). Ova teorija je evoluirala u mitohondrijsku teoriju starenja, jer se pokazalo da su mitohondriji glavni izvori staničnog RKV-a, koji nastaju kao produkti

elektronskog transporta prilikom stvaranja ATP-a u respiratornom lancu (Wallace, 2005.). U prilog tome, prethodna istraživanja su pokazala kako starenje uzrokuje proteotoksični stres u stanicama: akumulacija proteinskog oštećenja je jedan od glavnih pokazatelja starenja kod različitih vrsta (Oliver i sur., 1987.).

Glavna funkcija proteinskih šaperona je sposobnost odvajanja funkcionalnih proteina od oštećenih i nefunkcionalnih proteina. Oni uključuju i Hsp (engl. heat shock proteins), koji imaju brojne funkcije, pomažu u ponovnom smatanju proteina te obilježavanju proteina za degradaciju (Bukau i sur., 2006.). Gubitak aktivnosti šaperona utječe na jednu ili više staničnih funkcija koje dovode do stanične degeneracije i smrti.

Nadalje, cilj ovoga rada bio je istražiti da li šaperoni posjeduju signalna svojstva koja mogu utjecati i na neke druge signalne puteve, te na taj način utjecati na životni vijek. Poznato je nekoliko signalnih puteva koji uzrokuju povećanje životnog vijeka, uključujući odgovor sličan kalorijskoj restrikciji koji ovisi o AMP kinazi, sirtuini, IGF-1 (engl. insulin-like growth factor-1) i TOR (engl. target of rapamycin) signalni putevi (Raffaello i Rizzuto, 2001.). Smanjena aktivnost inzulinskog/IGF-I signalnog puta te TOR signalnog puta uzrokuje povećanje životnog vijeka kod evolucijski različitih vrsta, od jednostaničnih organizama do sisavaca (Barbieri i sur., 2003; Kaeberlein i sur., 2005.). Također, dugovječnost inducirana sirtuinima te inhibicijom mitohondrijske respiracije, konzervirana je među različitim koljenima. Ovaj mehanizam se odnosi na teoriju starenja pod nazivom "stopa življenja", prema kojoj se stanični procesi, uključujući starenje, odvijaju sporije, odnosno, odgođeni su kod metabolički manje aktivnih stanica/organizama. Kao rezultat reducirane mitohondrijske funkcije dolazi do smanjenja metaboličke stope koju karakterizira smanjena razina ATP-a i smanjena potrošnja kisika.

Takav fenotip često je u vezi s hipotezom 'uncouple-to-survive': smanjenjem razine ATP-a i proizvodnje RKV-a te povećanjem oksidacije masnih kiselina, razdvajanje (engl. uncoupling) u respiratornom lancu predstavlja važnu ulogu u modulaciji starenja i životnog vijeka (Brand, 2000.).

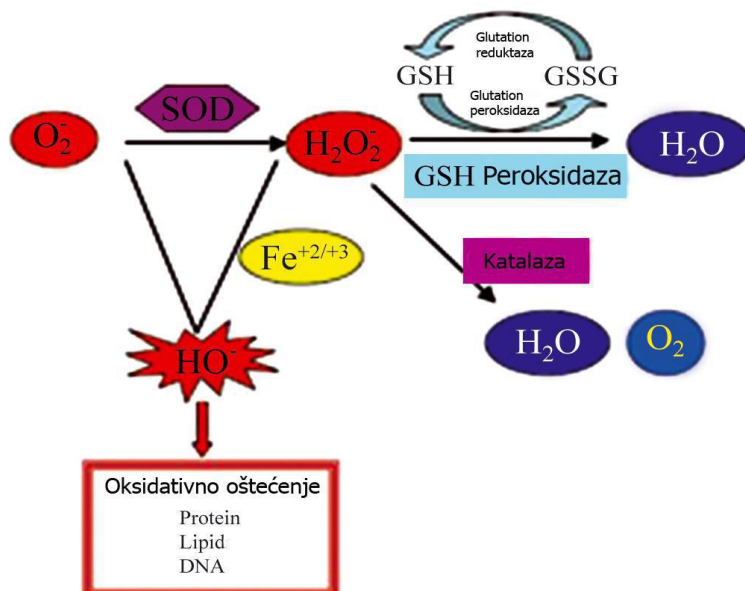


## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1 Oksidacijski stres

Oksidacijski stres definiran je 1985. godine kao poremećaj u ravnoteži u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama u organizmu, pri čemu je pomak ravnoteže usmjeren prema oksidaciji (Sies, 1997.). Riječ je o stanju prekomjernog stvaranja reaktivnih kisikovih molekularnih vrsta pri čemu dolazi do neuravnoteženog stvaranja slobodnih radikala i premašivanja mogućnosti neke stanice da ih razgradi, što rezultira oštećenjem stukture i slabljenjem funkcije važnih staničnih biomolekula (polinezasićenih lipida, ugljikohidrata, nukleinskih kiselina i proteina) te smanjenim preživljenjem stanica (Sies, 1997.). Drugim riječima, oksidacijski stres može se definirati kao oštećenje tkiva uvjetovano poremećajem ravnoteže pro- i anti-oksidativnog sustava (Slika 1).

U normalnim fiziološkim uvjetima, svi aerobni organizmi iskorištavanjem kisika stvaraju potencijalno štetne reaktivne kisikove spojeve (Sohal i Weindruch, 1996.). Posljednjih nekoliko godina povećan je interes za istraživanjem oksidacijskog stresa stanica i molekula koje mogu umanjiti ili ukloniti oštećenja unutar stanica.



Slika 1. Poremećena ravnoteža između antioksidanata i produkcije prooksidanata dovodi do povećanog stvaranja slobodnih radikala što može dovesti do ozbiljnih oštećenja stanica. (preuzeto i prilagođeno iz Wakamatsu et al. Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. Arq. Bras. Oftalmol. 2008; 71:72-79) (Wakamatsu i sur. 2008.)

Tako nastala oštećenja mogu narušiti homeostazu iona, prijenos signala u stanici, transkripciju gena te dovesti do drugih poremećaja. Oksidacijski stres je u posljednjih 40 godina prepoznat kao obilježje i uzročnik nastanka brojnih patofizioloških poremećaja, poput kardiovaskularnih i infektivnih bolesti, karcinoma, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, fibroze, hemolize te procesa starenja (Halliwell i Gutteridge, 2007.). Oksidacijsko oštećenje povećava se sa starenjem organizama te je dokazano jedan od biomarkera starenja.

### 2.1.1 Markeri oksidacijskog stresa

Markeri oksidacijskog oštećenja DNA, proteina i lipida su proizvodi nastali u reakciji slobodnih radikala s biološkim molekulama. Markeri oksidativnog oštećenja DNA su modificirani nukleozidi, markeri oksidativnog oštećenja proteina su proteinski hidroperoksidi, proteinski karbonili, dok su markeri lipidne peroksidacije malondialdehid (MDA), konjugirani dieni, 4-hidroksinonenal (HNE) i izoprostani. Detekcija i mjerenje oksidacijskih markera olakšava pristup za aktivnost oksidanta te za praćenje učinkovitosti antioksidativnog sustava.

### 2.2 Slobodni radikali

Slobodni radikali su definirani kao bilo koji atom, ion ili molekula s jednim ili više nesparenih elektrona. U toku oksidacijskih metaboličkih reakcija stvaraju se u svakoj stanici. Jako su nestabilni i mogu imati različite toksične efekte na stanične elemente i metaboličke procese. Prema naboju oni mogu biti pozitivni, negativni ili neutralni, a mogu se formirati i pucanjem kovalentnih veza (homo- ili heterolize). Zbog nesprenog elektrona, koji predstavlja slobodnu valenciju, slobodni radikali su kemijski jako reaktivni pa im je niska specifičnost za reaktante. Nastali slobodni radikal (inicijacija) može izazvati niz reakcija (propagacija), reagirajući s drugim, manje reaktivnim vrstama. Kao posljedica toga u kemijskoj reakciji *oksidacije*, brzo se i nepredvidivo spajaju s bilo kojom prostorno bliskom molekulom proteina, lipida, ugljikohidrata ili nukleinske kiseline. Zbog vrlo velike reaktivnosti, njihovo djelovanje je ograničeno na supstrate (biomolekule) iz najbliže okoline. Njihov srednji radijus difuzije je manji od 100 nm, a poluživot u biološkim sustavima nekoliko mikrosekundi. Vezivanjem slobodnih radikala na spomenute organske molekule mogu nastati novi radikali s mogućnošću pokretanja novog niza neenzimskih lančanih reakcija. Prilikom stupanja u reakcije međusobno ili s drugim molekulama, nesporeni

elektroni stvaraju kemijske veze, oslobađa se energija, a sustav prelazi u niže energetske stanje. U reakciji dvaju radikala, kombiniraju se njihovi nesporeni elektroni, koji formiraju kovalentnu vezu. Osim kovalentne veze, slobodni radikali mogu reagirati i na brojne druge načine s drugim biomolekulama, davanjem elektrona s reducirajućeg radikala, primanjem elektrona na oksidirajući radikal, oduzimanjem vodika, reakcijama adicije, poništavanja, disproporcionalnosti. Poremećaj ravnoteže u stvaranju i eliminaciji slobodnih radikala uzrokuje nakupljanje ovih elektronskih nestabilnih čestica. Veće količine ovih čestica dovode do štetnih interakcija u organizmu što nazivamo oksidacijskim stresom. Slobodni radikali mogu biti kisikovi ili dušikovi reaktivni spojevi (superoksid i hidroksilni radikali kisika, dušični monoksid i dioksid). Biološki su najznačajniji kisikovi reaktivni spojevi (*engl. reactive oxygen species*, ROS), što je zajednički naziv za radikale kisika kao i njegove reaktivne neradikalne derivate (Tablica 1). Oni uključuju niz kemijski reaktivnih molekula nastalih metabolizmom kisika. Djelujući kao oksidansi, reaktivne kisikove vrste (RKV) mijenjaju svojstva tvari s kojima reagiraju te stoga interferiraju i s njihovom funkcijom, tj. djeluju toksično.

Uz reaktivne kisikove vrste, veliku važnost imaju i reaktivne dušikove vrste (*engl. reactive nitrogen species*, RNS), u koje ubrajamo dušikove slobodne radikale kao što su dušikov(II)oksid ( $\text{NO}^\bullet$ ) i dušikov(IV)oksid ( $\text{NO}_2^\bullet$ ) te spojeve i molekule kao peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) i nitrozilni kation ( $\text{NO}^+$ ).

**Tablica 1.** Reaktivne kisikove vrste (RKV)

<p><b>Slobodni radikali:</b></p> <p>superoksid, <math>O_2^- \cdot</math></p> <p>hidroksilni radikal, <math>OH \cdot</math></p> <p>peroksilni radikal, <math>ROO \cdot</math></p> <p>alkoksilni radikal, <math>RO \cdot</math></p> <p>hidroperoksilni radikal, <math>HO_2 \cdot</math></p>	<p><b>Spojevi koji nisu slobodni radikali:</b></p> <p>vodikov-peroksid, <math>H_2O_2</math></p> <p>hipokloritna kiselina, <math>HClO</math></p> <p>ozon, <math>O_3</math></p> <p>singletni kisik, <math>^1O_2</math></p> <p>hidroperoksid, <math>ROOH</math></p>
---	--

### 2.2.1 Izvori reaktivnih kisikovih vrsta

Reaktivne kisikove vrste u aerobnim organizmima mogu nastati na više načina: tijekom metabolizma kisika u procesu oksidativne fosforilacije u mitohondrijima, tijekom fagocitoze, kemotaksije, apoptoze, koagulacije, hipoksije ili hiperoksije, u toku apsorpcije zračenja, prilikom transformacije egzogenih i endogenih supstrata u endoplazmatskom retikulumu, u procesu metabolizma etanola, u enzimskim reakcijama koje kataliziraju oksidaze, u reakcijama oksidoredukcije u prisustvu metala s promjenjivom valencijom te u procesu lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina. Izvori RKV mogu biti unutarnji i vanjski (Tablica 2).

**Tablica 2.** Unutarnji i vanjski izvori RKV

UNUTARNJI	VANJSKI
NAD(P)H oksidaza	Toksini iz okoliša
Mitohondriji	Električno polje
Peroksisomi	Ionizirajuće zračenje
Citokrom P450	Ultraljubičasto svjetlo
Ciklooksigenaze	Kemoterapeutici
Lipooksigenaze	Upalni citokini
Ksantin oksidaza	
$\gamma$ -glutamil transpeptidaze	

Enzimi koji su sposobni stvarati RKV su brojni, a uključuju citokrome P450, različite oksidaze, peroksidaze, lipooksigenaze i dehidrogenaze. Podaci iz literature pokazuju da do 4% ukupnog kisika uključenog u proces oksidativne fosforilacije u mitohondrijima odlazi na stvaranje RKV (Dalton i sur. 1999; Kehrer, 2000.) pa se mitohondrij smatra glavnim izvorom njihova nastajanja. RKV također proizvode sustav ksantin/ksantin oksidaza, lipooksigenaze i ciklooksigenaze. Osim toga, poznato je da RKV nastaju u procesu fagocitoze. Pri kontaktu s patogenim bakterijama, u fagocitnim stanicama se odvija tzv. respiratorni prasak (engl. respiratory burst), kojeg karakterizira povećana potrošnja kisika i stvaranje RKV, za koje je direktno odgovoran membranski vezani sustav NADPH oksidaze (van Eeden i sur. 1999.).

### 2.2.2 Štetan učinak slobodnih radikala

Uslijed oksidacijskog oštećenja lipida, nastaje lipidna peroksidacija koja uzrokuje promjene u fluidnosti i permeabilnosti membrana. Stoga dolazi do perforacije stanične membrane s povećanom propusnošću, smrti stanice ili nakupljanja peroksidnih lipida u postupku starenja te stvaranja reaktivnih metabolita (malondialdehida (MDA), 4-hidroksinonenala (HNE), izoprostana) i drugih produkata lipidne peroksidacije.

Oksidacijsko oštećenje DNA uzrokuje disocijaciju šećernih komponenti, modifikaciju baza te pucanje prstena, a posljedično se javljaju pogreške pri translaciji, inhibicija sinteze proteina, mutacije i naposljetku kancerogeneza.

Oksidacija proteina predstavlja veliku štetu zbog toga što proteini obavljaju većinu poslova u živim organizmima. To može utjecati na brojne stanične procese uključujući odgovore na stres, starenje i razvoj različitih bolesti. Drugim riječima, akumulacija oksidativnog oštećenja u proteinima smanjuje efikasnost i preciznost vitalnih biokemijskih procesa što rezultira staničnom degeneracijom i smrću.

Proteini mogu biti modificirani velikim brojem različitih oksidativnih reakcija (Cai i Yan, 2013.).

Opći tipovi oksidacijske modifikacije proteina su:

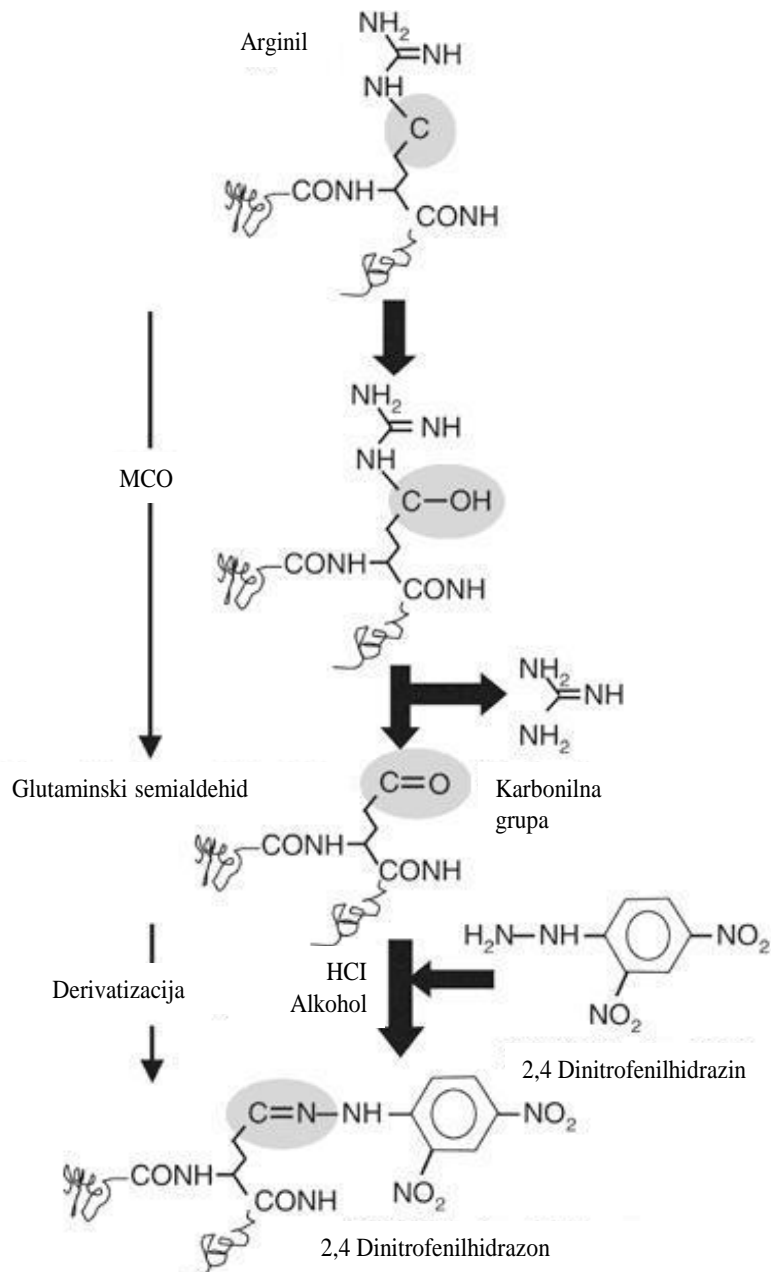
- oksidacija sumpora (disulfidi)
- proteinski karbonili (postranični aldehidi, ketoni)
- hidroperoksilni derivati alifatskih aminokiselina
- aminokiselinske interkonverzije (npr. His u Asn; Pro u OH-Pro)
- aminokiselinski oksidacijski produkti (npr. *p*-hidrokisfenilacetaldehid)
- disocijacija peptidnih veza

### **2.3 Oksidacijska karbonilacija proteina**

Karbonilacija proteina je biokemijska promjena proteina kojom se uvode karbonilne grupe (C=O) u proteine. Uvođenje karbonilnih grupa u proteine nastaje kao posljedica izloženosti oksidacijskom stresu. Fizikalno-kemijske promjene koje nastaju kod karboniliranih aminokiselina uzrokuju gubitak identiteta aminokiselinskog bočnog lanca. Zbog ireverzibilne prirode takvih promjena (Nystrom, 2007.), karbonilacija predstavlja najštetniji oblik oksidativnog oštećenja proteina.

Karbonilirani proteini gube svoju strukturu, a time i enzimatsku aktivnost pa povećana razina nefunkcionalnih proteina u stanici uzrokuje poremećaj staničnih funkcija. Umjereno karbonilirani proteini se razgrađuju proteolizom, dok se teško karbonilirani proteini povezuju međusobno kovalentnim vezama u netopljive proteinske agregate otporne na proteolitičku razgradnju.

Karbonilne grupe nastaju oksidacijom izloženih bočnih lanaca hidrofilnih aminokiselina prolina, arginina, lizina i treonina, često kataliziranom metalima (eng. Metalcatalyzed Oxidation, MCO), što ih čini hidrofobnijim i time sklonim agregaciji radi isključenja vode. Nadalje, karbonilni derivati lizina, cisteina i histidina mogu nastati u sekundarnim reakcijama s reaktivnim karbonilnim komponentama na ugljikohidratima (produkti glikooksidacije), lipidima i krajnjim produktima glikacije/lipooksidacije (Slika 2).



**Slika 2.** Karbonilacija i derivatizacija aminokiselinskog bočnog (postranog) lanca proteina (preuzeto i prilagođeno iz Nystrom, 2005.)

Kvantitativno najvažniji produkti reakcije karbonilacije su glutaminski semialdehid arginina i prolina te aminoadipinski semialdehid lizina (Requena i sur., 2003.). U usporedbi s drugim oksidacijskim modifikacijama, nastanak karbonila je relativno teško inducirati te je u odnosu na npr. formiranje metionin sulfoksida i disulfidne veze cisteina taj oksidacijski proces ireverzibilan (Dalle-Donne i sur., 2003.).

Stoga stanica mora razgraditi karbonilirane proteine kako bi ih uklonila. Određivanje razine karbonilnih grupa u proteinima se često koristi za mjerenje razine oksidacijskih oštećenja proteina. Razvijene su različite metode za detekciju i kvantifikaciju proteinskih karboniliranih grupa i većina njih uključuje derivatizaciju karbonilnih grupa s 2,4-dinitrofenilhidrazinom te imunodetekciju nastalog hidrazona korištenjem monoklonalnih ili poliklonalnih antitijela (Levine, 2002).

U prijašnjim istraživanjima se pokazalo da je razina oksidativno modificiranih proteina u fibroblastima pojedinaca s Hutchinson-Gilford progerijom i Wernerovim sindromom (dva genetička poremećaja povezana s ubrzanim starenjem), znatno veća nego kod kontrolnih individua iste dobi (Oliver i sur, 1986.).

Iako različito smotani, proteini mogu imati različitu rezistenciju na oksidativni stres, proteini nativne strukture su najčešće robustniji od onih koji su pogrešno smotani (Dukan sur. 2000.). Čak i u konstantnim, fiziološkim koncentracijama RKV, pogrešno smatanje proteina povećava njihovu osjetljivost na karbonilaciju *in vivo* (Dukan i sur. 2000; Fredriksson i sur. 2005.) Proteinska karbonilacija je povećana prilikom toplinskog šoka, nakon tretmana s puromicinom i streptomycinom kao i pri svim ostalim vrstama stresa koji dovode do pogrešnog smatanja i/ili odmatanja proteina (Dukan sur. 2000.). Njihova rezistencija na karbonilaciju *in vivo* je smanjena zbog aminokiselinskih supstitucija koje dovode do pogrešnog smatanja (Dukan sur. 2000; Fredriksson i sur. 2005). Već je iz prijašnjih istraživanja poznato da su pogrešno smotani proteini podložniji proteinskoj karbonilaciji. Međutim, ostaje nepoznanica zašto postoji razlika u otpornosti na oksidacijski stres kod pojedinačnih proteina koji se nalaze u svojoj nativnoj strukturi. Povišena karbonilacija proteoma *in vivo* u uvjetima pri kojima dolazi do pogrešnog smatanja proteina (Dukan sur. 2000; Fredriksson i sur. 2005), sugerira hipotezu da proteini rezistentniji na pogrešno smatanje mogu biti rezistentniji i na karbonilaciju.

Intenzivnim proučavanjem osnova robusnosti ustanovljeno je da stanična održivost i preživljenje bakterija i beskralješnjaka korelira kvantitativno s karbonilacijom staničnog proteoma (Kriško i Radman, 2010.).



### 2.3.1 Karbonilacija proteina i starenje

Brojna istraživanja su pokazala da se karbonilacija proteina povećava sa starošću stanica, organela i tkiva u različitim vrsta. Molekularni šaperoni su skupina proteina koji održavaju kvalitetu proteina u živim stanicama. Pokazano je kod bakterije *E. coli* da povećana ekspresija šaperona dovodi do smanjenja karbonilacije proteina te poboljšanja fitnessa stanice, što uključuje i smanjenu frekvenciju mutacija (Kriško i Radman, 2013.)

Slične studije nisu provedene na eukariotskim stanicama koje bi mogle poslužiti kao modeli za istraživanje trajanja životnog vijeka. Pupajući kvasac, *Saccharomyces cerevisiae*, je priznat i najčešće korišten model za istraživanje starenja eukariotskih stanica.

### 2.4 Genomska kompozicija nukleotida u genomu prokariota

U molekularnoj biologiji i genetici, GC-sadržaj (ili gvanin-citozinski sadržaj) i AT (ili adenin-timinski sadržaj) predstavljaju udio dušičnih baza u molekuli DNA. Ovaj parametar se može odnositi na specifični fragment molekule DNA ili RNA ili na cijeli genom. Da bi se razumjela evolucija, struktura i funkcija genoma, važno je znati opće kompozicijske karakteristike DNA. Varijabla koja korelira sa strukturnim svojstvima proteina je sadržaj nukleotida u genu koji kodira za taj protein (Mendez i sur. 2010.)

U genomu prokariota, genomska kompozicija nukleotida varira između visokog adenin+timin (A+T) sadržaja npr. kod obligatornih unutarstaničnih bakterija i visokog gvanin+citozin (G+C) sadržaja npr. kod slobodno živućih bakterija (Mendez i sur. 2010.). Sadržaj GC i AT obično se izražava u postotcima, a u nekim slučajevima kao njihov odnos.

Struktura genetičkog koda koja je bogata A+T nukleotidima, favorizira ugradnju aminokiselina fenilalanina, asparagina, lizina, tirozina, izoleucina u translatirani protein zbog sastava kodona koji za njih kodiraju (D'Onofrio i sur., 1999.). Genomska kompozicija koja sadrži pretežno G+C nukleotide odgovara aminokiselinama glicin, prolin, alanin i arginin. Dok druga grupa (G+C) sadrži aminokiseline koje destabiliziraju strukturu proteina (Uversky, 2013.), prva grupa (A+T) se sastoji od aminokiselina koje stabiliziraju proteinsku hidrofobnu unutrašnjost (F, I, Y) (Bastolla i sur., 2005.) ili aminokiselina koje prilikom izlaganja otapalu pridonose stabilnosti proteinske površine (Hill i DeGrado, 2000.)

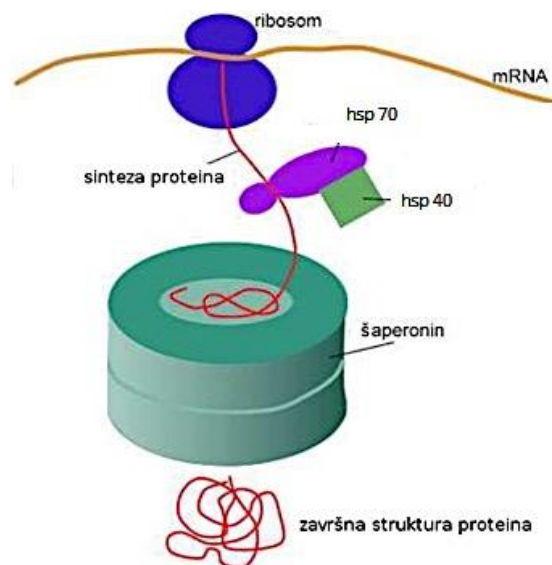
## 2.5 Molekularne osnove starenja

Starenje bioloških sustava nastaje usprkos brojnim složenim putovima održavanja i popravaka. Iako starenje često uzrokuje specifične bolesti koje su povezane sa starenjem, samo starenje ne može se smatrati bolešću. Naprotiv, to je prirodna pojava koja utječe na cijelu fiziologiju organizma. Razjašnjenje molekularnih mehanizama na kojima se temelji ovaj složeni proces i dalje ostaje veliki izazov.

Stresori stanice su sveprisutni i česti, dovodeći do odgovora na stres aktiviranjem mehanizama protiv stresa. Ovi mehanizmi uključuju različite molekule, među kojima su i molekularni šaperoni. Šaperoni pomažu drugim proteinima i RNA molekulama pravilno smatanje, odmatanje i transport do mjesta djelovanja. Iz ovoga proizlazi da će zatajenje šaperona imati veći ili manji utjecaj na jednu ili više staničnih funkcija, što može dovesti do ubrzanog starenja i bolesti.

## 2.6 Šaperoni

Većina novo-sintetiziranih proteina u stanici treba za svoje pravilno smatanje pomoć različitih proteinskih kofaktora – molekularnih šaperona. Slika 3. prikazuje interakciju šaperona s novonastalim polipeptidom te njegovu asistenciju pri smatanju polipeptida u njegovu nativnu strukturu.



**Slika 3.** Interakcija šaperona sa novosintetiziranim polipeptidom i pomoć pri smatanju u funkcionalnu strukturu. Preuzeto i prilagođeno sa:

<http://forum.krstarica.com/showthread.php/315112-%28Biologija%29-Globularni-proteini>

## 2.6.1 Uloga šaperona u smatanju proteina

Šaperoni imaju sljedeće uloge u metabolizmu proteina:

- Prepoznaju i selektivno vežu polipeptidni lanac pomoću njihovih hidrofobnih aminokiselina
- Sprječavaju nepravilno smatanje i agregaciju proteina
- Pomažu formiranje funkcionalne konformacije proteina
- Dostavljaju proteine u odgovarajuće stanične odjeljke
- Sprječavaju neproduktivne reakcije proteina s drugim staničnim komponentama
- Dostavljaju oštećene proteine na razgradnju
- Djeluju kao sustav kontrole kvalitete proteina
- Pomoć u slučaju staničnog izlaganja stresu koji uzrokuje odmatanje proteina; šaperoni ih vežu i štite jer za vrijeme stresa proteini se ne mogu smatati
- Po potrebi zadržavaju novo-sintetizirane proteine u nedovršenoj konformaciji pogodnoj za translokaciju između membrana - prijenos u endoplazmatski retikulum
- Djeluju kao katalizatori zato što trenutno stupaju u interakciju sa svojim supstratom, ali nisu prisutni u finalnom produktu

Neke eukariotske stanice obilježavaju 30-40% novo-sintetiziranih proteina za degradaciju odmah nakon njihove sinteze. Pretpostavka je da se proteini nepravilno smataju uslijed pogrešaka u translaciji ili zbog nedovoljne asistencije proteinskih šaperona u početnim stadijima smatanja u nativnu strukturu. Još uvijek se sa sigurnošću ne zna da li svi novo-sintetizirani proteini stupaju u interakciju sa šaperonima. Ne zna se mnogo o svim interakcijama koje se odvijaju međusobno između različitih šaperona, kao ni s novo-sintetiziranim proteinima i drugim proteinima koji su meta šaperona te koji šaperoni prvi stupaju u interakciju sa novonastalim polipeptidima. Međutim, poznato je da je NAC (engl. nascent associated complex) proteinski heterodimer konzerviran u genomima svih eukariota od kvasaca do ljudi. NAC se sastoji od  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica, koje formiraju dimer. NAC je komponenta citoplazmatskih ribosoma koja se reverzibilno veže za ribosom i stupa u kontakt s novosintetiziranim polipeptidom koji izlazi iz ribosoma kako bi ga zaštitio od proteolize te olakšao njegovo smatanje u nativnu strukturu. NAC sudjeluje u okupljanju i transportu *de novo* sintetiziranih proteina te u biogenezi ribosoma. Dimer  $\alpha$ NAC podjedinice veže se na RNA i DNA gdje djeluje kao transkripcijski faktor, dok  $\beta$  podjedinica zajedno s kaspazom 3 sudjeluje u apoptozi (Kogan i Gvozdev, 2014.).

Mutanti kvasca kojima nedostaje NAC sintetiziraju polipeptide normalno, ali imaju manji broj ribosoma na površini mitohondrija, također imaju defekte na mitohondrijima te smanjenu razinu proteina kao što je fumaraza, koji u normalnim uvjetima odlazi u mitohondrije ko-translacijski (Georgea i sur., 2002.).

Hsp70 familija šaperona su središnje komponente stanične mreže molekularnih šaperona i katalizatora smatanja. Oni sudjeluju i pomažu u različitim procesima smatanja proteina u stanici vezivanjem domene koja vezuje supstrate s kratkim hidrofobnim segmentima peptida unutar njihovih proteinskih supstrata. Vezivanje ATP-a i hidroliza su esencijalni za aktivnost Hsp70 *in vitro* i *in vivo*. Za neke specifične stanične procese Hsp70 djeluje zajedno i s drugim šaperonima, kao što su Hsp90 i Hsp100. Sudjeluju u različitim procesima smatanja, uključujući smatanje i okupljanje novosintetiziranih proteina, ponovno smatanje pogrešno smotanih i agregiranih proteina, membransku translokaciju sekretornih proteina, kao i kontrolu aktivnosti regulatornih proteina (Bukau i sur., 2000; Hartl i Hayer-Hartl, 2002; Young i sur., 2003; Neupert i Brunner, 2002; Ryan i Pfanner, 2002; Pratt i Toft, 2003; Toft, 1999.).

Sve ove aktivnosti su bazirane na mogućnosti interakcije Hsp70 sa hidrofobnim peptidnim segmentima proteina u ATP-kontroliranim uvjetima. Široki spektar staničnih funkcija Hsp70 proteina postignut je (i) amplifikacijom i diverzifikacijom gena *hsp70* u evoluciji, koja je stvorila specijalizirane Hsp70 šaperone, (ii) ko-šaperonima koji su selektivno regrutirani od strane Hsp70 šaperona kako bi izvršili specifične stanične funkcije i (iii) kooperacijom Hsp70 s ostalim šaperonskim sistemima kako bi proširili spektar djelovanja. Dakle, Hsp70 proteini su konstruirali kompleksnu mrežu "strojeva" za smatanje sa svojim ko-šaperonima i kooperativnim šaperonima (Mayer i Bukau, 2005.). Hsp90 je visoko rasprostranjen molekularni šaperon koji zauzima esencijalnu ulogu u brojnim staničnim procesima uključujući kontrolu staničnog ciklusa, stanično preživljavanje, hormonske i ostale signalne puteve. Važan je za stanični odgovor na stres te ima glavnu ulogu u održavanju stanične homeostaze. U posljednjih 10 godina postao je važna terapijska meta za rak, a također je porastao interes i za neurodegenerativne bolesti, te za razvoj anti-virusnih i anti-protozoanskih infekcija. Kao i većina ostalih familija molekularnih šaperona, Hsp90 je ovisan o aktivnosti ATP-a, te su vezivanje ATP-a i hidroliza odgovorni za promjene u strukturnoj dinamici proteina. Također, koriste i ko-šaperone koji osim što reguliraju ATP-aznu aktivnost i strukturnu dinamiku, sudjeluju u interakcijama s proteinskim klijentima od Hsp90 (Jackson, 2013.).

## 2.7 KVASAC

### 2.7.1 Kvasac kao modelni organizam

Kvasac je čovječanstvu poznat od davnina u proizvodnji kruha, piva i vina. Danas se metabolizam kvasca koristi u proizvodnji farmaceutskih pripravaka, enzima, različitih okusa te drugih tvari. Kako je njegova upotreba sve češća i raznovrsnija, detaljno su istraženi njegovi fiziološki procesi te metabolizam. Ova istraživanja smjestila su kvasac ne samo u vodeći industrijski mikroorganizam, nego i u vodeći eukariotski model u znanstvenim istraživanjima (Perez-Ortin i sur., 2002.)

Kvasac je prvi eukariotski organizam čiji je genom u potpunosti sekvencioniran, čime su stvoreni preduvjeti za stvaranje banke sojeva kvasca kojima nedostaju pojedini geni (*The yeast genome directory*, 1997.). Ovime su pak otvoreni putevi za razvoj novih tehnika pa su tako prvi DNA mikročipovi za analizu transkripcije gena te prvi proteomski čip napravljeni upravo na kvascu (Zhu i sur., 2001.). Također, radi jednostavnosti sustava, kvasac postaje sve popularniji model i u temeljnim medicinskim istraživanjima. Neke prednosti kvasca kao eukariotskog modela u znanosti navedene su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Karakteristike kvasca koje ga čine dobrim eukariotskim modelom.

<b>Kvasac kao eukariotski model</b>
Velika očuvanost (homologija) na razini organizacije stanice, gena i staničnih procesa s odvedenijim eukariotskim organizmima, uključujući i čovjeka.
Kratko vrijeme udvostručavanja (oko 1,5 h), vrlo velika gustoće stanica (>108 stanica/ml), veliki omjer površina/volumen
Poznata fiziologija
Mendelova genetika
Lagana manipulacija genima
Dobro uspostavljeni vektorski sustavi
Poznati genom od 1996. godine
Kolekcije deletiranih mutanata za sve gene (ako su vijabilni)
DNA čipovi za analizu transkripcije
Potpuni set proteina fuzioniranih na reporterske proteine GFP
Dobro istražene i dostupne mape proteinskih interakcija

## 2.7.2 Biologija kvasca

Pupajući kvasac, *Saccharomyces cerevisiae*, je jednostanični eukariotski organizam koji se u prirodi može nalaziti u dva oblika, haploidnom i diploidnom. Haploidne stanice, nastaju iz diploidnih stanica, mejozom, u procesu sporulacije pri čemu iz jedne diploidne stanice nastaju četiri haploidne stanice (spore), a određuje ih tip parenja,  $a$  i  $\alpha$ . Proces sporulacije karakterističan je za stresne uvjete poput suše ili nedostatka hrane. Haploidne stanice različitog tipa parenja ( $a$  i  $\alpha$ ) spajaju se u diploidnu stanicu ( $a\alpha$ ). U povoljnim uvjetima i diploidne i haploidne stanice razmnožavaju se mitozom (pupanjem) (Herskowitz, 1988.).

Haploidni genom kvasca, *Saccharomyces cerevisiae*, sastoji se od 16 kromosoma, veličine od 200 do 2 200 kb, što ukupno iznosi 12 052 kb. Tip parenja (MAT, eng. Mating type locus), smješten je na trećem kromosomu koji sadrži i „tihe“ gene za oba tipa parenja (lokus HML sadrži tihi gen  $\alpha$ , dok lokus HMR sadrži tihi gen  $a$ ). Haploidne stanice sposobne su mijenjati tip parenja i prema tome razlikujemo homotalične i heterotalične stanice. Naime, homotalične stanice sadrže aktivnu endonukleazu HO koja sudjeluje u premještanju „kazete“ s HML, odnosno HMR lokusa na MAT lokus koji predstavlja aktivne gene i određuje tip parenja. Tako homotalične stanice izmjenjuju tip parenja svakom generacijom. Heterotalične stanice nemaju aktivnu ovu endonukleazu te ne izmjenjuju tip parenja. Laboratorijski haploidni sojevi kvasca su heterotalični kako ne bi došlo do spontanog stvaranja diploida (Herskowitz, 1988.).

## 2.7.3 Pupajući kvasac *Saccharomyces cerevisiae* kao modelni organizam za replikativno starenje

Genetička manipulacija kvasca jednostavna je i jeftina u usporedbi s manipulacijom viših organizama poput crva, vinske mušice i, naravno, sisavaca. Pupajući kvasac, *S. cerevisiae*, je priznat i najčešće korišten model za istraživanje starenja eukariotskih stanica te je za razliku od drugih modelnih organizama, direktno ili indirektno pridonio identifikaciji gena vezanih za starenje kod sisavaca. Dvije uspostavljene paradigme koje se koriste u istraživanju starenja kod kvasca su replikativno i kronološko starenje. Replikativno starenje je model za određivanje starenja mitotički aktivnih stanica, definirano kao broj stanica kćeri kojeg proizvede jedna stanica majke prije ulaska u senescenciju. S druge strane, kronološko starenje je model za određivanje starenja post-mitotičkih stanica, definirano duljinom vremena u kojem stanice mogu preživjeti bez dijeljenja (Steffen i sur., 2009.). Kvasac *S. cerevisiae* je zaslužan za otkriće dvaju od vodećih mehanizama proučavanih u kontekstu

starenja i bolesti vezanih za starenje, put sirtuina i signalni put TOR (engl. Target of Rapamycin) (Longo, 2012.). Zbog dobro okarakteriziranog genoma i proteoma koji su pogodni za genetičku manipulaciju te mogućnosti efikasnih metoda pretraživanja, kvasac *S. cerevisiae* će nastaviti služiti kao vodeći modelni organizam za istraživanje mehanizama starenja i bolesti vezanih za starenje kod ljudi.

#### **2.7.4 Fenomen starenja i replikativno starenje kod kvasca**

Osnovni uvjet za praćenje procesa starenja kod organizama je mogućnost raspoznavanja i praćenja individualnih jedinki tijekom vremena. Praćenje procesa starenja je lako izvedivo kod višestaničnih eukariota kao što su mušice, miševi, i ljudi, dok je kod mikrobnih organizama takvo praćenje gotovo nemoguće. Problem je vezan uz činjenicu da se većina mikroorganizama dijeli simetrično, od jedne nastaju dvije stanice koje se vizualno međusobno ne razlikuju (od stanica koje su ih proizvele). Kvasac *S. cerevisiae* se dijeli asimetrično pupanjem, stanica majka daje manju stanicu kćer (pup), koja je vizualno i molekularno drugačija, što omogućava razlikovanje stanice majke od pupova i njeno praćenje kao jedinke tokom vremena. Kako bi se izbjeglo formiranje kolonija i osiguralo da se tokom eksperimenta prati jedna te ista stanica majka, pupovi odnosno stanice kćeri se uklanjaju od stanice majke pomoću mikromanipulatora.

Studije o replikativnom starenju započele su prije više od 50 godina (Mortimer i Johnston, 1959.). Analiza je konceptualno jednostavna zbog asimetrične podjele stanica kvasca. Ključno pitanje bilo je koliko puta se jedna stanica kvasca može podijeliti? Eksperimenti Mortimera i Johnstona (Mortimer i Johnston, 1959.), po prvi puta pokazuju da su stanice kvasca smrtne.

Uklanjanjem stanica kćeri od većih stanica majke, pokazali su da individualne stanice kvasca imaju određeni broj dioba (otprilike 20-25), koje definiraju replikativni životni vijek, nakon kojih ulaze u post-replikativno stanje (Muller i sur. 1980.). Iako su individualne stanice kvasca smrtne, populacija je besmrtna i nije dijelom klonalne senescencije koja je prisutna kod individualnih stanica metazoa. Stopa smrtnosti kod kvasca raste eksponencijalno kao funkcija starosti (Pohley, 1987; Jazwinski i sur., 1989.), ali u kasnijoj fazi pokazuje usporavanje diobe (Jazwinski i sur., 1998.). Nadalje, kvasci su tokom starenja podložni brojnim promjenama (Jazwinski, 1999.a), od kojih se većina odnosi na funkcionalne promjene.

Prosječan životni vijek je relativno konstantan za pojedini soj (Johnston, 1966; Mortimer i Johnston, 1959; Muller, 1971.), sugerirajući da na životni vijek kvasca snažno utječe genetska pozadina. Životni vijek različitih haploidnih sojeva kvasaca određen na kompletnom glukoznom mediju u prosjeku iznosi između 16 i 29 dioba, dok je maksimalni životni vijek ovih sojeva u mediju s etanolom bio 67 dioba (Muller, 1985.). Na životni vijek ne utječe ploidnost (Muller, 1971.), bogatstvo medija (Silar i sur., 1997.) ili temperatura (Muller i sur., 1980.). Zahvaljujući ovim zapažanjima, kvasac se koristi kao model za genetsko istraživanje starenja.

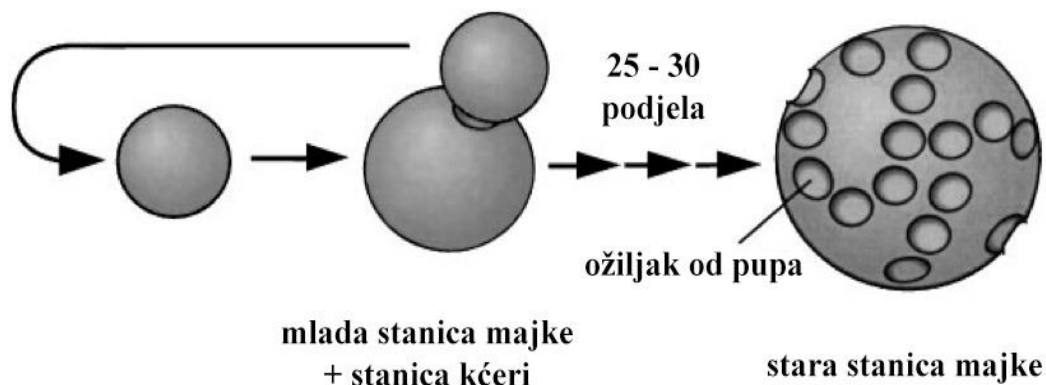
### **2.7.5 Gubitak asimetrije**

Stanice kvasca imaju ograničeni broj dioba koje su neovisne o kronološkoj starosti (Mortimer i Johnston, 1959; Muller i sur., 1980.), kao i većina stanica sisavaca u kulturi (Hayflick i Moorhead, 1961.). Kako stanice kvasca stare, postaju sve veće, ali i dalje daju male stanice kćeri tijekom kasne faze životnog vijeka. Međutim, najstarije stanice majke najčešće proizvode veće, kratko-živuće stanice kćeri (Johnston, 1966; Kennedy i sur., 1994; Mortimer i Johnston, 1959.). Prilikom posljednje diobe, stanica kćer se često ne odvaja od majke sve dok obje stanice ne postanu slične veličine (Johnston, 1966; Kennedy i sur., 1995.). Gubitak asimetrije u starim stanicama je intrigantan zbog toga što predstavlja još jedan argument difuzijskog faktora starenja. Kada diobe prestanu biti asimetrične, razlika između majke i kćeri nestaje, faktori starenja difuzijom se podjednako raspodjele u obje stanice, što objašnjava niži replikativni potencijal stanica kćeri koje potječu od stare majke.

### **2.7.6 Kronološki i replikativni životni vijek**

Životni vijek većine višestaničnih organizama izražen je u jedinicama vremena. Životni vijek kvasca također se može mjeriti i kronološki, međutim, ne postoji snažna poveznica između kronološkog i replikativnog starenja. Na primjer, kronološki životni vijek kvasca može se povećati, bez velikog utjecaja na replikativni životni vijek, hlađenjem stanica, kratkim blokiranjem stanične podjele, usporavanjem stope pupanja (Muller i sur., 1980.). Tijekom replikativnog starenja i starenja općenito, kvasci pokazuju brojne karakteristične morfološke i fiziološke promjene. Neke promjene se manifestiraju vizualno, dok se ostale reflektiraju na suptilnije efekte, uključujući promjene u genskoj ekspresiji. Slika 4. sažima promjene vezane za starenje kod kvasca.



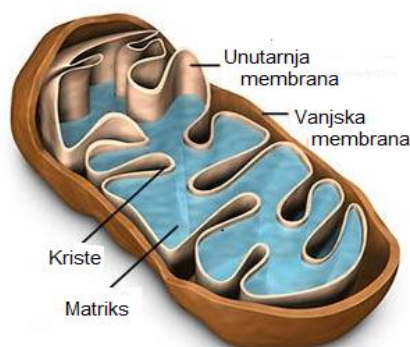


**Slika 4.** Biomarkeri starenja kvasca. *S. cerevisiae* dijeli se asimetrično dajući stanicu majke i manju stanicu kćeri svaki stanični ciklus. Ovaj proces rezultira stvaranjem tzv. ožiljaka od pupova na površini stanice majke, čiji broj služi kao mjera za starost. (preuzeto i prilagođeno iz Sinclair i sur., 1998.)

### 2.7.7 Mitohondriji i njihova uloga u procesu starenja

Mitohondriji su stanični organeli eukariotskih stanica, esencijalni u brojnim biološkim (fiziološkim) procesima uključujući metabolizam, signaliziranje, apoptozu, stanični ciklus i diferencijaciju. Specifično su odgovorni za proizvodnju stanične energije, proizvodnjom adenozin trifosfata (ATP) putem elektronskog transportnog lanca (engl. electron transport chain-ETC) koji se odvija na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani (Hwang i sur., 2012).

Sastoji se od dvije membrane, od kojih je vanjska relativno napeta, a unutarnja membrana koja sadrži enzime i proteine naborana je da bi joj se povećala površina i tako povećala mogućnost stvaranja ATP-a. U unutrašnjosti mitohondrija je osnovna supstanca matriks, u koji ulaze nabori unutarnje membrane (Slika 5). U matriksu se nalaze prstenasta molekula DNK, ribosomi i enzimi. Vjeruje se da su nastali endosimbiozom od aerobnih bakterija te zbog toga sadržavaju 70 S ribosome i prstenastu DNA kao i većina prokariota.



**Slika 5.** Građa mitohondrija (preuzeto i prilagođeno: <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/images/>)

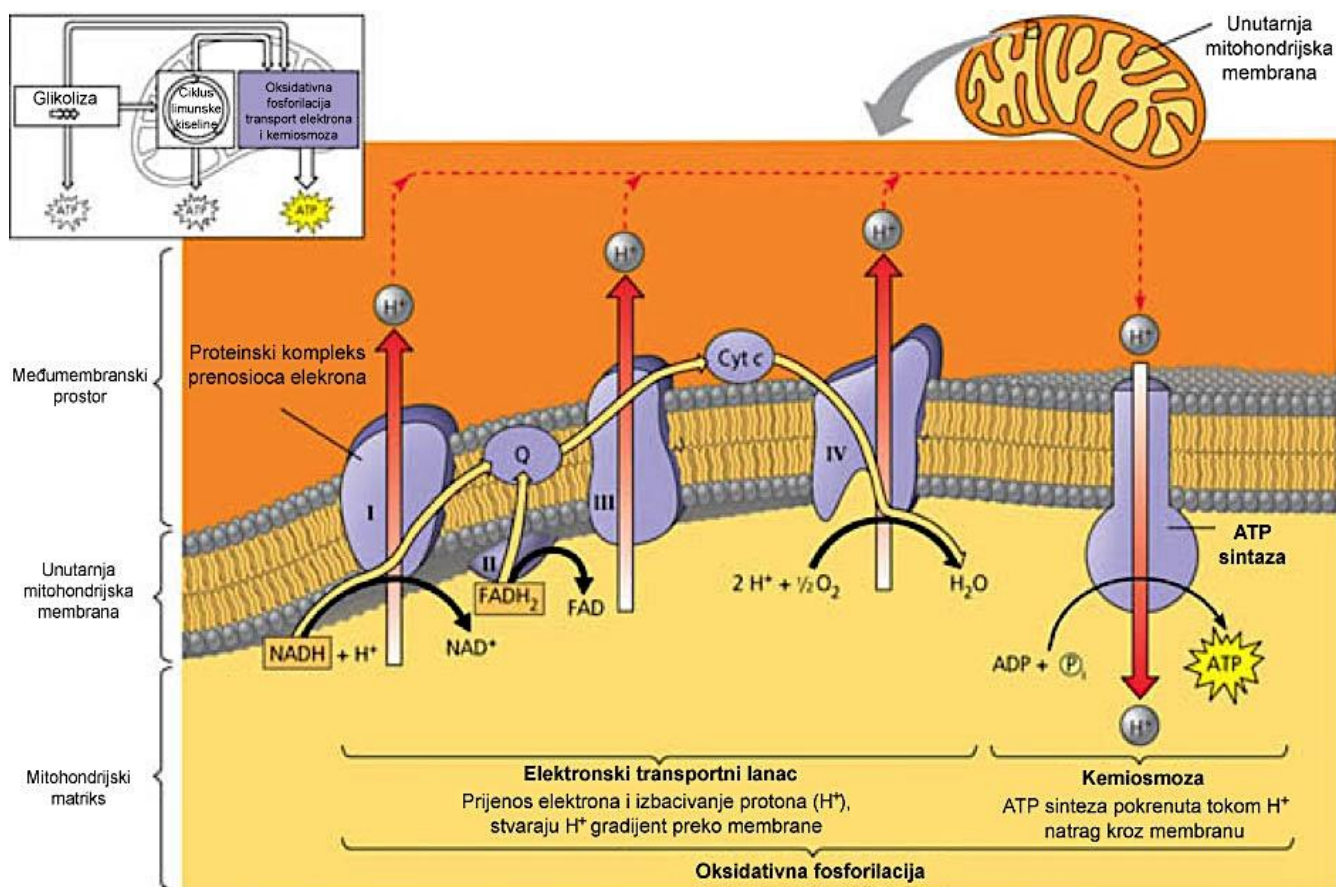
Zbog njihove iznimne važnosti u staničnoj fiziologiji, defekti u mitohondrijima često se povezuju s brojnim ljudskim bolestima (Wallace, 2005). U prilog tome, većina istraživanja je pokazala da mitohondriji imaju važnu ulogu u starenju i bolestima vezanim za starenje kao što su dijabetes, neurodegenerativne bolesti, rak. Teorija starenja zbog slobodnih radikala, po prvi puta iznesena od strane Harmana 1950-tih, predlaže kako je glavni uzrok starenja nakupljanje oštećenja koja su rezultat proizvodnje toksičnih reaktivnih kisikovih vrsta (engl. ROS) (Harman, 1956.). Ova teorija je redefinirana u mitohondrijsku teoriju starenja (ili teoriju starenja zbog oksidativnog oštećenja), jer mitohondriji su se pokazali kao glavni izvor staničnih RKV-a (Harman, 1972.). Prema toj teoriji, kako organizam stari, mitohondriji nakupljaju oksidativna oštećenja stvaranjem RKV-a tijekom transporta elektrona u svrhu proizvodnje ATP-a. Pokazano je da mitohondriji nisu samo glavni izvori RKV-a već su i pod utjecajem njihovog štetnog djelovanja. Proizvodnja mitohondrijskih RKV-a posljedica je oksidativne fosforilacije u kompleksima respiratornog lanca I i III, gdje elektroni donirani od NADH i FADH<sub>2</sub> direktno reagiraju s kisikom ili nekim drugim molekulama (akceptor) koje prihvaćaju elektrone te stvaraju slobodne radikale (Andreyev i sur., 2005; Jezek i Hlavata, 2005; Muller i sur., 2004.). Naime, porast redoks potencijala pri kompleksima I i III potiče stvaranje RKV-a (Kushnareva i sur., 2002; Chen i sur., 2003.). Ovaj proces uzrokuje mitohondrijsku disfunkciju zbog visoko reaktivnih RKV-a koji uništavaju makromolekule poput proteina, lipida i DNA. Posljedica je, tijekom vremena, propadanje osnovnih funkcija u organizmu uzrokujući starenje organizma i na kraju, smrt.

Stanice sisavaca su tijekom evolucije razvile sofisticirani sistem obrane za neutraliziranje RKV-a i njihovo preoblikovanje u ne-toksične oblike, koji uključuje katalazu, glutation reduktazu, glutation peroksidazu (Ma i sur., 2009.) i mangan superoksid dismutazu (SOD), koja je jedan od glavnih antioksidativnih enzima u stanici. Stanica, naime, posjeduje dva enzima SOD: MnSOD ili SOD<sub>2</sub> koji je smješten u matriksu mitohondrija i SOD<sub>1</sub> (Cu-Zn) koji se nalazi u unutrašnjoj membrani mitohondrija i u citoplazmi. Povećanje ekspresije spomenutih enzima rezultira povećanim životnim vijekom kod životinjskih modela te pokazuje poveznicu između proizvodnje RKV-a i dugovječnosti, iako je ova hipoteza još uvijek kontroverzna (Gems i Doonan, 2009.). Jedan od važnijih primjera koji podupire oksidacijsku teoriju starenja proizlazi iz analize povećane ekspresije MnSOD u mušici *Drosophila melanogaster* koja je pokazala pozitivan utjecaj na povećanje životnog vijeka (Sun i sur., 2002.). Nadalje, povećana ekspresija SOD<sub>1</sub> u specifičnim tkivima motornih neurona pokazala je povoljan utjecaj na životni vijek (Parkes i sur., 1998.). Suprotno tome,

kompletno odstranjenje spomenutog enzima kod miševa uzrokuje teško oksidacijsko oštećenje mitohondrija i ranu postnatalnu smrt povezanu s kardiomiopatijom i neurodegeneracijom (Li i sur., 1995; Lebovitz i sur., 1996.), iako ovaj model ne pokazuje direktnu vezu između oksidacijske štete i starenja. Drugi indirektni dokaz koji povezuje proizvodnju RKV-a sa starenjem proizlazi iz saznanja da različiti transgenični miševi s povećanim životnim vijekom pokazuju i povećanu aktivaciju MnSOD te zbog toga i poboljšanu učinkovitost odgovora na proizvodnju RKV-a (Yamamoto i sur., 2005; Taguchi i sur., 2007.). Nadalje, miševi s povećanom ekspresijom katalaze koja se nalazi u mitohondrijima, pokazuju povećani životni vijek, smanjenje proizvodnje RKV-a, bolesti vezanih za starenje, oksidacijske štete i mitohondrijskih disfunkcija. S druge strane, neka istraživanja ne podupiru hipotezu o poveznici između proizvodnje RKV-a i starenja (Jang i Remmen, 2009.). Na primjer, smanjenje ekspresije SOD-a kod vrste *Caenorhabditis elegans* štiti od oksidacijskog stresa, ali nema utjecaja na trajanje životnog vijeka (Doonan i sur., 2008.).

### **2.7.7.1 Razdvajanje (engl. uncoupling) elektronskog transportnog lanca**

Elektronski transportni lanac odvija se na unutrašnjoj membrani mitohondrija. Povezuje prijenos elektrona između donora elektrona (kao što je NADH) i akceptora elektrona (kao što je  $O_2$ ) s prijenosom  $H^+$  iona (protona) kroz membranu. Rezultirajući elektrokemijski protonski gradijent koristi se za stvaranje kemijske energije u obliku adenozin trifosfata (ATP). ETC se sastoji od pet proteinskih kompleksa, I-V. Kompleksi I-IV obuhvaćaju prijenos visoko-energetskih elektrona s jednog kompleksa na drugi i time stvaraju protonski gradijent preko unutrašnje membrane, dok kompleks V predstavlja ATP sintazu, koja stvara ATP koristeći tok protona natrag kroz membranu (Slika 6).



**Slika 6.** Elektronski transportni lanac. (Preuzeto i prilagođeno sa central biology.wikispaces.com)

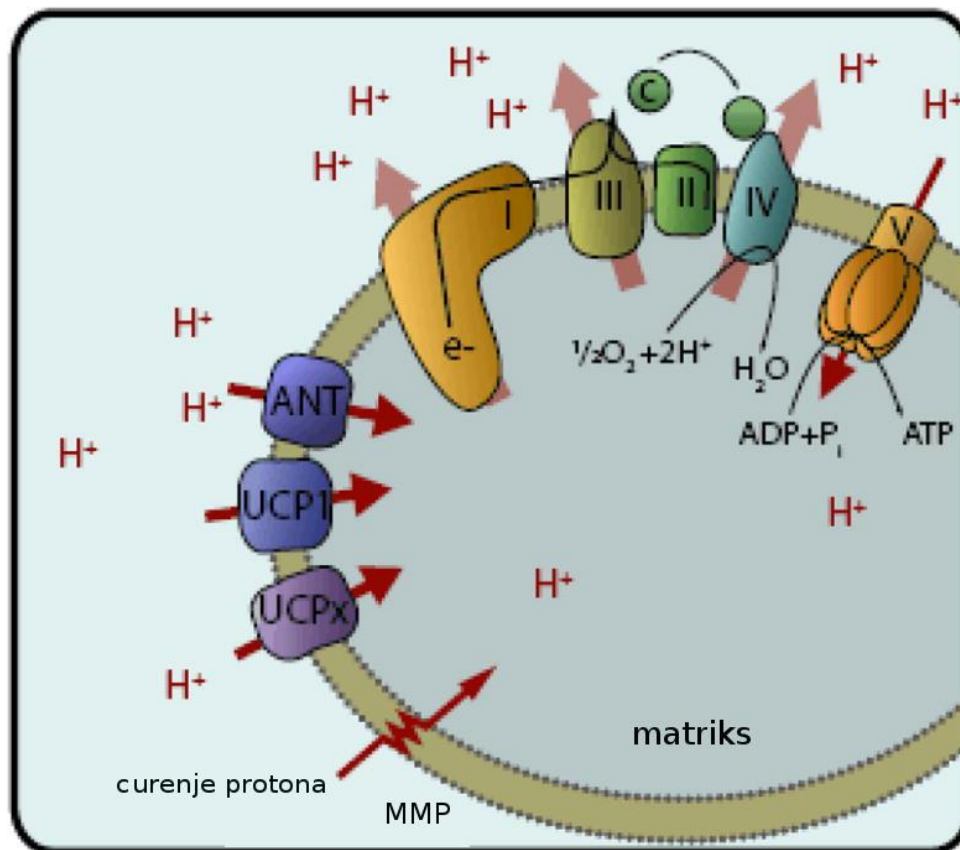
Curenje protona i elektrona u mitohondriju ima veliki utjecaj na učinkovitost mitohondrijskog spajanja (engl. couplinga) i proizvodnju RKV-a. Bazalno curenje nije regulirano i ono se velikim dijelom može pripisati mitohondrijskim anionskim nosačima, dok je curenje protona putem lipidnog dvosloja skoro pa zanemarivo. Bazalno curenje protona specifično je za pojedine stanične tipove i korelira s metaboličkom stopom. Izazvano curenje protona putem ANT (engl. adenine nucleotide translocase) i "uncoupling" proteina (UCPs) može biti aktivirano masnim kiselinama, superoksidom ili produktima peroksidacije. Prije razvoja Peter Mitchellove kemiosmotske hipoteze 1961 godine, poveznica između respiracije i sinteze ATP-a bila je nepoznata. Mitchellova shema predlaže da se energija sakupljena iz respiratornog lanca koristi za stvaranje elektrokemijskog protonskog gradijenta potrebnog za mitohondrijsku proizvodnju ATP-a, danas poznato kao kemiosmotska teorija (Mitchell, 1961.). Prema ovoj teoriji, cirkuliranje protona preko mitohondrijske unutarnje membrane je mehanizam koji potiče oksidativnu fosforilaciju, oksidaciju "coupling" supstrata i ADP

fosforilaciju (Slika 7). Oksidacijom supstrata otpuštaju se elektroni do kofaktora kao što su NADH ili FADH<sub>2</sub>. Ovi elektroni se prenose pomoću elektronskih nosača među kompleksima respiratornog lanca, time povećavajući oksidacijski potencijal te na kraju reduciraju molekularni kisik u vodu. Ovaj egzergoni proces se koristi za pumpanje protona iz mitohondrijskog matriksa u međumembranski prostor, stvarajući elektrokemijski gradijent poznat kao protonska pokretačka sila (engl. proton motive force),  $\Delta p$ .  $\Delta p$  pomiče protone natrag u matriks kroz ATP sintazu, potičući konverziju ADP-a i anorganskog fosfata u ATP i pritom oksidaciju "coupling" supstrata. Ova veza ("coupling") sinteze ATP-a i oksidacije supstrata nije jedini način vraćanja H<sup>+</sup>, jer se protoni mogu vratiti natrag u matriks neovisno o ATP-sintazi. Procesi pod kojima se ovo odvija kolektivno su prozvani "curenje protona". Curenje protona može se demonstrirati kao smanjenje  $\Delta p$  u prisutnosti inhibitora ATP sintaze, oligomicina. To se može vidjeti kao približno eksponencijalni porast razine curenja protona (izmjereno indirektno kao potrošnja kisika koja se koristi za njihov pogon) kako raste  $\Delta p$  u izoliranim mitohondrijima. Međutim, ovo ponašanje je prisutno i u ostalim netaknutim stanicama, pokazujući da curenje nije posljedica oštećenja mitohondrijske unutarnje membrane tijekom procesa izolacije (Nobes i sur.,1990.). Mehanizmi curenja protona uključuju direktno pomicanje protona preko fosfolipidne membrane, difuziju kroz integralne membranske proteine, aktivan transport kroz ANT (engl. adenine nucleotide translocase) ili "uncoupling" proteine (UCP1, UCPx) (Jastroch i sur., 2010.) (slika 7).

Pri ne-fosforilirajućim uvjetima, visokoprotonski transmembranski gradijent inhibira razinu potrošnje kisika posredovanu mitohondrijskim respiratornim lancem. Usporeni prijenos elektrona uzrokuje stvaranje RKV-a, koji sudjeluju u razarajućim reakcijama. Kako bi izbjegli pretjeranu proizvodnju RKV-a, mitohondriji održavaju visoku razinu potrošnje O<sub>2</sub> aktivacijom različitih, izrazito kontroliranih razdvojenih puteva. Različite vrste kvasca posjeduju jedan ili više sistema razdvajanja koji koriste jedan od dva moguća mehanizma: i) izljev protona i ii) ne-pumpajuće redox enzime. Izljevi protona odvijaju se pomoću mitohondrijskih kanala (engl. mitochondrial unspecific channels - MUC) i proteina odgovornih za razdvajanje (engl. uncoupling proteins - UCP). Kvasac *S. cerevisiae* eksprimira mitohondrijske kanale koji su visoko regulirani. Također, ne-pumpajuće alternativne oksidoreduktaze mogu biti zamjena za pumpe. Obećavajući modeli za istraživanje ovih mehanizama su jednostanični paraziti koji mogu potpuno isključiti svoj aerobni metabolizam. Raznolikost rasipanja energije u eukariotskim vrstama vjerojatno je dizajnirana u svrhu

kontrole proizvodnje RKV-a u različitim okolišima u kojima pojedine vrste obitavaju (Guerrero-Castillo, 2011.).

Prema tome, kada se koncentracija mitohondrijskog ADP-a smanji, a to se događa prilikom smanjene sinteze ATP-a, jer ADP ulazi u matriks mitohondrija samo ako se ATP izbacuje iz matriksa pomoću ATP – ADP translokaze (čini 15% proteina unutarnje mitohondrijske membrane) koja povezuje prijenos ADP-a u mitohondrij s prijenosom ATP-a iz mitohondrija, razina protoka elektrona kroz respiratorni lanac opada (stadij respiracije IV) i mitohondriji postaju izvor superoksida i ostalih RKV-a (Chen i sur., 2003.). Proizvodnja RKV-a ima i druge funkcije, kao što su signaliziranje i apoptoza (Forman i sur., 2010; Perrone i sur., 2008.).



**Slika 7.** Pumpanje protona i curenje kroz mitohondrijsku unutrašnju membranu. Kompleksi I, III i IV elektronskog transportnog lanca pumpaju protone iz matriksa u međumembranski prostor (MMP), pri tome se stvara protonska pokretačka sila ( $\Delta p$ ) preko unutrašnje membrane. Vraćanje protona kroz ATP sintazu (kompleks V) prati otpuštanje  $\Delta p$  za sintezu ATP-a. Svi ostali razlozi vraćanja protona predstavljaju curenje protona, jer je u tom slučaju  $\Delta p$  dobivena oksidacijom supstrata smanjena i ne katalizira sintezu ATP-a. Mehanizmi protonskog curenja uključuju direktno pomicanje protona preko fosfolipidne membrane, difuziju kroz integralne membranske proteine, aktivan transport kroz ANT (engl. adenine nucleotide translocase) ili "uncoupling" proteine (UCP1, UCPx). (Jastroch i sur. 2010.).

### 2.7.7.2 Važna uloga mitohondrija u replikativnom starenju

Mitohondriji imaju važnu, ali još uvijek nedovoljno poznatu ulogu u regulaciji replikativnog životnog vijeka. Ovo je po prvi puta jasno pokazano u istraživanjima kvasca i rezultatima koje su objavili Jazwinski i suradnici, gdje su pokazali da indukcija retrogradnog odgovora, koji prenosi signal mitohondrijskog stresa (disfunkcije) u jezgru, može povećati replikativni životni vijek i odgoditi proces starenja u određenim genetskim uvjetima, putem promjena u metabolizmu stanice i otpornosti na stres. Također je po prvi puta istaknuta povezanost retrogradnog odgovora s produljenim životnim vijekom preko Ras-PKA signalnog puta (Borghouts i sur., 2004; Kirchman i sur., 1999.).

Djelovanje mitohondrijskih poremećaja na životni vijek je pod utjecajem genoma, međutim, gubitak mitohondrijske DNA je povezan sa skraćenim, nepromjenjenim ili povećanim životnim vijekom, ovisno o genotipu soja kvasca. Također je poznato da kalorijska restrikcija (engl. Caloric Restriction, CR) aktivira protein Sir2 (Sirtuin 2) promjenama u odnosu NAD/NADH, putem povećane regulacije mitohondrijske respiracije (Lin i sur., 2002.). Međutim, neke druge studije su pokazale da mitohondrijska DNA i funkcionalni lanac prijenosa elektrona, nisu potrebni za povećanje životnog vijeka putem CR (Kaeberlein i sur., 2005.a), dok brojni sojevi kvasca kojima nedostaju mitohondrijski geni kodirani u jezgri, uključujući i one iz Krebsovog ciklusa, pokazuju produljenje životnog vijeka. Naime, delecija jezgrenog gena koji kodira za *SOVI*, mitohondrijski translacijski faktor, dovodi do povećanja replikativnog životnog vijeka mehanizmom koji uključuje aktivaciju Sir2 (Caballero i sur., 2011.). Potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se razjasnila važnost uloge mitohondrija u replikativnom starenju kvasca, osobito međusobno djelovanje između mitohondrijskih i jezgrinih genoma.

### 2.7.7.3 Respiracija

Stanično disanje skup je metaboličkih reakcija i procesa koji se odvijaju u stanici, a služe za oslobađanje energije koja se kasnije ulaže u proizvodnju adenozin trifosfata.

Pojednostavljena kemijska formula:  $C_6H_{12}O_6(aq) + 6O_2(g) \rightarrow 6CO_2(g) + 6H_2O(l)$

Kada glukoza uđe u stanicu, odvija se proces glikolize kojim od jedne molekule glukoze nastaju 2 molekule pirogroždane kiseline i 2 molekule adenozin trifosfata. Ako u stanici nema dovoljno kisika, u citoplazmi kvasca započinje anaeroban metabolički proces fermentacije ili *alkoholnog vrenja*. Tim procesom iz 2 molekule pirogroždne kiseline nastaju 2 molekule

alkohola i 2 molekule ugljičnog dioksida. Takvim anaerobnim procesom stanica ne dobiva energiju, već obnavlja  $H^+$  prijenosnike za nove reakcije glikolize. Ako u stanici postoji dovoljna količina kisika, odvija se aeroban metabolički proces pri kojem pirogroždana kiselina ulazi u mitohondrij stanice i spaja se s koenzimom A. Nastaje acetil - koenzim A (CoA) koji ulazi u proces Krebsovog ciklusa. Krebsov ciklus odvija se u matriksu mitohondrija te u njega ulaze još voda, adenzin difosfat i prijenosnici elektrona  $NAD^+$  i FAD. U Krebsovom ciklusu acetil CoA razgrađuje se do  $CO_2$  te se oslobađa koenzim A koji se potom vraća u proces. Razgradnjom acetil koenzima A oslobađa se energija koja se veže za ADP te nastaju dvije nove molekule ATP-a. Nastali vodikovi ioni vežu se za prijenosnike.

Prijenosnici zajedno s adenzin difosfatom i kisikom ulaze u *dišni lanac* ili procese oksidativne fosforilacije. Dišni se lanac odvija na unutarnjoj membrani mitohondrija gdje povećana količina vodikovih iona uzrokuje stvaranje protonskog gradijenta zbog kojeg se vodikovi ioni izbacuju preko membrane. Isti ioni vraćaju se kroz membranu gdje se nalaze ATP sintetaze. Povratak iona oslobađa energiju koja se pohranjuje u obliku kemijske veze ATP-a. Energetski rezultat dišnog lanca ukupno iznosi 34 molekule ATP-a. Staničnim disanjem, stoga, uz glikolizu i Krebsov ciklus nastaje ukupno 38 molekula ATP-a, ali se i potroše 2 molekule ATP-a u Krebsovom ciklusu te u stanici nastaje 36 upotrebljivih molekula ATP-a.

### 2.7.8 Kalorijska restrikcija u produljenju života

Poznato je da kalorijska restrikcija (engl. caloric restriction, CR) tj. rast na niskim koncentracijama glukoze, usporava proces starenja, odgađa brojne bolesti (patologije) vezane za starenje te produljuje životni vijek različitim organizmima. To je ujedno jedan od vodećih koncepata u gerontologiji posljednjih nekoliko desetljeća (Holehan i Merry, 1986; Weindruch i Walford, 1988; Masoro, 2002; Yu, 1996; Fontana i sur., 2010.).

Često se zbog povezanosti kalorijske restrikcije i povećanog životnog vijeka, utjecaj CR smatra evolucijski konzerviranim mehanizmom koji modulira intrinzičnu stopu starenja. (Fontana i sur., 2010; Masoro, 2005; Partridge, 2005.). Iako CR produljuje životni vijek i zdravlje u brojnim modelnim organizmima, odgovorni mehanizmi nisu još razjašnjeni. Prvi dokazi koji pokazuju utjecaj CR na usporavanje starenja i produljenje životnog vijeka, prezentirani su 1930-tih godina od strane McCay-a i ostalih. Od tada, istraživanja su pokazala slične rezultate na različitim vrstama, uključujući štakore, miševe, ribe, mušice, crve i kvasce



(Heilbronn i Ravussin, 2003.). Uklanjanje glukoze iz hranjivog medija, dovelo je do produljenja životnog vijeka i odgodu pojave fenotipa starenja kod kvasca *S. cerevisiae*. Također, smanjivanje sadržaja aminokiselina u mediju imalo je pozitivan utjecaj na životni vijek. Naime, ova saznanja sugeriraju da smanjena količina kalorija općenito, a ne specifični nutrijent, uzrokuju učinak karakterističan za kalorijsku restrikciju na starenje kod sisavaca. (Jiang i sur., 2000.).

Učinak kalorijske restrikcije nije zahtijevao retrogradni odgovor, koji signalizira status mitohondrijske funkcije i određuje dugovječnost. Nadalje, delecija RTG3, transkripcijskog faktora za retrogradni put, zajedno s kalorijskom restrikcijom, rezultirala je najvećim porastom dugovječnosti (123 %) dosada opisanoj kod kvasca. Dakle, retrogradni odgovor i kalorijska restrikcija različitim mehanizmima utječu na životni vijek kvasca (Jiang i sur., 2000.).

Naime, Guarente i suradnici su razvili novi model CR kod pupajućeg kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, u kojem životni vijek može biti produljen smanjenjem glukoze ili smanjenjem aktivnosti cikličke-AMP-ovisne kinaze (PKA) osjetljive na glukozu. Za produljenje životnog vijeka kod mutanta s reduciranom PKA aktivnošću potreban je Sir2 i NAD (nikotinamid adenin dinukleotid). CR može biti modelirana kod kvasca smanjenjem sadržaja glukoze u mediju sa 2% na 0.5% (Lin i sur., 2000.). Rast na 0.5%-tnoj glukozu produljio je životni vijek za oko 25%, u usporedbi s rastom na 2%-tnoj glukozu, a delecija sir2 spriječila je ovo produljenje života. Naime, nakon metaboliziranja glukoze u piruvat, put se dijeli na respiraciju i fermentaciju. Respiracija oksidira glukozu do CO<sub>2</sub> stvarajući pritom 28 molekula ATP-a po molekuli glukoze, dok fermentacija etanola stvara samo dvije molekule ATP-a po molekuli glukoze. Kada je razina glukoze visoka, energija je u suvišku i fermentacija je preferirana. Kada je razina glukoze smanjena, respiracija je preferirana, ugljik je prebačen u TCA ciklus (engl. tricarboxylic acid), i time se povećava transport elektrona i respiracija. Kako bi se istražilo da li se taj metabolički preokret prema respiraciji zbiva pod uvjetima CR, mjereno je omjer potrošnje kisika u stanicama s 0.5% glukozu. Rezultati su pokazali povećanu potrošnju kisika za ~2 puta, u odnosu na stanice s 2%-tne glukozu (Lin i sur., 2002.). Ista grupa znanstvenika istražila je da li je metabolički preokret prema respiraciji potreban za CR-uzrokovano produljenje životnog vijeka. Ako je to slučaj, eliminacija elektronskog transporta trebala bi spriječiti produljenje života. Zbog toga su napravili deleciju gena koji kodira za citokrom c1, CYT1, te mjerili duljinu životnog vijeka. U *cyt1Δ* mutantu nije produljen životni vijek, sugerirajući da je ipak metabolički preokret prema respiraciji nužan za produljenje životnog vijeka putem CR (Lin i sur., 2002.).

### 2.7.9 Osjetljivost na glukozu kod kvasca

Glukoza, osim što služi kao nutrijent eukariotskim stanicama te kao izvor ugljika i energije, također ima i regulatorne učinke slične hormonima u brojnim eukariotskim stanicama. Prisutnost glukoze utječe na različite metaboličke puteve, što uzrokuje brojne promjene kod metaboličkih intermedijera, kofaktora i krajnjih produkata. Zbog toga, različite eukariotske stanice koriste specifične mehanizme za otkrivanje glukoze. Fiziološka uloga ovih mehanizama ovisi o tipu stanica. Kvasci su razvili mehanizam za brzo dostavljanje glukoze iz medija staničnoj regulatornoj mašineriji, kako bi osigurali optimalnu iskoristivost (Rolland i sur., 2001.). Na primjer, geni uključeni u respiraciju i metabolizam alternativnih ugljikovih supstrata su potisnuti, dok su fermentacija i geni za rast inducirani (Johnston, 1999; Thevelein i de Winde, 1999; Gancedo, 1998; Carlson, 1999.).

Za regulatorni učinak glukoze na stanice kvasca (kratkoročne i dugoročne), potreban je transport i fosforilacija tog šećera. Molekularne analize otkrile su veliku familiju transportera heksoza u kvascima (Hxt proteini), koji su sami po sebi inducirani (transporteri niskog afiniteta) ili potisnuti (transporteri visokog afiniteta) glukozom (Boles i Hollenberg, 1997.). Nijedan mehanizam osjetljivosti na glukozu otkriven u kvasaca do sada ne uključuje povezanost regulatorne funkcije s aktivnim transporterima glukoze. Glukozni transporteri (Hxt proteini) angažiraju tri glavna signalna puta za osjetljivost na glukozu — Rgt2/Snf3, AMP - K, i cAMP-PKA. Naime, glukoza je preferirani izvor energije pupajućem kvascu *S. cerevisiae*, zbog toga što određuje fermentativni životni stil tog organizma – aerobna fermentacija etanola (Crabtree, 1929., i Lagunas, 1979.). Ovo je dijelom posredovano pomoću komunikacije između dvaju glukoznih signalnih puteva: 1) Rgt2/Snf3 glukozni induksijski put odgovoran za unos glukoze (Ozcan i Johnston, 1999; Kaniak, 2004; Johnston i Kim 2005.) i 2) Snf1/Mig1 glukozni represijski put koji negativno regulira gene povezane s oksidacijom glukoze i korištenjem alternativnih šećera (Carlson, 1999; Gancedo, 1998; Hedbacker i Carlson, 2008.).

Da bi glukoza inhibirala aktivnost kinaze Snf1 (kvašćev homolog za AMPK), potreban je njen unos i metabolizam (Ozcan, 2002.). Stanice kvasca prilagođavaju aktivnost signalnih puteva kako bi što efikasnije odredili osjetljivost na promjene dostupnosti glukoze u okolišu (Santangelo, 2006; Broach, 2012; Rolland i sur., 2002.). Budući da stvaranje energije fermentacijom nije efikasno, stanice kvasca usmjeravaju velike količine glukoze prema

glikolizi, time povećavajući metabolizam glukoze, odnosno njen unos povećanjem ekspresije glukoznih transporter gena (HXT) (Ozcan, 1999; Boles i Hollenberg, 1997.).

Kvasac *S. cerevisiae* posjeduje 6 članova porodice glukoznih transportera (Hxt1, 2, 3, 4, 6 i 7), svaki s različitim afinitetima za glukozu kako bi se mogli prilagoditi promjenama dostupnosti glukoze u okolišu (Boles i Hollenberg, 1997; Reifenberger i Boles, 1997.). Kvasci su se pokazali kao pogodni za eksperimentalno proučavanje mehanizama osjetljivosti na glukozu zbog pristupačnih genetičkih analiza. Još uvijek nije poznat mehanizam za osjetljivost na glukozu koji je zajednički svim eukariotima. Međutim, nedavno otkriće specifičnih proteina osjetljivih na glukozu u plazma membrani kvasca - homolozi transporterima glukoze, Snf3 i Rgt2 te Gpr1- mogu dovesti do otkrića sličnih proteina u ostalim eukariotima. Intenzivno proučavanje mehanizama koji su ovisni o kinazama koje sudjeluju u metabolizmu šećera najvjerojatnije će dovesti do identifikacije zajedničkih načela za osjetljivost na glukozu kod eukariota, barem za sustav fosforilacije ovisne o glukozu.

Pokazalo se da je dugovječnost u kvasca regulirana pomoću PKA (protein kinaza A) i proteinske kinaze Sch9. Dugovječnost je često povezana s povećanom rezistencijom na (oksidativni) stres i transkripcijskim faktorima za otpornost na stres, Msn2 i Msn4, koji su se pokazali bitnima za produljenje životnog vijeka u Sch9 i adenilat ciklaza mutantima (Fabrizio i sur., 2001.). Nadalje, druga istraživanja navode da je NAD (i njegova regulacija utišavanja proteina Sir2) potreban za produljenje života pomoću kalorijske restrikcije (CR) te za sudjelovanje cAMP-PKA signalnog puta u tom procesu neovisno o rezistenciji na stres (Lin i sur., 2000.). Međutim, delecija Gpr1 ili Gpa2 imala je sličan učinak na dugovječnost kao i CR, što je potvrdilo ulogu GPCR (engl. G-protein coupled receptors) sistema – integralnih membranskih receptora povezanih s G – proteinima, u osjetljivosti na visoku koncentraciju glukoze u okolini. Sch9 pokazuje najviše sličnosti s Akt/PKB u sisavaca. Ova proteinska kinaza sudjeluje u signalnom putu kontroliranom pomoću receptora nalik inzulinskom receptoru, u reguliranju metabolizma ugljika, otpornosti na stres i dugovječnosti kod *Caenorhabditis elegans* (Guarente i Kenyon, 2000.). Također i kod ljudi Akt/PKB sudjeluje u inzulinskom signalnom putu, translokaciji glukoznih transportera, apoptozi i staničnoj proliferaciji. Stoga je moguće da postoji prastari signalni mehanizam za glukozu koji koordinirano regulira metabolizam, otpornost na stres i dugovječnost (omogućavajući preživljavanje u dugim periodima gladovanja), konzerviran u svim eukariotskim organizmima (Fabrizio i sur., 2001.).

Također i Snf1 kod kvasca sudjeluje u kontroli starenja, a konzervirani homolozi u drugim organizmima vjerojatno imaju isti učinak. Kako je signaliziranje glukoze fundamentalno za staničnu funkciju i funkciju organizma, vjerojatno je da slični mehanizmi za osjetljivost kao kod kvasca, postoje i kod viših eukariota (Rolland i sur., 2002.).

### 2.7.10 SNF1/AMPK

SNF1 signalna mreža je potrebna za regulaciju metabolizma ugljika. Kvasci koriste glukozu putem fermentacije čak i u aerobnim uvjetima. U prisutnosti glukoze, enzimi potrebni za korištenje drugih izvora ugljika su potisnuti (Hedbacker i Carlson, 2008.). Za brzi i osjetljivi odgovor na promjene u razini glukoze, zaslužno je nekoliko međusobno povezanih signalnih mreža, a jedna od njih je signalna mreža SNF1 (Hedbacker i Carlson 2008; Zaman et al. 2008). Protein kinaza SNF1 po prvi puta je identificirana pomoću genetičke analize pupajućeg kvasca *S. cerevisiae*. SNF1 je potreban za prilagodbu stanica kvasca na limitiranu raspoloživost glukoze te za rast na podlozi ugljika koji je manje preferiran u odnosu na glukozu, a također je povezan s odgovorima na ostale stresne uvjete u okolišu. SNF1 regulira transkripciju velikog seta gena, modificira aktivnost metaboličkih enzima i kontrolira razne stanične razvojne procese ovisno o dostupnosti nutrijenata. Fosforiliran je i aktiviran putem uzvodnih kinaza Sak1, Tos3 i Elm1, a inaktiviran pomoću Reg1-Glc7 protein fosfataze 1 (Hedbacker i Carlson, 2008.).

U uvjetima nedostatka dostupne glukoze, aktivirani SNF1, direktnom fosforilacijom metaboličkih enzima i transportera te putem regulacije transkripcije s dugoročnijim učinkom, prilagođava stanične aktivnosti nedostatku glukoze. Takav odgovor uključuje represiju glikolize, aktivaciju Krebsovog ciklusa, respiracije i glukoneogeneze (von Plehwe i sur., 2009.). Kvašćev SNF1 je evolucijski konzervirani homolog AMPK (engl. AMP-activated protein kinase) familije proteinskih kinaza kod sisavaca, potreban za održavanje homeostaze energije, odnosno ravnoteže između proizvodnje i potrošnje ATP-a. Kvašćev Hsp70 homolog - Ssb, dio je SNF1 mreže, i sudjeluje u regulaciji fosforilacije Snf1 (von Plehwe i sur., 2009.).

# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1 BAKTERIJE

---

### 3.1.1 Bakterijski sojevi

U radu su korišteni sljedeći bakterijski sojevi: *E. coli* MG1655 (divlji tip), *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shewanella oneidensis*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus cereus*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Salmonella tiphy*.

### 3.1.2 Hranjive podloge za uzgoj bakterija

Za uzgoj bakterije *E. coli* korištena je tekuća hranjiva podloga LB, dok za rast kolonija kruta podloga LB. Kruta podloga LB je dobivena dodatkom 16,0 g/L agara u tekući LB prije sterilizacije.

Sastav tekuće podloge LB medija je ekstrakt kvasca 10 g, pepton 20 g, dd H<sub>2</sub>O 900 mL i 20% dekstroza, 100 mL za ukupan volumen od 1 L.

Hranjive podloge steriliziraju se u autoklavu u trajanju od 20 minuta pri 121/ °C.

*Pseudomonas putida* je uzgajana u hranjivom mediju – ekstrakt govedine 3 g, pepton 5 g, dH<sub>2</sub>O do 1L; *Shewanella oneidensis* u oksoid CM3 mediju – ekstrakt govedine 1 g, ekstrakt kvasca 2 g, pepton 5 g, NaCl 5 g, d H<sub>2</sub>O do 1 L; *Lactobacillus casei* u MRS mediju - pepton iz kaseina (tryptic digest) 10 g, ekstrakt mesa 10 g, ekstrakt kvasca 5 g, glukoza 20 g, Tween 80 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g, Na-acetat 5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> citrat 2 g, MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0.2 g, MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 0.05 g, d H<sub>2</sub>O do 1 L, namjestiti pH na 6.2-6.5; *Bacillus cereus* i *Clostridium acetobutylicum* u TSA mediju - pepton iz kazeina (iz gušterače) 15 g, NaCl 5 g, pepton iz soje 5 g, podesiti pH na 7.3.

### 3.1.3 Otopine

#### 3.1.3.1 Otopine za pripremu serija razrjeđenja bakterija

MgSO<sub>4</sub> - Fosfatni pufer M/15: natrijev hidrogenfosfat dihidrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> X 2H<sub>2</sub>O) 5,9 g/L; kalijev hidrogenfosfat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 4,5 g/L; otopljen u vodi i autoklaviran.

### 3.1.3.2 Otopine za gel-elektroforezu i priprema gela agaroze

Sastav pufera TAE (50x): Tris 242 g/L; 57,1 mL/L ledena octena kiselina; 100 mL/L 0,5 M EDTA, pH 8,0.

Agarozni gel: priprema se otapanjem agaroze u puferu TAE (1x).

Koncentracija agaroze u gelu može biti 0.8 % do 2 %, ovisno o potrebi.

Radne otopine pufera pripremaju se razrjeđivanjem koncentriranih otopina u Mili-Q™ vodi.

Boja za nanošenje uzorka (6x): 0,03 % brom-fenol-plavo, 0,03 % ksilen-cijanol FF; 60 % glicerol; 1 % SDS; 100 mM EDTA pH 8,0. Otopina se ne sterilizira i čuva se pri 4°C.

Etidijev bromid: osnovna otopina priprema se u koncentraciji od 10 mg/mL, ne sterilizira se i čuva pri 4°C u tamnoj boci. Otopina za vizualizaciju DNA priprema se dodatkom 50 µL osnovne otopine u 1 L destilirane vode i također čuva u tamnoj boci.

### 3.1.3.3 Otopine za izolaciju bakterijskih staničnih proteina

Pufer PBS (10x) pH 7,4: 80 g/L NaCl; 2 g/L KCl; 14,4 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,4 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> otopljen u 800 mL deionizirane vode, pH je izmjeren i podešen pomoću 0,1 M HCl te je otopina dopunjena vodom do 1000 mL i slijedi autoklaviranje.

Otopina za lizu stanica; pufer PBS 1x, pH 7,4: 1 mg/mL lizozima: 1x koktel inhibitora proteaza.

### 3.1.3.4 Otopine za mjerenje karbonilacije

Derivatizacijska otopina DNP: 0,02 g DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazin) otopljena je u 1 mL trifluoroctene kiseline, te je 6 µL otopine razrijeđeno u 10 mL pufera PBS 1x.

#### Puferi za ispiranje:

Pufer za ispiranje **I**: koncentrirani PBS pufer za ispiranje (10x) razrijeđen je do PBS 1x

Pufer za ispiranje **II**: PBS 1x pufer i 100 mL 96 % etanola za ukupni volumen od 200 mL.

Pufer za ispiranje **III**: PBS 1x i detergent Tween®20. Konačna koncentracija od 0,1 % u 1x razrijeđenom puferu za ispiranje (PBS 1x) (70 mL PBS pufera 10x za ispiranje pomiješano s 560 mL Mili-Q™ vode i 1,0 % Tween®20 do ukupnog volumena od 700 mL).

Priprema pufera za blokiranje: otopljeno mlijeko u prahu do konačne koncentracije od 5% u puferu za ispiranje III.

Priprema primarnog i sekundarnog antitijela: primarno antitijelo (protiv DNP, a proizvedeno u zecu) i sekundarno antitijelo konjugirano s peroksidazom (protiv zeca, a proizvedeno u kozi) su razrijeđeni 1:5000 x u puferu za blokiranje.

Otopina enzimatskog supstrata TMB: supstrat koji razvija plavu boju prilikom oksidacije u reakciji s peroksidazom. Intenzitet boje je proporcionalan s aktivnošću peroksidaze koji je proporcionalan s razinom karbonila.

Otopina za zaustavljanje reakcije: 0.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Priprema pufera za lizu: pufer za liziranje 5x razrijedi se do 1x u Mili-Q™ vodi.

Priprema proteinskih uzoraka: uzorci za testiranje mogu biti pripremljeni direktno iz taloga stanica ili od unaprijed pripremljenih staničnih lizata koji su čuvani u alikvotima na -20°C.

Stanični lizati: svi uzorci moraju biti razrijeđeni do konačne koncentracije od 10 µg/mL u puferu za liziranje 1x (opisano) prije analize ukoliko se koristi talog bakterijskih stanica.

### **3.1.3.5 Bradfordov reagens za određivanje koncentracije proteina**

Za 1L otopine - 100 mg *Coomassie Brilliant Blue*® G-250, 50 mL 96 % EtOH, 100 ml 85 % fosfatne kiseline.

### **3.1.3.6 Otopine fluorokroma**

Koncentrirane otopine (0,01 M) 3,3'-diheksiloksakarbocijanin jodid (DiOC<sub>6</sub>(3); Invitrogen, Molecular Probes, D272) i akridin oranž 10-nonil (NAO, Life technologies) pripremljene su u 100 % DMSO-u (DiOC<sub>6</sub>(3)) i 100% etanolu (NAO) te pohranjene na -20°C. Radne otopine (100 µM) pripremljene su razrijeđenjem stokova 50 % te čuvane na ledu u mraku kako bi se umanjila mogućnost degradacije.

### 3.1.4 Kemikalije i kompleti

#### Kemikalije

IPTG (Izopropil  $\beta$ -D-1- tiogalaktopiranozid), 5 g, Roth/Koncept  
N-acetil-cistein, 100 g, Roth/Koncept  
Geldanamycin, 10 mg HN71.3 Roth/Koncept  
Geldanamycin-FITC, BML-EI361-001 Enzo  
Rhodamine 110 chloride, bioreagent 99 %, 250 mg, Sigma/Biovit  
Sigma/Biovit Gvanidinium hidroklorid, 500 g Roth/Koncept  
Guanidine HCl, 500 g, 0037.2. Roth/Koncept  
4.0 M TMAO (Trimetilamin N-oksidi), 1 ml, Hampton Research  
Agaroz standardna: „Sigma-Aldrich“, St. Louis, MO, SAD  
Etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA): „Kemika“, Zagreb, Hrvatska  
Etidij-bromid: „Sigma-Aldrich“, St. Louis, MO, SAD  
Glicerol: „Kemika“, Zagreb, Hrvatska  
Koktel inhibitor proteaza: „Nalgene part of Thermo Scientific“, MA, SAD  
Kalijev hidrogenfosfat: „Fluka“, Buchs, Švicarska.  
Lizozim, 5 g: „Sigma-Aldrich“, St. Louis, MO, SAD  
Agens za uklanjanje lipida „Sigma-Aldrich“, 13360-U  
Bradford reagens B6916-500 ml Sigma/Biovit  
N-lauroil sarkozin, natrijeva sol: „Sigma-Aldrich“, St. Louis, MO, SAD  
Octena kiselina: „Kemika“, Zagreb, Hrvatska  
Tris: „Sigma-Aldrich“, St. Louis, MO, SAD  
Tween® : „Roth“, Karlsruhe, Njemačka  
TEMED, 50 ml, Acros/Kefo  
Trifluoroctena kiselina 500 ml, Sigma  
BSA (100x): „NewEngland BioLabs“, Ipswich, MA, SAD  
Zymolyase (Zymoresearch) 1.5 units/ $\mu$ l  
Milk powder, 500 g T145.2 Roth/Koncept  
Ethanol, 96%, p.a. 10 L, Kemika  
2-Mercaptoethanol, 98%, 100 ml M3148-100ML Sigma (Biovit)



## Sastav oksidacijske smjese

Hepes pufer  
Natrijev askorbat  
Željezo (III) klorid

## Boje

Bromfenol plavo: „Sigma-Aldrich“, St. Louis, MO, SAD

## Sastojci mikrobioloških hranjivih podloga i medija

Bacto™ Agar: „Becton, Dickinson and Company (BD)“, Sparks, MD, SAD  
Glukoza: „Kemika“, Zagreb, Hrvatska  
Ekstarkt kvasca: „Becton, Dickinson and Company (BD)“, Sparks, MD, SAD  
Tripton: „Becton, Dickinson and Company (BD)“, Sparks, MD, SAD  
Tryptone Peptone, 500 g 211705 BD/Gorea  
Tryptone Bacto, 2 kg 211699 BD/Gorea  
Tryptone enzymatic digest from casein, 1 kg 95039-1KG-F Sigma (Biovit)  
Tween 80, 25 ml P1754-25ML Sigma  
Peptone from Casein, Tryptic digest, 100 g 70172-100G Sigma/Biovit  
Peptone from soybean meal, enzymatic digest, 100 g 70178-100G BioChemika/Biovit  
Meat Extract, 100 g 70164-100 g Sigma/Biovit  
Minimal SD agar base, 467 g 630412 Clontech  
Minimal SD Base, 267 g 630411 Clontech  
YPD Medium 630409 Clontech  
Ura DO supplement, 10 g 630416 Clontech

## Komercijalni kompleti („kitovi“)

GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit: „Sigma-Aldrich“, St. Louis, MO, SAD.  
OxyELISA™ Oxidized Protein Quantitation Kit: „Millipore“, MA, SAD.  
Pierce<sup>R</sup>BCA Protein Assay Kit: „Thermo Scientific“, MA, SAD.  
Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit: „Pierce“  
Mini Prep Wizard plus, DNA purification system, Promega  
RNeasy Mini Kit: „Qiagen“

ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit „BioVision“  
Click-iT™ Protein Analysis Detection Kits „Invitrogen“

### 3.1.5 Uzgoj bakterija

Bakterijski sojevi se zasađuju direktno u odgovarajuće tekuće podloge iz glicerolske otopine čuvane na -80°C. Kulture se inkubiraju preko noći uz areaciju pri 37°C (ili drugoj odgovarajućoj temperaturi) do određene faze rasta. Faza rasta bakterijske kulture određuje se mjerenjem optičke gustoće kulture (engl. *Optical Density*, OD) na spektrofotometru (Eppendorf Bio Photometer), pri valnoj duljini od 600 nm. Optimalna optička gustoća eksponencijalne bakterijske kulture OD<sub>600</sub> iznosi 0,2 do 0,4. Bakterije se zasađuju na odgovarajuću krutu podlogu (16 % agara) za određivanje broja bakterijskih stanica u jedinici volumena tekuće kulture.

### 3.1.6 Bakterijski sojevi, plazmidi, uvjeti rasta i metode uzgoja

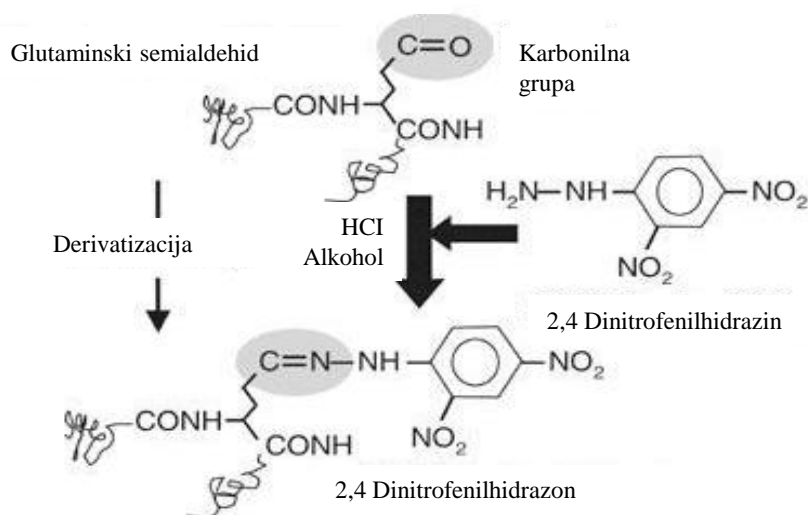
Bakterije *E. coli* MG1655 (divlji tip) uzgajane su u tekućem LB mediju na 37°C (u medij se uvijek prethodno dodaje odgovarajući antibiotik). Prekonoćne kulture su razrijeđene 100 puta u LB mediju uz dodatak IPTG (0.5 mM) te inkubirane na 37°C do eksponencijalne faze rasta (OD<sub>600</sub> = 0.2-0.3); *Pseudomonas putida* je uzgajana u nutrient mediju; *Shewanella oneidensis* u Oxoid CM3 mediju; *Lactobacillus casei* u MRS mediju; *Bacillus cereus* i *Clostridium acetobutylicum* u TSA mediju na 37°C do OD<sub>600</sub> = 0.2. Geni *thyA* i *nadD* su sintetizirani od strane DNA 2.0, biotehnoške kompanije koja pruža usluge za istraživanja u sintetskoj biologiji, nakon čega su uklonirani u vektor pJexpress401 nakon optimizacije korištenja kodona za *E. coli*, soj *MG1655* (divlji tip). Na C kraj proteina dodano je šest histidina (6xHis-biljeg). Sekvence proteina ThyA čiji su geni sintetizirani od strane DNA 2.0 preuzete su iz proteoma sojeva *Lactobacillus plantarum* (LACPL), *Clostridium botulinum* (CLOB1), *Staphylococcus epidermidis* (STAES), *Citrobacter koseri* (CITK8), *Vibrio cholerae* (VIBCH), *Methylococcus capsulatus* (METCA); a sekvence proteina NadD iz *Lactobacillus plantarum*, *Clostridium botulinum*, *Pseudomonas protegens Pf-5* (PSEF5), *Shewanella oneidensis* (SHEON): u zagradama se nalaze HAMAP (High-quality Automated and Manual Annotation of Proteins) kodovi pojedine vrste. Nakon ekspresije spomenutih proteina u bakteriji *E. coli* *MG1655*, proteini su pročišćeni (postupak pročišćavanja i potvrđivanja opisan u odjeljku 3.1.9).

### 3.1.7 Izolacija ukupnih staničnih proteina i oksidacija *in vitro*

Bakterijske kulture su razrijeđene u svježem odgovarajućem tekućem mediju te inkubirane na 37°C do eksponencijalne faze rasta ( $OD_{600} = 0.2-0.3$ ). U svrhu provođenja analiza *in vitro*, proteini moraju biti pročišćeni od ostalih staničnih komponenti. Za staničnu lizu, talog stanica je resuspendiran u 200  $\mu$ L pufera za liziranje (opisan) koji je obogaćen inhibitorima proteaza kako bi se spriječila proteoliza. U smjesu su dodane staklene kuglice promjera  $\leq 106 \mu\text{m}$  (Sigma) pomoću kojih se mehaničkim homogenizatorom razaraju stanice i smjesa se homogenizira. Nastala suspenzija se pročisti centrifugiranjem (20 minuta na 10,000 x g) koje odjeljuje različite stanične komponente u frakcije koje sadrže topive proteine, membranske lipide i proteine, stanične organele i nukleinske kiseline. Naime, pucanjem stanične membrane nastaju membranski fragmenti koji tvore karbonilima bogate micelle; one pri očitavanju karbonilacije proteina najčešće stvaraju preveliki pozadinski signal (engl. *background*). Zbog toga je u izdvojeni stanični lizat dodano 10 mg/100 mL silikatne smole (Sigma 13360-U), koja uklanja stanične lipide i lipoproteine. Uzorci su uz protresanje inkubirani 60 min na rotirajućoj mješalici pri sobnoj temperaturi. Suspenzija je ponovno centrifugirana u minicentrifugi 15 minuta pri 10,000 x g na 4°C. Pipetom je u novu tubicu odvojen supernatant koji sadrži proteinski ekstrakt. Koncentracija proteina je određena Micro BCA metodom uz korištenje kompleta kemikalija „Micro BCA Protein Assay Reagent Kit“ (Pierce). Proteinski standardi i proteinski lizati, prethodno razrijeđeni do 10  $\mu\text{g/mL}$  u puferu za liziranje, nanešeni su na dno jažica mikrotitarskih pločica (Nunc) u duplikatima po 100  $\mu\text{L}$ , pločica je poklopljena adhezivnom folijom te su inkubirani preko noći na 4°C uz protresanje kako bi se omogućila pasivna adsorpcija proteina na površinu jažica prije tretmana oksidacijskom smjesom i mjerenja proteinske karbonilacije. Adsorbirani proteini su oksidirani 5 minuta oksidacijskom smjesom koja se sastoji od 25 mM Hepes pufera, 25 mM natrijevog askorbata i 0.1 mM željezo (III) klorida.

### 3.1.8 Mjerenje karbonilacije proteina i tretman s GuHCL i TMAO:

Za mjerenje ukupne karbonilacije proteina korišten je komplet kemikalija „OxyELISA™ Oxidized Protein Quantitation Kit“ prema uputama proizvođača (Millipore, MA, SAD). Kemijski komplet temelji se na OxyELISA testu (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) - enzimatskoj imunodetekciji i kvantifikaciji karbonilnih skupina nastalih oksidacijom proteina (Slika 8).



**Slika 8.** Derivatizacija aminokiselinskog postranog lanca proteina (prema: Nyström, 2005.)

Za izvođenje ovog testa korištene su polistirenske mikrotitracijske pločice četvrtastog oblika koje imaju 96 (12 x 8) jažica, u kojima se topivi proteini i antitijela mogu vezati za čvrstu podlogu.

Po isteku inkubacije, odstranjena je adhezivna folija te je ispražnjen sav sadržaj iz pločice. Jažice su potpuno posušene okretanjem pločice na papirnati ručnik. Uklanjanje svih otopina koje se koriste u daljnjim koracima se izvršava na jednak način. Jažice su isprane u tri navrata sa 300  $\mu$ L pufera za ispiranje I, uz sušenje pločice.

Adsorbirani proteini na dnu jažica su derivatizirani dodavanjem 200  $\mu$ L svježe pripremljene 12  $\mu$ g/mL DNP derivatizacijske otopine koja sadrži reagens 2,4 dinitrofenilhidrazin (DNPH) koji reagira s karbonilnim skupinama na proteinima te ih kemijski modificira (derivatizira). S obzirom da je otopina koncentrirana, mora biti razrijeđena i prilagođenog pH (6,0- 6,5) neposredno prije upotrebe. Da bi se efikasno derivatizirali, proteini su s DNPH inkubirani 45 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon derivatizacije sadržaj iz jažica je uklonjen, a pločica isprana puferom za ispiranje II, 4 puta po 200  $\mu$ L te puferom za ispiranje I, 3 puta po 200  $\mu$ L. Nakon ispiranja jažice su blokirane 2 sata s puferom za blokiranje 1x u volumenu od 250  $\mu$ L te su potom isprane puferom za ispiranje III, 3 puta po 300  $\mu$ L. Derivatizirane (DNP)-karbonilne skupine su detektirane primarnim antitijelom konjugiranim s peroksidazom iz hrena (protiv DNP proizvedeno u zecu), koji je prethodno otopljen u puferu za ispiranje III 1x u koncentraciji 1:5000, 100  $\mu$ L po jažici. Inkubacija traje 120 minuta pri sobnoj temperaturi uz protresanje.

Nakon inkubacije uklonjena je adhezivna folija sa pločice, odstranjena je otopina anti-DNP te su jažice isprane 5 puta dodavanjem 200  $\mu$ L pufera za ispiranje III. Zatim je dodano sekundarno antitijelo (proizvedenim u kozi, a protiv zečjeg primarnog antitijela) konjugirano s HRP, pripremljeno na isti način kao i primarno antitijelo, uz inkubaciju od 60 min pri sobnoj temperaturi uz protresanje. Nakon inkubacije jažice su isprane 5 puta sa 200  $\mu$ L pufera za ispiranje III. Potom je uslijedila inkubacija jažica s 200  $\mu$ L otopinom enzimatskog supstrata 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) koja je rezultirala plavim obojenjem produkta. Enzimatska reakcija je prekinuta dodavanjem 100  $\mu$ L „STOP“ otopine (Stop Solution, 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) čime se boja iz plave promijeni u žutu. Optička gustoća produkta se kvantificira pri maksimalnoj absorpciji od 450 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Sunrise<sup>TM</sup>, Tecan Group, Männedorf, Švicarska).

Pročišćeni ThyA iz LACPL, CLOB1, STAES, METCA, CITK8 i VIBCH kao i NadD iz LACPL, CLOB1, SHEON i PSEF5 proteini su tretirani sa 6M guanidinium hidrokloridom (GuHCl) 5 minuta pri sobnoj temperaturi. ThyA iz LACPL i METCA kao i NadD iz LACPL i PSEF5 su tretirani sa 1M trimetilamin N-oksidom (TMAO) 90 minuta na 37°C. Tretmanima je prethodila adsorpcija proteina na jažice te oksidacija kako je već prije opisano, nakon čega je izmjerena karbonilacija proteina. Također su pripremljeni totalni proteinski ekstrakti iz *P. Putida*, *L. casei*, *B. cereus*, *S. oneidensis*, *C. acetobutylicum* i *E. coli* MG1655 te izmjerena karbonilacija čitavih proteoma.

### 3.1.9 Pročišćavanje ThyA i NadD i tretman sa GuHCl i TMAO

Eksploencijalne kulture *E. coli* koje nose plazmide s *thyA* i *nadD* su uzgajane i tretirane kako je već opisano gore u tekstu. U lizirajući pufer je dodan 20 mM imidazol i lizozim (1 mg/mL). Uzorci su inkubirani 30 minuta pri 37°C i centrifugirani 30 minuta pri 10,000 x g. Kako bi se uklonili veliki proteini iz uzorka, korišteni su Amicon Ultra 50K centrifugalni filteri (Millipore). Filtrat je sakupljen. Za pročišćavanje 6xHis-ThyA i 6xHis-NadD proteina korištene su Ni-NTA super propusne kolone (Qiagen) prema uputama proizvođača. Pročišćeni proteini su koncentrirani (ugušćeni) pomoću Amicon Ultra 3K centrifugalnih filtera (Millipore). Pročišćeni ThyA i NadD su razrijeđeni do 10 µg/mL, nanešeni na jažice mikrotitracijske pločice (Nunc), zatim su inkubirani preko noći na 4°C kako bi se proteini adsorbirali na dno jažica. Adsorbirani proteini su oksidirani oksidacijskom otopinom (sadržaj otopine naveden prethodno) u vremenu od 5, 15 i 30 minuta. Nakon oksidacije izmjerena je karbonilacija proteina. Također, svi pročišćeni ThyA i NadD proteini su tretirani 5 minuta pri sobnoj temperaturi sa 6 M gvanidin hidrokloridom (GuHCl). ThyA iz LACPL, STAES, METCA i VIBCH (ne-patogeni i kontrole), i NadD iz LACPL i PSEF5 (ne-patogeni) su tretirani 90 minuta pri 37°C s 1 M trimetilamin N-oksidom (TMAO) - osmoliti koji stabiliziraju strukturu proteina, zatim su proteini nanešeni na jažice, oksidirani 15 minuta nakon čega je izmjerena proteinska karbonilacija. Molekulske mase pročišćenih proteina (molekulska masa ThyA proteina iznosi 35 kDa; a molekulska masa NadD proteina je 23 kDa) potvrđene su razdvajanjem proteina u 12% (v/v) SDS-PAGE i zatim bojanjem poliakrilamidnog gela s Coomassie modrilom.

### 3.1.10 Tretman s geldanamycinom

Eksploencijalne kulture STAAF, SHEON, PSEAE, KLEP3, LACC3, PSEP1, ECOD1, CLOAB, CLOPS, STRAG, SALTI i BACC1 su izložene 2 µM geldanamycinu (finalno), 3h na temperaturi od 37°C. Isti tretman je primjenjen na *E. coli* MG1655 s pCA24N plazmidom koji nosi *katE*, *katG* i *sodD* gene, odvojeno. Korišten je 100 µM IPTG za indukciju ekspresije proteina. *E. coli* je uzgojena do eksploencijalne faze u prisutnosti 2.5 mM N-acetil-cisteina (finalno) i izložena geldanamycinu kako je već opisano gore u tekstu. Nakon zasađenih serijskih razrijeđenja, određeno je preživljenje nakon inkubacije preko noći na 37°C. Spremljeni su alikvoti za mjerenje proteinske karbonilacije. Za dobivanje proteinskih ekstrakata, sakupljene stanice su istaložene centrifugiranjem 15 minuta na 10,000 x g (Eppendorf 5804R). Stanični talozi su resuspendirani u puferu za liziranje stanica, koji sadrži 10 mM PBS i inhibitore proteaza kako bi se spriječila proteoliza. Pročišćeni proteini su

oksidirani 5 minuta oksidacijskom smjesom (25 mM Natrijev askorbat i 0.1 mM željezov (III) klorid u 25 mM Hepes puferu), nakon oksidacije izmjerena je karbonilacija proteina. Kako bi se odredila količina geldanamicina koja je ušla u stanice, korišten je geldanamicin obilježen sa fluorescein izotiocijanatom (FITC-GL), u istim uvjetima kako je već opisano gore u tekstu za neobilježeni geldanamicin. Nakon 3 sata inkubacije, stanice su isprane u 10 mM PBS i njihova fluorescencija je izmjerena pri ekscitaciji od 495 nm i emisiji od 519 nm.

### **3.1.11 Preživljenje bakterija i mjerenje rezistencije proteina pri povećanju temperature**

Kako bi eksperimentalno ispitali utjecaj povišene temperature na žive bakterije, ekspanzionalne kulture STAAF, SHEON, PSEAE, KLEP3, LACC3, PSEP1, ECODI, CLOAB, CLOPS, STRAG, SALT I i BACCI su izložene temperaturama od 39°C, 41°C, 50°C i 60°C u vremenu od 60 minuta. Nakon zasađenih serijskih razrijeđenja, određeno je preživljenje nakon inkubacije preko noći na 37°C. Spremljeni su alikvoti za mjerenje proteinske karbonilacije.

### **3.1.12 Mjerenje RKV (reaktivne kisikove vrste)**

Kako bi izmjerili proizvodnju RKV-a (engl. *Reactive Oxygen Species*-ROS) u svim proučavanim stanicama, bakterije su uzgajane do OD<sub>600</sub> 0.2-0.3. Dodan je geldanamicin (2 µM finalno) i nakon 15 minuta inkubacije na 37°C, dodan je dihidrorodamin-123 (25 µM finalno). Nakon 30 minuta inkubacije na 37°C, stanice su isprane u 10 mM PBS-u. Količina proizvedenog RKV-a je određena mjerenjem stanične fluorescencije sa ekscitacijom pri 500 nm i emisijom pri 530 nm.

Za unutarstaničnu analizu proizvodnje RKV-a protočnom citometrijom, stanice su inkubirane u mraku sa 10 µg/µL 2',7'-diklorofluorescein diacetatom (H2DCFDA, Sigma) 120 minuta na 37°C i nakon toga analizirane na FACSCalibur protočnom citometru. Fluorescencija 10,000 stanica kao rezultat unutarstanične konverzije ne-fluorescirajućeg H2DCFDA u fluorescirajući 2',7'-diklorofluorescein (DCF), izmjerena je kanalom FL1. Prikupljeni podaci su analizirani pomoću FlowJo softverske verzije 7.2.5 za Microsoft (TreeStar, San Carlos, CA, USA) kako bi se odredila srednja vrijednost intenziteta zelene fluorescencije nakon svakog tretmana. Rezultati su prikazani kao % srednje vrijednosti fluorescencije kontrolnog soja divljeg tipa.

### 3.1.13 Termalna denaturacija ThyA, NadD i sintetičkih peptida

Pročišćeni proteini ThyA i NadD te sintetički peptidi izloženi su termalnoj denaturaciji povećanjem temperature sa 30°C na 94°C uz pomak od 2°C u prisutnosti 1M TMAO (trimetilamin N-oksidi - osmoliti koji stabiliziraju strukturu proteina). Za svaku temperaturu izmjerena je apsorbancija pri 280 nm kako bi odredili krivulju odmatanja za svaki protein. Određena je konformacijska stabilnost svakog proteina procjenom temperature odmatanja dobivene iz krivulja odmatanja. Temperatura odmatanja je ona temperatura pri kojoj je 50% proteina denaturirano (Tablica 4.).

**Tablica 4.** Temperature odmatanja ThyA i NadD u prisutnosti 1 M TMAO.

Ne-patogeni				Kontrolni patogeni	
ThyA		NadD		ThyA	
M. capsulatus	L. plantarum	P. fluorescens	L. plantarum	S. epidermidis	V. cholerae
68°C	63°C	66°C	62°C	69°C	65°C

### 3.1.14 Dizajniranje sintetičkih peptida

Dizajnirane su dvije serije peptida različitih veličina (~25 ak) s visokom vjerojatnošću smatanja u motive (i)  $\alpha$  zavojnice (eng. helix-turn-helix; HTH) i (ii) beta ukosnice (eng. beta-hairpin; BH). Dizajn je baziran na fragmentima prethodno opisanih proteina koji formiraju sekundarne strukture s visokom vjerojatnošću. Točan slijed aminokiselinskih sekvenci pojedinog peptida je određen po PaPS (engl. pathogen proteome signature) i PUPS (engl. pathogen - unrelated proteome signature) vrijednostima na slijedeći način: (1) peptidi s PaPS vrijednostima karakterističnim za proteine iz patogenih bakterija, (2) peptidi s PaPS vrijednostima karakterističnim za proteine iz ne-patogenih bakterija, i (3) peptidi s PaPS vrijednostima iz ne-patogenih bakterija, ali s PUPS vrijednostima koje se razlikuju od PUPS vrijednosti proteina opisanih pod brojem (2). Ovi peptidi služe kao kontrola kojom se pokazuje kako promjena u kompoziciji aminokiseline koja nije povezana s PaPS vrijednostima nema nikakvog učinka na stabilnost strukture proteina i njegovu otpornost na oksidaciju. Peptidi su sintetizirani i kupljeni od GeneCust kompanije. Imena i svojstva peptida prikazani su u tablici 5. Izmjerali smo otpornost na oksidaciju i strukturnu stabilnost svih peptida, kako je već prije opisano u tekstu. Statistička značajnost dobivenih rezultata određena je, za sve slučajeve, pomoću two-tailed t-testa. Kod imena peptida, broj koji se nalazi ispred slova označava (1) peptid s PaPS vrijednostima patogenih bakterija, (2) peptid s PaPS vrijednostima ne-patogenih bakterija, i (3) kontrolni peptid. Peptidi su dizajnirani



pomoću već poznatih, postojećih peptida čija je struktura sastavljena od  $\alpha$  zavojnica i beta ukosnica.

**Tablica 5.** Sažetak svih eksperimenata obavljenih na različitim proteinskim uzorcima sa punim nazivom i HAMAP (High-quality Automated and Manual Annotation of Proteins) kodom vrste iz koje potječu.

	Puni naziv vrste	HAMAP kod vrste
Ukupan proteinski ekstrakt	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>E.coli MG1655</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Shewanella oneidensis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Salmonella tiphy</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i>	PSEAE STAAF ECOD1 KLEP3 PSEP1 LACC3 SHEON BACC1 STRAG SALTI CLOPS CLOAB
ThyA	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Citrobacter koseri</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Methylococcus capsulatus</i>	LACPL CLOB1 STAES CITK8 VIBCH METCA
NadD	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Pseudomonas protegens Pf-5</i> <i>Shewanella oneidensis</i>	LACPL CLOB1 PSEF5 SHEON

### 3.1.15 Kvantifikacija osnovnih trendova u fizikalno-kemijskim svojstvima proteoma

Iz potpuno sekvenciranih bakterijskih genoma unutar baze podataka NCBI Genome Projects (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Bacteria/>), odabrane su bakterije a) obilježene kao patogene ili nepatogene za kralježnjake i b) one koje su pripadale dvjema velikim filogenetskim grupama: Firmicutes (22 nepatogene i 19 patogenih) i  $\gamma$ -proteobacteria (18 nepatogenih i 27 patogenih). Uzet je po jedan soj od pojedinih bakterijskih vrsta (svi sojevi navedeni prethodno u tablici 5.) kako bi se izbjegla pristranost analize prema re-sekvenciranim mikrobima. Genomi unutarstaničnih parazita ili endosimbionata su isključeni zbog učinaka ekstremnog GC sadržaja na aminokiselinski sastav.

Obilježja patogenih u odnosu na ne-patogene bakterije su preuzeta iz NCBI Genome Projects „Iproks0“ tablice [[ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/genomeprj/lproks\\_0.txt](ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/genomeprj/lproks_0.txt)], nakon čega je slijedila ručna obrada podataka. Oportunistički patogeni su svrstani u patogene, kao na primjer *C. koseri*. Za daljnje usporedbe proteoma patogenih i ne-patogenih bakterija, napravljena je kontrola genomskog sadržaja genskih familija. Veći bakterijski genomi su obogaćeni sa specifičnim funkcionalnim kategorijama gena (npr. transkripcijskim faktorima), dok su manji genomi obogaćeni nezamjenjivim osnovnim funkcijama (npr. translacija) (Ranea, i sur., 2005; Supek i sur., 2010.). Ova saznanja mogu utjecati na analizu fizikalno-kemijskih svojstava proteoma, jer neke funkcionalne kategorije mogu imati neobičan sastav aminokiselina, kao na primjer ribosomalni proteini (Lin i sur., 2002.). Kako bismo kontrolirali takve utjecaje, korišteni su samo geni koji su upisani u COG (engl. clusters of orthologous groups) (Tatusov i sur., 2003) ili NOG ortologne grupe iz eggNOG baze podataka ortolognih grupa i funkcionalnih anotacija (Jensen i sur., 2008.), u iznosu od 2986.7 (od originalnih 3430.3) gena po genomu. Nadalje, unutar Firmicutes i  $\gamma$ - proteobacteria odvojeno su testirani geni da povećaju zajedničku frekvenciju pojedinog COG/NOG u patogenih i ne-patogenih bakterija, zadržavajući u prosjeku 2352.5 gena po genomu.

Prevođenje gena u proteine je opisano pomoću 59 fizikalno-kemijskih svojstava iz prethodnih istraživanja ekstremofilnih proteina (Smole i sur., 2011.), baziranih na selekciji (Atchley i sur., 2005) iz "Amino Acid Index" baze podataka. Proteomi su prikazani kao prosjek vrijednosti svih uzorkovanih proteina. Analize osnovnih komponenti su izvedene pomoću XLStat 2010.6 na 59 svojstava i 20 amino-kiselinskih frekvencija - ukupno 79 obilježja- unutar 86 proteoma. PaPS je linearna kombinacija PC1 i PC2 koja ima nagib (kosinu) (0.66) određen na temelju prosjeka nagiba linija koje povezuju patogene i ne-patogene centroide kod Firmicutes (0.72) i  $\gamma$ - proteobacteria (0.59). Stoga, PaPS je odrednica varijabilnosti u fizikalno-kemijskim svojstvima, koji definira razliku između proteoma patogenih i ne-patogenih bakterija. Za pronalazak fizikalno-kemijskih svojstava koji se odnose na PaPS vrijednosti (Slika 16D), korišten je ne-redundantni set svojstava ( $<0.9$  Spearman korelacija između bilo kojeg para svojstava u setu), dobiven procedurom opisanom u Smole i sur., 2011. Također je dizajnirana kontrolna varijabla PUPS koja nije korelirana s PaPS vrijednostima na grafovima za osnovne komponente: ima nagib jednak negativnom recipročnom nagibu PaPS u slijedećem koordinatnom sustavu (0.66 za PaPS; -0.34 za PUPS; efektivno, PaPS i PUPS su rotacije originalnih PC1 i PC2 linija, redom). Dakle, dva proteoma sa različitim PUPS vrijednostima, zasigurno imaju različiti aminokiselinski sastav na način

koji ne utječe na njihovu sličnost u svojstvima karakterističnim za patogene ("pathogen-likeness") ako imaju jednake PaPS vrijednosti.

### 3.1.16 Odabir familija gena koji pokazuju velike razlike između patogena i ne-patogena

Odabrane su specifične familije gena koje prikazuju trendove čitavih proteoma između patogenih i ne-patogenih bakterija, sažetih u PaPS vrijednostima. Procijenjena su 853 najraširenija COG-a (oni koji imaju najmanje 10 reprezentativnih proteina u svakom od navedenih: patogenima iz Firmicutes, patogenima iz  $\gamma$ - proteobakterija, ne-patogenima iz Firmicutes i ne-patogenima iz  $\gamma$ - proteobakterija). Kako bi odredili razliku između patogenih i ne-patogenih proteoma unutar pojedinog COG-a na temelju PaPS vrijednosti, izračunata je vrijednost površine ispod krivulje (AUC) za COG-ove posebno za svaku od dviju filogenetskih grupa. Također je izračunata vrijednost površine ispod krivulje za PUPS kontrolni motiv. AUC od  $\sim 0.5$  predstavlja vrijednost koja ne pokazuje razliku između patogenih i ne-patogenih, dok 1.0 vrijednost pokazuje savršenu razliku. Kako bi se eksperimentalno dokazala postavljena hipoteza, prema kojoj razlika u PaPS motivu, a ne u PUPS kontrolnom motivu, pruža strukturnu stabilnost i otpornost na oksidaciju proteinima patogenih bakterija, odabrana su dva COG-a: COG0207 (Thy u *E. coli*) i COG1057 (NadD u *E. coli*) sa visokom AUC vrijednošću za PaPS, ali niskom za PUPS, u obe filogenetske grupe. Za Firmicutes ThyA je imao vrijednost AUC PaPS = 0.80, a AUC PUPS=0.50 ; za  $\gamma$ - proteobakterije AUC PaPS = 0.83, a AUC PUPS=0.48. Vrijednost NadD za Firmicutes AUC PaPS =0.87, a AUC PUPS=0.60, dok su za  $\gamma$ - proteobakterije vrijednosti bile 0.79 i 0.43.

Ove AUC vrijednosti statistički značajno odvajaju patogene od ne-patogenih proteina prema PaPS vrijednostima (P-vrijednosti prema Mann-Whitney U testu na slikama 16E-H). Odabrana su dva COG-a kako bi se zadovoljili i drugi kriteriji: heterologna ekspresija, duljina proteina, homogenost duljine unutar COG familije. Za gensku familiju od svakog ThyA i NadD, odabrani su reprezentativni proteini prema PaPS vrijednostima proteina. Odabrani su slijedeći ThyA proteini: (a) dva proteina od patogena (CLOB1, CITK8) s vrijednostima PaPS koja vrijede za patogene; (b) dva od ne-patogena (LACPL, METCA) s vrijednostima PaPS koja se odnose na ne-patogene; i (c) dva od patogena (STAES, VIBCH) s PaPS vrijednostima koja se odnose na ne-patogene, sličnima posljednjoj grupi, ali s različitim rasporedom aminokiselina (prema kontrolnim PUPS vrijednostima). Kontrolna grupa (c) pokazuje da je PaPS motiv u kompoziciji aminokiselina odgovoran za otpornost na oksidaciju. Budući da

proteini iz kontrolne grupe potječu iz patogena, ali imaju PaPS vrijednosti ne-patogena, oni su još jedan pokazatelj kako PaPS određuje „patogenost“ proteina, dok druga svojstva proteoma patogena nemaju takav učinak. Za NadD odabrani su: (a) dva proteina iz patogena (CLOB1, SHEON), sa patogenim PaPS vrijednostima i (b) dva iz ne-patogena (LACPL, PSEF5) s nepatogenim PaPS vrijednostima. Kako bi se osigurali da dobiveni rezultati nisu specifični samo za pojedinu filogenetsku grupu, odabrani proteini čine po jedan protein iz Firmicutes i jedan iz  $\gamma$ -proteobakterija.

## 3.2 KVASCI

### 3.2.1 Sojevi kvasca

Koristili smo sljedeće sojeve kvasaca koji imaju povećanu ekspresiju različitih proteinskih šaperona te delecije dvaju transkripcijskih faktora, u divljem tipu kvasca *Saccharomyces cerevisiae* Y258:

1. WT Y258 - divlji tip; kontrola
2. YKL073W (Lhs1) - molekularni šaperon lumena endoplazmatskog retikuluma, sudjeluje u translokaciji i smatanju polipeptida
3. YJR045C (Ssc1-mt HSP70) - ATP-aza iz HSP70 familije šaperona, translokaza unutarnje mitohondrijske membrane; sudjeluje u translokaciji i smatanju proteina
4. YHR 193C (Egd2) - alfa podjedinica NAC kompleksa, sudjeluje u sortiranju i translokaciji proteina, povezana sa citoplazmatskim ribosomima
5. YDR 212W (Tcp1) - alfa podjedinica T-kompleksa, pomaže smatanje proteina u citosolu
6. PYES2 - prazni plazmid transformiran u WT Y258 kao kontrola
7. Petit mutant - mutant koji ima defekt stanične respiracije. Ovakav fenotip može biti posljedica nedostatka ili mutacija u mitohondrijskoj DNA.
8.  $\Delta$ Snf1
9.  $\Delta$ Hsf1

Divlji tip kao i sojevi sa povećanom ekspresijom LHS1, SSC1, EGD2, and TCP1 gena, te  $\Delta$ SNF1 i  $\Delta$ Hsf1 kupljeni su od kompanije Thermo Scientific (Dharmacon).

### 3.2.2 Hranjivi mediji i uvjeti rasta

Za divlji tip Y258, mutante s delecijom šaperona i *petite* mutanta korišten je YPD medij koji sadrži 2% (w/v) glukoze, 1% (w/v) kvašćevog ekstrakta, 2% (w/v) peptona. Za sojeve mutanata sa povećanom ekspresijom šaperona i kontrolni soj sa praznim PYES plazmidom korišten je –URA medij koji sadrži 2% (w/v) glukoze, 1% (w/v) kvašćevog ekstrakta, 2% (w/v) peptona i –URA DO.

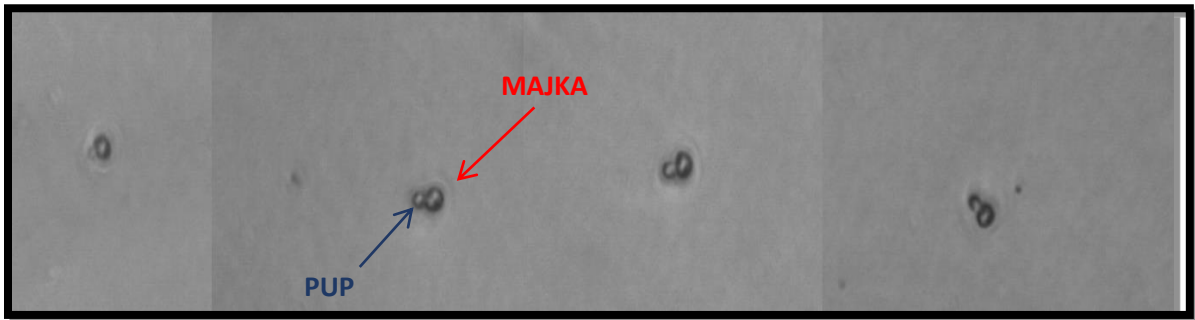
Svi sojevi rastu pri temperaturi od 30°C uz protresanje. Svi eksperimenti su obavljani sa stanicama kvasaca iz srednje eksponencijalne faze rasta, osim ako nije navedeno suprotno. Stanice su uzgajane do optičke gustoće (OD<sub>600</sub>) između 0.6-0.8, sakupljene centrifugom 20 min pri 4000 x g, dva puta isprane u PBS X 1, i zatim tretirane. Kontrolni soj je uvijek divlji tip sa praznim plazmidom.

### 3.2.3 Mjerenje replikativnog starenja kod pupajućeg kvasca *S. cerevisiae* pomoću mikromanipulatora

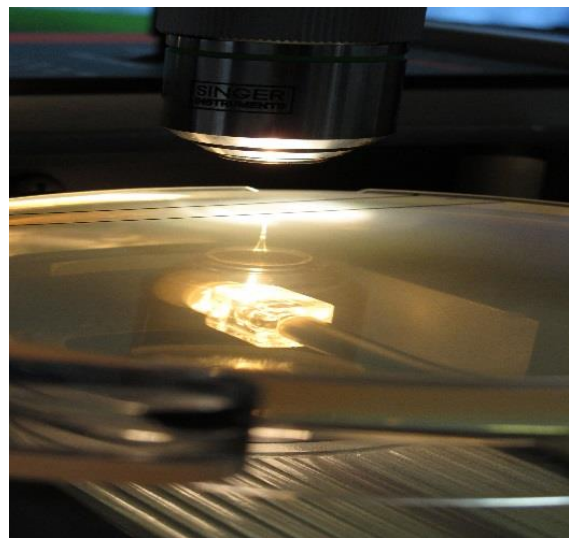
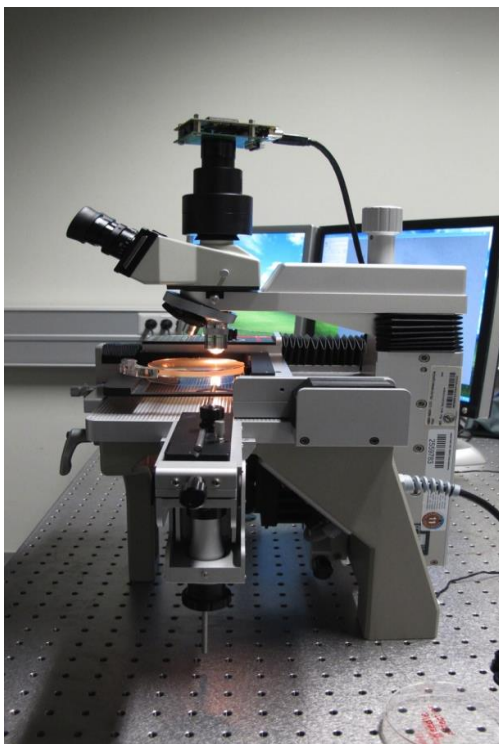
*S. cerevisiae* se dijeli asimetrično, stanica majke daje manju stanicu kćeri (pup) što omogućava razlikovanje stanice majke od pupova i njeno praćenje kao individue tokom vremena (Slika 9). Mjerenje replikativnog starenja kod svih sojeva opisanih prethodno učinjeno je pomoću mikromanipulatora. Kako bi se izbjeglo formiranje kolonija i osiguralo da se tokom eksperimenta prati jedna te ista stanica majke, pupovi odnosno stanice kćeri uklanjaju se ručno od stanice majke koristeći standardni mikroskop opremljen s aparaturom za mikrodisekciju kvasaca (Singer Instruments; Spore play, manual yeast tetrad dissection) - mikromanipulator (Slika 10 i 11). Mjerenjem replikativnog starenja određen je broj stanica kćeri koje proizvede jedna stanica majke. Stanice su inkubirane 2 dana na 30°C na YPD (divlji tip, mutanti sa delecijom šaperona i *petite* mutant) i –URA (mutanti sa povećanom ekspresijom šaperona) krutim podlogama, uklonjene iz inkubatora te postavljene iz jedne kolonije na novu podlogu s odgovarajućim medijem. Pomoću mikromanipulatora, otprilike 40 stanica je prenešeno iz razmaza, iz jedne kolonije, na definirana mjesta na agar ploči.

Za određivanje replikativnog životnog vijeka, odabrali smo stanice kćeri („djevice“) koje prethodno nisu proizvele niti jednu stanicu kćeri, dakle, nakon što su prvotno postavljene stanice proizvele jednu stanicu kćeri, roditeljska stanica je uklonjena mikromanipulacijom, a stanica kćeri ostavljena za daljnje praćenje. Ploče su čuvane na 30°C i svaka stanica je praćena kontinuirano svakih 90 minuta tijekom nekoliko dana, uključujući i praćenje tokom noći. Svaka nova stanica kćeri je ubrojena, zatim uklonjena i zabilježena, ostavljajući za

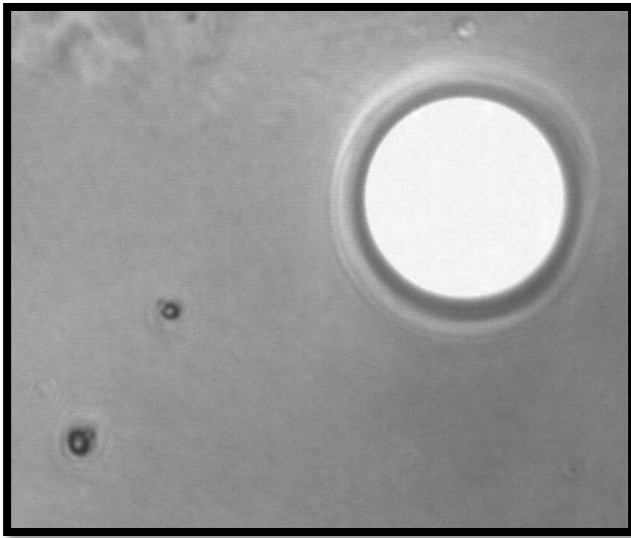
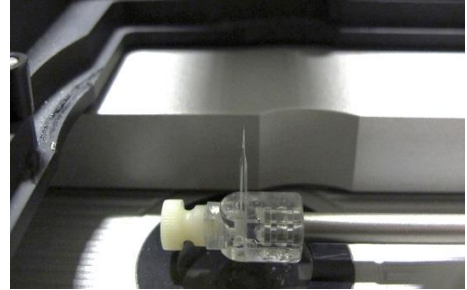
sobom samo stanicu majke koja nastavlja sa replikacijom do svoje starosti. Ovi koraci se ponavljaju dok sve stanice majke ne prestanu sa dijeljenjem. Na kraju se zbraja ukupan broj stanica kćeri koje je proizvela pojedina stanica majke. Za svaki soj, pratili smo ukupno više od 100 stanica kao što je prikazano u odjeljku s rezultatima.



**Slika 9.** Stanice kvasca: crvenom strelicom označena je stanica majke, a plavom kćer u fazi pupanja



**Slika 10.** Mikromanipulator

**A****B**

**Slika 11.** (A) Velika bijela kružnica prikazuje iglu mikromanipulatora kojom se razdvajaju majka i kćer (usporedba veličine igle s veličinom stanica) (B) Igla mikromanipulatora

### 3.2.4 Izolacija proteina iz kvasaca

Kulture su razrijeđene u svježem tekućem mediju te inkubirane na 30°C do srednje eksponencijalne faze rasta ( $OD_{600}=0.5-0.9$ ). Stanice su centrifugirane 20 min pri 4000 x g, te dva puta isprane u PBS X 1. Za staničnu lizu, talog stanica je resuspendiran u 200  $\mu$ L pufera za liziranje koji se sastoji od: PBS X 1, zimoliaz (0.06 U/  $\mu$ l; Zymoresearch) te inhibitora proteaza 100 X (Sigma) kako bi se spriječila proteoliza. Uzorci su uz protresanje inkubirani 60 min na temperaturi od 37°C u svrhu razbijanja stanične stijenke kvasca pomoću zimoliaz. Nakon inkubacije, suspenzija je centrifugirana 20 min pri 4000 x g te supernatant odvojen u nove eppendorf tubice.

### 3.2.5 Određivanje koncentracije proteina iz kvasaca i mjerenje

#### karbonilacije

Za određivanje koncentracije proteina korištena je kolorimetrijska metoda po Bradfordu (Sigma) (Bradford, 1976.).

Na 1  $\mu$ l pročišćenih proteina i standarda u rasponu od 0-10  $\mu$ l (u standarde je dodan 1  $\mu$ l pufera za liziranje – opisan u odjeljku 3.2.4), u mikrotitarskoj pločici, dodano je 200  $\mu$ l

Bradfordovog reagensa (opisano u odjeljku za otopine). Kao standardi, korištena su različita razrijeđenja albumina iz goveđeg seruma (BSA, Sigma) u rasponu koncentracija 0 – 0.05 mg/ml. Intenzitet plavog obojenja, koji nastaje u reakciji proteina i Bradfordovog reagensa mjereno je apsorbacijom valne duljine od 595 nm.

Mjerenje karbonilacije izvedeno po već opisanom postupku (vidi poglavlje 3.1.8).

### **3.2.6 Određivanje unutarstaničnog RKV-a**

Metoda se temelji na deacilaciji i unutarstaničnoj oksidaciji 2,7-diklorodihidrofluorescein diacetata (H2DCFH-DA, Sigma) u fluorescentni 2,7-diklorofluorescein (DCF) (Chen i sur., 2010.). Spoj H2DCFH-DA ne fluorescira dok se ne pocijepa unutarstaničnim esterazama, te kao takav postaje visoko reaktivan s vodikovim peroksidom pri čemu dolazi do oksidacije i fluorescencije, stoga se standardno koristi za unutarstanično određivanje RKV-a. Stanice iz srednje eksponencijalne faze rasta ( $OD_{600} \sim 0.5-0.9$ ), uzgajane u odgovarajućem mediju su centrifugirane, a talog stanica otopljen je u 1 ml fosfatnog pufera (PBS, pH 7,0) s  $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  H2DCFH-DA. Stanice su inkubirane 120 min u mraku u rotacionom inkubatoru na  $37^\circ\text{C}$ , kako bi se omogućio ulazak boje u stanicu, zatim su analizirane Becton-Dickinson FACSCalibur protočnim citometrom opremljenim s 488 nm Argonskim laserom i 635 nm laserskom crvenom diodom. Fluorescencija od 10 000 stanica izmjerena je pomoću FL1 kanala. Sakupljeni podaci analizirani su FlowJo verzijom softvera 7.2.5 za Microsoft (TreeStar, San Carlos, CA, USA) kako bi odredili srednju vrijednost intenziteta zelene fluorescencije nakon svakog tretmana. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost fluorescencije od 10 000 stanica.

### **3.2.7 Mjerenje respiracije**

Iskoristivost kisika izmjerena je polarografski pomoću oksigrafa opremljenog Clark elektrodama (Oxygraph, Hansatech, Norfolk, UK). Stanice su sakupljene tijekom eksponencijalnog rasta, centrifugirane i resuspendirane u odgovarajućem mediju do konačne koncentracije od  $30 \times 10^6$  stanica/mL.  $500 \mu\text{L}$  kulture je prebačeno u komorice oksigrafa volumena 1.5 mL. Tijekom eksperimenta stanice su tretirane na sličan način kao i prilikom rasta u kulturi ( $30^\circ\text{C}$  uz protresanje). Sadržaj kisika mjereno je 4 minute. Kako bismo bili sigurni da je izmjerena iskoristivost kisika posljedica mitohondrijske aktivnosti, u kulturu je dodan inhibitor kompleksa III, antimicin (finalna koncentracija,  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), te je napravljena usporedba s razinom bez antimicina.



### 3.2.8 Protočna citometrija

Protočna citometrija izvedena je na modelu Becton-Dickinson FACSCalibur opremljenog s 488 nm Argonskim laserom i 635 nm crvenom laserskom diodom.

### 3.2.9 Mjerenje membranskog potencijala mitohondrija

Razlike u transmembranskom potencijalu mitohondrija ( $\Delta\Psi_m$ ) proučavane su pomoću DiOC6(3), cijanin kationske boje koja se nakuplja u mitohondrijskom matriksu ovisno o potencijalu na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani,  $\Delta\Psi_m$  (Perry i ostali, 2011.). Stanice su inkubirane 30 min na 30°C u mraku uz stalno protresanje, u jednom mililitru medija koji sadrži 40 nM DiOC6(3).

Protočna citometrija napravljena je na već opisanom Becton-Dickinson FACSCalibur modelu. DiOC6(3) fluorescencija ovisna o membranskm potencijalu zabilježena je pomoću "FL1-height". Ukupno 10 000 stanica je analizirano za svaki uzorak. Sakupljeni podaci analizirani su pomoću FlowJo softvera, verzije 7.2.5 za Microsoft (TreeStar, San Carlos, CA, USA), kako bi se odredila srednja vrijednost zelene fluorescencije nakon svakog pojedinog tretmana. Rezultati su prikazani kao postotak srednje vrijednosti fluorescencije kontrolnog soja divljeg tipa. Za negativnu kontrolu, u svakom eksperimentu, prouzrokovan je kolaps mitohondrijskog membranskog potencijala u alikvotima stanica, prethodnom inkubacijom stanica sa FCCP (engl. carbonyl cyanide -4- trifluoromethoxy phenylhydrazone) (100  $\mu$ M) – ionski nosač, utječe na sintezu ATP-a prenošenjem  $H^+$  iona kroz staničnu membranu prije nego se mogu upotrijebiti za proizvodnju energije za oksidativnu fosforilaciju, te antimicinom (5  $\mu$ g/ml) – inhibitor respiratornog lanca, 10 min prije bojanja sa fluorescentnom bojom.

### 3.2.10 Mjerenje mitohondrijske mase određivanjem sadržaja kardiolipina

Za mjerenje mitohondrijske mase koristili smo NAO (opisan u 3.2.7.1 odjeljku), boju koja se veže za kardiolipin, fosfolipid specifično prisutan u mitohondrijskoj membrani (Petit i sur., 1996; Rodriguez, 2008; Duchen, 2002). Stanice ( $1 \times 10^6$ /ml) su inkubirane 30 min na 30°C u mraku uz stalno protresanje, u jednom mililitru medija sa 100 nM NAO boje. Uzorci su zatim analizirani FACSCalibur protočnom citometrijom sa istim postavkama kao i za DiOC<sub>6</sub>(3). Negativna kontrola ista kao i u 3.2.9 odjeljku.

### 3.2.11 Mjerenje razine ATP-a

Za mjerenje razine ATP-a u divljem tipu Y258, *petit* mutantu i mutantnim sojevima sa povećanom ekspresijom i delecijom šaperona korišten je ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BioVision). U ovoj metodi fosforilacijom glicerola stvara se produkt koji se zatim kvantificira kolorimetrijskom metodom (OD 570 nm). Pomoću ovog kita može se detektirati do 50 pmol (1  $\mu$ M) ATP-a u različitim uzorcima. Za pripremu uzoraka,  $2 \times 10^6$  stanica je lizirano u 100  $\mu$ l ATP Assay puferu sa zimoliazom (0.1 U/ $\mu$ l) te inkubirano 1h na 37°C uz lagano protresanje. Nakon inkubacije, određena je koncentracija proteina kolorimetrijskom metodom po Bradfordu (Sigma). Stanični lizat tretiran je s kitom za deproteinizaciju (engl. Deproteinization Sample Preparation Kit; BioVision, Cat. # 1997), koji se temelji na PCA (engl. perchloric acid) metodi proteinske precipitacije. Prisutnost proteina i različite enzimske aktivnosti često interferiraju s analizom malih molekula u biološkim uzorcima, zbog toga većina bioloških metoda zahtijeva uklanjanje proteina prije same analize. Pomoću kita, proteini su precipitirani, ostatak PCA uklonjen, a uzorci neutralizirani. U 96 mikrotitarsku pločicu dodano je 40  $\mu$ l uzorka i ATP assay pufera do konačnog volumena od 50  $\mu$ l po jažici, zatim je određena kolorimetrijska standardna krivulja.

Uzorci i standardi su pomiješani s reakcijskim miksom, zatim inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi u mraku. Apsorbancija je izmjerena (OD 570 nm) u čitaču mikrotitarskih pločica.

### 3.2.12 Izolacija RNA

Izolirana je ukupna RNA iz  $3 \times 10^8$  stanica kvasca korištenjem NucleoSpin RNA kita (Macherey & Nagel). Izolaciji prethodi inkubacija stanica s 50-100 U zimoliazom, 60 minuta na 30°C. Kvaliteta rezultata izolacije ukupne glasničke RNK provjerena je 1 % agaroznim gelom.

### 3.2.13 Kvantitativni „real-time“ PCR

Sintetizirana je cDNA iz 1  $\mu$ g ukupne RNA pomoću kita iScript™ cDNA sinteze (BioRad). Dobivena cDNA razrijeđena je 100 x, pomiješana s parovima početnica za svaki pojedini gen i sa SYBR-green (BioRad). Imena gena čija je ekspresija izmjerena kvantitativnim PCR-om, kao i sekvence početnica, prikazane su u Tablici 7. Svi parovi početnica dizajnirani su tako da imaju temperaturu sparivanja 60°C. Reakcija kvantitativnog PCR-a izvedena je na QuantFlexStudio 6 (Life Technologies), koristeći 40 ciklusa, nakon kojih su određene krivulje denaturacije za svaku jažicu. Diferencijalna ekspresija gena prema kvantitativnom PCR-u

izračunata je iz tri i četiri replikata pomoću EasyqpcR (La Pape, 2015.) koristeći metode iz Hellemans i ostali, 2007, uklanjanjem CT vrijednosti jedne standardne devijacije od srednje vrijednosti Ct za svaku gen/soj kombinaciju. Konačne vrijednosti promjena izračunate su prema UBC6 genu iz replikata kontrolnog soja.

### **3.2.14 Metaboličko označavanje novo-sintetiziranih proteina s L-AHA**

Kit za metaboličko označavanje i detekciju Click-iT (Invitrogen) korišten je za detekciju novosintetiziranih proteina.  $6.4 \times 10^7$  stanica je upotrijebljeno kako bi se napravio stanični lizat koji sadrži približno 200  $\mu\text{g}$  proteina. Click-iT reagens za metaboličko označavanje je otopljen u DMSO do finalne koncentracije stoka 1000x. Stanice su isprane ugrijanim PBS-om, dodan je medij bez metionina te inkubiran 90 minuta na 30°C. Stanice su sakupljene centrifugiranjem 5 minuta na 400 x g. Stanični pelet je ispran PBS-om, resuspendiran u PBS-u koji sadrži 0.2 U/ $\mu\text{l}$  zimolijaze i inhibitore proteaza te inkubiran 60 minuta na 37°C. Stanični lizat je sonificiran, vorteksiran 5 minuta te centrifugiran na 1000 x g na 4°C 5 minuta. Koncentracija proteina određena je Bradfordovim reagensom (Sigma). Uzorci proteina su razdvojeni pomoću 10 % 1D SDS-PAGE gelu i zatim preneseni na PVDF membranu. Detekcija Western blot signala je obavljena pomoću alkilne molekule koristeći Click-iT kit za proteinsku analizu (Invitrogen) i streptavidin-HRP na gelu. Kvantifikacija je obavljena u ImageJ softveru: Western blot signal svakog uzorka normaliziran je na signal ukupnih proteina u gelu obojanom Coomassie modrilom.

### **3.2.15 Detekcija Hsp90 i Snf1 Western analizom**

Stanice su inkubirane u 1 mL pufera za lizu stanica 60 minuta na 37°C. Stanični pelet je resuspendiran u puferu za lizu sferoplasta, stanice su vorteksirane 1 minutu te ostavljene na ledu 30 minuta, s povremenim vorteksiranjem. Nakon centrifugiranja, supernatant je sakupljen te je određena koncentracija proteina koristeći Bradfordov reagens (Sigma).

25  $\mu\text{g}$  proteina je pomiješano sa Laemmli puferom, zagrijano na 95°C 5 minuta te stavljeno na 7.5 % SDS-PAGE gel. Proteini su zatim prebačeni na nitroceluloznu membranu na 200 mA 60 minuta.

Za detekciju Hsp90 šaperona, membrana je blokirana s 5% mlijekom u PBS-u s 0.1 %-tnim Tweenom-20, 60 minuta. Anti-Hsp90 protutijelo (1 mg/ml) (StressMarq Biosciences) je razrijeđeno 2500 x u puferu za blokiranje i inkubirano s membranom preko noći na 4°C.

Detekcija je rađena sa sekundarnim protutijelom protiv miša konjugiranim s HRP-peroksidazom (2 mg/ml) razrijeđenim 20000 x u puferu za blokiranje.

Za detekciju fosforiliranog Snf1 šaperona, membrana je blokirana u 5 % BSA u TBST-u 60 minuta. Snf1 protutijelo je razrijeđeno 25000 x u puferu za blokiranje i inkubirano s membranom preko noći na 4°C. Detekcija je rađena sa sekundarnim protutijelom protiv zeca konjugiranim sa HRP-peroksidazom razrijeđenim 7000 x u puferu za blokiranje.

### 3.2.16 Ko-imunoprecipitacija

Kako bismo detektirali količinu Hsp90-Snf1 kompleksa u ispitanim sojevima, izvedena je ko-imunoprecipitacija, slijedeći protokol iz kita za ko-imunoprecipitaciju (Pierce). Dodana su 4 mg izoliranih proteina na kolonu prethodno inkubiranu sa 100 µg Anti-Hsp90 protutijelom (1 mg/mL) (StressMarq Biosciences), slijedi inkubacija preko noći na 4°C. Isprani proteini provjereni su na 7.5 %-tnom SDS-PAGE gelu, zatim je slijedila Western blot analiza koja je izvedena po već opisanoj metodi za detekciju fosfo-Snf1.

### 3.2.17 Statističke analize

Podatci su statistički analizirani pomoću programa R v2.15.3 (CRAN, <http://cran.r-project.org>) i Rstudio za Windows, v 0.97 (<http://www.rstudio.com/>). Sve grupe su testirane na normalnost distribucije Shapiro-Wilk testom. Kako su podatci slijedili normalnu distribuciju, razlike između brojnih grupa uspoređene su jednosmjernom ANOVOM, nakon koje slijedi Tukey's *post hoc* test. Razlike između dviju grupa testirane su Student's two-tailed t-testom. Za sve testove, razina statističke značajnosti postavljena je na  $p < 0.05$ .

## RNA sekvenciranje

### 3.2.18 Mapiranje sekvenci

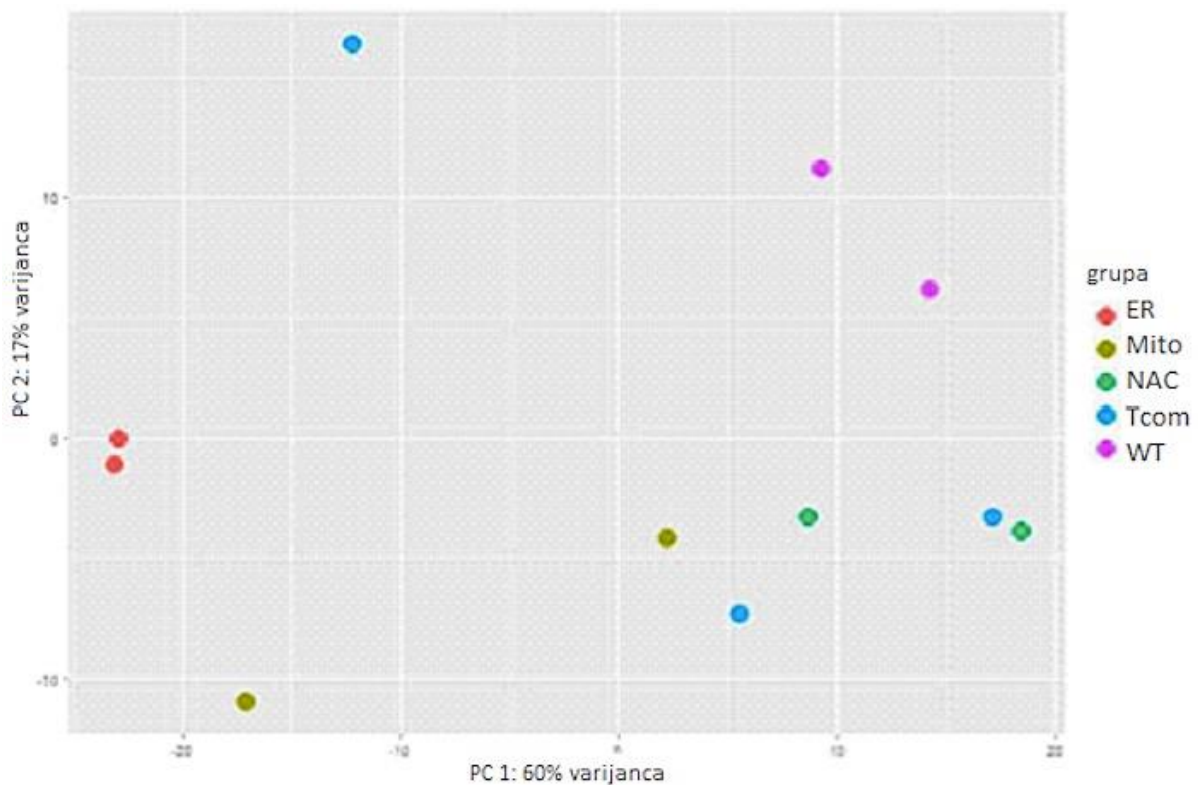
Očitavanja sekvenci (Illumina 50 bp single-end) mapirana su na SacCer3 referentni genom (April 2001 revision, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/285498/>, genom preuzet iz UCSC Genome Browser; Rosenbloom i sur., 2015.) pomoću STAR aligner programa (verzija 2.3.0e Dobin i sur., 2013.). Referentni transkripti preuzeti su iz Ensembl izvora za genom kvasca u GTF formatu.

Neobrađeni podatci iz sekvenciranja određeni su iz preklapanja s genima kvasca iz Ensembl izvora koristeći htseq-count verziju 0.6.0 iz okvira HTSeq (Anders i sur., 2014.), sa slijedećim parametrima: -a 10 -s no.

### 3.2.19 Analize diferencijalne ekspresije gena

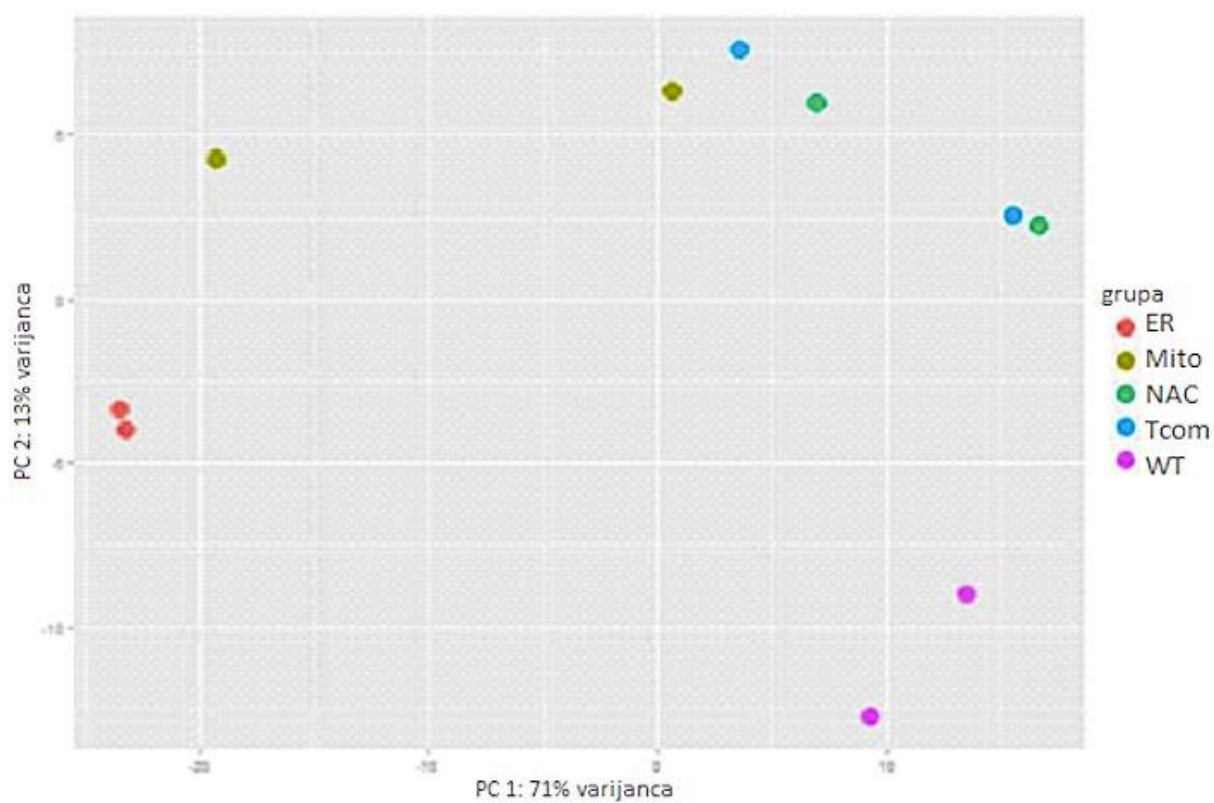
Neobrađena očitavanja za različite ekspresije analizirana su sa DeSeq2 paketom (Love i sur., 2014.) unutar Bioconductor okvira za očitavanje diferencijalne ekspresije gena (Huber i sur., 2015.) u R statističkom paketu (R Core Team), uz prethodno filtriranje replikata s netipičnim vrijednostima PCA analizom na rlog transformirane podatke replikata (Slika 12).

A



Slika 12. (opis na str.57)

**B**



**Slika 12.** PCA-bazirano filtriranje replikata RNA sekvenciranja. Prve dvije koordinate osnovnih komponenti korištene su za identifikaciju replikata netipičnih vrijednosti (engl. outlier). (A) PCA graf prije uklanjanja netipičnih vrijednosti. (B) PCA graf nakon uklanjanja netipičnih vrijednosti.

## 4. Rezultati

---

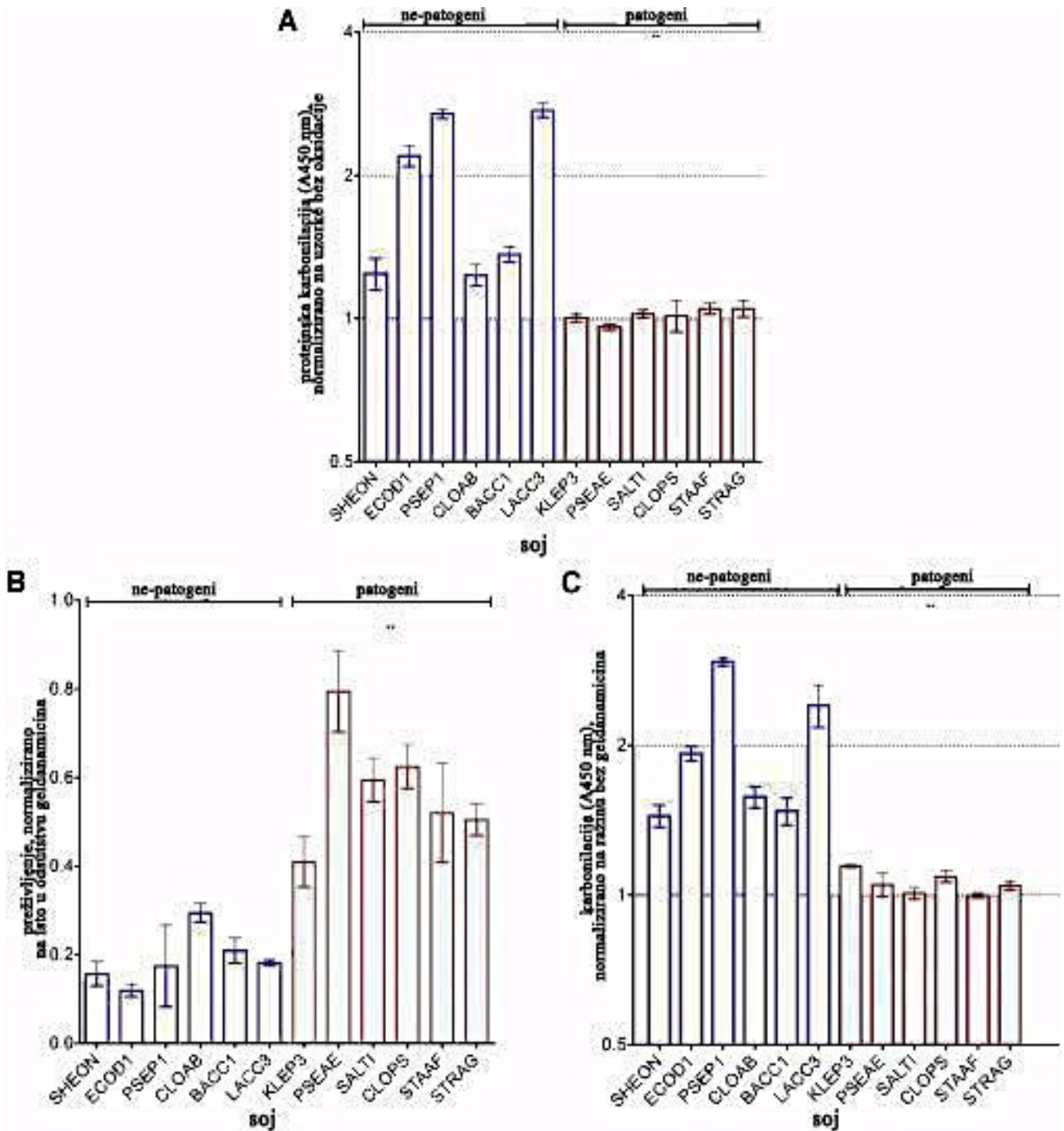
### 4.1 Proteomi patogena su rezistentniji na oksidaciju *in vitro* i HSP90 inhibiciju *in vivo*

U ovom istraživanju postavljena je hipoteza koja nalaže da su proteini iz patogenih bakterija modeli onih proteina koji su otporniji na oksidacijski stres. Kako bismo proučili mehanizam zaštite proteina u nativnoj konformaciji te potvrdili postavljenu hipotezu odabrali smo 6 reprezentativnih patogenih i 6 nepatogenih bakterija, koje potječu iz dviju različitih evolucijskih grupa, Firmicutes i  $\gamma$ -proteobacteria, čije smo proteine koristili kao kontrolu, te testirali osjetljivost na oksidaciju čitavog proteinskog ekstrakta svake pojedine vrste. Rezultati su pokazali da proteinski ekstrakti odabranih patogenih bakterija (Tablica 5.) imaju veću rezistenciju na oksidativni stres za 1.9-puta u odnosu na ne-patogene ( $p=0.0002$ ) (Slika 13A).

Zatim je kod istih 12 bakterija izmjerena rezistencija na utjecaj geldanamicina, inhibitora šaperona HSP90. U normalnim uvjetima, nedostatak šaperona HSP90 ne bi trebao uzrokovati štetu stabilnom proteomu, što je pokazano visokim preživljenjem stanica i niskom razinom proteinskog oštećenja nakon tretmana geldanamicinom. Rezultat je pokazao 19 % prosječno preživljenje ne-patogena (Slika 13B) i 58 % preživljenje patogena ( $p<0.0001$ ). Smrtnost uzrokovana geldanamicinom popraćena je proteinskom karbonilacijom čitavog proteoma (Slika 13C); niža smrtnost patogenih bakterija korelira s 1.9 puta manjom prosječnom razinom proteinske karbonilacije u odnosu na ne-patogene ( $p<0.0001$ ). U sve stanice istraživanih bakterijskih vrsta, dospjela je ista količina geldanamicina, isključujući na taj način propusnost membrane kao jedan od razloga za nisku osjetljivost patogenih bakterija na geldanamicin (Slika 14A). Prisutnost geldanamicina nije uzrokovala porast proizvodnje RKV u nijednoj ispitanjoj vrsti (Slika 14B i 14C), isključujući mogućnost da je rezistencija patogenih bakterija na geldanamicin posljedica učinkovite supresije RKV-a induciranih geldanamicinom. Naime, rezultati kod 12 ispitanih vrsta bakterija pokazuju poveznicu između povećane strukturne stabilnosti proteina i otpornosti na oksidaciju. Nadalje, ispitan je zaštitni utjecaj antioksidativnih enzima KatE, KatG, SodD i male antioksidativne molekule N-acetilcisteina (NAC) na djelovanje geldanamicina u bakteriji *E. coli*. Koncentracija antioksidativnih enzima povećana je u stanicama bakterije *E. coli* pomoću ekspresijskih vektora kako je opisano u materijalima i metodama. Bez obzira na izvor antioksidacijske aktivnosti, ona objašnjava samo 18 % prosječne razlike u otpornosti na geldanamicin između

patogena i ne-patogena (Slika 13B; Slika 14D). Sva četiri antioksidansa su u prosjeku povisila preživljenje za 30 % u prisustvu geldanamicina, ali je razlika u preživljenju između patogena i ne-patogena još uvijek 3 puta (Slika 13B). Za razinu proteinske karbonilacije trendovi su se pokazali konzistentnima kod bakterija *E. coli* sa povećanom ekspresijom KatE, KatG, SodD u prisutnosti 2  $\mu$ M geldanamicina i predtretmanom s N-acetilcisteinom (Slika 14E). Drugim riječima, otpornost proteoma na oksidaciju koja se može postići povećanjem antioksidacijske zaštite je mala u usporedbi s razlikama koje su pronađene između patogena i ne-patogena. Te razlike se mogu pripisati drugim izvorima, kao što su intrinzična svojstva proteoma.

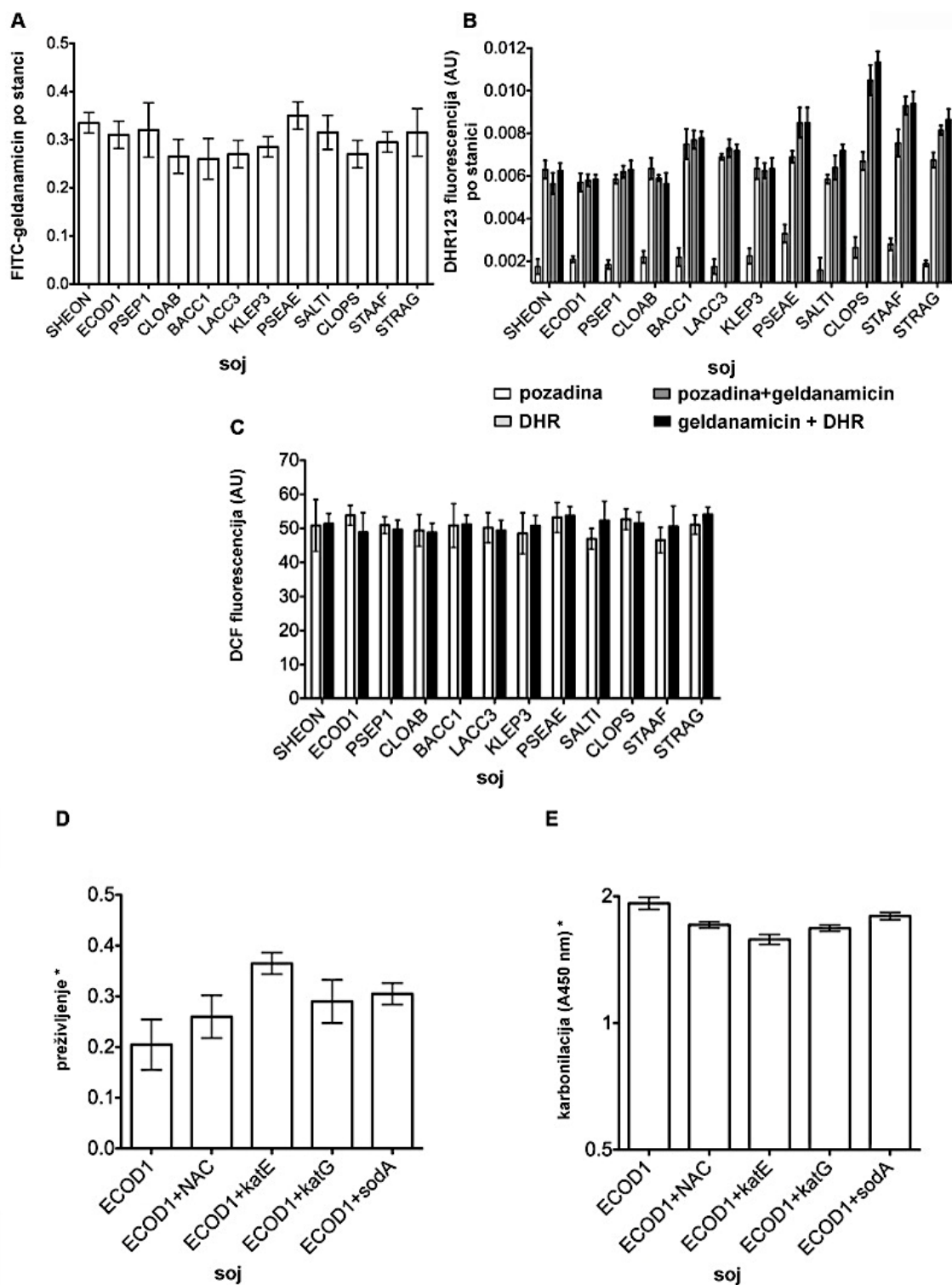




**Slika 13.** Otpornost na oksidaciju i HSP90 inhibiciju kod patogena i ne-patogena. (A) Otpornost na oksidaciju sveukupnog proteinskog ekstrakta, (B) preživljenje, i (C) proteinska karbonilacija kod vrsta *Shewanella oneidensis* (SHEON), *E.coli* MG1655 (ECOD1), *Pseudomonas putida* (PSEP1), *Clostridium acetobutylicum* (CLOAB), *Bacillus cereus* (BACC1), *Lactobacillus casei* (LACC3), *Klebsiella pneumoniae* (KLEP3), *Pseudomonas aeruginosa* (PSEAE), *Salmonella tiphy* (SALTI), *Clostridium perfringens* (CLOPS), *Staphylococcus aureus* (STAAF) i *Streptococcus agalactiae* (STRAG) u prisustvu 2 mM geldanamicina. Otpornost na oksidaciju kod (A) izražena je kao proteinska karbonilacija oksidiranog ekstrakta u usporedbi s neoksidiranim. Stupci pogreške predstavljaju SD (standardnu devijaciju) tri mjerenja u triplikatima. \*\* $p < 0.01$  ("two-tailed" t test).

**Tablica 6.** Sažetak sekvenci za svaki pojedini sintetički peptid.

Naziv peptida	PaPS	PUPS	Sekvenca peptida	Svojstva peptida
1HTH1	-50.84	-57.94	ERLSELGVTRTVVREAIIMLE	Nalik patogenima PC1'
2HTH1	51.95	1.73	VSSTAEGVGVSTVSRVIN	Nalik ne-patogenima PC1'
3HTH1	21.32	-15.26	IKDVAKAAGVGPLREALS	Kontrolni peptidi
1HTH2	-42.74	-67.47	HRQLAIQYGVTTVVREAIIMLE	Nalik patogenima PC1'
2HTH2	38.54	20.13	GLNQIIKESGAPVSTVSRVIN	Nalik ne-patogenima PC1'
3HTH2	-6.69	-33.21	KLTDVAKLAGVSLREALS	Kontrolni peptidi
1BH1	-4.15	31.09	DIITLRADKESPCCKSLVKWESNGVSDY EMKL	Nalik patogenima PC1'
2BH1	96.99	105.71	VNWVQRPGQGGWIWDIGPNGTDY N	Nalik ne-patogenima PC1'
3BH1	53.52	-38.22	GAAVAILGGPGTVWGLAFLDTGPNAV SAVFLK	Kontrolni peptidi
1BH2	23.27	-19.74	GTLKFFLTTPVPQGVVRFLLQTLVSTGE FKGTVL	Nalik patogenima PC1'
2BH2	87.03	85.53	MNWVKQPPGKGGWIWDIGWGDGSR KGVGYVYS	Nalik ne-patogenima PC1'
3BH2	32.66	-45.89	LAAIATGPGTVSLCVTAPEEFKGTVL	Kontrolni peptidi



**Slika 14.** (vezana za sliku 13.) Razina fluorescencije (A) u prisutnosti FITC-označenog geldanamicina, (B) DHR 123 fluorescencija bez i sa geldanamicinom, i (C) DCF fluorescencija bez i sa geldanamicinom kod SHEON, ECOD1, PSEP1, CLOAB, BACC1, LACC3, KLEP3, PSEAE, SALTI, CLOPS, STAAF i STRAG. (D,E) HSP90 inhibicija kod *E. coli* sa povećanom antioksidativnom aktivnosti. (D) preživljenje, \*normalizirano na preživljenje bez geldanamicina, i (E) ukupna proteinska karbonilacija, \*normalizirana na razinu bez geldanamicina, u prisutnosti 2  $\mu$ M geldanamicina, *E. coli* sa povećanom ekspresijom KatE, KatG, SodD i predtretmanom s N-acetilcisteinom. Stupci pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju tri mjerenja u triplicatima. \*\* označava  $p < 0.01$  (t-test, "two-tailed").

## 4.2 Ulazak geldanamicina u stanicu i mjerenje RKV

Kako bi ustanovili da li je razlika u otpornosti između reprezentativnih patogena i ne-patogena na tretman geldanamicinom, rezultat nejednake propusnosti geldanamicina kroz membrane kod pojedinih proučavanih vrsta, postavljena hipoteza je testirana mjerenjem razine geldanamicina unutar stanica pomoću fluorescentnog derivata, fluorescein izotiocijanat-geldanamicin (FITC) (Slika 14A). Signal fluorescencije pokazao je da otprilike ista količina geldanamicina ulazi u stanice svih proučavanih bakterijskih vrsta, isključujući diferencijalnu propusnost membrane kao razlog niske osjetljivosti patogena na tretman geldanamicinom. Također, smrtnost nakon tretmana geldanamicinom mogla je biti uzrokovana proizvodnjom RKV-a, a ne rezultatom proteinskog smatanja. U svrhu istraživanja ovog aspekta, bakterije su izložene djelovanju geldanamicina u prisustvu DHR-123, fluorescentne boje osjetljive na RKV, unutar stanica. Mjerenjem fluorescencije u otopini (Slika 14B) te protočnom citometrijom (Slika 14C), pokazano je da prisutnost geldanamicina ne utječe na povećanu proizvodnju RKV-a u nijednoj od proučavanih vrsta. Ovaj rezultat isključio je mogućnost da je otpornost patogena na geldanamicin rezultat supresije RKV-a nastalih pod utjecajem geldanamicina.

## 4.3 Zaštitna uloga RKV-sakupljača od posljedica djelovanja geldanamicina

Eksperimentalno smo ispitali zaštitna svojstva antioksidativnih enzima i malih antioksidativnih molekula N-acetilcisteina od utjecaja geldanamicina u bakteriji *E. coli*, u usporedbi s povećanom rezistencijom patogenih bakterija na geldanamicin. Povećana ekspresija katalaza KatE i KatG u bakteriji *E. coli* omogućila je 28 % i 15 % zaštite proteoma od geldanamicina (Slika 14D), izraženo kao postotak srednje razlike između patogenih i ne-patogenih vrsta (Slika 13). Povećana ekspresija KatE u *E. coli* pokazala je smanjenu karbonilaciju proteina (za faktor 0.81) i povećano preživljenje (za faktor 1.85) nakon tretmana geldanamicinom u odnosu na divlji tip bakterije *E. coli* (Slika 14E). Povećana ekspresija KatG imala je sličan učinak na karbonilaciju proteina i preživljenje (karbonilacija proteina bila je smanjena za faktor 0.87 x, a preživljenje povećano za faktor 1.45 x) (Slika 14E). Kako bi se potvrdilo da dobiveni rezultati nisu specifični za katalazu, također je povećana i ekspresija superoksid dismutaze SodA u bakteriji *E. coli*, koja je pokazala 18 % zaštite od utjecaja geldanamicina (rezultat je normaliziran na razliku između patogenih i ne-patogenih vrsta) (Slika 14D). Bakterije s povećanom ekspresijom SodA pokazale su smanjenu

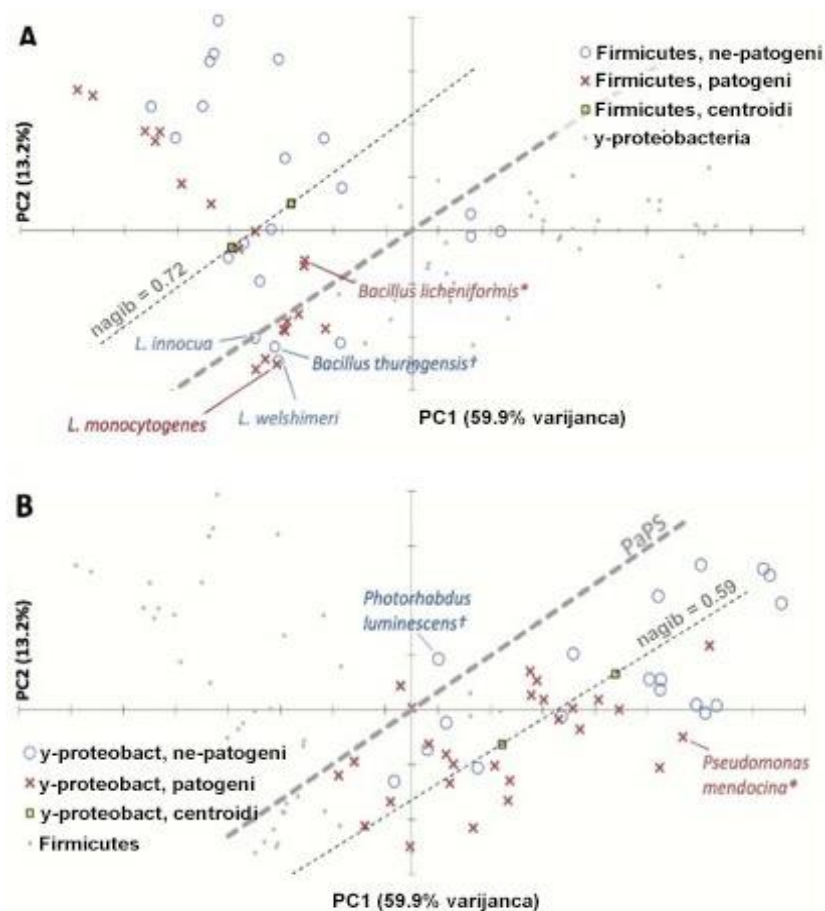
karbonilaciju proteina (za faktor 0.93 x) i povećano preživljenje (za faktor 1.55 x) nakon tretmana geldanamycinom u odnosu na divlji tip *E. coli* (Slika 14E). Naposljetku, za provjeru da li je učinak antioksidansa isti kao kod patogena i ne-patogena, stanice bakterije *E. coli* su predtretirane sa 2.5 mM NAC-om i izložene geldanamycinu; rezultat je pokazao samo 10 % zaštite od utjecaja geldanamicina u usporedbi s rezultatom dobivenim kod patogena i ne-patogena (Slika 14D). Stanice *E. coli* predtretirane sa NAC-om pokazale su smanjenu karbonilaciju proteina (za faktor 0.89 x) i povećano preživljenje (za faktor 1.3 x) nakon geldanamicina u usporedbi sa divljim tipom bakterije *E. coli* (Slika 14E). Za usporedbu, prosječne razlike između 6 patogenih i 6 ne-patogenih bakterija u karbonilaciji proteina su za faktor 0.52 x, a razlike u preživljenju su za faktor 3.01 x nakon tretmana geldanamycinom.

#### **4.4 Patogenost je reflektirana u općim trendovima odstupanja među fizikalno-kemijskim svojstvima proteoma**

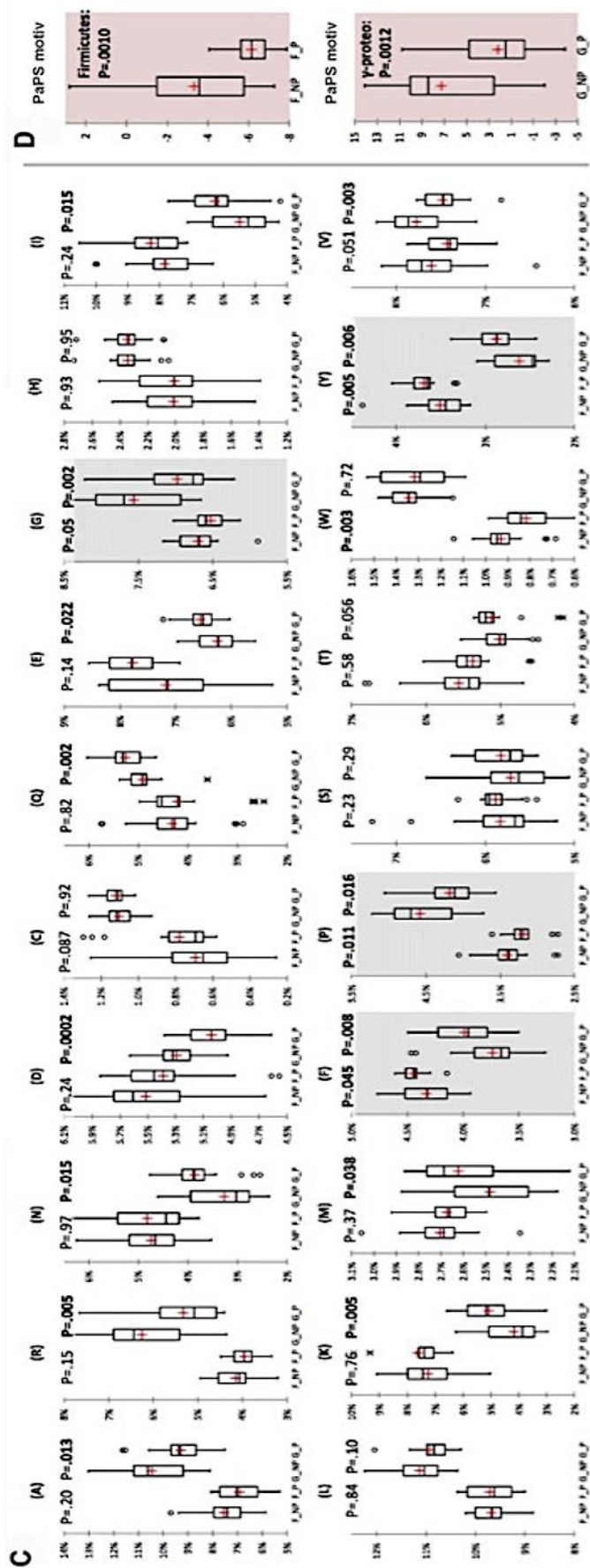
Sljedeće je istraženo da li je otpornost 6 odabranih patogena na inhibiciju HSP90 i oksidaciju proteoma rasprostranjena među širim spektrom mikroba. Uspoređeni su proteomi 46 poznatih patogena s 40 podudarnih ne-patogena, prema njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima, izračunatim iz genomski kodiranih kompozicija aminokiselina (vidi metode). U analizama osnovnih komponenti (engl. principal component; PC), koje obuhvaćaju razlike između bakterijskih proteomskih kompozicija (73 % varijabilnosti u prve dvije PCs; Slika 15), proteomi patogena su značajno pomaknuti od ne-patogena, i razlike su uočene odvojeno za dva različita koljena (Slike 16A i 16B;  $p=0.0035$  i  $0.0009$ , "two-tailed" Kolmogorov-Smirnov test). Pokazana je jaka poveznica između trendova vezanih za patogenost kod Firmicutes (Slika 15A) i  $\gamma$ -proteobakterija (Slika 15B), koja sugerira zajedničku, konvergentnu evoluciju razvoja proteomske kompozicije nalik patogenima. Prve dvije osnovne komponente su povezane sa statističkim sažetkom PaPS (engl. pathogen-like proteome signature) koje maksimiziraju razliku između patogenih i ne-patogenih proteoma (opisano u metodama); patogeni su imali znatno niže PaPS vrijednosti (Slike 16A i 16B). Uslijed ispitivanja doprinosa frekvencije pojedine aminokiseline PaPS vrijednostima višestrukom regresijom, pronađeni su jaki doprinosi aminokiselina glicina i prolina, koje su odgovorne za lomove u sekundarnim strukturama (Slika 16C;  $p>0.0001$  za obje), zatim arginina i serina ( $p<0.0001$  za obje), koje destabiliziraju strukture (Uversky, 2013.). Izbjegavanje aminokiselina nepovoljnih za sekundarne strukture u proteomima patogenih

bakterija, sugerira pomak trenda prema bolje strukturiranim proteinima. Ispitivanje fizikalno-kemijskih svojstava koji koreliraju s PaPS (Slika 16D), pokazalo je da patogeni favoriziraju velike, polarne i nabijene aminokiseline (koje imaju veliku mogućnost stvaranja  $\beta$  ploča i stabilizirajuća svojstva) a izbjegavaju aminokiseline sa destabilizirajućim svojstvima. Zbog toga, proteomi patogena teže prema nižoj slobodnoj energiji  $\alpha$  zavojnica. Direktna usporedba aminokiselinskih svojstava patogena i nepatogena konzistentna je s izbjegavanjem ugradnje glicina i prolina od strane patogena (Slike 15C-15E;  $p \leq 0.05$  i  $\leq 0.016$ , Mann-Whitney test) i s ugradnjom aminokiselina fenilalanina i tirozina koje imaju stabilizirajuća svojstva (Slike 15C-15E;  $p \leq 0.045$  i  $p \leq 0.006$ ).

Iako se PaPS vrijednosti znatno razlikuju kod patogenih i nepatogenih (Slike 16A i 16B), postoje iznimke. Takve slučajeve je bilo teško uvrstiti u definiciju patogenosti koristeći binarnu klasifikaciju. Na primjer, dva virulentna patogena klasterirala su zajedno sa nepatogenima, dok su dva patogena specifična za insekte klasterirala s patogenima specifičnima za kralježnjake (organizmi prikazani na slici 15). Također, dva ne-patogena iz familije *Listeria* klasterirala su s bliskim srodnikom patogena, iz kojih su nedavno potekli (vidi poblježe u raspravi).



Slika 15. (opis na str. 68)



Slika 15. – nastavak (opis na str. 68)

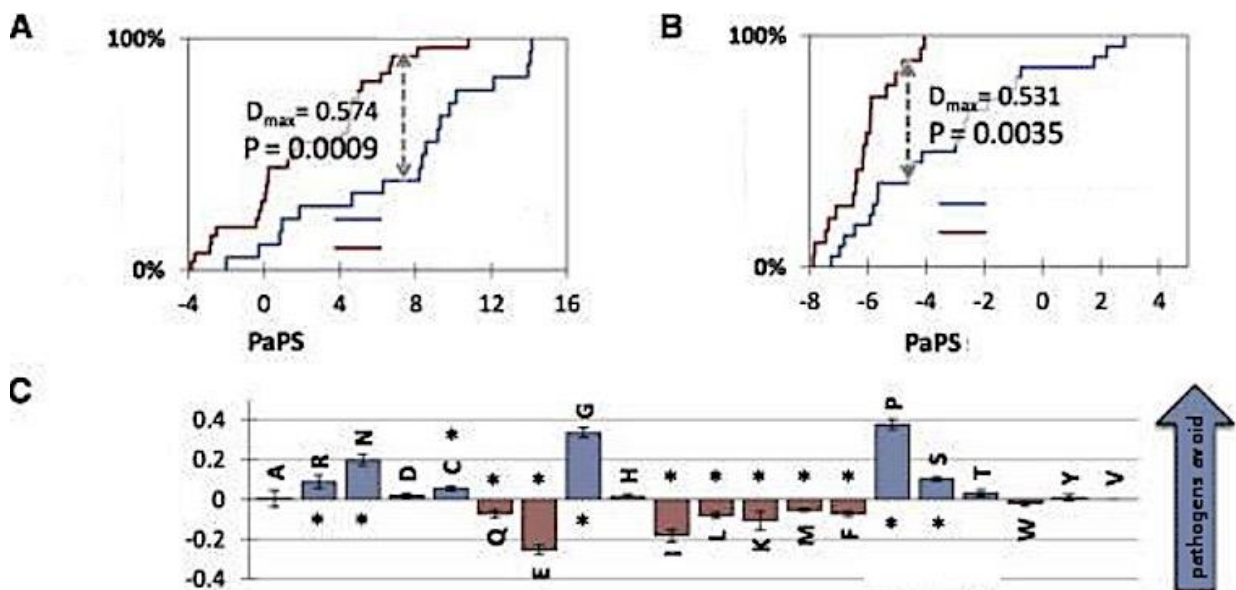
## E

ID u aaindeksu, opis (referenca)	R	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
ad hoc "sklonost patogenima" skala aminokiselina (nisu PAP5; vidi legendu Silke)	1.00	2.07	1.19	-0.45	0.54	-0.57	0.71	-1.29	0.61	-0.08	-1.42	-0.12	-1.29	0.23	-0.70	1.62	-0.26	-0.46	0.40	-1.29	0.59
* CHAM830103 Broj atoma u bočnom lancu označeni 1+1 (Charton-Charton, 1983)	0.28	-1.91	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-1.91	0.00	1.91	0.00	0.00	0.00	0.00	-1.91	0.00	1.91	0.00	0.00	1.91
* RIJ890112 Relativna referentna vrijednost na C3 [kod a-uzvojnice] (Richardson-Richardson, 1988)	0.28	-0.45	-0.29	-0.29	-0.61	-1.26	0.52	1.00	-1.42	0.19	0.98	1.49	1.97	0.03	1.33	-1.58	-0.61	-0.45	-0.94	0.19	0.52
* CHAM820102 Slobodna energija otapala u vodi, kcal/mole (Charton-Charton, 1982)	0.27	-0.64	-1.02	-0.43	0.76	2.18	-0.01	0.59	-0.73	-0.43	0.03	0.19	-0.43	-0.05	0.18	-1.72	-0.73	-0.43	0.49	2.40	-0.20
* KHAG800101 Povećanje Kerr-konstante (Khanarian-Moore, 1980)	0.26	0.46	2.78	-1.01	-0.91	-0.91	-0.35	-0.91	0.89	1.19	-0.38	-0.47	-0.91	-0.72	0.61	0.31	0.32	-0.05	1.05	-0.91	-0.09
* FODM020101 Učestalost aminokiselina u pl-uzvojnica (Fodje-Ali-Karadzoghi, 2002)	0.25	-0.87	-0.26	1.00	-0.46	0.27	-0.80	-0.24	-1.01	0.81	0.57	0.93	-0.36	-0.36	0.69	-2.28	-0.53	-0.77	1.80	1.51	0.35
* MUNV940104 Slobodna energija u regiji beta-lanca (Munoz-Serrano, 1994)	0.25	0.24	-0.17	0.11	0.37	-0.62	0.00	0.21	1.15	-0.30	-0.77	-0.21	-0.05	-0.29	-0.60	3.72	-0.17	-0.63	-0.41	-0.65	-0.90
* NAKH900108 Normalizirani sastav kod gljiva i biljaka (Nakashima et al., 1990)	0.22	-0.89	-1.13	1.33	-1.15	-0.57	-0.91	-1.38	-0.24	-0.06	1.88	1.04	-0.56	0.86	1.34	-0.58	0.05	-0.25	0.19	1.34	-0.32
* RACS820110 Prosječna relativna učestalost EL (I-1) (Rackovsky-Scheraga, 1982)	0.22	-0.25	-0.28	0.25	1.03	-0.19	-0.19	-0.57	2.12	-1.32	-0.57	-0.18	-0.38	0.29	-1.30	2.71	0.03	-0.88	0.10	-0.13	-0.49
* PALJ810114 Normalizirana učestalost promjena u svim beta strukturama (Palau et al., 1981)	0.22	-0.12	0.87	1.01	0.74	-0.21	0.32	-0.03	1.78	-0.03	-1.51	-0.58	-0.61	-2.14	-1.05	1.43	0.36	0.46	0.74	-0.89	-0.54
* FAUJ890102 Uсредnjeni upisilon sterički parametar (Fouchere et al., 1988)	0.22	-0.46	0.18	-0.28	-0.22	0.06	0.26	0.30	-2.58	-0.02	1.28	1.10	0.54	0.50	0.26	-2.58	-0.38	-0.06	0.78	0.26	0.98
* MUNV940105 Slobodna energija u regiji beta-lanca (Munoz-Serrano, 1994)	0.21	-0.02	-0.28	0.30	0.72	-0.41	-0.12	0.01	0.98	-0.25	-0.59	-0.12	-0.11	-0.44	-0.52	3.76	-0.32	-0.64	-0.47	-0.65	-0.82
* TAN5770104 Normalizirana učestalost reverznog bočnog lanca (Tanaka-Scheraga, 1977)	0.20	0.37	-0.29	-0.52	0.15	-0.48	0.53	-0.07	0.08	-0.60	-0.61	-0.62	0.15	-0.23	-0.98	3.64	0.79	0.34	-0.86	-0.25	-0.55
* MUNV940103 Slobodna energija u strukturi beta-lanca (Munoz-Serrano, 1994)	0.20	0.71	0.24	1.23	1.54	-0.85	0.57	0.73	0.82	-0.07	-1.52	-0.60	0.47	-0.49	-1.06	2.20	0.29	-0.62	-0.75	-1.15	-1.69
* RADAB90106 Površina dostupna otapalu (Radzicka-Wolfenden, 1988)	0.19	-1.04	1.26	-0.26	-0.32	-0.43	0.20	0.27	-1.64	0.35	0.26	0.14	0.75	0.49	0.94	-2.41	-0.81	-0.33	1.57	1.11	-0.11
* AURR890119 Normalizirana učestalost pojave aminokiselinskog ostataka na C kraju uzvojnice (Aurora-Rose, 1988)	0.19	0.30	0.89	0.13	0.54	-2.12	0.27	0.95	-0.05	-0.31	-0.05	-0.34	0.42	-0.08	-0.43	2.99	-0.66	-0.57	-0.22	-1.01	-0.63
* KMC930101 Termodinamička sklonost beta pločama (Kim-Berg, 1993)	0.19	0.56	-0.16	0.32	0.08	-0.41	0.16	0.08	3.37	-0.32	-1.13	-0.49	0.08	-0.32	-1.05	1.52	0.24	-0.49	-0.49	-0.65	-0.89
* HUJ7700101 Topinski kapacitet (Hutchens, 1970)	0.19	-1.18	-1.41	-0.43	-0.53	0.59	0.04	-0.14	-1.63	1.32	0.12	0.37	1.11	2.12	0.41	-0.61	-0.92	-0.69	1.10	0.67	-0.27
* NAKH920102 Sastav aminokiselina CYT2 proteina (Nakashima-Nishikawa, 1992)	0.17	1.94	0.33	0.25	0.37	-1.42	-0.11	1.43	0.90	-0.94	-1.06	1.00	0.37	-0.40	-0.68	0.73	0.74	-0.49	-1.49	-1.32	-0.14
* FAS5760104 pik-N (Fasman, 1976)	0.16	0.70	-0.78	-1.18	0.51	-2.13	-0.48	0.66	0.89	-0.40	0.68	0.51	-0.37	-0.31	-0.37	2.71	-0.31	-0.54	0.17	-0.52	0.55
* CHOP780213 Učestalost drugog aminokiselinskog ostataka u strukturi okeleta (Chou-Fasman, 1978)	0.16	-0.14	0.35	-0.02	0.41	-0.51	0.22	-0.39	0.01	-0.60	-0.81	-0.96	0.49	-0.04	-0.70	3.49	0.88	0.38	-1.15	-0.31	-0.59

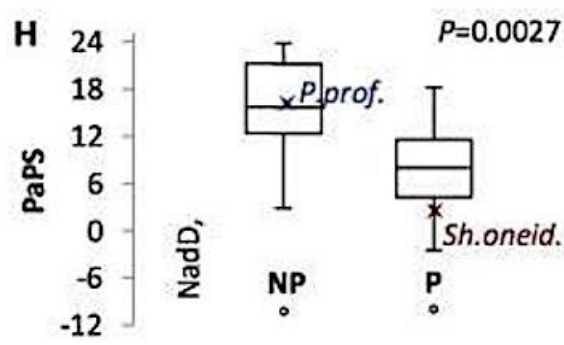
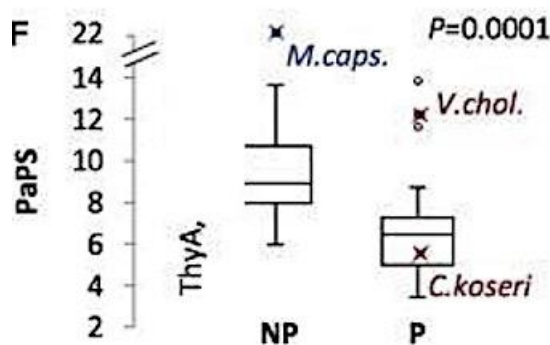
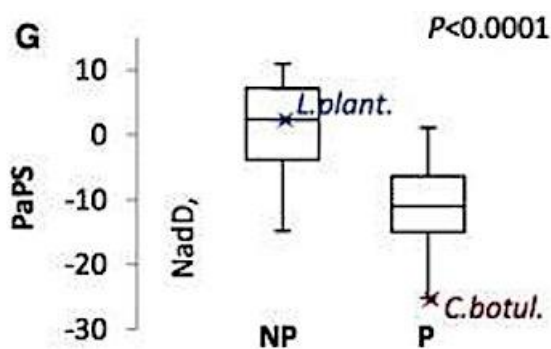
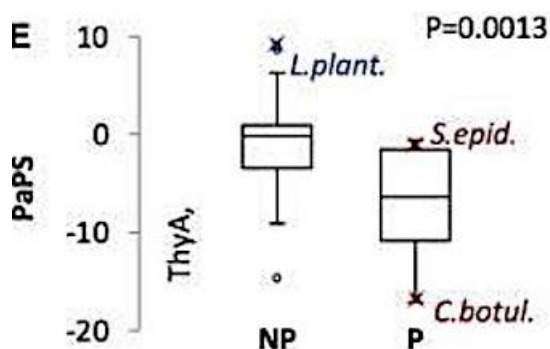
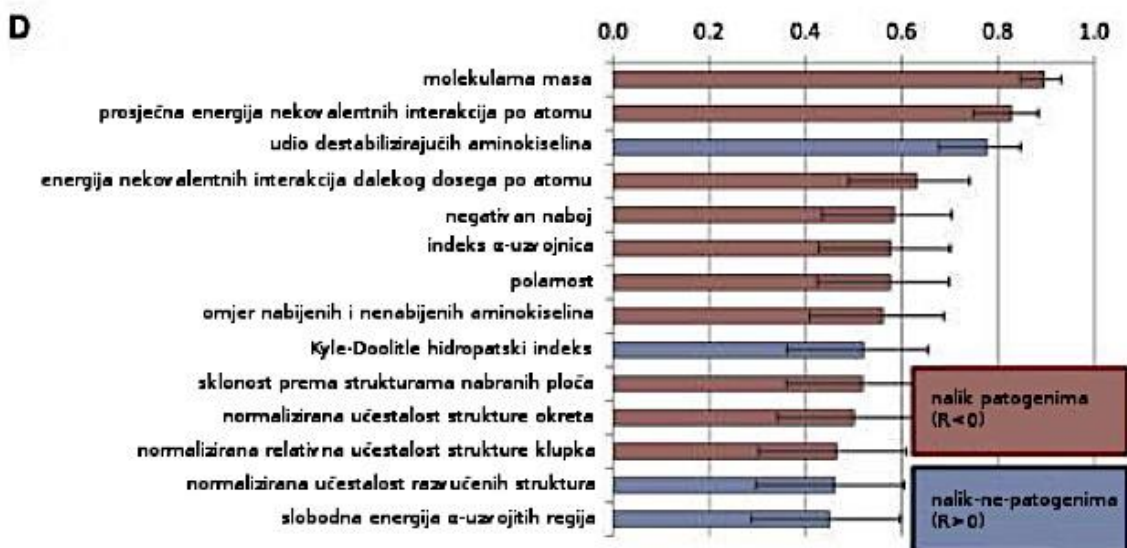
Slika 15. – nastavak (opis na str. 68)



**Slika 15.** (povezana sa slikom 16.) Graf osnovnih komponenti fizikalno-kemijskih svojstava 86 proteoma. Naglasak je na Firmicutes (A) ili na  $\gamma$ -proteobakterije (B). Podcrtane linije povezuju patogene i ne-patogene centroide u svakoj grani. PaPS (engl. pathogen proteome signature) motiv je rotacija koordinatnog sustava definiran pomoću dviju osnovnih komponenti, u kojem prva rotirana osnovna komponenta ( $\equiv$ PaPS) ima prosječan nagib dviju linija koje povezuju centroide. Proteomi patogena su usmjereni prema nižim PaPS vrijednostima. Slabije patogene vrste označene su zvijezdicom (\*). Bakterije koje su patogene samo za insekte označene su bodežima ( $\dagger$ ). "L" predstavlja *Listeriu*. (C-E) Korištenje individualnih aminokiselina uspoređenih između patogena i ne-patogena. (C) Distribucija relativnih frekvencija aminokiselina, promatranih odvojeno za proteome Firmicutes ((F\_NP i F\_P označavaju ne-patogene i patogene, redom) i  $\gamma$ -proteobakterija (G\_NP i G\_P). Kocke pokazuju srednjak i 1-3 kvartala, crveni križevi su prosjek, "whiskers" su minimum i maksimum nakon isključivanja netipičnih vrijednosti, koje su prikazane individualno kao krugovi (ili zvijezde, u slučaju ekstremnih netipičnih vrijednosti). P vrijednosti prikazuju značajnu razliku između patogena i ne-patogena, pomoću "two-tailed" Mann-Whitney testa. Aminokiseline koje su značajne za Firmicutes i  $\gamma$ -proteobakterije pri  $P \leq 0.05$  (odgovara zajedničkom  $P \leq 0.017$  ili  $FDR \leq 8.7\%$ ) su osvjetljene. (D) Distribucija PaPS rezultata za Firmicutes (gore) i  $\gamma$ -proteobakterija (dolje); kockasti grafovi i testovi značajnosti kao u (C). (E) *Ad hoc* stupanj 'sklonosti aminokiselina patogenima' definiran je za svaku aminokiselinu pomoću  $\log_2$  omjera prosječne učestalosti u ne-patogenima vs. prosječna učestalost u patogenima, odvojeno za Firmicutes i  $\gamma$ -proteobakterije. Zatim je izabrana najmanja apsolutna vrijednost dvaju razreda za svaku pojedinu aminokiselinu, kako bi osigurali da je aminokiselinska skala podržana među filogenetski različitim organizmima. Ova skala (prvi red brojeva) je uspoređena pomoću kvadratne Pearson korelacije ( $R^2$ ) sa 484 aminokiselinske skale iz *aaIndex* baze podataka i 20 najvećih korelirajućih skala prikazanih ovdje (ostali redovi). Sve skale su standardizirane među aminokiselinama na srednjak = 0 i standardnu devijaciju = 1. 9 od 20 skala su povezane s proteinskim strukturnim elementima (označeni u opisu skale).



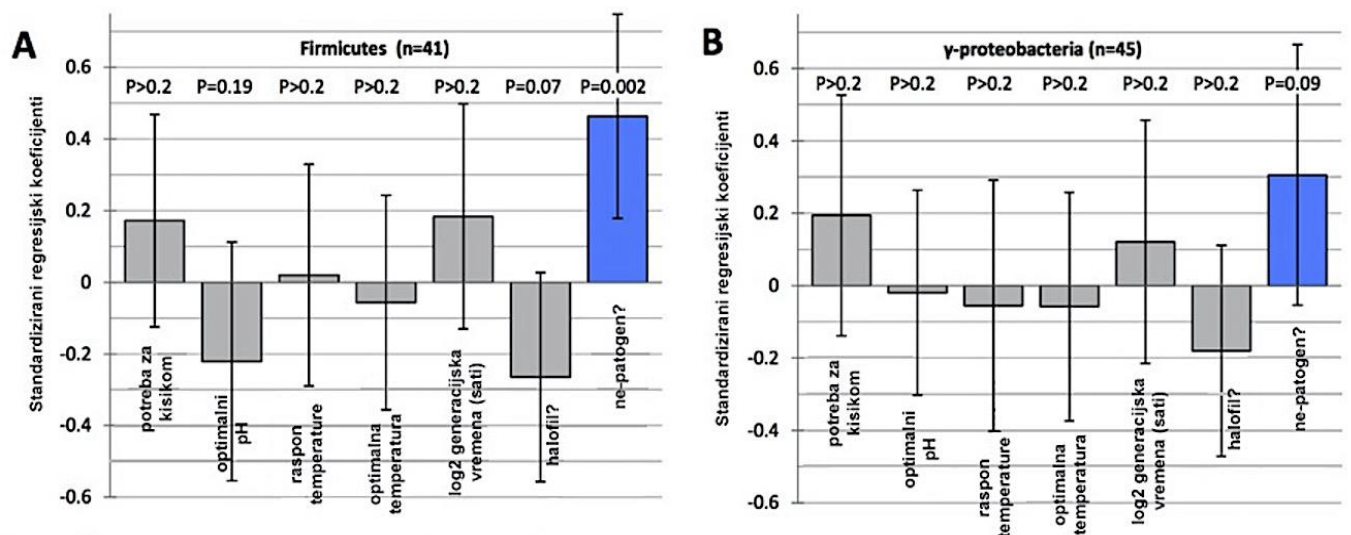
Slika 16. (opis na str. 69)



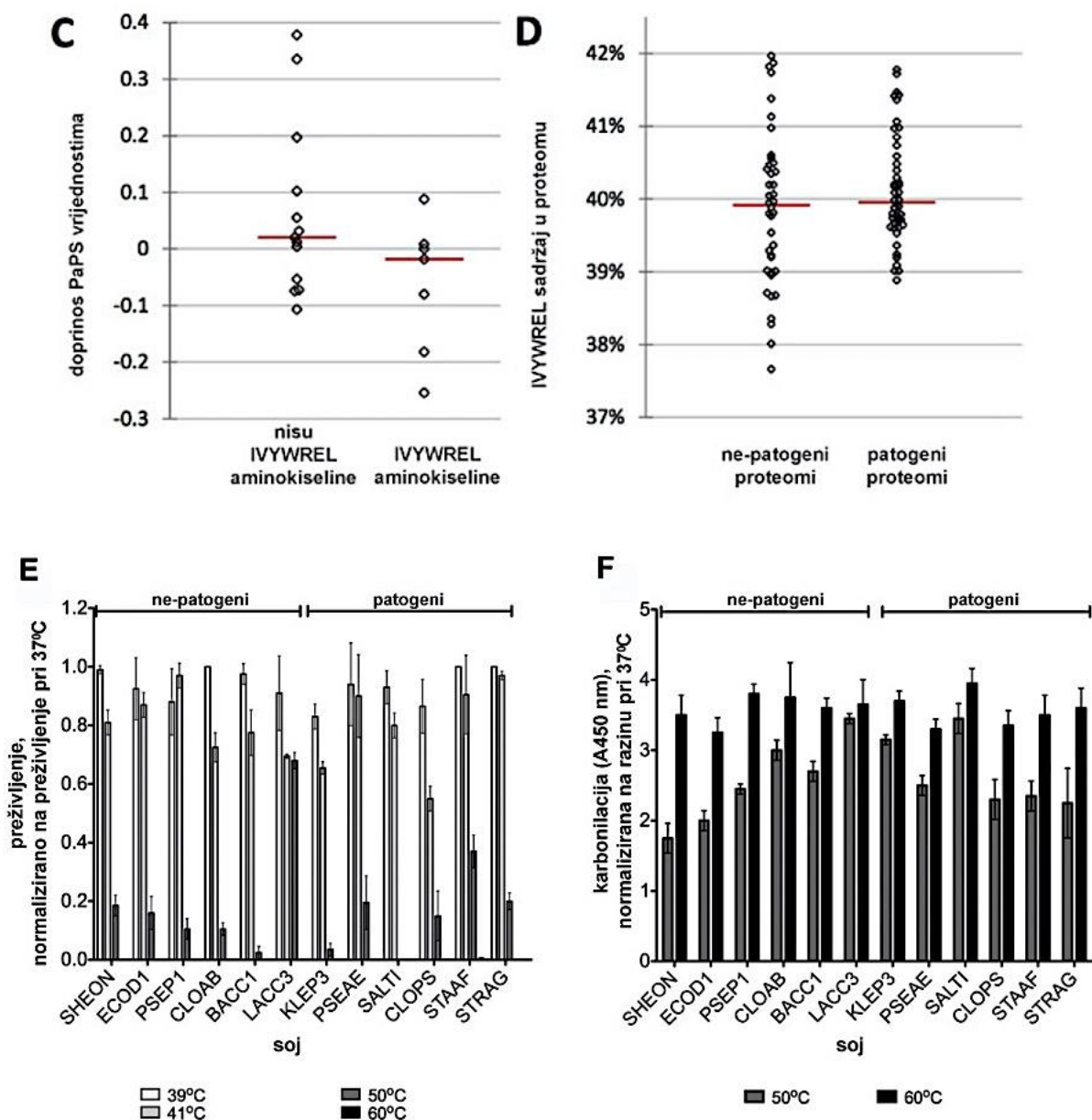
**Slika 16.** Dominantni trendovi u fizikalno-kemijskim svojstvima proteoma. (A i B) Kumulativni histogrami PaPS rezultata za patogene (crvena linija) i ne-patogene (plava linija). Proteomi patogena naginju prema nižim PaPS vrijednostima. Dmax je Kolmogorov-Smirnov (K-S) statistika, a p vrijednost je K-S test ("two-tailed"). (C) Standardizirani koeficijenti višestrukih linearnih regresija PaPS motiva naspram aminokiselinskim frekvencijama. \* $p < 0.001$  (t test). (D) Najsnažnije korelacije između PaPS i seta aminokiselinskih fizikalno-kemijskih svojstava. Stupci pogrešaka u (C) i (D) su unutar intervala od 95% točnosti. (E–H) Distribucija PaPS rezultata unutar ThyA i NadD proteinskih familija, kontrastirana između patogena i ne-patogena; p vrijednosti dobivene two-tailed Mann-Whitney testom. Proteini odabrani za slijedeće eksperimente su označeni i skraćena imena vrsta su pokazana. Vrijednost koja odstupa u setu patogena u (F) zahtijeva dodatna razjašnjenja.

Povećana strukturna stabilnost proteoma patogenih bakterija može biti rezultat nekih drugih prilagodbi (na primjer, temperatura tijela domaćina). Međutim, PaPS rezultati prema sedam fenotipova bakterija upućuju kako specifično patogenost najviše doprinosi PaPS-u, dok suprotno vrijedi za optimalnu temperaturu rasta (Slike 17A i 17B). Također, već poznati termofilni proteomski motiv (Zeldovich i sur., 2007.) ne korelira s PaPS ni sa kompozicijom patogenih proteoma (Slike 17C i 17D). Naime, eksperimentalno je pokazano da li postoje razlike između reprezentativnih patogena i ne-patogena u njihovoj prilagodbi na porast temperature. Iako rezultat pokazuje manje razlike u preživljenju među ispitanim vrstama, one se nemogu pripisati patogenosti (Slike 17E i 17F).

Kako bi se eksperimentalno dokazali trendovi proteoma zabilježeni PaPS statistikom, za analizu je odabrano 10 pročišćenih proteina iz oba razreda patogena i obje filogenetske skupine bakterija (vidi materijale i metode). Prema PC analizama, odabrane su slijedeće proteinske familije: timidilat sintaza (ThyA) i nikotin kiselinska mononukleotid adenilil transferaza (NadD), koje su pokazivale najznačajnije PaPS razlike između patogena i nepatogena (Slike 16E -16H; za NadD,  $p < 0.0001$  i  $p = 0.0027$  za Firmicutes i  $\gamma$ -proteobakterije; za ThyA,  $p = 0.0013$  i  $0.0001$ ).



Slika 17. (opis na str. 71)



**Slika 17.** (povezana sa slikama 13. i 16.) Provjera utjecaja povezanih fenotipova na PaPS proteomski motiv (A, B) Standardizirani koeficijenti regresije nakon regresije PaPS razine proteoma na 7 različitih svojstava bakterija, uključujući status patogenosti i 6 mogućih "confounders": 4 kontinuirane varijable (optimalni pH, optimalna temperatura rasta, raspon temperature rasta [visoki minus niski] i log<sub>2</sub> vrijeme udvostručavanja) i 2 kategorijske varijable (halofilnost kodirana kao 0/1, i potreba za kisikom kodirana kao: anaerobi ili mikroaerofili = 0, aerotolerantni = 1, fakultativni anaerobi = 2, obligatni aerobi = 3). P vrijednosti određene *t* testom na koeficijente regresije, "two-tailed". Stupci pogrešaka su unutar intervala od 95% točnosti. (C) Aminokiseline u IVYWREL grupi, koje odgovaraju poznatom motivu termofilnih proteoma (Zeldovich i sur., 2007.), uspoređene s ostalih 13 aminokiselina prema njihovom doprinosu PaPS vrijednostima (standardizirani koeficijenti iz slike 15). (D) IVYWREL sadržaj u proteomima patogena i ne-patogena. Crvene linije su srednje vrijednosti. (E,F) Otpornost na toplinski šok kod patogena i ne-patogena. (E) preživljenje na 39/ °C, 41/ °C, 50/ °C and 60/ °C, i (F) proteinska karbonilacija pri 50/ °C i 60/ °C kod SHEON, ECOD1, PSEP1, CLOAB, BACC1, LACC3, KLEP3, PSEAE, SALT1, CLOPS, STAAF i STRAG. Stupci pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju tri mjerenja u triplikatima.

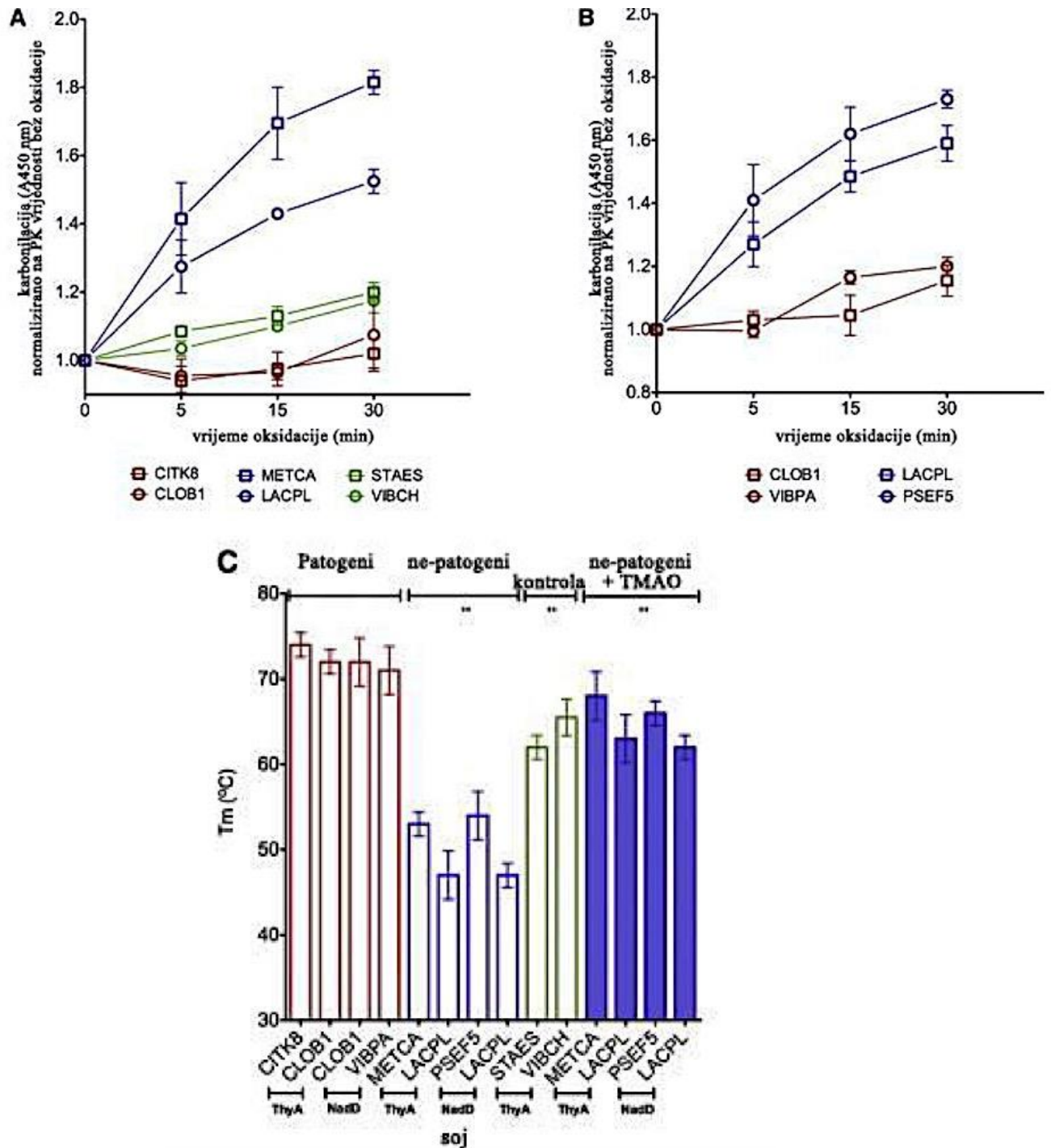
## 4.5 Povećana strukturna stabilnost povezana je s povećanom rezistencijom na oksidaciju

Unutar NadD i ThyA proteinskih familija, odabrano je 6 proteina iz ThyA familije i 4 iz NadD familije, s visokim nalik-patogenima, te visokim nalik ne-patogenima PaPS vrijednostima (naznačeno na Slikama 16E - H). Ovi proteini su proizvedeni u *E. coli* kako bi se eksperimentalno pokazala poveznica PaPS obilježja sa strukturnom stabilnošću i oksidacijskom rezistencijom. Mjerenjem kinetike proteinske karbonilacije, pronađeno je da su ThyA i NadD proteini iz patogenih bakterija, rezistentniji na oksidaciju u odnosu na njihove homologe iz ne-patogenih bakterija (Slike 18A i 18B). Osobito su bili više karbonilirani ThyA i NadD s PaPS vrijednostima nalik ne-patogenima, ThyA 68 %, a NadD 40 % ( $p = 0.0004$  i  $0.0005$ ), nakon inducirane oksidacije Fenton reakcijom, u usporedbi sa ThyA i NadD nalik patogenima. ThyA iz kontrolnih patogena (atipični proteini patogena sa PaPS vrijednostima nalik ne-patogenima) oksidira slično onima iz ne-patogenih bakterija. Ovo ukazuje da je specifično PaPS odgovoran za oksidacijsku rezistenciju, a ne neko drugo obilježje strukture proteoma patogena.

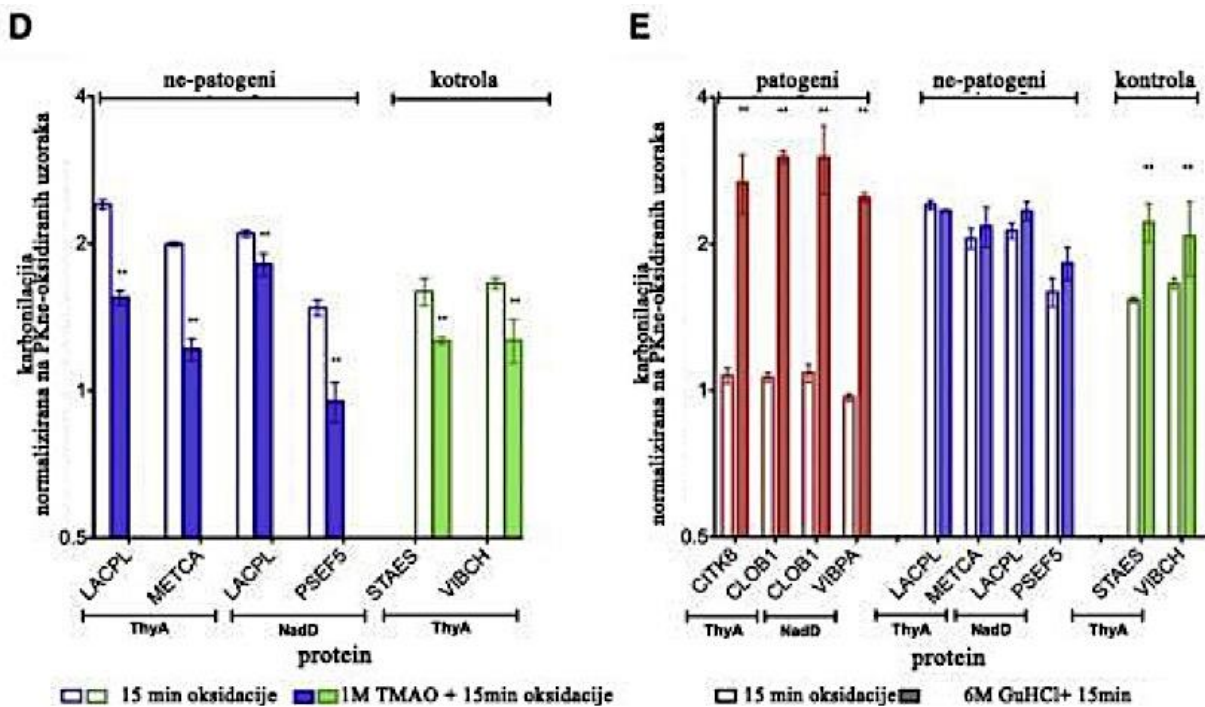
Naime, kako bi se odredila njihova konformacijska stabilnost i potencijalna korelacija s oksidacijskom rezistencijom, izmjerena je apsorbancija pri 280 nm tijekom termalne denaturacije ThyA i NadD.  $T_m$  pročišćenih ThyA proteina iz dviju patogenih bakterija bile su u prosjeku za 23 °C veće od ThyA iz ne-patogena (Slike 18C i 20A). NadD je pokazao u prosjeku veću  $T_m$  za 21 °C (Slike 18C i 20B) ( $p = 0.0001$ ). Međutim, ThyA proteini iz negativne patogene kontrole (patogeni proteini s PaPS nalik ne-patogenim; vidi metode) imali su  $T_m$  u prosjeku nižu za 26 °C od njihovih homologa iz patogena, slično ThyA proteinima iz ne-patogena. Velike razlike u  $T_m$  su ukazale na veliku konformacijsku stabilnost proteina s PaPS obilježjem nalik patogenima. Zatim je testirana poveznica dviju varijabli direktnom modifikacijom konformacijske stabilnosti pomoću osmolita koji stabilizira proteinske strukture, trimetilamin N-oksida (TMAO).

Izlaganje ne-patogenih ThyA i NadD proteina 1M TMAO, povišilo je  $T_m$  ovih proteina u prosjeku za 15 °C ( $p = 0.011$ ), indicirajući na porast konformacijske stabilnosti (Slika 18C; Tablica 7), ali i pokazujući povećanu rezistenciju na oksidaciju *in vitro* (Slika 18B); razine proteinske karbonilacije ThyA proteina su u prosjeku bile manje za 37 %, a NadD proteina za 23 % ( $p < 0.0001$  za oba proteina; Slika 18D). Kontrolni ThyA proteini pokazivali su slične trendove (Slika 18D), s prosječnim smanjenjem proteinske karbonilacije za 24 % nakon TMAO stabilizacije ( $p < 0.0001$ ). Naime, dok stabilizacija čini proteine rezistentnijim na

oksidaciju, vrijedi i obrnuto; denaturacija svih ispitanih proteina gvanidinium hidrokloridom (GuHCl), učinila ih je ekstremno osjetljivima na oksidaciju (Slika 18E; prosjek povećanja karbonilacije 2.7-puta,  $p < 0.0001$ ). Pomoću eksperimenata s vanjskom stabilizacijom (pomoću TMAO) ili destabilizacijom (pomoću GuHCl) proteina, postavljena je hipoteza da zaštitna uloga native strukture proteina od oksidacije potječe isključivo od konformacijske stabilnosti, a ne nekog drugog obilježja strukture i/ili kompozicije sekvenci.



Slika 18. (opis na str. 74)



**Slika 18.** Rezistencija na oksidaciju i konformacijska stabilnost proteina s PaPS vrijednostima nalik patogenima i ne-patogenima. (A i B) Karbonilacija proteina izmjerena je kod (A) ThyA iz CITK8, CLOB1, METCA, LACPL, STAES, i VIBCH i (B) NadD iz CLOB1, VIBPA, LACPL, i PSEF5. (C) Temperature topljivosti proteina iz (A) i (B). (D i E) Rezistencija na oksidaciju kod (D) ThyA i NadD sa ne-patogenima nalik i kontrolnim PaPS vrijednostima uslijed inkubacije s 1M TMAO prije oksidacije i (E) ThyA i NadD iz svih vrsta nabrojanih gore uslijed inkubacije sa 6 M GuHCl prije oksidacije. Rezistencija na oksidaciju promatrana je kao oksidacijska proteinska karbonilacija, normalizirana na vrijednosti proteinske karbonilacije ne-oksidiranih proteina. Stupci pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju tri mjerenja u triplikatima. \*\* $p < 0.01$  ("two-tailed" t test).

**Tablica 7.** (odnosi se na sliku 18C). Temperature topljivosti ThyA i NadD u prisutnosti 1M TMAO.

Ne-patogeni				Kontrolni patogeni	
ThyA		NadD		ThyA	
M. capsulatus	L. plantarum	P. fluorescens	L. plantarum	S. epidermidis	V. cholerae
68°C	63°C	66°C	62°C	62°C	65°C

## 4.6 Otpornost na povećanje temperature nije povezana s patogenošću vrste

Osim patogenosti organizama, moguća su i druga objašnjenja za dobivene trendove u kompozicijama (strukturama) proteoma. Pretpostavka je bila da se patogeni sisavaca (i ptica) prilagođavaju visokim temperaturama, onima koje odgovaraju tjelesnim temperaturama njihovih domaćina, koje su tipično iznad temperature okoline. Također se pretpostavljalo da se patogeni prilagođavaju promjenama temperature koje su rezultat odgovora domaćina na obranu od infekcije. Zbog toga je napravljena statistička procjena kojom je pokazano da li temperaturna preferencija organizama može bolje objasniti PaPS proteomski rezultat nego što stanje patogenosti može objasniti PaPS. Za statističku izvedbu korištena je ANCOVA, tehnika koja može simultano koristiti obje kontinuirane varijable (kao što su temperature rasta) i kategorijske varijable (patogenost) kako bi se predvidjela „ciljna varijabla“ (u ovom slučaju, rezultat PaPS proteomske strukture). Koeficijenti („nagibi“) eksplanatornih varijabli (temperature rasta, patogenost, itd.) se tada mogu usporediti ili testirati za značajnost. Ovaj test je korišten odvojeno na 41 Firmicutes i 45 Gamma-proteobakterija kako bi se ispitalo da li patogenost, optimalna temperatura rasta, raspon temperatura rasta i nekoliko drugih svojstava (Slika 17A-D) mogu konzistentno predviđati PaPS motiv preko dviju različitih evolucijskih linija.

Kod Firmicutes je pronađeno da patogenost organizma može predvidjeti PaPS proteomski potpis nezavisno o drugim ispitanim svojstvima (standardizirani koeficijent regresije  $b = 0.46$ , 95 % CI: 0.18 - 0.75) s visokom statističkom značajnošću ( $P = 0.002$ ). U suprotnom, optimalna temperatura rasta nije prediktor za PaPS ( $b = -0.06$ ,  $P > 0.2$ ); također, ni pomoću opsega između visokih i niskih točaka u rasponu temperatura rasta, koji je indikator prilagodbe organizma na promjene u temperaturi, nije bilo moguće predvidjeti PaPS ( $b = 0.02$ ,  $P > 0.2$ ). Nadalje, provedeni su isti testovi za patogenost i 6 ostalih svojstava za  $\gamma$ -proteobakterije, gdje su dobiveni kvalitativno slični rezultati: patogenost je najbolji prediktor za PaPS proteomskog potpisa ( $b = 0.31$ ,  $P = 0.09$ ; sljedeća po redu je aerobnost,  $b = 0.19$ ), a patogenost je jedina značajna statistički sa  $P < 0.1$  (svi ostali prediktori, uključujući temperature rasta imaju  $P > 0.2$ ). Standardizirani regresijski koeficijenti  $b$  za ove indikatore, njihov 95 % C.I. i značajnost, prikazani su na Slikama 17A, 17B.

Termofili su rijetki u ispitanom setu organizama - samo 7/81 vrste, od kojih su 2/7 patogeni. I dalje postoji mogućnost da su patogeni razvili proteomski potpis sličan termofilima zbog nekih drugih utjecaja okoliša (npr. RKV) koji su imali utjecaj na proteom



sličan utjecaju visokih temperatura. Prilikom ispitivanja ove mogućnosti, direktno je uspoređen PaPS potpis s poznatim potpisom termofilnih proteoma: termofili se mogu precizno razlikovati pomoću sume frekvencija IVYWREL aminokiselina (Zeldowich i sur., 2007.).

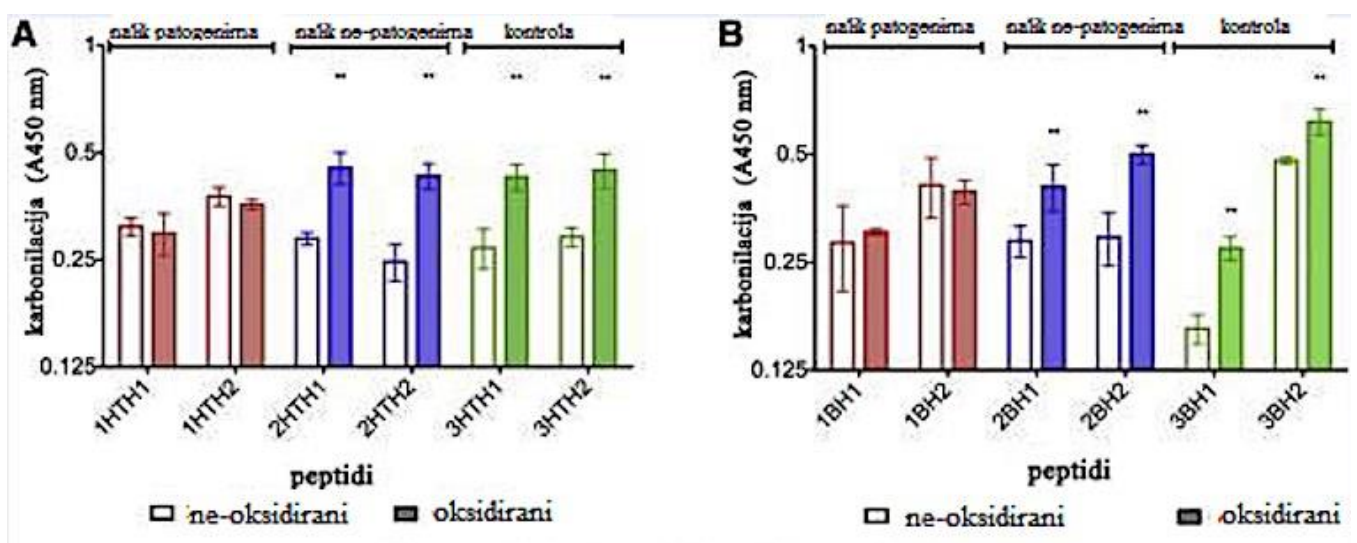
Za početak, provjereno je da li IVYWREL aminokiseline imaju drukčiji doprinos za PaPS rezultat u odnosu na ostale aminokiseline (13 aminokiselina). Razlika između središnjih PaPS regresornih koeficijenata (sa slike 16C) IVYWREL seta ( $-0.018 \pm 0.135$ , median  $\pm$  IQR) u odnosu na preostale aminokiseline ( $0.020 \pm 0.156$ ) je mala u usporedbi sa opsegom (distribucije prikazane na slici 17C). Pokazalo se, preko većine aminokiselina, da PaPS vrijednosti i IVYWREL aminokiselinski sastav nisu povezani.

Zatim je provjereno da li patogeni odstupaju od ne-patogena u IVYWREL aminokiselinskom sastavu njihovih proteoma, pokazalo se da nema značajne razlike (patogeni:  $40.0 \pm 0.9$  %; ne-patogeni  $39.3 \pm 1.5$  % [median  $\pm$  IQR] Slika 17D). Nadalje, napravljeni su eksperimenti kako bi se pokazalo da li 6 reprezentativnih patogenih bakterija korištenih u ovom istraživanju posjeduju svojstva koja su karakteristična za termofilne organizme. Također je eksperimentalno ispitan utjecaj umjerenih pomaka temperature na preživljenje 6 reprezentativnih patogena i 6 ne-patogena pri temperaturama od 39 °C, 41 °C, 50 °C i 60 °C. Rezultat je pokazao da sve vrste, bez obzira na patogenost ne podliježu nikakvim promjenama pri porastu temperature do 39 °C i 41 °C, s prosječnim preživljenjem od 94 % i 80 % (Slika 17E). S druge strane, veći porasti temperature su značajno utjecali na preživljenje bakterija: prosječno preživljenje pri temperaturi od 50 °C je 18 %, a pri 60 °C prosječno preživljenje je 0.07 % (Slika 17F). Iako postoje razlike u preživljenju između individualnih proučavanih vrsta, one nisu vezane uz patogenost vrste. Dvije anaerobne vrste (*Clostridium acetobutylicum* i *Clostridium perfringens*) nisu pokazivale razliku u ponašanju u odnosu na druge reprezentativne vrste. Kako bi se potvrdilo da li stanična smrtnost pri temperaturama od 50 °C i 60 °C, korelira sa oštećenjem proteina, izmjerena je razina proteinske karbonilacije kod 12 reprezentativnih vrsta, nakon njihovog izlaganja povišenim temperaturama. Slika 17F prikazuje da povećanje smrtnosti prati porast karbonilacije proteina: pri temperaturama od 50 °C i 60 °C karbonilacija je uvećana za 2.6 i 3.6 x u usporedbi s onom pri temperaturi od 37 °C. Međutim, ne postoje razlike između ovdje proučavanih vrsta koje se mogu objasniti njenom patogenošću.

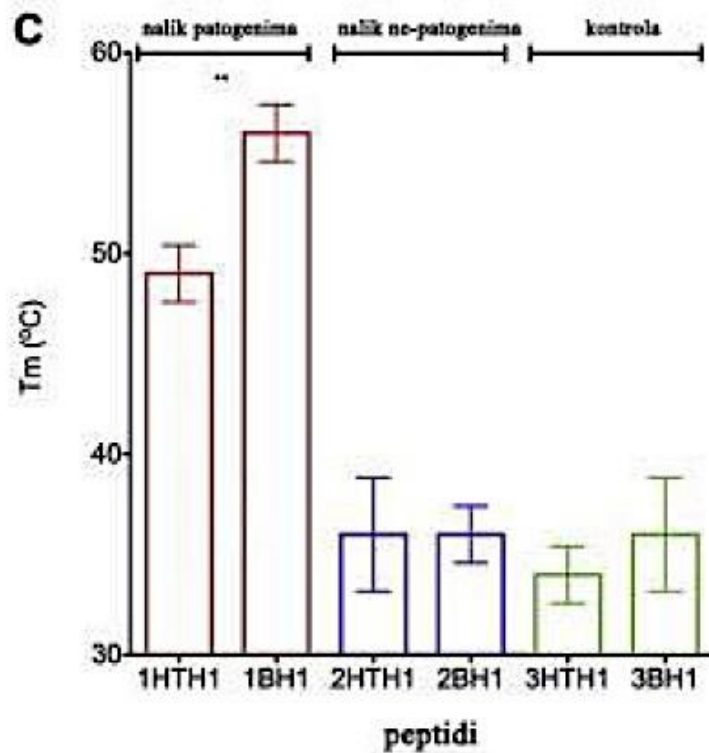
## 4.7 PaPS obilježje je dostatno za mogućnost dizajna konformacijski stabilnih i oksidacijski rezistentnih peptida

Cilj rada je bio dalje istražiti zajedničku poveznicu između specifičnog proteomskog motiva sažetog u PaPS, rezistencije na oksidaciju i konformacijske stabilnosti. U tu svrhu, dizajnirana je serija peptida, 6 helix-turn-helix (HTH) i 6  $\beta$ -ukosnica (BH) sa sastavom aminokiselina prema PaPS (vidi metode; peptidi prikazani u Tablici 6). Nakon indukcije oksidacije Fenton-reakcijom, HTH (Slika 19A) i BH (Slika 19B) peptidi s PaPS vrijednostima nalik ne-patogenima, pokazali su porast u karbonilaciji za 30 % u prosjeku ( $p < 0.0001$ ), za razliku od peptida sa PaPS vrijednostima nalik patogenima, koji nisu pokazali nikakav porast u razini karbonilacije. Peptidi negativne kontrole (kompozicije prema PaPS vrijednostima nalik ne-patogenima; vidi metode) su pokazali oksidacijsku rezistenciju sličnu peptidima nalik ne-patogenima. Naime, peptidi s PaPS nalik patogenima su pokazali porast konformacijske stabilnosti, s 13 °C većom temperaturom topljivosti HTH i 20 °C većom  $T_m$  BH, u odnosu na odgovarajuće peptide nalik ne-patogenima ( $p < 0.0001$ ) (Slike 19C i 20D-20F). Peptidi negativne kontrole nalikuju peptidima nalik ne-patogenima; njihova  $T_m$  je za 18 °C veća nego kod peptida nalik patogenima (Slike 19C i 20D-20F).

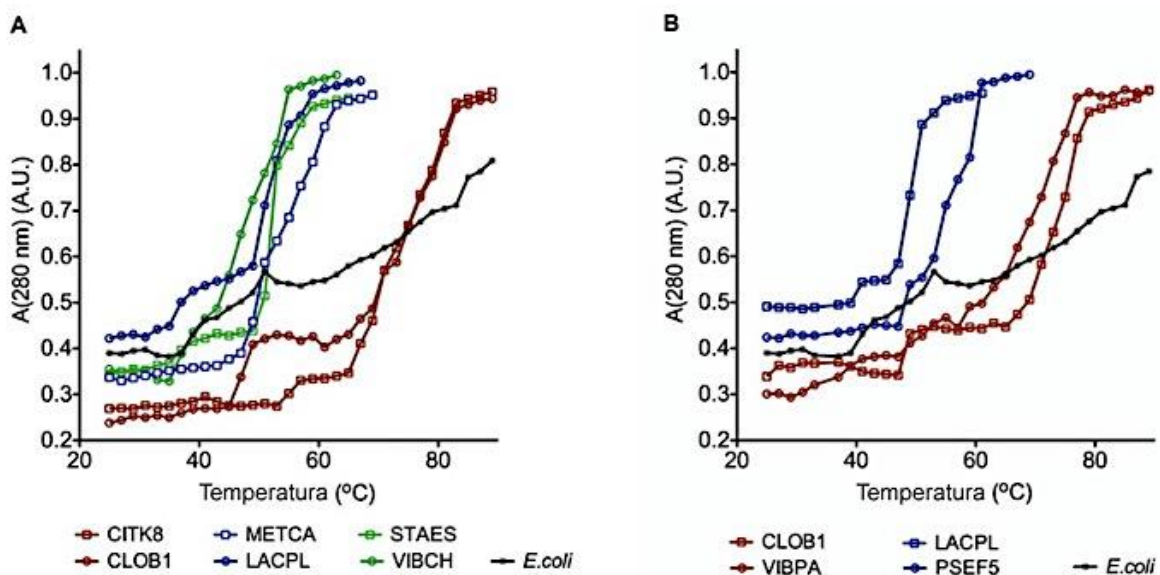
Konformacijska stabilnost sintetičkih peptida korelira s njihovom oksidacijskom rezistencijom, čime je ustanovljeno da veza između oksidacijske rezistencije i konformacijske stabilnosti nije ograničena samo na prirodne proteine.



Slika 19. (opis na str. 78)



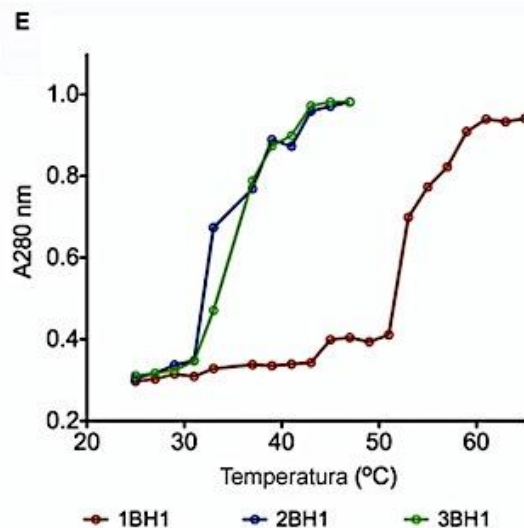
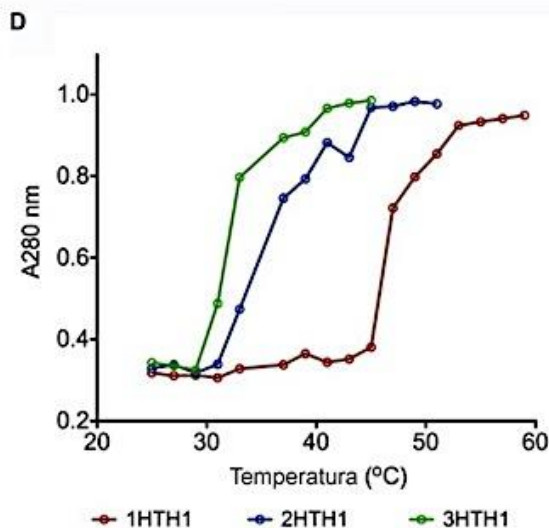
**Slika 19.** Oksidacijska rezistencija sintetičkih peptida nalik-patogenima i nalik ne-patogenima (A i B) Oksidacijska rezistencija dizajniranih peptida (A) zavojnica-okret-zavojnica (HTH, engl. helix-turn-helix) i (B)  $\beta$ -ukosnica (BH, engl.  $\beta$ -hairpin). Oksidacijska rezistencija je promatrana kao karbonilacija peptida nakon 5 min Fenton-inducirane oksidacije. (C) Temperature topljivosti sintetičkih peptida. Stupci pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju tri mjerenja u triplikatima \*\* $p < 0.01$  ("two-tailed" t test).



Slika 20. (opis na str. 79)

C

Patogeni				Ne - patogeni				Kontrolni patogen	
ThyA		NadD		ThyA		NadD		ThyA	
C. koseri	C. botulinum	C. botulinum	V. parahaemolyticus	M. capsulatus	L. plantarum	P. fluorescens	L. plantarum	S. epidermidis	V. cholerae
74 °C	72 °C	72 °C	69 °C	53 °C	47 °C	54 °C	47 °C	47 °C	45 °C



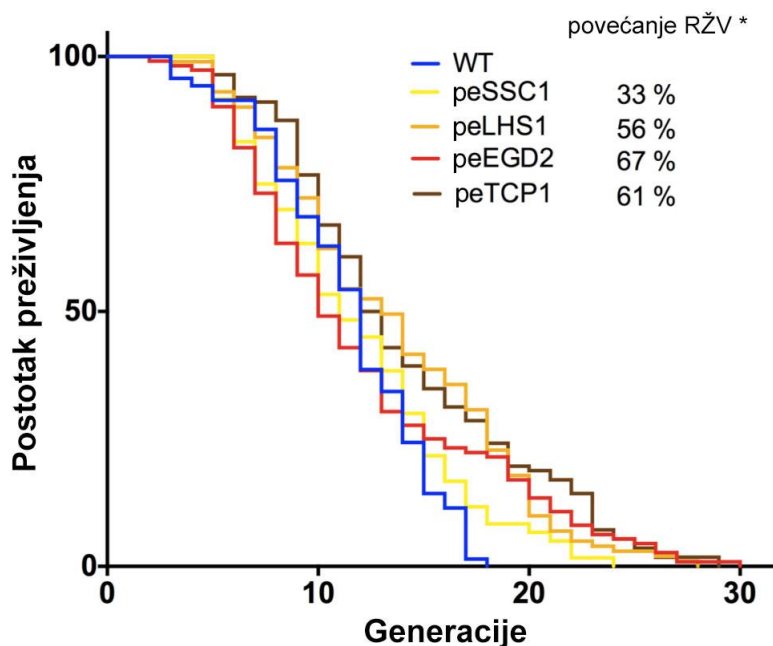
F

Nalik patogenima		Nalik ne - patogenima		Kontrolni peptidi	
1HTH1	1BH1	2HTH1	2BH1	3HTH1	3BH1
49 °C	56 °C	36 °C	36 °C	34 °C	36 °C

**Slika 20.** (povezana sa slikama 18. i 19.) Konformacijska stabilnost individualnih proteina iz patogena i ne-patogena. Toplinska denaturacija (A) ThyA iz CITK8, CLOB1, METCA, LACPL, STAES i VIBCH, i (B) NadD iz CLOB1, VIBPA, LACPL i PSEF5; (C) sažetak temperatura topljivosti za svaki protein. Termalna denaturacija dizajniranih peptida (D) zavojnica-okret-zavojnica (HTH, engl. helix-turn-helix) (HTH); (E)  $\beta$ -ukosnica (BH, engl.  $\beta$ -hairpin); (F) sažetak temperatura topljivosti za svaki peptid. Termalna denaturacija promatrana je kao promjena apsorbancije pri 280 nm sa porastom temperature. Crveni simboli predstavljaju proteine i peptide nalik-patogenima, plavi nalik-ne-patogenima, a zeleni kontrolne proteine i peptide. Broj ispred imena peptida predstavlja (1) peptidi sa PaPS nalik-patogenima, (2) peptidi sa PaPS nalik-ne-patogenima, i (3) peptidi negativne kontrole (peptidi s različitim kompozicijama, ali sa PaPS vrijednostima nalik-ne-patogenima). Termalna denaturacija proteinskog ekstrakta iz *E. coli* dodana je za usporedbu. Podatci predstavljaju tri neovisna mjerenja.

## 4.8 Povećana ekspresija šaperona povećava replikativni životni vijek kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Replikativni životni vijek, RŽV (engl. replicative lifespan, RLS) određen je kao broj generacija koje proizvedu stanice majke prije ulaska u starost. Soj divljeg tipa dao je maksimum od 18 pupova tijekom svog replikativnog životnog vijeka, što je bila očekivana vrijednost za taj određeni soj (Slika 21). Povećana ekspresija gena EGD2, podjedinice kompleksa koji se veže za novonastali polipeptid (engl. nascent polypeptide associated complex - NAC) pokazala je najveći utjecaj na povećanje replikativnog životnog vijeka, za 67 %, u odnosu na kontrolu sa praznim plazmidom. Učinak kompleksa NAC slijedi povećana ekspresija gena TCP1, koji kodira za citosolni T-kompleks, koji povećava replikativni životni vijek za 61 %, zatim gen LHS1, koji kodira za HSP70 šaperon iz endoplazmatskog retikuluma sa 56 %. Na kraju, povećana ekspresija gena SSC1, koji kodira za mitohondrijski HSP70 šaperon sa 33 % povećanim životnim vijekom u odnosu na kontrolu (divlji tip).

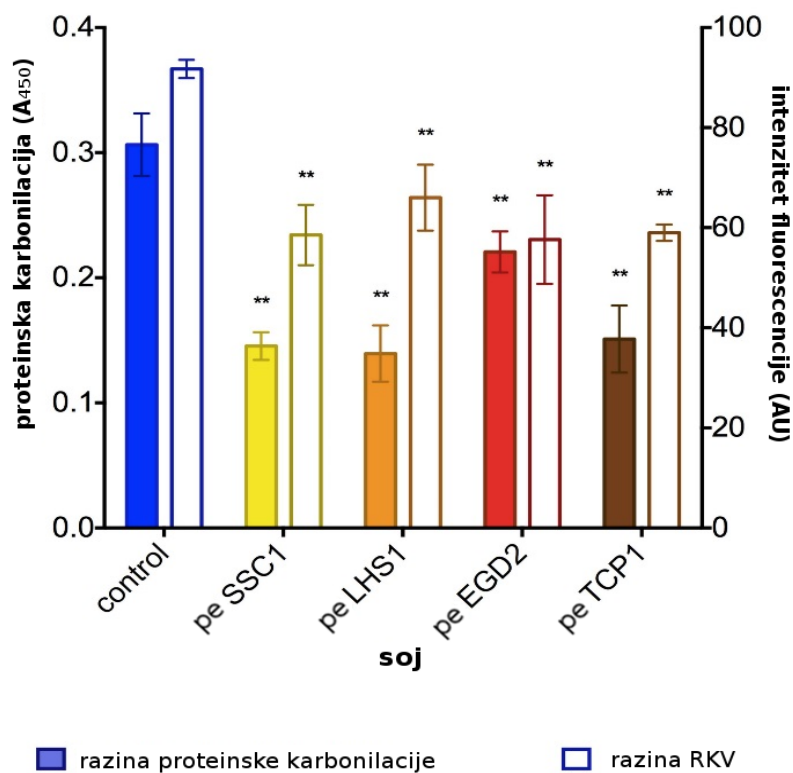


**Slika 21.** \*Replikativni životni vijek (RŽV) je produžen u mutantima s povećanom ekspresijom šaperona. Broj stanica je 103, 120, 112, 129 i 127 za divlji tip, pe SSC1, pe LHS1, pe EGD2, i pe TCP1, redom. Pe označava povećanu ekspresiju. Prikazani podaci su sakupljeni iz 2 neovisna eksperimenta za svaki pojedini soj. Značajnost rezultata testirana je s log-rank testom, p-vrijednosti < 0.05.

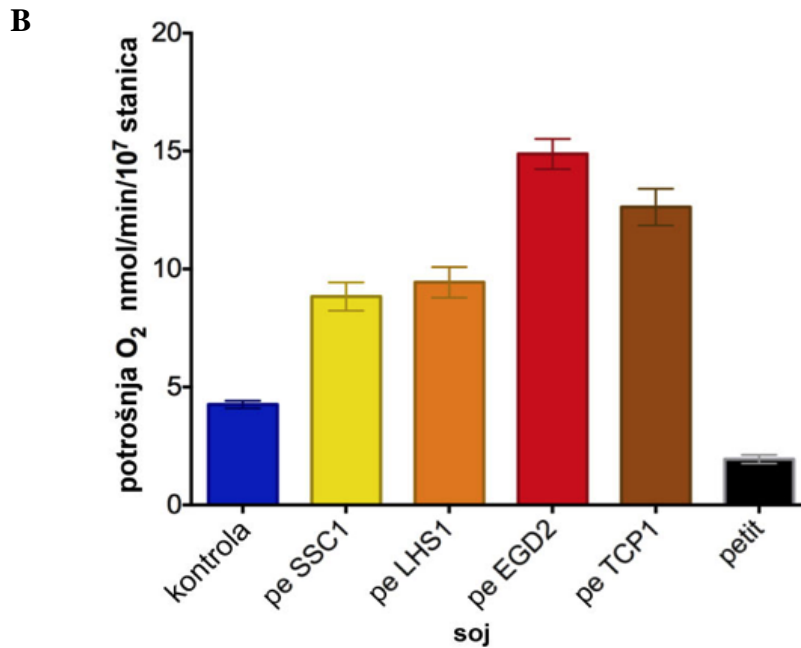
#### 4.9 Povećanu ekspresiju šaperona prati smanjena razina RKV-a (reaktivnih kisikovih vrsta) i oksidacijskog oštećenja proteina

Proizvodnja RKV-a i razina oksidacijskog oštećenja proteina povezana je sa starenjem kod nekoliko modelnih organizama (Sohal, 1996; Barja, 2004.), što nas je navelo da izmjerimo spomenute parametre kod dugo-živućih mutantnih sojeva kvasaca. Kako bismo ispitali da li je došlo do promjene u razini unutarstaničnih RKV-a uslijed povećane ekspresije šaperona, koristili smo metodu protočne citometrije (engl. FACS-Fluorescence Activated Cell Sorting), prateći fluorescenciju DCF probe koja nastaje kao rezultat reakcije H<sub>2</sub>-DCF s unutarstaničnim RKV-om (materijali i metode; odjeljak 3.2.6). Dugo-živući mutanti pokazuju smanjenu razinu RKV-a za otprilike 40% u usporedbi sa sojem divljeg tipa (Slika 22A). Nadalje, izmjerili smo razinu proteinske karbonilacije ukupnog proteinskog ekstrakta od svih sojeva. Sojevi s povećanom ekspresijom šaperona pokazuju smanjenu razinu proteinske karbonilacije za 40% u usporedbi s kontrolnim praznim plazmidom (Slika 22A). Ovi rezultati pokazuju da niža razina RKV-a uzrokuje manju oksidacijsku štetu na proteinima.

A



Slika 22. (opis na str. 82)



**Slika 22.** (A) Karbonilacija proteina i razina reaktivnih kisikovih vrsta (RKV) je smanjena u dugo-živućim mutantima u usporedbi s kontrolom.  $**p < 0.01$  (ANOVA plus post hoc). (B) Potrošnja kisika je povećana kod dugo-živućih mutanti. Potrošnja kisika je mjerena polarografski u odgovarajućem mediju obogaćenom s 2%-tnom glukozom na 30 °C.  $*** p < 0.001$  (ANOVA plus post hoc). Podatci na slici 22 su prikazani kao prosjek  $\pm$  standardna devijacija iz barem 3 zasebne kulture, svaka mjerena u triplicatu.

#### 4.10 Dugo-živući mutanti kvasca pokazuju povećanu respiraciju

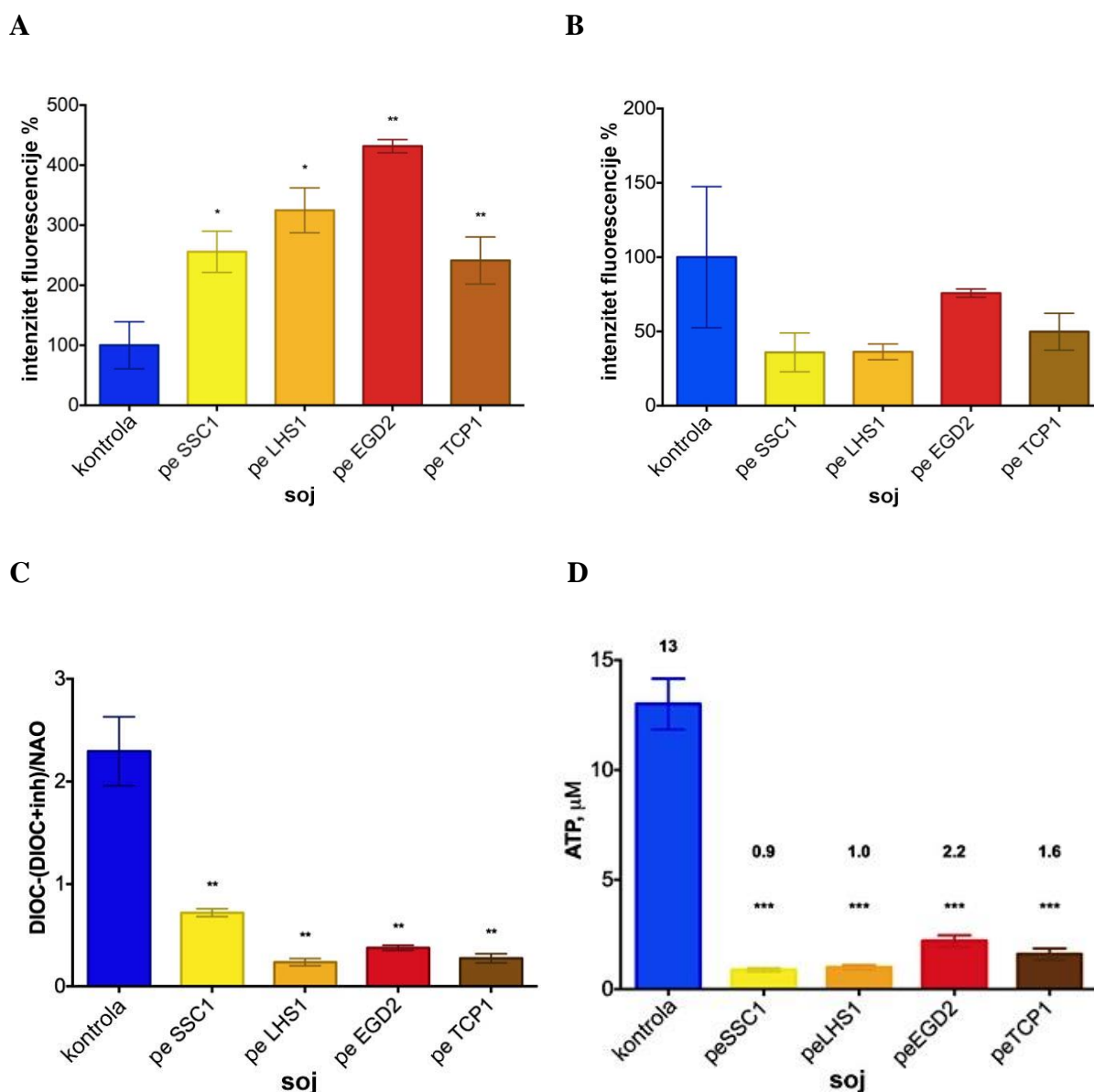
Mitochondriji su glavni izvor unutarstaničnog RKV-a (Turrens, 2003.), a također imaju važnu ulogu u regulaciji trajanja životnog vijeka (Barros, 2004.). Budući da je mitohondrijska funkcija povezana s proizvodnjom RKV-a, ispitali smo dodatne mitohondrijske parametre u dugo-živućim stanicama kvasca s povećanom ekspresijom šaperona. Mitohondrijska respiracija prihvaćena je kao najkorisnija metoda ispitivanja mitohondrijske funkcije/aktivnosti (Brand, 2011.). Prvo smo izmjerili potrošnju kisika u fazi eksponencijalnog rasta u mediju s 2% glukozom, oponašajući uvjete iz tekuće kulture kada se stanice kvasca djelomično koriste oksidativnom fosforilacijom. Svi dugo-živući mutanti, pokazuju povećanje u potrošnji kisika (respiratorna razina u eksponencijalnoj fazi) u odnosu na soj divljeg tipa, s najvećom promjenom u soju s pojačanom ekspresijom EGD2, zatim TCP1, LHS1 i na kraju SSC1 (Slika 22B). Mutant petit pokazao je izostanak respiracije kao rezultat gubitka funkcionalnog transportnog lanca elektrona, te je poslužio kao negativna kontrola.

## 4.11 Dugo-živući mutanti imaju karakteristike “nesparenih” mitohondrija

Kako bismo razjasnili mehanizme koji su odgovorni za nastale promjene u respiraciji, nastavili smo s karakterizacijom mitohondrijske aktivnosti. Kako povećana potrošnja kisika može biti rezultat povećanog kapaciteta mitohondrija, izmjerili smo biomasu mitohondrija u stanicama pomoću protočne citometrije. Stanicama kvasca dodali smo spoj akridin oranž 10-nonil (NAO), koji ima visoki afinitet vezivanja za kardiolipin u unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani pa se koristi za mjerenje mitohondrijske biomase. Fluorescencija spoja NAO pokazala je povećani sadržaj kardiolipina/mitohondrijske biomase u dugo-živućim mutantima u usporedbi s divljim tipom (kontrola) (Slika 23A). Pokazano je da povećanje mitohondrijske biomase snažno korelira s povećanjem stope respiracije, što je pokazatelj mogućeg postojanja uzročne poveznice između dva spomenuta efekta.

Zajedno sa stopom respiracije, mitohondrijski membranski potencijal predstavlja izuzetno važnu karakteristiku mitohondrija i služi kao jedna od boljih mjera za status mitohondrijske funkcije (Brand, 2011.). Membranski potencijal mitohondrija određen je protočnom citometrijom stanica obojenih s DiOC6(3), fluorescentnom bojom koja se nakuplja u mitohondrijskom matriksu ovisno o elektrokemijskom gradijentu, tj. potencijalu na unutarnoj membrani mitohondrija. Nakon bojenja stanica s DiOC6(3), ne vidi se značajna razlika u intenzitetu fluorescencije između mutantnih sojeva međusobno, kao ni u odnosu na divlji tip, što ukazuje na isti membranski potencijal u svim sojevima (Slika 23B). Međutim, potencijal na unutarnoj membrani, normaliziran na mitohondrijsku biomasu, je smanjen kod dugo-živućih mutanti (Slika 23C), također je smanjen ukupan stanični ATP kod ovih sojeva u usporedbi s kontrolom (Slika 23D), što upućuje na razdvajanje (engl. “uncoupling”) respiratornog lanca.





**Slika 23.** (A) Biomasa mitohondrija je povećana kod dugo-živućih mutanata. NAO fluorescentni signal mitohondrija sakupljen je u prikladni kanal nakon bojenja. (B) Fluorescencija povezana s potencijalom mitohondrijske membrane je nepromijenjena. Nakon 10 minuta inkubacije sa 100  $\mu\text{M}$  FCCP i 5  $\mu\text{g/mL}$  antimicinom, izazvan je kolaps  $\Delta\Psi\text{m}$ , rezultirajući smanjenim signalom, što ukazuje na depolarizaciju mitohondrijske membrane. (C) DiOC6(3)/NAO omjer. (D) Razine ATP-a su smanjene u dugo-živućim mutantima. Prosječna vrijednost je označena iznad svakog stupca. Podatci na slici su prikazani kao prosjek  $\pm$  standardna devijacija iz 3 zasebne kulture, svaka izmjerena u duplikatu. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$  (ANOVA plus post hoc).

U zaključku, dobiveni rezultati pokazuju manju proizvodnju RKV-a u sojevima s povećanom ekspresijom šaperona, te smanjeni mitohondrijski potencijal unatoč povećanoj potrošnji kisika i povećanoj mitohondrijskoj masi, u usporedbi s kontrolnim sojem (divlji tip).

## 4.12 Različita ekspresija gena kod dugo-živućih mutanti pokazuje povećanu ekspresiju kompleksa oksidativne fosforilacije i smanjenu glikolizu

Kako bismo opisali generalne trendove u ekspresiji gena kod dugo-živućih mutanti te ustanovili temeljni mehanizam, sekvencirane su mRNA (glasnička RNA) (engl. RNASeq) kod svih istraživanih sojeva. Rezultati su potom mapirani na KEGG signalne putove. Najznačajniji rezultati pokazuju smanjenu ekspresiju ključnih enzima glikolize, što ide u prilog represiji glikolize (Slika 24A), te povećanu razinu ekspresije kompleksa oksidativne fosforilacije (Slika 24A). Nadalje, genska ekspresija vezana za oksidaciju masnih kiselina ukazuje na masne kiseline kao glavni izvor energije kod dugo-živućih sojeva kvasaca (Slika 24A): Pox1, koenzim A oksidaza acil-masne kiseline, kao i Pot1, 3-ketoacil-CoA tiolaza, imaju povećanu ekspresiju što ukazuje na aktivaciju oksidacije masnih kiselina. Zatim, nekoliko podjedinica vakuolarne V-ATPaze, potrebne za kiselost vakuole, sniženo su eksprimirane (Slika 24A).

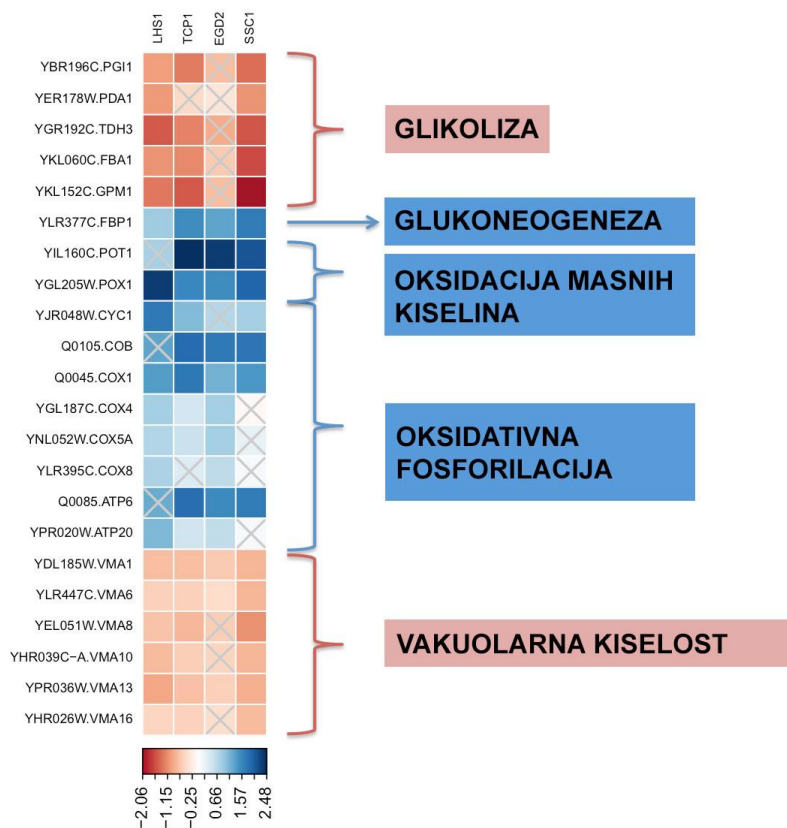
Kako bismo potvrdili rezultate dobivene sekvenciranjem RNA, provedena je sistematska analiza ekspresije nekoliko najintragantnijih gena putem kvantitativnog PCR-a (engl. qPCR). Rezultati su prikazani na Slici 24B. Općenito, rezultati potvrđuju represiju glikolize uz značajno smanjenu ekspresiju nekoliko ključnih glikolitičkih enzima (Slika 24B). S druge strane, MDH1, koji kodira za malat dehidrogenazu TCA ciklusa (Krebsov ciklus ili ciklus trikarboksilnih kiselina) pokazuje povećanje u ekspresiji. Mdh1 katalizira stvaranje NADH u TCA ciklusu. Za komplekse elektronskog transportnog lanca, dugo-živući mutanti pokazuju povećanu ekspresiju komponenti Kompleksa III i Kompleksa IV respiratornog lanca. Razina Citokroma c1 (CYT1) je uvećana za  $\approx 5$  puta na razini ekspresije, kao i razina izo-1-citokroma c (CYC1), koji služi za transport elektrona u mitohondrijskom međumembranskom prostoru.

Nadalje, uočili smo povećanu ekspresiju Cox1, Cox2, Cox3 i Cox4 komponenti Kompleksa IV respiratornog lanca, što ukazuje da postoji utjecaj na mitohondrijske i jezgrene kodirane komponente. Kompleks V, ATP sintaza, pokazuje  $\approx 4$  puta veću ekspresiju ATP1, alfa podjedinice F1 sektora mitohondrijske F1F0 ATP sintaze.

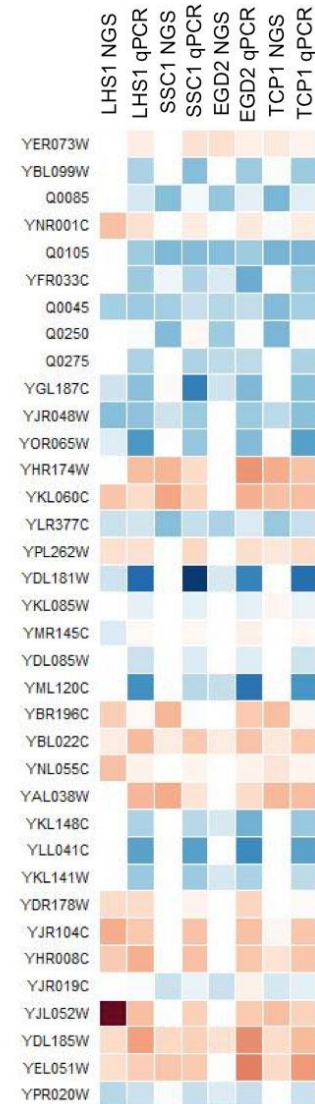
Analize kvantitativnog PCR-a su pokazale generalni porast broja podjedinica oksidativne fosforilacije, ali ne i značajnu razliku u broju mitohondrijskog markera za biogenezu, Por1, što ide u prilog rezultatima dobivenih iz mjerenja protočnom citometrijom mitohondrijskog potencijala unutarnje membrane i biomase mitohondrija. Paralelno

rezultatima kvantitativnog PCR-a, Slika 24B pokazuje rezultate sekvenciranja RNA za iste gene, gdje su prikazani sveukupni trendovi konzistentni između dva različita pristupa.

A



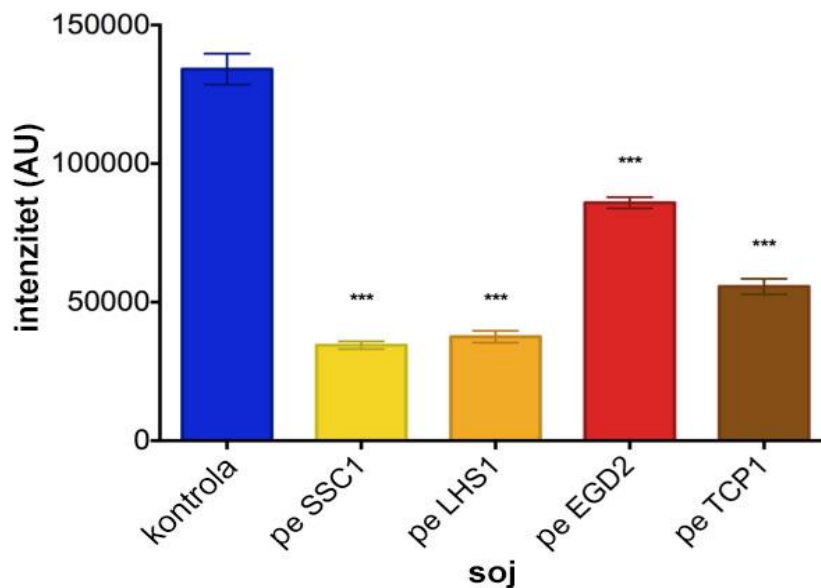
B



**Slika 24.** Ekspresija gena u dugo-živućim sojevima. (A) Toplinska mapa prikazuje diferencijalnu ekspresiju (u odnosu na divlji tip) odabranih gena, složenih po metaboličkim procesima, dobivenu RNA sekvenciranjem. Sivo X označava statistički nevažne promjene. (B) qPCR potvrda RNA sekvenciranih rezultata. Toplinska mapa prikazuje usporedbu promjena u ekspresiji po soju za odabrani set gena mjereno s qPCR i RNA sekvenciranjem. Imena gena su prikazana lijevo u svakoj toplinskoj mapi.

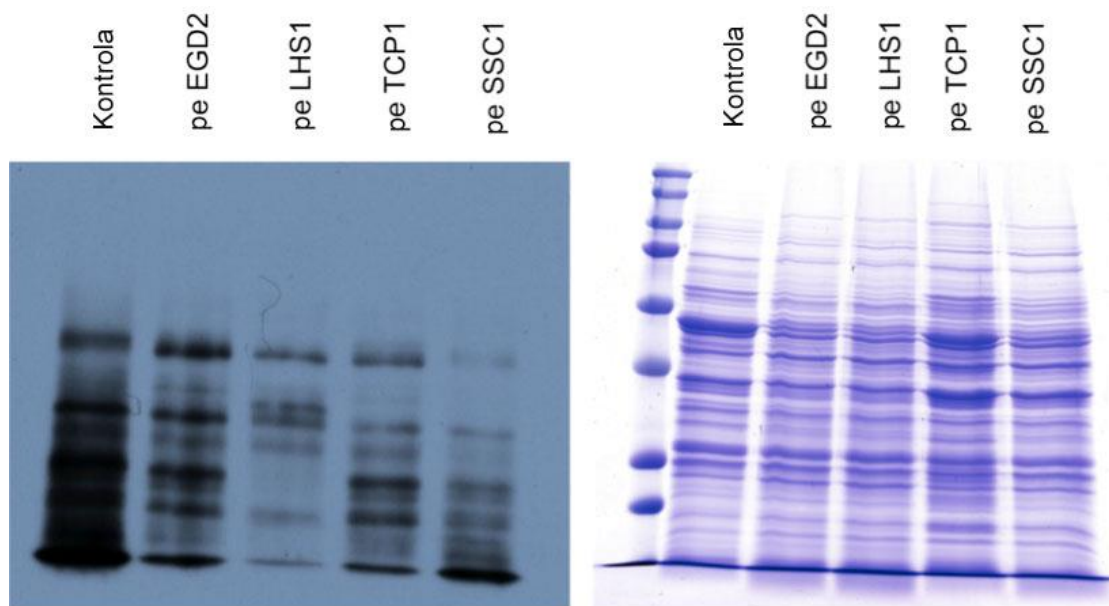
### 4.13 Dugo-živuće mutante karakterizira smanjena translacija

Povećana akumulacija tRNA u dugo-živućim sojevima, prema rezultatima RNA sekvenciranja, upućuje na potisnutu translaciju. Kako bismo potvrdili spomenuti fenotip, izmjerili smo količinu novosintetiziranih proteina u citosolu za jedno generacijsko vrijeme kod svih proučavanih sojeva, pomoću “Click-iT” metaboličkog obilježavanja. Rezultat je pokazao smanjenu količinu novosintetiziranih proteina u usporedbi s kontrolnim sojem (Slika 25, Slika 26), što dodatno podržava podatke dobivene RNA sekvenciranjem.



**Slika 25.** Količina novotranslatiranih proteina je smanjena u dugo-živućim mutantima. Podaci prikazuju ImageJ kvantifikaciju Western analize normaliziranu na cijeli stupac u proteinskom gelu obojanom Coomassie bojom. \*\*\*  $p < 0.001$  (ANOVA plus post hoc).

Pe označava povećanu ekspresiju.

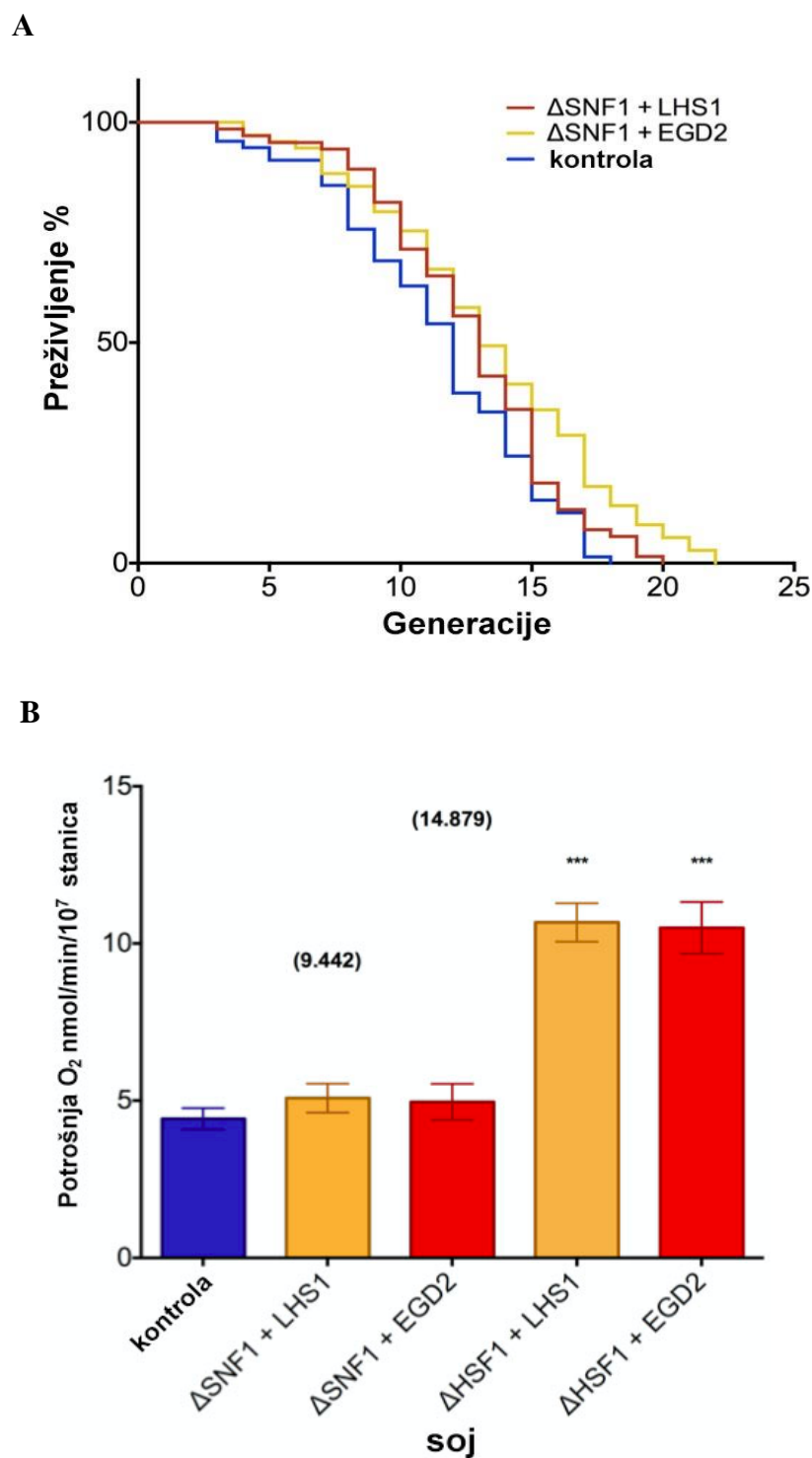


**Slika 26.** Detekcija novo-sintetiziranih proteina Western blot analizom i odgovarajući gelovi sveukupnih proteina korišteni za normalizaciju signala. Pe označava povećanu ekspresiju.

#### 4.14 Snf1 je esencijalan za produljenje životnog vijeka kod dugo-živućih mutanata

Zatim smo istražili utjecaj povećane ekspresije Lhs1 i Egd2 u odsutstvu kinaze Snf1 na duljinu replikativnog životnog vijeka. Nakon što su svi testirani sojevi pokazali sličan fenotip, za mjerenje replikativnog životnog vijeka odabrali smo samo dva soja.

Rezultati su pokazali da u odsutstvu kinaze Snf1 replikativni životni vijek nije produljen kod odabranih sojeva te da je usporediv s replikativnim životnim vijekom kontrolnog soja (Slika 27A). Također, mjerenja potrošnje kisika su pokazala izostanak povećanja respiracije (Slika 27B), ukazujući na Snf1 kao jednog od glavnih odgovornih za aktivaciju opisanog signalnog puta.



**Slika 27.** (A) Replikativni životni vijek dugo-živućih mutanata je skraćen u odsutnosti kinaze Snf1. Broj stanica je 103 (kontrola), 95 ( $\Delta$ Snf1+LHS1), 82 ( $\Delta$ Snf1+EGD2). Značajnost rezultata testirana je s log-rank testom, p-vrijednosti < 0.05. (B) Potrošnja kisika dugo živućih mutanata je smanjena u odsustvu Snf1, ali je nepromijenjena u odsustvu Hsf1 (prikazano kao negativna kontrola). U zagradama su prosječne vrijednosti odgovarajućih dugo-živućih mutanata, za usporedbu. Podaci su prikazani kao prosjek  $\pm$  standardna devijacija iz barem 3 zasebne kulture, svaka mjerena u triplicatu. \*\*\* < 0.001 (ANOVA plus post hoc).

## **4.15 Dugo-živuće mutante karakterizira povećan broj Hsp90-Snf1 kompleksa i fosforilirane Snf1 kinaze**

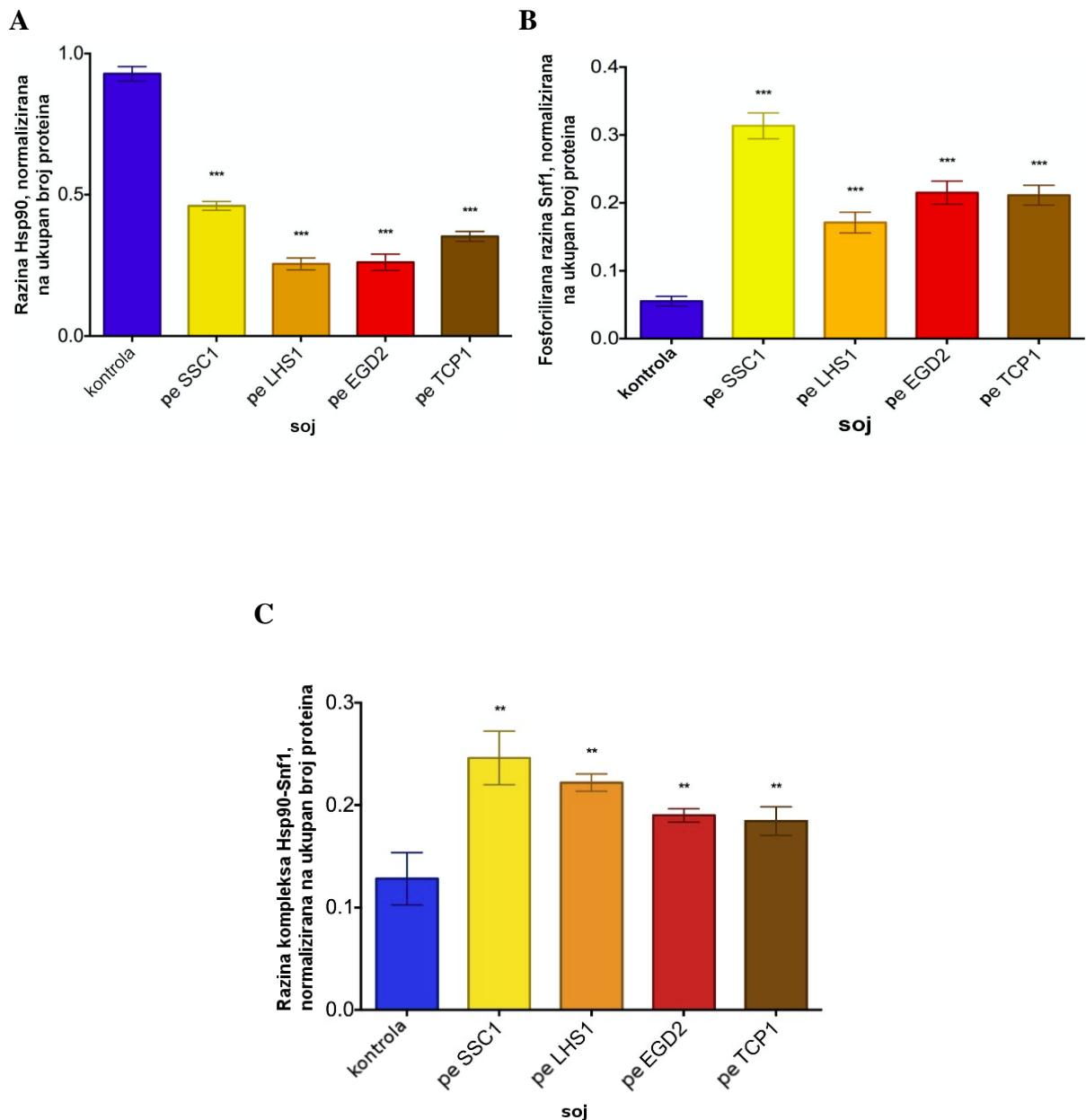
Postavlja se pitanje: koja je poveznica između povećane ekspresije različitih šaperona i učinaka vezanih za kinazu Snf1? Naša hipoteza predviđa da je smanjena količina Hsp90 šaperona. Naime smanjena razina RKV-a (reaktivnih kisikovih vrsta) i proteinske karbonilacije upućuje na manju količinu pogrešno uvijenih proteina. Zbog manje količine pogrešno uvijenih proteina smanjena je intervencija Hsp90 šaperona u dugो-živućim mutantima.

S obzirom da Hsp90-kofaktor kompleks služi kao kalup za aktivaciju kinaze Snf1, jednog od glavnih senzora za glukozu kod kvasca, zaintrigirala nas je ideja da bi aktivacija Snf1 neovisna o glukozu, mogla biti poveznica između mreže šaperona i promjena u osjetljivosti na glukozu.

Zatim, preostalo je za otkriti u kojem trenutku signalnog puta dolazi do preusmjeravanja povećane ekspresije četiriju različitih šaperona prema jednom zajedničkom putu, u četiri različita soja.

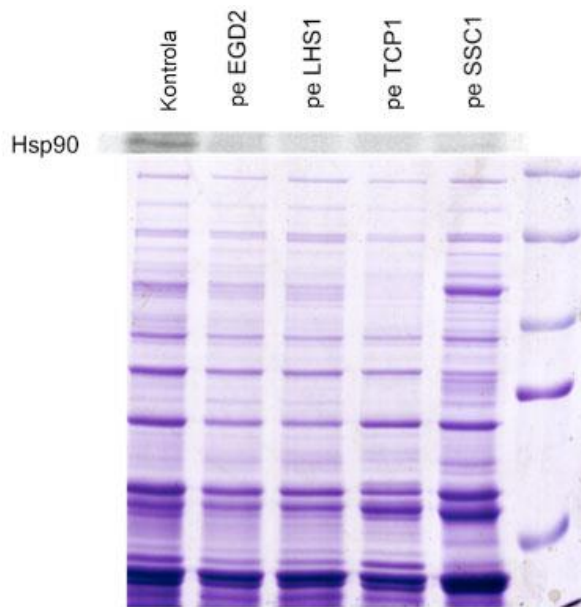
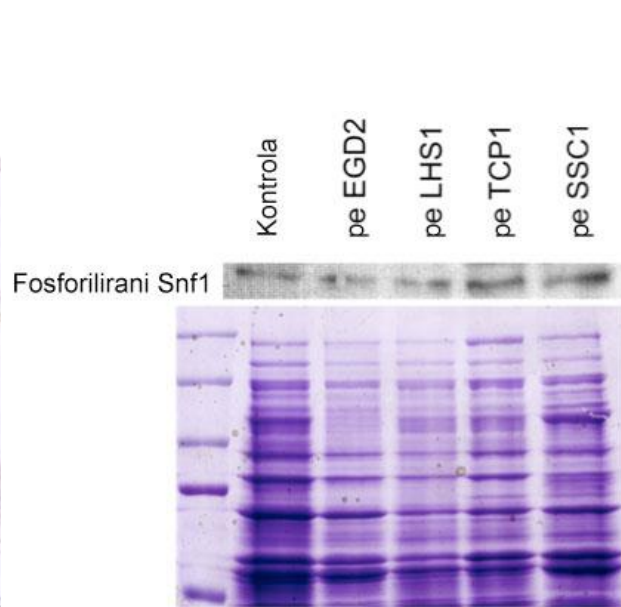
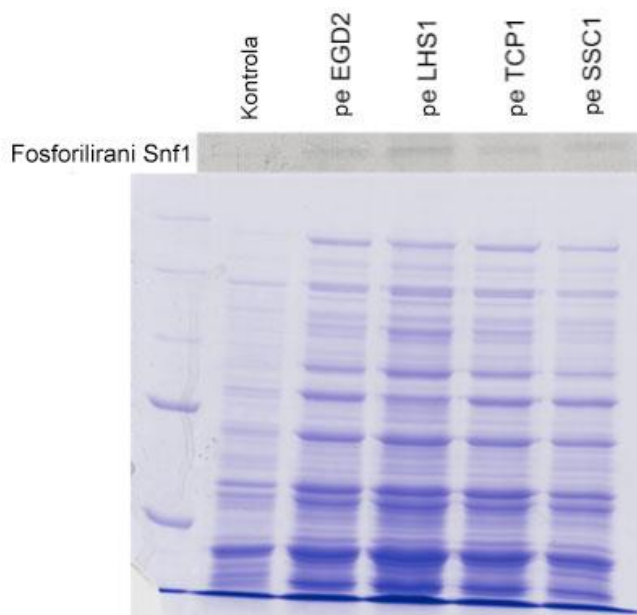
Pronašli smo da svi dugо-živući sojevi imaju manju količinu Hsp90 šaperona u odnosu na kontrolni soj (Slika 28A, Slika 29A), što upućuje na manju koncentraciju pogrešno smotanih proteina, odnosno klijenata za Hsp90 šaperone, i samim time smanjenu intervenciju Hsp90 šaperona u proteomu. Također smo odredili razine fosforiliranih (aktiviranih) Snf1 kinaza. Pronašli smo povećanu razinu fosforilirane kinaze Snf1 u dugо-živućim mutantima u usporedbi s kontrolnim sojem (Slika 28B, Slika 29B).

Nadalje, istražili smo brojnost kompleksa kinaza Hsp90 i Snf1, imunoprecipitacijom šaperona Hsp90, nakon koje je uslijedilo određivanje kinaze Snf1 putem Western blot analize. Rezultati su pokazali da dugо-živući mutanti imaju povećanu koncentraciju Hsp90-Snf1 kompleksa (Slika 28C, Slika 29C).



**Slika 28.** (A) Razina Hsp90, (B) razina fosforiliranog Snf1, i (C) razina kompleksa Hsp90-Snf1 (dobivenog ko-imunoprecipitacijom) u kontrolnoj grupi i u dugo-živućim mutantima. Podaci prikazuju ImageJ kvantifikaciju Western analize normaliziranu na cijeli stupac u proteinskom gelu obojanom Coomassie bojom iz dva nezavisna eksperimenta. \*\*  $p < 0.01$  (ANOVA plus post hoc).



**A****B****C**

**Slika 29.** Detekcija Western blot analizom (A) Hsp90 i odgovarajući gelovi sveukupnih proteina korišteni za normalizaciju; (B) fosforilirani Snf1 i odgovarajući gelovi sveukupnih proteina korišteni za normalizaciju; (C) Snf1 dobiven ko-immunoprecipitacijom s Hsp90 i odgovarajući gelovi sveukupnih proteina korišteni za normalizaciju.

## 5. RASPRAVA

---

Cilj ovog istraživanja bio je po prvi puta opisati povezanost očuvanja strukture proteina s različitim staničnim fenotipovima. U tom smo kontekstu pokazali kako strukturna stabilnost proteina uvjetuje otpornost proteina na oksidativno oštećenje, odnosno proteinsku karbonilaciju. Na primjeru patogenih u odnosu na nepatogene bakterije pokazali smo kako je povećana otpornost proteina patogenih bakterija prilikom obrane domaćina (indukcijom oksidativnog stresa kao imunološkog odgovora) zapravo posljedica povećane native strukturne stabilnosti proteina patogenih bakterija. Nadalje, pokazali smo također po prvi puta, na eukariotskom modelu pupajućeg kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, kako se poboljšanjem strukturne stabilnosti proteina pomoću različitih proteinskih šaperona povećava proteinska rezistencija na oksidativno oštećenje. Poboljšanje proteinske strukture, također, uzrokuje produljenje replikativnog životnog vijeka, utjecajem na metaboličke signalne puteve za osjetljivost na glukozu prilikom kojih dolazi do oponašanja kalorijske restrikcije.

### **Motivi konformacijske stabilnosti i oksidacijske rezistencije u proteomima patogenih bakterija**

Za patogene bakterije je karakteristično da pomoću različitih mehanizama uzrokuju bolesti, no ipak postoje zajednička obilježja izazivanja infekcije među evolucijski udaljenim patogenim vrstama (Gamma i sur., 2012.). U ovom radu, nisu proučavani mehanizmi izazivanja bolesti, već karakteristike sastava čitavih proteoma patogenih bakterija i njihova povezanost sa rezistencijom na oksidativni stres, koji je dio imunološkog odgovora domaćina kojem su izloženi patogeni prilikom invazije (Rosenberger i Finlay, 2003.).

Kao posljedica oksidativnog oštećenja, proteini gube nativnu strukturu i zbog toga obavljaju svoje funkcije s manjom učinkovitošću (Kriško i Radman, 2010.), što dovodi do porasta razine mutacija koje pokreću niz genetskih i proteinskih oštećenja (Kriško i Radman, 2013.). Iako proteini podliježu brojnim modifikacijama velikim brojem različitih oksidativnih reakcija, karbonilacija je najštetniji tip oštećenja čija se razina povećava tijekom oksidativnog stresa zbog njene ireverzibilne prirode (Nystrom, 2005.). Čak i u konstantnim, fiziološkim koncentracijama RKV, pogrešno smatanje proteina povećava njihovu osjetljivost na karbonilaciju *in vivo*, na primjer, tijekom toplinskog šoka i tretmana streptomycinom ili puromycinom (Dukan i sur., 2000.). Međutim, i proteini native strukture mogu biti

karbonilirani, dok individualni proteini pokazuju ekstremne razlike u rezistenciji na karbonilaciju, s ~10 % proteoma *E. coli* visoko podložnog karbonilaciji (Maisonneuve i sur., 2009.). Odrednice na razini aminokiselinskog slijeda i strukture proteina ovih razlika u osjetljivosti nisu razjašnjene, ali jaka sklonost nakupljanja karboniliranih dijelova u klastere ukazuje na postojanje nekoliko temeljnih principa (Rao i Moller, 2011.).

Naši početni eksperimenti su pokazali povećanu otpornost reprezentativnih patogenih bakterija na inhibiciju šaperona HSP90 *in vivo*, te oksidaciju njihovih pročišćenih proteina *in vitro*. Naime, baktericidni učinak nekih antibiotika može biti u obliku oksidativnog stresa (Kohanski i sur., 2007.). Kako bismo ispitali tu mogućnost, izmjerili smo razinu RKV-a kod svih reprezentativnih vrsta bakterija, u normalnim uvjetima i u prisutnosti geldanamicina koji uzrokuje inhibiciju HSP90 šaperona. Neovisno o patogenosti vrste i njihove tolerantnosti na oksidaciju, razina RKV-a u prisutnosti geldanamicina pokazala se nepromijenjenom, uključujući i dva obligatna anaeroba, *C. perfringens* (patogen) i *C. acetobutylicum* (nepatogen). Izjednačena razina RKV-a u prisutnosti geldanamicina ukazuje da prisutnost geldanamicina ne utječe na razinu RKV-a specifično samo za aerobe, već da se isto odnosi i na anaerobe. Veća otpornost patogena na geldanamicin stoga nije posljedica efikasne supresije RKV-a, već najvjerojatnije uslijed povećane strukturne stabilnosti proteoma patogena. Naime, povezanost između strukturne stabilnosti proteina i njihove otpornosti na oksidaciju kod odabranih bakterija, u skladu je s prijašnjim istraživanjima u kojima je pokazano kako su pogrešno smotani proteini visoko osjetljivi na oksidaciju *in vitro* (Dukan, i sur., 2000.). Ovi proteini imaju proteomska obilježja (PaPS vrijednosti), koja ukazuju na povećan sadržaj sekundarnih struktura te smanjen udio aminokiselina destabilizirajućih za tercijarnu strukturu proteina kod patogenih bakterija. Nadalje, visoko stabilni proteini posjeduju veći broj hidrofobnih aminokiselina uključenih u visokoenergetske nekovalentne interakcije u proteinima, dok su mjesta na proteinu dostupna otapalu (hidrofilne aminokiseline), uglavnom sklona karbonilaciji (Maisonneuve i sur., 2009.). Također, poznati su i patogeni koji ne favoriziraju ugradnju prolina, aminokiseline koja destabilizira strukturu, i najsklonija je karbonilaciji (Rao i Moller, 2011.). Međutim, sadržaj aminokiselina podložnih oksidaciji ne odražava otpornost organizma na kisik (Vieira-Silva i Rocha, 2008.). S druge strane, povećana karbonilacija proteoma pod utjecajem stresa *in vivo* koja dovodi do pogrešnog smatanja proteina (Dukan i sur., 2000.), ukazuje da oni proteini (ili samo neki dijelovi proteina) koji su intrinzično otporniji na pogrešno smatanje, trebaju biti otporniji na karbonilaciju. U bakteriji *E. coli* je pokazano da prisutnost enzima tzv. sakupljača RKV-a ili

malih antioksidativnih molekula (NAC), ne može objasniti razlike među proteomima patogenih vrsta u otpornosti na RKV (Slika 12), već su intrinzična svojstva proteina zaslužna za dodatnu zaštitu od RKV-a koja nisu objašnjena pomoću drugih ispitanih mehanizama.

Ovaj rad pruža više eksperimentalnih dokaza koji prikazuju uzročno-posljedičnu vezu strukturne stabilnosti pravilno smotanih proteina i njihove otpornosti na karbonilaciju. Naime, PaPS vrijednost iz koje se procjenjuje strukturna stabilnost, a koja proizlazi iz proteomskog sastava patogenih bakterija, ukazuje na povezanost PaPS obilježja i patogenosti. PaPS vrijednosti nisu ovisile o optimalnoj temperaturi rasta, vremenu udvostručivanja, ili aerobnosti (Slika 15), već je postojala mogućnost da je PaPS indirektno povezan s patogenošću preko G+C genomskog sadržaja. Bakterije ovisne o domaćinu, među kojima su i patogeni, teže ka nižem G+C sadržaju za razliku od slobodno živućih bakterija, stoga i patogeni također imaju niži G+C sastav. Poznato je da genomski sadržaj G+C utječe na aminokiselinski sastav proteoma (Moura i sur., 2013.), u kojem niski G+C odgovara stabilnijem proteomu manje sklonom odmatanju (Mendez i sur., 2010.). Prema tome, otkriveni motiv konformacijske stabilnosti proteoma patogenih bakterija, može biti posljedica indirektno selekcije na G+C sadržaju (Rocha i Feil review, 2010.). Međutim, genomski G+C sastav ne može objasniti u potpunosti eksperimentalna opažanja u ovom radu; tri od šest reprezentativnih patogena su imali umjereno visok (*S. typhimurium* [52 %] i *K. pneumoniae* [57 %]) ili vrlo visok G+C sastav (*P. aeruginosa* [67 %]), ali su pokazivali sličnu otpornost na geldanamycin kao i tri patogena sa niskim G+C sadržajem (Slika 13B) i sličnu proteomsku rezistenciju na oksidaciju (Slike 13A i 13B). Svi rezultati ukazuju da je patogenost složeni fenotip, a da su G+C sadržaj i sastav proteoma samo dodatna obilježja koja uz već poznate brojne faktore imaju utjecaj na patogenost.

Dakle, povećana konformacijska stabilnost može predstavljati dodatni mehanizam zaštite proteina patogenih bakterija od oksidacije, koja im omogućuje intrinzičnu obranu od imunološkog odgovora domaćina. Također, zahvaljujući našim rezultatima postoji i mogućnost dizajna konformacijski stabilnijih proteina, te proteina otpornijih na oksidativni stres, pomoću proteinskih svojstava „zapisanih“ (kodiranih) u PaPS vrijednostima proteoma patogenih bakterija. Osim za potencijalnu primjenu u sintetskoj biologiji, ova saznanja će pomoći u otkrivanju novih terapijskih sredstava za destabilizaciju bakterijskih proteina patogena. Takve strategije se u budućnosti mogu pokazati učinkovitima sinergijskim

napadom na proteom patogena, kombinacijom destabilizacije proteina i obrane domaćina prekomjernom proizvodnjom RKV-a.

## **Iznimke koje ne pokazuju ustanovljene razlike u sastavu proteoma patogena**

Sveukupno, pokazano je da se PaPS vrijednosti znatno i značajno razlikuju između patogena i ne-patogena (Slike 16A i 16B). Međutim, postoje i iznimke. Takvi slučajevi mogu utjecati na suptilnosti u definiciji patogenosti koje je teško zabilježiti pomoću binarne klasifikacije, poput one koju smo koristili u ovome radu. Na primjer, *Bacillus licheniformis* je patogen s najmanjom PaPS vrijednosti nalik-patogenima u svom proteomu, što ga klasificira među ne-patogene (Slike 15A, 15B), slično je i s *Pseudomonas mendocina* (drugi po redu s najmanje PaPS vrijednosti nalik-patogenima, Slika 15A, 15B).

Oba slučaja su nisko virulentni organizmi koji mogu uzrokovati bolesti kod ljudi, ali u vrlo rijetkim situacijama (Johansen i sur., 2011.). Također, u našem radu patogene smo definirali kao mikrobe koji uzrokuju bolesti kod vertebrata, tako su dvije bakterije u našem setu koje napadaju insekte (Waterfield i sur., 2004.) označene kao ne-patogeni, a to su upravo *Bacillus thuringiensis* i *Photorhabdus luminescens*. U oba slučaja, PaPS vrijednosti njihovih proteoma smjestile su ih među patogene (Slika 15A, 15B). Ovo sugerira kako su promjene u sastavu proteoma konzistentne među širim setom domaćina nego je obuhvaćeno našom definicijom. Nadalje, zanimljiva iznimka je *Listeria innocua*, ne-patogeni organizam koji posjeduje proteom nalik patogenima, te zbog toga klasterira zajedno s patogenim srodnikom, *Listeria monocytogenes* (označen na slici 15A, 15B). Naime, poznato je da je *L. innocua* nedavno proizašla iz *L. monocytogenes*, (~29 MYa) gubitkom nekolicine gena karakterističnih za patogene (Hain i sur., 2006; den Bakker i sur., 2010.). Međutim, izgleda da je još uvijek zadržala sastav proteoma karakterističan za patogene, ali je izgubila sposobnost uzrokovanja bolesti zbog nedostatka specifičnih gena potrebnih za uzrokovanje infekcije. Drugi ne-patogeni genom *Listeria*, *L. welshimeri*, prati ista evolucijska pozadina (Hain i sur., 2006; den Bakker i sur., 2010.) te također klasterira zajedno s *L. monocytogenes* zbog proteomske kompozicije (Slika 15). Ove tri vrste *Listeria* pokazuju kako kombinacija genomski kodiranih svojstava može biti nužna za objašnjenje fenotipa patogena, a sastav proteoma je jedno od tih svojstava.

## **Utjecaj proteinskih šaperona na replikativni životni vijek kod pupajućeg kvasca *Saccharomyces cerevisiae* putem kalorijske restrikcije**

Brojna istraživanja su pokazala da se karbonilacija proteina povećava sa starošću stanica, organela i tkiva različitih vrsta. Molekularni šaperoni su skupina proteina koji održavaju kvalitetu proteina u živim stanicama. U bakteriji *E. coli* pokazano je da povećana ekspresija šaperona dovodi do smanjenja karbonilacije proteina, te poboljšanja fitnessa stanice, što uključuje i smanjenu frekvenciju mutacija (Kriško i Radman, 2013.). Slične studije nisu provedene na eukariotskim stanicama koje bi mogle poslužiti kao modeli za istraživanje trajanja životnog vijeka. Pupajući kvasac, *Saccharomyces cerevisiae*, je priznat i najčešće korišten model za istraživanje starenja eukariotskih stanica. Osnovni uvjet za praćenje procesa starenja kod organizama je mogućnost raspoznavanja i praćenja individualnih jedinki tokom vremena.

Cilj nam je bio, također, istražiti postoji li poveznica između kvalitete proteina i staničnog fitnessa u eukariota, pupajućeg kvasca *S. cerevisiae*. Točnije, analizirati fenotip stanice kao posljedicu smanjenja udjela karboniliranih proteina pomoću šaperona određivanjem replikativnog starenja. Pretpostavka je bila da očuvanjem kvalitete native strukture proteina ili njenim poboljšanjem pomoću šaperona, možemo smanjiti udio karbonilacije proteina i samim time umanjiti sve negativne posljedice proteinske karbonilacije na fenotip stanice.

Dakle, daljnjim istraživanjem u ovom radu, predstavili smo novi signalni put koji po prvi puta povezuje stabilnost konformacije proteina i proteinske šaperone sa starenjem, putem promjena u osjetljivosti na glukozu. Fokusirali smo se na četiri familije šaperona koji unatoč različitoj lokalizaciji unutar stanice i različitim proteinskim klijentima, svi utječu na produženje replikativnog životnog vijeka kod pupajućeg kvasca, putem zajedničkog mehanizma koji po prvi puta otkriva poveznicu pravilnosti smatanja proteina i proteinskih šaperona sa staničnim metabolizmom.

Ova četiri šaperona djeluju u tri različita stanična odjeljka: u citosolu, mitohondrijima i endoplazmatskom retikulumu. Pokazali smo da povećana ekspresija različitih familija šaperona smanjuje broj pogrešno smotanih proteina, što dokazuje smanjena razina proteinske karbonilacije, smanjena ekspresija superoksid dismutaze (SOD) kao i HSP90. Kao posljedica toga, HSP90, šaperon esencijalan za vijabilnost stanice, je više dostupan nekim drugim svojim supstratima.

Unatoč tome što pomaže smatanju pogrešno smotanih proteina, Hsp90 je šaperon specijaliziran za specifičan set proteina uključujući brojne transkripcijske faktore i proteinske kinaze (Buchner, 1999). Među tim proteinima nalazi se kinaza Snf1 (Wong i Houry, 2006.), kvašćev homolog za AMP-aktiviranu kinazu kod sisavaca, jedna od glavnih kinaza uključenih u odgovor na razinu dostupne glukoze. U prisutnosti glukoze, kompleks Reg1/Glc7 protein fosfataza 1 defosforilira i inaktivira Snf1 (Sanz i sur., 2000.). Međutim, stanični rast u uvjetima smanjene koncentracije glukoze, fosforilacijom aktivira kinazu Snf1 (Hong i sur., 2003; Nath i sur., 2003.) što dovodi do transkripcijske aktivacije gena koji kodiraju za enzime uključene u glukoneogenezu, ciklus limunske kiseline (TCA ciklus), oksidaciju masnih kiselina i respiraciju, represiju glikolize.

U dugo-živućim mutantima kvasca proučavanih u ovom radu, unatoč dostupnosti 2% glukoze, fenotip i diferencijalna genska ekspresija su konzistentni s aktivacijom Snf1, što upućuje na uvjete kalorijske restrikcije. Obzirom na povećanu fosforilaciju Snf1, te povećanu razinu kompleksa Hsp90-Snf1 u dugo-živućim mutantima, smatramo da Hsp90 direktno aktivira kinazu Snf1. Aktivacija ove kinaze rezultira zaobilaznjem signalnog puta koji je odgovoran za okolnu razinu glukoze, signalizirajući lažni nedostatak glukoze (kalorijsku restrikciju). Za posljedicu dolazi do indukcije odgovora sličnog onome za kalorijsku restrikciju, uključujući represiju glikolize i citosolne translacije te aktivaciju oksidacije masnih kiselina i respiracije (Slika 30A). Oksidacija masnih kiselina služi kao alternativni izvor energije za mutante koji su „slijepi“ na glukozu. Takav odgovor dovodi do opadanja stanične razine ATP-a, a kao posljedica toga također izostaje aktivacija protein kinaze A (PKA) (Slika 30B). PKA signalni put postao je od velikog interesa u istraživanju starenja, pa mutacije koje uzrokuju redukciju (nestanak) PKA signaliziranja, utječu na povećanje životnog vijeka kod kvasca, odgađaju bolesti vezane za starenje te uzrokuju mršavost i dugovječnost kod miševa. Zbog toga je PKA signalni put idealna meta za inhibiciju u pokušaju spriječavanja starenja (Enns i Ladiges, 2010.).

Povećana respiracija u dugo-živućim mutantima je najvjerojatnije posljedica povećanog broja kompleksa oksidativne fosforilacije u unutarnjoj membrani mitohondrija, što je ustanovljeno kvantitativnim PCR-om i sekvenciranjem glasničke RNK. Zajedno sa smanjenim razinama RKV-a i ATP-a, ovaj fenotip predlaže „uncoupling“ na unutrašnjoj membrani mitohondrija, koji sudjeluje u produljenju životnog vijeka, utjecajem na metaboličku stopu i proizvodnju RKV-a kod različitih vrsta (Brand, 2000.). Takav fenotip je teže objasniti kod kvasca, s obzirom da proteini odgovorni za razdvajanje („uncoupling“) nisu

pronađeni u genomu kvasca. Međutim, moguće je da neravnoteža u ekspresiji komponenti elektronskog transportnog lanca dovodi do istjecanja protona ili elektrona, što rezultira razdvajanjem („uncoupling-om“) (Roussel i sur., 2002.).

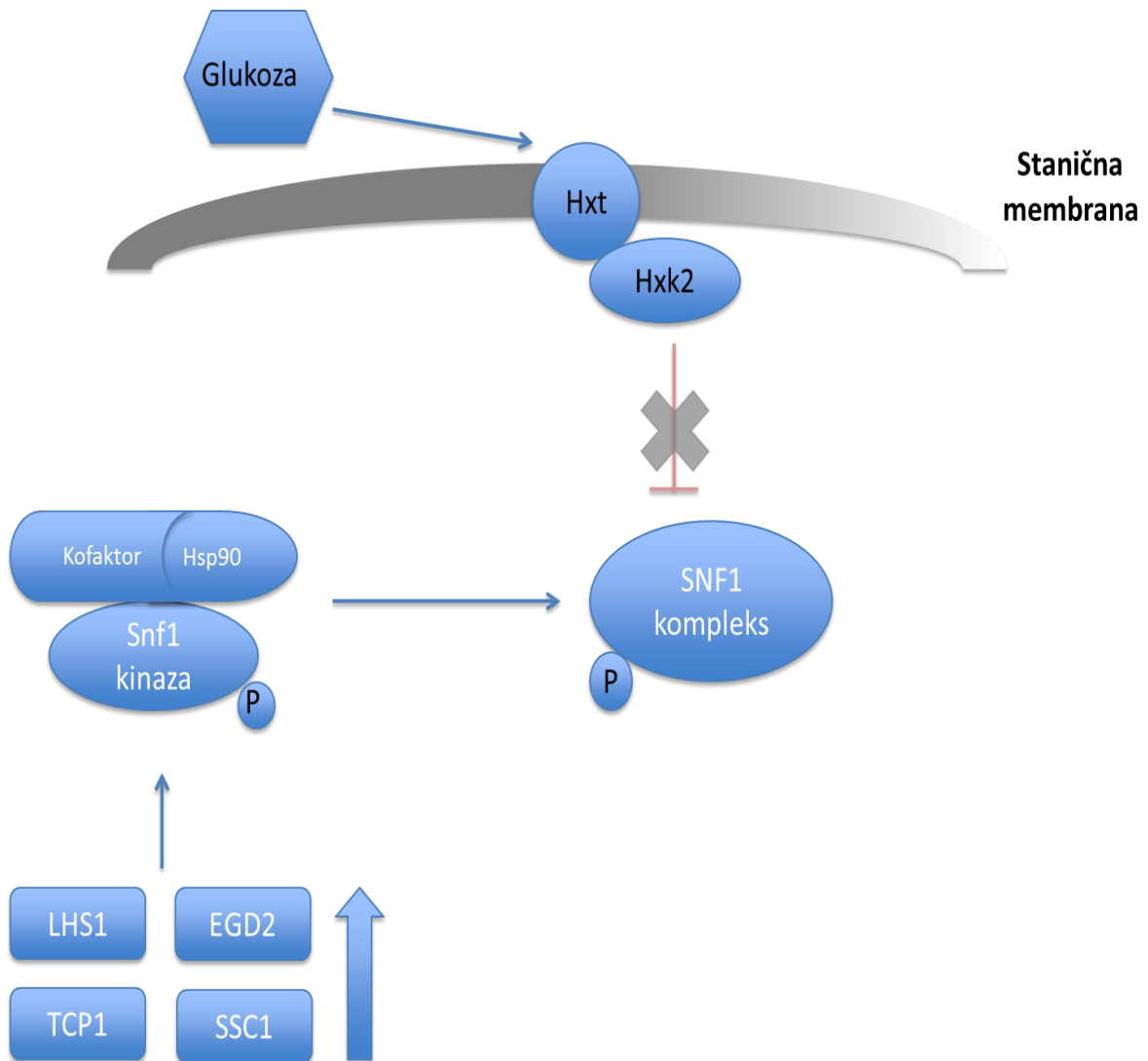
Nedavno je pronađeno da su V-ATP-aze (engl. vacuolat-type H<sup>+</sup> -ATPase) također aktivirane glukozom (Diakov i Kane, 2010.), a to je konzistentno sa smanjenom ekspresijom brojnih podjedinica tog proteina u našim dugo-živućim mutantima „slijepima“ na glukozu. Prilikom nedostatka glukoze, V-ATP-aza se razdvaja na V0 i V1 sektore, koji dovode do disocijacije V1 iz vakuolarne membrane, omogućavajući efikasan mehanizam za prestanak V-ATP-azne aktivnosti, kako bi se smanjila potrošnja energije tijekom gladovanja (Kane i Parra, 2000). Pokazano je da porast pH u citosolu, nakon dodavanja glukoze izgladnjelim stanicama, uzrokuje okupljanje V-ATP-aze te da ova aktivacija pozitivno regulira cAMP-ovisan PKA put kod kvasca (Dechant i sur., 2010.).

Naposljetku, za povećanje životnog vijeka kod sojeva kvasca s povećanom ekspresijom šaperona, odgovorna je kinaza Snf1. Do povećanja životnog vijeka dolazi uzrokovanjem fenotipa sličnog fenotipu kalorijske restrikcije koji dovodi do aktivacije oksidacije masnih kiselina, respiracije i mitohondrijskog razdvajanja.

Rezultati prezentirani u ovom radu po prvi puta pokazuju da šaperoni ne sudjeluju samo u proteinskoj homeostazi, već pokazuju njihov utjecaj na metaboličke i mitohondrijske aktivnosti stanice. Naime, postojana tema u studijama o starenju odnosi se na doprinos konzumirane energije te utroška iste na dugovječnost, s jedne strane, te proteinska homeostaza, s druge strane. Međutim, našim istraživanjem predložili smo da ova dva signalna puta ne djeluju samo odvojeno na starenje, već da su isprepleteni međusobno, putem povećane interakcije kinase Hsp90 i Snf1, rezultirajući njihovom aktivacijom bez obzira na optimalnu koncentraciju glukoze. Proteinski šaperoni mogu se sada uvrstiti među molekule koje su sposobne modulirati osjetljivost na glukozu, a time i energetske status stanice. U konačnici, očekujemo da će naša saznanja doprinjeti u području oponašanja kalorijske restrikcije otkrivanjem novih meta u glikolitičkoj inhibiciji, s direktnim implikacijama na starenje i bolesti vezanih za starenje.

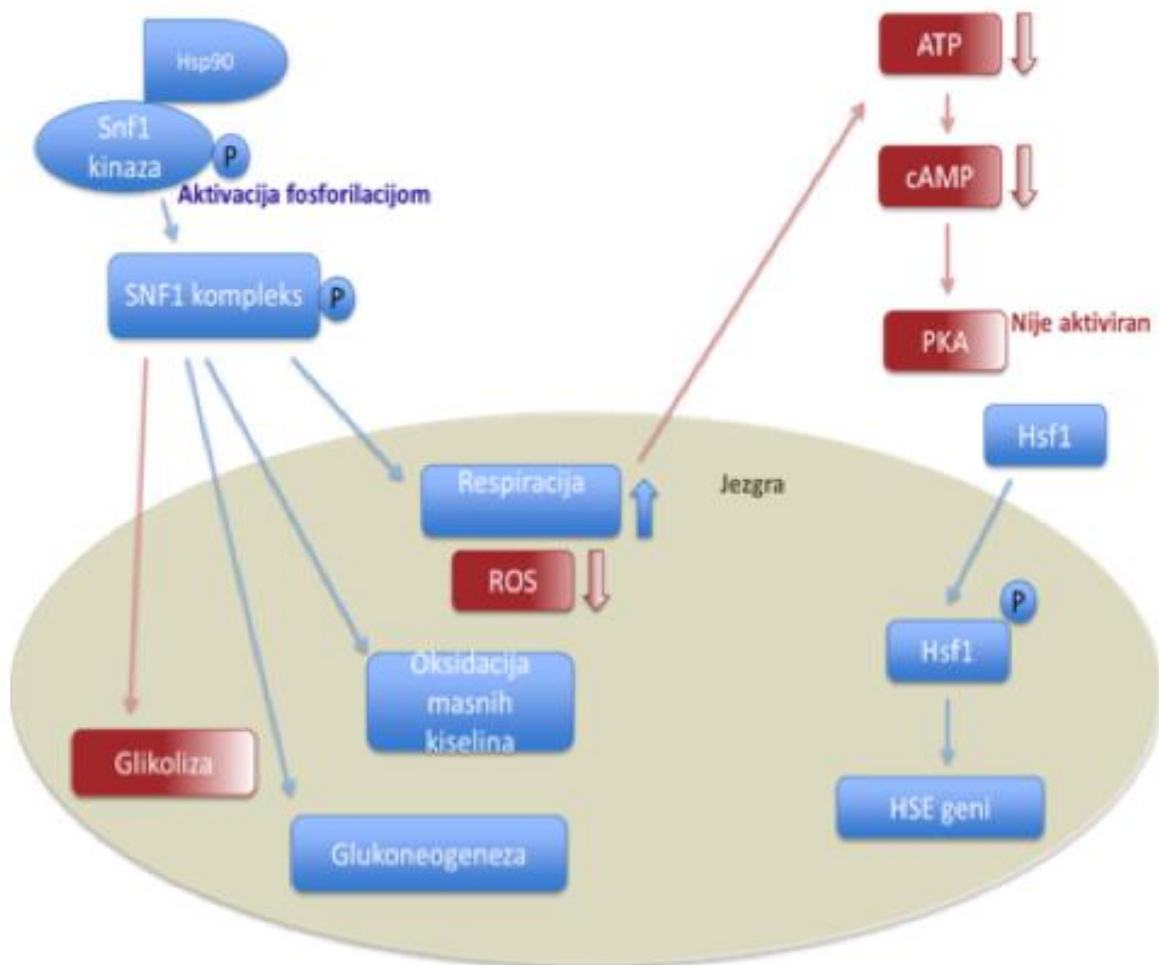


A



Slika 30. (opis na str. 101)

**B**



**Slika 30.** Shematski prikaz predloženog mehanizma produljenja replikativnog životnog vijeka putem povećane ekspresije proteinskih šaperona. (A) Kroz poboljšanu direktnu komunikaciju između Hsp90 i Snf1, koja rezultira povećanom fosforilacijom/aktivacijom Snf1, informacija o razini glukoze je zaobidena. (B) Aktivacija Snf1 kinaze rezultira represijom glikolize i ekspresije V-ATPaze, kao i aktivacijom glukoneogeneze, Krebsovog ciklusa, respiracije i oksidacije masnih kiselina. Razine ATP-a i cAMP-a su snižene, što rezultira inhibicijom signala PKA, aktivacijom Hsf1 i ekspresijom HSE gena. Plava boja označava aktivaciju ili povećanu regulaciju, dok crvena označava smanjenu ekspresiju, represiju ili izostanak aktivnosti.

## 6. ZAKLJUČCI

---

Istražena je priroda diferencijalne osjetljivosti proteina na oksidativne modifikacije, tj. mehanizam otpornosti proteina na oksidaciju u njihovoj nativnoj strukturi. Testirana je hipoteza koja nalaže kako stabilizacija strukture proteina dovodi do povećanja rezistencije proteina na oksidativni stres te da je povećana stabilnost strukture zapisana u fizikalno-kemijskim svojstvima koja se mogu 'iščitati' iz aminokiselinskih sekvenci.

Po prvi puta u literaturi, diskutirali smo vezu između genomskog sadržaja G+C/A+T, proteinske konformacijske stabilnosti i rezistencije na oksidaciju.

Mehanizam povećanja životnog vijeka prikazan u ovome radu, povezuje nekoliko signalnih puteva, koji su prethodno promatrani kao neovisni procesi, predstavljajući jedinstvo između nekoliko različitih bioloških procesa vezanih uz starenje te njihovu međusobnu ovisnost i suradnju.

Pokazano je kako povećana ekspresija četiri vrste šaperona smještenih u različitim staničnim odjeljcima - kompleks vezan za novosintetizirani polipeptid (engl. nascent polypeptide associated complex, NAC), citosolni T-kompleks, mitohondrijski HSP70 i HSP70 iz familije šaperona iz endoplazmatskog retikuluma – produljuje replikativni životni vijek u *S. cerevisiae*.

Sekvenciranjem glasničke RNK (engl. mRNA) pokazali smo smanjenu aktivnost glikolize i translacije, kao i aktivaciju glukoneogeneze i oksidacije masnih kiselina. Ovakav fenotip rezultat je povećane aktivacije kinaze Snf1 pomoću šaperona HSP90, što izaziva zaobilazanje signala razine glukoze u stanici te inducira odgovor sličan onom kalorijske restrikcije bez obzira na optimalnu razinu glukoze u okolini.

Zaključeno je da promjena razine ekspresije proteinskih šaperona ne utječe samo na replikativni životni vijek pupajućeg kvasca, već i na metabolička svojstva kao što su osjetljivost na glukozu, oksidacija masnih kiselina i razina respiracije. U kontekstu starenja, rezultati pokazuju kako uloga proteinskih šaperona nije samo pomaganje u smatanju pogrešno smotanih proteina, već ima i nizvodni učinak na metaboličke i mitohondrijske funkcije u stanici.

Na kraju, naša istraživanja trebala bi otvoriti mogućnost dizajna konformacijski stabilnijih proteina te proteina otpornijih na oksidativni stres, po uzoru na istraživane modele, s potencijalnom aplikacijom u biotehnologiji i sintetskoj biologiji. Također, rezultati istraživanja staničnih fenotipa vezanih za razinu pravilno smotanih proteina, karakteriziranih nižom karbonilacijom, prikazuju novu paradigmu za povećanje životnog vijeka, koja pruža jedinstvenu sistemsku platformu za buduća istraživanja, s direktnom implikacijom na starenje i patologiju vezanu za starenje.

## 7. LITERATURA

---

Anders S, Pyl PT, Huber W (2014) HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166-169.

Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc.)* 70, 200–214.

Ashrafi K, Lin SS, Manchester JK, Gordon JI (2000) Sip2p and its partner Snf1p kinase affect aging in *S. cerevisiae*. *Genes & Dev.* 14, 1872-1885.

Atchley WR, Zhao J, Fernandes AD, Druke T (2005) Solving the protein sequence metric problem. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102, 6395-6400.

den Bakker HC, Cummings CA, Ferreira V, Vatta P, Orsi R, Degoricija L, Barker M, Petrauskene O, Furtado MR, Wiedmann M (2010) Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics*. 11, 688.

Barbieri M, Bonafe M, Franceschi C, Paolisso G (2003) Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 285, E1064–E1071.

Barja G (2004) Free radicals and aging. *Trends Neurosci.* 27, 595-600.

Barros MH, Bandy B, Tahara EB, Kowaltowski AJ (2004) Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 49883-49888.

Barton AA (1950) Some aspects of cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. J.Gen. Microbiol. 4, 84–86.

Bastolla U, Porto M, Roman HE, Vendruscolo M (2005) Looking at structure, stability, and evolution of proteins through the principal eigenvector of contact matrices and hydrophobicity profiles. Gene 347:219-230.

Boles E, Hollenberg CP (1997) The molecular genetics of hexose transport in yeasts. FEMS Microbiol. Rev. 21, 85–111.

Borghouts C, Benguria A, Wawryn J, Jazwinski SM (2004) Rtg2 protein links metabolism and genome stability in yeast longevity. Genetics 166, 765–777. doi:10.1534/genetics.166.2.765.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: p. 248-54.

Brand MD (2000) Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. Exp. Gerontol. 35, 811–820.

Brand MD, Nicholls DG (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. Biochem. J. 435, 297-312.

Brandt U (2006) Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). Annu. Rev. Biochem. 75, 69 - 92.

Broach JR (2012) Nutritional control of growth and development in yeast. Genetics, 192, pp. 73–105.

Buchner J (1999) Hsp90 & Co. – a holding for folding. Trends Biochem. Sci. 24, 136–141.

Bukau B, Deuerling E, Pfund C, Craig EA (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101, 119–122.

Bukau B, Weissman J, Horwich A (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125, 443-451.

Busti S, Coccetti P, Alberghina L, Vanoni M (2010) Glucose Signaling-Mediated Coordination of Cell Growth and Cell Cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sensors* 10, 6195-6240.

Caballero A, Ugidos A, Liu B, Öling D, Kvint K, Hao X, Mignat C, Nachin L, Molin M, Nyström T (2011) *Mol. Cell* 42, pp. 390–400 this issue.

Cai Z, Yan LJ (2013) Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *J. Biochem. Pharmacol. Res.*1, 15-26.

Carlson M (1999) Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 202–207.

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* 278, 36027–36031.

Chen XP, Zhonga Z, Xua Z, Chen\*b L & Wang\*a Y et al. (2010) 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free. Radical. Research.* 44(6): p. 587-604.

Crabtree HG (1929) Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.* 23, 536-545.

Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends. Mol. Med.* 9, 169–176.

- Dalton TP, Shertzer HG, Puga A (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 67–101.
- Dechant R, Binda M, Lee SS, Pelet S, Winderickx J, Peter M (2010) Cytosolic pH is a second messenger for glucose and regulates the PKA pathway through V-ATPase. *EMBO J.* 29, 2515-2526.
- Diakov TT, Kane PM (2010) Regulation of Vacuolar Proton translocating ATPase Activity and Assembly by Extracellular pH. *J. Biol. Chem.* 285, 23771-23778.
- Diaz-Ruiz R, Uribe-Carvajal S, Devin A, Rigoulet M (2009) Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1796 (2009), pp. 252–265.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15-21.
- D'Onofrio G, Jabbari K, Musto H, Bernardi G (1999) The correlation of protein hydrophathy with the base composition of coding sequences. *Gene* 238, 3–14.
- Doonan R, McElwee JJ, Matthijssens F, Walker GA, Houthoofd K, Back P, Matscheski A, Vanfleteren JR, Gems (2008) Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*, *Genes Dev.* 22, 3236–3241.
- Drose S, Brandt U (2008) The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.* 283, 21649–21654.
- Dukan S, Farewell A, Ballesteros M, Taddei F, Radman M and Nystrom T (2000) Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5746-5749.
- Enns LC, Ladiges W (2010) Protein kinase A signaling as an anti-aging target. *Age. Res. Rev.* 9, 269-272.



Fabrizio P, Pozza F, Pletcher SD, Gendron CM, Longo VD (2001) Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* 292, 288-290.

Fontana L, Partridge L, Longo VD (2010) Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science* 328, 321–326.

Forman HJ, Maiorino M, Ursini F (2010) Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 49, 835–842.

Fredriksson A, Ballesteros M, Dukan S, Nyström T (2005) Defense against protein carbonylation by DnaK/DnaJ and proteases of the heat shock regulon. *J. Bacteriol.* 187, 4207-4213.

Gama JA, Abby SS, Vieira-Silva S, Dionisio F, Rocha EP (2012) Immune subversion and quorum-sensing shape the variation in infectious dose among bacterial pathogens. *PLoS Pathog.* 8, e1002503.

Gancedo JM (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 334–361.

Gancedo JM (2008) The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, pp. 673–704.

Gems D, Doonan R (2009) Antioxidant defense and aging in *C. elegans*: is the oxidative damage theory of aging wrong? *Cell Cycle* 8, 1681–1687.

Georgea R, Walshb P, Beddoeb T, Lithgowb T (2002) The nascent polypeptide-associated complex (NAC) promotes interaction of ribosomes with the mitochondrial surface in vivo. *FEBS Letters* Volume 516, Issues 1–3, 10, 213–216.

Gibson BR, Boulton CA, Box WG, Graham NS, Lawrence SJ, Linforth RS, Smart KA (2008) Carbohydrate utilization and the lager yeast transcriptome during brewery fermentation *Yeast*, 25, pp. 549–562.

Guarente L, Kenyon C (2000) Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* 408, 255-262.

Guerrero-Castillo S, Araiza-Olivera D, Cabrera-Orefice A, Espinasa-Jaramillo J, Gutiérrez-Aguilar M, Luévano-Martínez LA, Zepeda-Bastida A, Uribe-Carvaja S (2011) Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Journal of Bioenergetics* 43(3), 323-31. *Studies in different yeast species Bioenerg. Biomembr.*

Hain T, Steinweg C, Kuenne CT, Billion A, Gha R, Chatterjee SS, Domann E, Karst U, Goesmann A, Bekel T, Bartels D, Kaiser O, Meyer F, Puhler A, Weisshaar B, Wehland J, Liang C, Dandekar T, Lampidis R, Kreft J, Goebel W, Chakraborty T (2006) Whole genome sequence of *Listeria welshimeri* reveals common steps in genome reduction with *Listeria innocua* as compared to *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 188, 7405-7415.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free Radical Biology and Medicine*. 4 izdanje. Oxford Univ. Press, London.

Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298-300.

Harman D (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr.Soc.* 20(4), 145-7.

Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852–1858.

Hayflick L, Moorhead P (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 285–621.

Hedbacker K1, Carlson M (2008) SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci.* 1;13, 2408-20.

Heilbronn LK, Ravussin E (2003) Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 361–9.

Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesomepele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, R19.

Herskowitz I (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52(4): p. 536-53.

Hill RB, DeGrado WF (2000) A polar, solvent-exposed residue can be essential for native protein structure. *Structure* 8, 471-479.

Holehan AM, Merry BJ (1986) The experimental manipulation of aging by diet. *Biol. Rev.* 61, 329–368.

Hong SP, Leiper FC, Woods A, Carling D, Carlson M (2003) Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8839–8843.

Hosler JP, Ferguson-Miller S, Mills DA (2006) Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 165–187.

Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho B, Corrada Bravo H, Davis S, Gatto L, Girke T, et al. (2015) *Nature Methods* 12, 115-121.

Hwang AB, Jeong D-E, Lee S-J (2012) Mitochondria and Organismal Longevity. *Current Genomics* 13, 519-532.

Imlay JA (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395–418.

Jackson SE (2013) Hsp90: structure and function. *Top. Curr. Chem.* 328, 155-240.

Jang YC, Remmen VH (2009) The mitochondrial theory of aging: insight from transgenic and knockout mouse models. *Exp. Gerontol.* 44, 256–260.

Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, R. Treberg J, Brand MD (2010) Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays in Biochemistry* 47(1), 53-67.

Jazwinski SM, Egilmez NK, Chen JB (1989) Replication control and cellular life span. *Exp. Gerontol.* 24, 423– 436.

Jazwinski SM, Kim S, Lai C-Y, Benguria A (1998) Epigenetic stratification: The role of individual change in the biological aging process. *Exp. Gerontol.* 33, 571–580.

Jazwinski SM (1999a) The RAS genes: a homeostatic device in *Saccharomyces cerevisiae* longevity. *Neurobiol. Aging* 20 pp. 471–478.

Jensen LJ, Julien P, Kuhn M, von Mering C, Muller J (2008) eggNOG: automated construction and annotation of orthologous groups of genes. *Nucleic Acids Res.* 36, 250-254.

Jezek P, Hlavata L (2005) Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 2478–2503.

Jiang JC, Jaruga E, V. Repnevskaya M, Jazwinski SM (2000) An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in y east. *The FASEB Journal express article* 10.1096/fj.00-0242fje.

Johansen H K, Kjeldsen K, Hoiby N (2011) *Pseudomonas mendocina* as a cause of chronic infective endocarditis in a patient with situs inversus. *Clin. Microbiol. Inf.* 7, 650-652.

Johnston JR (1966) Reproductive capacity and mode of death of yeast cells. *Antonie van Leeuwenhoek* 32, 94–98.

Johnston M (1999) Feasting, fasting and fermenting – glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet.*15, 29–33.

Johnston M, Kim JH (2005) Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Biochem. Soc. Trans.* 33, pp. 247–252.

Kaeberlein M, Powers RW, Steffen KK, Westman EA, Hu D, Dang N, Kerr EO, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK (2005) Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* 310, 1193–1196.

Kane PM, Parra KJ (2000) Assembly and regulation of the yeast vacuolar H(+)-ATPase. *J. Exp. Biol.* 203, 81–87.

Kaniak A, Xue Z, Macool D, Kim JH, Johnston M (2004) Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 3, pp. 221–231.

Kawashima S, Kanehisa M (2000) AAindex: amino acid index database. *Nucleic Acids Res.* 28, 374.

Kennedy BK, Austriaco NR, Guarente L (1994) Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *J. Cell Biol.* 127, 1985–93.

Kennedy BK, Austriaco NR, Zhang J, Guarente L (1995) Mutation of the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae*. *Cell* 80, 485–96.

Kirchman PA, Kim S, Lai CY, Jazwinski SM (1999) Interorganelle signaling is a determinant of longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 152, 179–190.

Kogan GL, Gvozdev VA (2014) Multifunctional nascent polypeptide-associated complex (NAC). *Molecular biology* Volume 48, Issue 2, pp 189-196.

Kohanski M.A, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130, 797-810.

Krampe S, Stamm O, Hollenberg CP, Boles E (1998) Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *M FEBS Lett.*, 441, pp. 343–347.

Kriško A, Radman M (2010) Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. *Prot. Natl. Acad. Sci.*

Krisiko A, Radman M (2013) Phenotypic and Genetic Consequences of Protein Damage. *PLoS Genet.* 9, e1003810.

Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation–reduction state, *Biochem. J.* 368, 545–553.

Lagunas R (1979) Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars. *Mol. Cell. Biochem.* 27, pp. 139–146.

Le Pape S (2015) EasyqpcR: low-throughput real-time quantitative PCR data analysis. Available from:

[http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/EasyqpcR/inst/doc/vignette\\_EasyqpcR.pdf](http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/EasyqpcR/inst/doc/vignette_EasyqpcR.pdf)

Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM (1996) Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 9782–9787.

Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 11, 376–381.

Liang H, Gaber RF (1996) A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of HXT6. *Mol. Biol. Cell* 7, pp. 1953–1966.

Lin K, Kuang Y, Joseph JS, Kolatkar PR (2002) Conserved codon composition of ribosomal protein coding genes in *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Saccharomyces cerevisiae*: lessons from supervised machine learning in functional genomics. *Nucleic Acids Res* 30, 2599-2607.

Lin SJ, Defossez PA, Guarente L (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126-2128.

Lin SJ, Kaeberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, Culotta VC, Fink GR, Guarente L (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418, 344–348.

Longo VD, Shadel GS, Kaeberlein M, Kennedy B (2012) Replicative and Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab.*16(1), 18–31.

Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.

Ma YS, Wu SB, Lee WY, Cheng JS, Wei YH (2009) Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1021–1029.

Maisonneuve E, Ducret A, Khoueiry P, Lignon S, Longhi S, Talla E, Dukan S (2009) Rules governing selective protein carbonylation. *PLoS ONE* 4, e7269.

Masoro EJ (2002) *Caloric Restriction: a Key to Understanding and Modulating Aging*. Amsterdam: Elsevier.

Masoro EJ (2005) Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.*126:913–922.

Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol. Life. Sci.* 2005 Mar, 62(6): 670–684.

Mendez R, Fritsche M, Porto M, Bastolla U (2010) Mutation Bias Favors Protein Folding Stability in the Evolution of Small Populations. *PLoS Comput. Biol.* 6:e1000767.

Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144–148.

Mortimer RK, Johnston JR (1959) Life span of individual yeast cells. *Nature* 183, 1742–51.

Moura A, Savageau MA, Alves R (2013) Relative amino acid composition signatures of organisms and environments. *PLoS ONE* 8, e77319.

Muller I (1971) Experiments on ageing in single cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Mikrobiol.* 77, 20–25.

Muller (1985) Parental age and the life-span of zygotes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek* 51, 1–10.

Muller I, Zimmerman M, Becker D, Flomer M (1980) Calendar life span versus budding life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mech. Ageing Dev.* 12, 47–52.

Muller FL, Liu Y, Van Remmen H (2004) Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 279, 49064–49073.

Nath N, McCartney RR, Schmidt MC (2003) Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3909–3917.

Neupert W, Brunner M (2002) The protein import motor of mitochondria. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 555–565.

Nicholls DG, Ferguson SJ (2002) *Bioenergetics 3*. Academic Press, London, ISBN 0125181213.



Nobes CD, Brown GC, Olive PN, Brand MD (1990) Non-ohmic proton conductance of the mitochondrial inner membrane in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 265, 12903–12909.

Nystrom T (2007) A bacterial kind of aging. *PLoS Genet.* 3:e224.

Nystrom T (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* 24, 1311-1317.

Oliver NC, Ahn B, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER (1986) Age-related Changes in Oxidized Proteins. *J. Biol. Chem.* 12, 5488-5491.

Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER (1987) Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* 262, 5488–5491.

Ozcan S, Johnston M (1999) Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, pp. 554–569.

Ozcan S (2002) Two different signals regulate repression and induction of gene expression by glucose. *J. Biol. Chem.* 277, pp. 46993–46997.

Ozcan S, Johnston M (1995) Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* 15, pp. 1564–1572.

Parkes TL, Elia AJ, Dickinson D, Hilliker AJ, Phillips JP, Boulianne GL (1998) Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons. *Nat. Genet.* 19, 171–174.

Partridge L, Piper MD, Mair W (2005) Dietary restriction in *Drosophila* Mech. Ageing Dev. 126:938–950.

Perez-Ortin JE, Garcia-Martinez J, Alberola TM (2002) DNA chips for yeast biotechnology. The case of wine yeasts. *J. Biotechnol.* 98 (2-3), p. 227-41.

Perrone GG, Tan SX, Dawes IW (2008) Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 1354–1368.

Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA (2011) Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* 50, 98.

Petit P, Glab N, Marie D, Kieffer H, Métézeau P (1996) Discrimination of respiratory dysfunction in yeast mutants by confocal microscopy, image, and flow cytometry. *Cytometry* 23, 28-38.

von Plehwe U, Berndt U, Conz C, Chiabudini M, Fitzke E, Sickmann A, Petersen A, Pfeifer D, Rospert S (2009) The Hsp70 homolog Ssb is essential for glucose sensing via the SNF1 kinase network. *Genes Dev.* 23(17), 2102–2115.

Pohley, H-J (1987) A formal mortality analysis for populations of unicellular organisms (*Saccharomyces cerevisiae*). *Mech. Ageing Dev.* 38, 231–243.

Pratt WB, Toft DO (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 228, 111–133.

Raffaello A, Rizzuto R (2001) Mitochondrial longevity pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 260-268.

Raimundo N (2014) Mitochondrial pathology: stress signals from the energy factory. *Trends Mol. Med.* 20, 282-292.

Ranea JA, Grant A, Thornton JM, Orengo CA (2005) Microeconomic principles explain an optimal genome size in bacteria. *Trends Genet.* 21, 21-25.

Rao RS, Møller IM (2011) Pattern of occurrence and occupancy of carbonylation sites in proteins. *Proteomics* 11, 4166–4173.

R Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria ISBN 3-900051-07-0.

Reifenberger E, Boles E, Ciriacy M (1997) Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* 245, pp. 324–333.

Reifenberger E, Freidel K, Ciriacy M (1995) Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol. Microbiol.* 16, pp. 157–167.

Requena N, Breuninger M, Franken P, Ocon A (2003) Symbiotic status, phosphate, and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiol.* 132, 1540–1549.

Rocha EPC, Feil EJ (2010) Mutational patterns cannot explain genome composition: Are there any neutral sites in the genomes of bacteria? *PLoS Genet.* 6, e1001104.

Rodriguez ME, Azizuddin K, Zhang P, Chiu SM, Lam M, Kenney ME, Burda C, Oleinick NL (2008) Targeting of Mitochondria by 10-N-Alkyl Acridine Orange Analogues: Role of Alkyl Chain Length in Determining Cellular Uptake and Localization. *Mitochondrion* 8, 237.

Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM (2001) Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.26 No.5.

Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM (2002) Glucose-sensing and signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research* 2, 183-201. MiniReview.

Rosenberger CM, Finlay BB (2003) Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 385–396.

Roussel D, Harding M, Runswick MJ, Walker JE, Brand MD (2002) Does any yeast mitochondrial carrier have a native uncoupling protein function? *J. Bioenerg. Biomembr.* 34, 165-176.

Rosenbloom KR, Armstrong J, Barber GP, Casper J, Clawson H, Diekhans M, Dreszer TR, Fujita PA, Guruvadoo L, Haeussler M, et al. (2015) The UCSC Genome Browser database: 2015 update. *Nucleic Acids Res.* 43, D670-D681.

Ryan MT, Pfanner N (2002) Hsp70 proteins in protein translocation. *Adv. Protein Chem.* 59, 223–242.

Santangelo GM (2006) Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, pp. 253–282.

Sanz P, Alms GR, Haystead TAJ, Carlson M (2000) Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1321–1328.

Sies, H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 2, 291-295.

Silar P, Koll F, Rossignol M (1997) Cy-tosolic ribosomal mutations that abolish accumulation of circular intron in the mitochondria without preventing senescence of *Podospora anserina*. *Genetics* 145, 697–705.

Sinclair D, Mills K, Guarente L (1998) Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 533–60.

Smole Z, Nikolic N, Supek F, Smuc T, Sbalzarini IF, Krisko A (2011) Proteome sequence features carry signatures of the environmental niche of prokaryotes. *BMC Evol. Biol.* 11, 26.

Sohal RS, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and ageing. *Science* 273, 59–63.

Steffen KK, Kennedy BK, Kaeberlein M (2009) Measuring Replicative Life Span in the Budding Yeast. *JoVE* 28 10.3791/1209.

Sun J, Folk D, Bradley TJ, Tower J (2002) Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 161, 661–672.

Supek F, Skunca N, Repar J, Vlahovicek K, Smuc T (2010) Translational selection is ubiquitous in prokaryotes. *PLoS Genet* 6, e1001004.

Taguchi A, Wartschow LM, White MF (2007) Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science* 317, 369–372.

Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, Koonin EV, Krylov DM, Mazumder R, Mekhedov SL, Nikolskaya AN et al. (2003) The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 4, 41.

Tekaia F, Yeramian E (2006) Evolution of proteomes: fundamental signatures and global trends in amino acid compositions. *BMC Genomics* 7, 307.

Thevelein JM, de Winde JH (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP–protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 32, 1002–1012.

Toft DO (1999) Control of hormone receptor function by molecular chaperones and folding catalysts. In: *Molecular Chaperones and Folding Catalysts. Regulation, Cellular Function and Mechanism*, pp. 313–327.

Trumpower BL (1990) Cytochrome bc<sub>1</sub> complexes of microorganisms. *Microbiol. Rev.* 54, 101–129.

Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335-344.

Uversky VN (2013) Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 932-951.

Vieira-Silva S, Rocha EP (2008) An assessment of the impacts of molecular oxygen on the evolution of proteomes. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1931–1942.

Wakamatsu et al (2008) Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. *Arq. Bras. Oftalmol.* 71, 72-79.

Wallace DC (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39, 359-407.

Waterfield NR, Wren BW, Ffrench-Constant RH (2004) Invertebrates as a source of emerging human pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 833-841.

Weindruch R, Walford RL (1988) *The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction*. Springfield, IL: Thomas.

Wong KSK, Houry WA (2006) Hsp90 at the crossroads of genetics and epigenetics. *Cell Res.* 16, 742-749.

Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M, Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP, Kuro-o M (2005) Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J. Biol. Chem.* 280, 38029–38034.

Young JC, Barral JM, Ulrich Hartl F (2003) More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends. Biochem. Sci.* 28, 541–547.

Yu BP (1996) Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 651–668.

Zaman S, Lippman SI, Zhao X, Broach JR (2008) How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu. Rev. Genet.* 42, 27–81.

Zeldovich KB, Berezovsky IN, Shakhnovich EI (2007) Protein and DNA sequence determinants of thermophilic adaptation. *PLoS Comput. Biol.* 3, e5.

Zhu H, et al. (2001) Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 293 (5537), p. 2101-5.

## 8. ŽIVOTOPIS

Prezime: Lovrić (rođ. Vidović)

Ime: Anita

Datum rođenja: 04.05.1986.

Mjesto rođenja: Split, Hrvatska

### **Adresa i kontakt:**

Put Žnjana 12C, 21311 Split, Hrvatska

E-mail: [avidovic007@gmail.com](mailto:avidovic007@gmail.com)

[anita.vidovic@medils.hr](mailto:anita.vidovic@medils.hr)

Kontakt broj: +385915316704

### **Obrazovanje:**

2000 - 2004 II. Jezična gimnazija u Splitu

2004 - 2009 Sveučilište u Splitu, odjel za studije mora; Biologija i ekologija mora na oceanografskom institutu u Splitu

2010 diplomirala na institutu za oceanografiju i ribarstvo u Splitu.

Diplomski rad izrađen pod vodstvom dr. Danijele Bogner, u laboratoriju za sedimente i sedimentologiju mora na institutu za oceanografiju i ribarstvo u Splitu.

Diplomski rad pod nazivom: 'Sedimentologija u području otoka Paga i Raba'

2010 doktorski student Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, biološki odsjek.

### **Radno iskustvo:**

2010 Doktorski student, rad na projektima 'Biologija robusnosti' i 'Molekularne osnove starenja' pod vodstvom dr. sc. Anite Kriško i mentorstvom prof. emeritus Miroslava Radmana na Mediteranskom institutu za istraživanje života (MedILS), Split, Hrvatska

2012 16.01 - 06.02 Sudjelovanje na projektu 'Protein quality governed by ribosome associated chaperones and replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*' pod vodstvom dr. sc. Ive Tolić na Max Planck Institutu u Dresdenu, Njemačka



2012 Usavršavanje rada na metodama za 2D elektroforezu u laboratoriju za sistemsku medicinu, pod nadzorom dr. sc. Maria Cindrića.

2012 - 2015 rad na projektu 'Macromolecular homeostasis in aging' pod vodstvom dr. sc. Anite Kriško, MedILS, Split

### **Internacionalni simpoziji i radionice:**

Sudjelovanje na COST konferenciji BM 0903 'Skin Barrier in Atopic Disease' 10 - 12. rujna 2012.

Poster prezentacija na 15-tom EMBL doktorskom simpoziju: Competition in Biology: The race for survival from molecules to systems; Heidelberg, Njemačka, 21 - 23. studenog 2013.

Sudjelovanje na 'First Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies' ; MedILS, Split, Hrvatska; 24 - 29. kolovoza 2014.

Sudjelovanje na OMICs in Biomedical Research; MedILS, Split, Hrvatska; 8-12. lipnja 2015.

### **Publikacije:**

A Vidovic, F Supek, A Nikolic, A Kriško 'Signatures of Conformational Stability and Oxidation Resistance in Proteomes of Pathogenic Bacteria'. Cell Reports 2014; 7: 1393-1400