

# Uloga šaperona Hsp42 u metabolizmu kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

---

Kurtović, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

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:217:376368>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



Repository / Repozitorij:

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



Matea Kurtović

Uloga šaperona Hsp42 u metabolizmu kvasca  
*Saccharomyces cerevisiae*

Diplomski rad

Zagreb

2016.

Matea Kurtović

Uloga šaperona Hsp42 u metabolizmu kvasca  
*Saccharomyces cerevisiae*

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog stupnja  
magistrice struke (kemije)

Zagreb

2016.

*Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu osnovu starenja na Mediteranskom institutu za istraživanje života u Splitu pod neposrednim vodstvom dr. sc. Anite Kriško i mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ite Gruić Sovulj, Zavod za biokemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.*

## Zahvale

*Veliko hvala ...*

*Mentorici Iti Gruić Sovulj na velikoj pomoći, savjetima, uloženom vremenu i strpljenu tijekom pisanja ovog rada.*

*Mojim roditeljima bez čije podrške moje obrazovanje i studiranje ne bi bilo moguće. Posebno hvala mami na velikom trudu kojeg je uložila u razvoj mene kao osobe.*

*Svim ostalim članovima obitelji koji su vjerovali u mene i veselili se mojim uspjesima, pogotovo baki Mariji koja mi je životni uzor zbog svog optimizma i jer me cijeli život podučava da su trud i želja za radom najvažnije vrline.*

*Prijateljima Barbari, Miji, Tomislavu, Tamari, Lei, Mileni, Petri i ostalima koji su mi tijekom provedbe eksperimentalnog dijela rada pružali podršku, utjehu i nudili rješenja za praktične probleme, a ponekad i samo saslušali.*

*Neposrednoj voditeljici Aniti Kriško na pomoći pri izradi ovog rada.*

*Svim članovima Laboratorija za molekularnu osnovu starenja na MedILS-u, pogotovo Matei, Marini i Tei na strpljenju, pomoći i brojnim savjetima, što znanstvenim što životnim, ali najviše na ugodnoj radnoj atmosferi.*

*Ovaj diplomski rad posvećujem svom djedu Branku, kojeg bi jako veselila moja postignuća da ih može vidjeti.*

# Sadržaj

<b>1. Uvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturni pregled .....</b>	<b>2</b>
2.1 Biosinteza proteina i njihovo smatanje.....	2
2.2 Poremećaj proteostaze i uobičajeni stanični odgovori na stres .....	6
2.3 Odabrani molekularni šaperoni .....	8
2.4 Nova uloga šaperona: metabolizam i zaštita od proteotoksičnog stresa .....	13
2.5 Kinaza Snf1: uloga i aktivacija.....	16
2.6 Enzim glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza.....	18
2.7 Veza između proteostaze i starenja .....	19
2.8 Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - modelni organizam u starenju .....	20
<b>3. Materijali i metode.....</b>	<b>21</b>
3.1 Materijali i reagensi .....	21
3.2. Metode rada s DNA .....	24
3.2.1 Izolacija genomske DNA .....	24
3.2.2 Lančana reakcija polimeraze, PCR.....	24
3.2.3 Elektroforeza na agaroznom gelu.....	28
3.2.4 Proizvodnja ljepljivih krajeva pomoću restrikcijskih enzima.....	28
3.2.5 Pročišćavanje razgrađenih PCR-produkata .....	29
3.2.6 Ligacija pomoću T4 DNA-ligaze .....	29
3.3. Metode rada sa stanicama kvasca .....	30
3.3.1 Transformacija stanica kvasca .....	30
3.3.2 Mjerenje kronološkog životnog vijeka .....	31
3.3.3 Mjerenje frekvencije mutacija .....	31
3.4. Metode rada s proteinima .....	32
3.4.1 Ekstrakcija proteina metodom sa zimoelijazom.....	32
3.4.2 Određivanje koncentracije proteina metodom prema Bradfordu .....	33
3.4.3 Mjerenje stupnja karbonilacije proteina tehnikom ELISA.....	33
3.4.4 Mjerenje staničnog ATP .....	35
3.4.5 Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu uz prisutnost SDS-a (SDS-PAGE).....	36
3.4.6 Western blot analiza .....	37

3.5.	Statistička analiza .....	39
3.5.1	<i>Studentov T-test</i> .....	39
<b>4.</b>	<b>Rezultati</b> .....	<b>40</b>
4.1	Mutanti $\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1 i $\Delta$ hsp42 $\Delta$ zwf1 .....	41
4.2	Kronološki životni vijek .....	43
4.3	Karbonilacija proteina .....	46
4.4	Reaktivne kisikove vrste .....	48
4.5	Razina staničnog ATP-a .....	50
4.6	Frekvencija mutacija .....	52
4.7	<i>Western blot</i> detekcija razine fosforilacije kinaze Snf1 .....	53
<b>5.</b>	<b>Rasprava</b> .....	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>Zaključak</b> .....	<b>62</b>
<b>7.</b>	<b>Popis korištenih kratica</b> .....	<b>63</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturna vrela</b> .....	<b>65</b>
<b>9.</b>	<b>Prilozi</b> .....	<b>67</b>
9.1	Dodatak .....	67
9.2	Životopis .....	69

# Sažetak

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Kemijski odsjek

Diplomski rad

## Uloga šaperona Hsp42 u metabolizmu kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

*Matea Kurtović*

Zavod za biokemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu  
Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Stanica aktivno održava uravnotežen odnos između sinteze proteina, održavanja njihove konformacije i degradacije oštećenih proteina. Molekularni šaperoni su proteini čija je važna uloga održavanje homeostaze proteina (proteostaze). U ovom radu konstruirana su dva nova kvašćeva soja,  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1 i  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ zwf1. U oba soja deletiran je gen za šaperon Hsp42 te su deletirani ciljani geni koji kodiraju proteine metabolizma glukoze; kinaza Snf1 i glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza (zwf1). Za dobivene sojeve mjerena je količina staničnog ATP-a, stupanj karbonilacije proteina, razina reaktivnih kisikovih vrsta, frekvencija mutacija i kronološki životni vijek. Rezultati pokazuju da umjereni stres poput delecije jednog šaperona produžuje kronološki životni vijek i inducira toleranciju na stres, dok je u soju  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1 kronološki životni vijek skraćen. Iako su novokonstruirani mutanti izloženi proteotoksičnom stresu takav oblik stresa nije u korelaciji s proizvodnjom ATP-a u sojevima  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ zwf1 i  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1. Pokazano je i da je u novokonstruiranim sojevima značajno povećana frekvencija mutacija.

(69 + VIII stranica, 22 slike, 10 tablica, 36 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a, 10000 Zagreb, Hrvatska.

Ključne riječi: proteostaza, šaperoni, Hsp42, metabolizam kvasca, životni vijek, oksidativni stres, kinaza Snf1, reaktivne kisikove vrste, ATP

Mentor: dr. sc. Ita Gruić Sovulj, izv. prof.

Ocjenjivači: dr. sc. Ita Gruić Sovulj, izv. prof.  
dr. sc. Iva Juranović Cindrić, izv. prof.  
dr. sc. Ivica Đilović, doc.

Rad je prihvaćen: listopad 2016.



# Abstract

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Chemistry

Master's thesis

## **The role of molecular chaperone Hsp42 in metabolism regulation of *Saccharomyces cerevisiae***

*Matea Kurtović*

Division for Biochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb  
Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia

The cell actively maintains a balanced relation between protein synthesis, preservation of their stability and conformation, and degradation of damaged proteins. Molecular chaperons are proteins with the important role of maintaining protein homeostasis (proteostasis). In this thesis two yeast strains were newly constructed,  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1 and  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ zwf1. In both strains a gene for molecular chaperone Hsp42 was deleted, along with the target genes which encode for proteins that participate in glucose metabolism; Snf1 kinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase (zwf1). Measurements of the ATP levels, protein carbonylation levels, ROS levels, frequency of mutation and chronological lifespan were performed. The results demonstrate that a mild stress like the chaperone deletion extends the chronological lifespan and induces stress tolerability, while the chronological lifespan is shortened in the strain  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1. Although newly constructed mutants are exposed to proteotoxic stress it seems that this form of stress is not correlated with the ATP production in strains the  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ zwf1 and  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1. It is also shown that frequency of mutation in the above mentioned strains is highly increased.

(69 + VIII pages, 22 figures, 10 tables, 36 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia

Key words: proteostasis, molecular chaperones, Hsp42, yeast metabolism, lifespan, oxidative stress, Snf1 kinase, reactive oxygen species, ATP

Supervisor: dr. sc. Ita Gruić Sovulj, Associate Professor

Reviewers: dr. sc. Ita Gruić Sovulj, Associate Professor  
dr. sc. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor  
dr. sc. Ivica Đilović, Assistant Professor

Thesis accepted: October, 2016

# 1. Uvod

Proteostaza podrazumijeva uravnotežen odnos između sinteze proteina, održavanja njihove konformacije te degradacije oštećenih proteina. Molekularni šaperoni jedni su od glavnih regulatora proteostaze. Kada dođe do poremećaja proteostaze i proteini više ne mogu održavati svoju nativnu strukturu i obavljati funkciju, mora doći do njihovog ponovnog smatanja ili uklanjanja takvih oštećenih proteina kroz agregaciju i degradaciju. Neuspješno uklanjanje oštećenih ili nepravilno smotanih proteina može rezultirati inaktivacijom funkcionalnih proteina, ali i smrću stanice.

Do sada je odnos između proteostaze i drugih staničnih puteva slabo istražen i uloga molekularnih šaperona u regulaciji metaboličkih puteva nije poznata. No u najnovijim istraživanjima pojavila se potreba za pomicanjem fokusa sa dobro poznate uloge šaperona u homeostazi proteina na njihovu ulogu u metabolizmu stanice i mitohondrijskoj aktivnosti. Šaperon Hsp42 iz skupine sHsp (eng. *Small heat-shock proteins*) nalazi se u citosolu stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji je korišten kao modelni organizam u ovom istraživanju. Do sada je poznato da ukoliko je šaperon Hsp42 deletiran replikativni životni vijek kvasca se utrostručuje, a stanice aktiviraju odgovor srodan onome u uvjetima kalorijske restrikcije, usprkos obilju glukoze koja je prisutna u mediju. Budući da je glikolitička aktivnost kod takvih deletanata smanjena to znači da se stanice moraju prebaciti na drugi izvor ugljika, npr. pojačano aktivirati oksidaciju masnih kiselina, a glukozu usmjeravati u neki drugi metabolički put koji ju može iskoristiti.

Iz navedenih razloga u sklopu ovog diplomskog rada napravljene su i istražene delecije gena *snf1* i *zwf1* u laboratorijskom soju koji je imao deletiran gen za šaperon Hsp42, što je rezultiralo proizvodnjom sojeva s dvostrukom delecijom gena:  $\Delta\text{hsp42}\Delta\text{snf1}$  te  $\Delta\text{hsp42}\Delta\text{zwf1}$ . Gen *zwf1* kodira za enzim glukoza-6-fosfat-dehidrogenazu koji je najvažniji enzim puta pentoza-fosfata te je pokazano da njegova prekomjerna ekspresija štiti stanice od oksidativnog stresa. Gen *snf1* kodira za katalitičku podjedinicu kinaze Snf1 koja je jedan od glavnih regulatora metabolizma glukoze u kvascu, a ujedno i ortolog kinaze aktivirane 5'-adenozin monofosfatom (AMPK) u sisavaca. U uvjetima kada nema glukoze u mediju ili je ima vrlo malo, kinaza Snf1 se aktivira fosforilacijom, a upravo je Snf1/AMPK aktivacija esencijalna za produljenje životnog vijeka koje je primijećeno kod pojačane ekspresije nekih šaperona. Za dobivanje mutanata korištena je metoda inaktivacije gena delecijском kazetom, a u svrhu njene konstrukcije određeni fragmenati DNA su razgrađeni restrikcijским enzimima, umnoženi lančanom reakcijom

polimeraze (PCR, eng. *Polymerase chain reaction*), povezani pomoću T4 DNA-ligaze i transformirani u kvaščeve stanice soja  $\Delta$ hsp42. Kako bi se identificirala aktivnost Snf1 u deletantu  $\Delta$ hsp42 mjerena je razina fosforilacije Snf1 tehnikom *western blot*. Na svim sojevima također je mjerena količina staničnog ATP-a, stupanj karbonilacije proteina, razina reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, eng. *Reactive oxygen species*) te frekvencija mutacija. Za sve mutante mjerena je kronološki životni vijek. U radu su prikazani i rezultati analize diferencijalne ekspresije gena dobivene metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR).

## 2. Literaturni pregled

### 2.1 Biosinteza proteina i njihovo smatanje

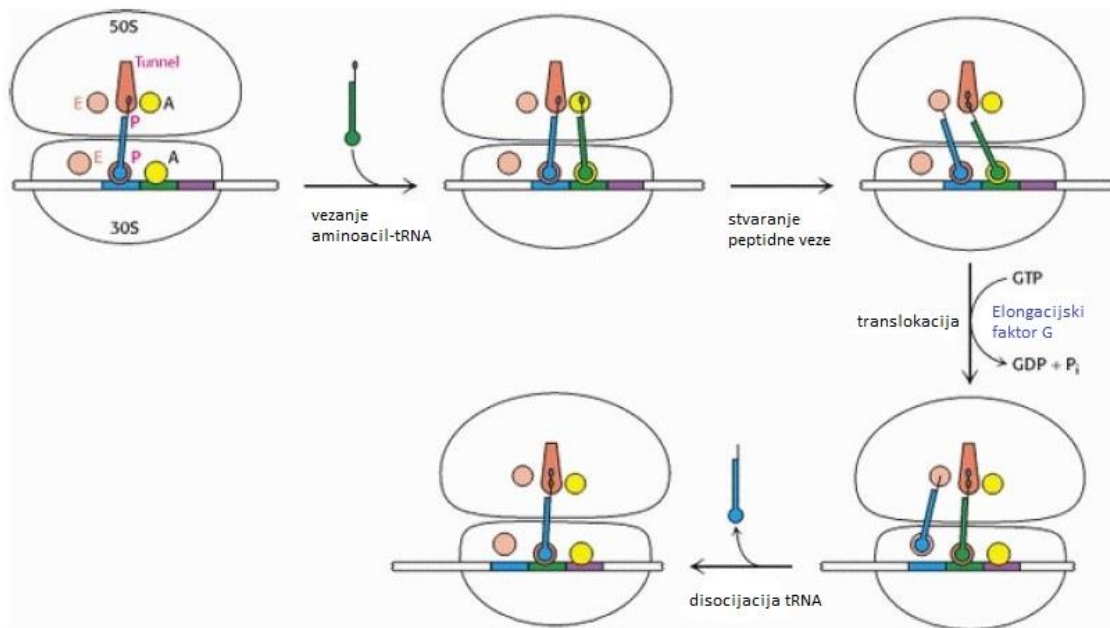
Proteini su najsvestranije makromolekule u stanicama i opseg funkcija koje obavljaju zaista je velik. Mogu djelovati kao katalizatori biokemijskih reakcija (enzimi), određuju oblik i strukturu stanice, sudjeluju u transportu iona kroz membranu, pohranjuju druge molekule ili ione, pružaju imunološku zaštitu, prenose živčane impulse, kontroliraju stanični rast i diferencijaciju, sudjeluju u staničnoj signalizaciji i staničnom prepoznavanju (hormoni), a postoje i motorički proteini koji reguliraju brzinu i snagu kontrakcije mišića. Za proteine koji imaju sličan aminokiselinski slijed ili strukturu te obavljaju sličnu funkciju kažemo da pripadaju istoj obitelji proteina.<sup>1</sup>

Regulirana biosinteza staničnih proteina glavni je preduvjet za normalno funkcioniranje organizma. Svrha genetičkog materijala je stoga kodirati za proizvodnju proteina u pravom tipu stanice, u pravom trenutku i u točno određenim količinama. Biosintezi proteina prethodi transkripcija gena u molekulu glasničke RNA (eng. *messenger RNA*, mRNA), posredovana RNA-polimerazom. Na ribosomu, u procesu kojeg nazivamo translacijom, sekvenca nukleotida molekule mRNA prevodi se u redoslijed aminokiselina u polipeptidu. Takav redoslijed naziva se primarnom strukturom proteina. Ribosomi su makromolekulski kompleksi koje čine velika i mala podjedinica, a građeni su od proteina i ribosomske RNA (rRNA). Bakterijski ribosom čine 30S i 50S podjedinica, dok se eukariotski sastoji od 60S i 40S podjedinice. Nazivi podjedinica potječu od brzine kojom te podjedinice talože kada se na njih primjeni centrifugalna sila, odnosno sedimentacijskog koeficijenta (S). Eukariotski ribosomi se od bakterijskih, osim strukturno, razlikuju i po smještaju unutar stanice jer uz citosolne ribosome kod eukariota postoje i mitohondrijski.<sup>2</sup>

Za uspješnu biosintezu proteina mora prvo doći do aktivacije aminokiselina. Ona se odvija u dva koraka, a katalizirana je enzimima koji se zovu aminoacil-tRNA sintetaze (aaRS). U prvom koraku se aminokiselina aktivira pomoću ATP-a pri čemu nastaje aminoacil-adenilat i zatim se u drugom koraku prenosi na odgovarajuću tRNA (eng. *transfer RNA*). Aminoacil-tRNA-sintetaze sastoje se od katalitičke domene koja uz aktivaciju aminokiseline katalizira i esterifikaciju tRNA te supstrat-vezne domene koja omogućuje prepoznavanje i vezanje

pripadne tRNA. Pojedine aminoacil-tRNA-sintetaze mogu posjedovati i dodatne domene npr., domene za hidrolizu nepravilno aminoaciliranih tRNA (eng. *proofreading* ili *editing domains*).<sup>2</sup>

Kao i transkripcija, proces translacije se može promatrati kroz tri stupnja: inicijaciju, elongaciju i terminaciju, a u skladu s tim postoje tri vezna mjesta za tRNA na ribosomu, P, A i E mjesto. Tijekom faze inicijacije, ribosomske podjedinice, mRNA i inicijacijska tRNA, koja nosi prvu aminokiselinu, stvaraju kompleks. U P mjestu na ribosomu se nalazi startni kodon AUG kojeg prepoznaje specifična inicijacijska formilmetionil-tRNA<sup>fMet</sup> (fMet-tRNA<sup>fMet</sup>). Inicijacijska tRNA je jedina tRNA koja se veže u P mjesto ribosoma. Za faze elongacije aminoacil-tRNA se veže u A mjesto na ribosomu, ribosom se pomiče duž mRNA u smjeru 5' → 3', a polipeptidni lanac se produljuje stvaranjem peptidnih veza između aminokiselina. Deacilirana tRNA se pomiče u E mjesto na ribosomu. Terminacija nastupa čitanjem translacijskog STOP kodona na mRNA pomoću faktora otpuštanja, što potiče hidrolizu esterske veze između polipeptida i tRNA, pri čemu novოსintetizirani lanac disocira s ribosoma. Ovaj mehanizam je prikazan na Slici 2.1.



Slika 2.1. Pojednostavljeni mehanizam biosinteze proteina. Ciklus počinje vezanjem inicijacijske tRNA u P mjesto na ribosomu. Zatim se aminoacil-tRNA veže u A mjesto na ribosomu. Dolazi do stvaranja peptidne veze između dvije aminokiseline. Pomoću elongacijskog faktora G dolazi do translokacije mRNA i deacilirana tRNA se pomiče u E mjesto na ribosomu odakle može disocirati s kompleksa. Preuzeto i doručeno iz [1].

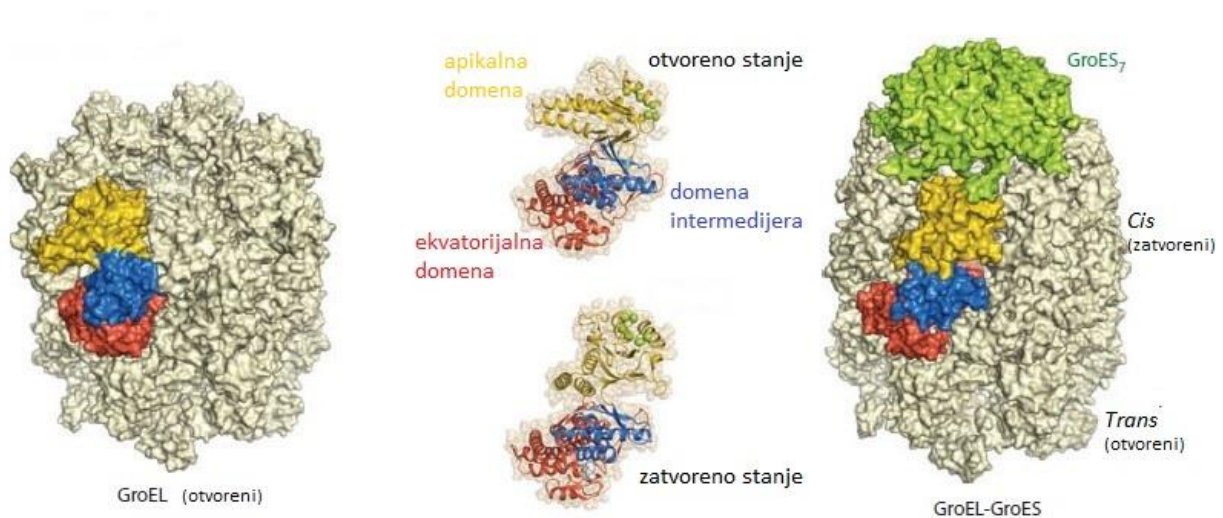
Bitno je napomenuti da se proces translacije razlikuje kod prokariota i eukariota u nekoliko stvari. Kod eukariota, za inicijaciju translacije potrebno je nekoliko dodatnih inicijacijskih faktora. Također, eukariotska mRNA nema nukleotidni slijed Shine-Dalgarno koji kod bakterija označava mjesto vezanja 30S ribosomske podjedinice. Shine-Dalgarno sekvenca je komplementarna sekvenci u 16S rRNA unutar 30S podjedinice pa između mRNA i ribosoma nastaju vodikove veze. Kod eukariota inicijacijska tRNA aminoacilira se metioninom koji se ne formilira, a translacija započinje prvim AUG signalom s 5'-kraja mRNA.<sup>2</sup>

U živim stanicama, novosintetizirani proteini se ne nalaze u linearnoj konformaciji već, kako bi postali funkcionalni, poprimaju kompaktni 3D-oblik. Glavnu ulogu u određivanju takve tercijarne strukture imaju kemijska svojstva aminokiselina. Zbog interakcija poput vodikovih veza, aminokiseline stvaraju sekundarne strukture od kojih su najpoznatije  $\alpha$ -zavojnice i  $\beta$ -ploče. Takve sekundarne strukture se zatim, uslijed hidrofobnosti i/ili polarnosti bočnih ogranaka aminokiselina koje ih grade, dalje oblikuju u tercijarne strukture.<sup>2</sup>

No, nakon sinteze većine proteina neće odmah nastupiti njihovo spontano smatanje. Postoje specijalizirani proteini čija zadaća je upravo pomagati i kontrolirati pravilno smatanje drugih proteina, a zovu se molekularni šaperoni. Oni su prisutni u svim vrstama organizama, od bakterije do čovjeka. Za sada su dobro istražene dvije veće skupine šaperona; prvu skupinu čine šaperoni nazvani prema svojoj molekularnoj masi, članovi Hsp70 i Hsp90 obitelji proteina, dok drugu skupinu čine šaperonini. Proteini iz prve skupine češće su prisutni u stanicama gdje je stres izazvan povišenom temperaturom pa su dobili i naziv *heat shock* proteini. Osim što štite proteine koji su denaturirani uslijed povišenja temperature, ponekad i sprječavaju preuranjeno smatanje proteina koji se prije smatanja moraju prvo translocirati kroz membranu.<sup>3</sup> Struktura, način regulacije šaperona i njihova uloga detaljnije su opisani u poglavlju 2.3.

Šaperonini su proteinski kompleksi koji su potrebni velikom broju proteina koji se u normalnim uvjetima ne mogu spontano smotati. Postoje dvije skupine šaperonina, jednostavno nazvane Skupina I i Skupina II. Procjenjuje se da u normalnim uvjetima 10-15% staničnih proteina u bakteriji *Escherichia coli* zahtjeva asistenciju sustava šaperonina iz Skupine I, zvanog GroEL/GroES, dok u uvjetima temperaturnog stresa takvu pomoć zahtjeva čak 30% proteina. Ciklus vezanja i otpuštanja supstrata u kompleksu GroEL/GroES alosterički je reguliran vezanjem ATP-a i njegovom hidrolizom. Kooperativnim vezanjem ATP-a na GroEL dolazi do niza konformacijskih promjena koje uzrokuju asocijaciju s GroES, popraćenu otpuštanjem supstrata s hidrofobnih regija u hidrofilne kaveze u GroEL. Dakle, proteini koji nisu smotani se

vežu u kaveze kompleksa GroEL, koji se zatim zatvaraju pomoću GroES „poklopca“ (Slika 2.2).<sup>3</sup> Drugu skupinu šaperonina (Skupina II) čine eukariotski šaperonini koji su puno slabije istraženi. TriC/CCT (eng. *TCP-1 Ring Complex*) je eukariotski šaperoninski kompleks koji se sastoji od dva prstena s osam različitih podjedinica. Kao i kod kompleksa GroEL/GroES i kod TriC/CCT postoje faze izmjene otvorenih i zatvorenih stanja, a vezanje proteina u kaveze je ključno za njihovo smatanje. TriC pomaže smatanju velikog broja citosolnih proteina te proteina koji čine citoskelet, tubulina i aktina.<sup>4</sup>



Slika 2.2. Strukturna šaperonina iz Skupine I. Kristalna struktura GroEL (lijevo, PDB 1SS8) i kompleksa GroEL-GroES (desno, PDB 1PF9). Istanaknute su konformacijske razlike podjedinica GroEL u zatvorenom i otvorenom stanju. Preuzeto i doradeno iz [4].

Ukoliko se proteini ne smataju pravilno doći će do njihove agregacije te nakupljanja agregata u određenim dijelovima stanice. To može uzrokovati defekte u prijenosu staničnih signala, transportu proteina, imunološkom prepoznavanju te staničnoj organizaciji. Pokazalo se da se neurodegenerativne bolesti poput Huntingtonove, Alzheimerove i Parkinsonove bolesti te dijabetesa tipa II, mogu povezati s kroničnom ekspresijom pogrešno smotanih ili agregiranih proteina.<sup>5</sup>

## 2.2 Poremećaj proteostaze i uobičajeni stanični odgovori na stres

Homeostaza proteina, tzv. proteostaza, podrazumijeva uravnotežen odnos između biosinteze proteina, održavanja njihove konformacije te degradacije i uklanjanja oštećenih proteina. U proteostazi sudjeluju molekularni šaperoni, mašinerije za degradaciju proteina te proteini staničnog odgovora na stres (eng. *Stress-response pathways*). Oni u sklopu mehanizama za kontrolu kvalitete nadziru smatanje, koncentraciju, staničnu lokalizaciju i međusobne interakcije proteina od trenutka njihove sinteze na dalje, a sve u svrhu očuvanja funkcionalnosti i stabilnosti proteoma.<sup>5</sup>

Jedan od načina kontrole kvalitete proteoma je kontrola na ribosomu prije i tijekom samog procesa sinteze proteina. To je ujedno i najbolji način za sprječavanje proizvodnje oštećenih proteina i njihovog nakupljanja jer se pogreške kontroliraju usputno kako protein nastaje. Smatra se da približno 300 proteina sudjeluje u procesu eukariotske translacije kako bi se osigurala učinkovitost, preciznost i kvaliteta novonastalih polipeptida. Pokazano je da se kod proteina koji posjeduju veće hidrofobne regije sklone agregaciji usporavanjem translacije olakšava interakcija šaperona i novosintetiziranog proteina što sprječava potencijalno stvaranje agregata. Dakle, uslijed stresa poput temperaturnog šoka, negativne promjene energetskeg statusa ili nedostupnosti nutrijenata u stanici, u pojedinim organelima kao što su mitohondriji i endoplazmatski retikulum aktiviraju se kinaze koje signaliziraju da se treba smanjiti brzina translacije proteina i tako omogućiti šaperonima više vremena za djelovanje.<sup>6</sup>

Sljedeći način kontrole kvalitete oslanja se na *proofreading* sposobnost enzima aminoacil-tRNA-sintetaza. Aminokiseline su relativno malene molekule koje nemaju dovoljno izražene razlike u strukturi na temelju kojih ih aaRS mogu vrlo precizno razlikovati. Stoga su aaRS razvile mehanizme popravka vlastitih pogrešaka koji omogućavaju hidrolizu aminoacil-adenilata nastalog aktivacijom pogrešne aminokiseline ili misacilirane tRNA. U skladu s tim postoje dva tipa popravka pogreške: popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline koji se odnosi na hidrolizu aminoacil-adenilata i popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline koji se odnosi na hidrolizu misacilirane tRNA.<sup>6,7</sup>

Treba napomenuti da postoji tendencija da se krivo smotani i agregirani proteini lokaliziraju u zasebne odjeljke u stanici. Time se pokušava smanjiti mogućnost da takvi proteini uzrokuju oštećenja na višoj razini ili da nepovoljno utječu na druge proteine u stanici. Posljedica toga je postojanje mehanizama popravka oštećenja na razini svakog odjeljka. Tako su u citoplazmi



zapaženi vrlo netopivi i veliki agregati te amiloidni segregati koji čine netopive proteinske naslage (eng. *Insoluble protein deposits*, IPOD). Stanica pomoću šaperona Hsp104 koji ima ulogu disagregaze razdvaja proteine iz ovih toksičnih agregata pa oni mogu biti podvrgnuti ponovnom smatanju uz pomoć šaperona iz obitelji Hsp70 i Hsp40 koji se nalaze u blizini IPOD-a. Za regulaciju odgovora na temperaturni stres u citoplazmi zaslužan je transkripcijski faktor Hsf1, početno identificiran u vinskoj mušci *Drosophila melanogaster*. Smatra se da uslijed temperaturnog šoka pogrešno smotani proteini signaliziraju Hsf1 da aktivira HSR (eng. *heat shock response*); u uvjetima kada nema stresa Hsf1 je čvrsto vezan u kompleks s Hsp90 dok u uvjetima temperaturnog stresa Hsp90 otpušta Hsf1 i pomaže smatanju krivo smotanih proteina. Aktivira se i velik broj šaperona iz obitelji proteina Hsp70 te malih *heat shock* proteina.<sup>6</sup>

U sisavaca endoplazmatski retikulum odgovoran je za smatanje i sazrijevanje proteina koji se izlučuju van stanice ili grade membrane, a koji čine 30% proteoma. U ER-u se također nalaze enzimi koji sudjeluju u sintezi većine lipida i steroida potrebnih za staničnu komunikaciju. Sprječavanje pogrešnog smatanja proteina i njihove agregacije u ovom odjeljku od velike je važnosti pa je i ovdje razvijen specifičan sustav odgovora na stres, nazvan UPR<sup>ER</sup> (eng. *unfolded protein response*). Kao odgovor na pogrešno smotane proteine aktiviraju se transmembranski receptori ATF6, PERK ili IRE1 i prenose informaciju iz ER-a u citosol i jezgru zbog čega će doći do aktivacije UPR-a. Svaki od navedena tri receptora inicira nizvodni put prijenosa signala što rezultira smanjenjem količine novosintetiziranih proteina ili povećanjem kapaciteta ER-a za smatanje proteina. Za sada postoje dva modela aktivacije UPR-a. Prema prvom, nesmotani proteini se vežu direktno na transmembranski receptor što uzrokuje njegovu dimerizaciju ili oligomerizaciju te posljedičnu aktivaciju puta. Prema drugom modelu, šaperon BiP iz obitelji proteina Hsp70 vezan je na transmembranski receptor sve dok razina nesmotanih proteina u ER ne nadilazi prag, a nakon toga će se BiP otpustiti što će aktivirati receptor i UPR.<sup>6</sup>

U mitohondrijima odgovor na stres je mitohondrijski UPR<sup>mt</sup> i njegova aktivacija rezultira povećanom ekspresijom mitohondrijskih šaperona poput Hsp6 i šaperonina Hsp60. No, ukoliko dođe do gubitka funkcije mitohondrija, koji se očituje u gubitku ili smanjenju membranskog potencijala, rezultat će biti apoptoza ili uklanjanje oštećenog mitohondrija procesom sličnim autofagiji, a koji se naziva mitofagijom.

Dakle, navedenim UPR<sup>mt</sup>, UPR<sup>ER</sup>, HSR, oxSR (eng. *oxydative stress response*) i drugim odgovorima pomaže se u zaštiti proteoma od povećane količine reaktivnih kisikovih vrsta, grešaka u biogenezi proteina i izloženosti visokim temperaturama. Bitno je istaknuti da

neuspješno uklanjanje pogrešno smotanih i agregiranih proteina može rezultirati inaktivacijom postojećih funkcionalnih proteina te propadanjem stanice. Stoga kada nije moguće popraviti oštećenje nastupit će neki od dva glavna mehanizma za razgradnju i uklanjanje oštećenih proteina. Ubikvitin-proteasomski sustav (UPS) temelji se na prepoznavanju oštećenih proteina pomoću kompleksa molekularnih šaperona i vezanju poliubikvitinskog lanca na ciljni protein. Nakon označavanja ubikvitinom, proteasom prepoznaje i degradira označeni protein. Proteasom se aktivira interakcijama između regulatornih jedinica unutar kojih se nalazi proteolitički aktivno mjesto. Drugi način razgradnje proteina je pomoću autofagije. To je unutarstanični proces u kojem se makromolekule i organeli razgrađuju kroz lizosom. Lizosomi su vezikule koje sadrže mnoštvo različitih hidrolaza poput lipaza, proteaza i glikozidaza. Proteolitičkom razgradnjom od oštećenih proteina nastaju maleni dipeptidi i tripeptidi te slobodne aminokiseline koje se zatim otpuštaju u citosol gdje mogu biti iskorišteni u sintezi novih proteina.<sup>8</sup>

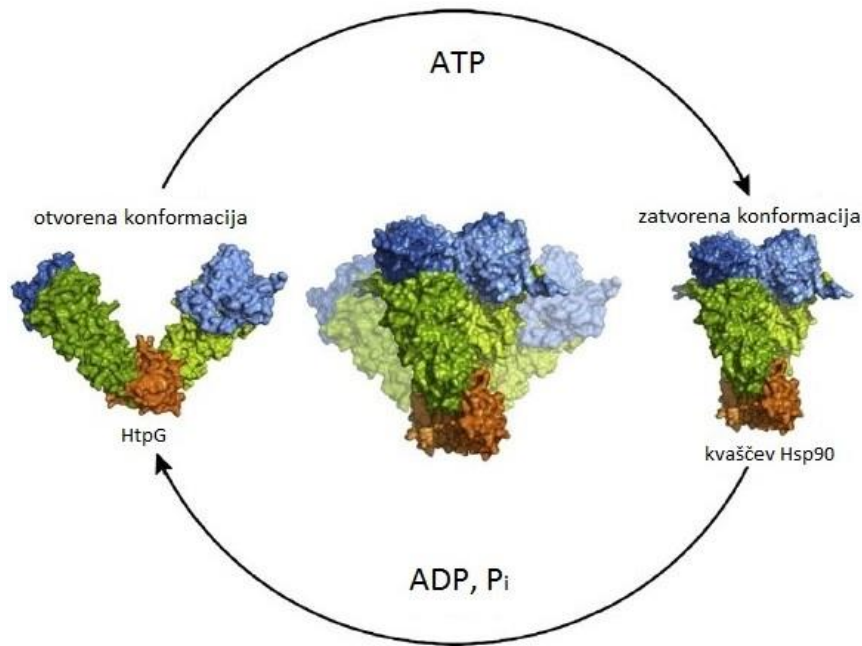
## 2.3 Odabrani molekularni šaperoni

### 2.3.1 Šaperon Hsp90

Hsp90 je homodimerna molekula koja je potrebna za stabilizaciju i aktivaciju brojnih proteina esencijalnih u staničnim putevima poput puta prijenosa signala. Smatra se da u eukariotima Hsp90 sudjeluje u pravilnom smatanju preko 200 proteina. Njegova aktivacija je regulirana konformacijskim promjenama induciranih ATP-om, ko-šaperonima i posttranslacijskim modifikacijama.<sup>9</sup>

Strukturno se može svrstati u skupinu giraza, histidin-kinaza i MutL superfamiliju ATPaza.<sup>4</sup> Hsp90 postoji u citosolu, jezgri i nekim organelima eukariota. U citosolu čovjeka se nalazi u obliku dvije izoforme, inducibilnoj Hsp90 $\alpha$  i konstitutivnoj Hsp90 $\beta$  formi, a u citosolu kvasca u obliku Hsp82 i Hsc82. Biljke posjeduju dodatne izoforme citosolnih Hsp90 koje ih štite od patogena i fluktuacija iz okoliša. U organelima se može pronaći u mitohondrijima (TRAP-1), endoplazmatskom retikulumu (Grp94) i kloroplastima. Hsp90 ima N-terminalnu ATP-vezujuću domenu, srednju domenu (eng. *M-domain*) u kojoj se nalaze vezna mjesta za ciljne proteine i ko-šaperone te C-terminalnu domenu. U apo stanju (stanje u kojem nije vezan kofaktor) Hsp90 poprima otvorenu konformaciju V-oblika. Vezanjem ATP-a na N-terminalnu domenu te proteina klijenata na M-domenu dolazi do stvaranja intermedijarnog stanja. Prateće strukturne promjene vode do zatvorenog stanja u kojem je N-terminalna domena dimerizirana i asocirana s M-domenama u kojem dolazi i do hidrolize ATP-a. Nakon hidrolize ATP-a N-terminalne domene disociraju, dolazi do otpuštanja ADP-a i P<sub>i</sub>, a Hsp90 se vraća u svoju izvornu konformaciju.<sup>9</sup> (prikazano na Slici 2.3.)

Hsp90 ima ulogu u kontroli staničnog ciklusa, hormonalnoj signalizaciji te odgovoru na stanični stres i stoga je jedna od ključnih komponenata u održavanju stanične homeostaze. Hsp90 je poznat i po tome što sudjeluje u replikaciji i popravku DNA, transkripciji i procesiranju RNA, a pokazano je i da olakšava održavanje telomera te da smanjena aktivnost Hsp90 rezultira smanjenom aktivnošću telomeraza. Na primjer, poznati proteinski klijent šaperona Hsp90 je tumor supresor p53 pa je Hsp90 važna meta za razvoj antitumorskih lijekova.<sup>9,10</sup>



Slika 2.3. Kristalne strukture Hsp90 iz bakterije *E.coli* (HtpG) u otvorenoj konformaciji, lijevo (PDB 2IOQ) te kvašćevog Hsp90 u zatvorenoj konformaciji, desno (PDB 2CG9). N-terminalna domena je prikazana plavom, M-domena zelenom, a C-terminalna domena narančastom bojom. Preuzeto i doradeno iz [9].

### 2.3.2 Šaperon Hsp70

Članovi obitelji proteina Hsp70 sastoje se od N-terminalne domene za vezanje nukleotida, te C-terminalne domene za vezanje supstrata. N-terminalna domena se sastoji od dva reznja, odnosno dvije poddomene između kojih se nalazi prorez u kojeg se veže ATP. Domena vezanja peptidnog supstrata se sastoji od poddomene u obliku  $\beta$ -sendviča te poklopca u obliku  $\alpha$ -heliksa. Supstrat se veže na ovu domenu pomoću vodikovih veza i van der Waalsovih interakcija između hidrofobnih bočnih ogranaka. Reakcijski ciklus Hsp70 je dakle ATP-ovisan i reguliran šaperonima iz obitelji Hsp40 (zvani i DnaJ). Djelomično smotani ili pogrešno smotani peptidni supstrat donesen je na Hsp70 koji ima vezan ATP pomoću nekih od Hsp40 kofaktora, zatim dolazi do zatvaranja poklopca u domeni vezanja supstrata i hidrolize ATP-a, odnosno otpuštanja ADP-a. Otvaranje poklopca i oslobađanje peptidnog supstrata inducirano je ponovnim vezanjem ATP-a čime se zatvara ciklus.<sup>4</sup>

### 2.3.3 Šaperoni Hsp26 i Hsp42

Šaperoni Hsp42 i Hsp26 pripadaju obitelji malenih *heat shock* proteina (eng. *small heat shock proteins*, sHsp), a nalaze se u citosolu kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Molekularna masa Hsp42, prema kojoj je i dobio ime iznosi 42 973 Da. Hsp42 i Hsp26 su ATP-neovisni šaperoni koji su potrebni za skupljanje pogrešno smotanih proteina u komplekse te njihovo odvođenje na mjesta gdje se takvi kompleksi mogu solubilizirati.<sup>11</sup> Kao kod svih šaperona iz skupine sHsp, kod Hsp42 postoji očuvana C-terminalna domena koja pokazuje veliku sličnost s domenom proteina  $\alpha$ -kristalina. No N-terminalna domena Hsp42 je neobično duga i ne pokazuje nikakvu homologiju s domenama ostalih sHps. Upravo preko N-terminalne domene Hsp42 djeluje na proteine. Ni Hsp26 ni Hsp42 nisu specifični kada je u pitanju vezanje supstrata i zapaženo je da štite proteine u rasponu molekulskih masa od 10 do 100 kDa.<sup>12,13</sup>

Za razliku od Hsp26 koji djeluje uglavnom pri uvjetima temperaturnog stresa, Hsp42 djeluje pri svim temperaturnim uvjetima, odnosno on je konstitutivno aktivan. Navedeno je u skladu i s opaženim strukturnim promjenama; pri temperaturama iznad 37°C Hsp26 mijenja kvaternu strukturu i kompleks od 24 podjedinice disocira na dimere čime se aktivira njegova šaperonska funkcija. Istraženo je prolazi li i Hsp42 kroz konformacijske promjene pri povišenim temperaturama, ali ni na 43°C nema zapaženih promjena u njegovoj kvaternoj strukturi iz čega se može zaključiti da šaperonska funkcija Hsp42 nije regulirana temperaturnim promjenama.<sup>12,13</sup> Istraženo je utječe li delecija jednog od šaperona Hsp26 i Hsp42 na ekspresiju onog drugog, što je izvedeno promatranjem ekspresijskog profila Hsp42 u sojevima kvasca u kojima je Hsp26 bio deletiran. Pokazano je da nema značajnog utjecaja, odnosno, može se zaključiti iz navedeno da, iako je regulacija sinteze sHsp-ova ista, oni nisu ovisni jedan o drugome. Određeni su i omjeri Hsp42 i Hsp26 pri fiziološkim uvjetima u stanici i uspostavilo se da je šaperona Hsp42 prisutno čak pet puta više od Hsp26, a pri temperaturnom stresu prisutno ga je čak 10 puta više od Hsp26.<sup>12</sup>

Uspoređena je morfologija stanica divljeg tipa i delecijjskih sojeva Hsp26 i Hsp42 pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i utvrđene su dramatične razlike pri analizi u uvjetima temperaturnog stresa. Morfologija je odgovarala stanicama koje su izložene dehidraciji, starenju i oštećenjima citoskeleta. To je potvrdilo ulogu koji sHsp imaju u zaštiti homeostaze proteina u kvascu *S. cerevisiae*.<sup>12</sup>

## 2.4 Nova uloga šaperona: metabolizam i zaštita od proteotoksičnog stresa

Poznato je da molekularni šaperoni kontroliraju i održavaju kvalitetu novosintetiziranih proteina, a da je sam proces biosinteze proteina usko povezan s energetske statusom stanice i razinom hranjivih tvari preko proteina mTOR (eng. *Mammalian target of rapamycin*). Ipak, odnos između proteostaze i drugih staničnih puteva ostaje slabo istražen te uloga šaperona u regulaciji metaboličkih mreža nije do sada poznata. Logičan sljedeći korak bio je istražiti stanični odgovor na poboljšanu ili smanjenu proteostazu i njenu komunikaciju s metaboličkim mrežama ukoliko ona postoji.

mTOR je serin/treonin kinaza koja aktivira stanični rast kao odgovor na dostupnost aminokiselina, faktora rasta i energetske status stanice (razina ATP-a). Prisutna je u dva strukturno i funkcionalno različita multiproteinska kompleksa nazvanih mTOR kompleks 1 (mTORC1) i mTOR kompleks 2 (mTORC2). Otkriveno je da delecija TOR1 gena u kvascu produljuje njegov replikativni životni vijek, a tretman kvašćeve kulture u stacionarnoj fazi rasta s rapamicinom, specifičnim inhibitorom TOR-a produljuje kvašćev kronološki životni vijek. Pokazalo se i da aktivacija mTORC1-signalnog puta pojačava biosintezu proteina što aktivira odgovor na stres. S druge strane, ograničavanje hranjivih tvari, hipoksija i oštećenja DNA smanjuju signalizaciju putem mTORC1. Dakle, može se zaključiti da je interakcija između staničnog odgovora na stres i metaboličkih signalnih puteva dvosmjerna, a da smanjena signalizacija putem TOR-a produljuje životni vijek kvasca.<sup>14</sup>

Postoji i pretpostavka da se modulacijom količine nepravilno smotanih proteina može utjecati na metaboličku aktivnost u stanici, kao i na mitohondrijsku aktivnost, a kao posljedica toga može doći do modifikacije replikativnog životnog vijeka kvasca (rad grupe dr. sc. Anite Kriško u postupku recenzije). Pokazano je da je odgovor na smanjenu količinu nepravilno smotanih proteina, uslijed prekomjerne ekspresije šaperona, kopija fenotipa koji se javlja kod staničnog odgovora na smanjenu razinu glukoze (eng. *glucose starvation*). Karakterizira ga smanjena glikolitička aktivnost i aktivnost ciklusa limuske kiseline te povećana potrošnja kisika. Takvo metaboličko stanje nastaje uslijed deaktivacije TOR-a i posljedične aktivacije spomenute Snf1 kinaze (rad grupe dr. sc. Anite Kriško u postupku recenzije). To bi mogao biti dokaz da stanice mogu aktivirati odgovor srodan odgovoru koji nastaje uslijed nedostatka glukoze i u uvjetima kada glukoze ima dovoljno, što pak znači da se stanice moraju prebaciti na drugi izvor ugljika, npr. aktivirati oksidaciju masnih kiselina. Utvrđeno je i produljenje životnog vijeka u

kvašćevim sojevima u kojima su šaperoni prekomjerno eksprimirani, a koji potpuno ovisi o metaboličkim promjenama izazvanim poboljšanjem proteostaze (rad grupe dr. sc. Anite Kriško u postupku recenzije).

Nadalje, nakon što su istražene promjene u sojevima s prekomjernom ekspresijom šaperona, istraženo je i što se događa u sojevima koji imaju smanjenu ili potpuno izgubljenu funkciju nekog od šaperona.

Naime, u eukariotskoj stanici postoje zasebni odjeljci poput ER-a, mitohondrija, jezgre i citosola u kojima postoje nezavisni putevi odgovora na gubitak proteostaze. Neki od tih puteva opisani su u poglavlju 2.2. No, postavlja se pitanje kakve posljedice na razini cijele stanice ima gubitak proteostaze u specifičnom odjeljku, na primjer gubitak funkcije šaperona iz mitohondrija, citosola i ER-a. Rezultati pokazuju da gubitak svakog pojedinog šaperona, bez obzira u kojem odjeljku se nalazio, inducira odgovor na stres nazvan CORE (eng. *Cross-organelle response*) koji uključuje odgovore iz citosola, mitohondrija i ER-a. To ukazuje na neku vrstu komunikacije koja postoji među odjeljcima u eukariotskoj stanici tijekom stresa. Nadalje, indukcija takvog CORE odgovora produljuje i replikativni i kronološki život kvasca što ukazuje na njegovu ulogu u zaštiti od blage ili umjerene proteotoksičnosti.<sup>15</sup>

Znak proteinskog stresa u svim sojevima koji imaju deletiran neki od šaperona bila je povećana razina citosolnog šaperona Hsp90, u odnosu na divlji tip. Nedostatak svakog od šaperona uzrokovao je značajno smanjenje utroška kisika što ukazuje da proteotoksičnost u bilo kojem staničnom odjeljku vodi do pada u respiraciji. Budući da se potrošnja kisika mogla smanjiti i zbog smanjene mase mitohondrija, metodom protočne citometrije pokazano je da nema promjene u masi mitohondrija. Ovo opažanje potvrđuju i smanjene razine ATP-a u delecijским sojevima, dok su razine reaktivnih kisikovih vrsta ostale nepromjenjene. Također je pretpostavljeno da je do smanjenja respiracije moglo doći zbog defekata u kompleksima respiratornog lanca. Uzgojem sojeva u mediju YPEG (3% etanol, 3% glicerol) u kojem su sposobne rasti samo stanice kompetentne za respiraciju, dok one s defektima u respiraciji ne mogu rasti, pokazano je da nema razlike među sojevima zbog čega se može zaključiti da pad u respiraciji nije rezultat ni defekata u respiratornom lancu kod delecijских sojeva.<sup>15</sup>

Opaženi pad u respiraciji motivirao je mjerenje trendova u ekspresiji gena koji sudjeluju u nekoliko puteva odgovora na stres, poput mitohondrijskog retrogradnog odgovora, ERAD-a te citosolnog odgovora na temperaturni šok. Razine Hsp42 te Hsp70 ostale su nepromjenjene, ali razina citosolnog Hsp26 je bila povišna u delecijским sojevima.<sup>15</sup>

Ova nedavna istraživanja sugeriraju da šaperoni trebaju biti promatrani i kao molekule koje mogu podešavati i osjećati razinu glukoze, odnosno energetske status stanice. Dokazano je da blagi ili umjereni stres kao što je delecija nekog od šaperona neće potaknuti nijedan od klasičnih puteva odgovora na stres već samo CORE odgovor. Na poslijetku, može se zaključiti da blagi stres produljuje životni vijek i inducira toleranciju na stres dok pretjerani stres pojačava proces starenja.<sup>15</sup>

Opisani rezultati pomiču fokus sa dobro poznate uloge šaperona u homeostazi proteina i ističu njihovu potencijalnu ulogu u metabolizmu, mitohondrijskoj aktivnosti te zaštiti od proteotoksičnosti.



## 2.5 Kinaza Snf1: uloga i aktivacija

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* regulira ekspresiju gena, metabolizam i rast u odnosu na različite signale iz okoliša. Tako prisutnost glukoze inducira ekspresiju nekoliko gena koji kodiraju za glikolitičke enzime, ribosomalne proteine i transportere glukoze. No glukoza može i potiskivati ekspresiju velikog broja gena, uključujući gene za korištenje alternativnih izvora ugljika, gene koji kodiraju proteine koji sudjeluju u glukoneogenezi i respiraciji. Taj proces je nazvan „potiskivanje glukozaom“ (eng. *glucose repression*). Identificirano je nekoliko ključnih sudionika takvih procesa, a jedan od njih je serin/treonin protein kinaza Snf1 (eng. *sucrose non-fermenting protein kinase*) za čiju katalitičku podjedinicu kodira gen *snf1*. Stanice koje rastu u mediju koji sadrži glukozu imaju kinazu Snf1 u inaktivnom defosforiliranom obliku. Kada razina glukoze padne Snf1 se fosforilira na aminokiselinskom ostatku Thr210, a dodatkom glukoze u medij Snf1 se ponovno inaktivira defosforilacijom.<sup>16</sup> Sisavčev homolog kinaze Snf1 se aktivira povećanjem omjera AMP/ATP i tako nadzire razine staničnog AMP-a i ATP-a. Kvaščeva kinaza Snf1 nije alosterički aktivirana AMP-om, ali njezina aktivacija je također u korelaciji s povećanjem omjera AMP/ATP i pripada Snf1/AMPK obitelji proteina.<sup>17,18</sup>

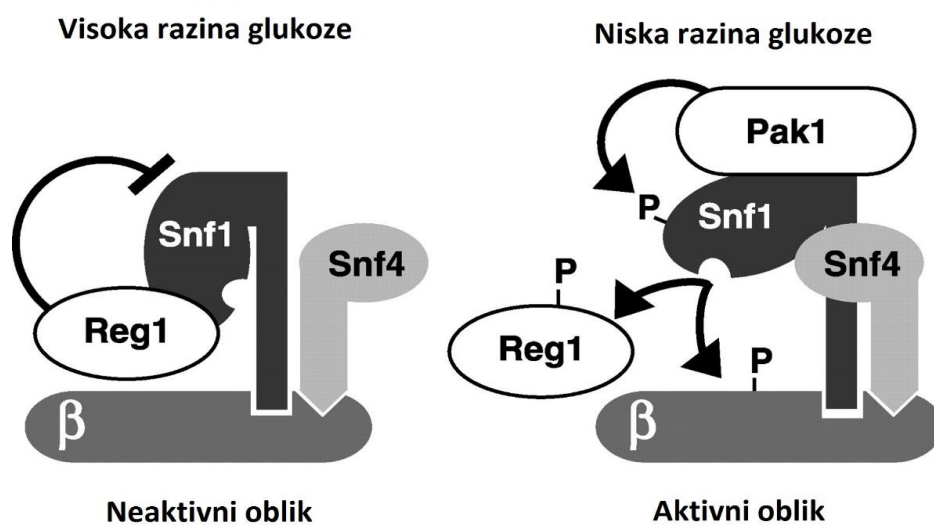
Kompleks Snf1 ima strukturu heterotrimeru. Sastoji se od katalitičke  $\alpha$ -podjedinice, tri alterirajuće  $\beta$ -podjedinice Sip1, Sip2 i Gal82, te  $\gamma$ -podjedinice, Snf4. Kao što je već spomenuto aktivacija katalitičke podjedinice Snf1 zahtijeva fosforilaciju aminokiselinskog ostatka Thr210, što je kontrolirano uzvodnim kinazama i protein-fosfatazom Reg1-Glc7.<sup>18</sup>

Dakle, kinaza Snf1 je potrebna za adaptaciju stanica kvasca na ograničenje glukoze i korištenje alternativnih izvora ugljika poput sukroze, galaktoze i etanola. No aktivacija Snf1 je potaknuta i nekim drugim promjenama u okolišu koje izazivaju stres, poput bazičnog pH, razina soli, odnosno natrijevih i litijevih iona te oksidativnog stresa.<sup>18</sup> Istraživanja su pokazala da kinaza Snf1 sudjeluje i u odgovorima na temperaturni stres pri čemu fosforilira faktor Hsf1 (eng. *heat-shock factor*) i pospješuje njegovu aktivaciju.<sup>16</sup>

Dokazano je da kinaza Snf1 ima veliku ulogu u sintezi glikogena jer je potrebna za defosforilaciju i aktivaciju enzima glikogen-sintaze, Gsy2, u uvjetima kada su izvori hranjivih tvari ograničeni. Pokazalo se i da je kinaza Snf1 negativni regulator aktivnosti prvog enzima u sintezi masnih kiselina, acetil-CoA-karboksilaze, čime zapravo inhibira sintezu lipida. Osim navedenog, sudjeluje i u odgovoru na stres tako što regulira lokalizaciju faktora Msn2 u suradnji

s kinazom TOR. Glukoza aktivira kinazu TOR koja inhibira defosforilaciju Msn2 i tada se Msn2 zadržava u citosolnom odjeljku. U odsutnosti negativnih regulatora (*reg1Δ* ili *hxx2Δ*) kinaza Snf1 je abnormalno aktivna u stanicama koje rastu na glukozi i inhibira uvoz Msn2 u jezgru tijekom gladovanja zbog manjka izvora ugljika.<sup>16</sup>

Naposlijetku, čini se da Snf1 sudjeluje i u povezanosti metabolizma i starenja jer prekomjerna ekspresija Snf1 te nedostatak N-miristoilacije podjedinice Sip2 promoviraju starenje, dok odsutnost podjedinice Snf4 produljuje životni vijek.<sup>18</sup>



Slika 2.4. Predloženi model Pak1-ovisne aktivacije kinaze Snf1. U prisutnosti visoke koncentracije glukoze, kinaza Snf1 je u kompleksu s proteinom Reg1 koji u kompleksu sa Glc7 defosforilira ostatak Thr210 u Snf1. U prisutnosti niske koncentracije glukoze, Pak1 stvara kompleks s kinazom Snf1 i fosforilira ju na ostataku Thr210. U aktivaciji kinaze Snf1 direktno sudjeluje i njena podjedinica Snf4 koja je u interakciji s regulatornom domenom. Preuzeto i doradeno iz [19].

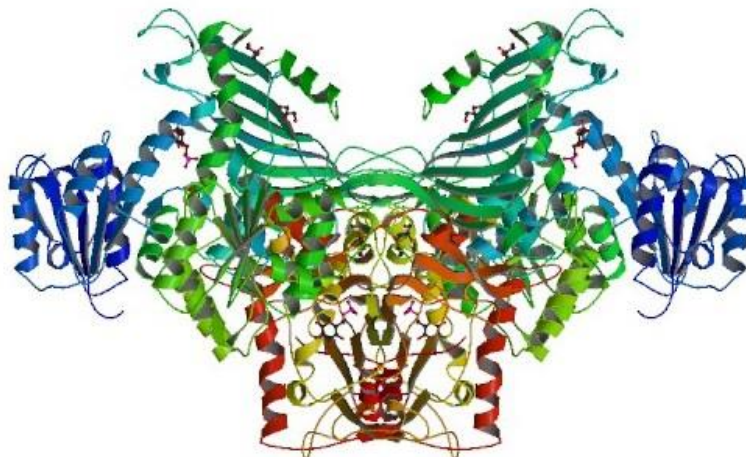
## 2.6 Enzim glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza

Enzim glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza (G6PD) je citosolni enzim koji katalizira prvi korak puta pentoza-fosfata, odnosno reakciju oksidacije glukoza-6-fosfata pri čemu dolazi do redukcije  $\text{NADP}^+$  u  $\text{NADPH}$ .



Metabolička aktivnost puta pentoza-fosfata varira ovisno o metaboličkim potrebama stanice. Prva reakcija oksidativne grane puta pentoza-fosfata je ireverzibilna i određuje brzinu reakcije.  $\text{NADPH}$  koji nastaje ovom reakcijom ima važnu ulogu u zaštiti stanica od oksidativnog stresa. Glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza se nalazi se u gotovo svim vrstama uključujući i čovjeka. Nedostatak ili smanjena razina G6PD u ljudi uzrokuje bolesti poput akutne hemolize, kronične hemolitičke anemije i drugih. Gen *zwf1* je kvašćev homolog humanog gena za G6PD i iako je njegova ekspresija u kvascu konstitutivna, aktivnost proteina G6PD je inhibirana molekulama  $\text{NADPH}$  i stimulirana procesima koji smanjuju citosolne razine  $\text{NADPH}$ . Nul-mutanti za gen *zwf1* imaju smanjenu otpornost na oksidacijski stres, smanjenu razinu  $\text{NADPH}$ , smanjenu iskoristivost izvora ugljika te su auksotrofi za metionin.<sup>20,21</sup>

Glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza najčešće ima strukturu dimera, a ponekad dimerizacijom podjedinica nastaje tetramer kao u slučaju ljudske G6PD čija kristalna struktura je prikazana na Slici 2.5.



Slika 2.5. Kristalna struktura ljudske glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze u kompleksu sa glukoza-6-fosfatom, određena difrakcijom rentgenskih zraka na kristalu. Rezolucija je 2,9 Å. Preuzeto i doručeno iz [22].

## 2.7 Veza između proteostaze i starenja

Starenje je stohastički proces koji uključuje progresivni gubitak funkcije u stanicama i tkivima tijekom vremena. Unazad desetak godina znanstveno područje koje se bavi istraživanjem molekularne osnove starenja doživjelo je veliki napredak jer se pokazalo da se brzina starenja može donekle kontrolirati modifikacijom genetičkih puteva i biokemijskih procesa. Utvrđeno je da postoji nekoliko zajedničkih obilježja starenja u svim organizmima, neka od njih su: genomska nestabilnost, skraćivanje telomera, epigenetičke promjene, disfunkcija mitohondrija, iscrpljenost matičnih stanica te gubitak homeostaze proteina.<sup>23</sup>

Starenjem stanice u post-mitotskoj fazi gube kontrolu nad ravnotežom koja treba vladati proteostazom: dolazi do pojave nepravilnosti u translaciji, smanjene regulacije šaperona i gubitka funkcije mašinerija za degradaciju proteina. Osim toga, uslijed povećavane razine oksidacijskog stresa nakupljaju se oštećene makromolekule. Reaktivne kisikove vrste (eng. *Reactive oxygen species*, ROS) nusprodukt su aerobnog metabolizma i oksidativne fosforilacije, a centar njihove proizvodnje su mitohondriji. One mogu uzrokovati oštećenja nukleinskih kiselina, proteina i lipida što kasnije rezultira abnormalnostima u njihovoj staničnoj funkciji. Postoji nekoliko vrsta oksidativnih modifikacija koje su inducirane reaktivnim kisikovim vrstama, a najčešća od njih je karbonilacija. Proteinskom karbonilacijom formiraju se aldehidi i ketoni mehanizmom oksidacije bočnih lanaca arginina, lizina, treonina i prolina. Karbonilirani proteini su manje aktivni, manje termostabilni i imaju izložene hidrofobne aminokiselina na svojoj površini. Budući da takve modifikacije proteina uzrokuju gubitak njihove strukturne i funkcije, nije neobično da povećana razina oštećenja uslijed starenja ima štetan učinak na funkciju stanica i organa. Povećane razine proteinske karbonilacije opažene su kod neurodegenerativnih bolesti, sistemske amiloidoze, mišićne distrofije, Wernerova sindroma, reumatoidnog artritisa i mnogih drugih.<sup>24</sup>

## 2.8 Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* - modelni organizam u starenju

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je eukariot koji ima relativno malen i dobro istražen genom, zbog čega je uz bakteriju *Escherichia coli* najpoznatiji modelni organizam u molekularnoj biologiji. 1996. godine genom kvasca bio je prvi potpuno sekvencirani eukariotski genom, a budući da su mnogi proteini iz kvasca po strukturi i funkciji slični onima u viših eukariota, istraživanja na kvascima uvelike doprinose razumijevanju važnih staničnih procesa kod ljudi.<sup>25</sup> Uz navedeno, uzgoj stanica kvasca je jednostavan jer se mogu uzgajati na selektivnim hranjivim podlogama te nisu komplicirani za genetičku manipulaciju. Kvasci mogu biti haploidi ili diploidi. Ukoliko su haploidi tada imaju samo po jednu kopiju svakog gena pa je deleciju specifičnog gena relativno jednostavno provesti i uočiti posljedice koje ona ima na fenotip ili metabolizam stanice. Diploidi omogućavaju proučavanje esencijalnih gena jer se može deletirati jedna kopija nekog gena koji je potreban za rast ili održavanje stanice na životu te izazvati malene promjene u drugoj kopiji.<sup>26</sup>

Tijekom rasta stanice kvasca prolaze kroz tri faze. Prva je logaritamska faza rasta tijekom koje im je metabolizam uglavnom glikolitički. U drugoj fazi kada izvori glukoze postaju ograničeni, stanice prelaze na respiratorni rast. Posljednja faza je stacionarna faza u kojoj se stanice prestaju dijeliti, a metabolizam se usporava.<sup>27</sup>

Kvasac se dijeli pupanjem (eng. *budding*) odnosno mitozom ili kloniranjem. Pupanjem nastaju manje (nove) stanice kćeri koje su genetički identične većim (starim) stanicama majkama. Stanica se u prosjeku dijeli 26 puta, a nakon toga umire.<sup>28</sup> Kvasac ima dva tipa životnog vijeka, replikativni (generacijski, mitotički) i kronološki. Replikativni životni vijek se odnosi na broj stanica kćeri koje proizvodi stanica majka, odnosno broj podjela kroz koje svaka individualna stanica može proći. Kronološki životni vijek se mjeri kao vremenski period tijekom kojeg se stanice koje se više ne dijele (stanice u stacionarnoj, G<sub>0</sub> fazi mitoze) mogu održavati na životu. Mnogi metabolički putevi mogu utjecati na kronološki životni vijek, na način da ga produžuju i ukazuju na fenotip dugovječnosti. To je pokazano za puteve TOR (eng. *Target of rapamycin*), i put Snf1/AMPK, odnosno protein kinaze koja osjeća razinu glukoze u stanici.<sup>29</sup> Može se zaključiti da se deletiranjem gena koji sudjeluju u tim putevima ili smanjenjem koncentracije dostupne glukoze može produljiti životni vijek kvasca. Ograničavanje unosa hrane, u ovom slučaju smanjenje koncentracije glukoze, naziva se kalorijskom restrikcijom.<sup>27</sup>

## 3. Materijali i metode

### 3.1 Materijali i reagensi

#### **Standardne kemikalije**

Agaroz (Sigma-Aldrich), akrilamid (Sigma), 2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol (Tris) (Sigma-Aldrich), amonijev persulfat (APS) (Sigma-Aldrich), 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) (Sigma), 2',7'-diklorfluorescein diacetat (Sigma), etanol (Kemika), etidijev bromid (Sigma-Aldrich), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Fluka), 3-fluorocena kiselina (Sigma-Aldrich), glicerol (Kemika), kalijev acetat (Sigma-Aldrich), litijev acetat (Sigma-Aldrich), natrijev dodecilsulfat (SDS) (Fisher), perklorna kiselina (PCA) (Kemika), polietilenglikol 3350 (PEG) (Sigma-Aldrich), propan-2-ol (Sigma-Aldrich), sumporna kiselina (Kemika), *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin (TEMED) (Sigma), tetrametilbenzidin (TMB) (Sigma-Aldrich), Tween 80 (Sigma), voda (AccuGENE, Lonza)

#### **Nukelinske kiseline, enzimi, antitijela i drugi proteini**

Albumin iz goveđeg seruma (BSA) (New England Biolabs), Phusion High-Fidelity DNA-polimeraza i pripadni pufer (Thermo Scientific), restrikcijske endonukleaze (*SacI* i *SaII*) i odgovarajući *CutSmart* pufer (New England Biolabs), T4 DNA-ligaza i pripadni pufer (Fermentas), zimolijaza 2000U (Zymo Research), primarno antitijelo za western blot: Phospho-AMPK $\alpha$  Rabbit mAb #2535 (Cell Signaling Technology), sekundarno antitijelo za western blot: Goat anti-Rabbit IgG (Abcam), primarno antitijelo za tehniku ELISA: anti-DNP rabbit, monoclonal (Sigma), sekundarno antitijelo za tehniku ELISA: anti-Rabbit HRP Goat IgG (Jackson ImmunoResearch), nukleotidne početnice (metabion, International AG),

#### **Boje**

Boja za nanošenje uzorka (Thermo-Scientific), Laemmli ( $\varphi(\text{SDS}) = 10\%$ ,  $\varphi(\text{glicerol}) = 20\%$ ,  $c(\beta\text{-merkaptioetanol}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\varphi(\text{bromfenolplavo}) = 0.05\%$ ), *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Merck), Ponceau S (Sigma)

## Ostale kemikalije

Inhibitor proteaza (*Thermo Scientific*), inhibitor fosfataza (*Thermo Scientific*), Hygromycin B  $\gamma = 50 \text{ mg/mL}$  (*Sigma-Aldrich*), Luminol reagens *ImmunoCruz Western Blotting* (*Santa-Cruz Biotechnology*), sperma lososa (*Single-stranded carrier DNA, 2.0 mg/mL*) (*Sigma-Aldrich*, Bradford reagens ( $\gamma$  (*Coomassie Brilliant Blue G-250*) =  $0,1 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $\varphi(\text{EtOH}) = 5 \%$ ,  $\varphi(\text{H}_3\text{PO}_4) = 8,5 \%$  (*Sigma-Aldrich*), marker masa *1kB DNA Ladder* (*New England Biolabs*), marker masa *Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards, 10-250 kDa* (*Bio-Rad*), dNTP smjesa (dCTP, dGTP, dATP, dTTP) (*Sigma-Aldrich*)

## Puferi

Pufer TAE ( $c(\text{Tris}) = 40 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{octena kiselina}) = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{EDTA}) = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ , pH 8.0), pufer TE ( $c(\text{EDTA}) = 7.44 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $c(\text{Tris}) = 6.06 \text{ g dm}^{-3}$ , pH 7.5), pufer TBS ( $c(\text{Tris}) = 0.2 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 1.5 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7.4), pufer za elektroforezu ( $c(\text{Tris}) = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{glicin}) = 0,192 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\varphi(\text{SDS}) = 0.1\%$ , pH 8.3), pufer za prijenos (sastav koncentriranog pufera 10x:  $c(\text{Tris}) = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{glicin}) = 0,19 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\varphi(\text{etanol}) = 96\%$ , pH 8.3), pufer za odbojavanje gela ( $\varphi(\text{ddH}_2\text{O}) = 70\%$ ,  $\varphi(\text{metanol}) = 20\%$ ,  $\varphi(\text{octena kiselina}) = 10\%$ ), pufer PBS ( $c(\text{NaCl}) = 1.5 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,162 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaH}_2\text{PO}_4) = 0.038 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7.4), pufer sa zimolijazom (pufer PBS uz dodatak zimolijaze 60U i inhibitora proteaza  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), pufer za lizu sferoplasta ( $c(\text{sorbitol}) = 0.6 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{Tris-HCl}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ , inhibitor proteaza  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ , pH 7.4), pufer TBS-Tween (pufer TBS uz dodatak Tween-a 20  $\varphi = 0.1\%$ )

## Hranjivi mediji i podloge

Hranjivi medij YPD ( $\gamma(\text{pepton}) = 20 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{kvašćev ekstrakt}) = 10 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{glukoza}) = 20 \text{ g dm}^{-3}$ , otopljeno u redestiliranoj vodi), tekući hranjivi medij sa L-kanavaninom, kojem ujedno nedostaje arginin, ( $c(\text{L-kanavanin}) = 0,2 \text{ g dm}^{-3}$ ), hranjive YPD krute podloge ( $\gamma(\text{pepton}) = 20 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{kvašćev ekstrakt}) = 10 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{glukoza}) = 20 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{bacto agar}) = 24 \text{ g dm}^{-3}$ , otopljeno u destiliranoj vodi)

## **Sojevi kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i plazmidi**

Divlji tip *S. cerevisiae* (Y258) (*Dharmacon*)

$\Delta$ hsp42 (*Dharmacon*): soj s deletiranim genom za šaperon Hsp42

$\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1: soj s deletiranim genom za šaperon Hsp42 i genom za kinazu Snf1 napravljen u sklopu ovog rada

$\Delta$ hsp42 $\Delta$ zwf1: soj s deletiranim genom za šaperon Hsp42 i genom za glukoza-6-fosfat dehidrogenazu napravljen u sklopu ovog rada

$\Delta$ snf1 (*Dharmacon*): soj s deletiranim genom za kinazu Snf1  
plazmid pAG32 (*addgene*)

## **Komercijalni kompleti**

Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (*Promega*) za pročišćavanje plazmida,

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System za pročišćavanje DNA nakon restrikcije (*Promega*),

ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (*Bio-Vision*) za mjerenje ATP-a.



## 3.2 Metode rada s DNA

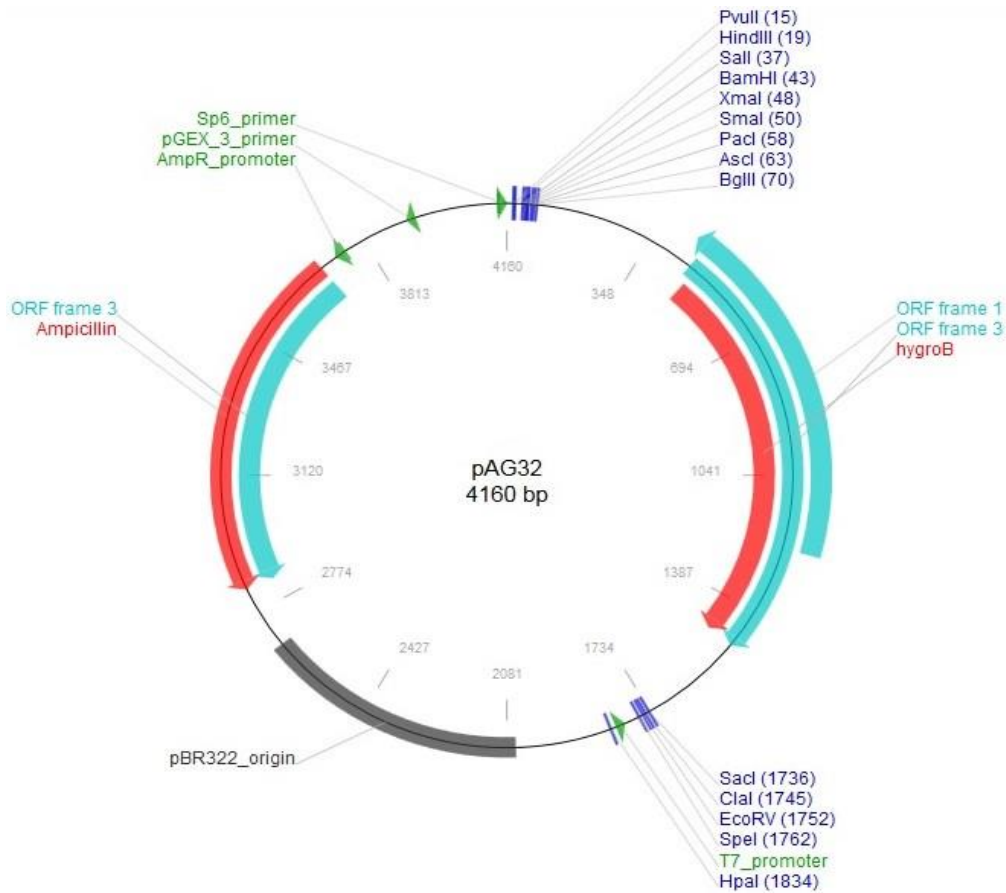
### 3.2.1 Izolacija genomske DNA

Prekonoćne kulture stanica kvasca su centrifugirane 5 minuta na 3500 rpm i supernatant je uklonjen. Talog stanica je resuspendiran u 660  $\mu\text{L}$  TE-SDS pufera i prebačen u mikrotubice. Uzorci su zatim kratko vorteksirani i inkubirani 5 minuta na 65°C nakon čega su promiješani okretanjem mikrotubice i inkubirani dodatnih 5 minuta. Zatim je uzorcima dodano 340  $\mu\text{L}$  natrijevog acetata i inkubirani su na 4°C. Inkubacija traje 30 minuta do 1 sat, a prekinuta je nakon pojave mliječno bijelog taloga koji je posljedica koagulacije proteina. Nakon koagulacije proteina slijedi centrifugiranje uzoraka u trajanju od 10 minuta na 16 000 g. 600  $\mu\text{L}$  supernatanta je prebačeno u nove mikrotubice. Supernatantu je dodano 600  $\mu\text{L}$  izopropanola i promiješano pa su uzorci inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim su centrifugirani 10 minuta na 12 300 g. Vodena faza je uklonjena, a sačuvan je talog DNA. Talogu je dodano 100  $\mu\text{L}$  etanola  $w = 95\%$  koji je bio pohranjen na -20°C i uzorci su centrifugirani 30 sekundi. Etanol je nakon toga pažljivo uklonjen pipetom i talog posušen na zraku. Talogu DNA je dodano 60  $\mu\text{L}$  TE pufera (sastav pufera je naveden na stranici 21) i mikrotubice su trljane po naboranoj površini. Uzorci DNA su zatim inkubirani 5 minuta na 65°C nakon čega su pohranjeni na -20°C.

### 3.2.2 Lančana reakcija polimeraze, PCR

Lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase chain reaction*, PCR) omogućuje eksponencijalno umnažanje specifičnog fragmenta DNA *in vitro*, uz korištenje para početnica i DNA-polimeraze. U reakcijsku smjesu potrebno je, osim početnica i termostabilne DNA-polimeraze, dodati kalup DNA, dNTP-ove, te pufer koji sadrži magnezijeve ione. Svaka PCR reakcija temelji se na ponavljanju ciklusa od tri koraka: termičke denaturacije kalupa DNA kojom se razdvajaju lanci, sljepljivanje početnica na komplementarne sljedove u kalupu te produljenje početnica, odnosno sinteza lanca komplementarnog kalupu.<sup>2,3</sup> Metoda PCR korištena je za umnažanje nukleotidnih sljedova od 500 pb homolognih s regijama uzvodno i nizvodno od ciljnog gena i delecije kazete koja nosi biljeg otpornosti na antibiotik te za provjeru uspješnosti transformacije stanica kvasca kontruktom koji sadrži deleciju kazetu.

Na Slici 3.1. prikazana je mapa plazmida pAG32 iz kojeg je dobivena delecija kazeta. Plazmid pAG32 iz bakterije *Escherichia coli* prethodno je pročišćen prema protokolu *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System*.



Slika 3.1. Kružna restrikcijska mapa plazmida pAG32. Delecija kazeta koja sadrži gen za otpornost na antibiotik higromicin B se nalazi između restrikcijskih mjesta za enzime *SacI* (1736) i *SalI* (37) i ima veličinu 1699 parova baza. Preuzeto iz [30].

Sastav PCR smjese je bio:  $c(\text{uzvodna početnica}) = 0,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$   $c(\text{nizvodna početnica}) = 0,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , *Phusion High-Fidelity* DNA-polimeraza  $0,01 \text{ U}/\mu\text{L}$ , pufer za DNA polimerazu sa magnezijevim ionima,  $c(\text{dNPT}) = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{kalup}) = 0,4 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . Ukupni volumen reakcijske smjese bio je  $50 \mu\text{L}$ . Za umnažanje homolognih sljedova od 500 pb kao kalup je služila genomska DNA kvasca divljeg tipa, a za kazetu plazmid pAG32.

Oligonukleotidne početnice osmišljene su tako da sadrže restrikcijska mjesta za enzime *SacI* i *Sall*, pri čemu je posebna pažnja obraćena na njihovu duljinu, temperaturu mekšanja, udio GC baza (~50%) te mogućnost stvaranja sekundarnih struktura koje ometaju umnažanje DNA. Popis početnica za umnažanje delecije kazete i homolognih sljedova od 500 pb dan je u tablici 3.1.

**Tablica 3.1.** PCR početnice za umnažanje kazete iz plazmida pAG32 koja ima restrikcijska mjesta za enzime *SacI* i *Sall* i početnice za umnažanje sljedova od 500 pb homolognih s regijama uzvodno i nizvodno od gena *snf1* te gena *zwf1*.

<b>kazeta</b>	
fwd	CGT ACG CTG CAG <u>GTC GAC</u> ( <i>Sall</i> )
rc	ATC GAT GAA TTC <u>GAG CTC</u> G ( <i>SacI</i> )
<b>snf1</b>	
fwd1	GCG GCG TGG ATG CAA AAG GAT
rc1	TAT <u>CAG CTG</u> CTG TGT TTG TGT TG ( <i>Sall</i> )
fwd2	TAT <u>GAG CTC</u> TGG TGG AAC GTA AAA GAA ( <i>SacI</i> )
rc2	TTC TGG CAG CAT GAT TTG ATA TCG
<b>zwf1</b>	
fwd1	TGC ACC TGT GGC AAT TAT TCG GC
rc1	TGC <u>CAG CTC</u> ATT CAT TTA TCG GCG TCG ACT AT ( <i>Sall</i> )
fwd2	TAT <u>CTC GAG</u> TGT GGT TTT CTA TTC ( <i>SacI</i> )
rc2	CAA CAA TAA TAG TAG CGC TAC TG

U tablicama 3.2. – 3.4. napisani su PCR programi koji su korišteni za PCR reakcije umnažanja. Jedina razlika je bila u temperaturama sparivanja početnica koje su različite za gen *snf1* i gen *zwf1*.

**Tablica 3.2.** PCR program za umnažanje delecije kazete i nukleotidnih sljedova od 500 pb homologije s regijom uzvodno (FRAGM 1) i s regijom nizvodno (FRAGM2) od ciljnog gena snf1.

		temperatura / °C	trajanje ciklusa / min	broj ciklusa
početna denaturacija		94	4	1
denaturacija		94	0,5	30
Sparivanje početnica	<b>FRAGM 1</b>	55	1	30
	<b>FRAGM 2</b>	56	1	30
produljenje		72	1,5	30
završno produljenje		72	5	1

**Tablica 3.3.** PCR program za umnažanje delecije kazete i nukleotidnih sljedova od 500 pb homologije s regijom uzvodno (FRAGM 1) i s regijom nizvodno (FRAGM2) od ciljnog gena zwf1.

		temperatura / °C	trajanje ciklusa / min	broj ciklusa
početna denaturacija		94	4	1
denaturacija		95	0,5	30
Sparivanje početnica	<b>FRAGM 1</b>	61	1	30
	<b>FRAGM 2</b>	45	1	30
produljenje		72	1,5	30
završno produljenje		72	5	1

**Tablica 3.4.** PCR program za umnažanje delecije kazete.

		temperatura / °C	trajanje ciklusa / min	broj ciklusa
početna denaturacija		94	4	1
denaturacija		94	0,5	30
Sparivanje početnica	<b>KAZETA</b>	47	1	30
produljenje		72	1,5	30
završno produljenje		72	5	1

### 3.2.3 Elektroforeza na agaroznom gelu

Uspješnost umnažanja fragmenata provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu. Agarozni gel ( $w(\text{agaroz}) = 1,5\%$ ) pripremljen je otapanjem agarote u puferu TAE (sastav pufera se nalazi na stranici 21). Uzorci volumena  $5\ \mu\text{L}$  su pomiješani s  $1\ \mu\text{L}$  boje za nanošenje uzorka (eng. *Gel loading dye*) i nanoseni na gel. Nanesen je i marker masa *1 kb DNA ladder* u volumenu od  $3\ \mu\text{L}$  koji je također pomiješan sa  $1\ \mu\text{L}$  boje.

Gel je smješten u aparaturu za horizontalnu elektroforezu koja je bila ispunjena puferom TAE. Elektroforeza je provedena pri  $80\ \text{V}$  u trajanju od 1h. Za detekciju fragmenata DNA na gelu korišten je etidijev bromid koji se interkalira između parova baza u nukleinskim kiselinama pri čemu dolazi do njegove fluorescencije. Gel je inkubiran u otopini etidijevog bromida 1 sat.

### 3.2.4 Proizvodnja ljepljivih krajeva pomoću restrikcijskih enzima

Restrikcijske endonukleaze su enzimi koji prepoznaju specifični slijed nukleotida i hidroliziraju fosfodietersku vezu okosnice DNA na restrikcijskim mjestima. U genetičkom inženjerstvu koriste se uglavnom restrikcijske endonukleaze tipa II koje uvijek cijepaju na istom položaju u odnosu na mjesto prepoznavanja. Mjesta prepoznavanja restrikcijskih endonukleaza tipa II su palindromski sljedovi koji imaju os simetrije drugog reda, a dugački su 4 do 8 parova baza. Neke endonukleaze cijepaju dvije nasuprotne fosfodieterske veze oba lanca DNA dajući tupe krajeve DNA, dok druge stvaraju međusobno komplementarne 5'- ili 3'-stršeće krajeve od 2 do 4 nesparena nukleotida koji se nazivaju i ljepljivim krajevima.<sup>31</sup>

Restrikcijska razgradnja je provedena pomoću restrikcijskih enzima *SacI* i *SaII*, uz odgovarajući *CutSmart* pufer (sastav pufera:  $c(\text{kalijev acetat}) = 50\ \text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{Tris-acetat}) = 20\ \text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{magnezijev acetat}) = 10\ \text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{BSA}) = 100\ \mu\text{g/ml}$ , pH 7,9). U reakcijsku smjesu je dodana i BSA  $0,1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Ukupan volumen smjese bio je  $50\ \mu\text{L}$ . Reakcija restrikcije provedena je inkubacijom smjese na  $37^\circ\text{C}$  u trajanju od 1 sat. Nakon toga slijedila je inaktivacija enzima na  $60^\circ\text{C}$  u trajanju od 20 minuta.

### 3.2.5 Pročišćavanje razgrađenih PCR produkata

Nakon restrikcije fragmenti su pročišćeni prema uputama *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)*. 50  $\mu\text{L}$  uzorka je uneseno u čistu mikrotubicu i pomiješano s jednakim volumenom komercijalnog pufera za vezanje na membranu (eng. *Membrane Binding Solution*). Zatim je smjesa prebačena na kolonu za pročišćavanje i inkubirana 1 minutu na sobnoj temperaturi da se omogući vezanje DNA. Slijedilo je centrifugiranje u trajanju od 1 minute na 16 000 g, a tekućina propuštena kroz membranu je uklonjena. Dodano je 700  $\mu\text{L}$  komercijalnog pufera za ispiranje membrane koji sadrži etanol (eng. *Membrane Wash Solution*) i uzorci su centrifugirani na 16 000 g 1 minutu. Prethodni korak se ponovio, ali sa 500  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje membrane te se centrifugiranjem 5 minuta na 16 000 g. Centrifugiranje je ponovljeno s otvorenim tubicama kako bi ispario preostali etanol. Kolona je premještena u novu mikrotubicu i dodano je 50  $\mu\text{L}$  vode oslobođene nukleaza (eng. *Nuclease-Free Water*). Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 1 minutu i zatim centrifugirani na 16 000 g 1 minutu. Pročišćeni fragmenti spremljeni su na  $+4^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.6 Ligacija pomoću T4 DNA-ligaze

DNA-ligaza je enzim koji katalizira stvaranje fosfodiesterske veze između 3'-hidroksilne skupine jednog fragmenta i 5'-fosfatne skupine drugog fragmenta DNA te tako popravlja jednolančane lomove u dvolančanoj molekuli DNA. Za potrebe stvaranja rekombinantne DNA u genetičkom inženjerstvu najčešće se koristi DNA-ligaza iz bakteriofaga T4 koja povezuje ljepljive krajeve DNA nastale restrikcijskom razgradnjom.<sup>31</sup>

Jedna ligacijska smjesa sadržala je kazetu s biljegom otpornosti na higromicin B,  $\gamma = 31,9$   $\mu\text{g/mL}$ , slijeda od 500 pb homolognog s regijom uzvodno od gena *snf1*,  $\gamma = 26,5$   $\mu\text{g/mL}$ , slijeda od 500 pb homolognog s regijom nizvodno od gena *snf1*,  $\gamma = 31,4$   $\mu\text{g/mL}$ , T4 DNA-ligaze i odgovarajućeg pufera za T4 DNA-ligazu (sastav pufera:  $c(\text{Tris-HCl}) = 50$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{MgCl}_2) = 10$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{ATP}) = 1$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{DTT}) = 10$   $\text{mmol dm}^{-3}$ , pH 7,5). Ukupni volumen smjese iznosio je 20  $\mu\text{L}$ . Ligacija je provedena inkubacijom smjese na  $4^{\circ}\text{C}$  preko noći.

Druga ligacijska smjesa bila je istog sastava s razlikom u koncentraciji slijeda od 500 pb homolognog s regijom uzvodno od gena *zwf1*,  $\gamma = 28,1$   $\mu\text{g/mL}$  te slijeda od 500 pb homolognog s regijom nizvodno od gena *zwf1*,  $\gamma = 24,5$   $\mu\text{g/mL}$ .

## 3.3 Metode rada sa stanicama kvasca

### 3.3.1 Transformacija stanica kvasca

Transformacija je metoda unosa strane DNA u stanice što uzrokuje promjene u fenotipu takvih stanica. Kako bi se ligacijske smjese koje sadrže konstruirane delecije kazete mogle transformirati u kvašćeve stanice soja  $\Delta$ hsp42 uzgojene su prekonoćne kulture soja  $\Delta$ hsp42 u 5 mL YPD tekućeg hranjivog medija (sastav medija je naveden na stranici 21) na 30°C, uz potreskivanje. Sljedeći dan svježi YPD medij je inokuliran prekonoćnom kulturom (2 mL prekonoćne kulture i 100 mL medija) i rast je praćen mjerenjem apsorbancije na 600 nm. Stanice su skupljane kada su bile u eksponencijalnoj fazi rasta ( $OD_{600} = 0,5-0,7$ ). Po 50 mL kulture u eksponencijalnoj fazi je centrifugirano 5 minuta na 4300 g kako bi se stanice istaložile, a medij uklonio. Stanice su resuspendirane i ispirane u 25 mL sterilne destilirane vode. Ispiranje je ponovljeno tri puta i talog stanica resuspendiran u 1 mL sterilne destilirane vode. Po 100  $\mu$ L suspenzije stanica je raspoređeno u mikrotubice i dodana im je transformacijska smjesa sljedećeg sastava: PEG 50% (w/v),  $c(\text{litijev acetat}) = 0,102 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\gamma(\text{sperma lososa}) = 0,028 \text{ mg/mL}$ , deionizirana voda. Ukupni volumen smjese je bio 3168  $\mu$ L. Na 100  $\mu$ L suspenzije stanica dodano je 228  $\mu$ L navedene transformacijske smjese i 8  $\mu$ L ligacijske smjese, osim u slučaju negativne kontrole (ne sadrže ligacijsku smjesu) gdje je dodano 336  $\mu$ L transformacijske smjese. Smjese su inokulirane preko noći na sobnoj temperaturi i zatim centrifugirane 30 sekundi na 16 000 g. Supernatant je uklonjen, a talozima stanica dodan po 1 mL tekućeg hranjivog YPD medija te su stanice inkubirane 3 sata na 30°C. Smjese transformiranih stanica su nasađene na selektivne YPD podloge (sastav podloge je naveden na stranici 21) koje sadrže antibiotik higromicin B,  $\gamma = 200 \text{ }\mu\text{g/mL}$ . Ploče sa stanicama su inkubirane na 30°C i praćen je rast kolonija kvasaca tijekom nekoliko dana.

Prekonoćne kulture su dobivene inokulacijom medija s odabranim kolonijama s krute podloge. Kulture su inkubirane na 30°C preko noći, uz potreskivanje. Iz prekonoćnih kultura je zatim izolirana genomska DNA prema postupku opisanom na stranici 23 kako bi se proveo PCR prema postupku opisanom na stranicama 24-26. Kao kontrola korišten je soj divljeg tipa. Za oba soja  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1 i  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ zwf1 korištene su početnice fwd1 (eng. *Forward* 1) i rc2 (eng. *Reverse complement* 2) navedene u Tablici 3.2.1. Rezultati PCR-a provjereni su elektroforezom na agaroznom gelu prema postupku opisanom na stranicama 26 i 27.

### *3.3.2 Mjerenje kronološkog životnog vijeka*

5 mL tekućeg YPD medija je inokulirano s jednom kvašćevom kolonijom s krute podloge i kultura je inkubirana na 30°C uz potreskivanje. Kulture su uzgojene do stacionarne faze rasta ( $OD_{600} = 0,7-0,9$ ) nakon čega su stanice istaložene centrifugiranjem 5 minuta na 5000 g i isprane u sterilnoj deioniziranoj vodi. Zatim su resuspendirane u sterilnoj deioniziranoj vodi i inkubirane na 30°C. Svaki treći dan ishodna kultura stanica je serijski razrijeđena i po 100  $\mu$ L suspenzije stanica razrijeđenja  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$  nasađivano je na ploče s podlogom YPD u duplikatima. Ploče su inkubirane na 30°C, a broj naraslih kolonija određen je nakon 48 sati. Napravljene su i biološke replike svakog soja.

### *3.3.3 Mjerenje frekvencije mutacija*

5 mL tekućeg YPD medija koji sadrži L-kanavanin, a kojemu nedostaje arginin inokulirano je s jednom kvašćevom kolonijom s krute podloge i kultura je inkubirana na 30°C uz potreskivanje preko noći. Kultura je zatim razrijeđena u svježi medij istog sastava 500-1000 puta i ponovno inkubirana na 30°C uz potreskivanje do stacionarne faze. Treći dan su stanice isprane u sterilnoj destiliranoj vodi i nasađene na ploče s krutom podlogom YPD u volumenu od 100  $\mu$ L u svrhu određivanja ukupnog broja stanica. Postupak je istovjetan postupku za mjerenje kronološkog životnog vijeka. Također je nasađeno 100  $\mu$ L suspenzije stanica u vodi na ploče s krutom podlogom YPD kojoj nedostaje arginin, ali ujedno sadrži L-kanavanin konačne koncentracije 200  $\mu$ g/mL. Ploče su inkubirane na 30°C, a broj naraslih kolonija se određen je nakon 72 sata. Na pločama s podlogom koja sadrži kanavanin, a nedostaje joj arginin narasli su samo mutanti otporni na kanavanin. Frekvencija mutacija izračunata je kao omjer broja stanica otpornih na kanavanin i ukupnog broja vijabilnih stanica u kulturi.



## 3.4 Metode rada s proteinima

### 3.4.1 Ekstrakcija proteina metodom sa zimolijazom

Prekonoćne kulture dobivene su inokulacijom 5 mL tekućeg YPD medija s kvašćevim kolonijama s krute podloge. Kulture su inkubirane na 30°C uz potreskivanje. 250 mL svježeg YPD medija je inokulirano s 2.5 mL prekonoćne kulture u uzgojeno do eksponencijalne faze rasta ( $OD_{600} = 0,5 - 0,7$ ). Stanice su istaložene centrifugiranjem 5 minuta na 4300 g, a medij uklonjen. Talози stanica su isperani nekoliko puta u otopini PBS (sastav otopine se nalazi na stranici 21). Talozima je zatim dodano 1 mL otopine PBS i stanice su premještene u mikrotubice, nakon čega su talože centrifugiranjem 5 minuta na 16 000 g. PBS je uklonjen, a talози stanica posušeni.

Stanice kvasca imaju debelu staničnu stijenku što otežava ekstrakciju proteina. Stoga se enzimskom digestijom staničnog zida pomoću zimolijaze i stvaranjem sferoplasta stanice dovode u osjetljiviji oblik iz kojeg je potom jednostavnije ekstrahirati proteine.

Talози stanica su resuspendirani u puferu sa zimolijazom (sastav pufera je naveden na stranici 21) te su uzorci zatim u blago polegnutom položaju inkubirani 1 sat na 37°C uz sporo potresanje. Slijedilo je centrifugiranje 5 minuta na 3700 g i supernatant je pažljivo uklonjen. Sve sljedeće korake bilo je potrebno provoditi na ledu. Talози su resuspendirani u puferu za lizu sferoplasta (sastav pufera je naveden na stranici 21). Suspenzije su vorteksirane 30 sekundi i inkubirane na ledu 30 minuta uz kraće vorteksiranje nakon 15 minuta. Na kraju su suspenzije snažno vorteksirane 2 minute i centrifugirane 10 minuta na 16 000 g. Bistri supernatant u kojem se nalazi ekstrakt proteina je prebačen u čistu mikrotubicu, a talog se odbačen.

Proteinski ekstrakti potrebni za western analizu dobiveni su prema istom postupku, s razlikama u ispiranju taloga stanica u puferu TBS (sastav pufera je naveden na stranici 21) te u sastavu pufera sa zimolijazom (pufer TBS, zimolijaza 60U, inhibitor fosfataza  $c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$  i inhibitor proteaza  $c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). U pufer za lizu sferoplasta je također bilo potrebno dodati inhibitor fosfataza.

Proteinski ekstrakti su ugušćeni na centrikonima 3K koji propuštaju sve proteine manje od 3 kDa, a zadržavaju veće.

### 3.4.2 Određivanje koncentracije proteina metodom prema Bradfordu

Određivanje koncentracije proteina metodom prema Bradfordu temelji se na reakciji proteina s bojom *Coomassie Brilliant Blue G-250* koja reagira prvenstveno s bočnim skupinama arginina, a u manjoj mjeri i s bočnim skupinama histidina, lizina, tirozina, triptofana i fenilalanina. Kada je vezana na proteine boja se nalazi u anionskom obliku i dolazi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu pri čemu se apsorpcijski maksimum boje pomiče sa 465 nm na 595 nm što se može pratiti spektrofotometrijski.<sup>32</sup>

Kako bi se konstruirao baždarni pravac korištena je otopina albumina iz goveđeg seruma ( $\gamma$ (BSA)= 1 mg/mL). Ona se nanosi u volumenima od 0, 2, 4, 6, 8 i 10  $\mu$ L na mikrotitarsku pločicu i doda joj je po 200  $\mu$ L Bradfordovog reagensa (sastav otopine je naveden na stranici 21). Uzorci proteina nanoseni su u volumenima od 2  $\mu$ L i svakom uzorku također je dodano po 200  $\mu$ L Bradfordovog reagensa. Uzorci su inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi uz potresanje i zatim im je očitana apsorbancija pri 570 nm na spektrofotometru (*Tecan Sunrise*). Podaci su prikupljeni pomoću softwera *XFLUOR4* version 4.51.

### 3.4.3 Mjerenje stupnja karbonilacije proteina tehnikom ELISA

Imunoanalitička tehnika ELISA (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) omogućava detekciju specifičnog analita ili tvari koja se želi kvalitativno ili kvantitativno odrediti u nekom uzorku. Temelji se na interakciji između liganda i odgovarajućeg antitijela koja se detektira obilježavanjem antitijela s enzimom (peroksidaza iz hrena, alkalna fosfataza,  $\beta$ -galaktozidaza) i pojavom fluorescencije ili promjene boje uslijed reakcije.<sup>33</sup> U ovom slučaju reaktivne aldehidne i ketonske skupine bočnih ogranaka proteina (najčešće se radi o aminokiselinama prolinu, argininu, lizinu i treoninu) derivatizirane su s 2,4-dinitrofenolhidrazinom (DNPH) nakon čega primarno antitijelo anti-DNPH prepoznaje proteine s derivatiziranim skupinama, a slijedi vezanje sekundarnog antitijela konjugiranog s enzimom na primarno.

Kako bi tehnikom ELISA bilo moguće iz staničnog ekstrakta odrediti stupanj karbonilacije proteina bilo je potrebno prethodno provesti ekstrakciju proteina prema opisanom postupku, nakon čega je slijedilo je određivanje koncentracije proteina metodom prema Bradfordu.

Proteinski ekstrakti su razrijeđeni u otopini PBS do konačne masene koncentracije  $\gamma = 0.01$   $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Po 100  $\mu\text{l}$  uzorka je nanešeno na mikrotitarsku pločicu u triplikatima i uzorci su inkubirani na 4°C preko noći. Sljedeći dan je otopina iz jažica mikrotitarske pločice uklonjena i pločica isprana tri puta s 200  $\mu\text{L}$  otopine PBS. Višak otopine uklonjen je pipetom. U jažice s uzorcima dodano je 200  $\mu\text{L}$  svježe pripravljene otopine DNPH (otapanjem 0,02 g 2,4-dinitrofenilhidrazina u 1 mL 3-fluoroctene kiseline) i pločica inkubirana 45 minuta u mraku. Otopina DNPH je zatim uklonjena, a mikrotitarska pločica ispirana četiri puta s 200  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje II (otopina PBS s dodatkom  $w(\text{etanol}) = 96\%$  u omjeru 1:1). Nakon toga pločica je isprana još tri puta s 200  $\mu\text{L}$  otopine PBS. Višak otopine uklonjen je pipetom. Nespecifična proteinska mjesta su blokirana dodatkom 250  $\mu\text{L}$  pufera za blokiranje. Pufer za blokiranje čini otopina mlijeka ( $w = 5\%$ ) u puferu III (otopina PBS s dodatkom Tween-a  $\varphi = 0,01\%$ ). Pločica s uzorcima je inkubira 90 minuta na sobnoj temperaturi uz potreskivanje. Pufer za blokiranje je uklonjen i jažice isprane tri puta sa 300  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje III. Zatim je u svaku jažicu dodano 100  $\mu\text{L}$  primarnog antitijela (anti-DNPH rabbit) i inkubira se 120 minuta na sobnoj temperaturi uz potreskivanje. Otopina primarnog antitijela je uklonjena i pločica isprana pet puta sa 200  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje III. Višak otopine uklonjen je pipetom. U svaku jažicu dodano je 100  $\mu\text{L}$  otopine sekundarnog antitijela (anti-rabbit HRP Goat IgG) i uzorci su inkubirani 60 minuta na sobnoj temperaturi uz potreskivanje. Otopina sekundarnog antitijela je uklonjena i pločica isprana pet puta s 200  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje III, a višak pufera uklonjen pipetom. 100  $\mu\text{L}$  otopine tetrametilbenzidina (TMB) dodano je u jažice i pločica inkubirana nekoliko minuta do razvijanja plave boje. Plava boja se razvija uslijed oksidacije TMB-a, odnosno vezanjem HRP-a na TMB. Reakcija je zaustavljena dodatkom 100  $\mu\text{L}$  otopine sumporne kiseline ( $c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ ) što uzrokuje promjenu boje iz plave u žutu te je očitana apsorbancija pri 450 nm na spektrofotometru (*Tecan Sunrise*). Podaci su prikupljeni pomoću softwarea *XFLUOR4* version 4.51.

### 3.4.4 Mjerenje staničnog ATP-a

Stanice kvasca istaložene su prethodno opisanim postupkom centrifugiranja i ispiranja u otopini PSB. Talozima stanica je dodano 100  $\mu\text{L}$  komercijalnog ATP pufera u kojem se nalazi zimolijaza 60U i zatim s uzorci inkubirani 1 sat na 37°C uz lagano miješanje na tresilici. Uzorci se zatim ostave na ledu 30 minuta i snažno vorteksiraju 2 minute. Tako pripremljenim uzorcima je određena koncentracija proteina metodom prema Bradfordu. Nakon određivanja koncentracije proteina, uzorcima je inaktiviran dio proteina prema standardnom protokolu za deproteinizaciju pomoću perklorne kiseline. Ovaj postupak se koristi za uklanjanje proteina, odnosno inaktivaciju enzima koji mogu smetati pri određivanju manjih molekula poput cAMP-a, ATP-a, glutationa i drugih. Uzorcima je dodano 20  $\mu\text{L}$  ledeno hladne perklorne kiseline (PCA), nakon čega su vorteksirani i inkubirani na ledu 5 minuta. Zatim je sljedilo centrifugiranje 2 minute na 16 000 g i 96  $\mu\text{L}$  supernatanta je prebačeno u novu mikrotubicu. Supernatantu je dodano 5  $\mu\text{L}$  ledeno hladne otopine za neutralizaciju iz komercijalnog kompleta i uzorci su promiješani okretanjem mikrotubica. Uzorci su inkubirani na ledu 5 minuta, nakon čega su centrifugirani 30 sekundi na 16 000 g. Deproteinizirani uzorci su razrijeđeni na 80 % početne koncentracije proteina koja je izračunata metodom prema Bradfordu.

Stanični ATP je mjereno je koristeći komercijalni komplet *ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (Bio-Vision)*. Ova metoda koristi reakciju fosforilacije glicerola pomoću ATP-a (ATP je donor fosforilne skupine) kojom će nastati produkt koji se može kvantificirati kolorimetrijskim ili fluorimetrijskim metodama. Na mikrotitarsku pločicu se u triplicatima nanese uzorci deproteiniziranog staničnog ekstrakta u volumenima 50  $\mu\text{L}$  i konačne masene koncentracije  $\gamma = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Uzorcima se zatim doda po 50  $\mu\text{L}$  komercijalne *ATP Master Mix* otopine.

Kako bi se konstruirao baždarni pravac, otopina standarda, odnosno čistog ATP-a koncentracije 1  $\text{mmol dm}^{-3}$ , iz komercijalnog kompleta nanese u volumenima od 0, 2, 4, 6, 8 i 10  $\mu\text{L}$  na mikrotitarsku pločicu i jažice su nadopunjene ATP puferom do volumena 50  $\mu\text{L}$  te je zatim u sve jažice dodano 50  $\mu\text{L}$  *ATP Mater Mix* otopine. Tako pripremljeni uzorci se inkubiraju 30 minuta do 1 sat u mraku nakon čega se očita apsorbancija uzoraka pri 570 nm na spektrofotometru (*Tecan Sunrise*), a podaci se prikupljaju pomoću softwera *XFLUOR4* version 4.51.

### 3.4.5 Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz prisutnost SDS-a (SDS-PAGE)

Natrijev dodecilsulfat (SDS) je anionski detergent koji solubilizira, disocira i denaturira većinu oligomernih proteina na podjedince. Uz to, SDS-polipeptidni kompleksi tijekom elektroforeze putuju prema anodi ovisno o molekularnoj masi proteina jer je omjer mase i naboja svih proteina jednak.<sup>34</sup> Za SDS-PAGE su korišteni poliakrilamidni gelovi debljine 1,0 mm. Koncentracija poliakrilamida određuje elastičnost, mehanička svojstva i gustoću gela te veličinu pora. Poliakrilamidni gel se sastoji od gela za sabijanja i gela za razdvajanje. Gel za sabijanje ima veće pore zbog niže koncentracije poliakrilamida, dok gel za razdvajanje ima manje pore u odnosu na gel za sabijanje. Koncentracija akrilamida je određuje dužinu lanaca poliakrilamida dok koncentracija bisakrilamida određuje učestalost unakrsnih veza između lanaca. TEMED i APS je potrebno dodati jer sudjeluju u reakciji polimerizacije, odnosno nastajanju lanaca poliakrilamida.

Napravljena su dva gela od kojih je jedan služio samo za vizualizaciju proteina, a drugi za prijenos proteina na membranu. Sastav smjese gela za razdvajanje  $w(\text{akrilamid-bisakrilamid}) = 7,5\%$  i gela za sabijanje naveden je u Tablici 3.4.

Smjesa gela za razdvajanje je pomoću mikropipete nanosena između stakala u aparaturi. Gel je nadslojen izopropanolom radi sprječavanja pristupa atmosferskom kisiku koji inhibira polimerizaciju, čime je istovremeno poravnat gornji rub gela. Gel je zatim pušten da polimerizira 20 minuta. Nakon polimerizacije izliven je izopropanol s vrha gela, prostor između stakala i rub gela je ispran redestiliranom vodom i na njega je izlivena smjesa gela za sabijanje. U gel je odmah zatim umetnut češalj za formiranje jažica. Polimerizacija je trajala 20 minuta.

**Tablica 3.4.** Sastav gela za SDS-PAGE koji je sačinjen od gela za sabijanje i gela za razdvajanje. Količine navedene u ovom receptu su dovoljnije za pripremu 2 gela.

GEL ZA SABIJANJE		GEL ZA RAZDVAJANJE	
komponenta	V/ $\mu\text{L}$	komponenta	V/ $\mu\text{L}$
Akrlamid 40% (w/v)	730	Akrlamid 40% (w/v)	<b>2820</b>
pufer Tris-HCl/SDS 0,5 mol $\text{dm}^{-3}$ pH 6.8	1875	pufer Tris-HCl/SDS 1,5 mol $\text{dm}^{-3}$ pH 8.8	3750
dH <sub>2</sub> O	4740	dH <sub>2</sub> O	8430
APS 10% (w/v)	37,5	APS 10% (w/v)	50
TEMED	7,5	TEMED	10
<b>ukupni volumen</b>	<b>7390</b>	<b>ukupni volumen</b>	<b>15 060</b>

U 20  $\mu\text{L}$  uzoraka proteinskog ekstrakta dodano je 5  $\mu\text{L}$  *Laemmli* pufera (sastav pufera je naveden na stranici 21) i uzorci su inkubirani 3 minute na  $95^\circ\text{C}$ . Uzorci i marker masa *Precision Protein Kaleidoscope* u volumenu od 6  $\mu\text{L}$  su zatim nanieseni na gel. Sastav pufera za elektroforezu naveden je na stranici 21. Elektroforeza je provodena u uređaju za vertikalnu elektroforezu (*Bio-Rad*) pri 25 mA po gelu, u trajanju od 1 sat i 15 minuta.

### 3.4.6 Western blot analiza

Po završetku elektroforeze jedan gel je ispran s destiliranom vodom i inkubiran 10 minuta u otopini *Coomasie Brilliant Blue R-250* uz potresanje. Gel je zatim odbojavan u puferu za odbojavanje (sastav pufera je naveden na stranici 21) tri puta po 10 minuta i skeniran na uređaju za skeniranje *BIO-5000 BioScanner*. Slika je obrađena pomoću softwera *ScanWizard Bio*.

Drugi gel, koji je predviđen za prijenos proteina na membranu, ekvilibriran je prvo u destiliranoj vodi, zatim u puferu za prijenos bez etanola. Nitrocelulozna membrana, *Whatmann* filter papiri i spužvice su također natopljeni u puferu za prijenos. Plastični okvir za prijenos je složen tako da je stavljena prvo donja spužvica, zatim filter papir na koji je položen gel, a na gel je prislonjena membrana tako da među njima nema mjehurića zraka. Membrana je zatim pokrivena drugim filter papirom i gornjom spužvicom. Okvir je dobro učvršćen i postavljen u uređaj tako da je membrana bila orijentirana prema + elektrodi. Prijenos proteina s gela na membranu proveden je na 200 mA u trajanju od 1h.

Nakon prijenosa proteina membrana je inkubirana u otopini *Ponceau S* 1-2 minute. Boja adsorbirana na membranu je ispirana s destiliranom vodom dok proteinske vrpce nisu postale jasno uočljive. Membrana je skenirana na uređaju za skeniranje *BIO-5000 BioScanner* i slike su obrađene pomoću softwera *ScanWizard Bio*. Nakon skeniranja membrana je isprana u puferu TBS-T dok se boja nije potpuno uklonila. Slijedilo je blokiranje membrane u 10 mL pufera za blokiranje (5% otopina BSA u TBS-T) u trajanju od 1 sat. Nakon toga membrana je inkubirana u otopini primarnog antitijela *Phospho-AMPK $\alpha$  Rabbit mAb* na  $4^\circ\text{C}$  preko noći uz miješanje na tresilici. Sljedeći dan se membrana je isprana u TBS-T tri puta po 15 minuta uz miješanje, nakon čega je inkubirana u otopini sekundarnog antitijela 20 000x *Goat anti-Rabbit IgG* u trajanju od 1 sat. Slijedilo je ispiranje membrane tri puta po 15 minuta u otopini TBS-T. Vizualizacija je provodena pomoću kemiluminiscentnog reagensa Luminola i izlaganjem

membrane filmu. Membrana je inkubirana u Luminol reagensu 1 minutu u mraku. U kemiluminiscentnoj reakciji Luminol se oksidira u reagens koji emitira svjetlost prilikom raspadanja. Membrana je izložena filmu u sobi za razvijanje filmova, a ekspozicija filma je varirana do pojave jasnih signala na filmu. U slučaju sojeva divljeg tipa i  $\Delta$ hsp42 optimalna ekspozicija filma je trajala 25 minuta.

## 3.5 Statistička analiza

### 3.5.1 Studentov T-test

U procjeni statističke značajnosti podataka korišten je studentov T-test. T-test je proveden u programu *Microsoft Excel 2013*.

Nul-hipoteza je pretpostavka da ne postoji razlika među uzorcima u populaciji od interesa. To je hipoteza koja se testira te se odbacuje ili prihvaća. Alternativna hipoteza vrijedi ako nul-hipoteza nije istinita. Često je alternativna hipoteza upravo hipoteza istraživača. U svim eksperimentima ovog istraživanja nul-hipoteza je bila pretpostavka da nema razlike između soja kvasca divljeg tipa i sojeva od interesa, bilo da se radi o razini staničnog ATP-a, razini karbonilacije proteina, razini ekspresije gena ili količini reaktivnih kisikovih vrsta u stanicama. Stoga je ova analiza rađena uvijek s dvije skupine podataka. Jednu skupinu su uvijek činili podaci za soj divljeg tipa kvasca, a drugu skupini podaci za neki drugi kvašćev soj od interesa.

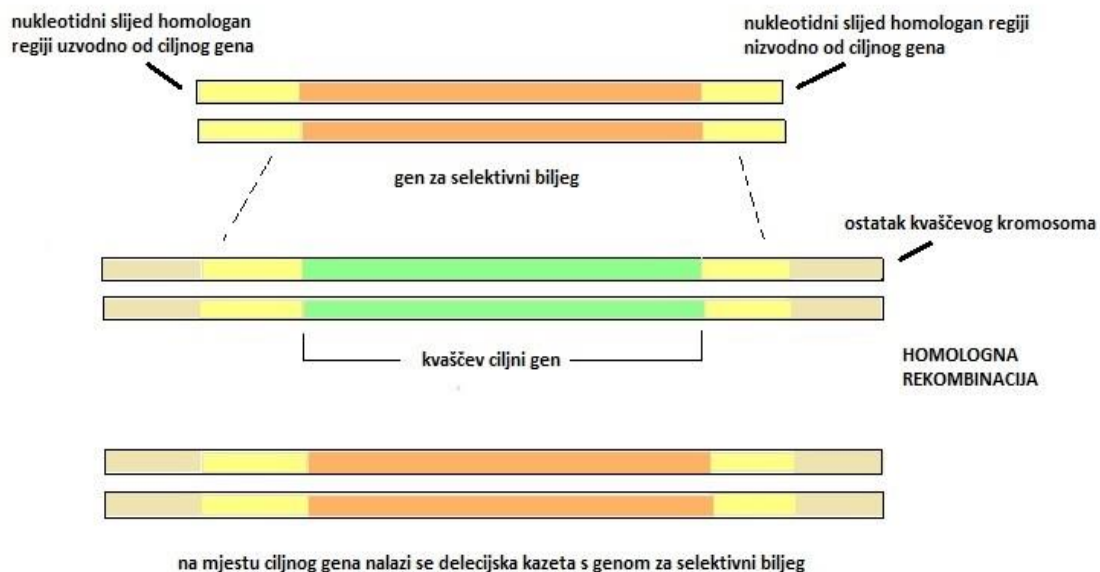
Dobivene P-vrijednosti govore o statističkoj razlici među uzorcima. Razina značajnosti je u svim eksperimentima bila 5% ( $P = 0,05$ ). Uz značajnost od 5% statistička razlika među uzorcima je značajna ako je vrijednost P manja od 5% i odbacuje se nul-hipoteza. U suprotnom, statistička razlika nije značajna, odnosno nema dovoljno dokaza za odbacivanje nul-hipoteze.<sup>35,36</sup>



## 4. Rezultati

### 4.1 Mutanti $\Delta hsp42\Delta snf1$ i $\Delta hsp42\Delta zwf1$

Do sada je poznato da delecija šaperona Hsp42 utrostručuje replikativni životni vijek kvasca i uzrokuje smanjenu glikolitičku aktivnost te aktivnost ciklusa limunske kiseline dok istovremeno pojačano aktivira  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina i put pentoza-fosfata. Stoga su konstruirana dva nova kvaščevoja soja u kojima je deletiran gen za šaperon Hsp42 te su deletirani ciljani geni koji kodiraju proteine metabolizma glukoze; kinaza Snf1 i glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza. Mutanti  $\Delta hsp42\Delta snf1$  i  $\Delta hsp42\Delta zwf1$  dobiveni su zamjenom divljeg tipa gena *snf1* i *zwf1* u soju  $\Delta hsp42$  s delecijom kazetom koja nosi biljeg otpornosti na antibiotik higromicin B. Delecijom kazeta također sadrži i restriksijska mjesta za enzime *SacI* (GAGCT<sup>A</sup>C) i *SaII* (G<sup>A</sup>TCGAC). Nukleotidni sljedovi od 500 pb homologni regijama uzvodno i nizvodno od ciljnog gena te delecijom kazeta veličine 1699 pb umnoženi su metodom lančane reakcije polimeraze (eng. *Polymerase chain reaction*, PCR). Navedeni homologni sljedovi potrebni su kako bi se kazeta specifično ugradila na mjesto gena koji se želi deletirati i stoga su podvrgnuti razgradnjom restrikcijom enzimima *SacI* i *SaII*, nakon čega su ligirani s delecijom kazetom. Konstruirana kazeta se ugrađuje u kromosom na mjesto gena koji se želi deletirati homolognom rekombinacijom. Shematski prikaz zamjene gena kazetom dan je Slikom 4.1.

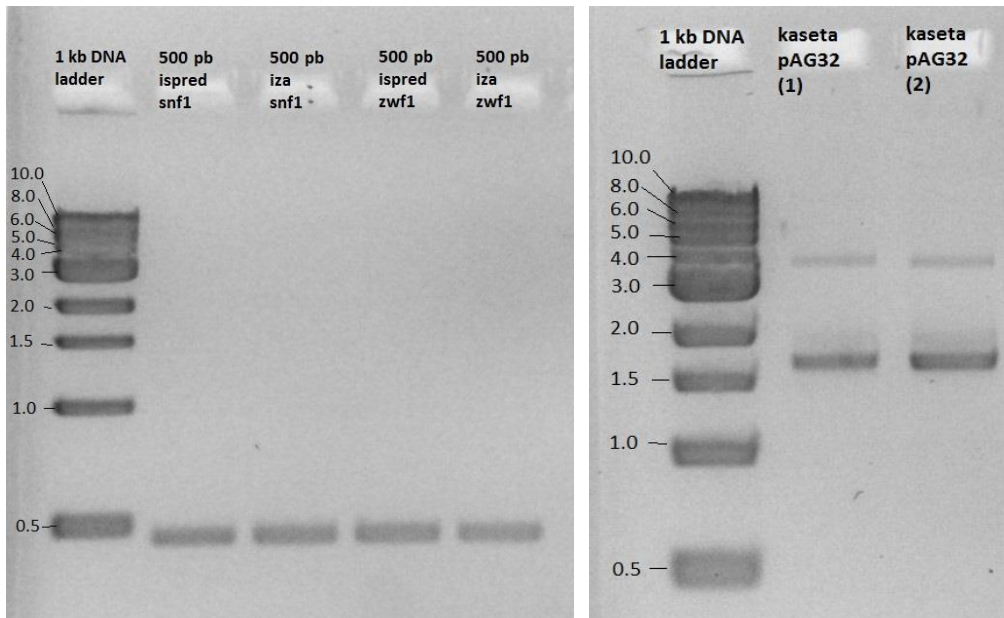


Slika 4.1. Delecija ciljnog gena u kvascu. Ciljni gen x zamijenjen je delecijom kazetom koja sadrži gen za selektivni marker, a koja će omogućiti jednostavnu selekciju mutanata na selektivnim podlogama.

Rezultati umnažanja delecije kazete te nukleotidnih sljedova od 500 pb homolognih s regijama uzvodno i nizvodno od gena *snf1* i gena *zwf1* koji se žele deletirati prikazani su na Slici 4.1.1.

a)

b)



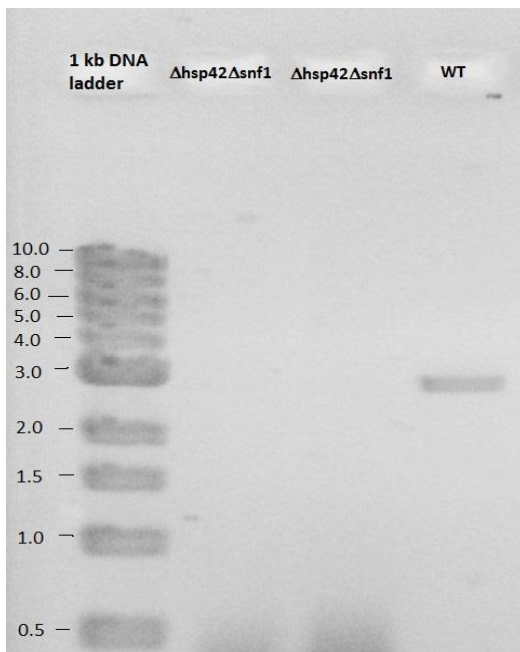
Slika 4.1.1. Na slici a) na agaroznom 1.5% gelu vidljive su vrpce veličine 500 pb koje odgovaraju nukleotidnim sljedovima koji su homologni s regijama uzvodno i nizvodno od ciljnih gena. Na slici b) također na 1.5% agaroznom gelu vidljive su dvije vrpce. Gornja, slabija vrpca koja se nalazi na približno 4 kb potječe od nerazgrađenog plazmida pAG32 (kalupa) koji je veličine 4160 pb, a donja deblja vrpca na oko 1.7 kb potječe od kazete koja ima gen za rezistenciju na higromicin B.

Iz slike je vidljivo da su delecijaska kazeta veličine 1699 pb i nukleotidni sljedovi od 500 pb homologije uspješno umnoženi PCR-om što je preduvjet za njihovu razgradnju restriktivnim enzimima i ligaciju u konstrukt te transformaciju tog konstrukta u stanice kvasca soja  $\Delta$ hsp42.

Nakon PCR-a, u fragmentima je hidrolizirana fosfodieterska veza pomoću restriktivnih endonukleaza *SacI* i *SalI* kako bi se stvorili ljepljivi stršeci krajevi na delecijaskoj kazeti i sljedovima od 500 pb homolognih s regijama oko ciljnih gena. Fragmenti su ligirani pomoću T4 DNA-ligaze, a ligacijske smjese su zatim transformirane u kvaščeve stanice soja  $\Delta$ hsp42 metodom s litijevim acetatom i polietilenglikolom. Smjese transformiranih stanica su nasade na selektivne hranjive podloge, a pojava kolonija na selektivnim podlogama govori da je transformacija uspješno provedena.

Dodatna potvrda ugradnje kazete na mjesto ciljnog gena provodi se metodom PCR na genomskoj DNA izoliranoj iz odabranih kolonija.

Kako bi se provjerilo jesu li kolonije koje su narasle na selektivnim podlogama s antibiotikom higromicinom B zaista traženi mutanti, s ploča je nasumično odabrano tri veće kolonije potencijalnog soja  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1 i dvije kolonije potencijalnog soja  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ zwf1. Iz njih je izolirana genomaska DNA koja je služila kao kalup u reakciji PCR. Za soj  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1 bio je očekivan izostanak vrpce na oko 2.7 kb koja je pristuna u divljem tipu, a koja potječe od gena snf1 (veličina gena je 1699 pb + 500 pb uzvodno + 500 pb nizvodno). Za soj  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ zwf1 je bio očekivan izostanak vrpce na 2.5 kb (veličina gena je 1518 pb + 500 pb uzvodno + 500 pb nizvodno). Rezultati PCR-a za soj  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1 prikazani su na Slici 4.1.2.



Slika 4.1.2. Rezultati PCR-a na genomskoj DNA izoliranoj iz odabrane kolonije soja  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1. Vidljiva je vrpca na oko 2.7 kb u soju divljeg tipa, a koja nije prisutna kod soja  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1.

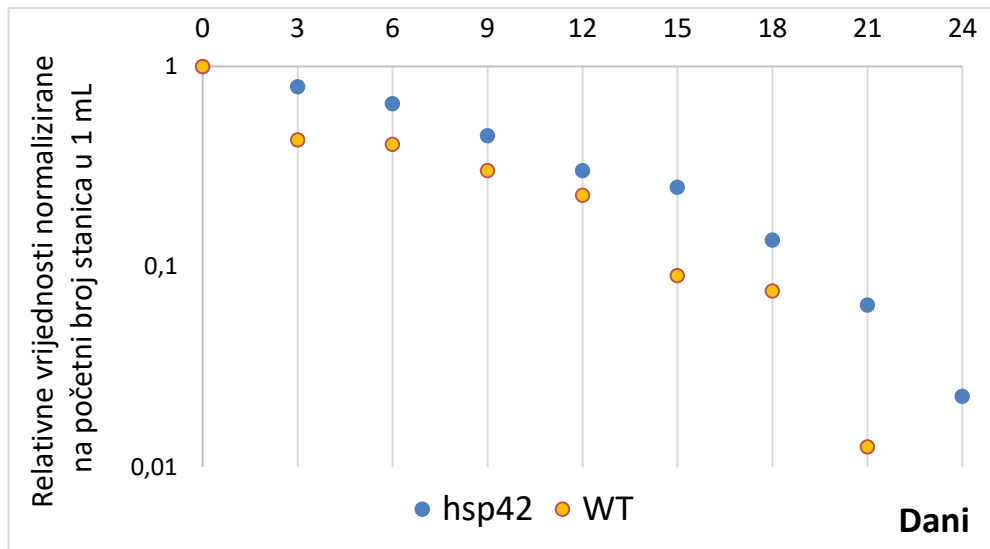
Budući da je vidljiva vrpca na oko 2.7 kb u divljem tipu, koja potječe od gena snf1 (1699 bp + 500 bp uzvodno + 500 bp nizvodno), a ta vrpca nije prisutna u konstruiranom mutantu  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1 može se tvrditi da je delecija gena snf1 bila uspješna. Delecija gena zwf1 u mutantu  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ zwf1 nije se mogla potvrditi ovom metodom, ali je metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR) potvrđeno da u stanici nisu prisutni transkripti gena zwf1 (pokus provela dr. sc Anita Kriško u Göttingenu, Njemačka). Na agaroznom gelu u slučaju mutantu  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ zwf1 i divljeg tipa pojavljivale su se vrpce na 5 kb ili vrpce uopće nisu bile prisutne u divljem tipu.

## 4.2 Kronološki životni vijek

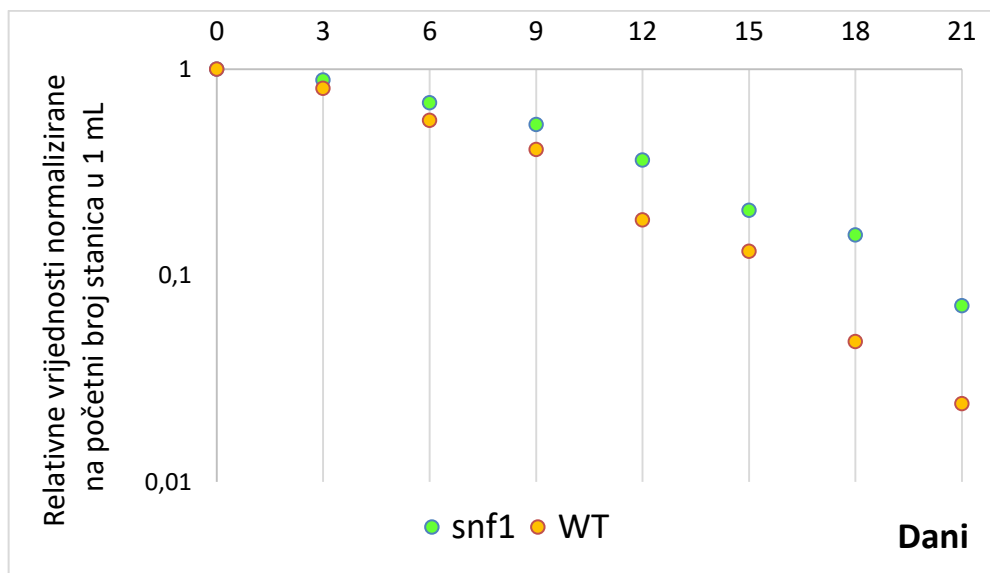
Kao što je već spomenuto, kvasac ima dva tipa životnog vijeka, replikativni (generacijski ili mitotički) te kronološki. Replikativni životni vijek se odnosi na broj stanica kćeri koje proizvodi stanica majka, odnosno broj podjela kroz koje svaka individualna stanica može proći. Kronološki životni vijek se mjeri kao vremenski period tijekom kojeg se stanice koje se više ne dijele (stanice u stacionarnoj,  $G_0$  fazi mitoze) mogu održavati na životu. Rezultati mjerenja replikativnog životnog vijeka mutanta  $\Delta hsp42$  (prikazani u Dodatku 1) pokazali su da je isti produžen čak tri puta i stoga su potaknuli na mjerenje i kronološkog životnog vijeka ovog mutanta. Osim za soj  $\Delta hsp42$  kronološki životni vijek mjereno je i za dvostruke deletante  $\Delta hsp42\Delta snf1$ ,  $\Delta hsp42\Delta zwf1$  te mutant  $\Delta snf1$ . Kao kontrola korišten je divlji tip kvasca *S. cerevisiae*.

Broj naraslih kolonija na pločama s hranjivom YPD podlogom na kojima je nasađeno po 100  $\mu\text{L}$  suspenzije stanica razrijeđenja  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$  određen je nakon 48 sati. U slučaju divljeg tipa broj kolonija na pločama na kojima se nalazila suspenzija stanica razrijeđenja  $10^{-5}$  varirao je između 50 i 70, a broj kolonija na pločama sa suspenzijom stanica razrijeđenja  $10^{-6}$  varirao je između 5 i 10. Broj stanica u 100  $\mu\text{L}$ , određen iz broja kolonija, skaliran je na broj stanica u 1 mL uzorka te je izračunat prosjek broja stanica između tehničkih replika i zatim prosjek razrijeđenja  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$ . Sve vrijednosti su normirane na početan broj stanica (0. dan mjerenja) za pripadni soj u 1 mL uzorka. Starost populacije na 50% preživljenja određena je računanjem 50% od početnog broja stanica prije normiranja (0. dan mjerenja) iz čega se moglo zatim zaključiti kojem danu mjerenja odgovara taj broj stanica.

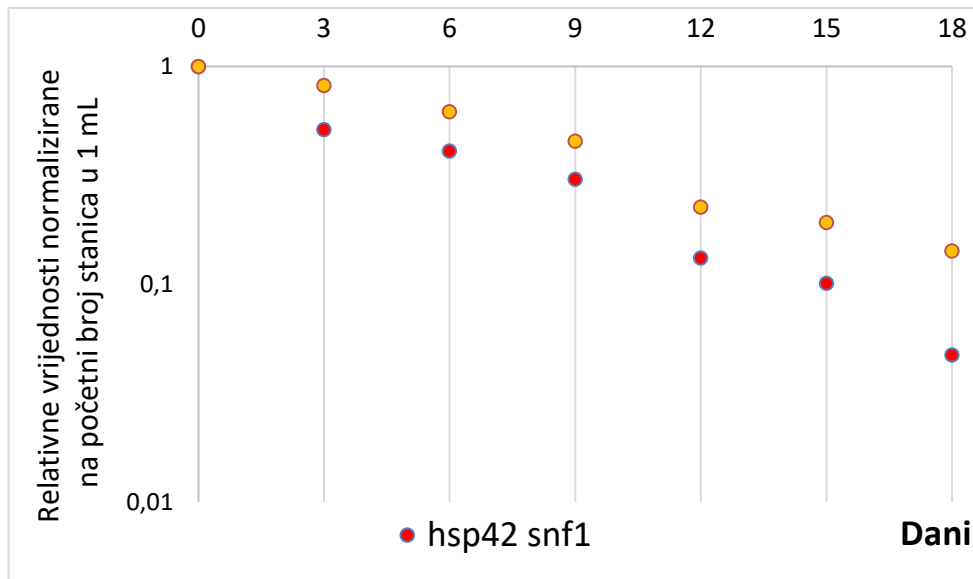
Rezultati mjerenja kronološkog životnog vijeka prikazani su Slikama 4.2.1. - 4.2.4., a iskazani su kao srednje vrijednosti dva nezavisna mjerenja, odnosno bioloških replika.



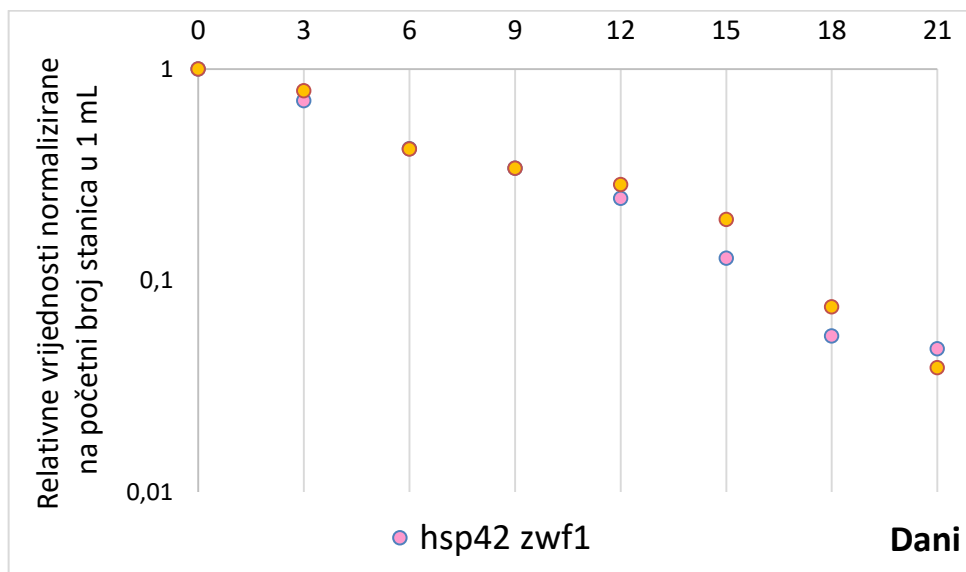
Slika 4.2.1. Kronološki životni vijek soja  $\Delta$ hsp42 te divljeg tipa koji služi kao kontrolni soj. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti dva nezavisna mjerenja, a vrijednosti su normirane na početan broj stanica u 1 mL uzorka. Starost populacije na 50% preživljenja za mutant  $\Delta$ hsp42 je 9 dana, dok je za divlji tip u ovom mjerenju starost populacije na 50% preživljenja 4 dana.



Slika 4.2.2. Kronološki životni vijek soja  $\Delta$ snf1 i divljeg tipa. Starost populacije na 50% preživljenja za mutant  $\Delta$ snf1 je 9 dana, dok je za divlji tip u ovom mjerenju 7 dana.



Slika 4.2.3. Kronološki životni vijek soja  $\Delta hsp42 \Delta snf1$  i divljeg tipa. Starost populacije na 50% preživljenja za mutant  $\Delta hsp42 \Delta snf1$  je 3 dana, dok je za divlji tip u ovom mjerenju 9 dana.



Slika 4.2.4. Kronološki životni vijek soja  $\Delta hsp42 \Delta zwf1$  i divljeg tipa. Starost populacije na 50% preživljenja je u slučaju mutanta  $\Delta hsp42 \Delta zwf1$  7 dana, dok je u slučaju divljeg tipa 5 dana u ovom mjerenju.

Iz mjerenja kronološkog životnog vijeka vidljivo je da delecija gena u sojevima  $\Delta hsp42$  i  $\Delta snf1$  uzrokuje efekt produljenja životnog vijeka, a zanimljivo je da se taj efekt gubi u soju koji ima deletirana oba navedena gena,  $\Delta hsp42\Delta snf1$ . Starost populacije na 50% preživljenja za mutant  $\Delta hsp42$  je 9 dana, dok je za divlji tip u istom mjerenju 4 dana. Starost populacije na 50% preživljenja za mutant  $\Delta snf1$  je 9 dana, a za divlji tip u tom mjerenju je 7 dana. Starost populacije na 50% preživljenja za mutant  $\Delta hsp42\Delta snf1$  je samo 3 dana, dok je za divlji tip u istom mjerenju bila 9 dana. Budući da je na razini metabolizma jedina značajna razlika među sojevima  $\Delta hsp42\Delta snf1$  i  $\Delta hsp42$  ta što mutant  $\Delta hsp42\Delta snf1$  ne usmjerava glukozu u put pentoze fosfata, kao mutant  $\Delta hsp42$  već u glikolizu, promjene u fenotipu životnog vijeka mogle bi se pripisati tome.

### 4.3 Karbonilacija proteina

Reaktivne aldehidne i ketonske skupine proteina smatraju se biomarkerima oksidacijskog stresa, ali i indikatorima problema u smatanju proteina pri konstantnom oksidacijskom stresu. Nastaju oksidacijom bočnih ogranaka aminokiselina u proteinima, i to aminokiselinskih ostataka prolina, arginina, lizina i treonina. Nakupljanje karboniliranih derivata proteina prisutno je kod bolesti poput Alzheimerove bolesti, dijabetesa, artritisa i mnogih drugih. Mjerenje stupnja karbonilacije proteina nakon derivatizacije njihovih karbonilnih skupine s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) je najčešće korištena metoda određivanja razine oštećenosti proteina. Derivatizacijom nastaje 2,4-dinitrofenil-hidrazonski derivat proteina koji se može detektirati tehnikom ELISA (eng. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) koja je vrlo osjetljiva, precizna i reproducibilna. Ovom tehnikom mjerena je karbonilacija proteina u sojevima divljeg tipa,  $\Delta hsp42$ ,  $\Delta hsp42\Delta snf1$  te  $\Delta hsp42\Delta zwf1$ .

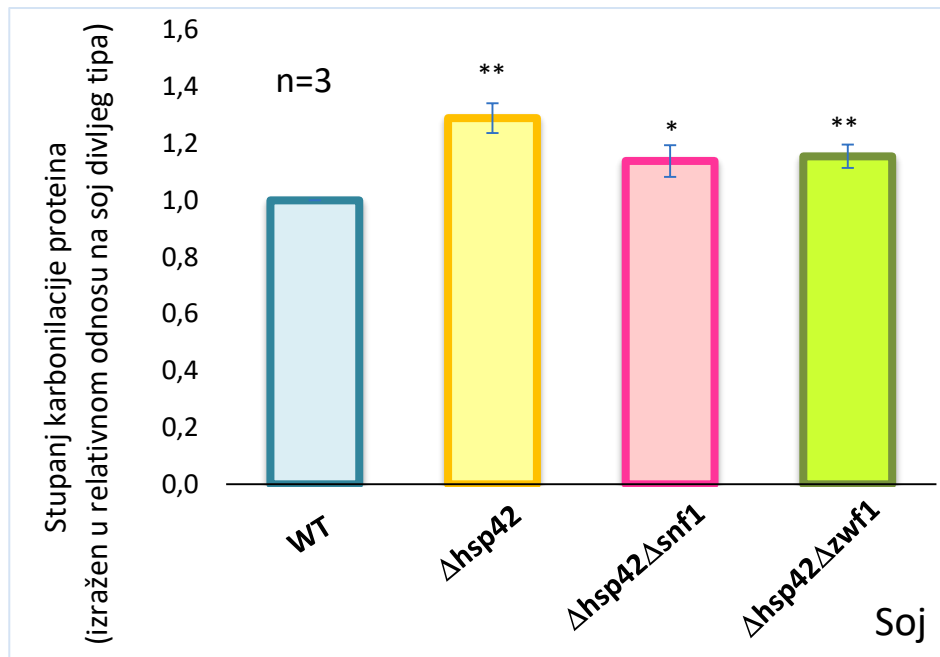
Uzorcima je određena koncentracija proteina metodom prema Bradfordu, a rezultati određivanja koncentracije prikazani su Tablicom 4.3.1.

**Tablica 4.3.1.** Određivanje koncentracije proteina metodom prema Bradfordu. Svaki soj imao je po 3 biološke replike. U tablici su navedene su srednje vrijednosti apsorbancija između tehničkih duplikata od kojih je oduzeta vrijednost slijepe probe te masena koncentracija iskazana u  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

soj		$A_{570\text{ nm}}$ - slijepe proba	protein $\gamma$ ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
WT	1	0,4360	9,3450
WT	2	0,6965	12,189
WT	3	0,5480	10,700
$\Delta\text{hsp42}$	1	0,5895	12,948
$\Delta\text{hsp42}$	2	0,5930	10,376
$\Delta\text{hsp42}$	3	0,7260	14,319
$\Delta\text{hsp42}\Delta\text{snf1}$	1	0,4935	10,695
$\Delta\text{hsp42}\Delta\text{snf1}$	2	0,6585	11,524
$\Delta\text{hsp42}\Delta\text{snf1}$	3	0,5590	10,924
$\Delta\text{hsp42}\Delta\text{zwf1}$	1	0,4305	9,2159
$\Delta\text{hsp42}\Delta\text{zwf1}$	2	0,2875	5,8591
$\Delta\text{hsp42}\Delta\text{zwf1}$	3	0,4290	9,1807

Proteinski ekstrakti poznatih koncentracija razrijeđeni su u otopini PBS do konačne masene koncentracije  $\gamma = 0.01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  i provedena je tehnika ELISA prema opisanom postupku. Apsorbancija uzoraka je očitana pri 450 nm na spektrofotometru (*Teacan Sunrise*). Dobivene vrijednosti apsorbancija normirane su na vrijednosti apsorbancije divljeg tipa iz istog mjerenja, budući da mjerenja nisu provedena odjednom za sve biološke replike. Rezultati mjerenja karbonilacije proteina prikazani su na Slici 4.3.1. Vrijednosti su normirane na vrijednosti divljeg tipa iz istog mjerenja.





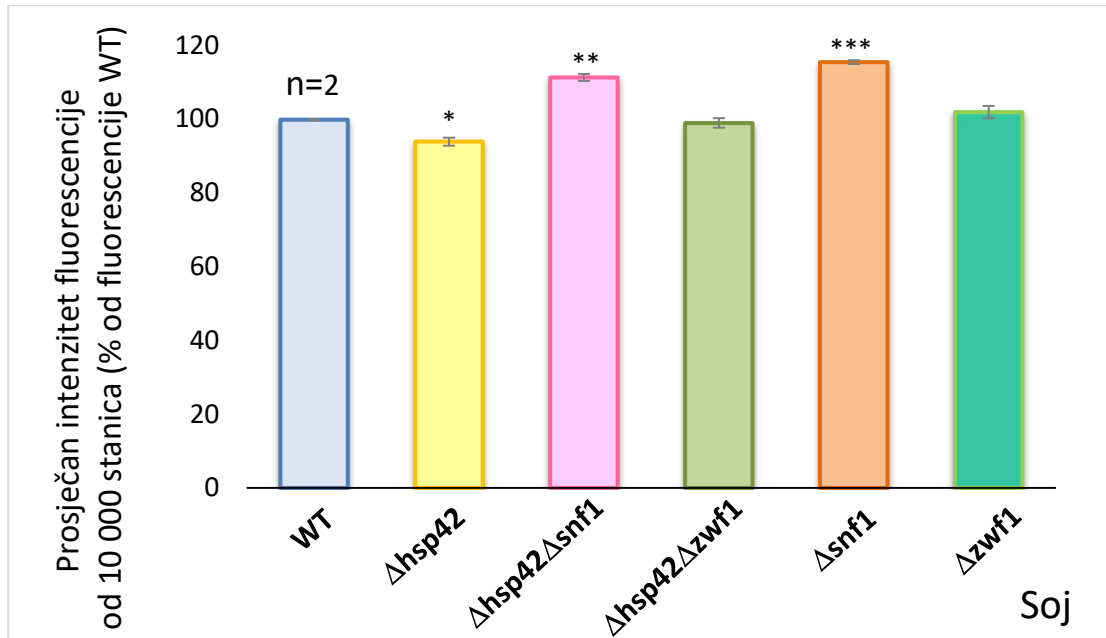
Slika 4.3.1. Karbonilacija proteina mjerena tehnikom ELISA. Vrijednosti su normirane na vrijednosti divljeg tipa iz istog mjerenja. Prikazana je standardna devijacija tri nezavisna biološka uzorka, a P-vrijednosti izračunate su T-testom (\* za  $P < 0.05$ , \*\* za  $P < 0.01$ ).

Prema rezultatima prikazanim na slici može se zaključiti da je stupanj proteinske karbonilacije povećan u svim delecijским sojevima u odnosu na divlji tip, ali neznatno. Kod soja  $\Delta hsp42$  je ta razlika nešto izraženija nego u sojevima  $\Delta hsp42\Delta snf1$  i  $\Delta hsp42\Delta zwf1$ .

#### 4.4 Reaktivne kisikove vrste, ROS

Reaktivne kisikove vrste (eng. *Reactive oxygen species*, ROS) nusprodukt su aerobnog metabolizma i oksidativne fosforilacije, a centar njihove proizvodnje su mitohondriji. Promjene u metabolizmu i morfologiji mitohondrija koje rezultiraju povećanim količinama reaktivnih kisikovih vrsta obilježja su starenja. Za mjerenje razine reaktivnih kisikovih vrsta u sojevima divljeg tipa,  $\Delta hsp42$ ,  $\Delta hsp42\Delta snf1$ ,  $\Delta hsp42\Delta zwf1$ ,  $\Delta snf1$  i  $\Delta zwf1$  korišten je supstrat 2',7'-diklorfluorescein diacetat (DCF) zbog čije se pretvorbe u fluorescentni 2',7'-diklorfluorescein može mjeriti intenzitet fluorescencije stanica na protočnom citometru (*Becton-Dickinson FACSalibur*, 488 nm Argon laser i 635 nm crveni diodni laser).

Za određivanje srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije korišten je software FlowJo verzija 7.2.5 Rezultati mjerenja prikazani su na Slici 4.4.1.



Slika 4.4.1. Ukupne reaktivne kisikove vrste u stanici, izražene kao prosječan intenzitet fluorescencije probe DCF od 10 000 stanica (% od fluorescencije divljeg tipa). Mjerenja su provedena u tehničkim triplikatima i biološkim duplikatima. Prikazana je standardna devijacija dva nezavisna biološka uzorka, a P-vrijednosti su izračunate T-testom (\* za  $P < 0.05$ , \*\* za  $P < 0.01$ , \*\*\* za  $P < 0.001$ ). (Pokus izvela dr.sc Anita Kriško u Göttingenu, Njemačka)

Jedina značajnija promjena u razinama reaktivnih kisikovih vrsta u odnosu na divlji tip može se uočiti u sojevima  $\Delta hsp42\Delta snf1$  i  $\Delta snf1$ . U soju  $\Delta hsp42$  prosječan intenzitet fluorescencije probe DCF smanjen je samo približno 5% u odnosu na divlji tip, dok je u sojevima  $\Delta hsp42\Delta snf1$  i  $\Delta snf1$  porastao za približno 15%.

## 4.5 Razina staničnog ATP-a

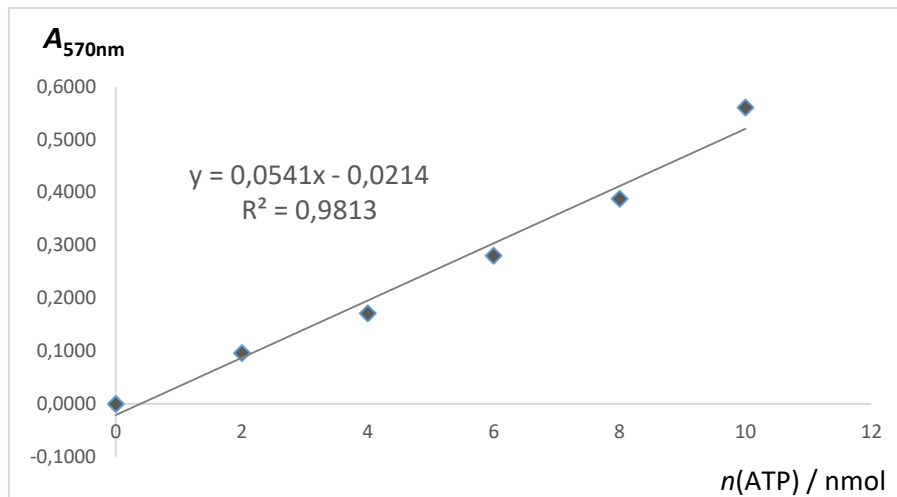
Gotovo svi biokemijski procesi koji se odvijaju u stanici koriste energiju pohranjenu u molekuli ATP-a što ga čini najvažnijim oblikom kemijske energije u živim bićima. Razina ukupnog staničnog ATP-a u sojevima kvasca divljeg tipa,  $\Delta hsp42$ ,  $\Delta hsp42\Delta zwf1$  i  $\Delta hsp42\Delta snf1$  određena je kolorimetrijskom metodom koristeći komercijalni komplet *ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit*.

Uzorcima je određena koncentracija proteina metodom prema Bradfordu, a rezultati određivanja koncentracije proteina prikazani su Tablicom 4.5.1.

**Tablica 4.5.1.** Određivanje koncentracije proteina metodom prema Bradfordu.

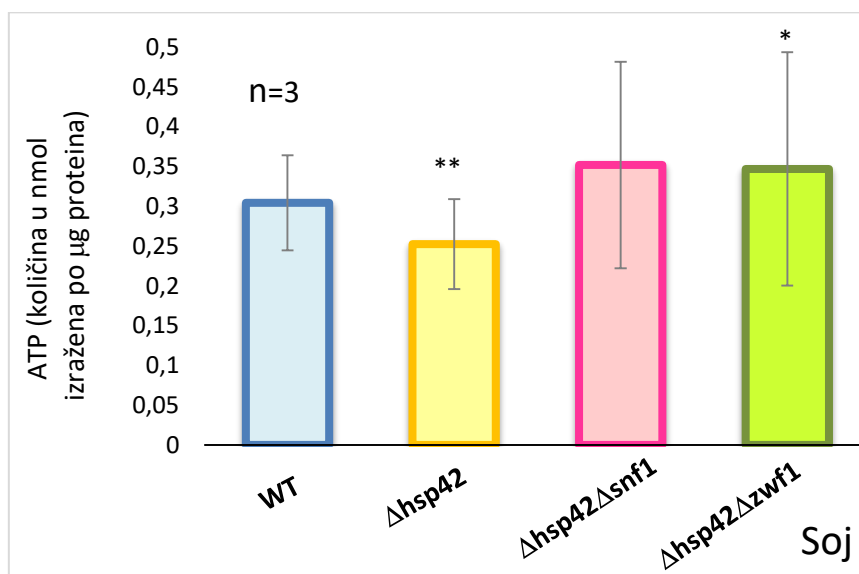
soj		$A_{570\text{ nm}}$ - slijepa proba	protein $\gamma$ ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	80% početne koncentracije
WT	1	0,1120	1,7171	1,3737
WT	2	0,1035	1,5454	1,2363
WT	3	0,1420	2,323	1,858
$\Delta hsp42$	1	0,1760	3,0101	2,4080
$\Delta hsp42$	2	0,1175	1,8282	1,4626
$\Delta hsp42$	3	0,1590	2,6666	2,1333
$\Delta hsp42\Delta snf1$	1	0,0705	0,8787	0,7030
$\Delta hsp42\Delta snf1$	2	0,1495	2,4747	1,9797
$\Delta hsp42\Delta snf1$	3	0,1200	1,9981	1,5985
$\Delta hsp42\Delta zwf1$	1	0,1550	2,5858	2,0686
$\Delta hsp42\Delta zwf1$	2	0,0690	0,8484	0,6787
$\Delta hsp42\Delta zwf1$	3	0,0720	0,9090	0,7272

Apsorbancija uzoraka i otopine standarda (otopina čistog ATP-a koncentracije  $1\text{ mmol dm}^{-3}$ ) očitana je pri 570 nm na spektrofotometru (*Tecan Sunrise*), a podaci prikupljeni pomoću softwera *XFLUOR4* version 4.51. Baždarni pravac s pripadnom jednadžbom je prikazan na Slici 4.5.1.



Slika 4.5.1. Baždarni pravac za određivanje količine staničnog ATP-a koristeći komercijalni komplet *ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit*.

Nakon što je uzorcima izmjerena apsorbancija pomoću jednadžbe baždarnog pravca izračunata je količina ATP-a izražena u nmol koja se nalazila 50  $\mu$ L uzorka. Budući da su koncentracije proteina unesenih u reakciju prethodno određene metodom prema Bradfordu, rezultate mjerenja razine ATP-a moguće je izraziti u nmol po  $\mu$ g unesenog proteina, a grafički su prikazani na Slici 4.5.2.



Slika 4.5.2. Količina staničnog ATP-a izražena u nmol po  $\mu$ g staničnih proteina. Prikazana je standardna devijacija tri nezavisna biološka uzorka, a P-vrijednosti su izračunate T-testom (\* za  $P < 0.05$ , \*\* za  $P < 0.01$ ).

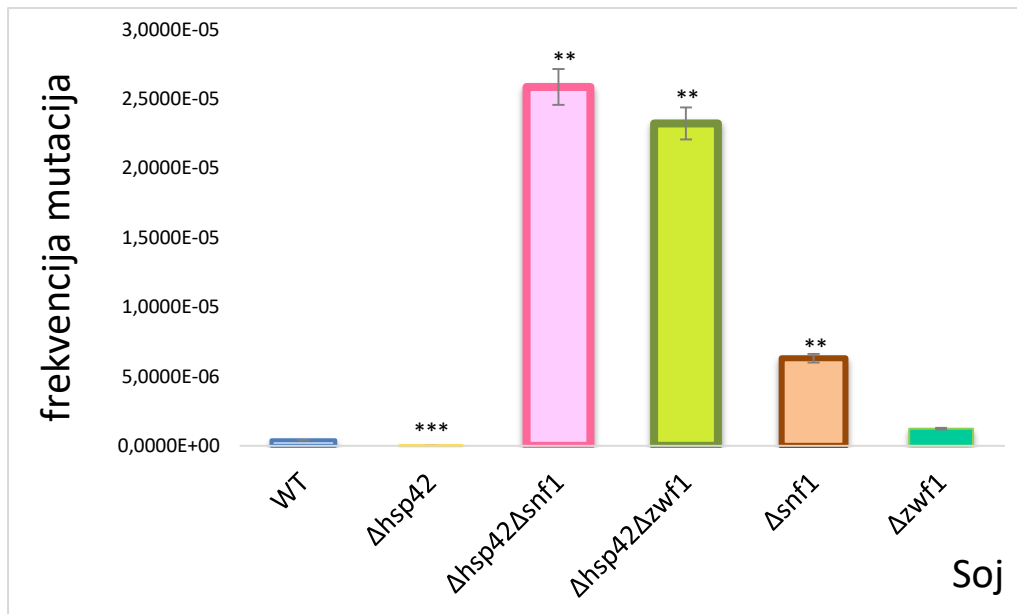
Iz slike je vidljivo da razina ATP-a pada u soju  $\Delta hsp42$  za približno 0,05 nmol po  $\mu\text{g}$  staničnih proteina dok u sojevima  $\Delta hsp42\Delta snf1$  i  $\Delta hsp42\Delta zwf1$  raste za približno 0,05 nmol po  $\mu\text{g}$  staničnih proteina u odnosu na divlji tip. Iako su novokonstruirani mutanti izloženi proteotoksičnom stresu čini se da taj stres nije u korelaciji s proizvodnjom ATP-a u sojevima  $\Delta hsp42\Delta zwf1$  i  $\Delta hsp42\Delta snf1$ . Dakle, novokonstruirani mutanti ne profitiraju preko smanjenja utroška APT-a kao što to čini mutant  $\Delta hsp42$ .

## 4.6 Frekvencija mutacija

Frekvencija spontanih mutacija izmjerena je u sojevima divljeg tipa,  $\Delta hsp42$ ,  $\Delta hsp42\Delta snf1$ ,  $\Delta snf1$ ,  $\Delta zwf1$  i  $\Delta hsp42\Delta zwf1$  kako bi se utvrdilo imaju li sojevi izloženi stresu (delecija šaperona) veću tendenciju za ugradnju pogrešnog nukleotida pri replikaciji DNA. Naime, kanavanin je toksični strukturni analog arginina kojeg prepoznaje arginil-tRNA sintetaza i koji se stoga tijekom sinteze proteina može ugraditi umjesto arginina. Arginin i kanavanin se unose u stanicu pomoću arginin-permeaze koja je kodirana genom CAN1. Mutacija koja inaktivira arginin permeazu rezultira otpornošću na kanavanin. Dakle, mutanti koji nemaju mogućnost unosa kanavanina u stanicu mogu rasti na pločama s kanavaninom, dok oni s aktivnom arginin-permeazom unose kanavanin koji je vrlo toksičan i stoga ne mogu preživjeti. Na Slici 4.6.1. grafički su prikazani rezultati mjerenja frekvencije mutacija za spomenute sojeve, a u Tablici 4.6.1 rezultati su prikazani i brojčano.

**Tablica 4.6.1.** Frekvencija mutacija prikazana kao prosjek tri nezavisna biološka uzorka.

soj	Frekvencija mutacija
WT	$4,0 \cdot 10^{-7}$
$\Delta hsp42$	$7,333 \cdot 10^{-10}$
$\Delta hsp42\Delta snf1$	$2,5877 \cdot 10^{-5}$
$\Delta hsp42\Delta zwf1$	$2,3247 \cdot 10^{-5}$
$\Delta snf1$	$6,3159 \cdot 10^{-6}$
$\Delta zwf1$	$1,2333 \cdot 10^{-6}$



Slika 4.6.1. Frekvencija mutacija. Prikazana je standardna devijacija tri nezavisna biološka uzorka, a P-vrijednosti su izračunate T-testom (\* za  $P < 0.05$ , \*\* za  $P < 0.01$ , \*\*\* za  $P < 0.001$ ).

Iz rezultata prikazanih u tablici i slike vidljivo je da je frekvencija mutacija u soju  $\Delta hsp42$  smanjena čak tri reda veličine dok je u sojevima  $\Delta hsp42\Delta snf1$ ,  $\Delta snf1$  i  $\Delta hsp42\Delta zwf1$  povećana u odnosu na divlji tip. Dakle, smanjenje frekvencije mutacija u soju  $\Delta hsp42$  na neki način ovisna je o aktivnosti Snf1 kinaze, kao i o Zwf1.

#### 4.7 Western blot detekcija razine fosforilacije kinaze Snf1

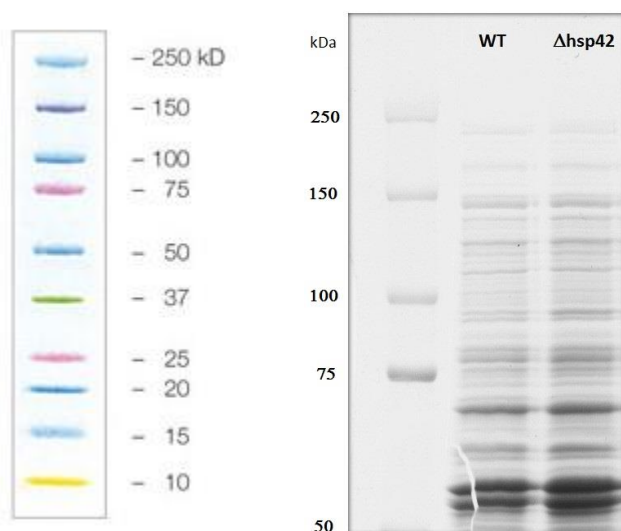
U soju u  $\Delta hsp42$  može se promatrati razina fosforilacije kinaze Snf1 te usporediti s divljim tipom. Inaktivni oblik Snf1 kinaze je defosforilirani oblik. Kada razina glukoze padne, Snf1 se aktivira fosforilacijom na aminokiselinskom ostatku Thr210. Poznato je da se kinaza Snf1 aktivira u uvjetima kalorijske restrikcije, no na ovaj način može se saznati hoće li se ova kinaza aktivirati u uvjetima proteinskog stresa, odnosno uvjetima nedostatka šaperona. To bi moglo sugerirati povezanost metabolizma i puteva odgovora na stres.

Rezultati određivanja koncentracije proteina metodom prema Bradfordu, opisanom ranije, prikazani su Tablicom 4.7.1.

**Tablica 4.7.1.** Određivanje koncentracije proteina metodom prema Bradfordu za divlji tip i soj  $\Delta$ hsp42.

soj	$A_{570\text{ nm}}$ - slijepa proba	protein $\gamma$ ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
WT	0,6735	12,2053
$\Delta$ hsp42	0,7225	13,2012

Na Slici 4.7.1. prikazan je gel koji sadrži ukupne proteine nakon poliakrilamidne elektroforeze uz prisutnost SDS-a. Na gel je nanoseno 25  $\mu\text{g}$  proteina iz proteinskog ekstrakta sojeva divljeg tipa i  $\Delta$ hsp42.



Slika 4.7.1. Marker masa *Precision Protein Kaleidoscope* i slika poliakrilamidnog gela koji sadrži ukupne proteine, skeniranog nakon inkubacije s bojom *Coomassie Brilliant Blue*.

Prijenos proteina s gela na membranu je bio uspješan što se pokazalo nakon inkubacije membrane u otopini *Ponceau S* koja se veže na proteine. Vizualizacija je provedena inkubacijom membrane u kemiluminiscentnom reagensu Luminolu otprilike 1 minutu u mraku. Potom se membrana izložila filmu, a ekspozicija filma je varirala od 30 sekundi do 60 minuta. Iako su se nakon 25 minuta pojavili signali u soju divljeg tipa i soju  $\Delta$ hsp42, signal koji potječe od fosforiliranog oblika kinaze Snf1 se nije dovoljno jasno mogao razlučiti. Nakon 60 minuta ekspozicije filma signali nisu postali ništa jači od onih pri 25 minutnoj ekspoziciji. Varirana je

i duljina inkubacije membrane s kemiluminiscentnim reagensom Luminolom, no ono nije imalo nikakav utjecaj na signale na filmovima. Iako je na slici prikazan gel na koji je nanoseno 25  $\mu\text{g}$  proteina, razlike na filmovima što se tiče signala od fosforilirane kinaze Snf1 nije bilo ni u slučaju kada je nanoseno po 50  $\mu\text{g}$  proteina na gel. Stoga nije bilo moguće utvrditi aktivira li se kinaza Snf1 u deletantu  $\Delta\text{hsp42}$ .



## 5. Rasprava

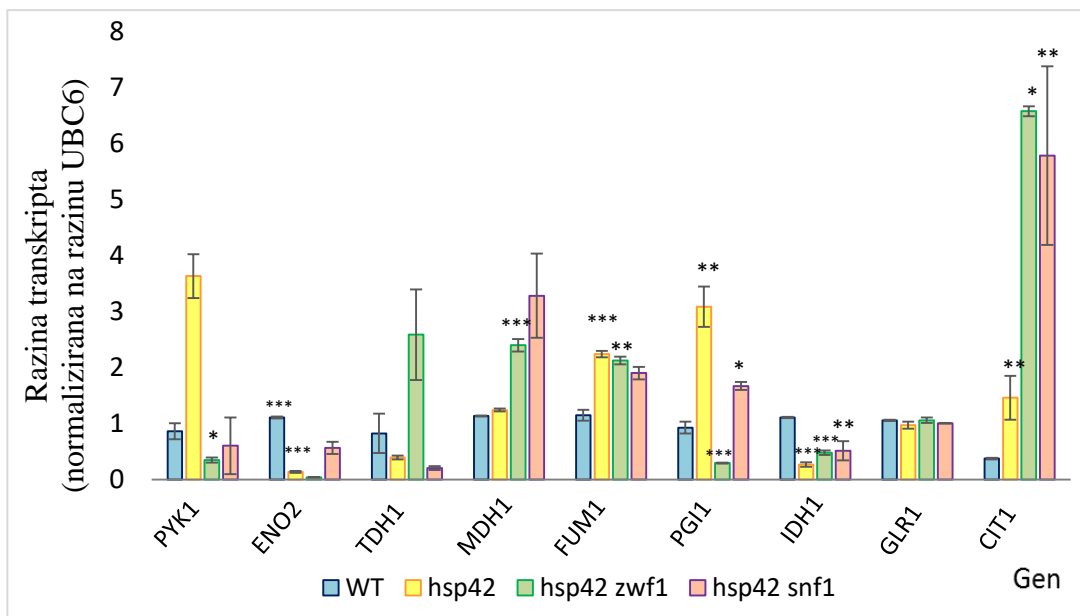
U dosadašnjim istraživanjima proučen je stanični odgovor na poboljšanu proteostazu u obliku pojačane ekspresije šaperona te potencijalna povezanost proteostaze s metaboličkim putevima. U neobjavljenom radu grupe dr. sc. Anite Kriško otkriveno je da se mijenjanjem količine nepravilno smotanih proteina u stanici mijenja i njena metabolička i mitohondrijska aktivnost. Nedavno je pokazano i da blagi ili umjereni stres, poput gubitka nekog od šaperona u različitim staničnim odjeljcima, potiče komunikaciju među odjeljcima koja stanici omogućava oporavak od proteotoksičnog stresa i produljuje njen replikativni životni vijek. U tim istraživanjima se posebno zanimljivim pokazao šaperon Hsp42. Poznato je da je Hsp42 ATP-neovisni šaperon koji je aktivan pri svim temperaturnim uvjetima, a potreban je za sakupljanje pogrešno smotanih proteina u komplekse te njihovo odvođenje na mjesta gdje se takvi kompleksi mogu solubilizirati. Delecija ovog šaperona čak utrostručuje replikativni životni vijek kvasca i uzrokuje smanjenu glikolitičku aktivnost te aktivnost ciklusa limunske kiseline dok istovremeno pojačano aktivira  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina i put pentoza fosfata. Smatra se da bi nedostatak šaperona Hsp42 i nemogućnost stvaranja agregata mogao biti uzrok umjerenom stresu jer je on potreban za uklanjanje krivo smotanih proteina iz citoplazme, ali i da je stvaranje agregata na neki način povezano s replikativnim starenjem u kvascu.

U ovom istraživanju cilj nam je bio istražiti mehanizam produljenja životnog vijeka kvasca uslijed nedostatka šaperona Hsp42. Stoga su napravljeni i proučeni sojevi s dvostrukim delecijama gena,  $\Delta hsp42\Delta snf1$  i  $\Delta hsp42\Delta zwf1$ . U oba soja je bio deletiran gen upravo za šaperon Hsp42, dok je druga delecija bila delecija gena za kinazu Snf1 koja je jedan je od glavnih regulatora metabolizma glukoze u kvascu, te se smatra da sudjeluje i u usmjeravanju glukoze u glikolizu ili put pentoze fosfata, odnosno delecija gena za enzim glukoza-6-fosfat-dehidrogenazu koji je najvažniji enzim puta pentoza-fosfata i za kojeg je pokazano da njegova prekomjerna ekspresija štiti stanice od oksidativnog stresa.

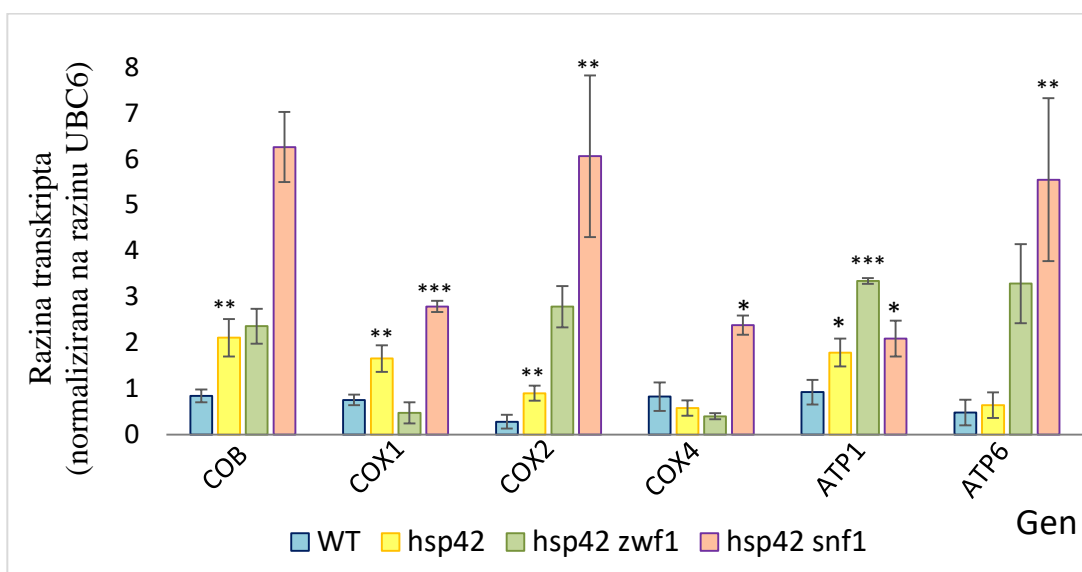
Za novokonstruirane sojeve  $\Delta hsp42\Delta snf1$  te  $\Delta hsp42\Delta zwf1$  mjeren je kronološki životni vijek, kao i za sojeve  $\Delta hsp42$  i  $\Delta snf1$ . U soju  $\Delta hsp42$  izmjereno je produljenje kronološkog životnog vijeka što je bilo i očekivano s obzirom na produljen replikativni životni vijek. Starost populacije na 50% preživljenja za mutant  $\Delta hsp42$  bila je 9 dana, dok je za divlji tip u istom mjerenju starost populacije na 50% preživljenja bila samo 4 dana. Zanimljivo je da je kronološki životni vijek bio produljen i u soju  $\Delta snf1$  u kojem nedostaje kinaza Snf1 što je

također oblik umjerenog stresa. No u soju  $\Delta hsp42\Delta snf1$  gubi se efekt produljenja životnog vijeka. Starost populacije na 50% preživljenja za mutant  $\Delta hsp42\Delta snf1$  je samo 3 dana, dok je za divlji tip u istom mjeranju 9 dana. Ono što se nije moglo očekivati iz do sada otkrivenog jest da će kronološki životni vijek ostati produljen i u mutantu  $\Delta hsp42\Delta zwf1$ , no bilo bi dobro ponoviti mjerenja kronološkog životnog vijeka za ovaj soj kako bi se sa sigurnošću moglo tvrditi da je to zaista tako.

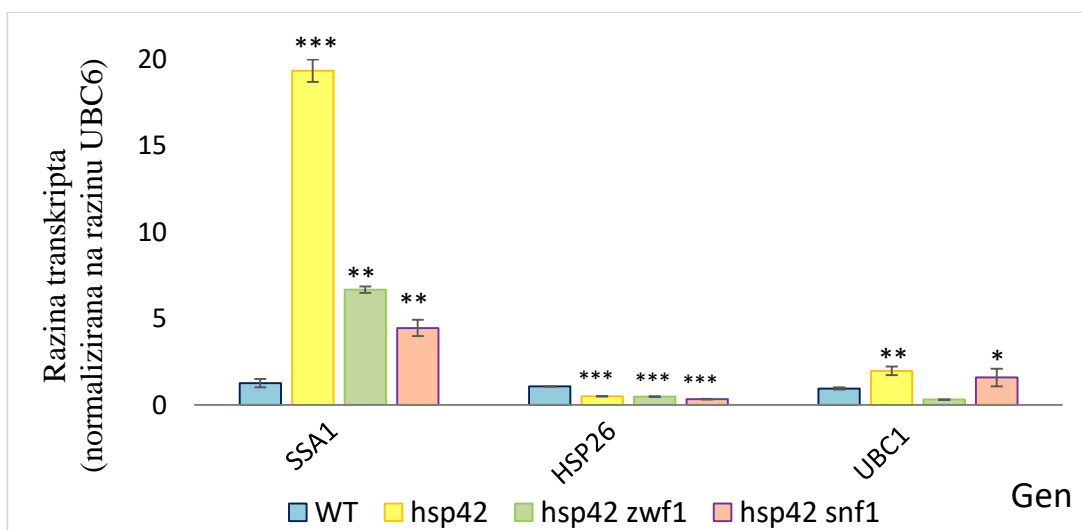
Pretpostavlja se da je produljenje replikativnog i kronološkog životnog vijeka u sojevima u kojima je deletiran po jedan gen za šaperon povezano s metaboličkim promjenama stoga je mjerena razina ekspresije gena koji su uključeni u metabolizam, respiraciju ili sudjeluju u putevima odgovora na proteinski stres. Pokus je proveden od strane dr.sc. Anite Kriško u Göttingenu (Njemačka), a neobjavljeni rezultati prikazani Slikama 5.1. - 5.3. Mjerenja su napravljena u tehničkim i biološkim duplikatima. Prikazana je standardna devijacija dva nezavisna biološka uzorka, a P-vrijednosti su izračunate T-testom (\* za  $P < 0.05$ , \*\* za  $P < 0.01$ , \*\*\* za  $P < 0.001$ ).



Slika 5.1. Razina transkripta gena iz metabolizma u sojevima divljeg tipa,  $\Delta hsp42$ ,  $\Delta hsp42\Delta snf1$  i  $\Delta hsp42\Delta zwf1$ . Razina transkripta normalizirana je na razinu transkripta gena UBC6.



Slika 5.2. Razina transkripta gena koji sudjeluju u respiraciji u navedenim sojevima. Razina transkripta normalizirana je na razinu transkripta gena UBC6.



Slika 5.3. Razina transkripta gena koji sudjeluju u obrani od proteotoksičnog stresa (održavanje konformacija proteina i degradacija oštećenih proteina) u navednim sojevima. Razina transkripta normalizirana je na razinu transkripta gena UBC6.

Razina transkripata gena koji sudjeluju u ciklusu limunske kiseline, poput gena za malat-dehidrogenazu (MDH1), fumarazu (FUM1) i citrat-sintazu (CIT1) povećana u sojevima s dvostrukom delecijom gena. U svim delecijским sojevima razina transkripta gena za izocitrat-dehidrogenazu (IDH1) je dvostruko smanjena što znači, zajedno s povećanom razinom transkripta gena CIT1, da vjerojatno dolazi do akumulacije citrata. Raniji rezultati qPCR-a su pokazali da mutant  $\Delta$ hsp42 usmjerava glukozu u put pentoza-fosfata, ali da mutant  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1 usmjerava glukozu ipak u glikolizu pa bi se promjene u fenotipu životnog vijeka mogle pripisati izostanku aktivacije puta pentoza-fosfata. U soju  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ zwf1 smanjene razine gena za piruvat-kinazu (PYK1), enolazu (ENO2) i glukoza-6-fosfat-izomerazu (PGI1) iz glikolize sugeriraju da je glikoliza potisnuta. Represija glikolize u ovom soju je neočekivana i vrlo neobična budući da  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ zwf1 ne može aktivirati put pentoze fosfata zbog deletiranog gena za glukoza-6-fosfat-dehidrogenazu.

Od razina transkripata gena koji su uključeni u respiraciju najzanimljivije rezultate pokazuje mutant  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ snf1. U ovom soju znatno je povećana razina transkripta gena za citokrom *b* ili Kompleks III (COB), gena za podjedinice citokroma *c* ili Kompleksa IV (COX1, COX2, COX4) te gena za podjedinice mitohondrijske ATP-sintaze (ATP1 i ATP6) u odnosu na divlji tip. Zanimljivo, smatra se da je upravo Kompleks III glavni proizvođač reaktivnih kisikovih vrsta poput  $O_2^-$ . Kod mutanta  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ zwf1 također su povećane razine transkripata gena za podjedinice ATP-sintaze (ATP1 i ATP6). Također se pokazalo da kod mutanata  $\Delta$ hsp42 i  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ zwf1 postoji neravnoteža u ekspresiji podjedinica Kompleksa IV, odnosno citokrom *c* oksidaze iz procesa oksidativne fosforilacije.

U kontekstu gena koji sudjeluju u smatanju ili degradaciji proteina u citosolu, najviše se ističe razina transkripta gena za Hsp70 (SSA1) koja je u odnosu na divlji tip povećana u svim sojevima, posebice u soju  $\Delta$ hsp42 u kojem je povećana približno 10 puta. Ti rezultati sugeriraju da nedostatak šaperona Hsp42 izaziva proteotoksični stres te da stanice reagiraju pojačanom ekspresijom šaperona Hsp70 (SSA1) kako bi se obranile od pogrešno smotanih proteina. Zanimljivo, razina transkripta citosolnog gena za šaperon Hsp26 (HSP26), koji se obično aktivira tijekom temperaturnog stresa, dvostruko je smanjena u svim sojevima u odnosu na divlji tip. To sugerira da se u sojevima u kojima je deletiran šaperon Hsp42 neće doći do ekspresije niti šaperona Hsp26 te da ekspresija Hsp26 na neki način prati razinu ekspresije šaperona Hsp42.

Reaktivne kisikove vrste nusprodukt su aerobnog metabolizma i oksidativne fosforilacije, a centar njihove proizvodnje su mitohondriji. Postoji nekoliko vrsta oksidativnih modifikacija koje su inducirane reaktivnim kisikovim vrstama, a najštetnija od njih je karbonilacija zbog nemogućnosti popravka takvih oštećenja. Karbonilirani proteini su manje aktivni i manje termostabilni pa takve modifikacije proteina uzrokuju gubitak njihove strukturne i funkcije. U skladu s očekivanjima razina proteinske karbonilacije povećana je u svim delecijским sojevima u odnosu na divlji tip, iako ta razlika nije velika. Kod soja  $\Delta hsp42$  je razlika u odnosu na divlji tip izraženija nego u sojevima  $\Delta hsp42\Delta snf1$  i  $\Delta hsp42\Delta zwf1$ , ali neobično, razina reaktivnih kisikovitih vrsta upravo je u soju  $\Delta hsp42$  manja u usporedbi s divljim tipom. Razina ukupnih reaktivnih kisikovitih vrsta povećana je u soju  $\Delta hsp42\Delta snf1$ , ali ne i u soju  $\Delta hsp42\Delta zwf1$ .

Mjerena je frekvencija spontanih mutacija kako bi se utvrdilo imaju li sojevi izloženi stresu veću tendenciju za ugradnju pogrešnog nukleotida pri replikaciji DNA. Vidljivo je iz rezultata da je frekvencija mutacija u soju  $\Delta hsp42$  smanjena za čak tri reda veličina dok je u sojevima  $\Delta hsp42\Delta snf1$ ,  $\Delta snf1$  i  $\Delta hsp42\Delta zwf1$  povećana u odnosu na divlji tip. Stoga bi se moglo zaključiti da smanjenje frekvencije mutacija u soju  $\Delta hsp42$  na neki način ovisi o aktivnosti kinaze Snf1, kao i o enzimu glukoza-6-fosfat-dehidrogenazi iz puta pentoza-fosfata.

Iako su novokonstruirani mutanti izloženi proteotoksičnom stresu čini se da taj stres nije u korelaciji s proizvodnjom ATP-a u sojevima  $\Delta hsp42\Delta zwf1$  i  $\Delta hsp42\Delta snf1$ . Iz rezultata je vidljivo da razina ATP-a pada u soju  $\Delta hsp42$  za približno 0,05 nmol po  $\mu\text{g}$  staničnih proteina dok u sojevima  $\Delta hsp42\Delta snf1$  i  $\Delta hsp42\Delta zwf1$  raste za približno 0,05 nmol po  $\mu\text{g}$  staničnih proteina u odnosu na divlji tip. Dakle, novokonstruirani mutanti ne profitiraju preko smanjenja utroška ATP-a kao što to čini mutant  $\Delta hsp42$ . Kako bi se bolje vidjelo što se događa s mitohondrijima njihova morfologija vizualizirana je konfokalnim mikroskopom pomoću zelenog fluorescentnog proteina (eng. *Green fluorescent protein*, GFP) i fluorescentnog proteina *mCherry*. Ovaj pokus je proveden od strane dr. sc. Anite Kriško. Morfologija mitohondrija u mutantima ukazuje na povećanje volumena mitohondrija koje je posljedica njihove hiperfuzije. Taj rezultat upućuje na potrebu za povećanjem mase mitohondrija i pojačanjem respiratorne aktivnosti ovih stanica. No, osim hiperfuzije mitohondrija, kod  $\Delta hsp42\Delta snf1$  mutanta primjećuju se i defekti u građi mitohondrija.

U soju u  $\Delta$ hsp42 cilj je bio promatrati i razinu fosforilacije kinaze Snf1 te ju usporediti s razinom fosforilacije u divljem tipu. Inaktivni oblik Snf1 kinaze je defosforilirani oblik, a kada razina glukoze padne, Snf1 se aktivira fosforilacijom. Poznato je da se kinaza Snf1 aktivira u uvjetima kalorijske restrikcije. Iz tog razloga provedena je metoda *western blot* kojom se može saznati hoće li se ova kinaza aktivirati u uvjetima nedostatka šaperona Hsp42. Iako je prijenos proteina s gela na membranu bio uspješan nije se vidio jasan signal koji potječe od fosforiliranog oblika kinaze Snf1 na filmu nakon 25 minutne ekspozicije, a zatim ni nakon 60 minutne ekspozicije filma. Varirano je i vrijeme inkubacije membrane s kemiluminiscentnim reagensom, no ono nije imalo nikakav utjecaj na signale na filmovima. Razlike na filmovima što se tiče signala od fosforilirane kinaze Snf1 nije bilo ni u slučaju kada je duplo povećana masa proteina nanesenih na gel. Stoga nije bilo moguće utvrditi aktivira li se kinaza Snf1 u deletantu  $\Delta$ hsp42. Mogući razlozi odsutnosti traženog signala na filmu su nespecifičnost i starost primarnog antitijela.

Metodom *western blot* bilo je također planirano promotriti i ekspresiju šaperona Hsp90 te Hsp104 u soju  $\Delta$ hsp42 i novokontruiranim sojevima, budući da je povećana razina Hsp90 u delecijским sojevima do sada služila kao indikacija proteinskog stresa. Postoji i sugestija da je jedan od proteinskih klijenata šaperona Hsp90 kinaza Snf1, odnosno da zajedno stvaraju kompleks koji sudjeluje u aktivaciji kalorijske restrikcije u soju  $\Delta$ hsp42. No, zbog neispravnosti antitijela i nemogućnosti nabave novog antitijela u vremenskom razdoblju ovog istraživanja, navedene *western blot* analize nisu izvedene.

Proveden je i pokus mjerenja razina  $\text{NADP}^+$  i NADPH, odnosno njihovog omjera kojim se moglo provjeriti favorizira li mutant  $\Delta$ hsp42 zaista put pentoze fosfata i kakva je aktivnost puta pentoza fosfata u ostalim mutantima, uključujući u mutantu  $\Delta$ hsp42 $\Delta$ zwf1 kod kojeg je deletiran gen za glukoza-6-fosfat-dehidrogenazu (put pentoza-fosfata bi trebao biti inaktivan u ovom soju). No, pokus mjerenja  $\text{NADP}^+$ /NADPH treba biti ponovljen i stoga rezultati prvog mjerenja nisu uzeti u obzir u ovom radu.

## 6. Zaključak

- Konstruiran je soj  $\Delta hsp42\Delta snf1$  zamjenom gena za kinazu Snf1 u soju  $\Delta hsp42$  konstruktom koji sadrži deleciju kazetu. Ovaj soj ima skraćen kronološki životni vijek, povećanu frekvenciju mutacija, povećan stupanj karbonilacije i povećanu razinu reaktivnih kisikovih vrsta.
- Konstruiran je soj  $\Delta hsp42\Delta zwf1$  zamjenom gena za glukoza-6-fosfat-dehidrogenazu u soju  $\Delta hsp42$  konstruktom koji sadrži deleciju kazetu. Ovaj soj ima produžen kronološki životni vijek, povećanu frekvenciju mutacija, povećan stupanj karbonilacije i smanjenu razinu reaktivnih kisikovih vrsta.
- Umjereni stres poput delecije šaperona, ali i delecije kinaze Snf1 produljuje kronološki životni vijek i inducira toleranciju na stres. No kod mutanta u kojem su deletirani i gen za šaperon Hsp42 i gen za kinazu Snf1 ne samo da se gubi efekt produljenja već dolazi do skraćivanja kronološkog životnog vijeka u odnosu na divlji tip kvasca.
- Iako su novokonstruirani mutanti izloženi proteotoksičnom stresu čini se da taj stres nije u korelaciji s proizvodnjom ATP-a u sojevima  $\Delta hsp42\Delta zwf1$  i  $\Delta hsp42\Delta snf1$ . Dakle, novokonstruirani mutanti ne profitiraju preko smanjenja utroška ATP-a kao što to čini mutant  $\Delta hsp42$ .
- U skladu s očekivanjima da je stupanj oštećenja proteina veći u sojevima koji su izloženi stresu poput delecije šaperona, stupanj proteinske karbonilacije povećan je u svim delecijским sojevima u odnosu na divlji tip, iako ta razlika nije velika. Kod soja  $\Delta hsp42$  je razlika u odnosu na divlji tip izraženija nego u sojevima  $\Delta hsp42\Delta snf1$  i  $\Delta hsp42\Delta zwf1$ , ali neobično, razina reaktivnih kisikovih vrsta upravo je u soju  $\Delta hsp42$  manja u usporedbi s divljim tipom.
- Frekvencija mutacija u soju  $\Delta hsp42$  smanjena je za čak tri reda veličina dok je u sojevima  $\Delta hsp42\Delta snf1$ ,  $\Delta snf1$  i  $\Delta hsp42\Delta zwf1$  povećana u odnosu na divlji tip. Dakle, smanjenje frekvencije mutacija u soju  $\Delta hsp42$  na neki način ovisno je o aktivnosti kinaze Snf1, kao i o enzimu glukoza-6-fosfat-dehidrogenazi.

## 7. Popis korištenih kratica

aa-AMP	aminoacil-adenilat
aaRS	aminoacil-tRNA-sintetaze
aa-tRNA	aminoacil-tRNA
AMP	adenozin-5'-monofosfat
APS	amonij persulfat
ATP	adenozin-5'-trifosfat
BSA	albumin iz govedeg seruma (eng. <i>bovine serume albumine</i> )
DCF	diklorfluorescein diacetat
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
dNTP	deoksiribonukleotid-5'-trifosfat
DTT	ditiotritol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ELISA	enzimom povezana imunoadsorpcijska tehnika (eng. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
G6PD	glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza
HRP	peroksidaza iz hrena (eng. <i>horse raddish peroxidase</i> )
Hsp	eng. <i>Heat-shock protein</i>
mRNA	glasnička RNA (eng. <i>messenger RNA</i> ),
NADP <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PBS	fosfatni pufer (eng. <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCA	perklorna kiselina
PCR	lančana reakcija polimeraze (eng. <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	polietilenglikol
qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimeraze (eng. <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
ROS	reaktivne kisikove vrste (eng. <i>reactive oxygen species</i> )
SDS	natrijev dodecilsulfat
SDS-PAGE	elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz prisutnost SDS-a



TAE	Tris-acetat-EDTA pufer
TBS	Tris pufer (eng. <i>Tris-buffered saline</i> )
TE	Tris-EDTA pufer
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamin
TMB	tetrametilbenzidin
TOR	meta rapamicina (eng. <i>target of rapamycin</i> )
Tris	Tris(hidroksimetil)-aminometan
tRNA	eng. <i>transfer RNA</i>
UPR	stanični odgovor na prisutnost nesmotanih proteina (eng. <i>unfolded protein response</i> )
YPD	medij s kvaščevim ekstraktom, peptonom i dekstrozom (eng. <i>yeast extract peptone dextrose</i> )

## 8. Literaturna vrela

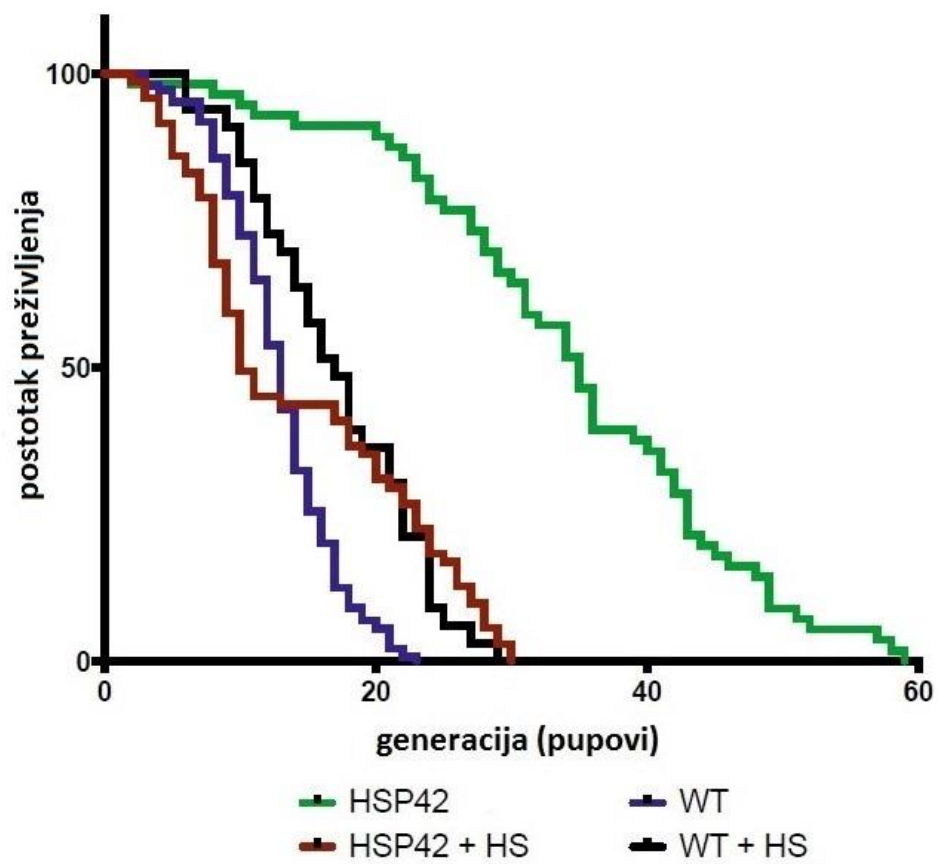
1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 6th Ed, W. H. Freeman and Company, New York, 2007
2. R. J. Brooker, *Genetics: analysis & principles*, 3. izdanje, McGraw-Hill, New York, 2009
3. D. L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th Ed, W. H. Freeman and Company, New York, 2008
4. Y. E. Kim, M. S. Hipp, A. Bracher, M. Hayer-Hartl, F. Ulrich Hartl, Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis, *Annu. Rev. Biochem.* **82** (2013) 323-355
5. C. Lopez-Otin, M. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, G. Kroemer, The Hallmarks of Aging, *Cell* **153** (2013) 1194-1210
6. S. Wolff, J. S. Weissman, A. Dillin, Differential Scales of Protein Quality Control, *Cell* **157** (2014) 52-64
7. J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, Synthetic and Editing Mechanisms of Aminoacyl-tRNA Synthetases, *Top Curr Chem.* **344** (2013) 1-41
8. Vilchez, D. *et al.* The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases, *Nat. Commun.* **5** (2014) doi: 10.1038/ncomms6659
9. J. Li, J. Soroka, J. Buchner, The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones, *Biochimica et Biophysica Acta* **1823** (2012) 624–635
10. S. E. Jackson, Hsp90: Structure and Function, *Top Curr Chem* **328** (2013) 155–240
11. S.M. Ungelenk, Structural features and interactions of substrates complexed with molecular chaperones, Dissertation, 2015
12. M. Haslbeck, N. Braun, T. Stromer, B. Richter, N. Model, S. Weinkauff, J. Buchner, Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J.1* **23** (2004) 638–649
13. S. Specht, S. B. M. Miller, A. Mogk, B. Bukau, Hsp42 is required for sequestration of protein aggregates into deposition sites in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Biol.* **195** (2011) 617-629
14. C. S. Conn, Shu-Bing Qian, mTOR signaling in protein homeostasis, *Cell Cycle* **10** (2011) 1940-1947
15. M. Perić *et al.* Crosstalk between cellular compartments protects against proteotoxicity and extends lifespan, *Sci. Rep.* **6**, 28751; doi: 10.1038/srep28751 (2016)
16. P. Sanz, Snf1 protein kinase: a key player in the response to cellular stress in yeast, *Biochem. Soc. Trans.* **31** (2003) 178-181
17. D. G. Hardie, D. Carling, M. Carlson, The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell?, *Annu Rev Biochem.* **67** (1998) 821-55.
18. K. Hedbacker, M. Carlson, SNF1/AMPK pathways in yeast, *Front Biosci.* **13** (2009) 2408–2420
19. N. Nath, R. R. McCartney, M. C. Schmidt, Yeast Pak1 Kinase Associates with and Activates Snf1, *Mol. Cell. Biol.* **23** (2003) 3909-3917
20. S. W. N. Au, S. Gover, V. M. S. Lam, M. J. Adams, Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP<sup>+</sup> molecule and provides insights into enzyme deficiency, *Structure* **8** (2000) 293-303
21. M. Kotaka, S. Gover, L. Vandeputte-Rutten, S. W. N. Au, V. M. S. Lam, M. J. Adams, Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP<sup>+</sup> binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Biological Crystallography*, **61** (2005) 495-504

22. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2BHL> (13.9.2016)
23. P. W. Piper, Long-lived yeast as a model for ageing research, *Yeast*, **23** (2006) 215-226
24. M. A. Baraibar, L.Liu, E. K. Ahmed, B. Friguet, Protein Oxidative Damage at the Crossroads of Cellular Senescence, Aging, and Age-Related Diseases, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. **2012** (2012) doi:10.1155/2012/919832
25. An Introduction to *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Visualized Experiments*, Cambridge, MA, (2014) doi: 10.3791/5081
26. [http://wiki.yeastgenome.org/index.php/What\\_are\\_yeast%3F](http://wiki.yeastgenome.org/index.php/What_are_yeast%3F) (20.7.2016.)
27. H. A. Tissenbaum, L. Guarente, Model Organisms as a Guide to Mammalian Aging, *Developmental Cell*, **2** (2002) 9-19
28. Prezentacije iz kolegija Modelni organizmi u molekularnoj biologiji, prof. dr. sc. S. Gajović, izv. prof. dr. sc. M. Matulić
29. L. Vachova, M. Čap, Z. Palkova, Yeast Colonies: A Model for Studies of Aging, Environmental Adaptation, and Longevity, *Oxid Med Cell Longev*. **2012** (2012), doi:10.1155/2012/601836
30. [www.addgene.org/vector-database](http://www.addgene.org/vector-database) (25.6.2016.).
31. S. B. Primrose, R. M. Twyman, Principles of Gene Manipulation and Genomics, 7. izd., Blackwell Publishing, (2006)
32. Ivica Strelec i Tihomir Kovač, Metode određivanja koncentracije proteina, 2013, Osijek
33. Dalle-Donne et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clinica Chimica Acta* 329 (2003) 23–38
34. Marijana Krsnik-Rasol, Biljana Balen, Boris Maček, Dubravko Pavoković, Elektroforetske tehnike istraživanja proteina, 2005, Zagreb
35. <http://www.biologyforlife.com/t-test.html> (20.7.2016)
36. <http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/statistics/tress4a.html> (20.7.2016.)

## 9. Prilozi

### 9.1 Dodatak

Dodatak.1. Rezultati mjerenja replikativnog životnog vijeka za sojeve divljeg tipa,  $\Delta hsp42$ , te iste sojeve uzgojene pri uvjetima temperaturnog stresa pri 37°C.



Dodatak 2. Popis kratica gena čija ekspresija je analizirana kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (qPCR).

Kratica gena	Puno ime	Metabolički put
ENO2	enolaza 2 (fosfoenolpiruvat-hidrataza)	glikoliza, glukoneogeneza
PYK1	piruvat-kinaza	glikoliza
PGI1	glukoza-6-fosfat-izomeraza	glikoliza
TDH1	gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza	glikoliza, glukoneogeneza
IDH1	izocitrat-dehidrogenaza	ciklus limunske kiseline
MDH1	malat-dehidrogenaza	ciklus limunske kiseline
FUM1	fumaraza	ciklus limunske kiseline
CIT1	citrat-sintaza	ciklus limunske kiseline
GLR1	glutation-oksidoreduktaza	redukcija glutaciona
ATP1	alfa podjedinica mitohondrijske ATP-sintaze	respiracija
ATP6	beta podjedinica mitohondrijske ATP-sintaze	respiracija
COB	citokrom <i>b</i>	oksidativna fosforilacija
COX1	citokrom <i>c</i>	oksidativna fosforilacija
COX2	citokrom <i>c</i>	oksidativna fosforilacija
COX4	citokrom <i>c</i>	oksidativna fosforilacija
SSA1	<i>Stress-Seventy Subfamily A</i>	degradacija proteina
HSP26	<i>Small heat-shock protein 26</i>	šaperon
UBC1	ubikvitin-konjugirani enzim E2 1	degradacija proteina

## 9.2 Životopis

### Osobni podaci

Ime i prezime: Matea Kurtović

Datum i mjesto rođenja: 29.9.1991., Bjelovar

### Obrazovanje

1998. – 2006. osnovna škola „IV. Osnovna škola Bjelovar“

2006. – 2010. opća gimnazija „Gimnazija Bjelovar“

2010. – 2014. preddiplomski sveučilišni studij kemije na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, tema završnog rada: „*Mehanizam djelovanja i funkcija proteaza*“, mentorica: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

2014. – 2016. diplomski sveučilišni studij kemije na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, istraživački smjer, grane biokemija i analitička kemija

### Projekti promicanja i popularizacije znanosti

Sudjelovanje na **IV. Otvorenom danu Kemijskog odsjeka**, u Zagrebu, 2011.

Sudjelovanje na **Smotri sveučilišta u Zagrebu**, 15.-17. studenoga 2012.

Sudjelovanje na **VI. Otvorenom danu Kemijskog odsjeka**, u Zagrebu, 12. travnja 2013. (dobitnica posebne Rektorove nagrade za akademsku godinu 2012./2013. za organizaciju i izvedbu cjelodnevnih događaja)

Sudjelovanje na **2. Znanstvenom pikniku**, u Zagrebu, 15. rujna 2013.

Sudjelovanje na **VII. Otvorenom danu Kemijskog odsjeka**, u Zagrebu, 4. travnja 2014.

Voditeljica sedmodnevne radionice na **Ljetnoj tvornici znanosti**, u Splitu, 2014.

Sudjelovanje na **3. Znanstvenom pikniku**, u Zagrebu, 14. rujna 2014.

Voditeljica sedmodnevne radionice na **Ljetnoj tvornici znanosti**, u Splitu, 2015.