Utjecaj dimerizacije NIX/BNIP3L receptura na mitofagiju

Ledić, Antonio

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:121316

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Antonio Ledić

UTJECAJ DIMERIZACIJE NIX/BNIP3L RECEPTORA NA MITOFAGIJU

Diplomski rad

Akademska godina: 2015./2016.

Mentor:

doc. dr. sc. Ivana Novak Nakir

Split, listopad 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
DIPLOMSKI RAD
Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet:
Tema rada: je prihvaćena na sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: doc. dr. sc. Ivana Novak Nakir
Pomoć pri izradi: dr.sc. Maja Buljubašić

Utjecaj dimerizacije Nix/Bnip3L receptora na mitofagiju
Antonio Ledić, br. indeksa 47

Mitofagija je važan proces kojim stanica uklanja oštećene mitohondrije. Protein Nix ima važnu ulogu u mitofagiji kao receptor te se pretpostavlja da se aktivira dimerizacijom. Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi da li fosforilacija serinskog ostataka S212 na C- terminalnom kraju mitohondrijskog proteina Nix utječe na njegovu dimerizaciju, a samim time i njegovu funkciju. U tu svrhu upotrijebljeni su konstrukti EGFP-NixWT, EGFP-NixS212A i EGFP-NixS212E. GST *pull-down* metodom određena je interakcija EGFP-Nix proteinskih mutanata s autofagijskim proteinom LC3A. Imunofluorescencijskom mikroskopijom promatrana je kolokalizacija mutanata proteina Nix i proteina vanjske mitohondrijske membrane Tom20 kako bi se utvrdio pravilan smještaj proteina Nix u vanjskoj mitohondrijskoj membrani. Imunofluorescencijska mikroskopija upotrebljena je i za promatranje kolokalizacije autofagosomalnog proteina LC3A i mutanata proteina Nix. Rezultati su pokazali da mutacije proteina Nix koristene u eksperimentu ne utjecu na interakciju sa autofagosomalniim proteinom LC3A te ju svi uspjesno ostvaruju ali postoji razlika u mogucnosti stvaraja dimera. Mutanta S212E ppokazuje nemogucnost stvaranja dimera. Imunofluorescencijskom mikroskopijom dokazano je da su mutante proteina Nix lokalizirane na vanjskoj mitohondrijskoj membrani što ukazuje da promijena navedenog aminokiselinskog slijeda ne mijenja njegovu lokalizaciju na mitohondriju. Za potvrdu uloge fosforiliranog serina S212 te njegov utjecaj na dimerizaciju i funkciju Nix proteina potrebni su dodatni eksperimenti.

Ključne riječi: Mitofagija, protein Nix, dimerizacija, fosforilacija
Rad sadrži: 67 stranica, 9 slika, 29 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:
1. izv. prof. dr. sc. Ivana Marinović Terzić, MD
2. izv. prof. dr. sc. Jasna Marinović Ljubković, MD
3. doc. dr. sc. Ivana Novak Nakir

Datum obrane: 12. listopada.2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta u Splitu, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD
GRADUATE THESIS
Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title:
Thesis subject: was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. and Faculty Council of School of Medicine, session no.
Mentor: doc. dr. sc. Ivana Novak Nakir
Technical assistence: dr.sc. Maja Buljubašić

The role of Nix/Bnip3L receptor on mitophagy
Antonio Ledić, indeks No. 47

Cell uses mitophagy to eliminate damaged mitochondria. Nix protein has a key role in mitophagy as receptor and it is proposed that it is activated by dimeryzation. .The objective of this study was to determine how phosphorylation of serine residue, S212, on the C- terminal end of Nix mitochondrial protein affects his dimerizationa and therefore its function as a mitophagy receptor. EGFP-NixWT, EGFP-NixS212A and EGFP - NixS212E constructs were used. The interaction of EGFP- Nix protein mutants with autophagosomal protein LC3A was determinated using GST pull-down method. Colocalization of Nix mutants with outer mitochondrial membrane protein Tom20 was observed using immunofluorescent microscopy. Immunofluorescent microscopy was also used to observe colocalization of autophagosomal protein LC3A and Nix mutants. Results showed that all Nix mutants used in the study interact with autophagosomal protein LC3A eventhough the dimerisation of NixS212E is abolished. Further, immunofluorescent microscopy analysis showed that Nix mutants are present on outer mitochondrion membrane which confirms that changes od S212 aminoacid does not influence its localization to mitochondria..Tu further confirm if phosphorylation of serine S212 influences Nix dimerisation and therefore, its function, further experiments are essential.

Key words: Mitophagy, Nix, dimerisation, phosphorylation

Thesis contains: 67 pages, 9 figures, 29 references

Original in: Croatian

Defence committee:
1. Ivana Marinović Terzić, MD.,PhD, associate prof.
2. Jasna Marinović Ljubković, MD.,PhD, associate prof.
3. Ivana Novak Nakir, PhD, assistant prof.

Defence date: October 12 2016.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

SADRŽAJ

1. UVOD 8

Ubikvitin-proteasomalni sustav 9

1.2. Autofagija 10

1.3. Mehanizam i regulacija autofagije 12

1.4. Mitofagija 15

1.4.1. Modeli Nix-posredovane mitofagije 17

1.5. Mitohondrijski protein Nix 19

1.5.1. LIR domena 20

1.5.2. Transmembranska domena (TM) 20

1.5.3. C- terminalni kraj 20

1.5.3.1. Regulacija receptorske aktivnosti fosforilacijom 20

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 22

3. MATERIJALI I METODE 24

3. 1. Materijali 25

3.1.1. Osnovne kemikalije 25

3.1.2. Aparati 26

3.1.3. Puferi 27

3.1.4 Otopine 28

3.1.5. Bakterijski sojevi 28

3.1.6. Stanične linije 28

3.1.7. LB hranjive podloge 28

3.1.8. Mediji za HeLa i HEK293 stanice 28

3.1.9. Kompleti 28

3.1.10. Protutijela 29

3.1.11. Enzimi 29

3.1.12. Proteazni inhibitori 29

3.1.13. Biljezi 29

3.1.14. Oligonukleotidne početnice 30

3.1.15. Plazmidni vektori 30

3.2. Metode 31

3.2.1. Uvođenje mutacija na ciljno mjesto (*site directed mutagenesis)* u DNA molekuli PCR- om 31

3.2.1.1. Dizajniranje oligonukleotidnih početnica 31

3.2.1.2. PCR- reakcija 31

3.2.1.3. Elektroforeza DNA 32

3.2.2. Transformacija DH5α bakterijskih stanica metodom „*heat shock*“ 33

3.2.3. Izolacija plazmidne DNA *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* kompletom 34

3.2.3.1. Priprema plazmidne DNA za određivanje primarne strukture 35

3.2.4. Priprema GST- fuzijskih proteina i njihovo vezivanje na glutation sefarozne kuglice 35

3.2.5. Transfekcija HEK 293 stanica 36

3.2.6. Izdvajanje i detekcija proteina 37

3.2.6.1. GST *Pull down* 37

3.2.6.2. SDS-PAGE elektroforeza 38

3.2.6.2.1. Transfer sa gela na membranu 38

3.2.6.2.2. *Ponceau S* bojanje 38

3.2.6.3. Western blot analiza 39

3.2.6.4. Imunodetekcija proteina na membrani 39

3.2.7. Imunofluorescencijska detekcija kolokalizacije Nix i Tom20 proteina 39

3.2.7.1. Transfekcija HeLa stanica 40

3.2.7.2. Indukcija mitofagije CCCP reagensom 40

3.2.7.3. Detekcija kolokalizacije Nix i Tom20 proteina 40

3.2.8. Imunofluorescencijska detekcija mitofagije praćenjem kolokalizacije LC3A i Nix proteina 41

3.2.8.1. Detekcija proteina imunofluorescencijom 41

4. REZULTATI 42

4.1. Detekcija interakcije proteina EGFP-Nix (WT, S212A, S212E i ΔLIR) s autofagosomalnim proteinom LC3A 44

4.2. Imunofluorescencijska detekcija kolokalizacije EGFP-Nix (WT, S212A, S212E i ΔLIR) i mitohondrijskog proteina Tom20 46

4.3. Imunofluorescencijska detekcija regrutacije autofagosomalnog proteina LC3A na mitohondrije uslijed ekspresije razlicitih konstrukata proteina EGFP-Nix (WT, S212A, S212E i ΔLIR) kao pokazatelj aktivacije mitofagije 47

5. RASPRAVA 50

6. ZAKLJUČCI 56

7. LITERATURA 58

8. SAŽETAK 62

9. SUMMARY 64

10. ŽIVOTOPIS 66

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Novak Nakir što mi je pružila priliku da pod njenim vodstvom izradim svoj diplomski rad. Hvala na pomoći i savjetima koje mi je pružila prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se članovima Laboratorija za istraživanje raka Medicinskog fakulteta u Splitu na pomoći pruženoj tijekom izrade ovog rada, kao i na ugodnoj radnoj atmosferi u kojoj je bio užitak raditi.

Na kraju, veliko hvala mojim roditeljima na podršci, strpljenju, pomoći i savjetima koje mi pružaju tijekom cijeloga života i bez kojih sve što sam dosad postigao u životu ne bi bilo moguće.

1. UVOD

Stanica je složeni životni sustav koji ovisi o ravnoteži anaboličkih i kataboličkih procesa. Svakodnevno u stanici nastaju različite makromolekule koje su stanici potrebne za normalno funkcioniranje. Također, određene makromolekule moraju se razgraditi jer više ne služe svojoj prvotnoj svrsi. Kako je stanica izrazito metabolički aktivna, kao posljedica tog metabolizma mogu nastati različiti štetni radikali koji oštećuju različite makromolekule i organele. Jednom oštećene organele postaju nefunkcionalne u stanici te ih stanica mora odstraniti odnosno razgraditi kako bi spriječila svoju smrt. Postoje dva složena proteolitička sustava kojima stanica razgrađuje oštećene makromolekule i organele, a to su ubikvitin - proteasomalni sustav i lizosomom posredovani sustav ili autofagija.

1.1. Ubikvitin-proteasomalni sustav

Ubikvitin je mali protein sastavljen od svega 76 aminokiselina. Njegov primarni aminokiselinski slijed je visoko konzerviran od kvasaca do sisavaca. Ubikvitin u svojoj strukturi ima sedam lizina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 i K63) koji služi za kovalentno vezivanje jednog ubikvitina za drugi, preko izopeptidne veze, tvoreći lanac. Nastajanje ubikvitinskih lanaca na različitim lizinskim nastavcima omogućuje signaliziranje različitih puteva (1).

Ubikvitin - proteasomalni sustav je visoko regulirani sustav koji prepoznaje i razgrađuje različite stanične proteine s visokom specifičnošću i selektivnošću (2). Ubikvitin-proteasomalni sustav sudjeluje u regulaciji staničnih procesa kao što su: obrađivanje antigena u stanici, apoptoza, stanični ciklus i dioba, transkripcija DNA i njen popravak, mišična i živčana oštećenja, modulacija površinskih staničnih receptora, odgovor na stres, odgovor na virusnu infekciju, itd. (2)

Ubikvitin - proteasomalni sustav sastoji se od 2 glavne sastavnice: enzima koji vežu substrat (E1, E2, i E3 enzimi) i enzima koji razgrađuju substrat, tzv. deubikvitinaze (3). Mehanizam ubikvitinilacije se odvija u dva koraka. U prvom koraku aktivira se karboksilna skupina glicina 76 ubikvitina posredovanjem ubikvitin-aktivirajućeg proteina (E1 enzim). Ovaj korak uključuje i hidrolizu molekule ATP-a u PP_i kako bi nastala veza između intermedijera adenilat ubikvitina i enzima E1. Tako stvoreni aktivirani ubikvitin se prenosi i veže na tiolnu skupinu cisteina u aktivnom mjestu enzima E2 (ubikvitin - konjugirajući enzim). E2 zatim može sam prenijeti ubikvitin na ciljani protein ili to može učinit posredstvom enzima E3 (ubikvitin ligaza) stvarajući amidnu vezu između karboksilne grupe

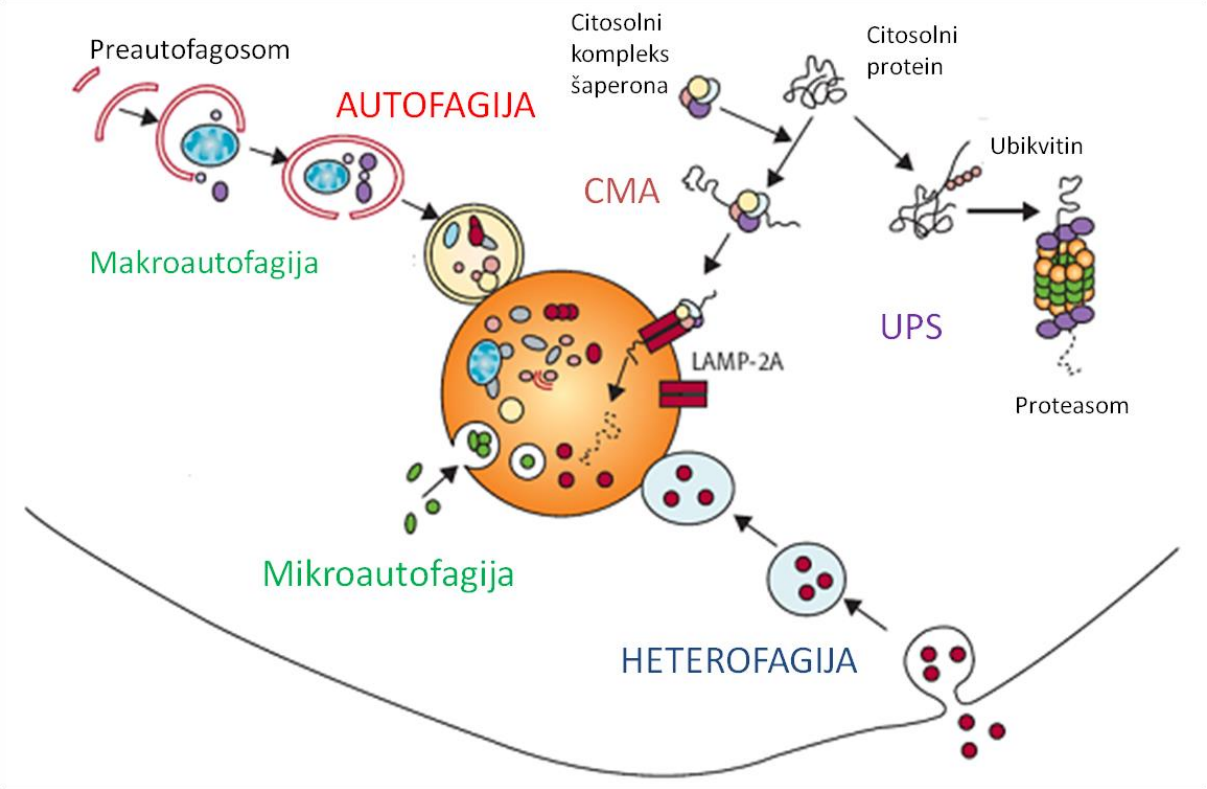
glicina 76 ubikvitina i ε- amino grupe lizinskog ostatka proteinskog substrata. Jednom kad proteinski substrat postane mono-ubikvitiniran, na njemu se formira poliubikvitinski lanac. Mehanizam rasta ubikvitinskog lanca isti je kao i mehanizam kojim se ubikvitin veže na proteinski substrat. Kod rasta ubikvitinskog lanca karboksilna grupa na glicinu 76 na karboksilnom kraju ubikvitina kovalentno se veže za unutarnji lizinski ostatak ubikivitina koji je već vezan na proteinski substrat (2). Vezanjem K48 i K29 poliubikvitinskog lanca na ciljani protein omogućuje se njegovo spajanje sa proteasomom 26S. Proteasom 26S se sastoji od jedne 20S podjedinice i dvije 19S podjedinice. 19S podjedinice su odgovorne za prepoznavanje ubikvitiniranih supstrata, dok je 20S podjedinica odgovorna za proteolitičku razgradnju ubikvitiniranih substrata (3).

1.2. Autofagija

Autofagija je visoko konzervirani proces koji se pojavljuje u većini eukariotskih stanica i sudjeluje u kontroli staničnog stresa. Ovaj proces uključuje *de novo* formiranje vezikula koje se nazivaju autofagosomi i koje mogu „progutati“ čitave organele, nakupine proteina, te unutarstanične patogene (4). Autofagija je proces koji podržava život stanice uklanjajući oštećene organele te razgrađujući proteinske agregate iz kojih se oslobađaju aminokiseline koje stanica može ponovno upotrijebiti za sintezu drugih proteina. Iako je autofagija proces koji omogućava stanici život uklanjajući sve dijelove koji su joj nepotrebni i za nju štetni, autofagija može također dovesti do stanične smrti i to kroz opsežnu samodigestiju i razgradnju esencijalnih staničnih dijelova. (5).

Postoje tri različita tipa autofagije: makroautofagija, mikroautofagija i šaperonima posredovana autofagija. Svi ovi tipovi autofagije zapravo su dio lizosomske razgradnje staničnih dijelova, što znači da je lizosom završno odredište staničnih dijelova koji su predodređeni za razgradnju. U makroautofagiji, autofagosomima se sadržaj prenosi do lizosoma, a zatim se autofagosom spaja s lizosomom tvoreći na ovaj način autolizosom. Kod mikroautofagije lizosom samostalno invaginacijom membrane direktno unosi citoplazmatske dijelove u svoju unutrašnjost. I mikro- i makroautofagiji je zajedničko da mogu progutati i razgraditi velike strukture. (6). U šaperonima posredovanoj autofagiji ciljni proteini su vezani u komplekse za šaperone. Tako formirani kompleksi nalaze se raspoređeni duž membrane lizosoma. Na membrani lizosoma se nalaze posebni proteini koji prepoznaju protein u

kompleksu sa šaperonom i dovode do njegovog odvajanja sa šaperona te konačno njegove razgradnje unutar lizosoma (slika 1). (6).

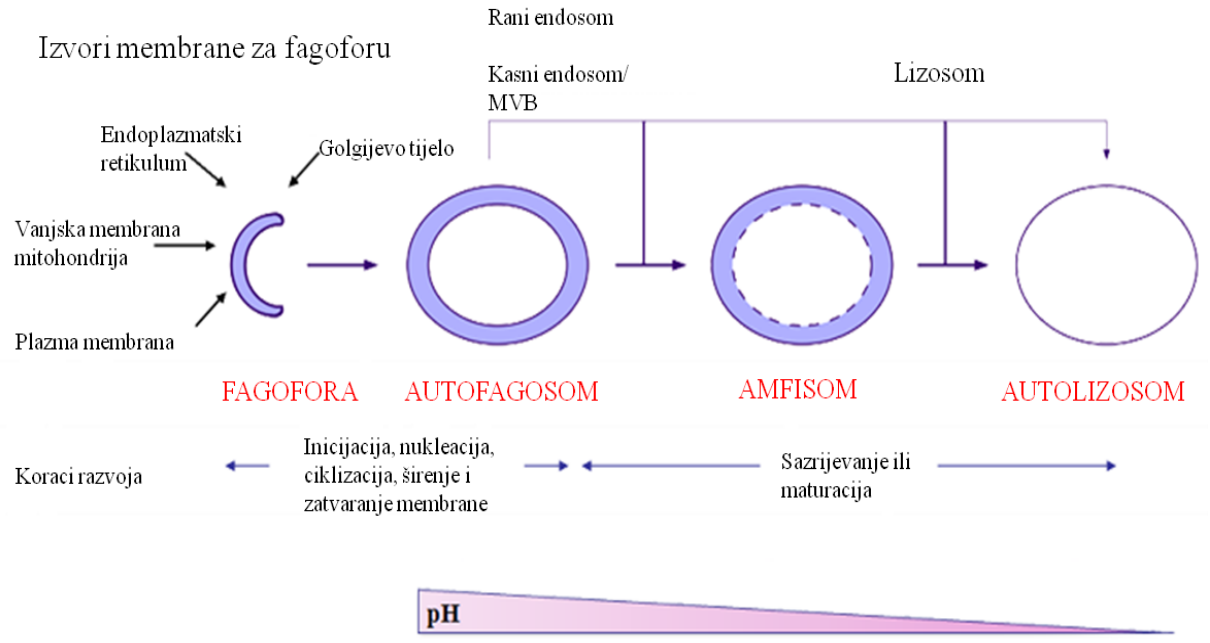


Slika 1. Shematski prikaz autofagije, heterofagije i ubikvitin- proteasomalnog sustava- Slika prikazuje makroautofagiju, mikroautofagiju te šaperonima posredovanu autofagiju. Također se može vidjeti usporedba između autofagije, heterofagije i ubikvitin - proteasomalnog sustava. Preuzeto i modificirano od: (28)

Autofagija je prisutna u svim eukariotskim stanicama kao metabolički homeostatski mehanizam (7). Različiti čimbenici mogu dovesti do aktivacije autofagije kao što su hipoksija, protuupalni odgovor i nedostatak nutrijenata, odnosno gladovanje (8). Jednom kada dođe do aktivacije autofagije, dva su moguća ishoda: jedan od ishoda je da aktivacijom autofagije dođe do pokretanja neapoptotskog tipa 2 programirane stanične smrti, dok je drugi mogući učinak prilagodba stanice i samim time njezino preživljenje. (8).

1.3. Mehanizam i regulacija autofagije

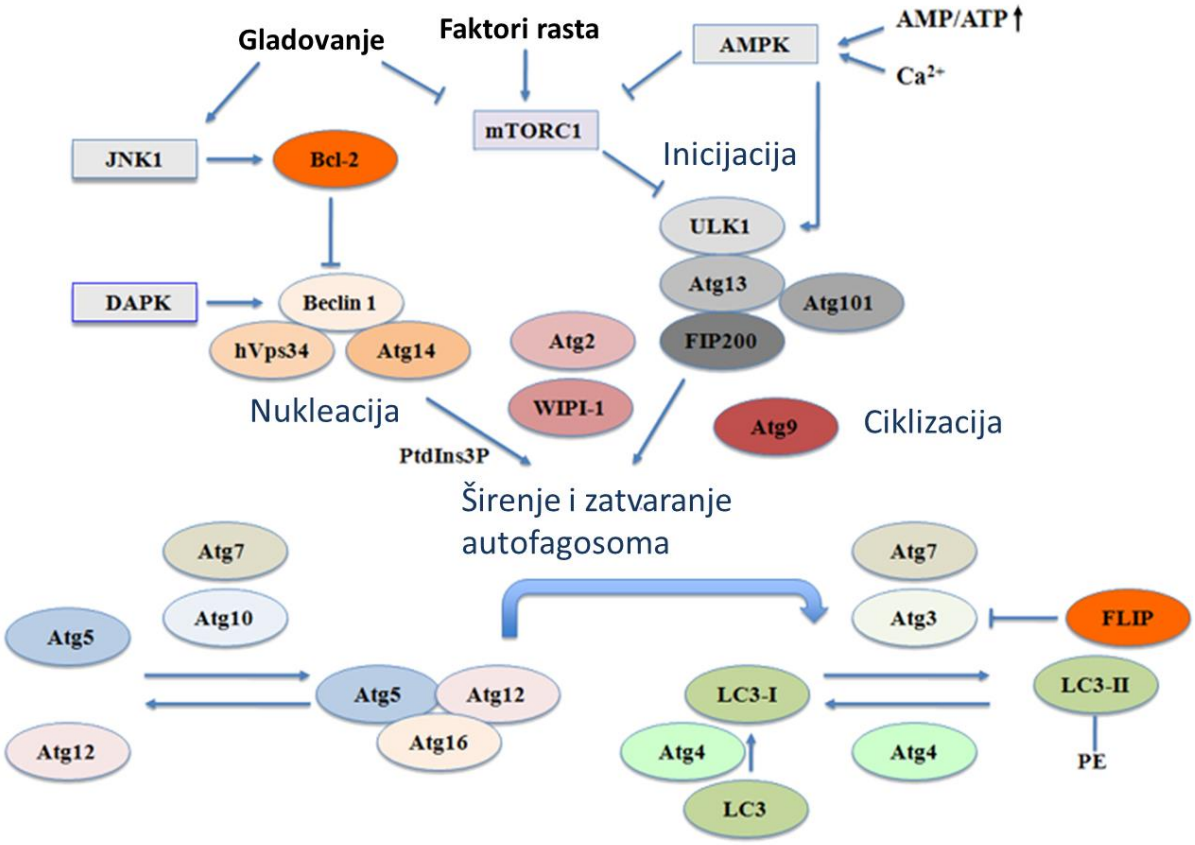
Autofagija započinje membranskom strukturom tzv. izolacijskom membranom poznatom još kao i fagofor. Fagofor najvjerojatnije nastaje iz lipidnog dvosloja koji potječe od stanične membrane, endoplazmatskog retikuluma, Golgijevog tijela ili mitohondrija (9). Fagofor se potom širi kako bi mogao progutati unutarstanični sadržaj kao što su proteinski agregati, stanične organele i ribosomi te ih na taj način odvojiti u unutrašnjost autofagosoma. Autofagosom u kojem je sada zarobljen stanični sadržaj spreman za razgradnju, spaja se s lizosomom. Spajanje autofagosoma sa lizosomom omogućava kiselim proteazama lizosoma da razgrade stanični sadržaj koji se nalazio unutar autofagosoma. Lizosomalne permeaze i transporteri potom prenose aminokiseline i druge produkte razgradnje natrag u citoplazmu gdje postaju dostupni za ponovnu sintezu važnih staničnih makromolekula. (10) Na slici 2 je shematski je prikazan gore opisani mehanizam.



Slika 2. Shematski prikaz autofagije. Autofagija počinje nastajanjem membranske strukture tzv. izolacijske membrane ili fagofora. U stanici postoje različiti izvori membrana koje mogu poslužiti za formiranje fagofore. Membrana se zatim širi i zatvara tvoreći autofagosom. Tijekom sazrijevanja, autofagosom se spaja sa kasnim endosomom te multivezikularnim tijelom. Nastaje amfisom koji se u zadnjem koraku spaja s lizosomom. Preuzeto i modificirano od: (11).

Budući da je autofagija složen stanični proces mora na molekularnoj razini biti dobro reguliran. Regulacija autofagije se odvija u 5 koraka: (a) formiranje fagofora ili nukleacija, (b) Atg5- Atg12 konjugacija, interakcija Atg16L i multimerizacija na fagoforu, (c) LC3 procesiranje i ulaganje u šireću membranu fagofora, (d) hvatanje specifičnih ili nespecifičnih struktura za razgradnju, (e) spajanje autofagosoma i lizosoma, nakon kojeg slijedi proteolitička razgradnja sadržaja autofagosoma. (10).

U prisutnosti aminokiselina, faktora rasta i dovoljne količine energije u stanici kompleks mTOR1 (mTORC1) blokira autofagiju inhibicijom kinazne aktivnosti ULK1. U odsutstvu aminokiselina, faktora rasta i kod promjene omjera AMP/ATP u korist AMP tada dolazi do inhibicije mTORC1 i ULK1 može aktivirati autofagiju (Inicijacija na slici 3). Tijekom gladovanja dolazi do aktivacije JNK1 koji fosforilira Bcl-2 te na taj način blokira inhibitorni učinak Bcl-2 na kompleks Beclin1/hVps34/Atg14. DAPK (engl.*Death- associated protein kinase*) fosforiliraBeclin1 što dovodi do Bcl-2 disocijacije sa gore navedenog kompleksa. Aktivnost kompleksa Beclin1/hVps34/Atg14 važna je za nukleaciju autofagosomalne membrane. Rast i zatvaranje autofagosomalne membrane ovisi o Atg12 i LC3. Kompleks Atg12 –Atg5 povezuje se sa Atg16 te dolazi do stimulacije konjugacije LC3-I sa fosfatidiletanolaminom (PE) čime dolazi do nastanka LC3-II (lipidirani LC3-I). Daljnje širenje autofagosomalne membrane najvjerojatnije ovisi o opskrbi lipidima od strane Atg9 u cikličkom procesu između perifernog bazena lipida i rastuće izolacijske membrane ili fagofore. (11). Na slici 3 prikazan je detaljan mehanizam regulacije autofagije.



Slika 3. Regulacija autofagije i veza autofagije sa signalnim molekulama i apoptotskim medijatorima. Slika prikazuje način aktivacije autofagije i njezinu regulaciju. Inicijacija autofagije započinje inhibicijom mTORC1 ili aktivacijom JNK1. Slikaprikazuje važnost Beclin1/hVps34/Atg14 kompleksa za nukleaciju. Širenje i zatvaranje autofagosomalne membrane ovisi o Atg12 i LC3. Preuzeto i modificirano od: (11).

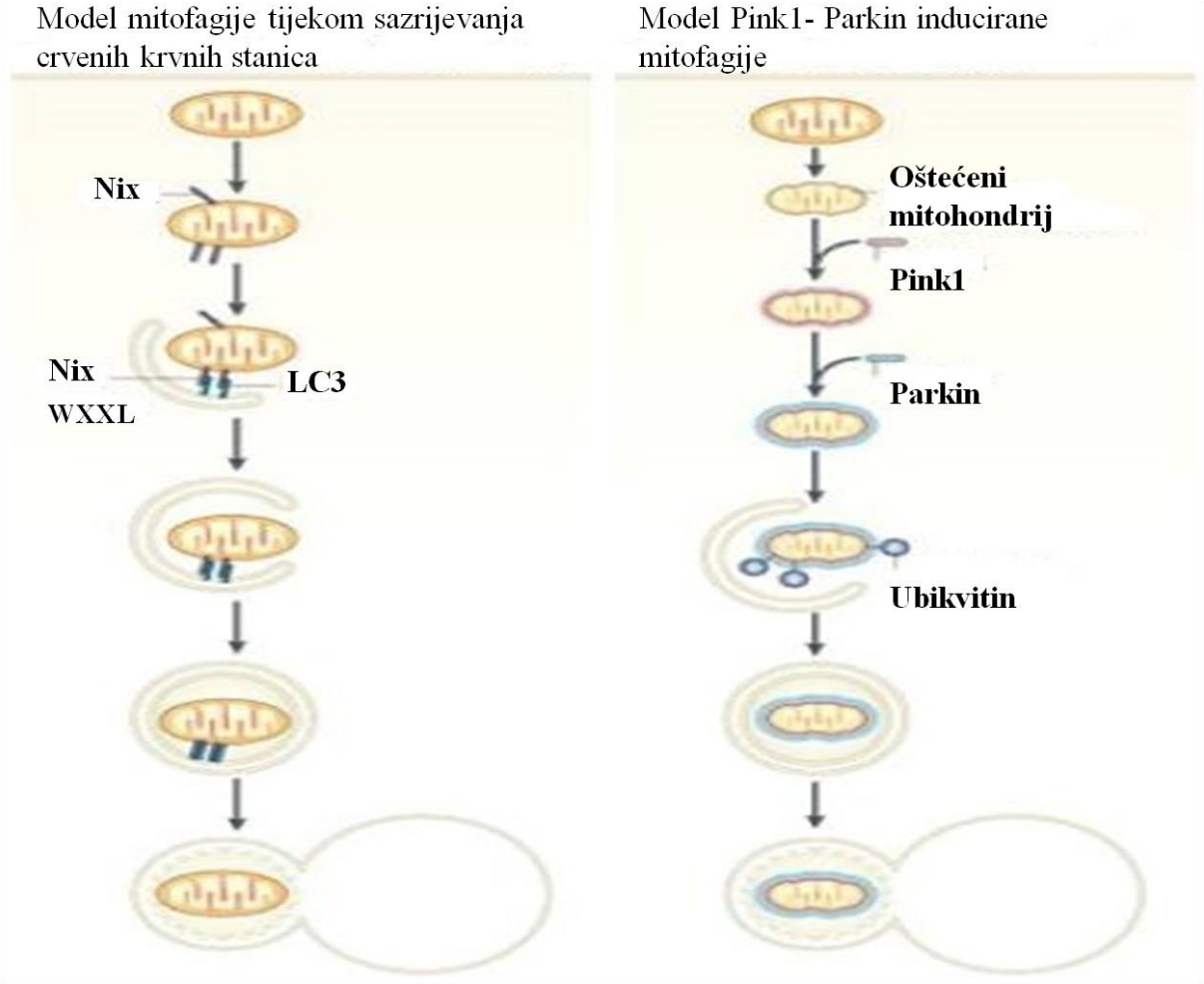
1.4. Mitofagija

Mitohondriji su organele koje imaju ključnu ulogu u energetskom metabolizmu eukariotske stanice (12). Uz činjenicu da su važni u opskrbi stanice energijom, mitohondriji su uključeni u procese stanične diferencijacije, proliferacije i apoptoze. (13)

Mitofagija je oblik autofagije u kojoj se mitohondriji selektivno razgrađuju u autolizosomu. Pojam mitofagija prvi je upotrijebio Lemasters kako bi opisao što se događa sa mitohondrijima u hepatocitima nakon što se aktivira i poveća permeabilnost membrane mitohondrija (mPT) i izgubi potencijal mitohondrijske membrane ($\Delta\Psi m$). (14) Različiti podražaji, kao što su ultraljubičasto zračenje, oksidativni stres i virusi, mogu djelovati na mitohondrije i dovesti do njihovog oštećenja i uništenja. Jednom depolariziran mitohondrij može aktivirati apoptozu ispuštanjem proapoptotskih proteina te je bitno da stanica na vrijeme ukloni takav mitohondrij. Uklanjanjem oštećenih mitohondrija stanica spriječava aktivaciju apoptoze te mitofagija postaje zaštitni mehanizam stanice. Međutim, koliko će mitofagija biti uspješna u zaštiti stanice od stanične smrti ovisi i o jačini signala koji stimulira stanicu i usmjerava je prema apoptozi ili nekrozi. Ako je signal slab, onda je mitofagija dovoljno jak zaštitni mehanizam. No, u slučajevima značajnije promjene propusnosti mitohondrijske membrane, razina ATP se značajno smanjuje i energetski sustav stanice je u cijelosti uništen. Pritom dolazi do gubitka energije i nemogućnosti stanice da osigura dovoljno energije za autofagiju ili apoptozu. Snažni podražaji u ovom slučaju dovode do nekroze. Ukoliko se mitofagijom uklone oštećeni mitohondriji dolazi do stabilizacije stanice i time se spriječava nekroza. Mitofagija je važan proces u preveniranju određenih bolesti kao što su neurodegenerativne bolesti, rak i autoimune bolesti (13). Nadalje, u sisavaca, mitofagija je važna u selektivnom i programiranom uklanjanju mitohondrija tijekom diferencijacije retikulocita i T limfocita (15). Stanice leće, eritrociti, i spermiji su idealni sustavi za proučavanje eliminacije mitohondrija budući da je eliminacija mitohondrijai drugih organela u ovim stanicama dio njihovog sazrijevanja (14).

Mehanizam mitofagije proučavan je tijekom sazrijevanja eritrocita. Ovaj mehanizam uključuje prisutnost receptora Nix na vanjskoj strani membrane mitohondrija i LC3 proteina koji se nalazi na površini autofagosoma. Postoji i drugi mehanizam mitofagije koji uključuje proteine Pink1 i Parkin. Pink1 je receptor na mitohondriju koji posjeduje kinaznu aktivnost, dok je Parkin E3-ubikvitin ligaza te zajednički sudjeluju u uklanjanju oštećenih mitohondrija. Pink1 dovodi do fosforilacije Parkina što uzrokuje njegovo premještanje iz citoplazme na

oštećeni mitohondrij. Parkin svojom E3-ligaznom aktivnošću zatim poliubikvitinira mitohondrijske substrate koji se zatim raygrađuju u proteasomu (16).



Slika 4. Shematski prikaz modela Nix i Pink1-Parkin posredovane mitofagije. Lijeva strana slike prikazuje mitofagiju tijekom sazrijavanja eritrocita . Nix ima važnu ulogu u mitofagiji vezujući se za LC3 protein na autofagosomalnoj membrani. Desna strana slike prikazuje uklanjanje oštećenog mitohondrija. Pink1 dovodi do fosforilacije Parkina. Proces završava ubikvitinacijom mitohondrija. Preuzeto i modificirano od: (18)

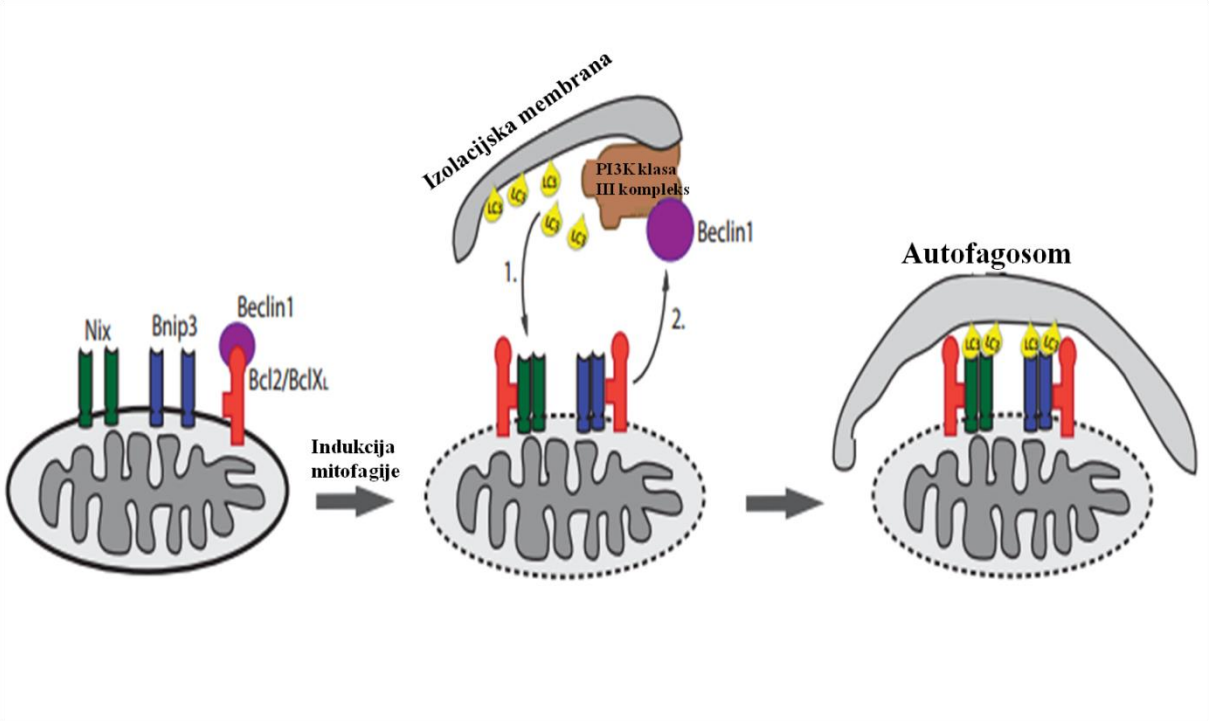
1.4.1. Modeli Nix-posredovane mitofagije

Prvi i najjednostavniji model Nix-posredovane mitofagije govori o Nix proteinu kao okidaču depolarizacije mitohondrija što dovodi do autofagije mitohondrija i njegove razgradnje. Ovaj se model smatra jednostavnim iz razloga što već postoji popriličan broj dokaza da Nix (i njegov homolog Bnip3) mogu biti okidači za mitohondrijsku depolarizaciju i da je upravo to dovoljno za aktivaciju mitofagije (18). Sandoval i suradnici su 2008. godine dokazali da u retikulocitima koji nemaju Nix proteina dolazi do poremećaja uklanjanja mitohondrija koji može biti ispravljen kemikalijama koje izazivaju depolarizaciju mitohondrija (17). Do danas još nedostaju podaci na koji način Nix direktno uzrokuje depolarizaciju mitohondrija u retikulocitima. Također postoji mogućnosti da se depolarizacija mitohondrija ne događa na samom početku procesa već da se može događati nakon što se formirao autofagosom, ali prije same eliminacije (18).

Drugi model Nix-posredovane mitofagije uključuje Nix protein koji aktivira komponente mehanizma autofagije neovisno o svojoj sposobnosti izazivanja mitohondrijsku depolarizaciju . Poznato je da pojačana ekspresija Nix proteina (i njegovog homologa Bnip3) aktivira autofagiju u različitim uvjetima, što predlaže da bi sposobnost induciranja autofagije mogla biti njihova unutarnja karakteristika. Važno je naglasiti da Nix nije homolog nijednom važnom proteinu koji sudjeluje u mitofagiji u kvasaca i da nedostatnost Nix proteina ne dovodi do potpunog kočenja autofagije u eritroidnim stanicama. Deficijencija Nix proteina zapravo dovodi do nemogućnosti povezivanja autofagosoma sa ciljnim mitohondrijima. Ovo je jednostavan model koji predstavlja Nix kao protein adapter koji aktivira i navodi komponente autofagije na mitohondrij. Različite studije su dosad dokazale da Nix ulazi u interakciju sa LC3 proteinom. (18)

Treći model Nix-posredovane mitofagije proizlazi iz modela u kojima dolazi do preklapanja mehanizama autofagije i stanične smrti. Bnip3 i Beclin1 su prvenstveno identificirani kao proteini koji stupaju u interakciju s Bcl-2 i/ili Bcl-$X_{L.}$ Beclin1 pripada klasi III PI3-K kompleksa koji regulira indukciju autofagije dok Bcl-2 inhibira autofagiju vezivanjem za Beclin1. Studije istraživanja strukture i mutacija pokazale su da se ova interakcija ostvaruje preko BH3-slične domene koja se nalazi u Beclin1. Proteini koji imaju BH3 domenu mogu aktivirati mitofagiju natjecanjem s Beclin1 za vezno mjesto na Bcl-2 ili Bcl-X_L. Stoga je moguće da se Nix natječe za vezno mjesto na Bcl-X_L i da povećana ekspresija Nix proteina tijekom diferencijacije eritrocita remeti stabilnost Bcl-X_L/Beclin1 kompleksa otpuštajući tako Beclin1 i aktivirajući autofagiju. Međutim, ovaj model ima

nedostatak, a to je da nedostatak Nix proteina u retikulocitima ne dovodi do potpunog izostanka autofagije. Ovo navodi na zaključak da je srž mehanizma same autofagije očuvana i da postoje drugi putevi aktivacije autofagije u retikulocitima. Pozivajući se na ovu tvrdnju možemo reći da je Nix zapravo potreban za aktivaciju autofagije u blizini mitohondrijske vanjske membrane, gdje je on zapravo i lokaliziran. (18)



Slika 5. Mehanizam mitofagije pod utjecajem Nix/Bnip3 proteina i Beclin1/Bcl-2 kompleksa. Nix i Bnip3 dovode do disocijacije Beclin1 s kompleksa Beclin1/Bcl-2. Beclin1 zatim aktivira mehanizam autofagije. Bcl-2 potiće dimerizaciju Nix i Bnip3. Zatim dolazi do interakcije s LC3 te spajanje autofagosoma s mitohondrijem. Preuzeto i modificirano od: (16)

1.5. Mitohondrijski protein Nix

Humani Nix protein je transmembranski protein koji u svom sastavu ima 219 aminokiselina i svojom transmembranskom domenom jednostruko prolazi kroz vanjsku membranu mitohondrija formirajući α- uzvojnicu . Nix je homolog proteina Bnip3, proteina koji također pripada BH3 porodici proteina. (19)

Nix je u malim količinama prisutan u stanicama različitih tkiva u ljudskom organizmu, ali je zato prisutan u puno većim količinama u stanicama srca, jetre i bubrega. Nix u kardiocitima nije reguliran hipoksijom, dok u drugim tkivima i stanicama tumora hipoksija aktivira Nix putem transkripcijskog faktora HIF-1 (engl. *hypoxia inducible factor 1*). Vrlo je česta pojava da u tkivima u kojima je smanjena ekspresija proteina Nix, ekspresija Bnip3 proteina bude povećana i obrnuto (20). Ovakve tkivne specifičnosti u regulaciji aktivacije Nix proteina imaju važnu primjenu. Nix je aktiviran u različitim fiziološkim i patološkim uvjetima posebno u hematopoetskim stanicama, srčanim stanicama te mnogim drugim stanicama. U hematopoetskom sustavu, ekspresija Nix proteina se povećava tijekom sazrijevanja eritroblasta. U srcu, tijekom patološke hipertrofije, Nix je transkripcijski reguliran kao odgovor na hemodinamičko opterećenje. Nix-posredovana apoptoza pridonosi programiranom gubitku kardiocita što na koncu dovodi do zastoja srca. (21)

Nix ima dvostruku ulogu u modelu koji možemo nazvati „Mitofagija u dva koraka“. Prvo, Nix potiče indukciju autofagije odvajajući Bcl-2/Beclin1 kompleks kroz kompetitivno vezanje za Bcl-2. (22). Druga uloga Nix proteina je označavanje mitohondrija za autofagiju. Nix ulazi u interakciju s LC3 proteinima i njegovim homolozima, te na taj način povezuje oštećeni mitohondrij sa mehanizmom autofagije. (22)

1.5.1. LIR domena

Nix ima LC3-vezujuću regiju (LIR) blizu svoga N- terminalnog kraja koja strši u citoplazmu koja je karakterizirana WxxL aminokiselinskim slijedom. Ovom regijom Nix se direktno veže za LC3 proteine i njegove homologe u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Ovaj odsječak može direktno vezati izolacijsku membranu za mitohondrij. (15)

1.5.2. Transmembranska domena (TM)

Transmembranska domena Nix proteina ima 21 aminokiselinu. Važna je za lokalizaciju Nix proteina u vanjsku membranu mitohondrija. Mutanti Nix kojemu je uklonjena transmembranska domena ne nalaze se na mitohondrijskoj membrani već u citosolu (23).

1.5.3. C- terminalni kraj

BLAST analiza sekvence Nix proteina otkriva da je C- terminalna regija Nix proteina 77% identična regiji Bnip3 proteina, koja je promatrana i okarakterizirana u lipidnom dvosloju NMR spektroskopijom. Mutanti Nix proteina kojima je uklonjena C- terminalna regija ne nalaze se više u mitohondriju nego u citosolu. (23).

1.5.3.1. Regulacija receptorske aktivnosti fosforilacijom

Fosforilacija proteina je najvažnija i najbolje istražena post-translacijska modifikacija. Fosforilacija je reverzibilan proces koji se odvija na bočnim lancima triju aminokiselina, a to su serin, treonin i tirozin. Fosforilacija ima važnu ulogu u regulaciji mnogih staničnih procesa kao što su stanični ciklus, rast stanice, apoptoza i prijenos signala u stanici različitim signalnim putevima.

Glavnu ulogu u fosforilaciji i defosforilaciji proteina imaju enzimi kinaze i fosfataze, koje fosforiliraju (kinaze) i defosforiliraju (fosfataze) substrat. Jedna od važnih uloga ovih enzima u stanici je održavanje prirodne ravnoteže u njihovoj aktivnosti kao i održavanje

ravnoteže u broju fosforiliranih odnosno defosforiliranih proteina. Za veliki broj proteina proces fosforilacije je usko povezan sa njihovom aktivnošću i ima glavnu ulogu u regulaciji njihove funkcije. Fosforilacija mijenja funkciju proteina tako što dovodi do konformacijskih promjena u proteinima. Gore navedene aminokiseline imaju u svojoj strukturi nukleofilnu (- OH) skupinu koja „napada“ terminalnu fosfatnu grupu u adenozin trifosfatu (ATP), što rezultira prijenosom fosfatne grupe na bočni lanac aminokiselina (27). Važnost fosforilacije otkrivena je u LIR regiji Bnip3 proteina koji je homolog proteina Nix. Otkriveno je da fosforilacija na serinima na položaju 17 i 24 dovodi do pojačane interekcije sa proteinima LC3. (24)

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Istraživanja su pokazala da je dimerizacija važna za dijelovanje Nix proteina kao receptora mitofagije. Nix u svojoj strukturi ima 4 važne domene, a to su: LIR domena, BH3-domena, transmembranska domena, C-terminalna domena koja je sastavljena od 11 aminokiselina. Pregledom dostupne literature lako se može zaključiti da svaka od ovih domena na određeni način sudjeluje u mitofagiji. LIR domena koja je važna za vezanje za LC3 protein, transmembranska domena i C-terminalna domena koje imaju važnost u dimerizaciji i lokalizaciji Nix proteina u mitohondriju. Opće je poznato da je aktivnost receptora regulirana određenim mehanizmima kontrole u stanici. Jedan od najpoznatijih takvih mehanizama je fosforilacija receptora. Zasad je otkriveno da fosforilacija u LIR sekvenci Nix proteina dovodi do pojačanog vezanja Nix i LC3 proteina. (Podaci u procesu objavljivanja). Ovaj podatak upućuje na mogućnost postojanja dodatnih mjesta fosforilacije u strukturi Nix koja bi mogla utjecati na dimerizaciju i interakciju Nix s LC3 proteinom.

Cilj moga istraživanja je utvrditi da li fosforilacija serinskog ostatka S212 na C-terminalnom kraju Nix proteina utječe na stvaranje Nix dimera. Cilj je bio i utvrditi dovodi li mutacija serina S212 u alanin ili glutaminsku kiselinu do nemogućnosti lokalizacije proteina Nix na vanjskoj mitohondrijskoj mebrani te utvrditi dovode li mutacije na ovoj poziciji do gubitka sposobnosti interakcije sa autofagosomalnim proteinom LC3A.

3. MATERIJALI I METODE

3. 1. Materijali

3.1.1. Osnovne kemikalije

- Agar (Roth)
- Agaroza (Sigma)
- Akril amid (AppliChem)
- Albumin iz goveđeg seruma (BSA) (Roth)
- Amonijev persulfat (APS) (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 (β- aminoetil eter)- N,N,N,N- tetraoctena kiselina (EGTA) (Roth)
- Fenol crveno (Sigma)
- Glicerol (Kemika)
- Glicin (Roth)
- Glutation sefarozne kuglice *Gluthathione Sepharose 4B* (GE Healthcare Bio-Science AB)
- Izopropil β-D-1- tiogalaktopiranozid (IPTG) (Roth)
- Kalijev dihidrogenfosfat (Kemika)
- Kalijev klorid (Kemika)
- Luminol *Western blotting luminol reagent (Solution A i Solution B)* (Santa Cruz Biotechnology)
- 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)
- Octena kiselina (Kemika)
- Paraformaldehid (Sigma)
- Piperazin-N,N-bis(2-etansumporna kiselina)(PIPES) (Roth)
- Ponceau S (Roth)
- Tripsin- EDTA (PAA)
- Tris (Sigma)
- Triton- X-100 (Roth)
- Voda oslobođena od nukleaza (Invitrogen)
- β- merkaptoetanol (Fluka)
- 2- propanol (Kemika)
- 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (HEPES) (Roth)
- 4, 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Koncentracija matične otopine 0.5 μg/ml

3.1.2. Aparati

- Aparatura za elektroforezu *Mini Protean 3* (Bio-Rad)
- Aparatura za horizontalnu elektroforezu (Bio-Rad)
- Aparatura za izlijevanje gelova (Bio-Rad)
- Centrifuga *Biofuge primo R* (Heraeus)
- Centrifuga *Heraous Fresco 17 centrifuge* (Thermo Scientific)
- Fluorescencijski mikroskop *Axioimager D1, Carl 165 Zeiss, Inc., (software: AxioVision software version 4.4; Carl Zeiss, Inc.)*
- Inkubator *Economy Incubator with fan size 1* (GALLENKAMP)
- Inkubator *Hereaus Hera Cell 150* (Thermo Scientific)
- Nanodrop *Nanodrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scinetific)
- PCR uređaj *Arktik Thermal Cycler* (Thermo Scientific)
- Roteks *General rotator STR4* (Stuart)
- Sonifikator SONOPULS HD 2200 (Bandelin)
- Spektrofotometar *DU 530 Life Science UV/VIS Spectrophotometer* (BECKMAN COULTER)
- Sustav za prijenos proteina *Mini Trans- Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad)

- Termoblok Termo Shaker Incubator Thriller (PREQLAB)
- Uređaj za dokumentaciju i analizu agaroznih gelova *Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290* (Kodak)
- Vibracijska mješalica *BioVortex VI* (BIOSAN)

3.1.3. Puferi

- 1X TAE pufer pripremljen iz koncentrirane otopine 50X TAE pufera (2 M Tris, 5.7% ledene octene kiseline, 100 mM EDTA pH 8.0 u ddH_20)
- 1X pufer za elektroforezu (*„running buffer"*) pripremljen iz koncentrirane otopine 10X (250 mM Tris, 2M glicin, 1% SDS u ddH_2O)
- 1X pufer za prijenos (*„transfer buffer"*) pripremljen iz koncentrirane otopine 10X (250 mM Tris, 2M glicin, 20% v/v metanol u ddH_2O)
- Pufer blokiranje TBS-BSA (5% BSA, 0,1% Na- azi, fenol red u sterilnom 1X TBS-u, pH 7.4 u ddH_2O)
- 4X Tris-HCl/SDS pufer za sabijanje pH 6.8 (0.5 M Tris, 0.4% SDS u dH_2O)
- 4X Tris-HCl/SDS pufer za razdvajanje pH 8.8 (1.5 M Tris, 0.4% SDS u dH_2O)
- GST pufer 1 (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.5 mM EGTA, pH 8.5, 150 mM NaCl u ddH_2O
- GST pufer 2 (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.5 mM EGTA, pH 8.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X- 100 u ddH_2O)
- GST pufer 3 (20mM Tris- HCl, pH 7.5 u ddH_2O)
- Pufer za ispiranje membrana (1X TBS, 0.05% Tween, pH 7.4 u ddH_2O)
- 1X PBS napravljen iz 10X koncentrirane otopine (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 x 7 H2O, 2 mM KH_2PO_4)
- 1X TBS napravljen iz 10X koncentrirane otopine (500 mM Tris, 1.5 M NaCl, pH 7.5 u ddH_2O)
- Pufer za lizu stanica ppH 7.5 (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 25 mM NaF, 1% Triton x-100, 10 µM $ZnCl_2$ u ddH_2O)
- 2X pufer za nanošenje uzoraka (*Leammli*) (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 5.6% SDS, 0.01% bromfenol plavo u ddH_2O)

3.1.4 Otopine

- 5% otopina mlijeka u prahu u 1X TBS puferu
- *Coomassie* otopina (15% v/v etanol, 17% v/v octena kiselina, 0.25% v/v *Coomassie brilliant blue* u dH_2O)
- Otopina za odbojavanje *Coomassie* boje (20% v/v metanol, 10% v/v octena kiselina u dH_2O)
- Otopina za blokiranje (3%- tna otopina BSA napravljena u 1X PBS- u)
- Otopina za fiksaciju i permeabilizaciju stanica (2%- tna otopina paraformaldehida uz dodatak 0.15% Triton X-100 napravljenja u 1X PBS-u)
- Ponceau S otopina (10% v/v koncentrirana octena kiselina, 0.5% v/v Ponceau S u deH_2O)

3.1.5. Bakterijski sojevi

- ***Escherichia coli* soj DH5α**

3.1.6. Stanične linije

- **HEK293-** humane embrionalne stanice bubrega
- **HeLa-** stanice adenokarcinoma cerviksa maternice

3.1.7. LB hranjive podloge

- Tekuća (1.0% bakto tripton, 0.5% ekstakt kvasca, 0.5% NaCl)
- Kruta (1.0% bakto tripton, 0.5% ekstrakt kvasca, 0.5% NaCl i 0.5% agar)

3.1.8. Mediji za HeLa i HEK293 stanice

- Tekuća hranjiva podloga DMEM uz dodatak 10% FBS (*Fetal bovine serum*) (GIBCO) i 1% penicilin/streptomicin (PAA)

3.1.9. Kompleti

- Komplet za izolaciju i pročišćavanje plazmidne DNA- *GeneJET Plasmid Miniprep kit* (Fermentas)
- Komplet za transfekciju *jetPRIME* (Polyplus transfection)
- dNTP set *100 mM dNTP Set PCR Grade* (Invitrogen)

3.1.10. Protutijela

Primarna

- Anti- GFP monoklonalno protutijelo proizvedeno u mišu (Roche)
- Anti- GFP poliklonalno protutijelo proizvedeno u kuniću (Clontech)
- Anti- Tom20 poliklonalno protutijelo proizvedeno u kuniću (Santa Cruz Biotech)
- Anti- FLAG monoklonalno protutijelo preizvedeno u mišu (Invitrogen)

Sekundarna

- Goat Anti- Mouse IgG (H+L)-HRP Conugate (Bio-Rad)
- Alexa Fluor488 donkey anti- mouse IgG (H+L) (Koncentracija 2 mg/ml)
- Alexa Fluor568 goat anti rabbit IgG (H+L) (Koncentracija 2 mg/ml)

3.1.11. Enzimi

- DNaza (Koncentracija matične otopine 1 mg/ml)
- *Dpn*I restrikcijska endonukleaza, enzimske aktivnosti 10 u/µl, s pripadajućim *Dpn*I puferom (Thermo Scientific)
- *Pfu*II polimeraza s pripadajućim 10X *PfuUltraII* puferom (Fermantas)

3.1.12. Proteazni inhibitori

- Aprotinin (Koncentracija matične otopine 10mg/ml) (Sigma)
- Fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) (Koncentracija matične otopine 100 mM)(Roth)
- Leupeptin (Koncentracija matične otopine 1 mg/ml) (Roche)
- Natrijev ortovanadat (Koncentracija matične otopine 1M) (Sigma)

3.1.13. Biljezi

- Proteinski biljeg- *Protein Marker VI (10-245) prestained* (AppliChem)
- DNA biljeg - *1 kb DNA Step Ladder* (Promega)

3.1.14. Oligonukleotidne početnice

Početnice	Nukleotidni slijed
hNix_S212Afor hNix_S212Arev	5'-CGACTGAGCACACCC**GCT**GCCAGCACCTACTG-3' 5'-CAGTAGGTGCTGGC**AGC**GGGTGTGCTCAGTCG-3'
hNix_S212Efor hNix_S212Erev	5'-CGACTGAGCACACCC**GAG**GCCAGCACCTACTG- 3' 5'-CAGTAGGTGCTGGC**CTC**GGGTGTGCTCAGTCG- 3'

3.1.15. Plazmidni vektori

pEGFP-C1 plazmid- korišten je za dobivanje konstrukta EGFP- NixS212A, EGFP-NixS212E, EGFP- NixΔLIR mutagenezom *in vitro* pomoću PCR-a

3.2. Metode

3.2.1. Uvođenje mutacija na ciljno mjesto (*site directed mutagenesis)* u DNA molekuli PCR- om

Site directed mutagenesis (SDM) je metoda za uvođenje specifičnih i ciljnih promjena u dvostrukom lancu plazmidne DNA. Za svrhu ovog diplomskog uvedene su sljedeće mutacije u plazmid pEGF-C1-Nix:

- **S212A-** (supstitucija serina alaninom na 212. položaju u aminokiselinskoj sekvenci Nix proteina)
- **S212E-** (supstitucija serina glutaminskom kiselinom na 212. položaju u aminokiselinskoj sekvenci Nix proteina)

3.2.1.1. Dizajniranje oligonukleotidnih početnica

Početnice se dizajniraju za željenu mutaciju i naručuju. Prilikom dizajnirana početnice treba poštovati sljedeća pravila:

- Komplementarne početnice trebaju sadržavati željenu mutaciju i sparivati se na isti slijed DNA samo na komplementarnim lancima
- Početnice trbaju biti dužine 25-45 pb, a temperatura taljenja veća od 78 °C
- Početnica se dizajnira tako da željena mutacija bude u sredini tako da ostane 10-15 parova baza nepromijenjenog slijeda sa obje strane mutacije.
- Trebaju sadržavati najmanje 40% GC nukleotida i krajevi početnica moraju počinjati i završavati s jednom ili više C ili G baza.

3.2.1.2. PCR- reakcija

Za PCR reakciju treba pripremiti reakcijsku smjesu u koju se stavljaju sljedeće komponente:

H_2O (oslobođena od nukleaza)	33,5 µl
10X *PfuUltra* II pufer	5 µl
DNA kalup (10 ng/µl)- plazmid pEGFP-Nix	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
5’ početnica (10 pmol/µl)	1 µl
3’ početnica (10 pmol/µl)	1 µl
DMSO	2,5 µl
Pfu II polimeraza	1 µl

Sveukupni volumen pripravljene smjese je 50 µl. Ovako pripremljene smjese za PCR promiješaju se na vibracijskoj miješalici i centrifugiraju. Nakon centrifugiranja smjese se stavljaju u PCR uređaj na sljedeći program:

1. 95 °C 3 min (početna denaturacija)
2. 95 °C 1 min (denaturacija lanca)
3. 58 °C 1 min (vezanje početnica na kalup)
4. 68 °C 12 min 30 sec (sinteza komplementarnih lanaca)

   2.- 4. x18 ciklusa
5. 68 °C 12 min 30 sec (završno produživanje lanaca)
6. 8 °C ∞

3.2.1.3. Elektroforeza DNA

Nakon završene PCR reakcije slijedi elektroforeza DNA. Elektroforeza DNA je metoda kojom se provjera uspješnost PCR reakcije. Elektroforeza je metoda razdvajanja fragmenata DNA i zasniva se na različitoj pokretljivosti fragmenata u električnom polju ovisno o njihovoj veličini. (29)

Pripremljen je 1,2% agarozni gel u 1X TAE puferu uz dodatak 1 µl etidijevog bromida. Na polimerizirani gel naneseno je 10 µl PCR produkta pomiješanog s 2 µl boje za praćenje elektroforeze *Blue/Orange 6X Loading Dye*. Elektroforeza je provedena pri naponu od 90V, 45 minuta u aparaturi za horizontalnu elektroforezu. Kada je elektroforeza završila, gel je snimljen pomoću uređaja *Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290* (Kodak). Položaj DNA molekule je bio vidljiv na gelu zahvaljujući interkalaciji etidijevog bromida između baza u molekuli DNA budući da etidijev bromid fluorescira pod UV svjetlom.

3.2.1.4. Uklanjanje kalupa DNA iz produkta PCR reakcije

Smjesa dobivenog PCR produkta u sebi sadržava plazmidnu DNA sa uvedenom ciljanom mutacijom, te DNA kalup (plazmid s metiliranom DNA). Za daljni tijek eksperimenta potrebno je ukloniti DNA kalup iz smjese.

Za uklanjanje kalupa upotrebljena je restrikcijska endonukleaza *Dpn*I. *Dpn*I enzim ima sposobnost cijepanja metiliranih sljedova 5' –Gm6ATC-2' dvolančane DNA (DNA kalup

bez mutacije) te na taj način u produktu ostaje samo produkt PCR reakcije koji sadrži željenu mutaciju.

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

3.2.2. Transformacija DH5α bakterijskih stanica metodom „*heat shock*“

Nakon što je uklonjen DNA kalup iz PCR smjese, slijedi prijenos plazmida s ciljanom mutacijom u bakterijsku stanicu. Proces unosa plazmida u bakterijsku stanicu naziva se transformacija. Plazmidi koji se unose u bakterijske stanice sadrže gen za antibiotsku rezistenciju što omogućava selektivno uzajanje transformiranih bakterija na selektivnim podlogama. Za potrebe eksperimenta upotrebljene su DH5α bakterijske stanice. Ove bakterije imaju brojne mutacije, a dvije su mutacije najbitnije zbog kojih su pogodne za transformaciju. Mutacija *end*A1 smanjuje endonukleaznu digestiju plazmida dok *hsd*R17 (rK-, mK+) mutacija smanjuje aktivnost *Eco*K restrikcijskog enzima.

Transformacija se vrši na ledu. U ohlađenoj tubici od 1,5 ml pomiješano je 10 µl PCR/DpnI smjese i 100 µl DH5α bakterijskih stanica. Nakon toga je uslijedila inkubacija na ledu 30 minuta. Dok je trajala inkubacija *Termoblok Thermo Shaker Incubator Thriller* zagrijan je na 42 °C. Kad je prošla inkubacija na ledu, smjesa je prenesena na *Termoblok Thermo Shaker Incubator Thriller (*u nastavku teksta samo *Thriller)* 2 min na 42 °C. Nakon završene inkubacije *Thriller* je temperiran na 37 °C za sljedeći korak. Smjesi skinutoj sa inkubacije sada se dodaje 1 ml sterilnog LB medija/tubicii. Uslijedila je inkubacija na 37 °C, 450 rpm, 1 h. Nakon inkubacije smjesa je centrifugirana 5 minuta na 2000 rpm na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja u tubici imamo talog i supernatant. Talog je resuspendiran u malo supernatanta te nasađen na hranjive podloge koje sadrže kanamicin budući da plazmid pEGFP-C1 sadrži kanamicinsku rezistenciju. Ploče su inkubirane na 37 °C jedan dan.

3.2.3. Izolacija plazmidne DNA *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* kompletom

Pojedinačna bakterijska kolonija narasla na selektivnoj podlozi inokulira je u 5 ml tekuće selektivne hranjive podloge uz dodatak odgovarajućeg antibiotika. Inkubirane se u tresilici za uzgoj bakterija na 37 °C uz konstantnu aeraciju pri 220 okretaja/min.

Izolacija plazmidne DNA napravljena je na sobnoj temperaturi. Prekonoćna bakterijska suspenzija je centrifugirana 10 minuta na 4000 okretaja/min. Bakterijski talog resuspendiran je u 250 µl otopine za resuspendiranje kojoj se prethodno doda RNaza A. Smjesa je resuspendirana i nakon toga joj je dodano 250 µl otopine za lizu. Nakon dodavanja otopine za lizu, smjesa je snažno promiješana izvrtanjem mikroepruvete minimalno 4 puta. Pojavio se bistri sadržaj. Otopina za lizu služi za liziranje bakterijski stanice te denaturiranje molekula proteina i DNA. Također treba napomenuti da se sadržaj u mikroepruveti ne smije ostaviti na duži vremenski period izlože otopini za lizu. Nakon miješanja dodano je 350 µl otopine za neutraulizaciju, te ponovno promiješano do pojave bijelog precipitata. Bijeli precipitat u ovom slučaju sadrži istaloženu genomsku DNA i denaturirane proteine. Plazmidna DNA se ovim korakom renaturira i ostaje u otopini. Smjesa je centrifugirana 10 minuta na 1300 okretaja/min. Supernatant je potom prebačen u kolonice *GeneJet* i ponovno centrifugiran pod istim uvjetima. Kolonicama je potom dodano 500 µl otopine za ispiranje, kojoj je prethodno dodan etanol za precipitaciju DNA te su centrifugirane 1 minutu na 1300 okretaja/min. Ovaj zadnji korak je ponavljen 2 puta. Napravljeno je dodatno centrifugiranje 2 minute na 1300 okretaja/min kako bi se uklonila otopina za ispiranje sa etanolom. Elucija DNA napravljena je dodavanjem 50 µl H_2O oslobođene od nukleaza. Eluirana DNA inkubirana je 2 minute na sobnoj temperaturi, a potom centrifugirana 2 minute na 1000 okretaja/min.

Količinu i kakvoću dobivene plazmidne provjerava se na uređaju *Nanodrop 1000 Spectrophotometer* mjerenjem apsorbancija na valnim duljinama 260 i 280 nm. Mjerenjem na 260 nm određuje se količina DNA. Omjer očitanja na 260 nm i 280 nm govori o čistoći DNA (za čistu DNA iznosi 1,8-2,0).

3.2.3.1. Priprema plazmidne DNA za određivanje primarne strukture

Sekvencioniranje je postupak određivanja slijeda nukleotida u nukleinskoj kiselini. Sekvencioniranje je napravljeno kako bi se provjerila uspješnost uvođenja mutacija u željenu plazmidnu DNA.

Uzorci su razrijeđeni u H_2O oslobođenoj od nukleaza na konačnu koncentraciju 0,1 µg/µl. Napravljeni su alikvoti od 15 µl koji su onda poslani na sekvencioniranje.

3.2.4. Priprema GST- fuzijskih proteina i njihovo vezivanje na glutation sefarozne kuglice

Pull down je metoda koja se koristi za dokazivanje interakcije između dva ili više proteina. Metoda se sastoji u postojanju proteina koji predstavlja „mamac“ (*bait*) na koji se veže protein od interesa (pray) iz smjese određenih proteina. Za dokazivanje interakcija između proteina Nix i njegovih mutanti s proteinima na autofagosomalnoj membrani upotrebljena je GST *pull-down* metoda. Autofasomalni protein LC3A označen je staničnim enzimom i vezan za glutation sefarozne kuglice veličine 26 kDa (GST) dok su u staničnom lizatu prisutni EGFP-Nix (divlji tip, ΔLIR, S212A, S212E). Za svrhu ovoga eksperimenta upotrebljen je već vezani protein LC3A na glutation sefarozne kuglice, tako da će u ovom odjeljku biti ukratko opisan postupak njegovog dobivanja. Pri izradi GST- fuzijskih proteina imobiliziranih na glutation sefarozne kuglice koristi se bakterija *E.coli,* soj BL21 (genotip; F- *dcm ompT hsdS*(rB- mb) *gal*). Bakterije se transformiraju sa plazmidom pGEX-4T-1 koji u sebi sadrži ukloniranu sekvencu LC3A (25). Bakterije se preko noći uzgajaju na LB čvrstim hranjivim podlogama koje sadrže ampicilin. Zatim se uzme kolonija sa te ploče i prenese u LB-ampicilin tekuću hranjivu i ostavi se preko noći. Određeni volumen prekonoćne kulture prenese u novi volumen LB-ampicilin tekuće hranjive podloge. Tu se spektrofotometrijski prati rast bakterijske kulture. Kultura se inkubira do optičke gustoće OD_{600} = 0.35-0.6. Pri ovoj vrijednosti bakterije su u logaritamskoj fazi rasta i ovdje je produkcija proteina najveća. Slijedi indukcija sa IPTG (izopropil β-D-1-tiogalaktpiranozid).

Nakon ovoga postupka slijedi izdvajanje proteina iz bakterijske stanice i ono se vrši na temperaturi od 4 °C. Nakon samog postupka razdvajanje slijedi postupak pripreme glutation sefaroznih kuglica s vezanim proteinima. Serijom ispiranja, resuspendiranja i centrifugiranja

glutation sefarozne kuglice *Glutathione Sepharose 4B* (GE HEalthcare Bio-Science AB) se isperu i dodaju supernatantu koji je ostao nakon izolacije proteina. Potom se inkubiraju 2h na 4 °C uz konstantnu vrtnju na *General rotator STR4* (Stuart). Nakon ovoga postupka slijedi ispiranje i priprema glutation sefaroznih kuglica za provjeru uspješnosti pročišćavanja. Provjera uspješnosti pročišćavanja se provodi elektroforezom na 10%- tnom poliakrilamidnom gelu.

3.2.5. Transfekcija HEK 293 stanica

Transfekcija je postupak unosa strane DNA u eukariotsku stanicu kako bi se dobila genetski modificirana stanica. Transfekcija je moćan analitički alat u proučavanju genske funkcije i regulacije te funkcije proteina. Transfekcija može biti stabilna ili prolazna. Kod stabilne transfekcije unešeni genetski materijal integrira se u genom stanice i zadržava gensku ekspresiju i nakon diobe stanice. Prolazno transfecirani geni su eksprimirani tijekom određenog vremenskog perioda i kod njih ne dolazi do integracije u stanični genom stanice u koju su unešeni. (26)

Trasfekcija za ovaj eksperiment je izvedena pomoću *jetPRIME* kompleta. *JetPRIME* komplet sadrži *jetPRIME* reagens koji osigurava visoku efikasnost transfekcije. Omogućava korištenje male količine DNA.

Prije transfekcije potrebno je nasaditi HEK293 stanice u pločice za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića. Po bunariću je stavljeno 2 ml DMEM+10%FBS+1% penicilin/streptomicin tekuće hranjive podloge. Stanice su inkubirane na 37 °C uz 5% CO_2 do postizanja optimalne popunjenosti za transfekciju od oko 60-80%.

Transfekcija je napravljena koristeći plazmidnu DNA s određenim konstruktima i mutacijama te su unešeni u bunariće u sljedećem rasporedu:

1. bunarić- netrasfecirane stanice
2. bunarić- pEGFP
3. bunarić- Nix WT
4. bunarić- Nix S212A
5. bunarić- Nix S212E
6. bunarić- Nix ΔLIR

Transfekcijska smjesa je napravljena tako da se pomiješa 1µg DNA, 2µl *jetPRIME* reagensa i 200 µl *jetPRIME* pufera po bunariću. Smjesa se kratko vorteksira i ostavi inkubirati

10 minuta. Nakon inkubacije transfekcijska smjesa se ravnomjerno rasporedi po stanicama u bunarićima. Stanice su inkubirane 24h na 37 °C. pri 5% CO_2.

3.2.6. Izdvajanje i detekcija proteina

Nakon inkubacije stanica slijedi izolacija proteina iz transfeciranih stanica. Postupak se izvodi na ledu (kako bi se sačuvali proteini) uz korištenje proteaznih inhibitora: natrijev ortovanadat (inhibitor fosfataze), leupeptin (inhibitor cisteinskih, serinskih i treoninskih proteaza), aprotinin (inhibitor serinskih proteaza) i PMSF (inhibitor serinskih proteaza).

Nakon inkubacije slijedeći korak je pokupiti medij iz bunarića u kojima su inkubirane stanice. Svakom bunariću potom je dodano 1 ml 1XPBS te su s njim pokupljene stanice i prenesene u tubicu od 1,5 ml. Tubice se drže na ledu jer se s proteinima uvijek radi na ledu da bi se očuvala njihova stabilnost. Tubice su potom centrifugirane 5 minuta na stolnoj centrifugi na 2000 rpm na 4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant se odbacuje. Stanice se liziraju na ledu uz dodatak 500 µl pufera za lizu stanica u koji je dodana DNaza (1:200, konc. matične otopine 1mg/ml) te proteaznih inhibitora; PMSF (1:200, konc. matične ot. 100mM), leupeptin (1:1000, konc. matične ot. 1 mg/ml), Na-ortovanadat (1:1000, konc. matične ot. 1 M), aprotinin (1:1000, konc. matične ot. 10 mg/ml). Tubice se inkubiraju 30 minuta na ledu. Nakon inkubacije, tubice su centrifugirane 20 minuta na 5000 rpm na 4 °C kako bi se uklonili svi nelizirani stanični dijelovi i dobila pročišćena smjesa proteina. Potom su pripremljena 2 seta novih tubica od 1,5 ml (za TCL i GST *Pull down*). Nakon centrifugiranja, u 2. set tubica prebačen je sav supertant iz tubica koje su bile na centrifugiranju. Supernatant se prebaciju u nove tubice u kojima se nastavlja eksperiment. Desetinu uzorka (ukupan stanični lizat) potrebno je odvojiti, pomiješati sa istim volumenom 2xLaemmli pufera za nanošenje na gel, zakuhati 5 minuta na 95°C i pospremiti na -20 °C do nanošenja na gel

3.2.6.1. GST *Pull down*

U tubice sa staničnim lizatom dodaje se eksperimentalno određena količina glutation sefaroznih kuglica u svaku tubicu (u našem slučaju 12 µl) te se inkubiraju uz rotaciju na 4 °C preko noći. Uzorci se centrifugiraju 3 minute na 2000 rpm na 4 °C. Nakon centrifugiranja supernatant se polako i pažljivo odsiše i odbaci. U svaku se tubicu dodaje pufer za lizu stanica kako bi se nespecifično vezani proteini za sefarozne kuglice ispravi. Postupak se ponavlja 5 puta. Nakon zadnjeg centrifugiranja, potrebno je u potpunosti ukloniti supernatant. Na

glutation sefarozne kuglice preostale u dnu tubice dodaje se 20 µl 2X Laemmli pufera za nanošenje na gel, uzorci se zakuhaju 5 minuta na 95°C i pospremaju na -20 °C do nanošenja na gel

3.2.6.2. SDS-PAGE elektroforeza

Elektroforeza je metoda razdvajanja molekula djelovanjem električnog polja na osnovi razlika fizičkih i kemijskih osobina. Denaturirajuća gel elektroforeza koristi anionski detergent natrijev dodecil sulfat (SDS) koji denaturira proteine te ih oblaže pa se razdvajanje temelji samo na veličini proteina. Diskontinuirana elektroforeza koristi dva gela, gel za sabijanje i gel za razdvajanje.

Gelovi za SDS elektroforezu napravljeni su korištenjem aparature za izlijevanje gelova (Bio Rad). Napravljen je 12%- tni gel za razdvajanje (12% akrilamid (40%), 25% pufer za razdvajanje 8.8, 0.5% APS, 0.1% TEMED), te 4%- tni gel za sabijanje (4% akrilamid (40%), 24% pufer za sabijanje 6.8, 0.5% APS, 0.1% TEMED). Za elektroforezu je korištena aparatura Mini Protan III (Bio Rad). Uzorci se nanose na način da se u prvu jažicu doda 5 µl proteinskog biljega (*Protein Marker VI (10-245) prestained* (AppliChem)), te u svaku iduću jažicu 25 µl ukupnih staničnih lizata ili GST *pull-down* uzoraka. Razdvajanje je na 120-150V. Kada je plava fronta od uzoraka počela curiti sa gela, elektroforeza je prekinuta. Nakon elektroforeze potrebno je proteine s gela prebaciti na nitroceluloznu membranu.

3.2.6.2.1. Transfer sa gela na membranu

Transfer je obavljen u aparuturi za prijenos proteina s gela na membranu *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio Rad). Transfer je obavljen u puferu za prijenos pri konstantnoj amperaži od 200 mA. Transfer proteina izvodi se 60-90 minuta.

3.2.6.2.2. *Ponceau S* bojanje

Kada je transfer s gela na membranu gotov, membrana se boji *Ponceau S* bojom kako bi se odredila uspješnost transfera i potvrdila prisutnost GST sefaroznih kuglica u uzorcima. Nakon što se membrana obojila, membrana je isprana par puta sa vodom kako bi se isprao višak boje. Membrana je potom slikana i isprana TBS-Tween otopinom kako bi se u potpunosti odbojila.

3.2.6.3. Western blot analiza

Membrani je nakon odbojavanja dodana otopina za blokiranje minimalno sat vremena. Svrha blokiranja membrane je da se smanji mogućnost vezivanja prvog protutijela na membranu. Nakon blokiranja membrane, dodaje se otopina primarnog protutijela (Anti-GFP monoklonalno protutijelo proizvedeno u mišu), 1-2h na sobnoj temperaturi uz ljuljanje. Nakon inkubacije membrana se ispire 5puta po 5 minuta s TBS-Tween ili TBS-Triton X-100 otopinom . Nakon ispiranja, membrana se inkubira u otopini sekundarnog protutijela (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP) 45 minuta uz ljuljanje. Nakon inkubacije uslijedio je isti postupak ispiranja membrane kao i nakon primarnog protutijela. Nakon ovog postupka ispiranja, membrana se ispire u čistoj TBS otopini. Membrana je sada spremna za imunodetekciju.

3.2.6.4. Imunodetekcija proteina na membrani

Detekcija proteina na membrani temelji se na kemiluminiscenciji. Na membranu je dodana mješavina otopine A i otopine B luminola za detekciju *Western blotting luminol reagent* (Santa Cruz Biotehnology). Membrana je umetnuta u prozirnu foliju i analizirana Gel Doc aparatom (Biorad).

3.2.7. Imunofluorescencijska detekcija kolokalizacije Nix i Tom20 proteina

Imunofluorescencija je metoda koja se koristi u svrhu prepoznavanja i lokalizacije dijelova stanice *in situ* putem specifične interakcije antigen-protutijelo, gdje je protutijelo obilježeno fluorescentnom bojom.

Tom20 je protein koji se nalazi u vanjskoj membrani mitohondija te je kao takav dobar marker mitohondrija. Uz pomoć Tom20 proteina moguće je odrediti jesu li Nix i njegove mutirane varijante (ΔLIR, S212A, S212E) lokalizirane u vanjskoj membrani mitohondrija.

3.2.7.1. Transfekcija HeLa stanica

HeLa stanice su nasađene na autoklavirane pokrovnice promjera 12 mm u ploči za uzgoj kulture stanica sa 12 bunarića. U svaki bunarić je stavljeno 1 ml DMEM+ 10% FBS + 1% penicilin/streptomicin medija i inkubirane su na 37 °C uz 5% CO_2 dok ne postignu optimalnu popunjenost za imunofluorescencijsku detekciju (oko 60%). Za transfekciju je korišten *jetPRIME* komplet. Transfekcijska smjesa po bunariću je sadržavala 0,5 µg plazmidne DNA, 1 µl *jetPRIME* reagensa i 100 µl *jetPRIME* pufera.

3.2.7.2. Indukcija mitofagije CCCP reagensom

Kako bi se inducirala mitofagija, stanicama se dodaje CCCP (Karbonil cijanid *m*-klorofenil hidrazon). CCCP djeluje kao depolarizator mitohondrijske membrane. Stanicama je uklonjen prethodni medij i zamjenjen 1 ml medijem s dodatkom CCCP otopine konačne koncentracije 10 µM. Tretman je trajao 2 sata te je napravljena i kontrola koja nije sadržavala CCCP.

3.2.7.3. Detekcija kolokalizacije Nix i Tom20 proteina

Stanice su nakon transfekcije isprane u 1 ml PBS te su fiksirane i permeabilizirane 20 minuta u 500 µl 2%- tne otopine paraformaldehida uz dodatak 0.01% Triton X-100. Nakon toga su isprane tri puta u 1 ml PBS te inkubirane preko noći na 4 °C u otopini za blokiranje (3% otopina albumina iz goveđeg seruma - BSA). Nakon blokiranja, stanice su inkubirane u otopini primarnih protutijela specifičnih za EGFP i Tom20. Otopine primarnih protutijela su razrijeđene u otopini za blokiranje. Proces inkubacije je trajao 1h. Nakon inkubacije slijedilo je ispiranje 3 puta po 5 minuta u PBS. Zatim je dodana otopina sekundarnih protutijela koja je sadržavala protutijela Alexa488 ~~(zeleni spektar)~~ i Alexa568 ~~(crveni spektar)~~. Za vizualizaciju jezgre korištena je boja DAPI (0,5 µg/ml) koja interkalira između nukleotida. Stanice su inkubirane 30 sekundi u DAPI boji i isprane 5 puta u PBS i ostavljene na zraku da se potpuno osuše. Osušene pokrovnice uklopljene su u medij za uklapanje pomoću *ProLong Antifade* kompleta (Invitrogen).

3.2.8. Imunofluorescencijska detekcija mitofagije praćenjem kolokalizacije LC3A i Nix proteina

Za imunofluorescencijsku detekciju mitofagije praćenjem kolokalizacije LC3A i proteina Nix, stanice su transfecirane i pripremljene kako je opisano u poglavljima *3.2.7.1. Transfekcija HeLa stanica* i *3.2.7.3. Detekcija kolokalizacije Nix- a i Tom20.* Indukcija mitofagije s CCCP reagensom napravljena je prema već opisanom postupku u poglavlju *3.2.7.2. Indukcija mitofagije CCCP reagensom.*

3.2.8.1. Detekcija proteina imunofluorescencijom

Za detekciju proteina korištena su primarna protutijela anti-FLAG monoklonalno protutijelo proizvedeno u mišu (Clontech) te anti-GFP poliklonalno protutijelo proizvedeno u kuniću (Clontech). Korištena su Alexa Fluor488 (Invitrogen) i Alex Fluor568 (Invitrogen) sekundarna protutijela. Detekcija je napravljena na epifluorescentnom mikroskopu *AxioImager* (Carl Zeiss).

4. REZULTATI

Protein Nix važan je mitohondrijski receptor u mitofagiji te je u ovome diplomskom radu proučavana moguća uloga fosforilacije serinskih ostataka na C-terminalnom dijelu proteina na mehanizam dimerizacije i aktivacije proteina Nix. Aminokiselinski slijed proteina Nix koji je visoko konzerviran u čovjeka i miša prikazan je na slici 6. Za utvrđivanje utjecaja fosforilacije serinskih ostataka na dimerizaciju proteina Nix formirani su plazmidni vektori Nix (S212A i S212E). Iz divljeg tipa plazmidnog vektora EGFP-Nix napravljeni su ciljanom mutagenezom mutacije na serinu S212 za kojeg se pretpostavlja da je moguće mjesto fosforilacije proteina Nix.

```
sp|O60238|BNI3L_HUMAN    MSSHLVEPPPPLHNNNNNCEENEQSLPPPAGLNSSWVELPMNSSNGNDNGNGKNGGLEHV   60
sp|Q9Z2F7|BNI3L_MOUSE    -MSHLVEPPPPLHNNNNNCEEGEQPLPPPAGLNSSWVELPMNSSNGNENGNGKNGGLEHV   59
                          ****************** ** ********************:************

sp|O60238|BNI3L_HUMAN    PSSSSIHNGDMEKILLDAQHESGQSSSRGSSHCDSPSPQEDGQIMFDVEMHTSRDHSSQS   120
sp|Q9Z2F7|BNI3L_MOUSE    PSSSSIHNGDMEKILLDAQHESGQSSSRGSSHCDSPSPQEDGQIMFDVEMHTSRDHSSQS   119
                          ************************************************************

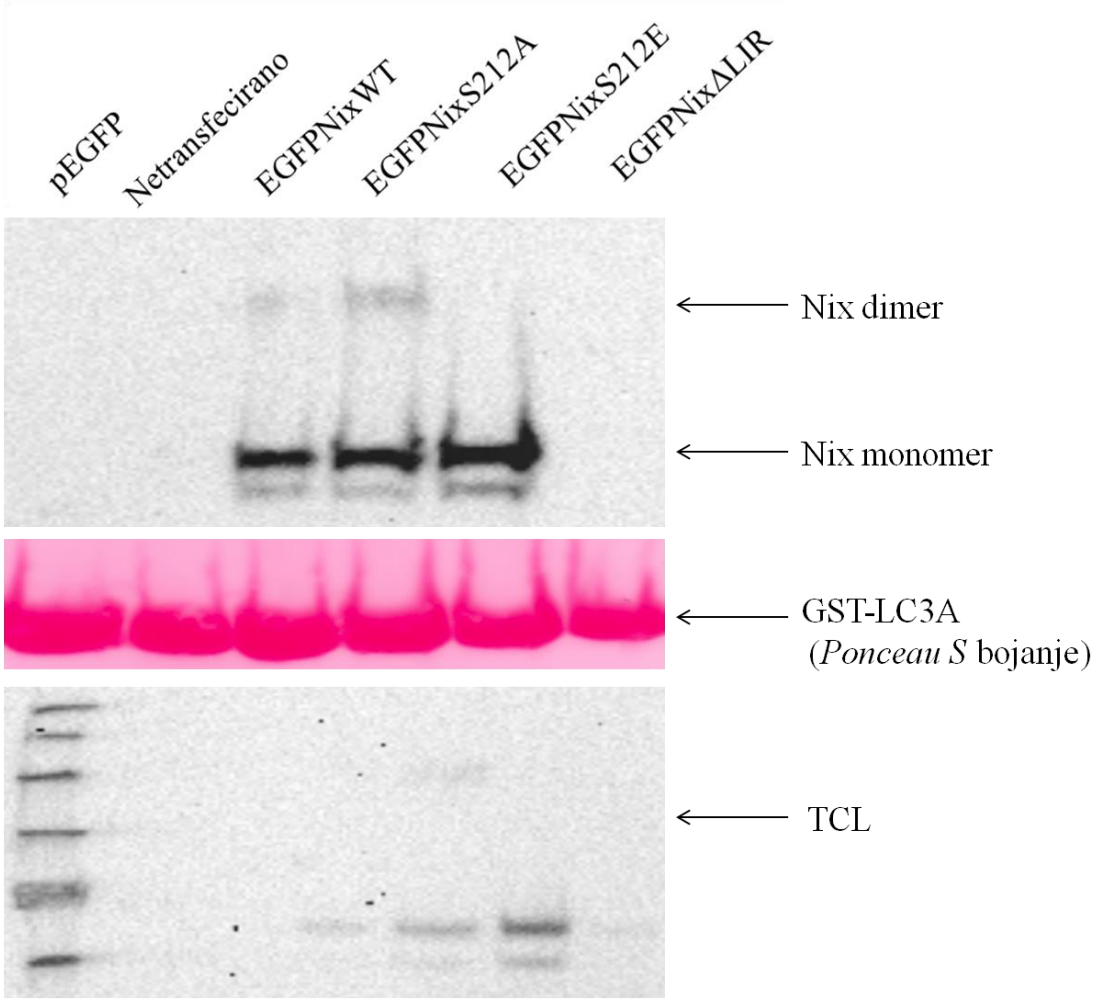
sp|O60238|BNI3L_HUMAN    EEEVVEGEKEVEALKKSADWVSDWSSRPENIPPKEFHFRHPKRSVSLSMRKSGAMKKGGI   180
sp|Q9Z2F7|BNI3L_MOUSE    EEEVVEGEKEVEALKKSADWVSDWSSRPENIPPKEFHFRHPKRAASLSMRKSGAMKKGGI   179
                          ****************************************:.***************

sp|O60238|BNI3L_HUMAN    FSAEFLKVFIPSLFLSHVLALGLGIYIGKRLSTPSASTY   219
sp|Q9Z2F7|BNI3L_MOUSE    FSAEFLKVFIPSLFLSHVLALGLGIYIGKRLSTPSASTY   218
                          ************************************
```

Slika 6. Usporedni prikaz aminokiselinskog slijeda u strukturi proteina Nix kod čovjeka (engl. *human*) i miša (engl. *mouse*). Crveno obojane aminokiseline predstavljaju aminokiseline koje se nalaze na C- terminalnom kraju proteina Nix. Plavo su označeni serini na C- terminalnom kraju proteina Nix.

4.1. Detekcija interakcije proteina EGFP-Nix (WT, S212A, S212E i ΔLIR) s autofagosomalnim proteinom LC3A

Od prije je poznato (15) da protein Nix stupa u interakciju s autofagosomalnim proteinom LC3A. Kako bi potvrdili da li mutacije serina S212 uzrokuju promjene u vezivanju LC3A, napravljen je GST pull down eksperiment.



Slika 7. Slika prikazuje rezultate *Ponceau S* bojanja i Western blot imunodetekcije interakcije proteina EGFP-Nix(WT, S212A, S212E, ΔLIR) i LC3A te ukupni stanični lizat, TCL (od engl. *total cell lysate*- ukupni stanični lizat).

Rezultati Ponceau S bojanja prikazuju prisutnost glutation sefaroznih kuglica kod svakoga od konstrukata EGFP-Nix (WT, S212A, S212E, ΔLIR) te je na slici 7. vidljivo da su signali (ružičasto obojeni) približno jednakih veličina što ukazuje na činjenicu da su količine dodanih glutation sefaroznih kuglica tijekom eksperimenta bile vrlo slične pa je stoga moguće uspoređivati rezultate.

Rezultati Western blot imunodetekcije ukazuju da EGFP-NixWT veže autofagosomalni protein LC3A. Nadalje, na slici 7. vidljivo je da ovaj konstrukt proteina Nix stvara i dimere i monomere. Monomeri su izraženiji u odnosu na dimere.

Konstrukt EGFP-NixS212A također veže autofagosomalni protein LC3A. Na slici 7. vidljivo je da ovaj konstrukt stvara dimere i monomere. Kao i kod prethodnog konstrukta divljeg tipa proteina Nix može se vidjeti da je monomer jače izražen u odnosu na dimer. Uspoređujući jačinu signala dimera kod proteina EGFP-NixWT i EGFP-NixS212A ne može se uočiti neka značajnija razlika.

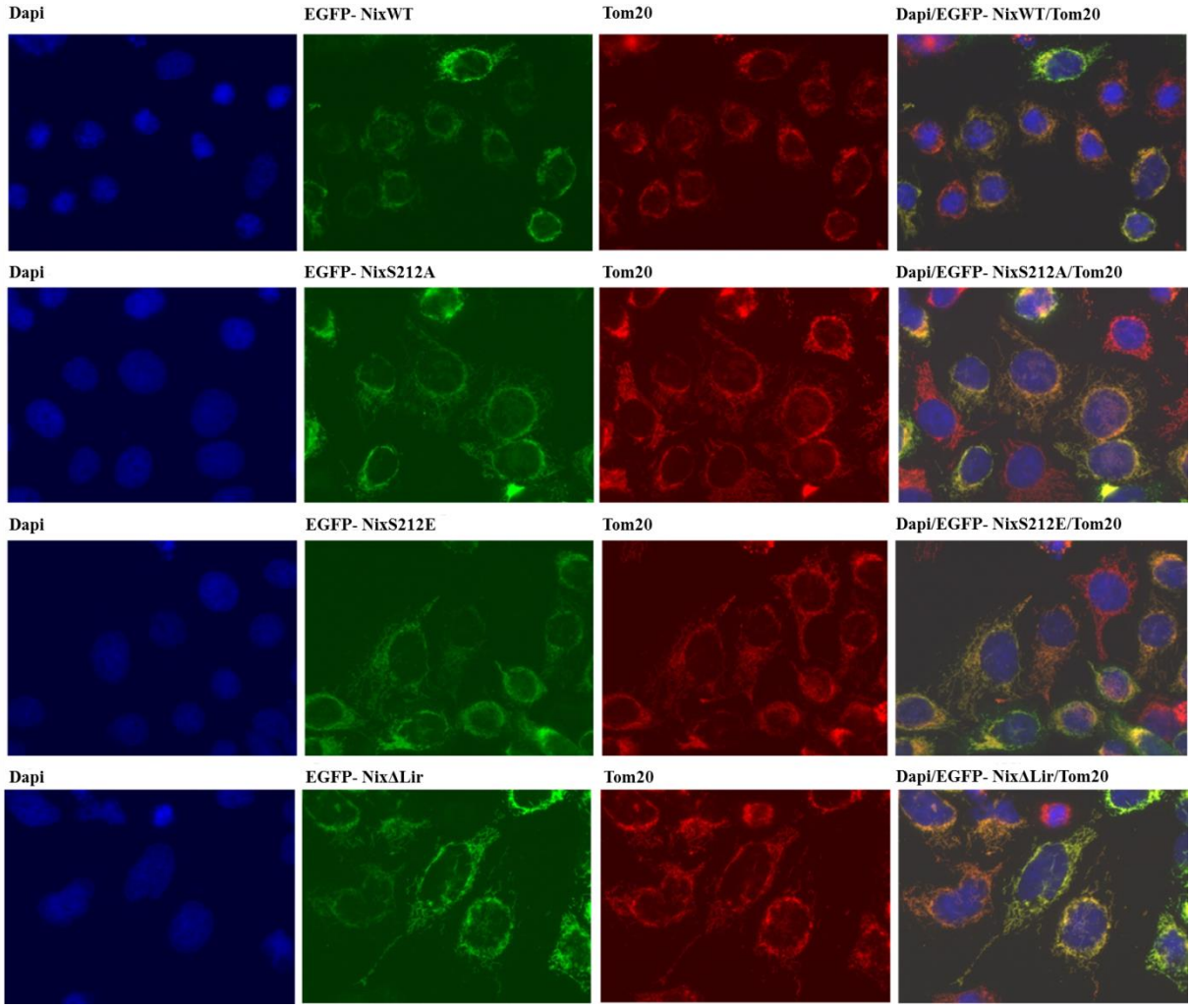
Konstrukt EGFP-NixS212E ostvaruje interakciju s autofagosomalnim proteinom LC3A. Slika 7. prikazuje konstrukt EGFP-NixS212E koji za razliku od ostalih testiranih konstrukata stvara samo monomere. Ovaj konstrukt ne može stvarati dimere te je zbog toga sav prisutan u signalu za monomer (u usporedbi s EGFP-Nix(WT i S212A)) što upućuje da mutacija serina S212E onemogućava dimerizaciju proteina Nix.

Konstrukt EGFP-Nix ΔLIR ne ostvaruje interakciju s autofagosomalnim proteinom LC3A te ga nije moguće detektirati na membrani kao što je već ranije pokazano (15). Međutim, u ovom eksperimentu ovaj konstrukt nije bio prisutan u ukupnom stanicnom lizatu na TCL- u (*total cell lysate*-ukupni stanični lizat) te ga zbog toga nije bilo moguće detektirati i provjeriti interakciju s LC3A.

Iz rezultata (slika 7.) vidljivo je da mutacije S212 ne utječu na vezanje Nix proteina i LC3A proteina *in vitro,* ali S212E mutacija utječe na stvaranje dimera proteina Nix upućujući da je za dimerizaciju potreban nefosforilirani serinski ostatak na poziciji S212.

4.2. Imunofluorescencijska detekcija kolokalizacije EGFP-Nix (WT, S212A, S212E i ΔLIR) i mitohondrijskog proteina Tom20

Imunofluorescencijska detekcija kolokalizacije proteina Nix i Tom20 se koristi kako bi se utvrdilo pravilno smještanje proteina EGFP-Nix (WT, S212A, S212E i ΔLIR) na mitohondrijskoj membrani u stanici. HeLa stanice su transfecirane proteinom EGFP-Nix (WT, S212A, S212E, ΔLIR) te su preparati snimljeni epifluorescentnim mikroskopom. Svi konstrukti EGFP-Nix (WT, S212A, S212E i ΔLIR) lokalizirani su na vanjskoj mitohondrijskoj membrani što upućuje da proučavane serinske mutacije i ΔLIR ne mijenjaju njegovu mitohondrijsku lokalizaciju.



Slika 8. Plavo (Dapi) obojane su jezgre stanica, zeleno je označen protein EGFP-Nix(WT, S212A,S212E i ΔLIR), a crveno protein Tom20. Narančasti i žuti signal pokazuju kolokalizaciju konstrukata EGFP-Nix(WT, S212A,S212E i ΔLIR) i Tom20.

4.3. Imunofluorescencijska detekcija regrutacije autofagosomalnog proteina LC3A na mitohondrije uslijed ekspresije razlicitih konstrukata proteina EGFP-Nix (WT, S212A, S212E i ΔLIR) kao pokazatelj aktivacije mitofagije

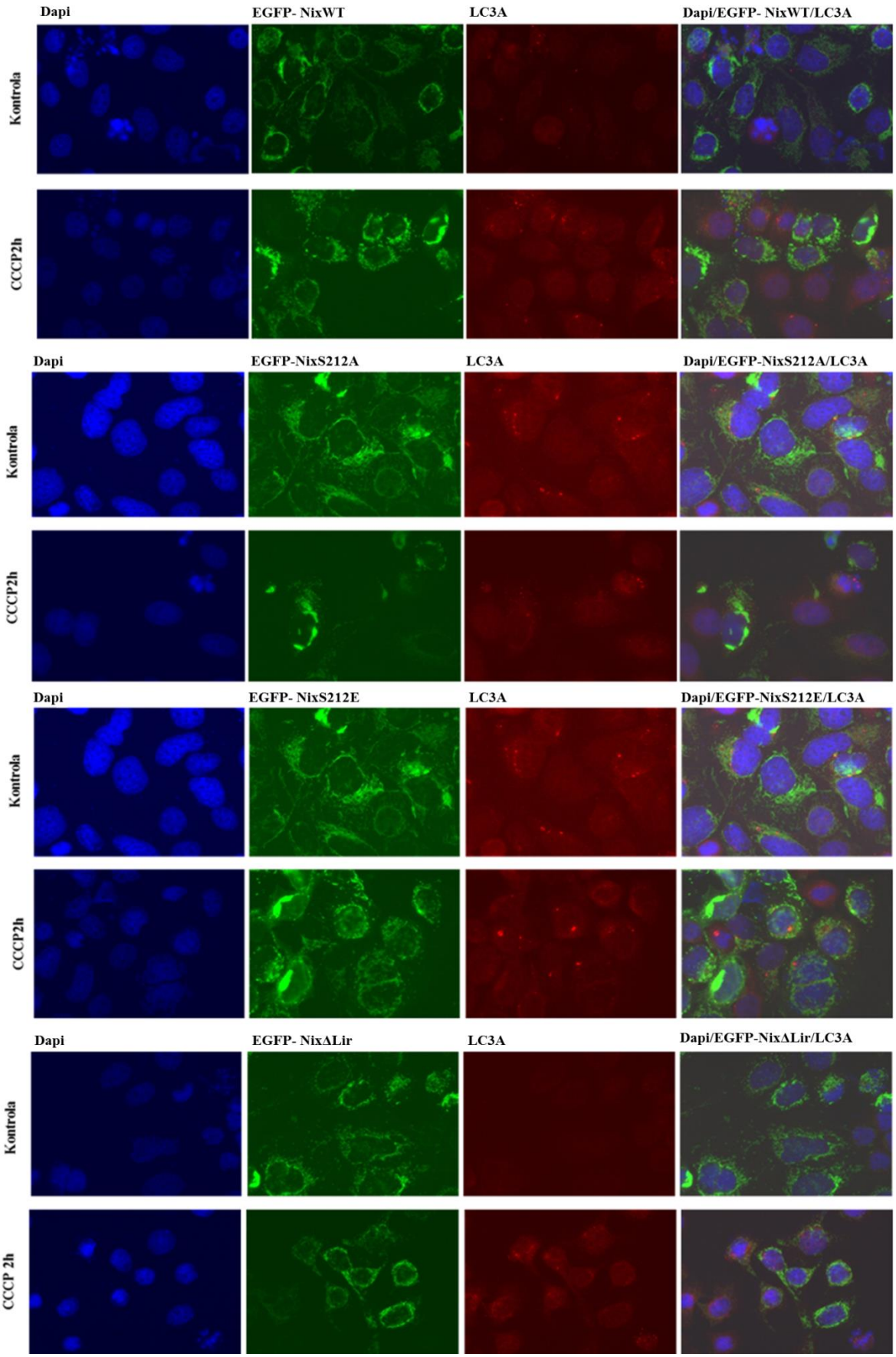
Imunofluorescencijska detekcije regrutacije autofagosomalnog proteina LC3A na mitohondrije uslijed ekspresije različitih konstrukata proteina EGFP-Nix (WT, S212A, S212E, ΔLIR) kao pokazatelja aktivacije mitofagije obavljena je uz tretman stanica s CCCP reagensom. CCCP je depolarizator mitohondrijske membrane i kao takav koristi se za indukciju mitofagije. Preparati bez CCCP reagensa upotrijebljeni su kao kontrola i služit će za usporedbu s rezultatima nakon dodatka CCCP reagensa. HeLa stanice su transfecirane plazmidnim vektorima EGFP-Nix (WT, S212A, S212E, ΔLIR) i preparati su snimljeni epifluorescentnim mikroskopom (Axioimager D1, Carl 165 Zeiss, Inc.) te su dobiveni slijedeći rezultati.

Kod konstrukta EGFP-NixWT u kontrolnim uzorcima mitofagija je slabo prisutna, dok nakon tretmana s CCCP reagensom vidimo da se broj autofagosoma povećao u odnosu na kontrolni uzorak te se može uočiti preklapanje crvenih signala proteina LC3A s zelenim signalima EGFP-NixWT. Rezultati su vidljivi na slici 9.

Kod konstrukta EGFP-NixS212A u kontrolnom uzorku prisutni su autofagosomi kao i u uzorku tretiranom s CCCP reagensom te se na slici 9. može uočiti preklapanje crvenih signala proteina LC3A i zelenih signala EGFP-NixS212A. Uspoređujući EGFP-NixWT i EGFP-NixS212A ne možemo uočiti neku značajniju razliku u jačini LC3A signala u stanicama tretiranima CCCP. Kod konstrukta EGFP-NixS212E crveni signali u uzorku tretiranom CCCP reagensom su veći i izraženiji što možemo prepisati grupiranju autofagosoma ili stvaranju većih autofagosoma. Na slici 9. može se uočiti preklapanje crvenih signala proteina LC3A s zelenim signalima EGFP-NixS212E.

Kod konstrukta EGFP-NixΔLIR u kontrolnom uzorku nemamo prisutne autofagosome dok su oni prisutni u uzorku tretiranom s CCCP reagensom. Na slici 9. je primjetno slabije

preklapanje crvenih signala LC3A sa zelenim signalima EGFP-NixΔLIR za razliku od gore navedenih konstrukata.



Slika 9. Plavo (Dapi) obojane su jezgre stanica, zeleno EGFP-Nix(WT, S212A,S212E i ΔLIR), a crveno protein LC3A.

5. RASPRAVA

U ovom diplomskom radu proučavana je potencijalna uloga fosforilacije serina na C-terminalnom kraju proteina Nix koja bi mogla utjecati na dimerizaciju proteina Nix. Do sad je pokazano kako je protein Nix važan u regulaciji uklanjanja mitohondrija putem mitofagije u stanicama sisavaca (15). Budući da su mitohondriji organeli važni za proizvodnju energije potrebne stanici za normalno funkcioniranje, treba naglasiti da je razumijevanje regulacije mitofagije od fundamentalne važnosti za stanicu. Hipoteza ovog diplomskog rada govori o mogućoj fosforilaciji C-terminalnog kraja proteina Nix koji je bogat aminokiselinama koje su mjesto moguće fosforilacije. Između ostalih, protein Nix na C- terminalnom kraju ima tri serina te svaki od tih serina može biti mjesto moguće fosforilacije. U svrhu boljeg razumijevanja ovih aminokiselina za početak smo u ovom diplomskom radu odabrali serin na poziciji 212 u humanom Nix proteinu.

Za potrebe eksperimenta su *in situ* mutagenezom napravljeni plazmidni vektori EGFP-Nix (WT, S212A, S212E i ΔLIR). Mutacije uvedene u konstrukte EGFP-Nix (S212A i S212E) su mutacije serina na položaju 212. aminokiselinskog slijeda humanog proteina Nix. Kod konstrukta EGFP-NixS212A, aminokiselina serin zamijenjena je sa aminokiselinom alanin. Alanin je neutralna aminokiselina koja se u stanici ne može fosforilirati te kao takva služi kao mutacija slična nefosforiliranom proteinu. Ako je fosforilacija serina na poziciji 212. važna za dimerizaciju proteina Nix onda bi ova mutacija trebala dovesti do nemogućnosti stvaranja dimera. Kod konstrukta EGFP-NixS212E serin je zamijenjen sa glutaminskom kiselinom. U stanici, serin fosforilacijom postaje negativno nabijen. Glutaminska kiselina je negativno nabijena aminokiselina te se ona u stanici ne fosforilira, ali se ova mutacija koristi kao zamjena za fosforilirani serin u strukturi proteina (naziva se još i fosfomimetička aminokiselina).

Divlji tip proteina Nix predstavlja pravi aminokiselinski slijed proteina Nix. Divlji tip proteina Nix u ovom eksperimentu je predstavljao kontrolu, odnosno upotrebljen je kao uzorak za usporedbu rezultata dobivenih imunodetekcijom na membrani i imunofluorescencijskim mikroskopom. Divlji tip proteina Nix u strukturi svoje C- terminalne domene nema mutacije.

Konstrukt EGFP-NixΔLIR upotrijebljen je također za usporedbu rezultata dobivenih imunodetekcijom na membrani. Budući da nema LIR regiju, ovaj konstrukt ne može ostvariti interakciju sa autofagosomalnim proteinom LC3A. Usporedbom rezultata za ovaj konstrukt i ostale konstrukte u eksperimentu moći ćemo utvrditi utječe li fosforilacija na C- terminalnom kraju proteina Nix na njegovu LIR regiju, odnosno dovodi li fosforilacija na ovoj poziciji do

mogućih konformacijskih promjena u strukturi proteina Nix, a koje bi dovele do inaktivnosti LIR regije i nemogućnosti vezivanja proteina LC3.

Rezultati imunodetekcije na membrani kod divljeg tipa proteina Nix pokazali su da on u stanici postoji u dimernoj i monomernoj formi. Također su pokazali da je monomer jače izražen u odnosu na dimer.

Kod konstrukta EGFP-NixS212A rezultati su pokazali da ovaj konstrukt u stanici postoji u dimernoj i monomernoj formi te da je monomerna forma jače izražena u odnosu na dimernu formu što se može vidjeti i kod divljeg tipa proteina Nix. Rezultati za konstrukt EGFP-NixS212E pokazuju da ovaj konstrukt u stanici postoji samo u obliku monomera. Kako je prisutan samo u monomernoj formi onda je zapravo sav protein na membrani sadržan u signalu za monomer te je zbog toga signal za monomer izraženiji i jači na membrani u odnosu na signale za monomer za divlji tip proteina Nix i EGFP- NixS212A. Uspoređujući jačinu signala dimera kod proteina EGFP-NixWT i EGFP-NixS212A može se uočiti mala razlika razlika u jačini signala u koristi EGFP-NixS212A konstrukta.

Konstrukt EGFP-NixΔLIR nije bio izražen u staničnom lizatu te ga nije bilo moguće detektirati iz istog.

Kako bi mogao ostvariti svoju funkciju receptora u mitofagiji protein Nix mora biti lokaliziran u vanjskoj membrani mitohondrija. Eliminacijom C- terminalne domene proteina Nix dolazi do njegove delokalizacije sa vanjske membrane mitohondrija u citosol (23). Kako se proučavane mutacije nalaze u C- terminalnom kraju proteina Nix provedena je imunofluorescencijska detekcija interakcije EGFP-Nix(WT, S212A, S212E i ΔLIR) i proteina Tom20 kako bi se utvrdila lokalizacija ovih konstrukata unutar stanice. Rezultati su pokazali da svi konstrukti lokaliziraju u mitohondrijskoj membrani te je potvrđeno da uvedene mutacije ne remete njegovo normalno smještanje u mitiohondrijskoj membrani.

Utvrđivanje lokalizacije proteina Nix bilo je potrebno kako bi se imunofluorescencijski mogla utvrditi interakcija EGFP-Nix (WT, S212A, S212E i ΔLIR) i autofagosomalnog proteina LC3A. Imunofluorescencijskom detekcijom nastojala se utvrditi interakcija unutar same stanice te zapravo vidjeti za svaki konstrukt posebno koliko će ta interakcija biti jaka i intezivna. Dosad je utvrđeno da dimerna forma proteina Nix može aktivirati mitofagiju i dovesti do navođenja autofagosoma na oštećeni mitohondrij (16). Ta činjenica ovdje je iskorištena kako bi se utvrdila preklapanja zelenog obojenja od svakog konstrukta proteina Nix i crvenih signala koji su predstavljali LC3A. Također važno je bilo

vidjeti za svaki konstrukt posebno postoji li veći odnosno manji broj crvenih signala. Ovaj dio eksperimenta proveden je zapravo s dvostrukom kontrolom. Jedna kontrola je ponovno bio divlji tip proteina Nix, dok je druga kontrola bio uzorak svakog konstrukta prije i nakon dodatka CCCP reagensa. CCCP reagens služi kao induktor mitofagije budući da dovodi do deploarizacije mitohondrijske membrane.

Rezultati imunofluorescencijske detekcije interakcije divljeg tipa proteina Nix i autofagosomalnog proteina LC3A ukazuju na niski stupanj mitofagije prije dodatka CCCP reagensa. Ovakav rezultat i ne čudi budući da su stanični mitohondriji netaknuti i „zdravi“ i nije ih potrebno autofagocitirati. Međutim, tretmanom uzorka s CCCP reagensom dolazi do oštećenja mitohondrija te dolazi do njihove mitofagije. Važno je naglasiti da je i ovdje imamo zapravo nizak stupanj mitofagije budući da na preparatu možemo vidjeti pokoji crveni signal LC3A u interakciji sa zelenim signalima divljeg tipa proteina Nix.

Kod konstrukta EGFP-NixS212A može se vidjeti da u uzorku prije tretmana sa CCCP reagensom stupanj mitofagije je nizak. Dodatkom CCCP reagensa taj stupanj se povećava te se može vidjeti da je broj crvenih signala koji predstavljaju LC3A nešto veći. Uspoređujući ove rezultate sa rezultatima dobivenima za divlji tip proteina Nix možemo reći da ne postoji neka značajnija razlika u intenzitetu i broju crvenih signala. Ovo se može gledati i kao potvrda rezultata dobivenih imunodetekcijom na membrani u kojima također nije uočena neka veća razlika u jačini signala za dimernu formu između konstrukta EGFP-NixS212A i divljeg tipa proteina Nix.

Konstrukt EGFP-NixS212E prije tretmana CCCP reagensom pokazuje veći stupanj autofagije u odnosu na EGFP-NixS212A i divlji tip proteina Nix. Nakon tretmana uzorka sa CCCP reagensom može se vidjeti da su crveni signali intenzivniji i veći u odnosu na EGFP-NixS212A i divlji tip proteina Nix. Veći signali moguća su posljedica grupiranja autofagosoma na određenom mjestu.

Konstrukt EGFP-NixΔLIR pokazuje odsutnost autofagosoma prije tretiranja s CCCP reagensom. Nakon tretiranja uzorka s CCCP reagensom pojavljuje se određen broj autofagosoma, no njihovo preklapanje s EGFP-NixΔLIR je slabo. Ovakav rezultat ukazuje na činjenicu koja je već otprije poznata (15), a to je da je LIR domena važna za interakciju sa LC3A i ako postoji mutacija u ovoj domeni onda se ta interakcija ne može ostvariti i autofagosom ne može biti usmjeren na mitohondrij.

Kada rezultate imunodetekcije na membrani dobivene za konstrukte EGFP-Nix (WT, S212A i S212E) stavimo u jedan širi kontekst može se vidjeti da fosforilacija na poziciji 212 utječe na dimerizaciju proteina Nix. Kod konstrukta EGFP-NixS212E ne dolazi do stvaranja dimera. Budući da glutaminska kiselina ima na sebi negativan naboj, najvjerojatnije prilikom dimerizacije dolazi do odbijanja negativnih naboja na ovoj poziciji i posljedično tome nemogućnosti dimerizacije. Ovu tvrdnju može potvrditi i rezultat dobiven za EGFP-NixS212A kod kojeg su nastali dimeri. Budući da je alanin hidrofobna i neutralna kiselina, njegova prisutnost na ovoj poziciji u proteinu Nix ne dovodi do nemogućnosti stvaranja dimera. Međutim rezultati dobiveni za ova dva konstrukta ne znače da na ovoj poziciji ne dolazi do fosforilacije nego upućuje na mogućnost da je fosforilacija na serinu na poziciji 212 bitna za inhibiciju aktivnosti proteina Nix kao receptora. Prema dobivenim rezultatima moglo bi se zaključiti da je protein Nix najvjerojatnije fosforiliran na poziciji 212 cijelo vrijeme dok je protein Nix inaktivan u stanici. Rezultati također upućuju na mogućnost da je za aktiviranje proteina Nix kao receptora potrebna fosforilacija serina na poziciji 214. i 216. dok bi se istovremeno trebao defosforilirati serin na poziciji 212.

Rezultati imunofluorescencijeske detekcije kolokalizacije konstrukata EGFP-Nix (WT, S212A, S212E i ΔLIR) i mitohondrijskog proteina LC3A pokazuju da su svi konstrukti lokalizirani na vanjskoj mitohondrijskoj membrani. Rezultati su također pokazali da mutacija serina na poziciji S212 ne dovodi do konformacijskih promjena u strukturi EGFP-Nix(S212A i S212E) te da im je lokalizacijom na mitohondrijskoj membrani očuvana aktivnost kao receptora u mitofagiji.

Eksperiment u ovom diplomskom radu proveden je samo jedanput te rezultati koji su dobiveni ne mogu se uzeti sa stopostotnom pouzdanošću. Za dobivanje čvrstih dokaza potrebno je provesti ovaj eksperiment najmanje tri puta te onda izvršiti procjenu tih rezultata. Također bi trebalo kod imunodetekcije na membrani izvršiti kvantifikaciju signala kompjuterski za svaki signal dobiven na membrani. Za točno utvrđivanje inteziteta mitofagije kod interakcije EGFP-Nix(WT, S212A, S212E, ΔLIR) i LC3A potrebno je također tri puta provesti eksperiment i provesti brojanje autofagosoma na minimalno sto stanica ili uključiti dodatne eksperimente koji bi omogućili bolju kvantifikaciju kao što je npr. protočna

citometrija. Eksperiment ponovljen na ovaj način dao bi rezultate koji bi imali visoku pouzdanost.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem eksperimentalno dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Konstrukti EGFP-Nix (WT, S212A i S212E) ostvaruju interakciju s autofagososmalnim proteinom LC3A, dok je konstrukt EGFP-NixΔLIR ne ostvaruje.
2. Konstrukti EGFP-Nix (WT, S212A) prisutni su u stanici u dimernoj i monomernoj formi, dok je EGFP-NixS212E prisutan samo kao monomer u stanici.
3. Mutacija serina u glutaminsku kiselinu dovodi do nemogućnosti stvaranja dimera.
4. Zamjenom aminokiseline serina sa alaninom ne dolazi do izostanka stvaranja dimera.
5. Imunofluorescencijskom detekcijom kolokalizacije proteina Nix s proteinom Tom20 utvrđeno je da su konstrukti EGFPNix(WT, S212A, S212E i ΔLIR) lokalizirani u vanjskoj mitohondrijskoj membrani.
6. Imunofluorescencijskom detekcijom regrutacije autofagosomalnog proteina LC3A na mitohondrije, pod utjecajem ekspresije konstrukata EGFP-Nix(WT, S212A, S212E), dolazi do stvaranja i kolokalizacije autofagosoma na mitohondrije kod svih konstrukta.
7. Iz svega gore navedenog može se zaključiti da je za funkcioniranje proteina Nix kao receptora mitofagije potrebna dimerizacija koja je vjerojatno regulirana fosforilacijom i defosforilacijom serina na njegovom C-terminalnom kraju.
8. Iz svega navedenog može se zaključiti da bi trebalo sprovesti daljna istraživanja na ovu temu u svrhu otkrivanja točnog mehanizma fosforilacije kod proteina Nix te utvrđivanja koji od serina na poziciji 214. i 216. se fosforilira i dovodi do dimerizacije, budući da fosforilacija na poziciji 212. dovodi do nemogućnosti stvaranja dimera.

7. LITERATURA

1. Yau, R., Rape, M. (2016.) The increasing complexity of the ubiquitin code. Nature Cell Biology 18, 579–586

2. Myung, J., Kyung, B. K., and Craig M. (2001). The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Proteasome Inhibitors. Med Res Rev.: 245–273

3. Rahimi, N. The Ubiquitin-Proteasome System Meets Angiogenesis (2012.). Mol Cancer Ther; 538–48..

4. Reggiori, F., Komatsu, M., Finley, K. and Simonsen A. (2012.). Autophagy: More Than a Nonselective Pathway. International Journal of Cell Biology, Article ID 219625

5. Yuan, Xi-Ming, Sultana, N., Siraj, N., Ward, L. J., Ghafouri, B. and Li,W. (2016.). Autophagy Induction Protects Against 7-Oxysterol-induced Cell Death via Lysosomal Pathway and Oxidative Stress. J Cell Death.: 1–7.

6. Glick, D., Barth, S. and Macleod, K. F. (2010.). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. J Pathol.: 3–12.

7. Abounit, K., Scarabelli, T.M. and McCauley, R.B. (2012.). Autophagy in mammalian cells. World J Biol Chem.; 1–6.

8. Fei, B., Ji, F., Chen, X., Liu, Z., Li, S., Mo, Z. and Fang, X. (2016.). Expression and clinical significance of Beclin-1 in gastric cancer tissues of various clinical stages. Oncol Lett.: 2271–2277.

9. Lamb, C. A., Yoshimori, T. and Tooze, S.A. (2013.). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. Nature Reviews Molecular Cell Biology 14, 759–774

10. Badadani, M.. Autophagy Mechanism, Regulation, Functions, and Disorders. (2012). ISRN Cell Biology Volume 2012, Article ID 927064

11. Maryam Mehrpour, Joëlle Botti, Patrice Codogno.(2011). Mechanisms and regulation of autophagy in mammalian cells; Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology

12. Franka, M., Duvezin-Caubeta, S., Koobd, S., Occhipintid, A., Jagasiaf, R., Petcherskig, A., Ruonalag, M. O., Priaultb, M., Salinb, B., Reichertd, A. S. (2012.). Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. Volume 1823, Issue 12, December 2012, Pages 2297–2310

13. Song, Y., Ding, W., Xiao, Y. and Lu, Kong-jun.(2015.) The Progress of Mitophagy and Related Pathogenic Mechanisms of the Neurodegenerative Diseases and Tumor. Neurosci J. 2015; 2015: 543758.

14. Tolkovsky, A. M. (2009). Mitophagy. Biochimica et Biophysica Acta 1793; 1508–1515

15. 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. and Dikic, I. (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance EMBO Rep.: 45–51.

16. Novak, I. (2012.). Mitophagy: Acomplex Mechanism of Mitochondrial Removal. Antioxid Redox Signal. :794-802.

17. Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S.K., Schumacher, A., Prchal, J.T., Chen, M., Wang, J. (2008). Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. Nature 454: 232–235.

18. Zhang, J. and Ney, P.A. (2009). Role of BNIP3 and Nix in cell death, autophagy and mitophagy. Cell Death Differ.: 939–946.

19. Yasuda, M., Han, JW., Dionne, CA., Boyd, JM., Chinnadurai, G. (1999.). BNIP3alpha: a human homolog of mitochondrial proapoptotic protein BNIP3.. Cancer Res.:533-7.

20. Dorn, GW. 2nd. (2011.). Nix Nought Nothing: Fairy Tale or Real Deal, II. J Mol Cell Cardiol.: 497–500

21. Diwan, A., Matkovich, S.J., Yuan, Q., Zhao, W., Yatani, A., Brown, J.H., Molkentin, J.D., Kranias, E.G., and Dorn, G.W., II. (2009). Endoplasmic reticulum–mitochondria crosstalk in NIX-mediated murine cell death. J Clin Invest.: 203–212.

22. Ding, Wen-Xing and Yin, Xiao-Ming (2012). Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. Biol Chem.: 547–564.

23. Chen, Cizeau, J., Vande Velde, C., Park, J.H., Bozek, G., Bolton, J., Shi, L., Dubik, D., and Greenberg, A.. Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. J. Biol.Chem. 274:7-10.

24. Zhu, N., Maßen, S., Terenzio, M., Lang, V., Chen-Lindner, S., Eils, l., Novak, I., Dikic, I., Hamacher-Brady, A., and Brady, N.R. (2013.). Modulation of serines 17 and 24 in the LC3- interacting region of BNIP3 determines pro-survival mitophagy vs. Apoptosis. J Biol Chem.: 1099–1113.

25. Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. (2009). A role for ubiquitin in selective autophagy. Mol Cell. :259-69.

26. Kim, T. K. and Eberwine, J.H. (2010.). Mammalian cell transfection: the present and the future. Anal Bioanal Chem.: 3173–3178.

27. https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/phosphorylation.html, pristupljeno 20.06.2016.

28. https://www.mdcberlin.de/10987285/en/research/research_teams/proteomics_and_molecular_mechanisms_of_neurodegenerative_diseases/research/research2, pristupljeno 20.06.2016.

29. Ambrović-Ristov, A. (2007). Metode u molekularnoj biologiji

8. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi da li fosforilacija serinskog ostataka S212 na C-terminalnom kraju mitohondrijskog proteina Nix utječe na njegovu funkciju s naglaskom na stvaranje njegovih dimera. U tu svrhu, upotrebom mutanata proteina Nix, S212A i S212E, cilj je odrediti važnost serina 212 za lokalizaciju proteina Nix u mitohondriju i njegovu funkciju receptora mitofagije analizom njegove interakcije s autofagosomalnim proteinom LC3A.

MATERIJAL I METODE

Za potrebe eksperimenta upotrebljeni su konstrukti EGFP-Nix (WT, S212A, S212E i ΔLIR) koji su dobiveni unošenjem i umnažanjem u bakterijskim stanicama *E.coli*. Izoliranim plazmidnim DNA vektorima transfecirane su HEK 293 i HeLa stanice. GST Pull down metodom određena je interakcija EGFP-Nix proteinskih mutanata s autofagijskim proteinom LC3A koji je bio vezan za glutation sefarozne kuglice. HeLa stanice su transfecirane istim DNA konstruktima kako bi se napravila analiza imunofluorescencijskim mikroskopom. Imunofluorescencijskom mikroskopijom promatrana je kolokalizacija EGFP-Nix (WT, S212A, S212E i ΔLIR) i proteina vanjske mitohondrijske membrane Tom20. Imunofluorescencijska mikroskopija upotrebljena je i za promatranje kolokalizacije i regrutacije autofagosomalnog proteina LC3A i EGFP-Nix (WT, S212A, S212E i ΔLIR) kao markera aktivacije mitofagije.

REZULTATI

Rezultati eksperimenta su pokazali da su konstrukti EGFP-Nix (WT i S212A) prisutni na mitohondrijskoj membrani u obliku monomera i dimera. Kod konstrukta EGFP-Nix S212E prisutan je samo monomer dok dimera nema. Nadalje, pokazano je da mutacija S212E u proteinu Nix utječe na aktivaciju mitofagije te ukazuje da je za taj proces potrebno stvaranje dimera proteina Nix.

ZAKLJUČAK

Prema dobivenim rezultatima eksperimenata, može se zaključiti da bi trebalo sprovesti daljna istraživanja na ovu temu u svrhu otkrivanja točnog mehanizma fosforilacije kod proteina Nix te utvrđivanja koja kombinacija serina na C- terminalnom kraju proteina Nix je bitna za njegovu dimerizaciju. Također bi trebalo sprovesti istraživanja s ciljem otkrivanja koji je od serina na poziciji 214. i 216. na C- terminalnom kraju proteina Nix ključan za mehanizam fosforilacije i stvaranje dimera, budući da fosforilacija na poziciji 212 dovodi do nemogućnosti stvaranja dimera.

9. SUMMARY

OBJECTIVES

The objective of this research was to determinate how the phosphorylation of serin residue S212 on the C- terminal end of mitochondrial protein Nix affects its possibility to create dimers and therefore its function as a mitophagy receptor. The mutant forms of Nix, S212A and S212E, were used to determine the importance of serine S212 on Nix mitochondrial localization and its function as a mitophagy receptor by analyzing its interaction with autophagosomal protein LC3A.

MATERIAL AND METHODS

For the purpose of this experiment, EGFP-Nix (WT, S212A, S212E i ΔLIR) plasmid constructs were introduced and then multiplied in *E. coli* bacterial cell. HEK293 and HeLa cells were then transfected with isolated plasmid DNA vectors. The interaction of EGFP- Nix protein mutants with autophagosomal protein LC3A was determinated with GST Pull down method. For immunofluorescent microscopy analysis HeLa cells were transfected with the same DNA constructs. Colocalization of EGFP-Nix (WT, S212A, S212E i ΔLIR) and outer mitochondrial membrane protein Tom20 was observed with immunofluorescent microscopy. Immunofluorescent microscopy was also used to observe recruitment and colocalization of autophagosomal protein LC3A to mitochondria.

RESULTS

The experimental results showed that EGFP-Nix (WT, S212A) constructs are present on mitochondrial membrane in form of monomers and dimers. This constructs showed stronger signal for monomers than signal for dimers. Construct EGFP-NixS212E only forms the monomers. Further, S212E mutation in Nix seems to be important for dimerization status of Nix protein and therefore directly influences its function as mitophagy receptor.

CONCLUSION

For the purpose of revealing the exact mechanism of Nix phosphorylation on C-terminal end, the further research will need to be performed in order to define which combination of serines is important for Nix dimerization. It is also important to discover which serines on positions 214. and 216. has a key role in Nix dimerization, beacuse phosphorylation on position 212. disables dimerization.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezim: Antonio Ledić

Adresa: Kralja Tomislava 15, 22000 Šibenik

Elektronička pošta: antonioledic@live.com

Državljanstvo: hrvatsko

Datum, država i mjesto rođenja: 12.09.1992., Republika Hrvatska, Split

OBRAZOVANJE:

1999.- 2001. Osnovna škola Plokite, Split

2001.- 2007. Osnovna škola Fausta Vrančića, Šibenik

2007.- 2011. Medicinska i kemijska škola Šibenik, smjer farmaceutski tehničar

2011.- 2016. Studij Farmacije na Kemijsko- tehnološkom i Medicinskom fakultetu, Split