

# Identifikacija kinaze odgovorne za fosforilaciju mitohondrijskog proteina NIX

---

Šamadan, Lara

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:644051>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Lara Šamadan

**Identifikacija kinaze odgovorne za fosforilaciju  
mitohondrijskog proteina NIX**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu pod vodstvom mentorice izv. prof. dr. sc. Ivane Novak Nakir. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

## *Zahvala*

*U prvom redu veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Ivani Novak Nakir na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju i korisnim savjetima pri izradi ovog rada. Hvala Vam što ste na mene preneli dio svog znanja, te što ste uvijek imali vremena i strpljenja za odgovore na sva moja pitanja. Hvala i komentorici prof. dr. sc. Ivani Ivančić Baće na pruženoj prilici i pomoći u izradi ovog rada.*

*Hvala i Miji što mi je njena pomoć, ali i društvo olakšalo sate provedene u laboratoriju. Hvala i svim kolegama Laboratorija za istraživanje raka Medicinskog fakulteta u Splitu na pruženoj pomoći i ugodnoj radnoj atmosferi.*

*Ipak, najveće hvala mojoj obitelji i prijateljima, posebno mami, tati i bratu na ljubavi i potpori pruženoj tijekom cijelog školovanja. Hvala vam što ste uvijek vjerovali u mene i gurali me naprijed.*

*Vaša Lara.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Identifikacija kinaze odgovorne za fosforilaciju mitohondrijskog proteina NIX

Lara Šamadan

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Dosadašnja istraživanja ukazuju kako fosforilacija uvelike pospješuje vezanje mitohondrijskog proteina NIX za autofagosomalne receptore mitofagije LC3A i LC3B neophodnih prilikom inicijacije autofagije i regrutiranja autofagosoma. Cilj ovog istraživanja je identificirati kinazu odgovornu za fosforilaciju proteina NIX što bi moglo dodatno razjasniti mehanizam regulacije mitofagije. *In silico* analizom odabrane su kinaze IKK $\beta$  i GSK3 $\beta$  koje su testirane metodom *Pull-down* i imunoprecipitacijom na interakciju s fuzijskim proteinom EGFP-NIX i njegovim mutantama. Metodom *Western blot* provjerena je proteinska interakcija mitohondrijskog proteina NIX i dviju odabranih potencijalnih kinaza. Dobiveni rezultati pokazuju interakciju proteina NIX s kinazom GSK3 $\beta$ , dok interakcija s kinazom IKK $\beta$  izostaje te se iz rezultata zaključuje kako je mitohondrijski protein NIX u interakciji s kinazom GSK3 $\beta$ . S obzirom na ustanovljenu interakciju s kinazom GSK3 $\beta$ , ciljanom mutagenезom *in vitro* napravljene su dvije mutante, jedna s konstitutivno aktivnom kinazom GSK3 $\beta$  te druga čija je kinazna domena inaktivna. Buduća istraživanja s navedenim konstruktima trebala bi pokazati fiziološku važnost ove interakcije.

(61 stranica, 14 slika, 2 tablice, 76 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: autofagija, mitofagija, NIX, fosforilacija, kinaza, GSK3 $\beta$ , IKK $\beta$

Voditelj: dr. sc. Ivana Novak Nakir, izv. prof.

Suvoditelj: dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof.

dr. sc. Sven Jelaska, izv. prof.

dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.

Rad prihvaćen: 29. studenog 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation Thesis

# **Identification of the kinase responsible for phosphorylation of NIX mitochondrial protein**

Lara Šamadan

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Previous research suggest that phosphorylation greatly enhances the binding of NIX mitochondrial protein to autophagosomal LC3A and LC3B mitophagy receptors necessary for autophagy initiation and cargo degradation. The aim of this study was to identify kinase responsible for phosphorylation of NIX protein, which could further clarify the mechanism of mitophagy regulation. Using *In silico* analysis, IKK $\beta$  and GSK3 $\beta$  kinases were selected and had been tested by *Pull-down* and immunoprecipitation for interaction with the fusion protein EGFP-NIX and its appropriate mutant variants. *Western blot* immunodetection was used to detect protein interaction of NIX and two selected potential kinases. The results show the interaction of NIX protein with kinase GSK3 $\beta$ , whereas interaction with kinase IKK $\beta$  was not confirmed. Taken together it can be concluded that of two tested kinases, NIX interacts *in vitro* with GSK3 $\beta$ . Given the established interaction with kinase GSK3 $\beta$ , two mutants, one with the constitutively active kinase domain and the other with inactive kinase domain, were generated by site-directed mutagenesis. Future studies using these mutants should provide the physiological importance of this interaction.

(61 pages, 14 figures, 2 tables, 76 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: autophagy, mitophagy, NIX, phosphorylation, kinase, GSK3 $\beta$ , IKK $\beta$

Supervisor: Dr. Ivana Novak Nakir, Assoc. Prof.

Cosupervisor: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.

Dr. Sven Jelaska, Assoc. Prof.

Dr. Nada Oršolić, Prof.

Thesis accepted: November 29th 2018.

## SADRŽAJ:

1	UVOD .....	1
1.1	Autofagija.....	2
1.1.1	Stvaranje autofagosoma.....	3
1.1.2	Selektivna autofagija .....	5
1.2	Mitofagija .....	5
1.2.1	Bazalna mitofagija.....	7
1.2.2	Selektivna mitofagija potaknuta oštećenim mitohondrijima .....	7
1.2.3	Razvojem potaknuta selektivna mitofagija.....	9
1.3	NIX – receptor mitofagije .....	10
1.3.1	Domena LIR .....	11
1.4	Fosforilacija proteina NIX.....	12
2	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	14
3	MATERIJALI I METODE.....	16
3.1	Materijali .....	17
3.1.1	Osnovne kemikalije.....	17
3.1.2	Aparatura .....	19
3.1.3	Puferske otopine .....	20
3.1.4	Osnovne otopine.....	21
3.1.5	Bakterijske stanice.....	21
3.1.6	LB hranjive podloge (engl. <i>Luria-Bertani broth</i> ).....	21
3.1.7	Stanične linije .....	22
3.1.8	Mediji .....	22
3.1.9	Komercijalni kompleti.....	22
3.1.10	Protutijela .....	22
3.1.11	Enzimi .....	23
3.1.12	Proteazni inhibitori .....	23
3.1.13	Biljezi molekulskih masa .....	23
3.1.14	Oligonukleotidne početnice.....	24
3.1.15	Plazmidni vektori.....	24

3.2	Metode.....	26
3.2.1	Priprema i pročišćavanje His-GSK3 $\beta$ fuzijskog proteina.....	26
3.2.2	Dokazivanje interakcija proteina <i>Pull-down</i> metodom i imunoprecipitacijom .....	28
3.2.3	Mjesno specifična <i>in vitro</i> mutageneza primjenom PCR-a .....	33
3.2.4	Priprema i transformacija kompetentnih DH5 $\alpha$ bakterijskih stanica plazmidnom DNA .....	36
3.2.5	Izolacija plazmidne DNA s uvedenim ciljnim mutacijama iz bakterijskih stanica .....	38
4	REZULTATI.....	41
4.1	Pročišćavanje Ni-NTA agaroznih kuglica s vezanim fuzijskim proteinom His-GSK3 $\beta$ .....	43
4.2	Utvrđivanje ekspresije proteina EGFP-NIX i MYC-IKK $\beta$ i provjera njihove interakcije u lizatu stanica HEK293.....	44
4.3	Utvrđivanje ekspresije proteina EGFP-NIX i provjera interakcije s His-GSK3 $\beta$ u lizatu stanica HEK293.....	46
4.4	Provođenje ciljane mutageneze <i>in vitro</i> .....	47
5	DISKUSIJA.....	49
6	ZAKLJUČAK .....	52
7	LITERATURA.....	54



# **1 UVOD**

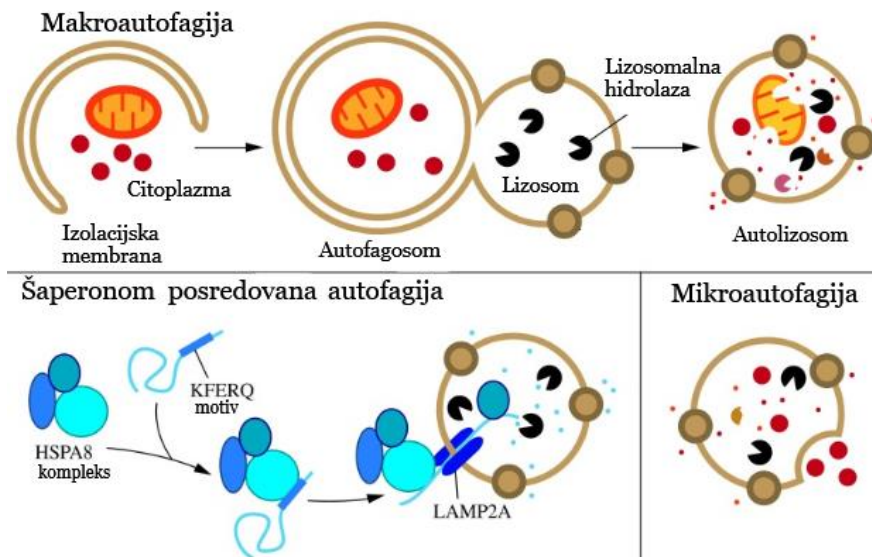
Održavanje ravnoteže nužno je za zdravo stanje čitavoga organizma. U složenom procesu održavanja homeostatskih, fizioloških uvjeta sudjeluju sve stanice organizma koje pravilnom sintezom potrebnih makromolekula, ali i razgradnjom onih nepotrebnih, oštećenih ili dotrajalih makromolekula aktivno sudjeluju u staničnoj ravnoteži. Narušavanje ravnoteže nakupljanjem nefunkcionalnih staničnih dijelova vodi nastanku patoloških stanja i naposljetku staničnoj smrti. Za uspješno uklanjanje takvih dijelova eukariotska stanica je evolucijski razvila dva složena unutarstanična proteolitička sustava: ubikvitin-proteosomalni sustav i autofagiju ili lizosomom posredovani sustav.

## 1.1 Autofagija

Autofagija je katabolički proces uklanjanja pogrešno smotanih ili agregiranih proteina, oštećenih organela poput mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma ili peroksisoma, ali i uklanjanja unutarstaničnih patogena. Pojam autofagije izveden je iz grčkih riječi *auto* (sam) i *phagein* (jesti) i označava, u doslovnom prijevodu, „samoproždiranje“. Razgradnja vlastitih staničnih dijelova odvija se uz pomoć lizosoma, a pojam autofagije uveo je Christian de Duve prije više od 50 godina kada je opisivao razgradnju posredovanu tzv. autofagosomalnim vakuolama. Autofagosomalne vakuole danas označavaju autofosome, dvoslojne membranske strukture koje sadrže dijelove citoplazme određene za razgradnju (Glick i sur., 2010).

Proces autofagije nije ograničen ni veličinom ni vrstom sadržaja koja se razgrađuje. Postoje tri definirana tipa autofagije kod sisavaca: makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonima (Slika 1.), a bez obzira na razlike, svima je zajednička proteolitička razgradnja posredovana lizosomom. Kod makroautofagije, kao glavnog puta stanične degradacije, autofagosom se spaja s lizosomom kako bi se razgradio sadržaj koji se do njega kontrolirano dopremio. Mikroautofagija je karakteristična po uklanjanju staničnog sadržaja na način da membrana lizosoma okruži citoplazmatski sadržaj i unese ga u unutrašnjost lizosoma gdje se potom razgrađuje. Treći tip, autofagija posredovana šaperonom, odvija se na način da šaperon HSPA8/HSC70 prepoznaje KFERQ aminokiselinski motiv na proteinu što direktno signalizira odvođenje kompleksa do LAMP-2A receptora na membrani lizosoma gdje počinje razgradnja (Tekirdag i Cuervo, 2018).

Osim navedene podjele postoji, i podjela prema specifičnosti materijala koji se doprema u lizosom. Stoga razlikujemo selektivnu autofagiju, koja doprema točno određeni materijal i neselektivnu, pri kojoj autofagosom nespecifično pakira dio citoplazme.



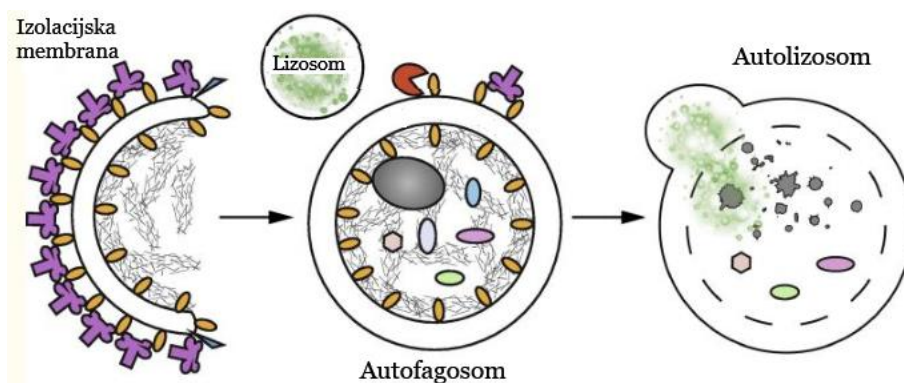
**Slika 1. Tri tipa autofagije:** makrofagija, mikrofagija i šaperonom posredovana autofagija. Preuzeto i prilagođeno iz Parzych i Klionsky, 2014.

S obzirom da je autofagija u svim stanicama organizama viših eukariota glavni mehanizam kontrole ispravnosti svih staničnih dijelova, odgovorna je za uklanjanje oštećenih organela. Nadalje, odgovorna je za procese razgradnje koji se događaju pri razvoju i diferencijaciji mnogih vrsta stanica. Neki od primjera autofagije prilikom diferencijacije su uklanjanje mitohondrija u eritrocitima i limfocitima T kod sazrijevanja (Pua i sur., 2009; Mortensen i Simon, 2010), te uklanjanje majčinske RNA te proteina i mitohondrija spermija u oplodenoj oociti (Tsukamoto i sur., 2008). Osim različitih tipova selektivne autofagije kojima se uklanjaju stanične komponente, jedna od selektivnih vrsta autofagije je i ksenofagija, koja je osnovni stanični mehanizam uklanjanja patogena poput bakterija i virusa (Thurston i sur., 2009). Imajući u vidu saznanja o važnosti autofagije jasno je kako poremećena autofagija može biti uzrok brojnim patološkim stanjima te da može dovesti do razvoja bolesti poput bolesti jetre i srca, neurodegenerativnih bolesti, tumora, cistične fibroze i dijabetesa tipa II (Levine i Kroamer, 2008).

### 1.1.1 Stvaranje autofagosoma

Autofagija započinje izolacijskom membranom, za koju se prije tvrdilo da nastaje kao lipidni dvosloj dijela endoplazmatskog retikuluma i/ili Golgijevog aparata i endosoma (Simonsen i Tooze, 2009; Axe i sur., 2008), dok novija istraživanja iznose kako struktura nastaje *de novo* te izvor lipida

može biti bilo koji organel (Turco i Martens, 2016). Širenjem izolacijske membrane nastaje fagofor koji se širi kako bi „zarobio“ dio citoplazme bilo da je riječ o određenom organelu ili o neselektivnoj razgradnji citoplazmatskog sadržaja uzrokovanoj gladovanjem ili hipoksijom. Širenjem fagofora i fuzijom njegovih krajeva stvara se autofagosom s dvostrukom membranom (Mizushima, 2007). Autofagosom koji nosi materijal za razgradnju sazrijeva kroz fuziju s lizosomom čime nastaje tzv. autolizosom (Slika 2.). Tom fuzijom promiče se razgradnja autofagosomalnog sadržaja različitim lizosomalnim enzimima kao što su kisele proteaze, peptidaze, lipaze i nukleaze. Nakon razgradnje, nastali metaboliti otpuštaju se u citoplazmu preko transportera i lizosomskih permeaza gdje se ponovno koriste u metabolizmu stanice (Mizushima, 2007). Tako se autofagija može smatrati „staničnom tvornicom“ za recikliranje te posreduje u kontroli štete nastale različitim unutarstanim mehanizmima uklanjanjem nefunkcionalnih proteina i organela (Glick i sur., 2010).



**Slika 2. Stvaranje autofagosomalnih struktura.** Izolacijska membrana postupno raste u autofagosom. **Fuzijom autofagosoma** s lizosomom nastaje autolizosom. Preuzeto i prilagođeno iz Turco i Martens, 2016.

Unatoč tome što se za autofagiju zna posljednjih 60-ak godina, razumijevanje njene molekularne osnove započelo je otkrićem skupine gena Atg (engl. *Autophagy related genes*) kod kvasaca čijim se otkrićem objasnio molekularni mehanizam stvaranja autofagosoma i njegova uloga u razgradnji. S obzirom da je proces autofagije visoko konzerviran, homolozi kvaščevih gena Atg pronađeni su i kod viših eukariota. Proteini Atg podjeljeni su u 4 podskupine, kojima pripadaju i dva ubikvitinu slična konjugacijska sustava Atg12 i Atg8/LC3. Njihova sličnost s ubikvintinom očituje se u strukturi i mehanizmu aktivacije (Paz i sur., 2000; Suzuki i sur., 2005), a od posebnog je značaja Atg8/LC3. Uloga Atg8/LC3 proteina je sudjelovanje u stvaranju, zatvaranju i transportu autofagosoma u procesu autofagije (Lee i Lee, 2016), ali imaju i ulogu proteina adaptora budući da se vežu za

specifične proteine receptore odgovorne za dovlačenje odgovarajućeg citoplazmatskog sadržaja u selektivnom obliku autofagije. Zbog središnje uloge u autofagiji, protein LC3 koristi se za proučavanje broja autofagosoma i aktivnosti autofagije, te se uvriježeno koristi kao marker za autofagiju (Rogov i sur., 2014).

Pri normalnim fiziološkim uvjetima u stanici razina autofagije je niska te je aktivna samo tzv. bazalna ili konstitutivna autofagija odgovorna za održavanje stanične ravnoteže. Početak autofagije kontroliran je složenim regulatornim mehanizmom kojeg aktiviraju stanja staničnog stresa poput gladovanja, hipoksije, infekcije, oksidativnog stresa i sl. Svi ti signali djeluju na kompleks mTORC, kojeg inaktiviraju budući da mTORC (engl. *Mammalian Target Of Rapamycin Complex*) konstitutivno inhibira autofagiju. Povećanjem razine autofagije stanica prilagođavanjem pokušava preživjeti nepovoljne uvjete (Yang i Klionsky, 2009).

### **1.1.2 Selektivna autofagija**

Ranije se autofagija smatrala nasumičnim procesom budući da se opisivala kao proces u kojem dolazi do „slučajnog“ obuhvaćanja dijela citoplazme. Ipak, danas postoji podjela na neselektivnu i selektivnu autofagiju. Dok neselektivna autofagija može biti potaknuta manjkom nutrijenata i energije i time započeti stanično preživljavanje, selektivna autofagija može biti visoko specifična za određene komponente poput peroksisoma, mitohondrija, proteinskih agregata, jezgri, itd. (Lee i sur., 2012; Till i sur., 2012) i time održavati staničnu ravnotežu (Chen i Klionsky, 2011). Različite vrste selektivne autofagije nazvane su prema specifičnom materijalu kojeg autofagosomi nose: peroksisome (peroksifagija), mitohondrije (mitofagija), proteinske agregate (agrefagija), jezgre (nukleofagija), ribosome (ribofagija), patogene (ksenofagija), itd. (Xie i Klionsky, 2007).

## **1.2 Mitofagija**

Mitohondrij je stanični organel eukariotskih stanica koji služi kao izvor stanične energije i odgovorni su za aerobnu proizvodnju ATP-a. Stanična ravnoteža uvelike ovisi o energiji koju stvaraju mitohondriji. Mitohondriji, osim proizvodnje ATP-a, imaju i druge uloge u stanici poput skladištenja kalcija, sinteze različitih metabolita i apoptoze (Kroamer i sur., 2007). Morfološki su visoko dinamički organeli koji konstantno prolaze kroz fuziju i fisiju. Izmjene između fuzije i fisije moraju biti u ravnoteži što je pod kontrolom proteina specifičnih za ove procese (Mfn1 i Mfn2, Opa1, Drp1, Fis1), a svako odstupanje od ravnoteže može uzrokovati poremećaje njihova oblika i funkcije (Karbowski i

Youle, 2003). Morfologija mitohondrija također često određuje vrstu stanice te stupanj njene diferencijacije. Broj mitohondrija u stanici određen je različitim faktorima poput metaboličkih potreba stanice ili njenog diferencijacijskog stupnja.

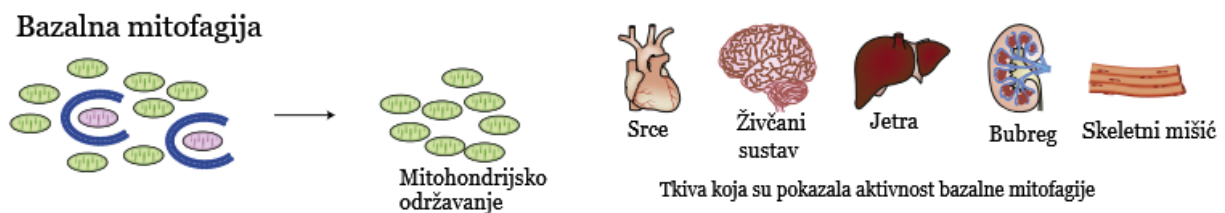
Uklanjanje oštećenih mitohondrija koji bi mogli utjecati na disfunkciju stanice ili staničnu smrt vrši se mitofagijom, ali mitofagija je odgovorna i za uklanjanje mitohondrija tijekom diferencijacije stanica poput eritrocita i limfocita T. S obzirom da je mitofagija selektivna vrsta autofagije, mitohondriji koje obuhvaćaju autofagosomi trebaju biti označeni za razgradnju i odvođenje do lizosoma.

Iako se mitofagija odvija u višestrukoj signalnoj kaskadi, regulatorni putevi mitofagije klasificirani su kao putevi ovisni o ubikvitinu i neovisni o ubikvitinu (Khaminets i sur., 2016). Put ovisan o ubikvitinu je PINK1-Parkin posredovan put (Pickles i sur., 2018) i važan je u različitim aspektima fiziologije mitohondrija poput mitohondrijske dinamike, biogeneze, ali i transporta i dovođenja autofagosomalnog sustava čime se osigurava uklanjanje nefunkcionalnih mitohondrija (Palikaras i sur., 2017; Ashraf i Schwarz, 2013; Harper i sur., 2018);. U zdravim mitohondrijima kinaza PINK1 se nalazi na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani gdje ju procesira nekoliko proteaza, a takvu formu PINK1 degradira ubikvitin-proteosomalni sustav (Harper i sur., 2018; Sekine i Youle, 2018). Tijekom poremećaja u membranskom potencijalu PINK1 se stabilizira u vanjskoj mitohondrijskoj membrani, te se auto-fosforilira što dovodi do translokacije ligaze Parkin na površinu mitohondrija (Pickles i sur., 2018; Harper i sur., 2018; Sekine i Youle, 2018) i aktivacije ligaze. Takvim djelovanjem ligaze Parkin stvaraju se poliubikvitinski lanci koje dodatno fosforilira kinaza PINK1, a njih prepoznaju proteini adaptor koji započinju formiranje autofosoma vezanjem za LC3 (Ordureau i sur., 2014). S druge strane, ubikvitin neovisni put mitofagije obuhvaća proteine na autofosomima koji su u direktnoj interakciji s mitohondrijima preko receptora koji se nalaze na membranama mitohondrija. Identificiran je niz receptora autofagije koji se nalaze na mitohondrijima označenima za autofagiju (Rogov i sur., 2014): NIX (Novak i sur., 2010), BNIP3 (Quinsay i sur., 2010; Hanna i sur., 2012), FUNDC1 (Liu i sur., 2012), BCL2L13 (Otsu i sur., 2015), Prohibitin (Lahiri i Klionsky, 2017) i Atg32 (Kanki i sur., 2009).

Nadalje, istraživanja su pokazala kako postoje barem tri mehanizma uklanjanja mitohondrija autofagijom: bazalna mitofagija, mitofagija potaknuta oštećenim mitohondrijima (engl. *damage induced*) te razvojem potaknuta mitofagija (engl. *development-induced*) (Novak, 2012).

### 1.2.1 Bazalna mitofagija

Donedavno se mitofagija proučavala samo u *in vitro* uvjetima u staničnim kulturama koje su prekomjerno ekspimirale glavne komponente mitofagije te se istima kemijski poticao proces mitofagije. Informacije o bazalnoj mitofagiji bile su ograničene do provođenja istraživanja na dva transgenična miša koji su ekspimirali pH-osjetljive fluorescentne proteine reportere ciljne za mitohondrije. U oba transgenična miša pokazano je kako većina stanica prolazi stalnu bazalnu mitofagiju prilikom mitohondrijskog održavanja u stanici (McWilliams i sur., 2016; Sun i sur., 2015). Opseg različitosti među tkivima kao i različitih tipova stanica unutar istog tkiva upućuje na autonomnu staničnu regulaciju bazalne mitofagije (Slika 3.). Točnije, timus i slezena pokazuju manju aktivnost bazalne mitofagije od srca, skeletnih mišića, živčanog sustava, jetre i slično. (Sun i sur., 2015). Bazalna mitofagija je PINK1-nezavisna u metabolički aktivnim tkivima za razliku od kemijski inducirane mitofagije (McWilliams i sur., 2018).



**Slika 3. Bazalna mitofagija.** Bazalnom mitofagijom stanica održava potreban broj mitohondrija. Preuzeto i prilagođeno iz Palikaras i sur., 2018.

### 1.2.2 Selektivna mitofagija potaknuta oštećenim mitohondrijima

Konstantna proizvodnja energije oksidativnom fosforilacijom za sobom ostavlja nusprodukte reakcije, tzv. reaktivne kisikove oblike – ROS (engl. *Reactive Oxygen Species*) koji se nakupljaju u mitohondrijima. Nakupljanje ROS-a uzrokuje oštećenja DNA i proteina, na način da povećana količina mutacija u mitohondrijskoj DNA i pogrešnih smatanja mitohondrijskih proteina dovode do nefunkcionalnosti mitohondrija zbog čega je neophodno njihovo uklanjanje (Kroamer i sur., 2007). Oštećenje mitohondrija se zapravo događa na način da dolazi do otvaranja pora unutarnje mitohondrijske membrane uslijed povećane koncentracije ROS-a, čime oni istječu u međumembranski

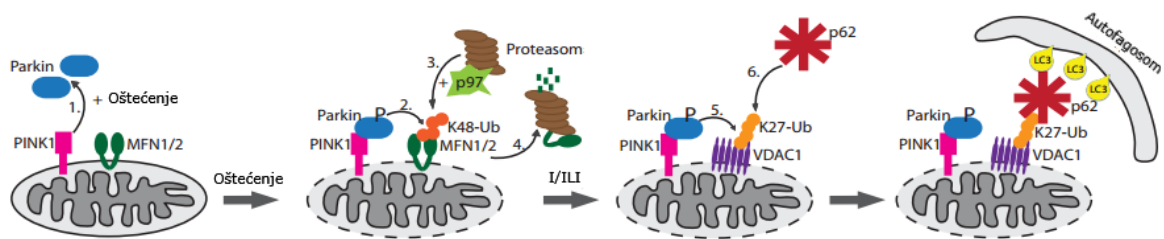
prostor uzrokujući depolarizaciju vanjske mitohondrijske membrane i regrutaciju mašinerije autofagije (Elmore i sur., 2001).

Istraživanja na Parkinsonovoj bolesti dala su uvid u mutacije koje su povezane s defektima u mitofagiji. To su mutacije dvaju proteina važnih u mitofagiji, kinaze vanjske mitohondrijske membrane PINK1 (engl. *PTEN-Induced putative kinase 1*) i E3 ubikvitinske ligaze Parkin (PARK2) (Valente i sur., 2004). Osim toga, analize su pokazale kako se kod stanica tretiranih karbonil-cijanid m-klorofenilhidrazonom (CCCP), koji depolarizira mitohondrije smanjenjem membranskog potencijala, događa translokacija ligaze Parkin iz citoplazme na vanjsku membranu mitohondrija. Nadalje, studije su pokazale kako se ova translokacija događa isključivo na oštećenim mitohondrijima, a ne na zdravima (Narendra i sur., 2008). Regrutacija ligaze Parkin, posljedično smanjuje količinu mitohondrija, zbog čega se smatra kako ligaza Parkin utječe na put kontrole mitofagije te upravlja selektivnim uklanjanjem oštećenih mitohondrija. *In vitro* istraživanja na staničnim kulturama pokazala su kako je prekomjerna ekspresija kinaze PINK1 dovoljna za translokaciju ligaze Parkin (Kim i sur., 2008), ali još uvijek nije do kraja razriješeno na koji način PINK1 na vanjskoj mitohondrijskoj membrani regrutira citoplazmatsku ligazu Parkin. Predložena su dva moguća mehanizma. Prema prvom, PINK1 je u direktnoj interakciji s ligazom Parkin, na način koji ne ovisi o njihovim aktivnostima (Sha i sur., 2010). U drugom predloženom mehanizmu, domena kinaze PINK1 koja je okrenuta prema citoplazmi fosforilira ligazu Parkin (Kim i sur., 2008; Sha i sur., 2010) što rezultira translokacijom na mitohondrij i aktivacijom ubikvitinske ligaze Parkin.

S druge strane, u jednom od dva mehanizma indukcije mitofagije, smatra se kako fizija mitohondrija prethodi mitofagiji na način da normalne mitohondrije čini pogodnima za obuhvaćanje autofagosomom (Twig i sur., 2008). Blokiranje fuzije mitohondrija jedan je od načina na koji se dopušta proteinima fizije da preoblikuju mitohondrije u stanici. Osim toga, neka su istraživanja pokazala kako ubikvitinska ligaza Parkin ubikvitinira fuzijske proteine mitofuzine (Mfn1 i Mfn2) što regrutira proteasom koji posljedično razgrađuje mitofuzine (Gegg i sur., 2010; Poole i sur., 2010; Ziviani i sur., 2010; Slika 4.). Uklanjanje mitofuzina neophodno je u pravilnoj indukciji mitofagije zbog toga što se njihovim nedostatkom onemogućava fuzija sa zdravim mitohondrijem kao metoda mitohondrijskog popravka oštećenja (Liu i sur., 2009).

Drugi mehanizam indukcije mitofagije demonstrira kako je protein VDAC1, lokaliziran u vanjskoj mitohondrijskoj membrani, ciljani protein ubikvitinske ligaze Parkin tijekom mitofagije. Ligaza Parkin dodaje Lys27 poliubikvitinski lanac na VDAC1 čija je uloga pokrenuti autofagiju privlačeci receptor autofagije p62. Prepoznavanje se događa preko domene UBA proteina p62 s jedne strane i domene LIR na drugoj strani, koja vezuje proteine LC3/GABARAP neophodne u indukciji autofagije. Ovakva organizacija proteina premošćuje mitohondrije i novonastale autofosome (Pankiv i sur., 2007).





**Slika 4. Mitofagija inducirana oštećenjem.** Prilikom oštećenja, PINK1 veže E3 ligazu Parkin i odvodi je do mitohondrija (1). Parkin ubikvitinira Mfn1 i Mfn2 (2) koji se razgrađuju na proteosomu (4) koji se do mitohondrija dovodi pomoću p97 (3). Razgradnjom mitofuzina fuzija mitohondrija se zaustavlja i inducira se mitofagija. Parkin ubikvitinira VDAC1 dodajući Lys27 poliubikvitinske lance (5) za koje se veže p62 (6). Vezanje p62 i VDAC1 za mitohondrij i Atg8/LC3/GABARAP na autofagosom rezultira obuhvaćanjem mitohondrija i početak autofagosomalne razgradnje. Preuzeto iz Novak, 2012.

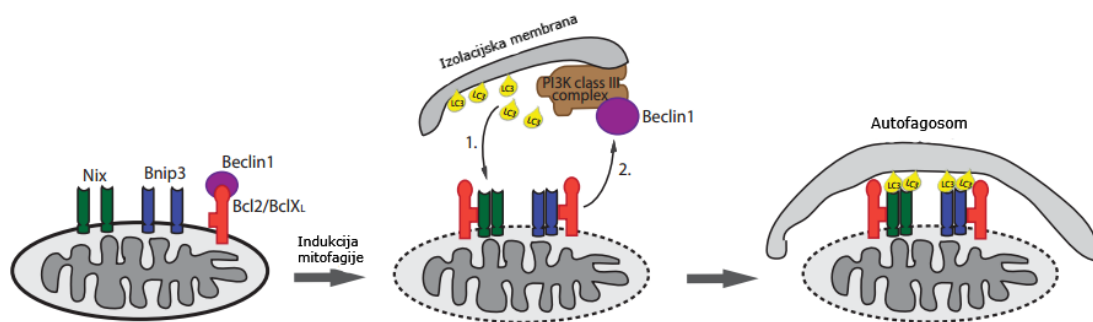
### 1.2.3 Razvojem potaknuta selektivna mitofagija

Selektivno uklanjanje mitohondrija javlja se i tijekom razvoja određenih specijaliziranih stanica kojima je taj proces neophodan za zdrav i ispravan razvoj. Mitofagija tijekom diferencijacije nije proces kontrole kvalitete mitohondrija, već programirano polovično ili potpuno uklanjanje mitohondrija iz stanica. Takva pojava poznata je u stanicama očne leće, gdje se smanjuje broj mitohondrija, i u zrelih spermatskih stanicama, gdje dolazi do gotovo potpunog uklanjanja svih mitohondrija (Bassnett i Beebe, 1992; Sutovsky i sur., 1999). Ali, najbolje proučavane stanice u kojima dolazi do selektivne mitofagije tijekom razvoja specifične stanične vrste su eritrociti, odnosno njihove preteče, retikulociti. Zreli eritrociti ne sadrže mitohondrije ni druge organele, čime se povećava kapacitet stanice za prijenos kisika, ali osim toga smanjuje se rizik oštećenja ROS-om čime se povećava vrijeme života u cirkulaciji (Novak, 2012).

U dva neovisna istraživanja, otkriven je BH3-only protein Nix, poznat kao i protein Bnip3L, koji se nalazi na vanjskoj mitohondrijskoj membrani i uključen je u programirano uklanjanje mitohondrija u retikulocitima (Schweers i sur., 2007; Sandoval i sur., 2008). Retikulociti miševa s inaktiviranim genima za protein Nix nisu bili sposobni provesti proces uklanjanja mitohondrija, čime

nisu uspjeli završiti sazrijevanje u zrele eritrocite. Osim toga, otkriveno je i kako se u takvim stanicama mitohondriji nakupljaju oko autofagosoma, ali ne budu uspješno obuhvaćeni i nikada se u takvim stanicama ne nalaze unutar autofagosoma. U daljnjem istraživanju, u takve stanice unesen je divlji tip Nix što je rezultiralo potpunim povratkom aktivnosti mitofagije (Novak i sur., 2010).

Nadalje, proučavanjem uloge proteina NIX u mitofagiji otkriveno je kako je NIX u direktnoj interakciji s proteinima LC3/ GABARAP, homologima proteina Atg8, koji su neophodni za formiranje autofagosoma (Novak i sur., 2010). Interakcija se događa preko domene LIR (engl. *LC3-Interacting Region*) koja se nalazi na N - terminalnom kraju proteina NIX, specifičnog motiva WxxL pronađenog i u drugim autofagosomalnim receptorima (Kirkin i sur., 2009). Uz protein NIX, poznat je i protein BNIP3 (engl. *BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3*), koji s proteinom NIX dijeli visoku sličnost u sekvenci, lokalizaciju na vanjskoj mitohondrijskoj membrani te motiv LIR, a pokazalo se i to da djeluju zajednički ili slično u selekciji i uklanjanju mitohondrija (Zhu i sur., 2013).



**Slika 5. Mitofagija tijekom razvoja.** Prilikom indukcije mitofagije, vežu se mitohondrijski receptori Nix i Bnip3 na Atg8/LC3/GABARAP i posreduju regrutiranju rastuće izolacijske membrane (1). Interakcijom Nix i Bnip3 s Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> uzrokuje se otpuštanje Beclin1 koji aktivira nastanak autofosoma (2). Preuzeto iz Novak, 2012.

### 1.3 NIX – receptor mitofagije

Prije otkrivanja važnosti proteina NIX u mitofagiji, identificiran je kao homolog proapoptotskog humanog proteina NIP3 te se smatralo kako zajedno tvore obitelj proapoptotskih mitohondrijskih proteina (Chen i sur., 1999). Danas je poznato kako je mitohondrijski protein NIX mali transmembranski protein od svega 219 aminokiselina. Svojom transmembranskom regijom (TM) prolazi kroz vanjsku membranu mitohondrija gdje formira  $\alpha$  uzvojnica. Gen koji ga kodira, BNIP3L

gen, nalazi se na kraćem kraku humanog kromosoma 8 (8p21.2) (Matsushima i sur., 1998), te je evolucijski iznimno konzerviran. Osim vanjske mitohondrijske membrane, gdje je najčešće lokaliziran, u nekim vrstama stanica može se naći i na membrani endoplazmatskog retikuluma, ali i na jezgrinoj ovojnici (Ohi i sur., 1999). U njegovoj strukturi funkcionalno su važne tri domene: LIR (engl. *LC3-Interacting Region*), BH3-only i domena TM (Slika 6.). Domena BH3-only svrstava protein NIX u BCL-2 obitelj proapoptotskih proteina koji se nalaze na vanjskoj mitohondrijskoj membrani te su u interakciji s proteinima BCL-2 i BCL-X<sub>L</sub>. Za proapoptotsku aktivnost ovih proteina zaslužna je transmembranska domena, a ne domena BH3 kao u ostalim BH3-only proteinima (Imazu i sur., 1999). Osim toga, kratka transmembranska domena od samo 21 aminokiseline neophodna je u lokalizaciji proteina NIX u vanjsku mitohondrijsku membranu (Yasuda i sur., 1998), ali i za ulogu u dimerizaciji (Bocharov i sur., 2007), pa tako protein NIX postoji u monomernoj formi molekulske mase ~ 42 kDa i u obliku dimera veličine ~ 80 kDa. Stvaranje homodimera posljedica je lokalizacije u vanjskoj mitohondrijskoj membrani, stoga mutante TM nemaju mogućnost stvaranja homodimera (Ohi i sur., 1999; Ray i sur., 2000). Transmembranska domena jedna je od nužnih dijelova proteina NIX s obzirom na činjenicu kako ne može funkcionirati kao receptor mitofagije ukoliko nije usidren u mitohondrijsku membranu (Novak i sur., neobjavljeni rezultati).

Poznato je kako stabilna ekspresija proteina NIX usporava rast karcinoma čime se predlaže kako bi NIX mogao biti tumor supresorski protein. Osim toga, NIX stupa u interakcije s BCL2 i BCL-X<sub>L</sub>, što ima proapoptotsko djelovanje (Imazu i sur., 1999; Zhu i sur 2013) na način da blokira njihovu anti-apoptotsku aktivnost preko C-terminalne transmembranske domene (Zhang i Ney, 2009).

Nadalje, NIX je neophodan u programiranom uklanjanju mitohondrija tijekom stanične diferencijacije, točnije sazrijevanja retikulocita. Sukladno toj spoznaji, miševi s inaktiviranim genom Nix pokazuju manjkavosti u razvoju eritrocita. Takvi miševi zbog nakupljanja mitohondrija razvijaju blagu do umjerenu anemiju i jaku retikulocitozu što je pojava nakupljanja nezrelih eritrocita u krvi (Diwan i sur., 2007; Schweers i sur., 2007; Sandoval i sur., 2008). Nedostatak ovog proteina uzrokuje nakupljanje mitohondrija oko autofagosoma čime se zaustavlja mitofagija. Analiza je pokazala kako defekt u razvoju eritrocita nije izravno povezan s regulacijom puta stanične smrti, a osim toga bazična stanična autofagija nije poremećena što ukazuje na postojanje i drugih molekularnih puteva neovisnih o proteinu NIX (Schweers i sur., 2007; Sandoval i sur., 2008).

### 1.3.1 Domena LIR

Treći esencijalni dio proteina NIX je vrlo kratka domena LIR na citoplazmatskoj strani (engl. *LC3-Interacting Region*) koja sadrži konsenzus sekvencu W/YxxL/I (gdje je W/Y triptofan/tirozin, x

bilo koja aminokiselina i L/I je leucin/izoleucin) (Komatsu i sur., 2007; Pankiv i sur., 2007; Kirkin i sur., 2009).

Preko domene LIR protein NIX veže Atg8/LC3/GABARAP autofagosomalne proteine, što je dokazano u *in vivo* uvjetima koimunoprecipitacijom endogenih proteina. Osim činjenice kako su proteini u interakciji, ustanovljeno je kako protein NIX u normalnim staničnim uvjetima slabo veže protein LC3, dok u uvjetima inducirano mitohondrijskog stresa protein NIX puno jače veže protein LC3 (Novak i sur., 2010). Testiranjem niza potencijalnih motiva LIR na sekvenci proteina NIX ustanovljeno je kako je LIR-W35 glavno mjesto interakcije s Atg8 obitelji proteina, (Novak i sur., 2010).



**Slika 6. Građa proteina Nix (shema).**

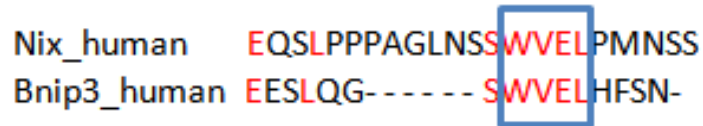
#### **1.4 Fosforilacija proteina NIX**

Nekoliko funkcionalnih homologa receptora mitofagije okarakterizirano je u različitim animalnim vrstama. Istraživanja provedena na *Saccharomyces cerevisiae* ustanovila su kako je Atg32 neophodan protein tijekom respiratornog rasta. Atg32, lokaliziran u vanjskoj mitohondrijskoj membrani, u interakciji je s autofagosomalnim proteinima Atg8 i Atg11 (Gatica i sur., 2018). Kinaze Hog1 i CK2 (engl. *casein kinase 2*) reguliraju fosforilaciju Atg32 povećavajući udruživanje s Atg11 i stimulirajući mitofagiju (Kanki i sur., 2013). Tako Atg32 stvara multikompleks s Atg8 i Atg11 djelujući na mitohondrijsku dinamiku te inicijaciju mitofagije (Kondo-Okamoto i sur., 2012). Osim kvaščeve homologa, pokazana je i fosforilacija domene LIR humanog proteina BNIP3 koja određuje aktivnost receptora te potiče mitofagiju (Zhu i sur., 2013).

S obzirom na evolucijsku povezanost i sličnost proteina NIX i receptora mitofagije BNIP3 dokazana je fosforilacija proteina NIX te utjecaj te fosforilacije na interakciju s humanim homologima proteina Atg8, LC3 i GABARAP (Rogov i sur., 2017). Interakcija između receptora autofagije i proteina ATG8/LC3/GABARAP pokazala se važna u ispravnoj aktivaciji i selektivnoj autofagiji. Otkriveno je kako je fosforilacija serina ispred domene LIR odgovorna za funkcionalnu aktivaciju receptora za OPTN i BNIP3 (Wild i sur., 2011; Zhu i sur., 2013). Komparativnom analizom sekvenci

proteina NIX i homologa BNIP3 ustanovljeno je kako je na N-terminalnom kraju ispred domene LIR konzervirana sekvenca bogata serinima (Slika 7.).

```
Nix_human   EQSLPPPAGLNSSWVELPMNSS
Bnip3_human EESLQG-----SWVELHFSN-
```



**Slika 7. Poravnanje sekvenci domene LIR proteina NIX i BNIP3.** Kvadratom je obilježena domena LIR.

Rogov i sur. (2017.) ustanovili su kako su serini ispred domene LIR na pozicijama Ser34 i Ser35 jednako važni kao i domena LIR što je pokazano eksperimentom u kojem su spomenuti serini mutirani u alanine što je uzrokovalo potpuni gubitak interakcije s proteinima LC3A i LC3B iako je domena LIR ostala netaknuta. Osim toga, eksperimentom s fosfomimetičkim mutantama (aminokiselinske supstitucije koje oponašaju djelovanje fosforiliranog proteina) gdje su serini mutirani u glutaminsku ili asparaginsku kiselinu pokazano je kako je vezanje na proteine LC3A i LC3B pojačano u odnosu na divlji tip. Taj je eksperiment napravljen na jednostrukim i dvostrukim mutantama što je dalo uvid kako je vezanje jednostrukog mutanta jače od divljeg tipa, ali ipak slabije od dvostruke fosfomimetičke mutante. Obzirom da je dokazano kako fosforilacija uvelike pospješuje vezanje proteina NIX za LC3A i LC3B potrebno je otkriti kinazu i metabolički put kojim se taj proces događa.

## **2 CILJ ISTRAŽIVANJA**

Prema dosadašnjim saznanjima o selektivnom uklanjanju mitohondrija procesom autofagije, mitofagiji, poznato je kako jednu od ključnih uloga u procesu igra protein NIX lokaliziran na vanjskoj mitohondrijskoj membrani. Protein NIX stupa u interakciju s proteinima LC3/GABARAP čime se obilježavaju mitohondriji namjenjeni autofagosomalnoj degradaciji, stoga nedostatak proteina NIX onemogućava selektivno uklanjanje mitohondrija. Najnovija istraživanja pokazuju kako je za interakciju između proteina NIX i LC3/GABARAP odgovorna fosforilacija Ser34 i Ser35 koji se nalaze ispred domene LIR proteina NIX.

Stoga je cilj ovog istraživanja identifikacija kinaze odgovorne za fosforilaciju proteina NIX što bi moglo dodatno razjasniti mehanizam regulacije mitofagije.

## **3 MATERIJALI I METODE**



## 3.1 Materijali

### 3.1.1 Osnovne kemikalije

Agar (Roth)

Agarozna (Sigma)

Akrični amid (AppliChem)

Albumin goveđeg seruma (BSA) (Roth)

Amonijev persulfat (Sigma)

Bakto tripton (Fluka)

Boja za praćenje elektroforeze *Blue/Orange 6X Loading Dye* (Promega)

Brom fenol plavo (Kemika)

Cinkov klorid (Fluka)

Dimetil sulfoksid (DMSO) (Roth)

Ekstrakt kvasca (Fluka)

Etanol (Kemika)

Etidijev bromid (koncentracija 10 ng/ml) (Sigma)

Etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA) (Roth)

Etilenglikol-bis ( $\beta$ - aminoetil eter) – N, N, N', N' –tetraoctena kiselina (EGTA) (Roth)

Fenol crveno (Sigma)

GFP-Trap agarozne kuglice (Chromotek)

Glicerol (Kemika)

Glicin (Roth)

Imidazol (Sigma)

Izopropil  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) (Roth)

Kalcijev klorid (Kemika)

Kalijev dihidrogenfosfat (Kemika)

Kalijev klorid (Kemika)

Luminol *Western blotting luminol reagent (Solution A i Solution B)* (Santa Cruz Biotechnology)

Magnezijev klorid (Fermentas)

Metanol (Sigma)

Mlijeko u prahu (Roth)

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

Natrijev azid (Kemika)

Natrijev dodecil sulfat (SDS) (Roth)

Natrijev fluorid (Fluka)

Natrijev hidrogenfosfat heptahidrat (Kemika)

Natrijev klorid (Kemika)

Ni-NTA agarozne kuglice (Qiagen)

Octena kiselina (Kemika)

Piperazin-N, N'-bis(2-etansumporna kiselina) (PIPES) (Roth)

Ponceau S (Roth)

Tripsin-EDTA (PAA)

Tris (Sigma)

Triton-X-100 (Roth)

Voda bez nukleaza (Invitrogen)

$\beta$ -merkaptoetanol (Fluka)

2-propanol (Kemika)

4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (HEPES) (Roth)

### 3.1.2 Aparatura

Aparatura za izlivanje gelova (Bio-Rad)

Aparatura za elektroforezu *Mini Protean 3* (Bio-Rad)

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

Aparatura za horizontalnu elektroforezu (Bio-Rad)

Centrifuga *Centrifuge 5424 R* (Eppendorf)

Centrifuga *Heraeus Multifuge 3L-R* (Thermo Scientific)

Mikroskop *Olympus CKX41* (Olympus)

Inkubator *Innova42 Incubator Shaker* (New Brunswick Scientific)

Inkubator *Heraeus Hera Cell 150* (Thermo Scientific)

Kamera *ChemiDoc XRS+* (Bio-Rad)

Nanodrop *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific)

Njihalice *See-saw Rocker* (Stuart)

PCR uređaj *Arktik Thermal Cycler* (Thermo Scientific)

Roteks *General rotator STR4* (Stuart)

Sonikator *SONOPULS HD 2200* (Bandelin)

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

Termoblok *Termo Shaker Incubator Thriller* (PREQLAB)

Termoblok *Thermo Block TDB-120* (BIOSAN)

Transiluminator UV (Sigma)

Vibracijska miješalica *BioVortex VI* (BIOSAN)

### 3.1.3 Puferske otopine

1X TAE pufer pripremljen iz stock otopine 50X TAE (2M Tris, 5.7% ledene octene kiseline, 100mM EDTA pH 8.0 u ddH<sub>2</sub>O)

1X pufer za elektroforezu („*running buffer*“) pripremljen iz stock otopine 10X (250 mM Tris, 2 M glicin, 1% SDS u ddH<sub>2</sub>O)

1X pufer za prijenos („*transfer buffer*“) pripremljen iz stock otopine 10X (250 mM Tris, 2M glicin, 20% v/v metanol u ddH<sub>2</sub>O)

Pufer za blokiranje TBS-BSA (5% BSA, 0.1% Na-azid, fenol crveno u sterilnom 1X TBS-u, pH 7.4 u ddH<sub>2</sub>O)

4X Tris –HCl/SDS pufer za sabijanje pH 6.8 (0.5 M Tris, 0.4% SDS u dH<sub>2</sub>O)

4X Tris –HCl/SDS pufer za razdvajanje pH 8.8 (1.5 M Tris, 0.4% SDS u dH<sub>2</sub>O)

1X TBS pufer pripravljen iz stock otopine 10X (500 mM Tris, 1.5 M NaCl, pH 7.5 u ddH<sub>2</sub>O)

Pufer za ispiranje membrana (1X TBS, 0.05% Tween, pH 7.4 u ddH<sub>2</sub>O)

1X PBS napravljen iz 10X stock otopine (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Pufer za lizu stanica pH 7.5 (50 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 25 mM NaF, 1% Triton X-100, 10μM ZnCl<sub>2</sub> u ddH<sub>2</sub>O)

Pufer za lizu stanica *QIAexpressionist Lysis buffer* pH 8.0 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol)

Pufer za ispiranje *QIAexpressionist Wash buffer* pH 8.0 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol)

2X pufer za nanošenje uzoraka (*Leamml*) (125mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 5.6% SDS, 0.01% bromfenol plavo u ddH<sub>2</sub>O)

5X pufer za nanošenje uzoraka (*Leamml*) (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 30% glicerol, 10% SDS, 0.02% bromfenol plavo + 5% β-merkaptetanol)

### 3.1.4 Osnovne otopine

*Coomassie* otopina (15% v/v etanol, 17% v/v octena kiselina, 0.25% v/v *Coomassie brilliant blue* u dH<sub>2</sub>O)

Otopina za odbojavanje *Coomassie* boje (20% v/v metanol, 10% v/v octena kiselina u dH<sub>2</sub>O)

Ponceau S otopina (10% v/v koncentrirana octena kiselina, 0.5% v/v Ponceau S u ddH<sub>2</sub>O)

Otopina CaCl<sub>2</sub> pH 7.0 (60 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol, 10 mM PIPES)

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

5%-tna otopina mlijeka u prahu u 1X TBS puferu

### 3.1.5 Bakterijske stanice

#### *Escherichia coli* soj DH5α

F- Φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>) *phoA supE44 λ-thi-1 gryA96 relA1*

#### *Escherichia coli* soj BL21DE3

*fhuA2 [lon] ompT gal* (λ DE3) [*dcm*] Δ*hsdS* λ DE3 = λ *sBamHI* Δ*EcoRI*-B *int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5*

### 3.1.6 LB hranjive podloge (engl. *Luria-Bertani broth*)

Prilikom uzgoja bakterija *E. coli* korištene su tekuća (1% bakto tripton, 0.5% ekstrakt kvasca, 0.5% NaCl) i kruta (1% bakto tripton, 0.5% ekstrakt kvasca, 0.5% NaCl, 0.5% agar) sterilizirana LB hranjiva podloga. U LB podloge koje su se koristile prilikom selekcije transformiranih bakterija, ovisno o rezistenciji koju nosi plazmid, dodani su antibiotici ampicilin (Roth) i kanamicin (Roth) finalne koncentracije 1X.

### 3.1.7 Stanične linije

**HEK293** - humane embrionalne stanice bubrega

### 3.1.8 Mediji

Za uzgoj stanica HEK293 u kulturi korištena je tekuća hranjiva podloga DMEM (engl. *Dulbecc's modified Eagle's medium*) (PAA) uz dodatak 10% FBS (engl. *Fetal Bovine Serum*) i 1% penicilin/streptomycin (PAA).

### 3.1.9 Komercijalni kompleti

dNTP set 100 mM dNTP Set PCR Grade (Invitrogen)

Kompleti za izolaciju i pročišćavanje plazmidne DNA:

- *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas)
- *QIAfilter Midi Kit for purification of ultrapure, transfection grade plasmid DNA* (QIAGEN)

Komplet za transfekciju *jetPRIME* (Polyplus transfection)

### 3.1.10 Protutijela

#### 1) Primarno protutijelo

Anti-GFP monoklonsko protutijelo proizvedeno u mišu (Roche)

Anti-GFP poliklonsko protutijelo proizvedeno u kuniću (Clontech)

Anti-MYC monoklonsko protutijelo proizvedeno u mišu (Santa Cruz Biotechnology)

## 2) Sekundarno protutijelo

Kozje anti-mišje sekundarno protutijelo konjugirano peroksidazom iz hrena (HRP, engl. *Horseradish peroxidase*) (Bio-Rad)

Kozje anti-kuniće sekundarno protutijelo konjugirano peroksidazom iz hrena (HRP, engl. *Horseradish peroxidase*) (Dako)

### 3.1.11 Enzimi

*Dnaza I* (koncentracija matične otopine 1 mg/ml)

*Dpn I* restrikcijska endonukleaza (enzimatska aktivnost 10 u/μl) uz pripadajući *DpnI* pufer (Thermo Scientific)

*Pfu II* polimeraza s pripadajućim 10X *PfuUltraII* puferom (Fermentas)

### 3.1.12 Proteazni inhibitori

Aprotinin (koncentracija matične otopine 10 mg/ml) (Sigma)

Fenilmetilsulfonyl fluorid (PMSF) (koncentracija matične otopine 100 mM) (Roth)

Leupeptin (koncentracija matične otopine 1 mg/ml) (Roche)

Natrijev ortovanadat (koncentracija matične otopine 1M)

### 3.1.13 Biljezi molekulskih masa

**Proteinski biljeg** *Protein Marker VI (10-245) prestaines* (AppliChem)

**DNA ljestve** *1 kb DNA Step Ladder* (Promega)

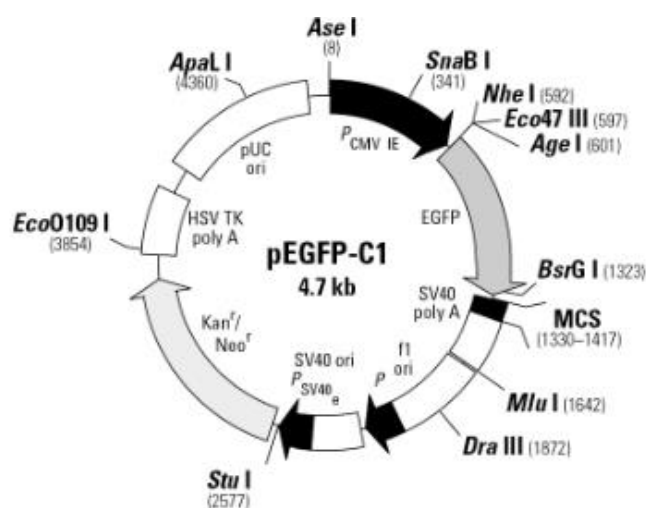
### 3.1.14 Oligonukleotidne početnice

Tablica 1. Oligonukleotidne početnice i njihovi nukleotidni slijedovi

Naziv početnice	Nukleotidni slijed početnice
GSK3 $\beta$ _Active_S9A_Forward	5' GCCCAGAACCACCGCCTTTGCGGAGAG 3'
GSK3 $\beta$ _Active_S9A Reverse	5' CTCTCCGCAAAGGCGGTGGTTCTGGGC 3'
GSK3 $\beta$ _Inactive_K85R_Forward	5' CTGGTCGCCATCAGGAAAGTATTGCAG 3'
GSK3 $\beta$ _Inactive_K85R Reverse	5' CTGCAATACTTTCCTGATGGCGACCAG 3'

### 3.1.15 Plazmidni vektori

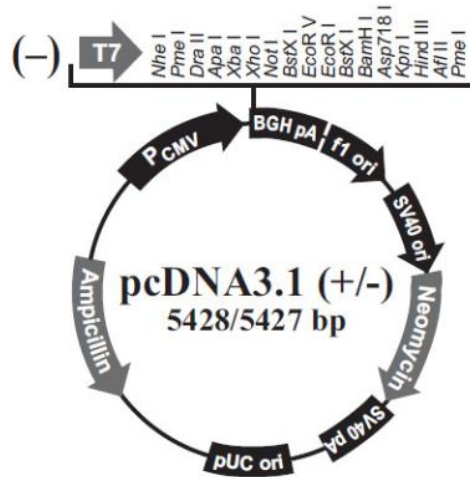
Plazmid pEGFP-C1 korišten je za kloniranje humane sekvence gena NIX u višestrukom mjestu za kloniranje, MCS (engl. *Multiple Cloning Site*) kako bi se stvorili konstrukti EGFP-NIX WT (divlji tip), EGFP-NIX  $\Delta$ LIR, EGFP-NIX S34,35A, i EGFP-NIX G204A metodom mutageneze *in vitro* primjenom PCR-a (Slika 8.). Ovaj plazmid nosi rezistenciju na kanamicin, pa je taj antibiotik korišten u selekciji transformiranih bakterija.



Slika 8. Restriksijska mapa plazmida pEGFP-C1. Preuzeto s internet stanice Invitrogen.

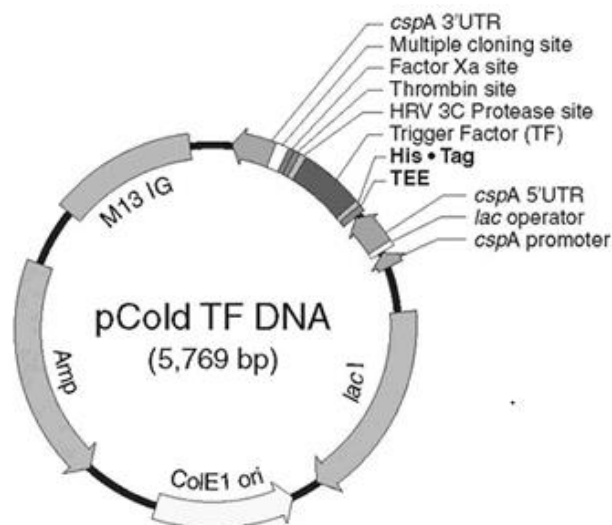


**Plazmid pcDNA3.1 (-)** s prethodno ubačenim slijedom za biljeg Myc, korišten je za stvaranje Myc-IKK $\beta$  konstrukta metodom mutageneze *in vitro* primjenom PCR-a (Slika 9.). Ovaj plazmid nosi rezistenciju na ampicilin, pa je taj antibiotik korišten za selekciju transformiranih bakterija.



**Slika 9. Restriksijska mapa plazmida pcDNA3.1.** Preuzeto s internet stranice Invitrogen.

**Plazmid pColdTF** korišten je za kloniranje sekvence kinaze GSK3 $\beta$  u višestrukom mjestu za kloniranje, MCS (engl. *Multiple Cloning Site*) kako bi se stvorili mutanti His-GSK3 $\beta$  S9A i K85R metodom mutageneze *in vitro* primjenom PCR-a (Slika 10.). Ovaj plazmid nosi rezistenciju na ampicilin, pa je taj antibiotik korišten u selekciji transformiranih bakterija.



**Slika 10. Restriksijska mapa plazmida pColdTF.** Preuzeto s internet stranice Research Gate.

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Priprema i pročišćavanje His-GSK3 $\beta$ fuzijskog proteina

Za dokazivanje potencijalnih interakcija između mitohondrijskog proteina NIX, divljeg tipa i njegovih mutanti s potencijalnim kinazama koje taj protein fosforiliraju korištene su metode *Pull-down* i imunoprecipitacija. Metoda *Pull-down* se bazira na principu interakcije mamca (engl. *bait*) i plijena (engl. *prey*) na način da je protein mamac označen specifičnom oznakom, privjeskom (engl. *tag*).

Potencijalna kinaza GSK3 $\beta$  označena je s 6X histidinskim privjeskom veličine ~ 1kDa (*His-tag*), kasnije imobilizirana na Ni-NTA agarozne kuglice što predstavlja protein mamac. Proteini koji predstavljaju plijen su EGFP-NIX fuzionirani proteini (divlji tip,  $\Delta$ LIR, S34,35A, G204A) koji se nalaze u ukupnom lizatu stanica u kojima su prekomjerno eksprimirane.

#### 3.2.1.1 Indukcija ekspresije His- GSK3 $\beta$ fuzioniranog proteina

Kako bi se izradili His- GSK3 $\beta$  fuzionirani proteini vezani na Ni-NTA agarozne kuglice potrebno je prvenstveno transformirati bakterije *E.coli* soja BL21DE3 plazmidom pColdTF u kojem se nalazi histidinom obilježena kinaza GSK3 $\beta$ .

Bakterijske stanice transformirane su sa 100 ng plazmida u 200  $\mu$ l te su nasadene na krute hranjive LB podloge s ampicilinom. Stanice su inkubirane preko noći na 37 °C . Inokulirana je po jedna transformirana bakterijska kolonija u 20 ml tekuće LB hranjive podloge uz dodatak ampicilina te je inkubirana preko noći u inkubatoru na 37 °C uz konstantno miješanje na 220 okretaja/ min.

12 ml prekonodne bakterijske kulture dodano je u 200 ml tekuće LB hranjive podloge uz dodatak ampicilina i inkubirano na 37 °C uz konstantno miješanje 220 okretaja/ min te se rast bakterija intenzivno pratio do postizanja optičke gustoće OD<sub>600</sub>= 0.4-0.6. Praćenje se obavljalo spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 600 nm. Pri zadovoljavajućoj vrijednosti OD<sub>600</sub> bakterije se nalaze u logaritamskoj fazi rasta kada je metabolizam najintenzivniji, a time i stvaranje proteina najveća.

Nakon postizanja optimalne vrijednosti optičke gustoće bakterijama je dodan induktor IPTG (izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid) konačne koncentracije 0.5 mM kako bi se inducirala proizvodnja fuzijskih proteina jer je promotor u plazmidu IPTG inducibilan. Indukcija je trajala preko noći na 16 °C uz konstantno miješanje 220 okretaja/ min.

Prije i nakon indukcije IPTG-om uzeti su alikvoti od 100 µl bakterijske kulture i centrifugirani 5 min na 4000 okretaja/ min. Talozci su potom pomiješani s 30 µl 2X Leammi pufera za nanošenje uzoraka i inkubirani 5 min na 95 °C na termobloku.

### **3.2.1.2 Izdvajanje proteina iz bakterijskih stanica *E.coli***

Kako bi proteini proizvedeni u bakterijama ostali sačuvani u nativnom obliku njihova izolacija je napravljena na ledu.

Nakon indukcije bakterijska je suspenzija centrifugirana 20 min na 4000 okretaja/ min na 4 °C, a bakterijski talog je izvagan kako bi se odredio volumen u kojem će se isti resuspendirati. Volumen se određuje prema omjeru 4:1 u odnosu volumen : masa.

U ovom eksperimentu talog je resuspendiran u 10.4 ml *QIAexpressionist Lysis* pufera uz dodatak lizozima te je bakterijska suspenzija inkubirana na ledu 30 min. Uzorak je soniciran 2 min (1 sek puls – 1 sek pauza) na sonikatoru SONOPULS HD 2200 (Bandelin), a nakon sonikacije dodan je MgCl<sub>2</sub> i Dnaza I konačne koncentracije 1x uz inkubaciju na ledu 15 min. Soniciran uzorak je centrifugiran 60 min na 8500 okretaja/min na 4 °C.

### **3.2.1.3 Priprema Ni-NTA agaroznih kuglica s vezanim fuzijskim proteinima**

His-GSK3β fuzijski protein potrebno je vezati na Ni-NTA agarozne kuglice (Qiagen) na način da one sadrže Ni<sup>2+</sup> ione koji su visoko afinitetni ligand za His-tag s fuzijskog proteina čime je vezanje omogućeno.

Supernatant je odvojen i njemu je dodano 1000 µl Ni-NTA agaroznih kuglica koje su prethodno pročišćene u 1X puferu PBS u seriji resuspendiranja i centrifugiranja na 2000 okretaja/ min, 3 min na 4 °C ponovljenih 3 puta. Bakterijski lizat i dodane Ni-NTA agarozne kuglice inkubirane su 2 h na 4 °C uz konstantnu vrtnju na roteksu *General rotator STR4* (Stuart) kako bi se His-GSK3β fuzijski proteini vezali za Ni-NTA agarozne kuglice.

### **3.2.1.4 Pročišćavanje His-GSK3β Ni-NTA agaroznih kuglica**

His-GSK3β Ni-NTA agarozne kuglice potrebno je pročititi od ostatka bakterijskog lizata što je napravljeno nizom ispiranja kuglica na način da su prvo centrifugirane 3 min, 2000 okretaja/ min na 4 °C, odstranjen je supernatant, potom su kuglice resuspendirane u 500 µl PBS-a i ponovno centrifugirane pri istim uvjetima. Ova serija ispiranja ponovljena je 5 puta, a prilikom zadnjeg

uklanjanja supernatanta korištena je inzulinska šprica kako bi se tekući dio mogao sigurno ukloniti s pročišćenih Ni-NTA agaroznih kuglica s vezanim His- GSK3 $\beta$  fuzijskim proteinom. Takve kuglice resuspendirane su u 1000  $\mu$ l pufera PBS i do korištenja su čuvane na 4 °C.

### 3.2.1.5 Provjera uspješnosti pročišćavanja Ni-NTA His-GSK3 $\beta$ agaroznih kuglica

Kako bi provjerili uspješnost vezivanja i pročišćavanja Ni-NTA agaroznih kuglica i His-GSK3 $\beta$  fuzioniranim proteinom iz ukupnog bakterijskog lizata te odredili volumen koji će biti prikladan prilikom eksperimenta *Pull-down*, pročišćene kuglice analizirane su elektroforezom u 10% poliakrilamidnom gelu. Testirani su volumeni 1, 2, 4, 8, 10, 15 i 20  $\mu$ l Ni-NTA agaroznih kuglica s His-GSK3 $\beta$  koji su u istom volumenu pomiješani s 2X puferom za nanošenje (Leamml) i inkubirani 5 min na 95 °C.

Elektroforeza je provedena na aparaturi Mini Protean III (Bio-Rad) gdje je razdvajanje proteina napravljeno na 80V kroz gel za sabijanje i 120V kroz gel za razdvajanje u 1X puferu za elektroforezu. Korišten je proteinski standard *Protein Marker VI (10-245) prestained* (AppliChem). Nakon elektroforeze, gelovi su inkubirani u otopini *Coomassie* koja reverzibilno boja proteine, a odbojavanje viška boje napravljeno je preko noći uz njihanje, u otopini za odbojavanje *Coomassie* boje.

Sukladno dobivenim rezultatima određeni su optimalni volumeni agaroznih kuglica Ni-NTA His-GSK3 $\beta$  pogodnih u daljnjem korištenju u eksperimentu *Pull-down*.

### 3.2.2 Dokazivanje interakcija proteina *Pull-down* metodom i imunoprecipitacijom

Metoda *Pull-down* se koristi za dokazivanje međusobne interakcije dva ili više proteina u *in vitro* uvjetima gdje jedan protein predstavlja mamac (engl. *bait*) koji je označen specifičnom oznakom (engl. *tag*) te mu ta oznaka omogućuje visoko afinitetno vezanje za imobilizirani ligand koji služi odvajanju na njega vezanih proteina iz ostatka staničnog lizata. Drugi protein je plijen (engl. *prey*) i to je protein od interesa kojeg se testira na interakciju s mamcem. Interakcija među tim proteinima može se dokazati analizom *Western blot*.

Imunoprecipitacija je metoda koja omogućuje izdvajanje proteina od interesa iz ukupnog staničnog lizata proteina pomoću specifičnog antitijela s kojim stvara kompleks. Za istraživanje interakcija između dva ili više proteina, koristi se metoda koimunoprecipitacije. Postojanje međusobne interakcije provjerava se *Western blot* analizom.

Za dokazivanje mogućih interakcija između mitohondrijskog proteina NIX i njegovih mutanti s potencijalnim kinazama koje fosforiliraju protein NIX potrebno je prekomjerno eksprimirati EGFP-NIX (divlji tip,  $\Delta$ LIR, S34,35A, G204A) i Myc-IKK $\beta$  u HEK293 stanicama.

### 3.2.2.1 Transfekcija stanica HEK293 kompletom jetPRIME

Transfekcija je postupak unosa strane molekule DNA u eukariotske stanice. Metoda može rezultirati stabilnom transfekcijom kada se vektor ugrađuje u genom stanice ili prolaznom transfekcijom kada se uneseni vektor nakon nekog vremena odbacuje.

U ovom radu transfekcija na HEK293 stanicama napravljena je transfekcijskim kompletom *jetPRIME* u svrhu prekomjerne ekspresije plazmidne DNA. Postupak je napravljen prema uputama proizvođača.

Stanice HEK293 nasađene su na ploče za uzgoj staničnih kultura u tzv. *6-well-ove* u 2 ml DMEM + 10% FBS + 1% penicilin/streptomycin tekuće hranjive podloge te su inkubirane na 37 °C uz 5% CO<sub>2</sub> do postizanja optimalne konfluentnosti za transfekciju od 70-80%.

Stanice su kotransfecirane plazmidnom DNA s EGFP-Nix (divlji tip,  $\Delta$ LIR, S34,35A, G204A) i pcDNA/Myc-IKK $\beta$  sekvencama. Korišteno je 1  $\mu$ g DNA (po 0,5  $\mu$ g svakog plazmidnog konstrukta) koje je u transfekcijskoj smjesi pomiješano s 2  $\mu$ l reagensa *jetPRIME* zajedno u 200  $\mu$ l pufera *jetPRIME*, a smjesa je kratko promiješana na vibracijskoj miješalici i centrifugirana te ostavljena 10 min na sobnoj temperaturi kako bi se stvorili kompleksi između plazmidne DNA i *jetPRIME* reagensa. Nakon toga smjesa je ravnomjerno nanosena na stanice na pločama za uzgoj koje su se potom inkubirale 24 h u inkubatoru na 37 °C pri 5% CO<sub>2</sub>.

Nakon inkubacije potrebno je provjeriti uspješnost transfekcije fluorescentnim mikroskopom. Plazmidni konstrukti EGFP-NIX fluoresciraju što omogućuje zabilježavanje signala uspjele transfekcije.

### 3.2.2.2 Izdvajanje proteina iz stanica HEK293

Stvaranje staničnog lizata zahtjeva mehaničku i enzimatsku razgradnju membrana stanica, što se nameće kao iznimno važan korak jer utječe na ukupnu količinu i čistoću proteina, njihovu biološku aktivnost ili može dovesti do proteolitičke razgradnje željenog proteina. Stoga, kako bi se proteini očuvali u svom nativnom obliku postupak se provodi na ledu uz dodatak proteaznih inhibitora u pufer za staničnu lizu. Korišteni inhibitori su: aprotinin, leupeptin, natrijev ortovanadat i fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF). Natrijev ortovanadat inhibitor je fosfataza, aprotinin i PMSF su inhibitori serinskih proteaza, a leupeptin inhibira cisteinske, serinske i treoninske proteaze. Osim navedenog, korištena je i

DNaza I koja degradira molekule DNA iz staničnog lizata, a za njenu aktivnost potrebno je dodati i  $MgCl_2$  koji aktivira djelovanje enzima Dnaze I.

Transfecirane stanice isperu se prvo u 1X PBS-u, a potom se na stanice doda 500  $\mu$ l pufera za lizu stanica s dodanim proteaznim inhibitorima što se inkubira 30 min na ledu. Sadržaj se prebaci u ohlađene mikroeprovete i centrifugira na 5000 okretaja/ min 20 min na 4 °C. Otopljeni proteini nalaze se u tekućem supernatantu od kojeg je odvojeno 50  $\mu$ l ukupnog staničnog lizata koji je denaturiran mješanjem s 12.5  $\mu$ l 5X pufera za nanošenje uzoraka (Leamml) te je inkubirano 5 min na 95 °C na termobloku, a ostatak staničnog lizata, kao i zagrijani uzorci, pohranjeni su na -20 °C do korištenja.

### **3.2.2.3 Pull-down i koimunoprecipitacija**

#### **3.2.2.3.1 His-GSK3 $\beta$ Pull-down eksperiment**

400  $\mu$ l staničnog lizata pomiješano je s 20  $\mu$ l unaprijed pripremljenih His-GSK3 $\beta$  Ni-NTA agaroznih kuglica, te je smjesa inkubirana preko noći na 4 °C uz konstantnu vrtnju na rotekstu.

Nakon završene inkubacije, agarozne kuglice su ispirane kako bi se otklonili nevezani proteini iz staničnog lizata. Ispiranje se radi u seriji od 4-5 ponavljanja koja se sastoji od centrifugiranja na 2000 okretaja/ min tokom 3 min na 4 °C, odstranjivanja supernatanta i resuspendiranja kuglica u 500  $\mu$ l pufera za lizu stanica. U posljednjem ispiranju, nakon centrifugiranja, supernatant je potrebno potpuno odstraniti pa je za to korištena inzulinska šprica čiji je otvor manji od promjera agaroznih kuglica što omogućuje potpuno uklanjanje pufera.

Uzorci su potom pomiješani s 20  $\mu$ l 2X pufera za nanošenje uzoraka (Leamml) te je inkubirano 5 min na 95 °C na termobloku. Uzorci su pohranjeni na 4 °C do nanošenja na poliakrilamidni gel.

#### **3.2.2.3.2 GFP-Trap koimunoprecipitacija**

U ovom radu u metodi koimunoprecipitacije korištene su komercijalno dostupne GFP-Trap agarozne kuglice (Chromotek) kako bi specifično vezale EGFP-NIX konstrukte kotransfecirane u stanicama zajedno s pcDNA/Myc-IKK $\beta$ . Metodom je moguće, ukoliko su proteini u međusobnoj interakciji, vezivanjem jednog proteina na kuglice precipitirati i drugi protein.

Agarozne kuglice potrebno je prije korištenja pročititi što je napravljeno ispiranjem u 500  $\mu$ l pufera PBS te centrifugiranjem na 2000 okretaja/min tijekom 2 min na 4 °C. Serija ispiranja i centrifugiranja ponovljena je 3 puta.

Na 400  $\mu$ l staničnog lizata dodano je 2  $\mu$ l GFP-Trap agaroznih kuglica te je smjesa inkubirana tijekom 1 h na roteksu na temperaturi 4 °C.

Nakon inkubacije, uzorci se centrifugiraju na 2000 okretaja/ min, 2 min na 4 °C te se odbacuje supernatant. Agarozne kuglice se resuspendiraju u 500  $\mu$ l pufera PBS i ponavlja se centrifugiranje pri istim uvjetima. Cijeli postupak ispiranja napravljen je 3 puta. Nakon posljednjeg centrifugiranja inzulinskom špricom u potpunosti se odstrani višak pufera PBS te se GFP-Trap agarozne kuglice resuspendiraju u 20  $\mu$ l 2X pufera za nanošenje uzoraka (Leammler) te je inkubirano 10 min na 95 °C na termobloku kako bi se proteini u kompleksu odvojili od GFP-Trap agaroznih kuglica u supernatant. Uzorci su do nanošenja na gel pohranjeni na 4 °C.

#### **3.2.2.4 Razdvajanje proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecil sulfata (SDS-PAGE)**

Elektroforeza je metoda razdvajanja molekula djelovanjem električnog polja na temelju različitih fizičkih i kemijskih karakteristika poput veličine, oblika, naboja i sl. U ovom radu korištena je denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu gdje se denaturacija postiže dodatkom natrij dodecil sulfata (SDS) zbog čega se razdvajanje temelji isključivo na veličini proteina. Također, korišteni poliakrilamidni gel se sastoji od dva gela, gel za sabijanje i gel za razdvajanje s različitim pH. Proteini prvo prolaze kroz gel za sabijanje gdje se na granici gelova koncentriraju u usku prugu na jednakoj razini, a potom daljnjim prolaskom kroz gel postiže se vrlo efikasno razdvajanje prema veličini (Ambrović i sur., 2007.).

Gelovi za denaturirajuću elektroforezu napravljeni su korištenjem aparature za izlivanje gelova (Bio-Rad). Korišteni je 10%-tni gel za razdvajanje (10% akrilamid (40%), 25% pufer za razdvajanje pH 8.8, 0.5% APS, 0.1% TEMED) i 4%-tni gel za sabijanje (4% akrilamid (40%), 24% pufer za sabijanje pH 6.8, 0.5% APS, 0.1% TEMED). Elektroforeza je napravljena na aparaturi *Mini Protean 3* (Bio-Rad).

Unaprijed pripremljeni uzorci nanoseni su na poliakrilamidni gel u volumenu od 30  $\mu$ l. Razdvajanje je u gelu za sabijanje provedeno na 80 V, a u gelu za razdvajanje na konstantnih 120 V u 1X puferu za elektroforezu.

Za određivanje molekulske mase proteina korišten je proteinski standard molekulskih masa *Protein Marker VI (10-245) prestained* (AppliChem).

### 3.2.2.5 Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu

Za prijenos proteina na nitroceluloznu membranu korišten je sustav za prijenos proteina *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad). Prijenos proteina napravljen je u 1X puferu za prijenos tokom 120 min uz konstantnu jakost struje od 200 mA.

#### 3.2.2.5.1 Bojanje proteina nakon prijenosa na membranu

Nakon prijenosa proteina s gela na membranu potrebno je odrediti učinkovitost prijenosa. Membrane se stoga nakratko inkubiraju u otopini Ponceau S koja reverzibilno boji proteine, a potom se ispiru u destiliranoj vodi do pojave jasno vidljivih vrpca što se dokumentira skeniranjem.

#### 3.2.2.6 Imunodetekcija proteina na membrani – Western blot

Za identifikaciju proteina u kompleksnoj proteinskoj smjesi koristi se analiza *Western blot*, tehnika koja se temelji na prepoznavanju i stvaranju kompleksa između antigena i protutijela na način da se protutijelo veže na antigen koji se nalazi na nitroceluloznoj membrani.

Primarno protutijelo veže se direktno na antigen i ono mora biti visoko specifično za traženi protein, a na njih se vežu sekundarna protutijela koja su u kompleksu s peroksidazom iz hrena, HRP (engl. *HorseRadish Peroxidase*). Ovaj enzim omogućuje vidljivost signala na način da u dodiru s kemiluminiscentnim supstratom dolazi do emisije svjetla na mjestima gdje se nalaze sekundarna protutijela što se zabilježava na kameri *ChemiDoc XRS+* (Bio-Rad) kao tamne pruge.

Membrane su inkubirane preko noći na 4 °C u puferu za blokiranje TBS-BSA. Uloga pufera za blokiranje je smanjenje nespecifičnih vezanja primarnih protutijela na samu membranu. Nakon blokiranja membrane su prebačene na inkubaciju u primarno protutijelo. Membrane na kojima su preneseni EGFP-NIX konstrukti inkubirane su u anti-GFP poliklonalnskom protutijelu proizvedenom u kuniću (razrijeđenje 1:2000), a membrane s Myc-IKK $\beta$  konstruktom u anti-MYC monoklonalnskom protutijelu proizvedenom u mišu (razrijeđenje 1:1000). Protutijela su razrijeđena u puferu za blokiranje TBS-BSA, a inkubacija je trajala 90 min uz njihanje na sobnoj temperaturi.

Nakon inkubacije u primarnom protutijelu, membrane je potrebno ispirati u 1X TBS 0,05% Tween puferu za ispiranje uz promjenu pufera 5 puta svakih 10 min uz njihanje.

Membrane su potom inkubirane 60 min u kozjem anti-mišjem (razrijeđenje 1:5000) i kozjem anti-kunićjem (razrijeđenje 1:6000) sekundarnom protutijelu konjugiranom HRP enzimom koja su razrijeđena u 5%-tnoj otopini mlijeka u prahu. Naposljetku, membrane su ispirane 5 puta po 10 min u 1X TBS 0,05% Tween puferu za ispiranje.



Detekcija proteina na membrani napravljena je kemiluminiscencijom. Na membrane je u omjeru 1:1 dodana mješavina otopine A i otopine B luminola za detekciju *Western blotting luminol reagent* (Santa Cruz Biotechnology) te su kratko inkubirane u otopini. Membrane su postavljene na prozirnu foliju i zatvorene u kameru *ChemiDoc XRS+* gdje su pomoću programa *ImageLab* podešeni uvjeti trajanja ekspozicije i broja slika. Ekspozicija je trajala 6 min. Obrada slika također je napravljena u istom programu.

### 3.2.3 Mjesno specifična *in vitro* mutageneza primjenom PCR-a

Lančana reakcija polimerazom, PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) *in vitro* je metoda umnažanja specifične regije od interesa na molekuli DNA. Kako bi se umnožile ciljane regije koriste se dvije specifične početnice koje su komplementarne s krajevima molekule DNA. Reakcija se odvija u nizu ponavljajućih ciklusa: denaturacija molekule DNA, specifično vezanje oligonukleotidnih početnica na kalup DNA i sinteza komplementarnog lanca DNA.

Kako bi se mutacija uvela na ciljno mjesto na DNA koriste se početnice koje u sebi nose željenu mutaciju. Osim početnica, važna je i termostabilna DNA polimeraza s visokom točnosti polimerizacije za unos mutacije u ciljni dio DNA, te se kao kalup DNA koristi vektor s odgovarajućim odsječkom DNA.

U ovom postupku *in vitro* mutageneze ciljne mutacije unošene su u prethodno ukloniranu sekvencu kinaze GSK3 $\beta$  fuzioniranu s vektorom pColdTF. Kinaza GSK3 $\beta$  fuzionirana je s 6 histidinskih ostataka u fuzijski protein His-GSK3 $\beta$ .

U ovom radu u vektor pColdTF uvedena je ciljna mutacija:

- **S9A** (supstitucija serina alaninom na aminokiselinskom položaju 9 sekvence kinaze GSK3 $\beta$ )
- **K85R** (supstitucija lizina argininom na aminokiselinskom položaju 9 sekvence kinaze GSK3 $\beta$ )

#### 3.2.3.1 Dizajniranje početnica za uvođenje specifičnih mutacija

Sve početnice su dizajnirane prema željenim mutacijama i naručene (Mycrosynth). Prilikom dizajniranja praćena su sljedeća pravila:

- 1) Početnice trebaju sadržavati željenu mutaciju i sparivati se na isti slijed DNA samo na komplementarnim lancima
- 2) Početnice trebaju biti duge 25-45 pb
- 3) Željena mutacija treba biti u sredini početnice tako da s obje strane ostane oko 10-15 pb nepromijenjenog slijeda DNA
- 4) Početnice trebaju imati barem 40% GC nukleotida te trebaju počinjati i završavati s G ili C bazom (barem jednom)

U poglavlju 3.1.14. *Oligonukleotidne početnice* navedeni su nukleotidni slijedovi dizajniranih početnica.

### 3.2.3.2 Ciljana mutageniza *in vitro* primjenom metode PCR

Dobivene početnice razrijeđene su u vodi bez nukleaza (Invitrogen) na radnu koncentraciju od 10 pmol/ $\mu$ l. Za svaku ciljnu mutaciju koju unosimo u DNA napravljena je zasebna PCR reakcijska smjesa koja sadržava:

H <sub>2</sub> O (bez nukleaza)	36 $\mu$ l
10X <i>PfuUltra II</i> pufer (Fermentas)	5 $\mu$ l
DNA kalup	5 $\mu$ l
- Plazmid pColdTF s ukloniranom sekvencom kinaze GSK3 $\beta$ (20 ng/ $\mu$ l)	
Smjesa dNTP-ova (radna koncentracija 40mM) (Invitrogen)	1 $\mu$ l
Početnica 5' (20 $\mu$ M/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Početnica 3' (20 $\mu$ M/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
<i>Pfu II</i> polimeraza (Fermentas)	1 $\mu$ l
<hr/>	
Ukupno	50 $\mu$ l

PCR reakcijske smjese kratko su izmiješane na vibracijskoj miješalici i potom centrifugirane.

PCR reakcija postavljena je na PCR uređaju Arktik Thermal Cycler na programu:

1. 95 °C 3 min – početna denaturacija
  2. 95 °C 1 min – denaturacija lanca
  3. 56 °C 1 min – vezanje početnica na DNA kalup
  4. 68 °C 12 min 30 sec – sinteza komplementarnih lanaca
  5. 68 °C 12 min 30 sec – završno produžavanje lanaca
  6. 4 °C  $\infty$
- } x 25 ciklusa

### 3.2.3.3 Provjera uspješnosti PCR reakcije

Uspješnost PCR reakcije provjerena je elektroforezom produkta reakcije. Metoda se zasniva na razdvajanju fragmenata DNA temeljeno na njihovoj molekulskoj masi. Molekulska masa direktno je odgovorna za pokretljivost DNA molekula u električnom polju, te je put koji pređe fragment obrnuto proporcionalan logaritmu njegove mase (Ambrović i sur., 2007).

Za provedbu elektroforeze napravljen je 1%-tni agarozni gel u 1X TAE puferu s dodatkom 0,034% etidijevog bromida. Nakon polimerizacije u kalupu i postavljanja u aparaturu za horizontalnu elektroforezu (Bio-Rad) u 1X TAE puferu nanoseno je po 5 µl PCR produkta pomiješanog s 1 µl boje za praćenje elektroforeze *Blue/Orange 6X Loading Dye* (Promega). Elektroforeza je provedena na 100V tijekom 30 min. Kao biljeg molekulske mase korišten je *1 kb DNA Step Ladder* (Promega).

Položaj na kojem se nalazi DNA u gelu je vidljiv zbog interkaliranja etidijevog bromida između baza molekula DNA koji pod UV svjetlom fluorescira. Zahvaljujući fluorescenciji gel je fotografiran uz pomoć uređaja Transilluminator UV (Sigma).

### 3.2.3.4 Uklanjanje početnog DNA kalupa iz produkta PCR reakcije

Kako bi u daljnjem postupku mogli koristiti samo novi produkt DNA potrebno je ukloniti iz reakcije početni DNA kalup (metilirana DNA). Time se osigurava prisutnost DNA koja nosi uvedenu ciljnu mutaciju (nemetilirana DNA).

U postupku uklanjanja kalupa DNA korištena je restriksijska endonukleaza *Dpn I* (Thermo Scientific). *Dpn I* enzim prepoznaje metiliranu sekvencu na palindromu 5'-GmATC-3' dvolančane DNA kao DNA molekule bez željene mutacije, kida je i ostavlja u uzorku samo nemetilirani produkt PCR reakcije koja sadrži ciljnu mutaciju.

Reakcijska smjesa za *Dpn I* tretman sadržava 44 µl PCR produkta, 5 µl *Dpn I* pufera i 1 µl *Dpn I* enzima (10 u/µl). Smjesa je inkubirana na 37 °C kroz 1h u termobloku *Thermo Block TDB-120* (BIOSAN).

### 3.2.3.5 Precipitacija DNA

Nakon *Dpn I* tretmana, DNA je moguće precipitirati kako bi povećali njenu koncentraciju. U postupku precipitacije pomiješan je PCR produkt nakon tretmana, s 165  $\mu$ l 100%-tnog etanola i 9,5  $\mu$ l 3M Na-acetata te je ostavljeno da se inkubira 15 min na ledu. Nakon inkubacije uzorak je centrifugiran 15 min na 13000 okretaja/min na 4 °C. Nastao talog ispran je u 500  $\mu$ l 70%-tnog etanola te je uzorak ponovno centrifugiran pri istim uvjetima. Talogu se odstrani supernatant te se ostavi da se osuši i ispari etanol kako bi mu se dodalo 10  $\mu$ l vode bez nukleaza u kojem se talog ponovno resuspendira.

### 3.2.4 Priprema i transformacija kompetentnih DH5 $\alpha$ bakterijskih stanica plazmidnom DNA

Postupak unosa strane plazmidne DNA u bakterijske stanice naziva se transformacija. Metoda se sastoji od dva dijela: 1. stvaranja kompetentnih bakterijskih stanica sposobnih da prime unesenu stranu DNA i 2. transformacija bakterijskih stanica plazmidnom DNA nakon čega se vrši selekcija samo onih bakterija koje su primile stranu DNA. Selekcija se vrši nasadivanjem transformiranih bakterija na krute hranjive podloge s antibiotikom za selekciju. Antibiotik koji se koristi ovisi o genu za rezistenciju koju nosi plazmidna DNA (Ambrović i sur., 2007).

U ovom radu korištena je metoda transformacije CaCl<sub>2</sub> uz toplinski šok tzv. „CaCl<sub>2</sub>/ *heat shock*“ metoda. Ca<sup>2+</sup> ioni prilikom transformacije tvore kompleks s negativno nabijenom molekulom DNA čime se pospešuje njen ulazak kroz pore na staničnoj stjenci bakterija uzrokovane povišenom temperaturom.

#### 3.2.4.1 Priprema kompetentnih bakterijskih stanica DH5 $\alpha$

Bakterijski soj *E. coli* DH5 $\alpha$  ima niz brojnih mutacija koje ga čine pogodnim za transformaciju, a jedne od najkorisnijih su mutacija *endA1* (smanjuje endonukleaznu digestiju plazmidne DNA unutar bakterije) i mutacija *hsdR17* (r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) (smanjuje aktivnost *EcoK* restriktijskog enzima). Prije transformacije „heat shock“ metodom potrebno je bakterije učiniti kompetentnim za prihvaćanje plazmidne DNA pomoću CaCl<sub>2</sub>.

Stock bakterija pohranjen je na –80 °C te ga je potrebno otopiti na ledu za daljnju upotrebu. Kako bi se dobile pojedinačne kolonije potrebno je bakterije iz stock-a nasaditi na krutu LB hranjivu podlogu koja se inkubira preko noći na temperaturi od 37 °C kako bi kolonije narasle.

Narasle kolonije su pojedinačno inokulirane u 20 ml tekućeg LB hranjivog medija te su postavljene u inkubator da rastu preko noći na temperaturi 37 °C uz konstantno miješanje (220 okretaja/min) i prozračivanje.

5 ml prekonoćne kulture preneseno je u 400 ml svježeg tekućeg LB hranjivog medija i ostavljeno otprilike 3 h da rastu u inkubatoru do sredine logaritamske faze rasta. Brojevno je taj stadij rasta određen apsorbancijom pri 600 nm koja treba iznositi  $OD_{600}=0.38-0.4$  (tzv. optička gustoća; engl. *Optical Density*) zbog čega je ista mjerena svakih 20-30 min na spektrofotometru DU 530 Life Science UV/VIS Spectrophotometer (BECKMAN COULTER). Kao slijepa proba korištena je svježa tekuća LB hranjiva podloga.

Nakon postizanja optimalne optičke gustoće bakterije u suspenziji su postavljene na led 10-15 min kako bi im se rast zaustavio u ekspanzionalnoj fazi. Suspenzije su potom centrifugirane (2500 okretaja/min, 7 min na 4 °C), supernatant uklonjen, a bakterijski talog resuspendiran u 10 ml svježe napravljene i sterilizirane otopine 60 mM CaCl<sub>2</sub>. Ponovljeno je centrifugiranje i resuspendiranje još 2 puta po 5 min na 2500 okretaja/min, prilikom čega je u posljednjem dodatku otopine CaCl<sub>2</sub> puštena inkubacija bakterija u otopini 1 h na ledu. Zadnje centrifugiranje napravljeno je pri jednakim uvjetima kao i prethodni, a dobiveni bakterijski talog resuspendiran je u 2 ml hladne otopine CaCl<sub>2</sub>. Ranije su pripremljene sterilne i ohlađene mikroepruvete kako bi se u njih alikvotiralo 50 µl kompetentnih bakterijski stanice. Alikvotiranje je obavljeno brzo i mikroepruvete su odmah smrznute u tekućem dušiku i pohranjene na -80 °C do korištenja.

#### **3.2.4.2 Transformacija bakterija DH5α metodom „heat shock“**

Alikvoti kompetentnih bakterija otopljeni su na ledu te je 50 µl bakterija pomiješano sa 100 ng određenog PCR produkta (nakon tretmana *Dpn I* restriksijskom endonukleazom) i inkubirano na ledu 30 min. Potom su izložene temperaturnom šoku na način da je smjesa inkubirana 2 min na 42 °C zbog čega su kratkotrajno otvorene pore na stjenci bakterija što dozvoljava ulazak plazmidne DNA u stanicu. Kako bi se bakterije regenerirale nakon temperaturnog šoka dodano im je 1 ml svježeg tekućeg LB hranjivog medija prilikom čega su inkubirane 1 h na 37 °C uz stalno miješanje na 450 okretaja/min.

Nakon regeneracije, suspenzija je centrifugirana 5 min na 4000 okretaja/min. Većina supernatanta je otklonjena, a ostavljen je mali dio tekućeg LB hranjivog medija u kojem je bakterijski talog resuspendiran kako bi ga se moglo nasaditi na krutu LB hranjivu podlogu. Takve krute podloge ostavljene su u inkubatoru preko noći na 37 °C kako bi narasle pojedinačne kolonije transformiranih bakterija.

Bakterije transformirane plazmidom pEGFP-C1 nasadene su na podloge s kanamicinom, a one koje nose plazmid pcDNA3.1 na podlogu s ampicilinom.

### 3.2.5 Izolacija plazmidne DNA s uvedenim ciljnim mutacijama iz bakterijskih stanica

Transformirane bakterije korištene su za umnažanje plazmidnih DNA unesenih u stanice kako bi im se postupkom sekvencioniranja odredila primarna struktura i kako bi se istom plazmidnom DNA transfecirale animalne stanice. Za izolaciju DNA korištena su dva komercijalno dostupna kompleta: *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) i *QIAfilter Plasmid Purification Kit (Midi)* (QIAGEN).

#### 3.2.5.1 Izolacija plazmidne DNA GeneJET Plasmid Miniprep Kit kompletom

Izolacija je napravljena prema uputama proizvođača, a karakteristična komponenta su mikroeprovete s posebnim silikatnim kolonicama koje imaju visoku efikasnost vezanja negativno nabijene plazmidne DNA kako bi se DNA što bolje izdvojila i pročistila.

Pojedinačne kolonije transformiranih bakterija naraslih preko noći u inkubatoru inokulirane su u 5 ml tekuće LB hranjive podloge uz dodatak selektivnog antibiotika. Bakterijske suspenzije inkubirane su preko noći u inkubatoru na temperaturi 37 °C uz stalno miješanje 220 okretaja/min. Izolacija plazmidne DNA provođena je na sobnoj temperaturi.

Prekonoćne bakterijske suspenzije centrifugirane su 20 min na 4000 okretaja/min nakon čega je bakterijski talog resuspendiran u 250 µl otopine za resuspendiranje (kojoj je prema uputama proizvođača prethodno dodana RNaza). Na resuspendirane bakterije dodano je 250 µl otopine za lizu bakterijskih stanica te su mikroeprovete ručno 4-6 puta snažno izmiješane do pojave bistre smjese. Osim lize bakterija ova otopina denaturira DNA i proteine u staničnom lizatu. U mikroeprovetu je dodano i 350 µl otopine za neutralizaciju, sadržaj je ponovno izmiješan do pojave bijele boje. Neutralizacijska otopina služi taloženju genomske DNA i proteina, dok se plazmidna DNA ponovno renaturira i ostaje otopljena. Smjesa je potom centrifugirana 5 min na 13000 okretaja/min kako bi se uklonili stanični ostaci. Supernatant je prebačen na kolonice GeneJET kompleta te su ponovno centrifugirane pri istim uvjetima. Na kolonice je dodano 500 µl otopine za ispiranje koja sadrži etanol za precipitiranje DNA nakon čega se centrifugiralo 1 min na 13000 okretaja/min, a isti korak ponovljen je još dvaput. Zadnje centrifugiranje napravljeno je na „suho“ bez dodatka otopine za ispiranje 2 min na 13000 okretaja/min kako bi se uklonili zaostaci otopine za ispiranje.

Direktno na kolonice (ali bez dodirivanja iste) dodano je 50 µl otopine za eluciju te su kolonice inkubirane 2 min na sobnoj temperaturi nakon čega su centrifugirane 2 min na 13000 okretaja/min.

Količina i kvaliteta izolirane plazmidne DNA određena je spektrofotometrijski na aparatu *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific) mjerenjem apsorbacije pri valnim duljinama

260 nm i 280 nm. Mjerenje na valnoj duljini 260 nm određuje količinu DNA u uzorku, dok omjer očitavanja pri 260 nm i 280 nm daje informaciju o čistoći DNA (za čistu DNA potreban omjer 1.8-2.0). kao slijepa proba mjerenja korištena je otopina za eluiranje.

### 3.2.5.2 Izolacija plazmidne DNA QIAfilter Plasmid Purificaton Kit (Midi) kompletom

Kako bi dobili veću količinu plazmidne DNA izolaciju provodimo *QIAfilter Plasmid Purificaton Kit (Midi)* kompletom koji sadrži posebne „*QIAGEN-tip*“-ove (dalje u tekstu *tip*). Takvi *tip*-ovi pri odgovarajućoj koncentraciji soli i pH vrijednosti specifično vežu plazmidnu DNA. Postupak izolacije napravljen je prema uputama proizvođača.

Pojedinačno narasle prekonocne kolonije transformiranih bakterija s odgovarajućih hranjivih podloga inokulirane su u 100 ml tekuće hranjive LB podloge uz odgovarajući antibiotik. Bakterijske suspenzije inkubirane su preko noći na 37 °C uz konstantno miješanje na 220 okretaja/min. Prekonocna suspenzija centrifugirana je na 4000 okretaja/min 20 min na 4 °C, a dobiveni bakterijski talog resuspendiran je u 4 ml pufera 1 (P1) kojem je prethodno dodana RNaza (konačna koncentracija 100 µg/ ml) i boja za praćenje miješanja pufera „*LyseBlue*“. Smjesi je dodano 4 ml pufera 2 (P2) uz snažno miješanje 4-6 puta do pojave plavog obojenja nakon čega je smjesa inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi.

Kako bi se *tip*-ovi pripremili za korištenje potrebno ih je kalibrirati puferom za kalibraciju (QBT) koji zbog prisutnosti deterdženta smanjuje površinsku napetost kolone i QBT pufer istjeće kroz kolonu.

Za neutralizaciju bakterijskog lizata dodano je 4 ml pufera 3 (P3) te je smjesa dobro izmiješana do pojave bijelog precipitata i nestanka plavog obojenja. Smjesa je prebačena u „*QIAfilter Cartridge*“ i inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi nakon čega je istisnuta u kalibrirane *tip*-ove i puštena da isteće polako pod gravitacijskom silom.

U 10 ml pufera za ispiranje (QC) isprani su *tip*-ovi kako bi se plazmidna DNA oslobodila od kontaminacija, a elucija plazmidne DNA s kolona napravljena je dodavanjem 5 ml pufera za eluciju (QF). Eluat je sakupljen u tubice od 15 ml, DNA je precipitirana dodavanjem 3.5 ml 2-propanola (Kemika) i centrifugiranjem kroz 1 h na 8000 okretaja/ min i 4 °C.

Kako bi se DNA isprala talog je resuspendiran u 2 ml 70% etanola (Kemika) i ponovno centrifugiran 30 min na istim uvjetima. Etanol služi uklanjanju precipitirane soli i olakšava otapanje DNA. Talog u kojem se nalazi plazmidna DNA je nakon centrifugiranja osušen na zraku i otopljen u 100 µl vode bez nukleaza.

Količina i kvaliteta izolirane plazmidne DNA određena je spektrofotometrijski na aparatu *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific) mjerenjem apsorpcije pri valnim duljinama 260 nm i 280 nm. Mjerenje na valnoj duljini 260 nm određuje količinu DNA u uzorku, dok omjer očitavanja pri 260 nm i 280 nm daje informaciju o čistoći DNA (za čistu DNA potreban omjer 1.8-2.0). kao slijepa proba mjerenja korištena je voda bez nukleaza.

Izolirana plazmidna DNA razrijeđena je na konačnu radnu koncentraciju od 1 µg/µl i pohranjena na -20 °C do korištenja.

### **3.2.5.3 Priprema plazmidne DNA za sekvenciranje**

Sekvenciranje ili određivanje primarne strukture je postupak određivanja nukleotida u molekuli nukleinske kiseline. Sekvenciranje se primjenjuje za provjeru uspješnosti uvođenja ciljne mutacije u plazmidnu DNA koja sadrži prethodno ukloniranu GSK3β sekvencu.

Za potrebe sekvenciranja, uzorke je potrebno razrijediti na konačnu koncentraciju od 0.1 µg/µl, alikvotirati u 15 µl i poslati u Microsynth (Švicarska).

### **3.2.5.4 Provjera uspješnosti uvođenja ciljnih mutacija u plazmidnu DNA**

Dobivene sekvence su analizirane i uspoređene sa sekvencama divljeg tipa GSK3β proteina kako bi provjerili uspješnost uvođenja ciljnih mutacija.



## **4 REZULTATI**

Cilj ovog istraživanja je identifikacija kinaze koja fosforilira domenu LIR proteina NIX na aminokiselinskim ostacima Ser34 i Ser35. U tu svrhu pretražena je *PhosphoNet Human Phosphosite KnowledgeBase* baza podataka, svjetski najveći repozitorij poznatih i predviđenih humanih mjesta fosforilacije te potencijalnih kinaza koje bi fosforilirale ta mjesta. Prilikom pretrage proteina NIX rezultatima baznog algoritma dobivena je lista potencijalnih kinaza koje fosforiliraju Ser34 i Ser35 ispred domene LIR, a iz baze su odabrane zajedničke kinaze koje fosforiliraju i Ser34 i Ser35 jer se istraživanjem Rogov i sur., 2017 pokazalo kako je efekt regrutacije autofagosoma na oštećene mitohondrije kao i interakcija s LC3B puno jača kod dvostrukih serinskih mutacija nego kod jednostrukih mutacija serina. Osim toga, jedan od kriterija bio je da se kinaza može lokalizirati na mitohondrijima, te da se kinazna domena odabranih kinaza nalazi u citoplazmi kao i domena LIR čija se fosforilacija proučava. Iz analize su bile isključene one kinaze čije se kinazne domene nalaze u međumembranskom mitohondrijskom dijelu. Također važan kriterij bio je i da su te kinaze prethodno opisane kao potencijalno važne za autofagiju (Tablica 2.).

**Tablica 2.** Potencijalne kinaze domene LIR proteina NIX.

Unos	Ime gena	Ime proteina	Dužina
O14920	IKBKB	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta	756
P49841	GSK3B	Glycogen synthase kinase-3 beta	420
Q13131	PRKAA1	5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1	559
P45984	MAPK9	Mitogen-activated protein kinase 9	424
O75116	ROCK2	Rho-associated protein kinase 2	1388
Q5MAI5	CDKL4	Cyclin-dependent kinase-like 4	379
O14757	CHEK1	Serine/threonine-protein kinase Chk1	476
O60285	NUAK1	NUAK family SNF1-like kinase 1	661

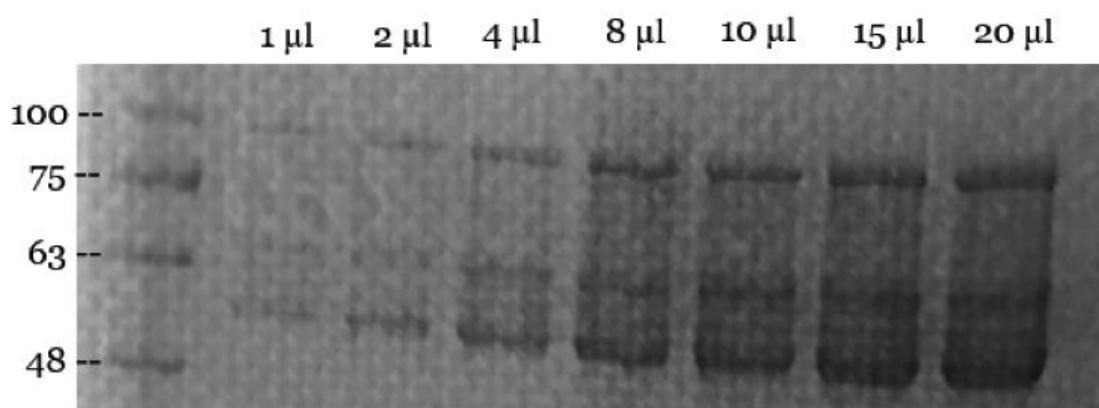
U radu je korišten humani protein NIX ukloniran u plazmidni vektor pEGFP-C1 čime se postigla ekspresija proteina NIX s fuzioniranim zelenim fluorescentnim proteinom, EGFP, na N-terminalnom kraju. Korišteni su konstrukti proteina NIX: EGFP-NIX WT, EGFP-NIX  $\Delta$ LIR, EGFP-NIX S34,35A i EGFP-NIX G204A. Konstrukat EGFP-NIX  $\Delta$ LIR je mutanta s delecijom čitave domene LIR dok mutanta S34,35A ima točkaste mutacije na serinima koji su promjenjeni u alanine. Te mutante odabrane su kako bi se proučila mogućnost interakcije potencijalne kinaze s proteinom NIX u ovisnosti o razlikama s divljim tipom proteina NIX. Mutanta G204A nosi točkastu mutaciju u transmembranskoj domeni zbog čega protein NIX nema mogućnost dimerizacije već se pojavljuje lokaliziran u vanjskoj mitohondrijskoj membrani samo kao monomer (Novak i sur, neobjavljeni rezultati). Jedna od potencijalnih kinaza IKK $\beta$  uklonirana je u plazmidni vektor pcDNA3.1 s fuzioniranom MYC biljgom. Druga potencijalna kinaza GSK3 $\beta$  uklonirana je u plazmidni vektor s

fuzioniranom 6xHis biljegom. Spomenuti plazmidni vektori korišteni su u animalnim ili bakterijskim stanicama kako bi se postigao izražaj odgovarajućih proteina te kako bi se potvrdila međusobna interakcija predloženih kinaza s proteinom NIX. IKK $\beta$  plazmidni vektor ubačen je u animalne stanice s EGFP-NIX plazmidima za potrebe koimunoprecipitacije, dok je GSK3 $\beta$  vektor ubačen u bakterijske stanice gdje je eksprimiran te uz pomoć Ni-NTA agarozih kuglica pročišćen proteinski produkt za potrebe za eksperimenta *Pull-down*. Prethodno opisanim metodama, His *Pull-down*, imunoprecipitacijom i *Western blot* proučavana je interakcija proteina NIX i kinaza IKK $\beta$  i GSK3 $\beta$ .

#### 4.1 Pročišćavanje Ni-NTA agaroznih kuglica s vezanim fuzijskim proteinom His-GSK3 $\beta$

Uspješnost pročišćavanja Ni-NTA agaroznih kuglica s vezanim fuzijskim proteinom His-GSK3 $\beta$  iz ukupnog bakterijskog lizata i određivanje volumena kuglica potrebnih za eksperiment His *Pull-down* provjereni su na 10% poliakrilamidnom gelu u denaturirajućoj elektroforezi. U gelu s 10 velikih jažica analizirano je 1  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 4  $\mu$ l, 8  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 15  $\mu$ l i 20  $\mu$ l pročišćenih Ni-NTA agaroznih kuglica.

Provjera uspješnosti napravljena je inkubacijom gela u otopini *Coomassie* 2 h i potom preko noći u otopini za odbojavanje *Coomassie* boje (Slika 11.).



**Slika 11.** Provjera uspješnosti pročišćavanja Ni-NTA agaroznih kuglica s vezanim fuzijskim proteinom GSK3 $\beta$  na poliakrilamidnom gelu s velikim jažicama. Kao prikladan volumen kuglica za eksperiment His *Pull-down* određeno je 20  $\mu$ l.

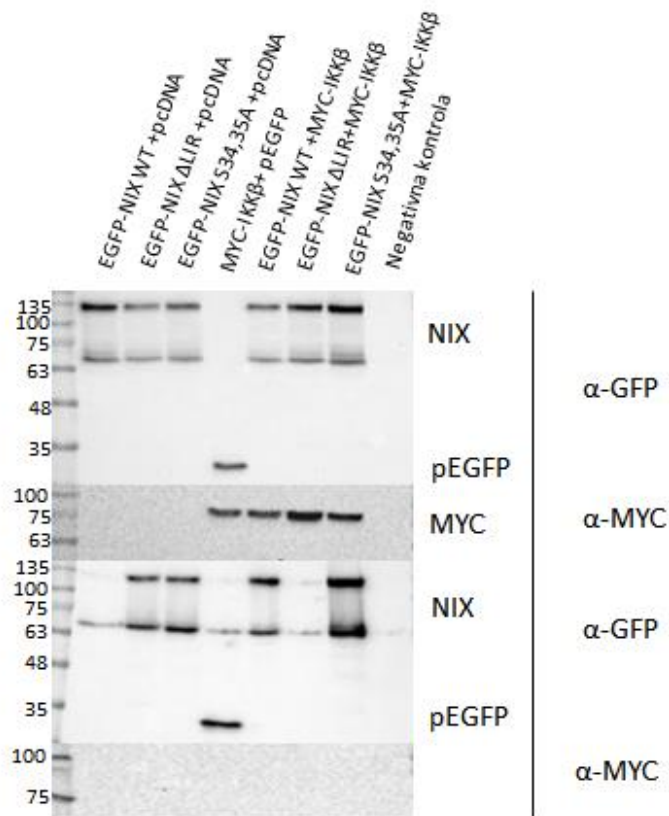
## 4.2 Utvrđivanje ekspresije proteina EGFP-NIX i MYC-IKK $\beta$ i provjera njihove interakcije u lizatu stanica HEK293

Stanice HEK293 kotransfecirane su EGFP-NIX konstruktima (divlji tip (WT),  $\Delta$ LIR ili S34,35A) i MYC-IKK $\beta$  (originalni plazmidni vektor pEGFP-C1 i pcDNA3.1 korišteni su u slučaju kotransfekcije pojedinačnih NIX ili IKK $\beta$  vektora kako bi se u svim uzorcima zadržala ista količina DNA potrebna za transfekciju). Kotransfekcija je napravljena pomoću transfekcijskog reagensa jetPRIME.

Dio ukupnog staničnog lizata odvojen je kao uzorak (ukupni stanični lizat) za određivanje ekspresije/prisutnosti izraženih proteina analizom *Western blot* kojoj prethodi razdvajanje proteina u denaturirajućoj elektroforezi u 10%-tnom poliakrilamidnom gelu.

Ostali dio pojedinačnih staničnih lizata s izraženim EGFP-NIX (divlji tip (WT),  $\Delta$ LIR i S34,35A) i MYC-IKK $\beta$  fuzijskim proteinima nakon inkubacije s komercijalno dostupnim GFP-Trap agaroznim kuglicama i pročišćavanja kuglica uzastopnim ispiranjem uklonjeni su svi proteini iz lizata koji nemaju GFP oznaku ili nisu u interakciji s NIX proteinom. Konačno, uzorci nakon razdvajanja u denaturirajućoj elektroforezi na 10%-tnom poliakrilamidnom gelu, preneseni su na nitroceluloznu membranu.

Rezultati *Western blot* imunodetekcije pokazuju uspješnost izvedenog eksperimenta gdje je u svakom uzorku gdje je izražen fuzionirani EGFP-NIX potvrđena njegova ekspresija (detekcija anti-GFP protutijelima; Slika 12. prvi panel), kao i ekspresija fuzioniranog MYC-IKK $\beta$  (detekcija anti-MYC protutijelima; Slika 12. drugi panel). Konstrukti EGFP-NIX divljeg tipa (WT),  $\Delta$ LIR i S34,35A detektirani su i u monomernom (oko 70 kDa) i dimernom (oko 130 kDa) obliku. pEGFP bez ukloniranog proteina NIX velik je oko 30 kDa. Konstrukt MYC-IKK $\beta$  velik je oko 75 kDa. Međutim, rezultat imunoprecipitacije (Slika 12. četvrti panel) ukazuje da u uzorcima inkubiranim s GFP-Trap agaroznim kuglicama nema interakcije s MYC-IKK $\beta$ .



**Slika 12.** *Western blot* imunodetekcija interakcije EGFP-NIX/MYC-IKK $\beta$  proteina u lizatu HEK293 stanica. Prvi panel prikazuje detekciju konstrukata EGFP-NIX u ukupnom staničnom lizatu primarnim protutijelom na GFP, dok drugi panel označava konstrukte MYC-IKK $\beta$  detektirane primarnim protutijelom na MYC. Treći panel predstavlja EGFP-NIX proteine vezane na GFP-Trap agarozne kuglice koji su detektirani u monomernom i dimernom obliku, jednako kao u ukupnom staničnom lizatu. Ipak, četvrti panel predstavlja rezultate imunoprecipitacije proteina MYC-IKK $\beta$  s EGFP-NIX.

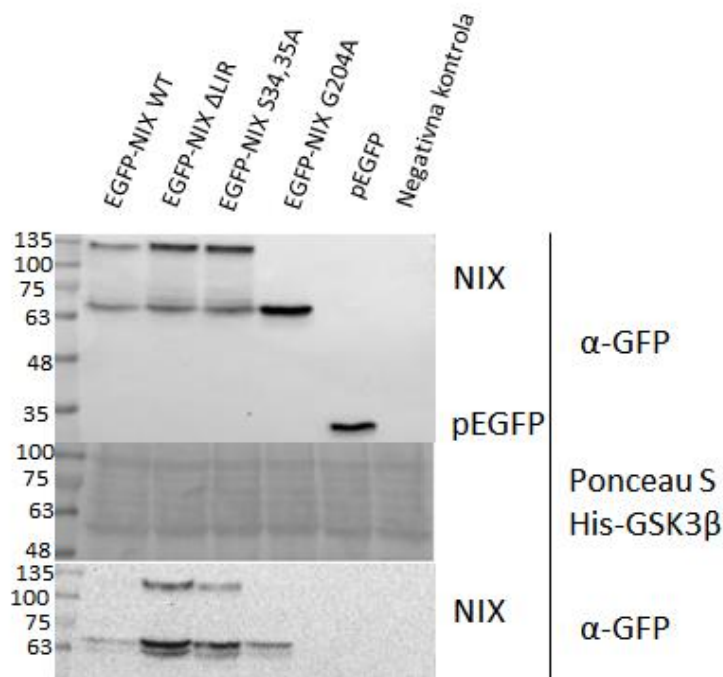
### 4.3 Utvrđivanje ekspresije proteina EGFP-NIX i provjera interakcije s His-GSK3 $\beta$ u lizatu stanica HEK293

Stanice HEK293 transfecirane su EGFP-NIX konstruktima: divlji tip (WT),  $\Delta$ LIR, S34,35A i G204A te plazmidnim vektorom pEGFP-C1 bez ukloniranog gena NIX koji se koristi kao kontrola. Transfekcija plazmidnom DNA napravljena je korištenjem transfekcijskog reagensa *jetPRIME*.

Nakon lize stanica odvojen je ukupni stanični lizat proteina kao uzorak (ukupni stanični lizat) za određivanje ekspresije/prisutnosti izraženih proteina *Western blot* analizom kojoj je prethodilo razdvajanje proteina u denaturirajućoj elektroforezi u 10%-tnom poliakrilamidnom gelu.

Ostatak ukupnog staničnog lizata s izraženim EGFP-NIX (divlji tip (WT),  $\Delta$ LIR, S34,35A i G204A) inkubiran s pripremljenim His-GSK3 $\beta$  Ni-NTA agaroznim kuglicama i pročišćen uzastopnim ispiranjem, razdvojen je u denaturirajućoj elektroforezi na 10%-tnom poliakrilamidnom gelu, napravljen je prijenos proteina na nitroceluloznu membranu, a uspješnost prijenosa potvrđena je bojanjem membrane *Ponceau S* bojom.

Rezultati *Western blot* imunodetekcije pokazuju uspješnost izvedenog eksperimenta gdje je u svakom uzorku gdje je izražen fuzionirani EGFP-NIX potvrđena njegova ekspresija (detekcija anti-GFP protutijelima). Konstrukti EGFP-NIX divlji tip (WT),  $\Delta$ LIR i S34,35A javljaju se i u monomernom (oko 70 kDa) i u dimernom (oko 130kDa) obliku, dok se protein NIX s mutacijom G204A detektira samo kao monomer. pEGFP bez ukloniranog proteina NIX velik je oko 30 kDa (Slika 13. prvi panel). Rezultat bojanja membrane na kojoj su uzorci inkubirani s kuglicama s *Ponceau S* bojom potvrđuju kako su uzorci pravilno i u jednakoj količini korišteni u eksperimentu (Slika 13. drugi panel). Prema rezultatima *Western blot* analize proteinske interakcije vidljivo je da u uzorcima inkubiranim s His-GSK3 $\beta$  Ni-NTA agaroznim kuglicama postoji interakcija s EGFP-NIX fuzioniranim proteinima (Slika 13. treći panel).

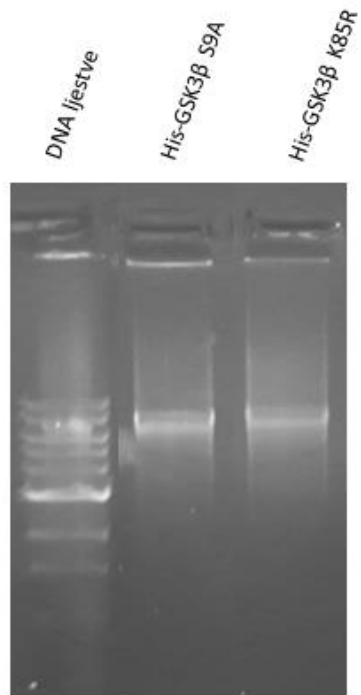


**Slika 13.** Bojanje bojom *Ponceau S* i *Western blot* imunodetekcija interakcije EGFP-NIX/His-GSK3 $\beta$  proteina u lizatu HEK293 stanica. Prvi panel prikazuje detekciju konstrukata EGFP-NIX u ukupnom staničnom lizatu primarnim protutijelom na GFP. Drugi panel predstavlja membranu bojanu bojom *Ponceau S* nakon inkubacije uzoraka s His-GSK3 $\beta$ , dok je treći panel *Western blot* imunodetekcija nakon inkubacije s primarnim protutijelom na GFP.

#### 4.4 Provođenje ciljane mutageneze *in vitro*

Napravljena je ciljana mutageneza primjenom metode PCR *in vitro* u svrhu stvaranja konstitutivno aktivne, ali i inaktivne kinaze GSK3 $\beta$ . Uspješnost umnažanja željene DNA provjerena je elektroforezom u agaroznom gelu gdje je uzorak pomiješan s etidijevim bromidom, interkalirajućom bojom, koja pod UV svjetlom transiluminatora daje signal o postojanju DNA molekula. Dobiven je očekivani produkt His-GSK3 $\beta$  S9A i His-GSK3 $\beta$  K85R od oko 8 kb (Slika 14.).

Uzorak je podvrgnut *Dpn I* tretmanu kako bi se uklonili ostaci kalupa DNA nakon čega su bakterije soja DH5 $\alpha$  transformirane s pročišćenim produktom kako bi se dobile velike količine plazmidne DNA. DNA je izolirana iz transformiranih bakterija, a uspješnost ciljane mutageneze kinaze GSK3 $\beta$  potvrđena je sekvenciranjem.



**Slika 14.** Provjera uspješnosti umnažanja DNA metodom lančane reakcije polimerazom.



## **5 DISKUSIJA**

U ovom radu istraživane su dvije odabrane kinaze u svrhu provjere njihove uloge u fosforilaciji domene LIR mitohondrijskog proteina NIX koji sudjeluje kao receptor selektivne autofagije, točnije mitofagije. Prethodno je otkriveno da je fosforilacija domene LIR odgovorna za regulaciju aktivnosti proteina NIX kao receptora mitofagije (Rogov i sur., 2017). U svrhu ovog istraživanja korišten je humani protein NIX divljeg tipa ukloniran u plazmidni vektor s EGFP oznakom kako bi, osim nativnog oblika proteina, bila moguća vizualizacija uspješnosti transfekcije. Osim divljeg tipa proteina, korišteni su i mutanti s delecijom domene LIR ( $\Delta$ LIR) kako bi se provjerila interakcija kinaze s proteinom koji nema domenu LIR, zatim dvostrukom točkastom mutacijom serina u alanine (S34,35A) kako bi se provjerio utjecaj promjene aminokiselinskih ostataka na interakciju proteina s kinazom te mutant s točkastom mutacijom glicina u alanin (G204A) za koji se zna da nema mogućnost lokalizacije u mitohondrijskoj membrani već se zadržava u citoplazmi u monomernom obliku (Novak i sur., 2010; Rogov i sur., 2017).

Uzevši u obzir prethodno spomenute kriterije prilikom pretrage *PhosphoNet Human Phosphosite KnowledgeBase* baze podataka, za testiranje su odabrane IKK $\beta$  i GSK3 $\beta$  fuzionirane s oznakama (MYC i His) pomoću kojih je opisanim metodama proučavana interakcija s proteinom NIX.

Prema rezultatima imunoprecipitacije kinaze IKK $\beta$  (MYC- IKK $\beta$ ) s konstruktima proteina NIX (EGFP-NIX) vidljivo je kako među njima nema proteinske interakcije. To znači kako fuzijski protein MYC- IKK $\beta$  nije izoliran iz ukupnog staničnog lizata vezanjem na konstrukte fuzijskog proteina EGFP-NIX i GFP-Trap agarozne kuglice (Slika 12. četvrti panel). S druge strane, fuzijski protein MYC- IKK $\beta$  detektiran je u ukupnom staničnom lizatu što potvrđuje uspješnost transfekcije i postojanje proteina u ukupnom staničnom lizatu (Slika 12. drugi panel). Rezultati analize *Western blot* jednaki su i za uzorke ukupnog staničnog lizata i za uzorke inkubirane s GFP-Trap čime ukazuju kako se konstrukti fuzijskog proteina EGFP-NIX u jednakim formama nalaze u oba uzorka (Slika 12. prvi i treći panel). Signal je slabiji u uzorku stanica kotransfeciranih s divljim tipom proteina NIX i plazmidnim vektorom pcDNA3.1 te uzorku s konstruktom EGFP-NIX  $\Delta$ LIR i MYC-IKK $\beta$  što je moguća posljedica slabije transfekcije stanica, ali je signal ipak vidljiv (Slika 12. treći panel).

Slijedeće je testirana kinaza GSK3 $\beta$  (His-GSK3 $\beta$ ) vezana za Ni-NTA agarozne kuglice s konstruktima proteina NIX (EGFP-NIX). Uspješnost transfekcije stanica konstruktima EGFP-NIX u uzorcima ukupnog staničnog lizata potvrđena je analizom *Western blot* (Slika 13. prvi panel). Konstrukti su detektirani prema očekivanom u formama dimera i monomera (divlji tip,  $\Delta$ LIR, i S34,35A) te G204A u isključivo monomernoj formi (Novak i sur., 2010; Rogov i sur., 2017). Osim toga, pravilnost izvođenja metode *Pull-down* potvrđena je bojenjem membrane *Ponceau S* bojom (Slika 13. drugi panel), dok se iz rezultata analize *Western blot* metode *Pull-down* jasno vidi kako su testirani proteini u međusobnoj interakciji (Slika 13. treći panel). Rezultati *Pull-down* eksperimenta pokazuju signale proteina EGFP-NIX u svim njegovim oblicima što potvrđuje kako je protein NIX u

interakciji s kinazom GSK3 $\beta$  obzirom da su iz ukupnog staničnog lizata izdvojeni zajedno. Prema vidljivim signalima može se zaključiti kako je kinaza GSK3 $\beta$  u interakciji i s monomernim i dimernim oblikom proteina NIX.

S obzirom da je ranije istraživanje pokazalo kako fosforilacija zasigurno poboljšava vezanje proteina NIX i autofagosomalnih proteina LC3/GABARAP (Rogov i sur., 2017) rezultati dobiveni u ovom radu ukazuju kako bi GSK3 $\beta$  uistinu mogla biti kinaza koja fosforilira protein NIX i na taj način pospješuje vezanje proteina NIX i LC3/GABARAP.

U ovom radu interakcija proteina NIX i GSK3 $\beta$  testirana je koristeći četiri konstrukta proteina NIX te je kinaza u interakciji sa svakim od njih. U daljnjem istraživanju svakako bi trebalo ispitati interakciju kinaze s drugim konstruktima proteina NIX poput jednostrukih mutanti serina u glutaminsku kiselinu na pozicijama Ser34 i Ser35, ali i dvostruke mutante S34,35E.

Osim toga, nužno je ispitati djelovanje mutanata kinaze GSK3 $\beta$ , one mutacije koje uzrokuju konstitutivnu aktivnost ispitivane kinaze, kao i one zbog kojih je kinaza inaktivna, te provjeriti kakva je njihova interakcija s mitohondrijskim proteinom NIX. U ovom radu napravljena je ciljna mutageneza *in vitro* PCR-om na kinazi GSK3 $\beta$  gdje su stvoreni mutanti His- GSK3 $\beta$  S9A gdje je kinaza konstitutivno aktivna, te His- GSK3 $\beta$  K85R mutant čije je kinazno djelovanje inaktivirano. Nakon sekvenciranja plazmidne DNA, čime je utvrđena točnost sekvence, ista će se dalje koristiti za proučavanje interakcije konstrukata proteina NIX s divljim tipom GSK3 $\beta$  kinaze, ali i navedenim mutantama.

Nadalje, kako bi se zaista utvrdilo da se radi o kinazi odgovornoj za fosforilaciju proteina NIX, osim potvrde interakcije, potrebno je napraviti kinaznu analizu kako bi se izmjerila aktivnost pročišćene kinaze i njen učinak na fosforilaciju proteina NIX. I konačno, za potvrdu fiziološke uloge kinaze GSK3 $\beta$  na fosforilaciju proteina NIX potrebno je u *in vivo* uvjetima pokazati djelotvornost kinaze na aktivnost proteina NIX mjerenjem uspješne aktivacije mitofagije i vezanja proteina NIX za LC3/GABARAP proteine.

## **6 ZAKLJUČAK**

Na temelju dobivenih rezultata moguće je zaključiti:

- ✓ Nije potvrđena interakcija kinaze IKK $\beta$  s proteinom NIX i njegovim mutantama.
- ✓ Potvrđena je interakcija kinaze GSK3 $\beta$  sa svim testiranim konstruktima proteina NIX.
- ✓ Stvorena mutanta GSK3 $\beta$  S9A koja izražava konstitutivno aktivnu kinazu koristit će se u daljnjem istraživanju.
- ✓ Stvorena mutanta GSK3 $\beta$  K85R koja izražava inaktivnu kinazu koristit će se u daljnjem istraživanju.

Može se zaključiti kako bi kinaza GSK3 $\beta$  mogla biti kinaza koja fosforilira domenu LIR mitohondrijskog proteina NIX i time pospješuje vezanje proteina NIX na autofagosomalne receptore LC3A i LC3B kao dio procesa selektivne autofagije, mitofagije.

## **7 LITERATURA**

1. Ambriović-Ristov, A. (2007). *Metode u molekularnoj biologiji*. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.
2. Ashraf, G., Schwarz, T. L. (2013). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Difer.* *20*, 31–42.
3. Axe, E. L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., et al. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* *182*, 685–701.
4. Bassnett, S., Beebe, D. C. (1992). Coincident loss of mitochondria and nuclei during lens fiber cell differentiation. *Dev Dyn* *194*, 85-93.
5. Bocharov, E. V. et al. (2007). Unique dimeric structure of Bnip3 transmembrane domain suggests membrane permeabilization as a cell death trigger. *J Biol Chem* *282*, 16256-16266.
6. Chen, G., Cizeau, J., Vande Velde, C., Park, J. H., Bozek, G., Bolton, J., Shi, L., Dubik, D., Greenberg, A. (1999). Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J. Biol. Chem.* *274*, 7–10.
7. Chen, Y., Klionsky D. J. (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci.* *124*, 161-170.
8. Diwan, A., Koesters, A. G., Odley, A. M., Pushkaran, S., Baines, C.P., Spike, B. T. et al. (2007). Unrestrained erythroblast development in Nix<sup>-/-</sup> mice reveals a mechanism for apoptotic modulation of erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci* *104*, 6794–6799.
9. Elmore, S. P., Qian, T., Grissom, S. F., Lemasters, J. J. (2001). The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB.* *15*, 2286-2287.
10. Gatica, D., Lahiri, V., Klionsky, D. J. (2018). Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Dev. Cell* *26*, 9-18.
11. Gegg, M. E., Cooper, J. M., Chau, K. Y., Rojo, M., Schapira, A. H., Taanman, J. W. (2010). Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/ parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* *19*, 4861-4870.

12. Glick, D., Barth, S., Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* *221*,3–12.
13. Hanna, R.A. et al. (2012). Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *J. Biol. Chem.* *287*, 19094–19104.
14. Harper, J. W., Ordureau, A., Heo, J. M. (2018). Building and decoding ubiquitin chains for mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *19*, 93–108.
15. Imazu, T., Shimizu, S., Tagami, S., Matsushima, M., Nakamura, Y., Miki, T. et al. (1999). Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein (Bnip3L) interacts with bcl-2/Bcl-xL and induces apoptosis by altering mitochondrial membrane permeability. *Oncogene* *18*, 4523–4529.
16. Kanki, T. et al. (2009). Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev. Cell* *17*, 98–109.
17. Kanki, T. et al. (2013). Casein kinase 2 is essential for mitophagy. *EMBO Rep.* *14*, 788-794.
18. Karbowski, M., Youle, R. J. (2003). Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* *10*, 870-880.
19. Khaminets, A., Behl, C., Dikic, I. (2016). Ubiquitin-dependent And independent signals in selective autophagy. *Trends Cell Biol.* *26*, 6–16.
20. Kim, Y., Park, J., Kim, S., Song, S., Kwon, S. K., Lee, S. K., Kitada, T., Kim, J. M., Chung, J. (2008). PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* *377*, 975-980.
21. Kirkin, V., McEwan, D. G., Novak, I. Dikic, I. (2009). A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* *34*, 259-269.
22. Kondo-Okamoto, N., Noda, N. N., Suzuki, S. W., Nakatogawa, H., Takahashi, I., Matsunami, M., Hashimoto, A., Inagaki, F., Ohsumi, Y., Okamoto, K. (2012). Autophagy-related protein 32 acts as autophagic degron and directly initiates mitophagy. *J Biol Chem.* *287*, 10631-10638.



23. Komatsu, M. et al. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* *131*, 1149-1163.
24. Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* *87*, 99-163.
25. Lahiri, V., Klionsky, D. J. (2017). PHB2/prohibitin 2: An inner membrane mitophagy receptor. *Cell Res.* *27*, 311–312. Lee, J., Giordano, S., Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J.* *441*, 523-40.
26. Lee, Y-K., Lee, J-A. (2016). Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Rep.* *49*, 424-430.
27. Levine, B., Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* *132*, 27-42.
28. Liu, X., Weaver, D., Shirihai, O., Hajnoczky, G. (2009). Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *EMBO J.* *28*, 3074-3089.
29. Liu, L. et al. (2012). Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* *14*, 177–185.
30. Matsushima, M., Fujiwara, T., Takahashi, E., Minaguchi, T., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y. et al. (1998). Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3. *Genes, Chromosomes and Cancer* *21*, 230-235.
31. McWilliams, T. G., Prescott, A. R., Allen, G. F., Tamjar, J., Munson, M. J., Thomson, C., Muqit, M. M., Ganley, I. G. (2016). Mito-QC illuminates mitophagy and mitochondrial architecture in vivo. *J Cell Biol.* *214*, 333-345.
32. McWilliams, T. G., Prescott, A. R., Montava-Garriga, L., Ball, G., Singh, F., Barini, E., Muqit, M. M. K., Brooks, S. P., Ganley, I. G. (2018). Basal Mitophagy Occurs Independently of PINK1 in Mouse Tissues of High Metabolic Demand. *Cell Metab.* *27*, 439-449.
33. Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev* *21*, 2861–2873.
34. Mortensen, M., Simon, A.K. (2010). Nonredundant role of Atg7 in mitochondrial clearance during erythroid development. *Autophagy* *6*, 423-425.

35. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* *183*, 795-803.
36. Novak, I. (2012). Mitophagy: A complex mechanism of mitochondrial removal. *Antioxid Redox Signal.* *17*, 794-802.
37. Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D. G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., Rogov, V., Löhr, F., Popovic, D., Occhipinti, A., Reichert, A. S., Terzic, J., Dötsch, V., Ney, P. A., Dikic, I. (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO reports* *11*, 45-51.
38. Ohi, N., Tokunaga, A., Tsunoda, H., Nakano, K., Haraguchi, K., Oda, K. et al. (1999). A novel adenovirus E1B19K-binding protein B5 inhibits apoptosis induced by Nip3 by forming a heterodimer through the C-terminal hydrophobic region. *Cell Death Differ.* *6*, 314-325.
39. Ordureau, A. et al. (2014). Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis. *Mol. Cell* *56*, 360–375.
40. Otsu, K., Murakawa, T., Yamaguchi, O. (2015). BCL2L13 is a mammalian homolog of the yeast mitophagy receptor Atg32. *J. Autophagy.* *10*, 1932-1933.
41. Palikaras, K., Daskalaki, I., Markaki, M., Tavernarakis, N. (2017). Mitophagy and age-related pathologies: Development of new therapeutics by targeting mitochondrial turnover. *Pharmacol. Ther.* *178*, 157–174.
42. Palikaras, K., Lionaki, E., Tavernarakis, N. (2018). Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat. Cell Biol.* *20*, 1013-1022.
43. Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G., Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem.* *282*, 24131-24145.
44. Parzych, K. R., Klionsky, D.J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal.* *20*, 460–473.
45. Paz, Y., Elazar, Z., Fass, D. (2000). Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p. *J Biol Chem.* *275*, 25445-25450.

46. Pickles, S., Vigie, P., Youle, R. J. (2018). Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Curr. Biol.* 28, R170–R185.
47. Poole, A. C., Thomas, R. E., Yu, S., Vincow, E. S., Pallanck, L. (2010). The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PLoS One* 5, e10054.
48. Pua, H. H., Guo, J., Komatsu, M., He, Y.W. (2009). Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J. Immunol.* 182, 4046-40055.
49. Quinsay, M.N. et al. (2010). Bnip3-mediated mitochondrial autophagy is independent of the mitochondrial permeability transition pore. *Autophagy* 6, 855–862.
50. Ray, R., Chen, G., Vande Velde, C., Cizeau, J., Park, J. H., Reed, J. C. et al. (2000). BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and non mitochondrial sites. *J Biol Chem.* 275, 1439-1448.
51. Rogov, V., Dotsch, V., Johansen, T., Kirkin, V. (2014). Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell.* 53, 167–178.
52. Rogov, V. V., Suzuki, H., Marinković, M., Lang, V., Kato, R., Kawasaki, M., Buljubašić, M., Šprung, M., Rogova, N., Wakatsuki, S., Hamacher-Brady, A., Dötsch, V., Dikic, I., Brady, N. R., i Novak, I. (2017). Phosphorylation of the mitochondrial autophagy receptor Nix enhances its interaction with LC3 proteins. *Sci Rep.* 7, 1131.
53. Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S. K., Schumacher, A., Prcahal, J. T., Chen, M., Wang, J. (2008). Essential role for Nix in autophagosome maturation of erythroid cells. *Nature* 454, 232-235.
54. Schwarten, M., Mohrluder, J., Ma, P., Stoldt, M., Thielmann, Y., Stangler, T., Hersch, N., Hoffmann, B., Merkel, R., Willbold, D. (2009). Nix directly binds to GABARAP; a possible crosstalk between apoptosis and autophagy. *Autophagy* 5, 690-698.
55. Schweers R. L., Zhang, J., Randall, M. S., Loyd, M. R., Li, W., Dorsey, F. C., Kundu, M., Opferman, J. T., Cleveland, J. L., Miller, J. L., Ney, P. A. (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19500-19505.

56. Sekine, S., Youle, R. J. (2018). PINK1 import regulation; a fine system to convey mitochondrial stress to the cytosol. *BMC Biol.* *16*, 2.
57. Simonsen, A., Tooze, S. A. (2009). Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol.* *186*, 773–782.
58. Sun, N., Yun, J., Liu, J., Malide, D., Liu, C., Rovira, I. I., Holmström, K. M., Fergusson, M. M., Yoo, Y. H., Combs, C. A., Finkel, T. (2015). Measuring In Vivo Mitophagy. *Mol Cell.* *60*, 685-696.
59. Sutovsky, P., Moreno R. D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., Schatten, G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* *402*, 371-372.
60. Suzuki, N. N., Yoshimoto, K., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., Inagaki, F. (2005). The crystal structure of plant ATG12 and its biological implication in autophagy. *Autophagy* *1*, 119-126.
61. Tekirdag, K., Cuervo, A. M. (2018). Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Joint by a chaperone. *J Biol Chem.* *293*, 5414-5424.
62. Thurston, T. L., Ryzhakov, G., Bloor, S., von Muhlinen, N., Randow, F., (2009). The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin – coated bacteria. *Nat Immunol.* *10*, 1215-21.
63. Till, A., Lakhani, R., Burnett, S. F., Subramani, S. (2012). Pexophagy: the selective degradation of peroxisomes. *Int J Cell Biol.* 2012,512721.
64. Tsukamoto, S., Kuma, A., Murakami, M., Kishi, C., Yamamoto, A., Mizushima, N. (2008). Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* *321*, 117-120.
65. Turco, E., Martens, S. (2016). Insights into autophagosome biogenesis from in vitro reconstitutions. *J Struct Biol.* *196*,29–36.
66. Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B. F., Yuan, J., Deeney, J. T., Corkey, B. E., Shirihai, O. S. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* *27*,433-446.

67. Vande Velde, C., Cizeau, J., Dubik, D., Alimonti, J., Brown, T., Israels, S. et al. (2000). BNIP3 and genetic control of necrosislike cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol.* 20, 5454-5468.
68. Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A. R., Healy, D. G., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W. P., Latchman, D. S., Harvey, R. J., Dallapiccola, B., Auburger, G., Wood, N. W. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304,1158-1160.
69. Wild, P. et al. (2011). Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* 333, 228-233.
70. Xie, Z., Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 9,1102-9.
71. Yang, Z., Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 22, 124–131.
72. Yang, Z., Klionsky, D. J. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 335, 1–32.
73. Yasuda, M., Han, J. W., Dionne, C. A., Boyd, J. M., Chinnadurai, G. (1999). BNIP3alpha: a human homolog of mitochondrial proapoptotic protein BNIP3. *Cancer Res.* 59 (3), 533–7.
74. Zhang, J., Ney, P. A. (2009). Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ.* 16, 939–946.
75. Zhu, Y., Massen, S., Terenzio, M., Lang, V., Chen-Lindner, S., Eils, R., Novak, I., Dikic, I., Hamacher-Brady, A., Brady, N. R. (2013). Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis. *J Biol Chem.* 288,1099-1113.
76. Ziviani, E., Tao, R. N., and Whitworth, A. J. (2010). Drosophila parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5018-5023.

**ŽIVOTOPIS**

**Ime i prezime:** Lara Šamadan

**Datum i mjesto rođenja:** 11. veljače 1995., Split, Republika Hrvatska

**Adresa:** Šime Ljubića 17, 21000 Split

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

**Obrazovanje:**

2001. - 2009. Osnovna škola Trstenik, Split

2009. - 2013. IV. gimnazija Marko Marulić, Split

2013. - 2016. Studij Biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Split

2016. - 2018. Studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Zagreb