Zaštitna uloga proteina iz tardigrada protiv oštećenja DNA

Miškec, Karlo

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:268491

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ZAŠTITNA ULOGA PROTEINA IZ TARDIGRADA PROTIV OŠTEĆENJA DNA

PROTECTIVE ROLE OF TARDIGRADE PROTEINS AGAINST DNA DAMAGE

SEMINARSKI RAD

Karlo Miškec
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Zagreb, 2017.

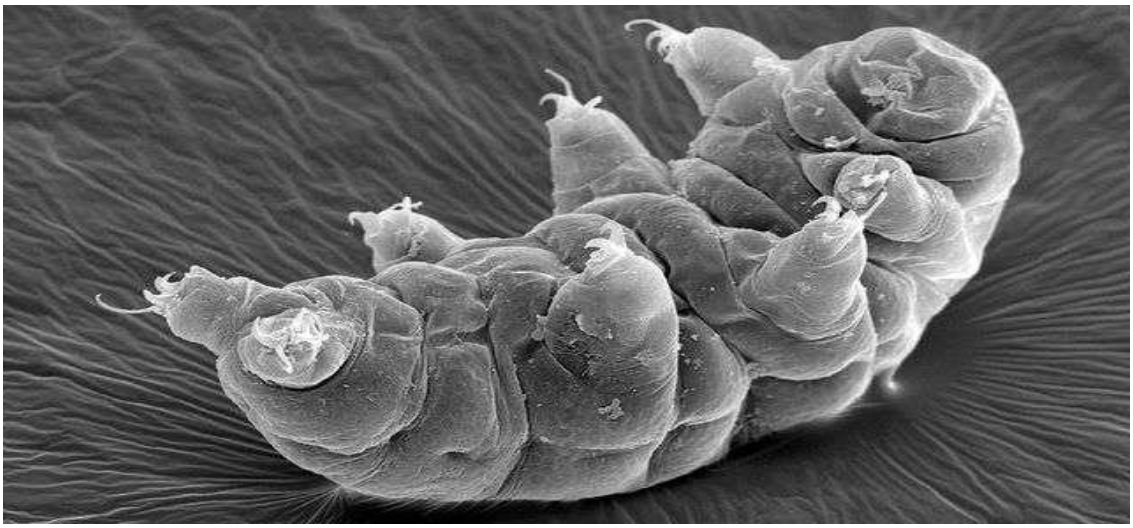
SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. EKSTREMOTOLERANTNE VRSTE TARDIGRADA: *Ramazzottius varieornatus* 3
2.1. SEKVENCIRANJE GENOMA *R. varieornatus* 3
2.2. USPOREDBA GENOMA *R. varieornatus* i *H. dujardini* 5
3. VAŽNI METABOLIČKI I SIGNALNI PUTEVI *R. varieornatus* 7
3.1. ß-OKSIDACIJA MASNIH KISELINA 7
3.2. SIGNALNI PUT PI3K/AKT/mTOR 8
4. DJELOVANJE PROTEINA TARDIGRADA NA RADIOTOLERANCIJU HUMANE STANIČNE KULTURE 11
4.1. UTJECAJ X-ZRAKA NA MOLEKULU DNA 11
4.2. IZOLACIJA I DETEKCIJA RADIOTOLERANTNOG PROTEINA 13
4.3. GRAĐA PROTEINA Dsup 14
4.4. EKSPRESIJA PROTEINA Dsup U STANICAMA HEK293 I SUPRESIJA OŠTEĆENJA 15
4.5. UTJECAJ PROTEINA Dsup NA VIJABILNOST STANICA HEK293 17
5. LITERATURA 20
6. SAŽETAK 24
7. SUMMARY 25

1. UVOD

Tardigrade ili vodeni medvjedići (slika 1) su maleni bilateralno simetrični, većinom vodeni, beskralježnjaci veličine 0.1 mm - 1.2 mm sa četiri para nogu. Građeni su od 5 segmenta, 1 segment glave i 4 segmenta trupa iz kojih izlazi po jedan par nogu (Hashimoto & Kunieda 2017). Nemaju specifično mjesto obitavanja te se mogu pronaći bilo gdje na svijetu uključujući i vrhove planina, duboka mora, tropske kišne šume i Antarktiku, a opisano je preko 1200 vrsta. Prvi puta ih je opisao J.A.E. Goeze 1973., dok im je naziv tardigrada dodijelio Lazzaro Spallanzani 1976. (http://serc.carleton.edu/microbelife/index.html). Tardigrade obuhvaćaju vlastito koljeno dugoživaca (*Tardigrada)* i zajedno sa koljenima *Arthropoda* i *Nematoda* pripadaju podcarstvu *Ecdysozoa* (Boothby i sur. 2016). Zbog svoje građe i osobina kojima graniče između člankonožaca i oblića, često se koriste kao evolucijski model razvojnih mehanizama. Dijele se na tri razreda: *Eutardigrada, Mesotardigrada,* i *Heterotardigrada* (Miller 1997). Iako su vodene životinje, uspješno mogu preživjeti uvjete bez vode kao i neke ekstremne uvjete u kojima se uobičajeno ne javlja život. Preživljavaju na temperaturama od -272°C do 151°C (Rahm 1921), intenzivnim zračenjima koja npr. ne mogu preživjeti ljudi (Horikawa i sur. 2013), u organskim otapalima (Ramløv & Westh 2001) i pri velikom pritisku (Jönsson i sur. 2008). Kada uđu u okoliš gdje vladaju nepovoljni uvjeti rasta, smanje volumen tijela gubitkom vode te ulaze u kontrahirano dehidrirano stanje anhidrobioze (Hashimoto i sur. 2016). Također mogu ući u stanje kriobioze (niska temperatura), osmobioze (visoka razina soli) i anoksibioze (niska razina kisika), no najčešća je anhidrobioza gdje tardigrade formiraju „stakleni omotač“ oko sebe koji ih čuva od suše. U dodiru sa vodom, stakleni omotač se otopi, a 2015. godine otkriveno je da je stakleni omotač pod kontrolom određenih gena (http://serc.carleton.edu/microbelife/index.html). Dokazano je da 3% populacije *Milnesium tardigradum* može u takvom anhidrobiotičkom stanju nakon tretiranja sa 7577 kJ/m^2 UV radijacije preživjeti čak 10 dana ekspozicije u niskoj Zemljinoj orbiti (Horikawa i sur. 2013). Jedno od potencijalnih objašnjenja je da se u takvom dehidriranom stanju smanjuje djelovanje oštećenja zračenjem pošto se 2/3 oštećenja javlja zbog hidroksilnih radikala koji nastaju iz ozračenih molekula vode (Hashimoto & Kunieda 2017). Pretpostavlja se da je razlog intenzivne otpornosti tardigrada na stresne uvjete zbog horizontalnog prijenosa gena iz okoliša (*engl.* HGT). Otkriveno je da je čak 17.5% ukupnog genoma *Hypsibius dujardini* stranog porijekla iz gljiva, biljka, arheja, metazoa, bakterija, virusa i nedefiniranog porijekla (Hashimoto i sur. 2016, Boothby i sur. 2016). Prije tog otkrića smatralo se da skupina *Rotifera* ima najveću

vjerojatnost HGT-a od 9.6%, no sekvenciranjem genoma tardigrada, oni su zauzeli prvo mjesto u toj kategoriji (Boothby i sur. 2016).

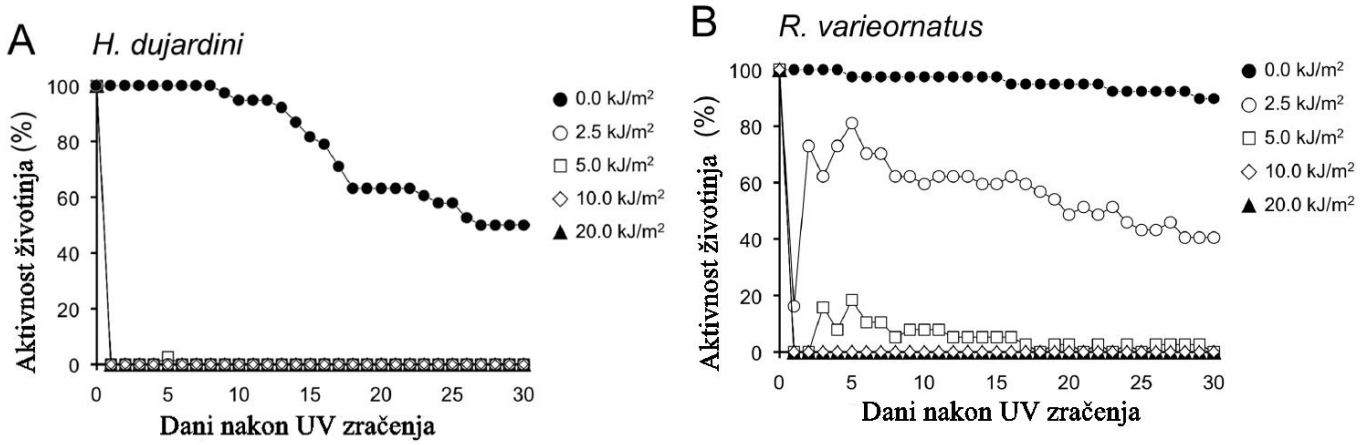


Slika 1. Skenirajuća elektronsko mikroskopska slika tardigrade položenog na dorzalnu stranu tijela. (Preuzeto sa: http://www.gettyimages.com/)

Bioinformatičkim analizama i molekularnim metodama, otkrilo se da *Hypsibius dujardini* ima 13.2% proteina stranog porijekla, a 47.6% proteina je dopunjeno sa barem jednim stranim proteinom. Od svih proteinskih domena koje su se translatirale sa gena dobivenih HGT-om, najbrojnije su katalaze IPR010582 i IPR011614. Katalaze su važni antioksidativni enzimi koji neutraliziraju stres u stanici uklanjajući vodikov peroksid. Smatra se da imaju važnu ulogu u otpornosti na stres u anhidrobiotičkom stanju tardigrada (Hashimoto i sur. 2016). Osim ovih proteina, tardigrade imaju povećanu ekspresiju Ku ß-bačva koje imaju ulogu u nehomolognom sparivanju krajeva tj. popravku dvolančanih lomova molekula DNA koji mogu nastati uslijed UV zračenja. Dio proteina Ku također je dobiven HGT-om. Pošto UV zračenja mogu biti letalna te vrlo često uzrokuju pojavu timinskih dimera i ciklobutanskih pirimidinskih dimera, što dodatno vodi prema mutacijama, povećana je razina nekoliko skupina proteina dobivenih HGT-om (Horikawa i sur. 2013). To su proteini poput proteina UmuC (uloga u translezijskoj sintezi), Ada (smanjuju stres uzrokovan alkilirajućim agensima), *recA* (popravak DNA i rekombinacija) i šaperona Hsp70 (zaštita od UV zračenja) (Boothby i sur. 2016). Smatra se da je razlog zašto tardigrade inkorporiraju veću količinu stranih gena u svoj genom njihova jako propusna membrana koja postaje sve propusnija kada se tardigrade rehidriraju nakon stresnih uvjeta. Time je omogućen unos većih makromolekula uključujući i DNA (Horikawa i sur. 2013).

2. EKSTREMOTOLERANTNE VRSTE TARDIGRADA: *Ramazzottius varieornatus*

Pošto su tardigrade organizmi otporni na DNA oštećenja uzrokovana stresom, istraživanja su se počela usmjeravati prema ideji kako bi se takvi proteini mogli koristiti za smanjivanje DNA oštećenja i povećanje radiotolerancije u ljudi. U svrhu toga su se sekvencirali genomi ekstremotolerantnih tardigrada koje pripadaju terestričkom rodu *Ramazzottius* iz razreda *Eutardigrada*. Iako se već sekvencirao genom vodene vrste *Hypsibius dujardini*, ta vrsta nije ekstremno otporna na stres. *R. varieornatus* je puno otporniji na UV oštećenja, ima svjetlosno-aktivirajući popravak DNA te veću stopu preživljenja (slika 2) i bolju reproduktivnu sposobnost nego *H. dujardini* (Horikawa i sur. 2013). Osim tih vrsta dokazano je da su i vrste *Milnesium tardigradum* i *Richtersius coronifer* otporne na određeni stupanj zračenja u dehidriranom stanju, ali nisu u hidriranom stanju kao i *R. varieornatus* (Hashimoto & Kunieda 2017).

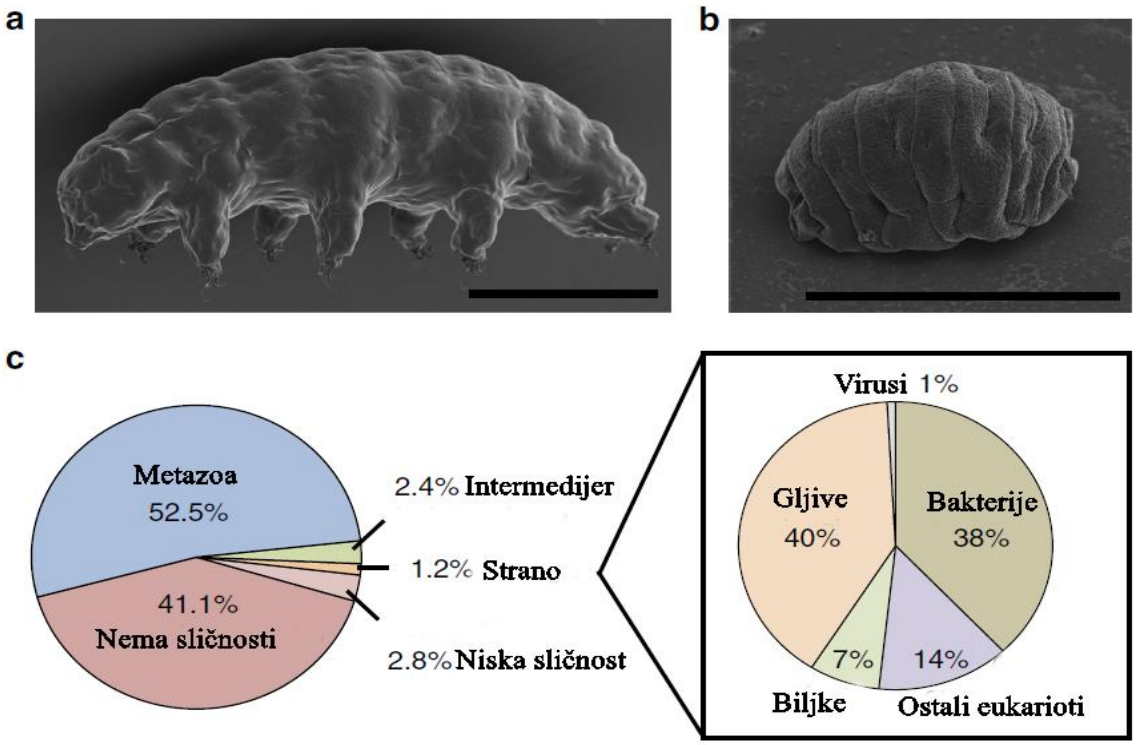


Slika 2. Usporedba aktivnosti hidriranih stanja dvaju vrsta tardigrada A) *H. djuradini* i B) *R. varieornatus* nakon zračenja različitih jačina u periodu inkubacije od 30 dana (Prilagođeno i preuzeto iz Horikawa i sur. 2013).

2.1. SEKVENCIRANJE GENOMA *R. varieornatus*

Da bi se mogao sekvencirati genom prethodno je potrebno sakupiti tardigrade iz okoliša. One se skupljaju vrlo jednostavnom metodom. Ukratko, metoda se bazira na sakupljanju životinja sa suhih ili vlažnih nakupina mahovina ili lišajeva koje se polažu u plitku posudu. Zatim se doda destilirana voda i mahovina se inkubira 3-24 h na sobnoj temperaturi. Nakraju se voda ukloni iz posude, a voda sa mahovine se sakupi i koristi za daljnju izolaciju tardigrada mikropipetom (https://serc.carleton.edu/microbelife/index.html). U svrhu sekvenciranja koristile su se tardigrade koje su bile tretirane antibiotikom i izgladnjivane 2 dana kako bi ušle

u svoje anhidrobiotičko stanje (slika 3). Genom *R. varieornatus* se odredio 2016. godine koristeći Sanger i Illumina metode. Veličina genoma određena je bojanjem propidij jodidom i protočnom citometrijom koristeći stanice *D. melanogaster* kao kvantifikacijsku referencu (Hashimoto i sur. 2016). Veličina genoma aproksimirana je na 55 Mpb što je upola manje od genoma *H. dujardini* (Yoshida i sur. 2017). Nakon identifikacije veličine genoma i važnih regija, odredio se udio HGT-a koristeći program BLAST. Rezultati su pokazali da u ovoj vrsti tardigrada HGT ima značajno manji udio od vrste *H. dujardini* (17.5%) te HGT iznosi između 1.2% i 1.8%. Većina HGT gena (61%) pripada eukariotima (slika 3) od kojih najveći udio zauzimaju gljive dok općenito najmanji udio nose virusi. Ukupno je detektirano 138 od 234 HGT gena koji se aktivno prepisuju, a u tu skupinu pripadaju stres tolerantni geni koji kodiraju za proteine poput katalaza (Hashimoto i sur. 2016). Katalaze se svrstavaju u 3 klade (I, II i II) te sve metazoanske katalaze pripadaju skupini III (Klotz & Loewen 2003) no na temelju filogenetske analize katalaza iz tardigrada, smatra se da njihove katalaze pripadaju skupini II (Hashimoto i sur. 2016).



Slika 3. (a) Elektronsko mikroskopska snimka *R. varieornatus* u svojem hidriranom stanju i u svojem dehidriranom stanju (b). Ljestvica veličine je 100 µm. (c) Graf udjela stranih i domaćih gena u vrsti *R. varieornatus* (Prilagođeno i preuzeto iz Hashimoto i sur. 2016).

2.2. USPOREDBA GENOMA *R. varieornatus* i *H. dujardini*

Analizom genoma tardigrada *R. varieornatus* i *H. dujardini* otkrivene su razlike u ekspresiji sa stresom povezanih proteina te same građe genoma. *R. varieornatus* ima visoki udio pojedinačnih lokusa egzona koji se ne javljaju u *H. dujardini*, ali ova vrsta ima više vrsno-specifičnih gena, duplikacija gena i veći udio HGT-a od *R. varieornatus*. Obje vrste imaju specifične gene uključene u anhidrobiozu. U *R. varieornatus* povećana je razina gena i proteina CAHS (*engl.* cytosolic abundant heat soluble), RvLEAM (*engl.* late embryogenesis abundant protein mitochondrial), MAHS (*engl.* mitochondrial abundant heat soluble) i Dsup (*engl.* damage suppressor). Ulazak u anhidrobiozu je lakši kod ove vrste jer ne zahtijeva prekondicioniranje tj. prilagođavanje na kritične uvjete te se vrlo vjerojatno konstitutivno eksprimiraju geni što se dokazalo usporedbom ekspresije gena u hidriranom i dehidriranom stanju. Oba stanja su otprilike pokazala jednaku ekspresiju gena (Hashimoto i sur. 2016). Kod *H. dujardini* potrebna je aktivna transkripcija gena tokom prekondicioniranja što ukazuje na višu razinu regulacije ulaska u anhidrobiotičko stanje. Pretpostavlja se da važnu ulogu imaju transkripcijski faktori FoxO (*engl.* forkhead box O) (Yoshida i sur. 2017). FoxO su regulatori staničnog odgovora na stres i važni su u smanjivanju staničnog oksidativnog oštećenja. Stimuliraju transkripciju antioksidativnih proteina mitohondrija (superoksid dismutaza, peroksiredoksin) i peroksisoma (katalaza) te ekstracelularnih proteina (selenoprotein P i ceruloplazmin) u plazmi (Klotz i sur. 2015). FoxO se vjerojatno inhibira djelovanjem PPA1/2A (anorganska pirofosfataza) koja povećava letalnost u *H. dujardini* tokom indukcije anhidrobioze (Yoshida i sur. 2017).

Osim drugačije regulacije ulaska u anhidrobiotičko stanje, tardigrade pokazuju različitu prisutnost proteina koji smanjuju stres u stanici. *R. varieornatus* ima povećani udio dupliciranih gena sa kojih se translatiraju proteini superoksid dismutaza (SOD) i peroksiredoksin koji smanjuju pojavu oksidativnog stresa. Uz njih povećano je prisustvo mitohondrijskog šaperona BSC1, transkripcijskog faktora NFAT5 vezanog uz osmotski stres i apoptotičkih gena PARP. Suprotno tome, u *H. dujardini* je povećana ekspresija šaperona Hsp70, DnaK i DnaJ koji imaju ulogu u popravku krivo namotanih proteina. DnaJ se javlja i u *R. varieornatus*, ali pripada drugim proteinskim obiteljima. Također uočena je i razlika u proteinima koji imaju ulogu u popravku molekula DNA. U *H. dujardini* pronađeno je 5 kopija endonukleaze XPF koja ima ulogu u ekscizijskom popravku nukleotida dok je u *R. varieornatus* pronađeno 4 kopija MRE11 koji ima ulogu u popravku dvolančanog loma molekule DNA, koji se često javlja kod

tardigrada, i DNA ligaze IV važnu u putu popravka nehomolognim sparivanjem krajeva (Yoshida i sur. 2017, Hashimoto i sur. 2016).

3. VAŽNI METABOLIČKI I SIGNALNI PUTEVI *R. varieornatus*

3.1. ß-OKSIDACIJA MASNIH KISELINA

ß-oksidacija masnih kiselina je metabolički put katalize masnih kiselina koji se odvija u 2 stanična odjeljka, peroksisomu i mitohondriju. Oba puta su uključena u skraćivanju estera acil-CoA između C2 i C3 atoma sve do krajnjeg produkta, najkraćeg mogućeg acil-CoA i acetil-CoA odnosno propionil-CoA ovisno o tome ima li masna kiselina paran ili neparan broj C atoma (Poirier i sur. 2006). Ukratko, ß-oksidacija u peroksisomu obuhvaća nekoliko bitnih enzima. Acil-CoA oksidaza (ACOXs) je enzim koji koristi faktor FAD uz pomoću kojeg prenosi elektron sa acil-CoA direktno na molekulski kisik pri čemu se stvara vodikov peroksid i trans-enoil-CoA. Sljedeći korak je dobivanje 3-ketoacil-CoA uz pomoću enzima enoil-CoA hidrataze (PBE/DBP). Zadnji korak obuhvaća suradnju enzima 3-ketoacil-CoA tiolaze (ACAA1) i 2-metil-3-oksoacil-CoA (SCPX) kako bi nastali završni produkti, acil-CoA (- 2 C atoma) i acetil-CoA. Taj proces se nastavlja dok više nije moguće ponoviti ciklus, a ovisi o početnom broju C atoma (Jia i sur. 2003, Mannaerts i sur. 2000, Hashimoto i sur. 2016). U mitohondriju se događaju gotovo identični procesi koristeći slične enzime, a osnovna razlika ß-oksidacije mitohondrija i peroksisoma je u prvoj oksidaciji. U mitohondriju se elektroni prenose na molekulski kisik preko prenositelja u respiratornom lancu, a u peroksisomu prenose se direktno na molekulski kisik uz stvaranje vodikova peroksida kojeg dalje cijepa katalaza (Nelson & Cox 2013). Enzimi u mitohondrijskom putu su redom: acil-CoA dehidrogenaza (ACAD), enoil-CoA hidrataza (HADH) i 3-ketoacil-CoA tiolaza (ACAA2). Kod *R. varieornatus* dokazano je da nedostaju u potpunosti svi enzimi koji sudjeluju u putu katalize masnih kiselina u peroksisomu, uključujući i enzim trans-2-enoil-CoA-reduktazu (PECR) dok je mitohondrijski put aktivan zajedno s analogom enzima PECR, MECR, koji ima istu ulogu, a to je povratak trans-enoil-CoA u enoil-CoA. U tablici 1. prikazano je nekoliko enzima ostalih oksidativnih puteva peroksisoma koji nedostaju u *R. varieornatus.* Velika količina gena peroksisoma je inaktivna (Hashimoto i sur. 2016).

Tablica 1. Enzimi oksidativnih puteva peroksisoma koji nedostaju *R. varieornatus.*

Enzim	Oznaka	Reakcija
Alanin-glioksilat aminotransferaza	AGT1	alanin + glioksilat → piruvat + glicin
D-aminokiselinska oksidaza	DAO	glicin + O_2 → glioksilat + H_2O_2
Hidroksikiselinska oksidaza	HAO	glioksilat + O_2 → oksalat + H_2O_2
Urat oksidaza	URO	urat + O_2 → alantoin + H_2O_2

Napomena: Nazivi enzima i reakcije su preuzete iz mape 04146 KEGG puteva (http://www.genome.jp/kegg/pathway.html)

3.2. SIGNALNI PUT PI3K/AKT/mTOR

Signalni put PI3K/AKT/mTOR je unutarstanični put signalizacije koji ima važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa te se veže uz procese proliferacije, sinteze proteina i autofagije. mTOR (*engl.* mammalian target of rapamycin) je velika serin/treonin protein kinaza koja je uključena u translacijsku kontrolu ovog signalnog puta (Hoeffer & Klann 2010). Glavni inhibitor joj je rapamicin koji pripada makrolidima deriviranim iz bakterija (Kunz & Hall 1993). Građen je od nekoliko važnih dijelova. Na C-terminalnom kraju nalazi se kinazna katalitička domena koja je regulirana fosforilacijom. Mjesto gdje se može desiti fosforilacija zove se represorska domena koja je konzervirana u gotovo svim kinazama slične strukture. Također je važna i FKBP12-rapamicin vezajuća domena koja je zapravo mjesto vezanja rapamicina. On ometa formiranje proteinskih kompleksa mTOR zbog čega blokira signalne puteve. mTOR se dijeli na 2 multiproteinska kompleksa, mTORC1 i mTORC2 koji imaju različite supstrate, ali i građu (Hoeffer & Klann 2010). mTORC1 je osobito važan u regulaciji staničnog rasta i proliferacije preko proteinske sinteze (Dunlop & Tee 2009). Najosnovniji dijelovi kompleksa mTORC1 su mTOR, raptor (regulatorno asociran mTOR protein), deptor (represor kompleksa mTORC1) i MLST8 (protein asociran s proteinom mTOR) (Catena & Fanciulli 2017, Hoeffer & Klann 2010). Kompleks mTORC2 je drugi multiproteinski kompleks mTOR. Kao i kompleks mTORC1, sastoji se od kinaze mTOR, i proteina MLST8, a uz njih su još važni PRAS40, mSin1, protor i rictor (Peterson i sur. 2009). Glavna uloga ovog kompleksa je moduliranje staničnog preživljena kao odgovor na djelovanje faktora rasta fosforilacijom različitih efektora i kontrola aktina citoskeleta (Guertin & Sebatini 2007, Long i sur. 2005).

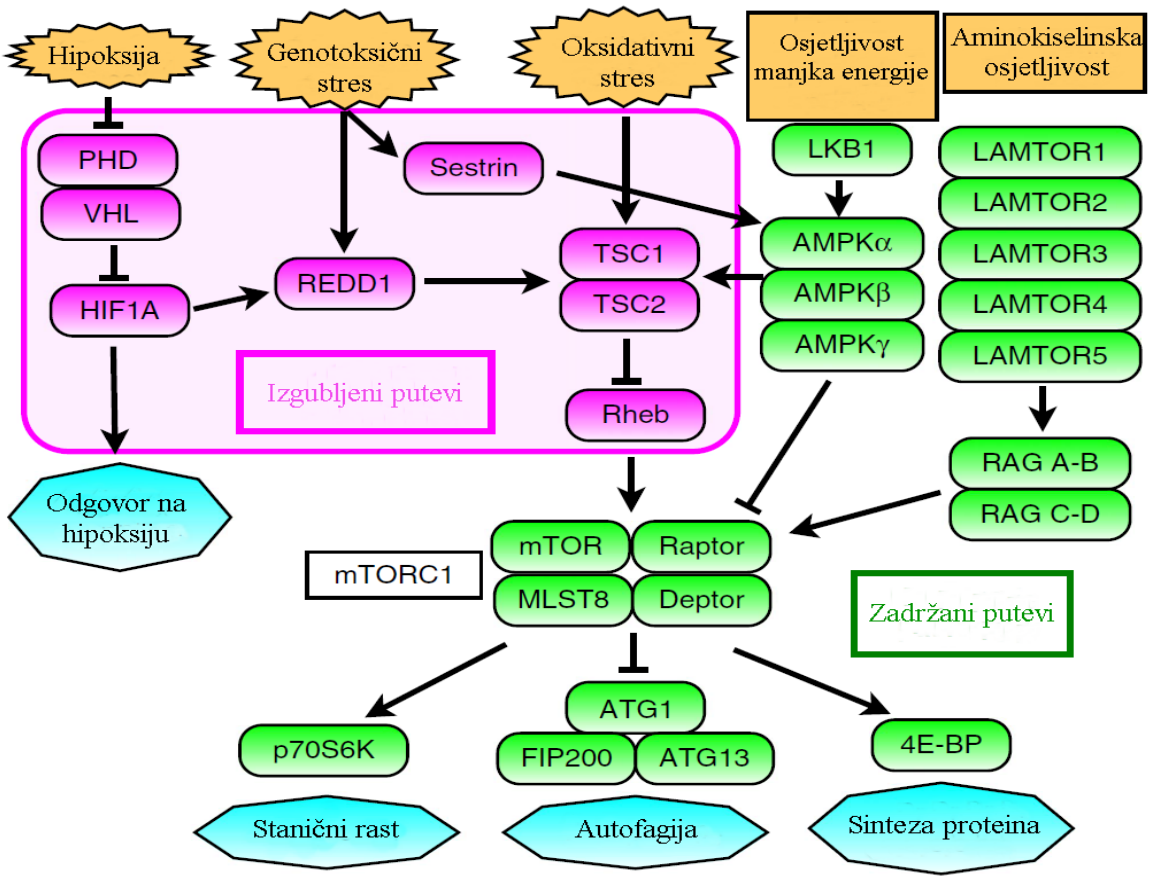
Kod *R. varieornatus* uočena je promijenjena regulacija kompleksa mTORC1. Kod tardigrada kompleks mTORC1 djeluje na stanični rast aktivacijom ribosomalne kinaze p70S6K, proteinsku sintezu aktivacijom 4E-BP koji veže eIF4E važan za inicijaciju translacije i inaktivaciju autofagije vezane uz glad inaktiviranjem proteinskog kompleksa ATG1, FIP200 i ATG13. Aktivnost mTORC1 se regulira na nekoliko načina. Prvi put regulacije je aktivacija povezane mreže signalnih puteva stresa poput hipoksije, genotoksičnog stresa i oksidativnog stresa što može inaktivirati kompleks mTORC1 (Hashimoto i sur. 2016).

Hipoksija je pojava kada tkivo počinje degenerirati iz bilo kojeg razloga zbog nedovoljne količine kisika. Hipoksija se dijeli na 4 osnovne vrste: hipoksična, anemična, stagnirajuća i histotoksična hipoksija (Cafaro 1960). Kisik je nužan za aktivnost eukariotskog organizma. Stanični odgovor na količinu kisika tokom razvoja je reguliran transkripcijskim faktorom HIF (hipoksija inducibilni faktor). Kada se taj faktor aktivira dolazi do hipoksijskog odgovora. HIF

se može inaktivirati djelovanjem dva faktora, a to su PHD (prolil-hidroksilazna domena enzima) i pVHL (von Hippel Lindau tumor supresor protein). U uvjetima normotoksije, HIF se hidroksilira na prolinima pomoću PHD-a. Nakon toga takav hidroksiliran HIF prepoznaje ubikvitin-ligaza kompleks pVHL koja usmjerava HIF prema proteasomu 26S za degradaciju (Greer i sur. 2012). Ukoliko faktor HIF ostaje aktivan, on dalje sudjeluje u aktivaciji faktora REDD1 koji se može i aktivirati preko faktora p53 u slučaju genotoksičnog stresa. Kada se REDD1 aktivira on može potaknuti aktivaciju tumor supresorskog kompleksa TSC1/TSC2 koji inaktivira Rheb (Hashimoto i sur. 2016). Rheb je GTP vezajući protein koji može vezati i regulirati kinazu mTOR. Ukoliko Rheb nije aktivan, ne može se aktivirati mTORC1 preko tog djela signalne mreže (Long i sur. 2005). TSC1/TSC2 se također može aktivirati preko oksidativnog stresa (Zhang i sur. 2013).

Genotoksični stres osim što aktivira faktor REDD1, aktivira također i drugi važni faktor, Sestrin, koji sudjeluje u aktivaciji AMPKα koji pripada drugom regulatornom putu. Drugi put regulacije je kontroliran preko osjetljivosti na manjak energije (Hashimoto i sur. 2016). U tome putu važnu ulogu ima tumor supresor LKB1. On kodira za serin/treonin kinazu koja fosforilira i aktivira put AMPK koji regulira metabolizam lipida, kolesterola i glukoze. Nakon što se AMPKα aktivira preko kinaze LKB1 ili Sestrina, slijedi aktivacija AMPKß koji direktno aktivira faktore TSC1/TSC2 i AMPKγ koja inaktivira kompleks mTORC1 (Shackelford & Shaw 2009).

Treći regulatorni put kompleksa mTORC1 se bazira na principu aminokiselinske signalizacije. Kompleks mTORC1 se može aktivirati djelovanjem GTP-aza RAG koje se nalaze na lizosomalnoj membrani. Proteine RAG aktivira protein Ragulator koji se sastoji od 5 proteinskih komponenta, p18 (kojeg kodira LAMTOR1), p14 (kodiran preko LAMTOR2), MP1 (kodiran sa LAMTOR3), C7orf59 i HBXIP koje kodiraju LAMTOR4 i LAMTOR5 (Jewell i sur. 2013). U vrsti *R. varieornatus* nedostaju u potpunosti svi signalni putevi koji uključuju procese hipoksije, genotoksičnog i oksidativnog stresa, dok su ostali putevi regulacije ostali aktivni (Hashimoto i sur. 2016). Cjelokupna mreža regulacije kompleksa mTORC1 prikazana je na slici 4.



Slika 4. Selektivni gubitak signalnih puteva regulacije kompleksa mTORC1 u vrsti *R. varieornatus.* Ljubičastom bojom su prikazani izgubljeni putevi, dok zelenom bojom zadržani putevi (Prilagođeno i preuzeto iz Hashimoto i sur. 2016).

4. DJELOVANJE PROTEINA TARDIGRADA NA RADIOTOLERANCIJU HUMANE STANIČNE KULTURE

4.1. UTJECAJ X-ZRAKA NA MOLEKULU DNA

Stanice su često podložne različitim vrstama stresa koji prouzrokuje oštećenja DNA. Kao način obrane, postoje specifični mehanizmi popravaka i smanjivanja stresa, ali postoji određeni limit popravka u slučaju djelovanja X-zraka. Ozračivanje stanica X-zrakama ima dva osnovna efekta na staničnu funkciju. Stanica može ući u proces programirane stanične smrti, apopotoze, ili proći kroz mutagene promjene (Coderre 2004). Stanica koja je ušla u apoptozu većinom umire u interfazi nekoliko sati nakon izlaganja te gubi strukturu jezgre uz intenzivnu degradaciju DNA. Ukoliko se izgubi apoptotička kontrola, vrlo lako dolazi do formiranja tumorskih agregata. Također zračenje može usporiti rast i prekinuti ulazak u mitozu što ovisi o dozi ozračivanja. Kod ljudi u *in vivo* uvjetima dovoljna je doza od 150 cGy za akutno oštećenje, a već kod 50 Gy potiču se konvulzije kroz cijelo tijelo te smrt nakon petog dana ozračivanja. U *in vitro* uvjetima je dovoljna manja doza od 10 cGy. Ako stanice ne uđu u proces apoptoze moguće je inicirati mutagene promjene (Little 2003, Hashimoto & Kunieda 2017).

Postoji nekoliko dokaza da je DNA glavna meta ozračivanja:

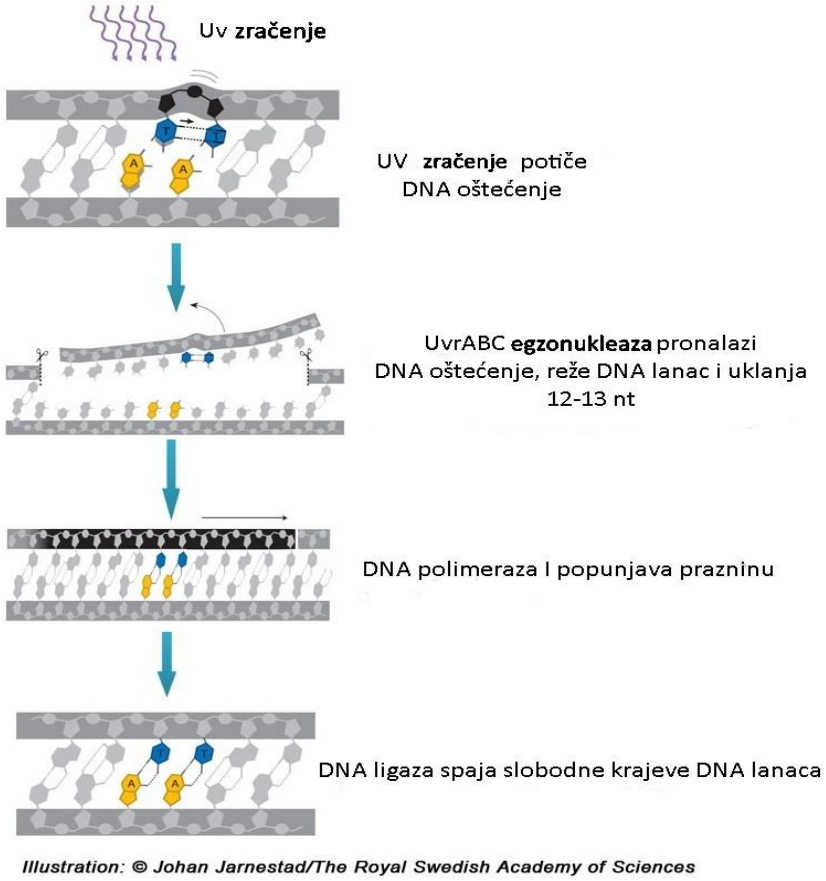
1. DNA je osjetljivija na X-zrake od citoplazme
2. Stanice kojima nedostaju enzimi za popravak oštećenja uzrokovanih zračenjem su osjetljivije
3. Postoji korelacija između staničnog sadržaja molekule DNA i radioosjetljivosti
4. Radioizotopi puno lakše ubijaju stanicu ukoliko su inkorporirani u DNA nego u RNA ili proteine (Coderre 2004).

Od mutagenih promjena, najčešće su kromosomske aberacije. One se dijele na stabilne i nestabilne. Stabilne uključuju pojavu delecija, recipročnih translokacija i aneuploidije (Little 2003). Neke mutacije uzrokovane recipročnim translokacijama se čak mogu prenositi na niz sljedećih generacija (Kano & Little 1985). Nestabilne aberacije su opasnije i većinom su letalne za diobu stanica. U tu skupinu pripadaju pojave dicentričnih kromosoma, „ring“ kromosoma te delecije većih fragmenata (Little 2003).

Uz kromosomske aberacije česte su i lezije molekule DNA. Postoji niz lezija koje se mogu dogoditi u stanici, a najčešće su pucanje lanaca molekule DNA, promjene dušičnih baza, razaranje šećera, formiranje pirimidinskih dimera i pojava unakrsnih veza između baza. Što se tiče lomova lanaca, glavna podjela je na jednolančane i dvolančane lomove. Jednolančani lomovi mogu nastati na fosfodiesterskoj vezi ili na vezi između šećera i baze. Također mogu

biti prouzročeni i hidroksilnim radikalima (Coderre 2004). Dva su načina nastanka jednolančanih lomova X-zrakama. Prvi način je direktnom apsorpcijom X-zraka, a drugi je indirektni način preko napada reaktivnih kisikovih specija (ROS) dobivenih iz molekula vode koje su se aktivirale zračenjem (Hashimoto i sur. 2016). Dvolančani lomovi uključuju sve lomove na oba lanca na mjestima koja nisu udaljenija od 3 nukleotida. Takvi lomovi ukoliko se ne poprave su najčešće letalni (Coderre 2004).

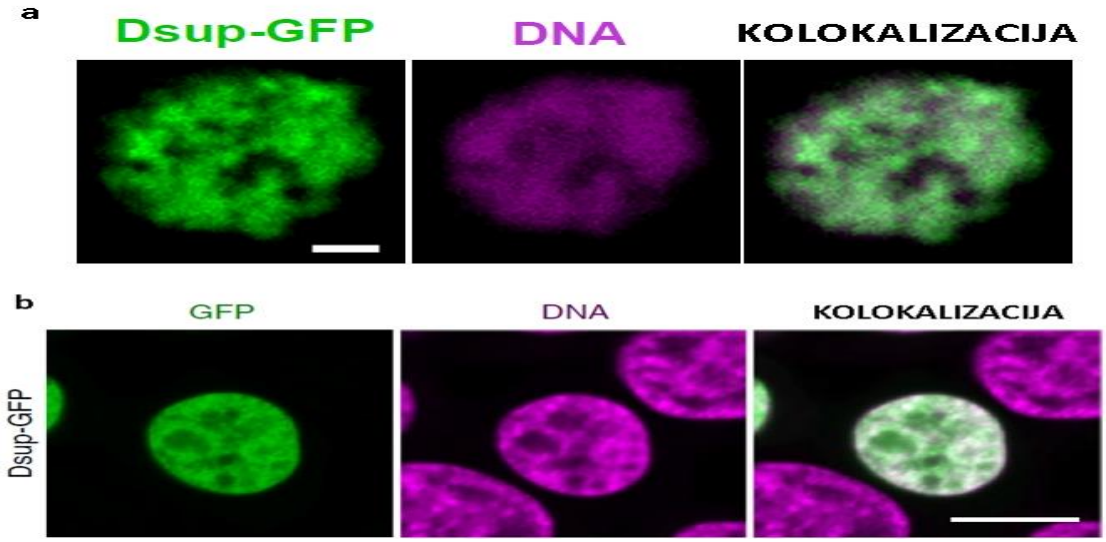
Ukoliko se desi DNA lom ili oštećenje, potrebno je popraviti molekulu DNA kako bi mogla normalno funkcionirati u staničnim procesima (Coderre 2004). Neki od primjera popravka molekula DNA nakon ozračivanja su fotoreaktivacijski popravak kod bakterija, rekombinacijski popravak i ekscizijski popravak nukleotida (slika 5). Kod *R. varieornatus* se pretpostavilo da postoje jedinstveni proteini koji ili popravljaju oštećenu DNA ili u potpunosti sprječavaju oštećenje pošto su ovo ekstremotolerantne vrste tardigrada te imaju visoku radiotoleranciju koju nemaju sve vrste tardigrada (Hashimoto i sur. 2016). Također, dehidracija potiče razaranje molekula DNA, ali kod tardigrada dehidracija kao da nema destabilizirajući učinak na DNA što je dodatno navelo znanstvenike na ideju o postojanju zaštitnog proteina (Hashimoto & Kunieda 2017).



Slika 5. Pojednostavnjeni prikaz ekscizijskog popravka nukleotida kod prokariota. Kod eukariota je mehanizam sličan, ali se izrezuje veći segment molekule DNA (Prilagođeno i preuzeto sa http://www.easybiologyclass.com/).

4.2. IZOLACIJA I DETEKCIJA RADIOTOLERANTNOG PROTEINA

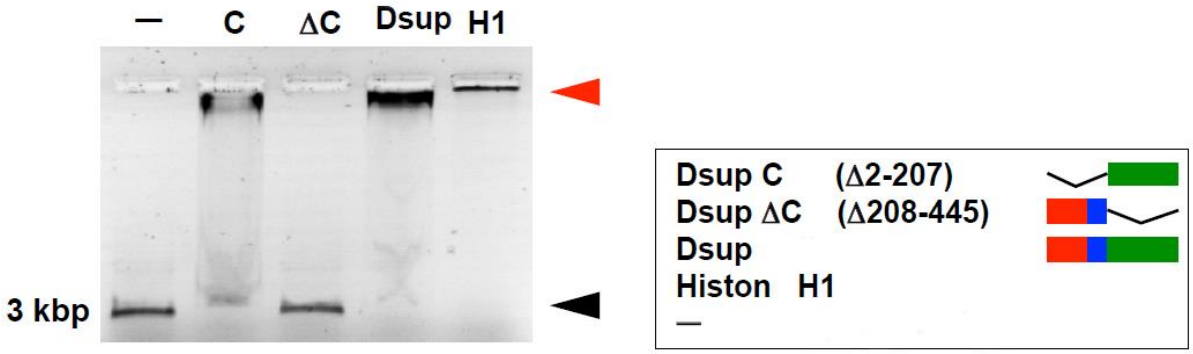
Da bi se radiotolerantni proteini mogli detektirati, izolirala se kromatinska frakcija tardigrada iz petsto jedinki *R. varieornatus.* Nuklearna i kromatinska frakcija su se analizirale na SDS-PAGE gelu koji se bojao srebrom, a 2 vrpce detektirane na 17-20 kDa, jedinstvene za kromatinsku frakciju, su se izolirale i analizirale masenom spektrometrijom. Ti izolirani proteini su se fuzionirali sa zelenim fluorescentnim proteinom (GFP) te su bili unešeni u stanice *Drosophila* Schneider 2 (S2) gdje se DNA označila DAPI bojom. Isti postupak se ponovio sa ljudskim embrionalnim stanicama bubrega HEK293 gdje je DNA obojana sa Hoechst 33342. Pronađen je samo jedan protein koji kolokalizira sa molekulom DNA u tim stanicama (slika 6), a nazvali su ga supresor oštećenja (*engl.* damage supressor) ili protein Dsup. Analizom ekspresije dokazano je da se javlja u velikim količinama u embriogenom stadiju tardigrada (Hashimoto i sur. 2016).



Slika 6. Kolokalizacija proteina Dsup-GFP sa molekulom DNA u stanicama *Drosophila* Schneider 2 (a) i u stanicama HEK293 (b). Skala je veličine 2 μm (a) odnosno 10 μm (b) (Prilagođeno i preuzeto iz Hashimoto i sur. 2016).

Interakcija proteina Dsup s molekulom DNA se dodatno provjerila gel-retardacijskom elektroforezom. Protein Dsup se inkubirao s bakterijskim plazmidom *pBluescript* II (10 ng) u različitim omjerima kako bi se vidjela ovisnost vezanja o količini proteina. Rezultati su se usporedili s pokretljivošću kompleksa DNA i histona H1 za kojeg se zna da se veže za molekulu DNA. Rezultati su pokazali da protein Dsup ima visok afinitet za DNA te da u omjeru 10:1 onemogućava da kompleks izađe iz jažice gela no da ipak ima slabiji afinitet vezanja od histona H1 (Hashimoto i sur. 2016). Potencijalni razlog zašto H1 jače veže DNA od proteina Dsup je jer H1 služi kao poveznica (*engl.* linker) nukleosoma te pomaže u kondenzaciji DNA kako bi se spriječila nukleazna razgradnja molekule DNA (Bernier i sur. 2015) dok protein Dsup nema

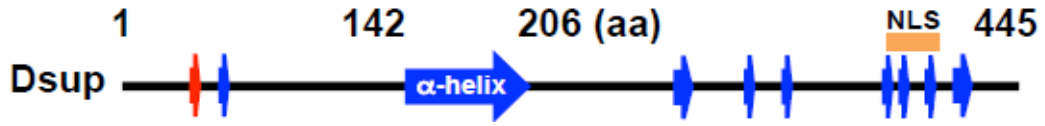
važnu ulogu u normalnim uvjetima stanice. Kod mutanata DsupΔC nije se dokazalo usporavanje molekule DNA na gelu (slika 7) zbog čega se došlo do zaključka da je C-terminalni kraj nužan za vezanje DNA (Hashimoto i sur. 2016).



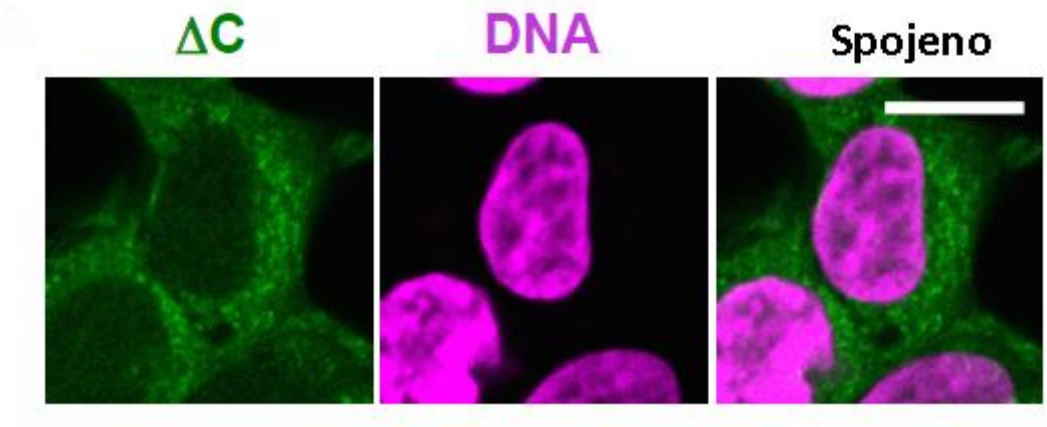
Slika 7. Rezultati gel-retardacijske elektroforeze. Crvena strelica prikazuje usporeni kompleks DNA:protein dok crna strelica prikazuje kretanje slobodne molekule DNA. Korišteno je 5 uzorka kao na slici: slobodna DNA, DNA:C-terminalni kraj Dsup, DNA:DsupΔC, DNA:Dsup i DNA:H1 (Prilagođeno i preuzeto iz Hashimoto i sur. 2016).

4.3. GRAĐA PROTEINA Dsup

Protein Dsup (445 aminokiselina) ne pokazuje nikakvu sličnost dosad otkrivenim proteinima u poznatim proteinskim bazama podataka. Jedini potencijalni homolog sa vrlo malom sličnosti (35.5%) je hipotetski protein BV898_01301 (328 aminokiselina) u vrsti *H. dujardini*. Oba proteina imaju sličan naboj i zajedničke regije hidrofobnosti te se smatra da su nastali divergentnom evolucijom (Hashimoto & Kunieda 2017). *In sillico* analizom se predstavila približna građa proteina Dsup. U sredini proteina nalazi se dugačka α-zavojnica od aminokiselinskog položaja 146 do 206 (slika 8). C-terminalni kraj vjerojatno predstavlja vezno mjesto sa kiselom molekulom DNA zbog povećane razine bazičnih aminokiselina s prosječnom pH vrijednošću 10.55. To dodatno potvrđuju eksperimenti gdje se u potpunosti uklonio C-terminalni kraj (slika 9). Smatra se da se protein Dsup veže za DNA elektrostatskim interakcijama. Vezanje proteina za DNA često može biti štetno i inhibirajuće za replikaciju i transkripciju no kod tardigrada nema takvog efekta. Vjerojatan razlog je postojanje N-terminalnog kraja koji svojom interakcijom poništava interferenciju replikacije i transkripcije te smanjuje heterokromatinizaciju (Hashimoto i sur. 2016).



Slika 8. Relativni položaj ß-naboranih ploča (crvena strelica) i α-zavojnica (plava strelica) u odnosu na broj aminokiselina. NLS predstavlja C-terminalni kraj i potencijalno mjesto vezanja proteina Dsup za molekulu DNA (Preuzeto iz Hashimoto i sur. 2016).



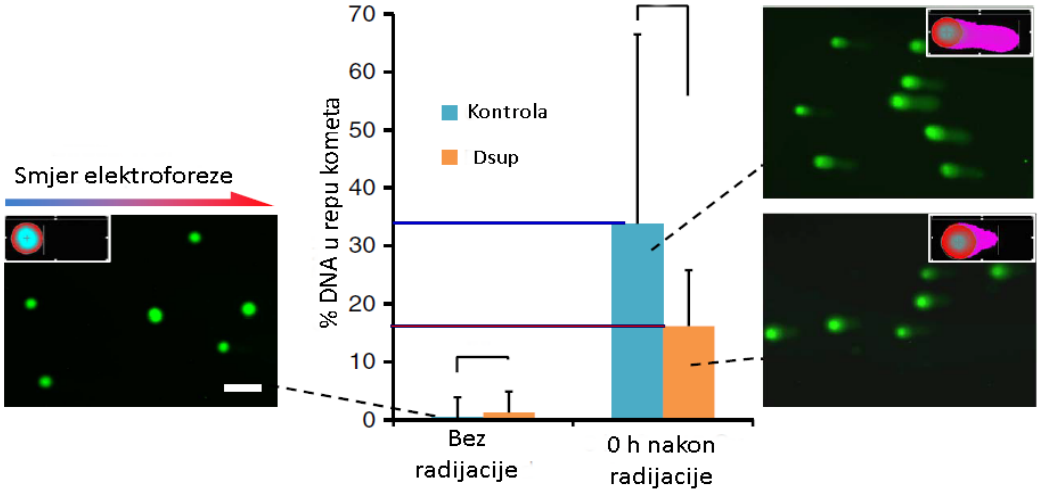
Slika 9. Subcelularna lokalizacija proteina Dsup-GFP sa uklonjenim C-terminalnim krajem u stanicama HEK293. Mutant DsupΔC ne pokazuje kolokalizaciju s DNA. DNA je vizualizirana DAPI bojom. Skala je veličine 10 µm (Prilagođeno i preuzeto iz Hashimoto i sur. 2016).

4.4. EKSPRESIJA PROTEINA Dsup U STANICAMA HEK293 I SUPRESIJA OŠTEĆENJA

Kako bi se moglo dokazati postoji li mogućnost supresije oštećenja DNA u ljudima pomoću proteina Dsup, uspostavila se stanična linija HEK293 s eksprimiranim proteinom Dsup pod promotorom CAG. Uz te stanice bile su korištene i kontrolne stanice HEK293 bez proteina Dsup. Obje vrste stanica su bile ozračene X-zrakama jakosti 10 Gy, a nakon toga su bile tretirane alkalnom otopinom (pH>13) kako bi se pripremile za alkalni komet test (Hashimoto i sur. 2016).

Komet test (mikrogel elektroforeza pojedinačnih jezgara) je metoda za mjerenje DNA lomova eukariotskih stanica. Stanice su ugrađene u agarozu na predmetnom stakalcu i lizirane deterdžentom i solima kako bi DNA stvorila superzavojnice. Elektroforeza pri visokom pH rezultira strukturama koje predstavljaju komete koji se analiziraju fluorescentnom mikroskopijom. Putovanjem prema anodi formiraju se repovi, a intenzitet repa kometa u odnosu na glavu kometa je ekvivalent broju lomova DNA (Collins 2004.).

U ozračenim stanicama sa proteinom Dsup dokazano je manje oštećenje DNA sa ukupnom duljinom repa jezgre 16%, dok u netransformiranim stanicama oštećenje je bilo skoro dvostruko veće (33% duljina repa). Na temelju ovih rezultata zaključilo se da protein Dsup može suprimirati jednolančane lomove u humanim stanicama ako X-zrake djeluju direktno (slika 10). Kako bi rezultati bili točniji, proveo se još jedan eksperiment kada X-zrake djeluju indirektno preko ROS-ova. Stanice su bile tretirane vodikovim peroksidom (100 µM, 4°C, 30 min) nakon čega se opet mjerila duljina repa komet testom. Rezultati su ponovno pokazali da je manje oštećenje u stanicama Dsup-HEK293 (18%) nego u netransformiranim stanicama (71%). To ukazuje da protein Dsup ne razlikuje način na koji je došlo do oštećenja te ima jednaku efikasnost u oba slučaja zaštite neovisno o jačini potencijalnog oštećenja. Pretpostavlja se da protein Dsup ima sličan mehanizam N-acetil-L-cistein antioksidansu i da neutralizira ROS-ove (Hashimoto i sur. 2016).



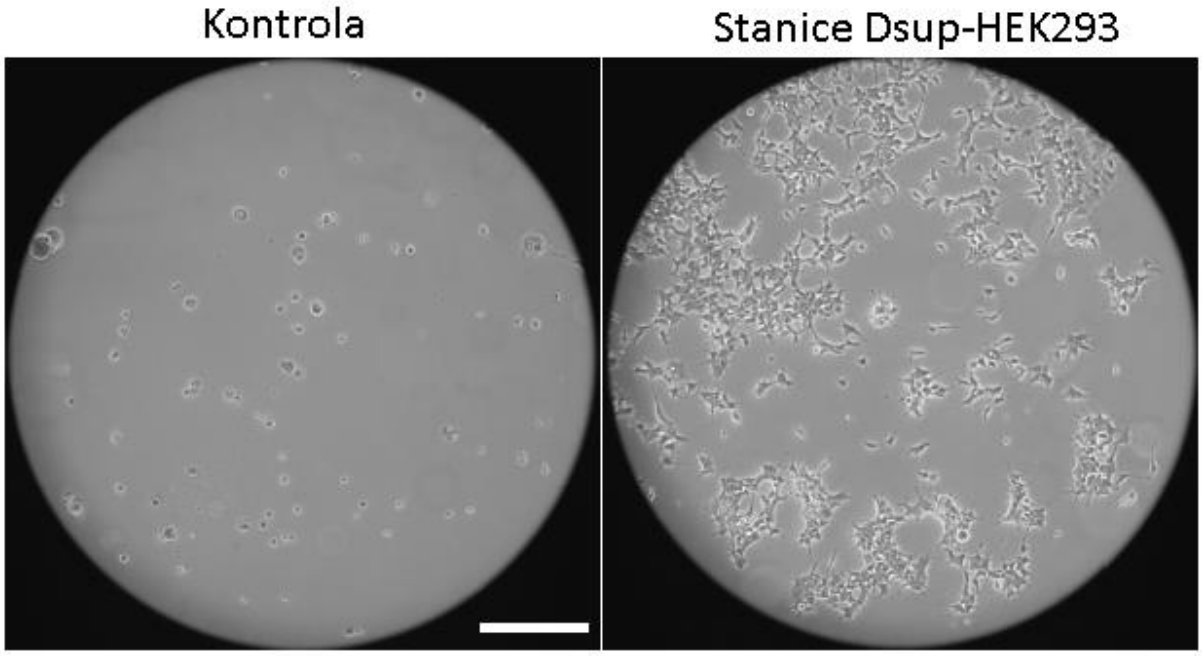
Slika 10. Rezultati alkalnog komet testa nakon zračenja od 10 Gy. Plavom bojom je prikazana kontrolna skupina stanica HEK293, a narančastom stanice Dsup-HEK293 (Prilagođeno i preuzeto iz Hashimoto i sur. 2016).

Nakon izvršenog alkalnog komet testa, proveo se neutralni komet test kako bi se dokazalo može li protein Dsup suprimirati čak i dvolančane lomove koji su letalniji od jednolančanih lomova DNA. Stanice su se ovaj puta tretirale manjom dozom direktnog zračenja od 5 Gy. U netransformiranim stanicama udio oštećenog repa je bio oko 40%, dok u stanicama Dsup-HEK293 duplo manji oko 20%. Time se dokazalo da protein Dsup uistinu može suprimirati ne samo jednolančane nego i dvolančane lomove (Hashimoto i sur. 2016). Osim neutralnog komet testa, dvolančani lomovi su se kvantificirali još jednom metodom. Kada se DNA ošteti i stvori dvolančani lom, uvijek će se fosforilirati histon H2AX. H2AX pripada varijantama histona H2A. Fosforilira se kinazama u signalnom putu PI3K. Nakon što se fosforilira, γ-H2AX ima

ulogu u privlačenju enzima za popravak DNA (Kuo & Yang 2008). U ozračenim stanicama HEK293 (1 Gy) pojavila se fluorescencija tokom prvog sata inkubacije. Fokusi su vizualizirani imunofluorescencijom korištenjem primarnog antitijela anti-fosfo-histon H2A.X (Ser139), odnosno sekundarnim antitijelom anti-mišji IgG. Stanice koje su imale protein Dsup su pokazale 40% manje fokusa od običnih stanica HEK293. Kada su se konstruirali utišani mutanti Dsup supresijom sa malom molekulom shRNA, koja smanjuje količinu transkripta proteina Dsup, nestala je redukcija oštećenja DNA u stanicama što potvrđuje rezultate neutralnog komet testa. Nakon konstrukcije mutanta DsupΔC uočilo se da ponovno nema redukcije oštećenja DNA i to je dodatna potvrda da je C-terminalni kraj proteina Dsup nužan za interakciju i zaštitu molekule DNA (Hashimoto i sur. 2016).

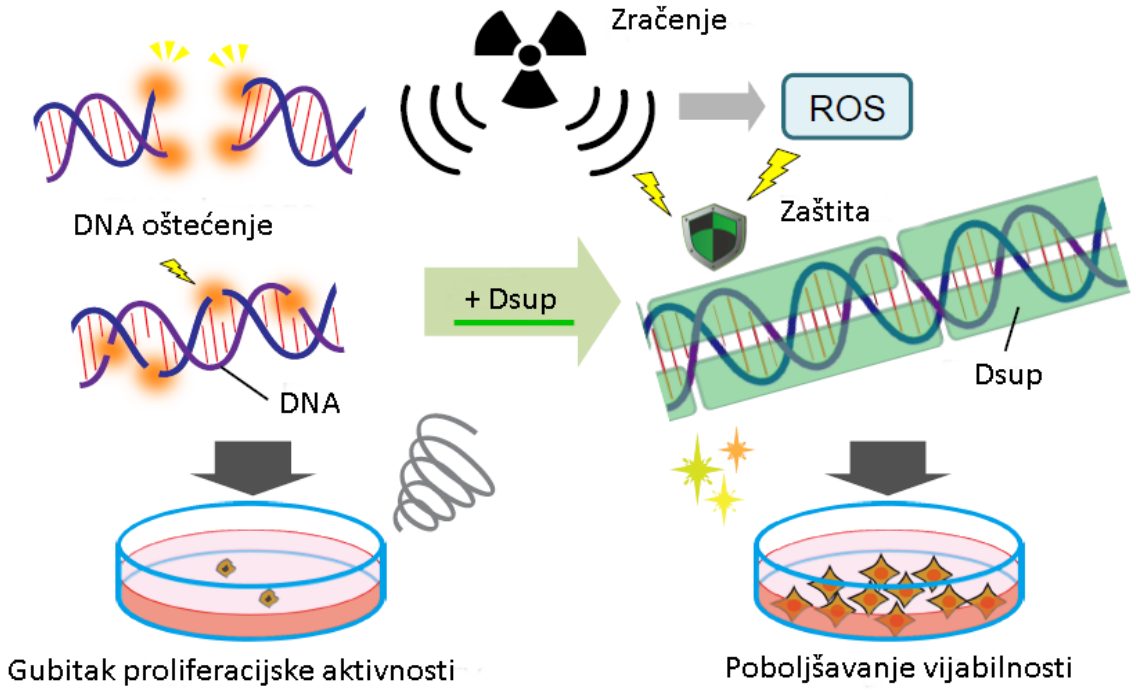
4.5. UTJECAJ PROTEINA Dsup NA VIJABILNOST STANICA HEK293

Pošto je dokazano da protein Dsup povećava radiotoleranciju ljudskih stanica u kulturi, drugo važno pitanje je može li povećati vijabilnost stanica koje su izložene zračenju. Kod sisavaca se vijabilnost stanica gubi pri vrlo niskim razinama zračenja od čak 3-7 Gy (Puck & Marcus 1956). Stoga su se stanice ozračivale sa malom jačinom zračenja od 4 Gy koja bi trebala suprimirati proliferaciju stanica HEK293. Stanična proliferacija se mjerila svaka 24 h tokom 8 dana. Koristio se reagens *PrestoBlue Cell Viabilitiy* kojim se mjerila redukcija kulture, a fluorescencija se mjerila fluorometarskom mikropločicom. Broj stanica se odredio automatskim brojačem stanica nakon tripsinizacije i odvajanja kulture od podloge. Četvrtog dana uočila se očita razlika u preživljenju stanica. U kontrolnoj grupi HEK293 vijabilnost je bila puno manja od vijabilnosti stanica Dsup-HEK293. Stanice kontrolne grupe su poprimile obilježja mrtvih stanica, bile su okrugle i u potpunosti odvojene od podloge dok su stanice koje su imale protein Dsup pokazivale normalnu vijabilnost i tipičan izgled živih stanica (slika 11).



Slika 11. Fazno-kontrastna mikroskopska slika kontrolnih i transformiranih stanica HEK293 nakon tretiranja sa 4 Gy zračenjem. Skala je 200 μm (Prilagođeno i preuzeto iz Hashimoto i sur. 2016).

Nakon dugog perioda zračenja, trebalo se potvrditi povećava li se broj stanica kroz dulji vremenski period. Stanice koje su imale ekspresiju proteina Dsup, neovisno o tome jesu li bile ozračene ili ne, su pokazale veći stupanj proliferacije nego stanice bez proteina. Dodatno je to potvrdio i utišani mutant Dsup koji se ponašao slično kontrolnoj grupi stanica. Kod ozračenih stanica, jedino su se transformanti Dsup zadržali na podlozi i nastavili s intenzivnom proliferacijom dok kontrolna grupa nije pokazala isto ponašanje. Kod mutanta DsupΔC, kao što je i očekivano, je pokazana manja proliferacija nego kod divljeg tipa stanica sa proteinom Dsup. Protočnom citometrijom je dokazano da povećana radiotolerancija uslijed ekspresije proteina Dsup nije zbog alternacija staničnog ciklusa jer često radioosjetljivost može biti promijenjena zbog staničnog ciklusa (Hashimoto i sur. 2016). Na slici 12. prikazana je pojednostavnjena shema djelovanja proteina Dsup na proliferativnu aktivnost stanica u kulturi.



Slika 12. Pojednostavnjena shema utjecaja proteina Dsup na vijabilnost stanica HEK293 (Prilagođeno i preuzeto iz Hashimoto i sur. 2016).

5. LITERATURA

Bernier M., Luo Y., Nwokelo C. K., Goodwin M., Dreher J. S., Zhang P., Parthun R. M., Fondufe-Mittendorf Y., Ottesen J. J., Poirier G. M. (2015). Linker Histone H1 and H3K56 Acetylation are Antagonistic Regulators of Nucleosome Dynamics. *Nature Communications*. **6**, doi:10.1038/ncomms10152.

Boothby T. C., Tenlen J. R., Smith F. W., Wang J. R., Patanella K. A., Osborne Nishimura E., Tintori C. S., Qing L., Jones D. C., Yandell M., Messina N. D., Glasscock J., Goldstein B. (2016). Evidence for Extensive Horizontal Gene Tansfer from the Draft Genome of a Tardigrade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **112**, 15976–15981.

Cafaro P. R. (1960). Hypoxia: Its Causes and Symptoms. *Journal of the American Dental Society of Anesthesiology*. **7**, 4-8.

Catena V., Fanciulli M. (2017). Deptor: not Only a mTOR Inhibitor. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. **36,** doi:10.1186/s13046-016-0484-y.

Coderre J. (2004). 22.55 Principles of Radiation Interactions. Open Course Ware, https://ocw.mit.edu. **Pristupljeno 18.7.2017.**

Collins A. R. (2004). The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications and Limitations. *Molecular Biotechnology*. **26**, 249-262.

Dunlop E. A., Tee A. R. (2009). Mammalian Target of Rapamycin Complex 1: Signalling Inputs, Substrates and Feedback Mechanisms. *Cellular Signaling*. **21**, 827-835. doi: 10.1016/j.cellsig.

Greer S. N., Metcalf J. L., Wang Y., Ohh M. (2012). The Updated Biology of Hypoxia-Inducible Factor. *The EMBO Journal*. **31**, 2448–2460.

Guertin D. A., Sabatini D. M. (2007). Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell*. **12**, 9-22.

Hashimoto T., Kunieda T. (2017). DNA Protection Protein, a Novel Mechanism of Radiation Tolerance: Lessons from Tardigrades. *Life*. **7**, doi:10.3390/life7020026.

Hashimoto T., Horikawa D. D., Saito Y., Kuwahara H., Kozuka-Hata H., Shin-I T., Minakuchi Y., Ohishi K., Motoyama A., Aizu T., Enomoto A., Kondo K., Tanaka S., Hara Y., Koshikawa S., Sagara H., Miura T., Yokobori S., Miyagawa k., Suzuki Y., Kubo T., Oyama M., Kohara Y., Fujiyama A., Arakawa K., Katayama T., Toyoda A., Kunieda T. (2016). Extremotolerant Tardigrade Genome and Improved Radiotolerance of Human Cultured Cells by Tardigrade-Unique Protein. *Nature Communications.* **7**, doi: 10.1038/ncomms12808.

Hoeffer A. C., Klann E. (2011). mTOR Signaling: At the Crossroads of Plasticity, Memory, and Disease. *Trends in Neurosciences.* **33**, doi: 10.1016/j.tins.2009.11.003.

Horikawa D. D., Cumbers J., Sakakibara I., Rogoff D., Leuko S., Harnoto R., Arakawa K., Katayama T., Kunieda T., Toyoda A., Fuyijama A., Rotschild J. L. (2013). Analysis of DNA Repair and Protection in the Tardigrade *Ramazzottius varieornatus* and *Hypsibius dujardini* After Exposure to UVC Radiation. *PLOS One.* **8**, doi: 10.1371/journal.pone.0064793.

Jewell J. L., Russell R. C., Guan K. L. (2013). Amino Acid Signalling Upstream of mTOR. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* **14**, 133–139.

Jia Y., Qi C., Zhang Z., Hashimoto T., Rao M. S., Huyghe S., Suzuki Y., Van Veldhoven P. P., Baes M., Reddy J. K. (2003). Overexpression of Peroxisome Proliferator-activated Receptor-alpha (PPAR alpha)-Regulated Genes in Liver in the Absence of Peroxisome Proliferation in Mice Deficient in Both L- and D-Forms of Enoyl-CoA Hydratase/Dehydrogenase Enzymes of Peroxisomal Beta-Oxidation System. *The Journal of Biological Chemistry.* **278**, 47232-47239.

Jönsson K. I., Rabbow E., Schill R. O., Harms-Ringdahl M., Rettberg P. (2008). Tardigrades Survive Exposure to Space in Low Earth Orbit. *Current Biology.* **18**, 729–731.

Kano Y., Little J. B. (1985). Mechanisms of Human Cell Neoplastic Transformation: X-Ray-Induced Abnormal Clone Formation in Long-Term Cultures of Human Diploid Fibroblasts. *Cancer Research.* **45**, 2550-2555.

Klotz O. L., Sánchez-Ramos C., Prieto-Arroyo I., Urbánek P., Steinbrenner H., Monsalve M. (2015). Redox Regulation of FoxO Transcription Factors. *Redox Biology.* **6**, 51–72. doi: 10.1016/j.redox.2015.06.019.

Klotz M. G., Loewen P. C. (2003). The Molecular Evolution of Catalatic Hydroperoxidases: Evidence for Multiple Lateral Transfer of Genes between Prokaryota and from Bacteria into Eukaryota. *Molecular Biology and Evolution.* **20**, 1098–1112.

Kunz J., Hall M. N. (1993). Cyclosporin A, FK506 and Rapamycin: More than Just Immunosuppression. *Trends in Biochemical Sciences.* **18**, 334–338.

Kuo L. J., Yang L. X. (2008). Gamma-H2AX - a Novel Biomarker for DNA Double-Strand Breaks. *In vivo.* **22**, 305-309.

Little B. J. (2003). Ionizing Radiation. U: Holland-Frei Cancer Medicine 6, Nizozemska.

Long X., Lin Y., Ortiz-Vega S., Yonezawa K., Avruch J. (2006). Rheb Binds and Regulates the mTOR Kinase. *Current Biology.* **15**, 702-713.

Mannaerts G. P., Van Veldhoven P. P., Casteels M. (2000). Peroxisomal Lipid Degradation via Beta – and Alpha – Oxidation in Mammals. *Cell Biochemistry and Biophysics.* **32**, 73-87.

Miller W. R. (1997). Tardigrades: Bears of the Moss. *The Kansas School Naturalist*. **43**, 3-15.

Nelson L. D., Cox M. M. (2013). Oxidation of Fatty Acids. U: Lehninger Principles of Biochemistry 6th edition (682-683), New York.

Peterson R. T., Laplante M., Thoreen C. C., Sancak Y., Kang A. S., Kuehl M. W., Gray S. N., Sabatini M. D. (2009). DEPTOR is an mTOR Inhibitor Whose Frequent Overexpression in Multiple Myeloma Cells Promotes their Survival. *Cell.* **137**, 873–886.

Poirier Y., Antonenkov V. D., Glumoff T., Hiltunen J. K. (2006). Peroxisomal ß-oxidation a Metabolic Pathway with Multiple Functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* **1763**, 1413–1426.

Puck T. T., Marcus P. I. (1956). Action of X-Rays on Mammalian Cells. *The Journal of Experimental Medicine.* **103**, 653–666.

Rahm P.G. (1921). Biologische und Physiologische Beiträge zur Kenntnis der Moosfauna. *Zeitschrift Allg Physiologie.* **20**, 1–35.

Ramløv H., Westh P. (2001). Cryptobiosis in the Eutardigrade *Adorybiotus* (*Richtersius*) *coronifer*: Tolerance to Alcohols, Temperature and *de novo* Protein Synthesis. *Zoologischer Anzeiger*. **240**, 517–523.

Shackelford D. B., Shaw R. J. (2009). The LKB1-AMPK Pathway: Metabolism and Growth Control in Tumour Suppression. *Nature Reviews Cancer.* **9**, 563–575.

Yoshida Y., Koutsovoulos G., Laetsch R. D., Stevens L., Kumar S., Horikawa D. D., Ishino K., Komine S., Kunieda T., Tomita M., Blaxter M., Arakawa K. (2017). Comparative Genomics of the Tardigrades *Hypsibius dujardini* and *Ramazzottius varieornatus*. http://www.biorxiv.org/content/early/2017/03/01/112664 **Pristupljeno 16.7.2017.**

Zhang, J., Alexander A., Cai S., Tripathi D. N., Dere R., Tee A. R., Tait-Mulder J., Di Nardo A., Han J. M., Kwiatkowski E., Dunlop E. A., Dodd K. M., Folkerth R. D., Faust P. L., Kastan M. B., Sahin M., Walker C. L. (2013). A Tuberous Sclerosis Complex Signalling Node at the Peroxisome Regulates mTORC1 and Autophagy in Response to ROS. *Nature Cell Biology*. **15**, 1186–1196.

http://www.easybiologyclass.com/nucleotide-excision-repair-ner-in-prokaryotes-dna-repair/ **Pristupljeno 18.7.2017.**

http://www.genome.jp/kegg/pathway.html **Pristupljeno 18.7.2017.**

http://www.gettyimages.com/license/152415975 **Pristupljeno 14.7.2017.**

https://serc.carleton.edu/microbelife/topics/tardigrade/index.html **Pristupljeno 14.7.2017**

6. SAŽETAK

Tardigrade ili vodeni medvjedići su beskralježnjaci koji pripadaju koljenu *Tardigrada*. Većina tardigrada je barem djelomično tolerantna na stresne uvjete kao što su suša, promjene saliniteta, visoki pritisak i radioaktivna zračenja. Smatra se da njihova tolerancija dolazi zbog intenzivnog horizontalnog prijenosa gena pri čemu se većinom prenose geni za stres otporne proteine ili proteine koji neutraliziraju oksidativni stres poput katalaza. Sekvenciranjem genoma ekstremotolerantne vrste *R. varieornatus* dokazano je da HGT ipak nije nužno glavni razlog tolerancije pošto ova vrsta ima nižu stopu HGT-a (1.2%) od vrste *H. dujardini* (17.5%) koja ima manju toleranciju. *R. varieornatus* vjerojatno ima ekstremnu toleranciju zbog gubitka određenih metaboličkih puteva kao što je peroksisomalna ß-oksidacija zbog čega se smanjuje udio H_2O_2 u stanici i supresije autofagije kojom se sprečava uništavanje komponenta stanice. Što se tiče intenzivne radiotolerancije, protein Dsup je najvjerojatniji razlog ovog fenomena. On se veže svojim C-terminalnim krajem te smanjuje oštećenje DNA i povećava vijabilnost. Transfekcijom stanica HEK293 dokazano je da protein Dsup može povećati radiotoleranciju ljudskih stanica u kulturi te smanjiti oštećenja DNA koja su nastala zračenjem za 40%.

7. SUMMARY

Tardigrades or water bears are invertebrates from phylum *Tardigrada*. Most tardigrades are at least partially tolerant to stress conditions like drought, changes in salinity, high pressure and radiation. It is thought that their tolerance comes from intense horizontal gene transfer most of which are genes for stress tolerant proteins or proteins that neutralise oxidative stress like catalases. After sequencing the genome of extremotolerant species *R. varieornatus*, it was proven that HGT is not the main reason of tolerance since this species has lower HGT (1.2%) than species *H. dujardini* (17.5%) which has lower tolerance. *R. varieornatus* probably has extreme tolerance due to losing specific metabolic pathways like peroxisosmal ß-oxidation which lowers the amount of H_2O_2 in the cell and autophagy supression which prevents the destruction of cellular components. As for intense radiotolerance, Dsup protein is the most probable cause of this phenomenon. This protein binds DNA with its C-terminal end, reduces DNA damage and increases viability. Dsup protein increases radiotolerance in transfected HEK293 human cell culture and reduces DNA damage caused by radiation by 40%.