Uloga proteina optineurina u autofagiji proteinskih nakupina u neurodegenerativnim bolestima

Korać Prlić, Jelena

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:289903

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Jelena Korać

Uloga proteina optineurina u autofagiji proteinskih nakupina u neurodegenerativnim bolestima

Doktorska disertacija

Split, 2013.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu biologiju pri Katedri za imunologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu i na Biokemijskom institutu II, Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. W. Goethe u Frankfurtu u Njemačkoj.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Ivan Đikić, dr. med.

Zahvaljujem svome mentoru, prof. dr. sc. Ivanu Đikiću na ustrajnoj i stručnoj podršci, korisnim savjetima i razumijevanju tijekom izrade doktorske disertacije.

Iskreno zahvaljujem dr. sc. Koraljki Husnjak na pomoći, prenesenom znanju, velikom strpljenju, uloženom trudu i dragocjenom vremenu koje mi je posvetila prilikom savladavanja metoda i rada u laboratoriju.

Veliko hvala prof. dr. sc. Janošu Terziću i kolegama Zavoda za imunologiju i medicinsku genetiku, kao i kolegama sa instituta u Frankfurtu na podršci, suradnji i ugodnoj atmosferi tijekom izrade ovog rada.

Također zahvaljujem doc. dr. sc. Ivani Novak na savjetima i kritičkom čitanju predloška doktorske disertacije.

Na kraju se zahvaljujem svojoj obitelji, Teu i njegovoj obitelji na podršci, bezgraničnom razumijevanju i strpljenju. Puno im hvala što su mi cijelo vrijeme bili podrška i vjerovali u mene tijekom mojeg doktorata.

Sadržaj

1 UVOD 1

1.1 Neurodegenerativne bolesti 1

1.1.1 Amiotrofična lateralna skleroza 2

1.1.2 Huntingtonova bolest 3

1.1.3 Alzheimerova bolest 5

1.1.4 Parkinsonova bolest 6

1.2 Putovi razgradnje proteina 7

1.2.1 Ubikvitinsko-proteasomalni sustav 9

1.2.2 Lizosomalni put razgradnje 12

1.3 Autofagija 14

1.4 Mehanizam autofagije 16

1.4.1 Indukcija i nukleacija fagofora 18

1.4.2 Elongacija, selektivno vezanje supstrata i formiranje autofagosoma 19

1.4.3 Fuzioniranje s lizosomima 21

1.5 Selektivna autofagija 22

1.5.1 Autofagosomalni receptori 24

1.5.2 Mitofagija 26

1.6 Razgradnja proteinskih nakupina 27

1.7 Protein optineurin 30

1.7.1 Građa proteina optineurina 31

1.7.2 Funkcija proteina optineurina 31

1.7.3 Protein optineurin u glaukomu i Pagetovoj bolesti kosti 35

1.7.4 Protein optineurin u neurodegenerativnim bolestima 35

1.8 Animalni modeli istraživanja neurodegenerativnih bolesti 37

2 HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA 38

2.1 Hipoteza 38

2.2 Ciljevi istraživanja 38

3 MATERIJALI I METODE 40

3.1 Materijali 40

3.1.1 Kemikalije 40

3.1.2 Mikroorganizmi i stanice 41

3.1.3 Protutijela 42

3.1.4 Enzimi 43
3.1.5 Oligonukleotidi 43
3.1.6 Markeri 43
3.1.7 Komercijalno dostupni kompleti 44
3.1.8 Hranjive podloge za uzgoj bakterija 44
3.1.9 Puferi i otopine 44
3.1.10 Gelovi 46
3.1.11 Konstrukti (plazmidna DNA) i plazmidni vektori 47
3.2 Metode 50
3.2.1 Protokol istraživanja 50
3.2.2 Kloniranje DNA 50
3.2.3 Transformacija bakterije *E. coli* soj DH5α i BL21 plazmidnom DNA 51
3.2.4 Izolacija plazmidne DNA iz bakterija 51
3.2.5 Proizvodnja i pročišćavanje proteina iz bakterija 52
3.2.6 Metoda *GST pull down* i imunoprecipitacija 53
3.2.7 Kapljična analiza proteinskih agregata 53
3.2.8 *In vitro* fosforilacija i defosforilacija 54
3.2.9 Kultura stanica 54
3.2.10 Indukcija ili inhibicija autofagije. Inhibicija proteasoma 55
3.2.11 Priprava staničnih lizata 55
3.2.12 Denaturirajuća elektroforeza u SDS poliakrilamidnom gelu i metoda imunodetekcije (engl. *western blot*) 56
3.2.13 Kvantifikacija proteinskih nakupina 57
3.2.14 Imunofluorescencijska mikroskopija 57
3.2.15 Transgenični miševi, fiksacija tkiva i imunohistokemija 57
3.2.16 Riba zebrica (*Danio rerio*) 58
3.2.17 Statistički postupci 59
4 REZULTATI 60
4.1 Optineurin veže autofagosomalne proteine LC3/GABARAP preko domene LIR 60
4.2 Optineurin veže proteinske agregate 66
4.3 Posredna interakcija proteina optineurina i proteinskih agregata 70
4.4 Optineurin veže proteinske agregate C-terminalnim dijelom neovisno o interakciji s ubikvitinom 72
4.5 Optineurin utječe na količinu proteinskih nakupina u stanicama 77

4.6 Protein optineurin sudjeluje u autofagiji proteinskih nakupina.....81
4.7 Protein optineurin dovlači autofagosomalnu membranu na proteinske nakupine vezanjem za proteinske nakupine svojim C-terminalnim dijelom te vezanjem na autogafosomalni protein LC3 svojom domenom LIR.....84
4.8 Vezanje proteina optineurina i LC3 ovisno je o fosforilaciji serina neposredno prije domene LIR pomoću kinaze TBK1.....86
4.9 TBK1 u proteinskim agregatima fosforilira optineurin.....88
4.10 TBK1 utječe na količinu proteinskih nakupina u stanicama.....89
4.11 Fosforilirani optineurin i kinaza TBK1 vežu proteinske nakupine u mišjem modelu ALS-a.....91
4.12 Utišavanje optineurina u zebrici uzrokuje simptome ALS.....93
4.13 Utišavanje optineurina u zebrici pogoršava simptome ALS-a uzrokovane mutiranim proteinom SOD1 G93A.....96
5 RASPRAVA.....98
6 ZAKLJUČCI.....105
7 SAŽETAK.....106
8 SUMMARY.....107
9 LITERATURA.....108
10 ŽIVOTOPIS.....122

POPIS OZNAKA I KRATICA

ak, aminokiseline

ALFY, engl. *Autophagy-linked FYVE protein*

ALS, amiotrofična lateralna skleroza

AMO, morfolino oligonukleotidi, engl. *antisense morpholino oligonucleotides*

ATG, engl. *Autophagy-related genes*

BafA1, BafilomicinA1

BSA, albumin goveđeg seruma

CC, domena zavojite uzvojnice, engl. *coiled coil domain*

CFP, cijano fluorescirajući protein, engl. *cyan fluorescent protein*

CMA, autofagija posredovana šaperonima, engl. *chaperone-mediated autophagy*

Cvt, autofagija ciljanje citoplazme do vakuole, engl. *cytoplasm to vacuole targeting*

DRPLA, dentatorubralna palidolujzianska atrofija engl. *Dentatorubral-pallidoluysian atrophy*

DUB, deubikvitinirajući enzim engl. *deubiquitinating enzyme*

E1, ubikvitin-aktivirajući enzim engl. *ubiquitin activating enzyme*

E2, ubikvitin-konjugirajući enzim engl. *ubiquitin conjugating enzyme*

E3, ubikvitin ligaza engl. *ubiquitin ligase enzyme*

FBS, fetalni goveđi serum, engl. *fetal bovine serum*

FVEI, fenilalanin-valin-glutaminska kiselina-izoleucin

GABARAP, engl. *gamma-aminobutyric-acid-type-A-receptor-associated protein*

GFP, zeleni fluorescirajući protein engl. *green fluorescent protein*

GST, glutation-S-transferaza, engl. *glutathione S-transferase*

HDAC6, histonska deacetilaza 6 engl. *histone deacetylase 6*

HEK293T, ljudske stanice bubrega fetusa 293T engl. *Human embryonic kidney 293T*

HSC70, engl. *Heat-Shock Cognate 70*

htt ex1 Q103, protein huntingtin s prvih 92 aminokiseline (koje kodira prvi egzon) s poliglutaminskim nizom od 103 glutamina

htt, protein huntingtin

IgG, imunoglobulin G

IP, imunoprecipitacija

KFERQ, lizin-fenilalanin-glutamat-arginin-glutamin

LAMP-2A, engl. *Lysosomal-Associated Membrane Protein 2A*

LIR, LC3 vezujuća domena, engl. *LC3-Interacting Region*

MAP1LC3, engl. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*

MBP, maltoza vezujući protein

MTOC, središte organizacije mikrotubula, engl. *microtubule-organizing center*

mTORC, kompleks mTORC, engl. *Mammalian Target of Rapamycin Complex*

NBR1, engl. *Neighbour of BRCA1 1*

ND, nedostatak hranjivih tvari engl. *nutritional deficiency*

NDP52, engl. *nuclear dot protein 52 kDa*

NEMO, engl. *NF-kappa-B essential modulator*

NF-κB, jezgrin faktor kappa B, engl. *Nuclear factor-kappaB*

NIX, engl. *NIP3-like protein X*

NPG, glaukom s normalnim očnim tlakom, engl. *normal tension glaucoma*

NzF, domena cinkova prsta, engl. *Zinc finger domain*

OPTN, optineurin

PB1, oligomerizirajuća domena, engl. *Phox and Bem 1 domain*

PE, fosfatidiletanolamin engl. *Phosphatidylethanolamine*

PI3K, fosfatidilinozitol-3-kinaza, engl. *Phosphatidylinositol 3-kinase*

POAG, primarni glaukom otvorenog kuta, engl. *primary open-angle glaucoma*

PTU, feniltiourea

SCA, spinocerebralna ataksija engl. *Spinocerebellar ataxia*

shRNA, kratka ukosnica RNA, engl. *short hairpin RNA*

siRNA, mala interferirajuća RNA, engl. *small interfering RNA*

SBMA, spinalno bulbarna mišićna atrofija, engl. *Spinal and bulbar muscular atrophy*

SOD1, superoksid dismutaza 1 engl. *Cu/Zn superoxide dismutase 1*

SV2, protein sinaptičke vezikule 2, engl. *synaptic vesicle 2*

TBK1, TANK vezujuća kinaza 1, engl. *TANK-binding kinase 1*

TDP-43, TDPBP, engl. *TAR DNA-binding protein*

Ub, ubikvitin

UBA, ubikvitin vezujuća domena engl. *Ubiquitin-associated domain*

UBAN, ubikvitin vezujuća domena engl. *Ubiquitin binding in ABIN and NEMO*

ULK1, kinaza slična proteinu UNC-51, engl. *UNC-51 like kinase 1*

UPS, ubikvitinsko-proteasomalni sustav engl. *Ubiquitin-proteasome system*

wt, divlji tip engl. *wild type*

Y2H, metoda kvaščevog sustava dvaju hibrida engl. *yeast two-hybrid*

1 UVOD

1.1 Neurodegenerativne bolesti

Neurodegenerativne bolesti predstavljaju vrlo šaroliku skupinu bolesti kojima je osnovna karakteristika propadanje određenih dijelova mozga. Ovisno koji dio mozga i koja vrsta neurona je zahvaćena, kao posljedica se javlja poremećaj kognitivnih ili motoričkih funkcija. Najčešće neurodegenerativne bolesti su Alzheimerova, Parkinsonova i Huntingtonova bolest, amiotrofična lateralna skleroza, spinocerebralne ataksije te frontotemporalna demencija. Uglavnom se pojavljuju sporadično, a samo mali postotak nastaje obiteljski te se uglavnom nasljeđuju autosomno dominantno. Zajednička karakteristika svih neurodegenerativnih bolesti je nakupljanje abnormalnih proteina (1). Budući da su neuroni osjetljivi na toksične učinke mutiranih i abnormalnih proteina, dolazi do njihovog propadanja. Do stvaranja proteinskih nakupina dolazi uslijed prekomjernog stvaranja abnormalnih proteina i nemogućnosti njihovog uklanjanja iz stanica protiv čega se stanica bori pomoću dva glavna mehanizma – ubikvitinsko-proteasomalni i autofagijsko-lizosomski put razgradnje. Složenost procesa stvaranja proteinskih agregata ima za posljedicu nastajanje mnogo različitih struktura koje je moguće klasificirati s obzirom na veličinu i položaj u stanici. Prvo nastaju topljivi oligomerni oblici koji se potom formiraju u veće proteinske nakupine nazvane agregatima te u velike proteinske nakupine smještene perinuklearno nazvane agresomima (2). Još uvijek je nepoznato koji je od ovih oblika toksičan za stanicu i što uzrokuje njezino propadanje. Smatra se da su oligomerni oblici odgovorni za najveću toksičnost te da se stanica stvaranjem proteinskih nakupina štiti od štetnog učinka topljivih monomernih i oligomernih oblika abnormalnih proteina (3).

1.1.1 Amiotrofična lateralna skleroza

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je neurodegenerativna bolest u kojoj dolazi do propadanja motoričkih neurona što za posljedicu ima atrofiju mišića. Degeneracija neurona se događa u kralježničkoj moždini, moždanom deblu i motoričkom korteksu, a dolazi i do degeneracije piramidalnih putova. Mogu biti zahvaćeni gornji ili donji motorički neuroni, ali je moguće i kombinirano propadanje gornjih i donjih motoričkih neurona. Od ALS-a godišnje obolijeva 2-5 osoba na 10 000 stanovnika. Bolest karakterizira brza progresija koja rezultira smrtnim ishodom unutar dvije do pet godina od prvih simptoma najčešće zbog prestanka disanja jer dolazi do propadanja motoričkih živaca koje inerviraju respiratorne mišiće. Najčešće se pojavljuje sporadično, a u 5-10% slučajeva se nasljeđuje. Mutacije u nekoliko gena, superoksid dismutaza 1 (SOD1, engl. *Cu/Zn superoxide dismutase 1*), TDP-43 (TDPBP, engl. *TAR DNA-binding protein*), FUS/TLS (engl. *Fused in sarcoma*), senataksin, alsin, spataksin, VAPB (engl. *VAMP-associated protein B)* i angiogenin, dokazano su povezane s razvojem ALS-a. U preko 20% slučajeva obiteljskog oblika ALS-a nađena je mutacija u genu SOD1 i do sada je poznato preko 140 različitih mutacija u tom genu. Od mutacija u genu SOD1, najčešća je mutacija A4V (alanin na poziciji 4 zamijenjen s valinom), koja se javlja u preko 50% slučajeva te je povezana s lošom prognozom i kratkim preživljenjem bolesnika. Protein SOD1 je citoplazmatski enzim koji štiti stanice od slobodnih radikala tako što metabolizira radikale iona superoksida (O_2^-) u molekule kisika i vodikovog peroksida. U početku se smatralo da mutacija u tom genu uzrokuje gubitak te funkcije što za posljedicu ima povećani oksidativni stres u stanici. No, istraživanja su pokazala da mnoge nađene mutacije u tom genu ne utječu na aktivnost samog enzima već one uzrokuju nastajanje mutiranog proteina SOD1 sklonog agregiranju i stvaranju proteinskih nakupina koje su naročito štetne za živčane stanice (4-6). Osim oksidativnog stresa i toksičnosti proteinskih nakupina, dokazana je disfunkcija mitohondrija kao i poremećaji u procesiranju pre-mRNA koji pridonose propadanju motoričkih neurona (7).

1.1.2 Huntingtonova bolest

Huntingtonova bolest je autosomalno dominantna nasljedna neurodegenerativna bolest s incidencijom od 1 oboljelog na 10 000 stanovnika, a uzrokovana je mutacijama u genu za huntingtin. Bolest je karakterizirana abnormalnim motoričkim pokretima (koreja) te subkortikalnom demencijom i psihičkim poremećajima. Dolazi do bilateralne atrofije glave nukleusa kaudatusa i putamena s udruženim umjerenim stupnjem atrofije vijuga frontalnih i temporalnih regija. Mutacije u genu huntingtinu su abnormalno ponavljanje tripleta CAG koji kodira aminokiselinu glutamin. Normalno gen huntingtin sadrži 11 do 34 ponavljanja, a ukoliko mutirani gen ima više od 40 ponavljanja dolazi do razvoja bolesti. Broj ponavljanja tripleta povećava se iz generacije u generaciju. Obično se bolest pojavljuje u mlađoj životnoj dobi, oko četrdesete godine života. Ukoliko je riječ o većem broju ponavljanja do razvoja bolesti dolazi još i ranije (8-10). Protein huntingtin (htt) s većim brojem ponavljanja glutamina sklon je agregiranju i stvaranju proteinskih nakupina. Osim što dolazi do stvaranja proteinskih nakupina, smatra se da gubitak njegove funkcije u stanici također pridonosi propadanju neurona. Protein huntingtin sudjeluje u transportu vezikula preko mikrotubula vezući se na mikrotubularne motoričke proteine dinein i kinezin, što je neophodno za transport neurotransmitera neurona.

Osim Huntingtonove bolesti, postoji cijeli niz tzv. poliglutaminskih bolesti među kojima su spinocerebralne ataksije (SCA, engl. *Spinocerebellar ataxia*), spinalno bulbarna mišićna atrofija (SBMA, engl. *Spinal and bulbar muscular atrophy*) i dentatorubralna palidolujzianska atrofija (DRPLA, engl. *Dentatorubral-pallidoluysian atrophy*). U ovoj skupini bolesti dolazi do poremećaja voljnih pokreta udova i trupa, koji nastaju uslijed oštećenja malog mozga i leđne moždine. Genski uzrokovane ataksije, do sada su povezane s mutacijama u genima SCA1-8, SCA10-19, SCA21-23, atrofinu 1 i androgenom receptoru, i nasljeđuju se autosomalno dominantno. Kao i u Huntingtonovoj bolesti, u tim genima dolazi do ekspanzije tripleta CAG. Broj ponavljanja tripeta koji dovodi do razvoja bolesti za svaki je gen različit (tablica 1) (11).

Tablica 1. Prikaz poliglutaminskih bolesti s pripadajućim mutiranim genima s povećanim brojem ponavljanja tripleta.

Bolest	Gen	Protein	Broj ponavljanja tripleta CAG	
			Normalni gen	Razvoj bolesti
DRPLA	ANT1	Atrofin 1	6 – 35	49 – 88
SBMA	Androgen receptor	Androgen receptor	9 – 36	38 – 62
SCA1	ATXN1	Ataksin 1	6 – 35	49 – 88
SCA2	ATXN2	Ataksin 2	14 – 32	33 – 77
SCA3	ATXN3	Ataksin 3	12 – 40	55 – 86
SCA6	CACNA1A	Podjedinica α1a kacijevog kanala	4 – 18	21 – 30
SCA7	ATXN7	Ataksin 7	7 – 17	38 – 120
SCA17	TBP	TATA-box vezujući protein	25 – 42	47 – 63

1.1.3 Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest je najčešća neurodegenerativna bolest karakterizirana progresivnom degeneracijom središnjeg živčanog sustava što za posljedicu ima poremećaj kognitivnih funkcija kao što su demencija, poremećaji u govoru i promjene ličnosti. Prije svega dolazi do atrofije hipokampusa i propadanja kolinergičnih neurona ali i ostalih dijelova mozga. Uglavnom zahvaća stariju populaciju (preko 50% oboljelih su osobe iznad 80 godina). Na svakih 100 000 stanovnika pojavljuje se godišnje 125 novih slučajeva starijih od 60 godina s naznakom da ova učestalost raste s godinama starosti. Najčešće se pojavljuje sporadično, dok se u 5% slučajeva nasljeđuje autosomalno dominantno. Patohistološki, Alzheimerovu bolest karakteriziraju dvije vrste inkluzija: (1) izvanstanične inkluzije građene uglavnom od beta-amiloidnog proteina i (2) unutarstanične inkluzije nastale taloženjem neurofibrilarnih vlakana hiperfosforiliranog proteina tau. Do sada su poznata tri gena uključena u nastajanje ove bolest: gen za amiloidni prekursorski protein (APP) te geni za transmembranske proteine, presenilin 1 (PSEN1) i presenilin 2 (PSEN2). Također je pokazano da mutacije u genu za protein apolipoprotein E4 povećavaju rizik nastajanja Alzheimerove bolesti. Rizik je povećan i kod osoba s Downovim sindromom (trisomija 21. kromosoma) budući da se gen za APP nalazi na 21. kromosomu.

U normalnim uvjetima metabolizmom proteina APP nastaje protein beta-amiloid koji sadrži 40 aminokiselina. Ukoliko postoji poremećaj u metabolizmu proteina APP, nastaju abnormalni proteini beta-amiloidi od 42 aminokiseline koji su skloni oligomeriziranju i agregiranju te se talože u izvanstaničnim inkluzijama. Proteini presenilin 1 i presenilin 2 sudjeluju u metabolizmu APP-a te mutacije i u tim proteinima uzrokuju stvaranje abnormalnih proteina beta-amiloida (12, 13). Funkcija proteina tau u stanici je aksonalni transport reguliran fosforilacijom. Smatra se da agregiranje proteina beta amiloida uzrokuje hiperfosforilaciju proteina tau što potiče stvaranje neurofibrilanih vlakana hiperfosforiliranog proteina tau.

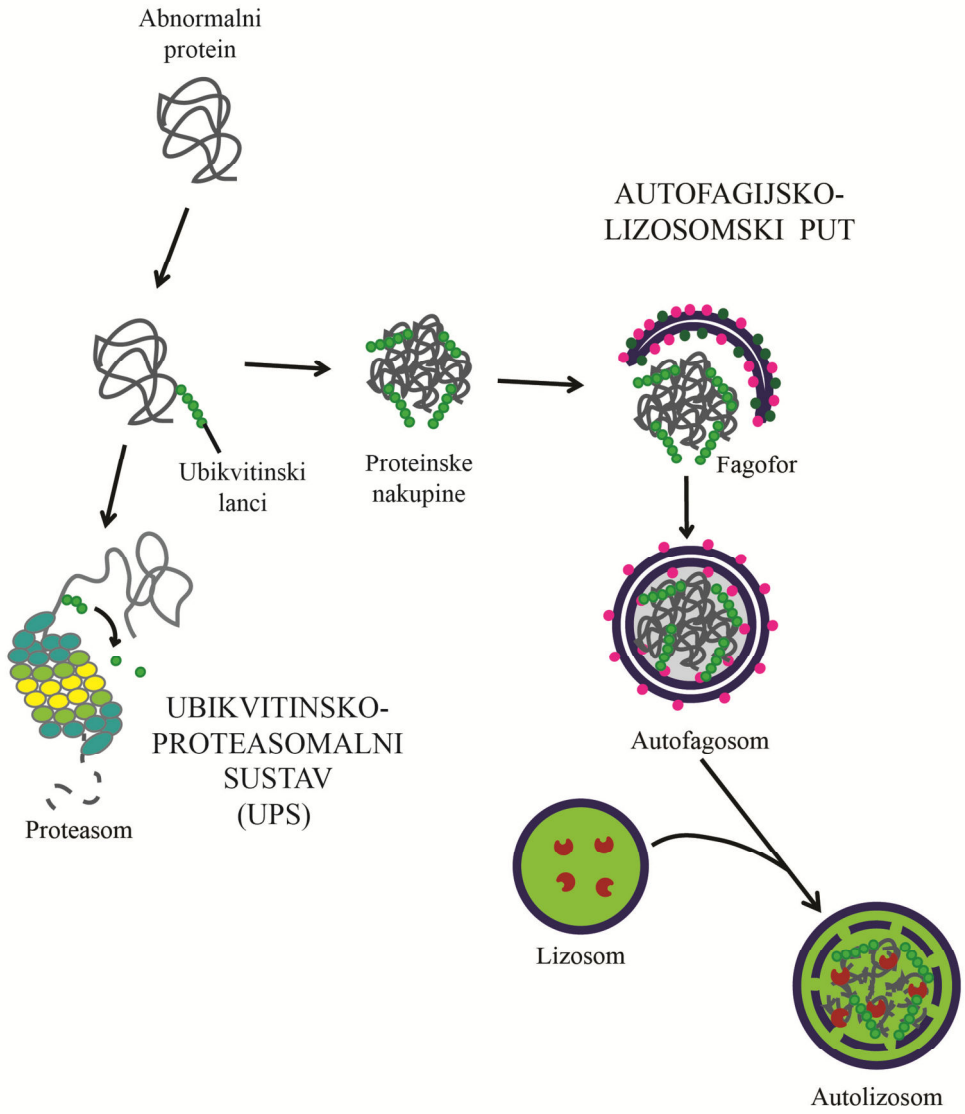
Osim Alzheimerove bolesti, druga česta neurodegenerativna bolest koja uzrokuje progresivnu demenciju je frontocerebralna demencija (FTD). Karakterizira ju degeneracija čeonog i prednjeg temporalnog režnja. Čak 30-60% se nasljeđuje, od čega 20% pacijenta ima mutirani gen tau. Kod FTD-a nastaju proteinske inkluzije s hiperfosforiliranim proteinom tau i proteinom ubikvitinom (14, 15).

1.1.4 Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest je neurodegenerativna bolest u kojoj dolazi do poremećaja pokreta, kao što su rigidnost, bradikineza, akinetički tremor, fleksijsko držanje tijela. To je progresivna neurodegenerativna bolest uzrokovana degeneracijom dopaminergičkih neurona supstancije nigre, a simptomi se javljaju kada 60 do 80% dopaminergičkih neurona propadne. Javlja se u 1% osoba starijih od 65 godina. Geni koji su do sada povezani s Parkinsonovom bolesti su α-sinuklein (PARK1/PARK4), UCH-L1 (engl. *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1/*PARK5) i LRRK2 (engl. *leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2/*PARK8) koji se nasljeđuju autosomalno dominantno te parkin (engl. *E3 ubiquitin-protein ligase parkin/* PARK2), PINK1 (engl. *PTEN-INduced putative Kinase 1/*PARK6), DJ-1 (PARK7) i ATP13A2 (PARK9) koji se nasljeđuju autosomalno recesivno. Molekularni mehanizam razvoja Parkinsonove bolesti leži u poremećajima raznih procesa u stanici kao što su transport vezikula, autofagija, ubikvitinacija, te difunkcija mitohondrija i pojačani oksidativni stres, a uzrokuju ih mutacije u navedenim genima. Patohistološki nalaz pokazuje prisutnost Lewyjevih tjelešaca u dopaminskim neuronima, a predstavljaju citoplazmatske inkluzije čija je glavna komponenta protein α-sinuklein (16, 17).

1.2 Putovi razgradnje proteina

Kao ključna komponenta održavanja homeostaze u stanici, a time i u organizmu, je pravilna sinteza proteina i drugih makromolekula, ali isto tako i njihova pravilna razgradnja. Stoga je sinteza proteina u stanici strogo regulirani proces s točno definiranim vremenom, mjestom i količinom sinteze. Kako bi se održala homeostaza, potrebno je razgraditi nepotrebne ili oštećene proteine. Ukoliko ne dođe do uklanjanja nefunkcionalnih i oštećenih proteina, dolazi do oštećenja stanice, razvijaju se razna patološka stanja i na kraju nastupa smrt stanice. Prilikom sinteze, svaki protein mora poprimiti pravilnu tercijarnu strukturu. Ponekad zbog mutacije u genu, novosintetizirani mutirani protein ne može poprimiti pravilni strukturu. Mutacije mogu imati raspon od zamjene jedne baze, preko insercije ili delecije jedne ili više baza. Ukoliko se radi o zamjeni jedne baze, tzv. točkaste mutacije, dolazi do promjene jedne aminokiseline ili do preuranjenog stop kodona što rezultira skraćenim proteinskim produktom. Do nastanka abnormalnih proteina također može doći uslijed promjena u posttranslacijskim modifikacijama proteina, ali i pod utjecajem vanjskih čimbenika kao što su oksidativni stres i neke toksične tvari. Neovisno o uzroku koji je doveo do abnormalnih i oštećenih proteina, oni se moraju ili popraviti ili ukloniti iz stanice. Proteini šaperoni prvi prepoznaju takve proteine i nastoje ih popraviti. Ukoliko popravak nije moguć, stanica aktivira mehanizam razgradnje abnormalnih i oštećenih proteina. Postoje dva glavna proteolitička sustava pomoću kojih se stanica bori protiv oštećenih i abnormalnih proteina – ubikvitinsko-proteasomalni sustav (UPS) i autofagijsko-lizosomski put razgradnje (slika 1). Abnormalni proteini se primarno razgrađuju UPS-om, višekomponentnim sustavom koji identificira i razgrađuje nepoželjne proteine. Nemogućnost uklanjanja proteina UPS-om kao i prekomjerno nastajanje abnormalnih proteina dovodi stvaranja proteinskih nakupina. Stanica tada aktivira drugi sustav, autofagiju, kako bi se proteinske nakupine pokušale ukloniti. Proces autofagije započinje formiranjem dvostruke membrane oko ciljnog sadržaja i stvaranjem autofagosoma koji se u konačnici spaja s lizosomima kako bi se ciljni sadržaj razgradio (18-20).



Slika 1. Dva glavna proteolitička sustava u stanici – ubikvitinsko-proteasomalni sustav i autofagijsko-lizosomski put.
Stanica prepoznaje abnormalni protein i obilježi ga ubikvitinskim lancima te ga razgradi UPS-om. Ukoliko se abnormalni proteini ne uklone UPS-om, stvaraju se proteinske nakupine koje stanica pokušava ukloniti procesom autogafije. Formira se dvostruka membrana oko ciljnog sadržaja (fagofor) iz čega nastaje autofagosom koji se u konačnici spaja s lizosomima kako bi se ciljni sadržaj razgradio.

1.2.1 Ubikvitinsko-proteasomalni sustav

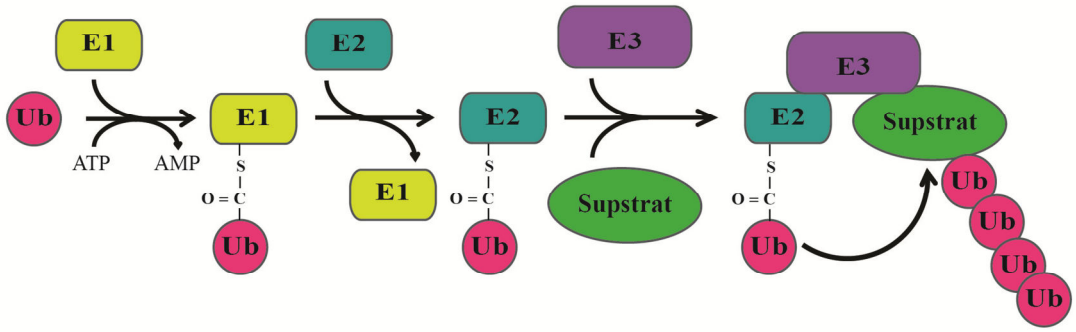
Nakon što stanica prepozna abnormalni protein, isti se obilježava proteinom ubikvitinom pomoću kaskade enzima. Tako obilježen protein lako prepoznaje proteasom, a prije razgradnje u unutrašnjosti proteasoma, enzimi deubikvitininaze odstranjuju ubikvitin s proteina koji potom biva odmotan i spreman za ulazak u proteasomalnu šupljinu.

1.2.1.1 Ubikvitinacija

Ubikvitin (Ub) je mali polipeptid od 76 aminokiselina, koji je evolucijski očuvan i prisutan u svim vrstama od kvasca do čovjeka, između kojih se razlikuje u samo tri aminokiseline. Kovalentno se veže na ciljne proteine procesom ubikvitinacije. Poput procesa fosforilacije i defosforilacije, ubikvitinacija je reverzibilni proces; odvajanje ubikvitina od ciljnih proteina provode deubikvitinirajući enzimi (engl. DUB, *deubiquitinating enzyme*). Iako prvobitno opisana isključivo kao signal za razgradnju proteina putem proteasoma, ubikvitinacija je danas prepoznata kao široko rasprostranjeni stanični mehanizam uključen u regulaciju mnogih bioloških procesa, kao što su regulacija genske aktivnosti i staničnog ciklusa, popravak oštećene DNA, apoptoza, endocitoza, autofagija i mnogi drugi (21, 22).

Vezanje Ub na ciljni protein odvija se preko karboksi (C) terminalnog dijela glicina Ub-a i (većinom) lizina ciljnog proteina. Proces ubikvitinacije sastoji se od tri koraka u koji su uključena tri ključna enzima – ubikvitin-aktivirajući enzim (E1), ubikvitin-konjugirajući enzim (E2) i ubikvitin ligaza (E3) (slika 2). U prvom koraku C-terminalni glicin (G76) Ub-a aktivira se ATP-om pomoću ubikvitin-aktivirajućeg (E1) enzima, čime prvo nastaje međuprodukt Ub-adenilat. Ub se zatim veže za cistein enzima E1 pomoću tioesterske veze, uz otpuštanje AMP-a. Aktivirani Ub se potom prebacuje na cisteinski ostatak unutar aktivnog mjesta enzima E2. U trećem koraku, kojeg katalizira enzim E3, Ub se veže svojim C-terminalnim krajem amidnom izopeptidnom vezom za ε-amino grupu lizinskog ostatka ili za amino (N) terminalni kraj ciljanog proteina. Poznato je nekoliko različitih enzima E1, dok je broj enzima E2 znatno veći (kod ljudi oko 100). Enzim E3 je odgovoran za specifičnost prepoznavanja i vezanja supstrata, te je sukladno tome potrebno jako puno različitih enzima E3 (kod ljudi oko 1000) (23). Do danas je opisan veliki broj modifikacija proteinom ubikvitinom. Poliubikvitinacijom se označava modifikacija kada se ciljni protein konjugira lancima ubikvitina. Kako ubikvitin posjeduje sedam lizinskih ostataka (K6, K11, K27, K29, K33, K48 i K63), mogući je nastanak više različitih vrsta lanaca ubikvitina. Ovisno o vrsti lanaca koji se konjugiraju na ciljni protein, dolazi do drugačijeg odgovora stanice. Lanci s

konjugiranim ubikvitinom na K48 drugog ubikvitina sudjeluju u proteasomalnoj degradaciji (24).



Slika 2. Grafički prikaz ubikvitinacije.
Protein ubikvitin se prvo aktivira vezanjem za enzim E1, a zatim se prenosi na enzim E2. Konačni prijenos ubikvitina na ciljni protein posredovan je ligazom E3.

1.2.1.2 26S proteasom

26S proteasom je 2,5 MDa veliki multienzimski kompleks bačvaste strukture odgovoran za razgradnju oštećenih, nepotrebnih ili starih proteina u stanici. 26S proteasom sastoji se od 20S katalitičke podjedinice i jedne ili dvije 19S regulatorne podjedinice. Katalitička podjedinica sastoji se od četiri prstena, dva vanjska (α) i dva unutarnja (β), a svaki se prsten sastoji od sedam različitih podjedinica. Podjedinice β prstena posjeduju proteolitičku aktivnost. Zbog karakteristične prstenaste zatvorene strukture, stanica je zaštićena od proteolitičke aktivnosti, koja se regulirano odvija jedino u unutrašnjosti 20S podjedinice. Regulatorna podjedinica sastoji se od dva dijela, baze i poklopca. Baza se sastoji od 6 ATPaza AAA tipa (engl. *ATPase associated with various cellular activities*). Hidroliza ATP-a pomaže 19S podjedinici da odmota supstrat i pripremi 20S katalitičku podjedinicu za njegov ulazak. Proteasom predstavlja dinamičnu strukturu koja mijenja svoju konformaciju vezivanjem poliubikvitiniranog supstrata i njegovom razgradnjom. Sam supstrat ubrzava svoju razgradnju utječući na otvaranje vrata za ulazak u 20S podjedinicu i aktivirajući peptidaze u samoj 20S podjedinici. Podjedinice u poklopcu specifično prepoznaju poliubikvitinske lance čime se osigurava da samo poliubikvitinirani proteini budu razgrađeni (25). Do sada su otkrivena dva intrinzična proteasomalna ubikvitinska receptora, Rpn10/S5a i Rpn13/ADRM1, koji su oba sastavne podjedinice 19S proteasoma. Osim njih, postoji i nekoliko neproteasomalnih ubikvitin-vezujućih proteina, koji funkcioniraju kao transportni proteini te sudjeluju u regrutiranju ubikvitiniranih proteina na 19S proteasom. Takvi proteini su HR23A, HR23B, PLIC-1 i PLIC-2. Uz ubikvitin-vezujuću domenu na svojem C-terminalnom kraju, ovi proteini imaju i ubikvitinu sličnu domenu na svojem N-terminalnom kraju kojom se vežu na proteasomalne receptore i druge podjedinice 19S proteasoma (26).

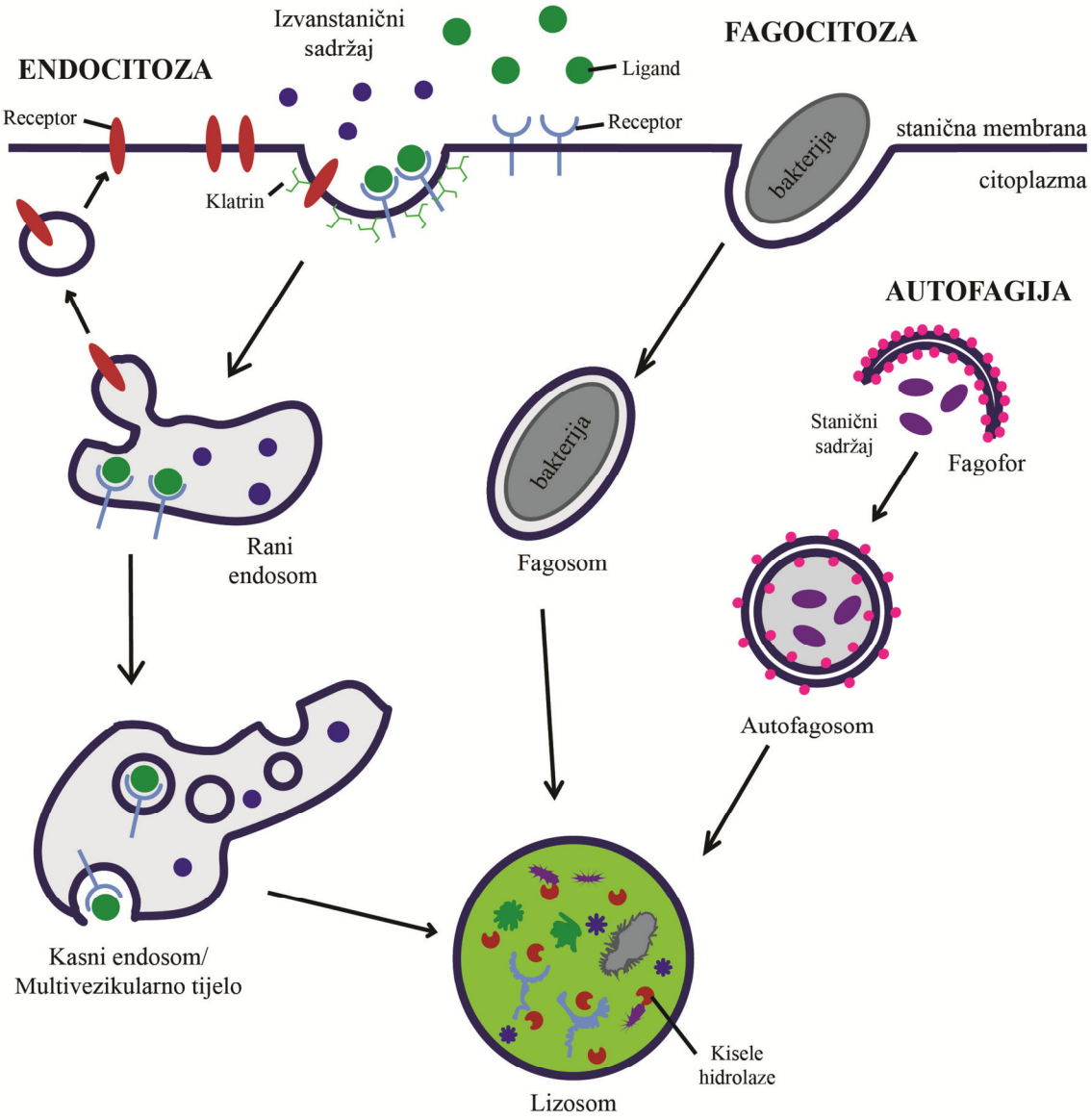
1.2.2 Lizosomalni put razgradnje

Lizosomi su organeli okruženi membranom unutar kojih se nalaze razni enzimi za razgradnju makromolekula poput proteina, nukleinskih kiselina i lipida. Izrazito su kiselog sadržaja s niskim optimalnim pH (4,6-5,0) jedino u kojem su enzimi aktivni. Protonske crpke u lizosomskoj membrani odgovorne su za postizanje niskog pH. U procesu razgradnje sudjeluje preko 50 različitih kiselih hidrolaza (proteaze, nukleaze, lipaze, glikozidaze, fosfataze i sulfataze) i 120 različitih lizosomskih membranskih proteina. Osim za aktivnost hidrolaza, niski pH pospješuje denaturaciju makromolekula čime se omogućuje lakša razgradnja hidrolazama. Lizosomi imaju veliku sposobnost fuzijoniranja s drugim membranskim staničnim komponentama te tako sudjeluju u procesima autofagije, fagocitoze, endocitoze i egzocitoze (slika 3) (27-29). Endocitozom i fagocitozom stanica razgrađuje izvanstanični sadržaj, dok se autofagijom razgrađuje unutarstanični sadržaj kao što su organeli i proteinske nakupine.

Tijekom endocitoze izvanstanični sadržaj ili ligandi na plazma membrani unose se u stanicu invaginacijom membrane obložene klatrinom pri čemu nastaju endocitozni mjehurići koji se potom spajaju s ranim endosomima. Osim glavnog tipa endocitoze ovisne o klatrinu, postoje i manje zastupljene vrste endocitoze koje su neovisne o klatrinu. Dijelovi membrane se obnavljaju tako da se dio membrane iz ranog endosoma odvoji i vrati natrag u staničnu membranu, dok ostatak ranog endosoma dozrijeva u kasni endosom. Jedna od važnih promjena tijekom sazrijevanja endosoma je sniženje pH na 5,5 kako bi kisele hidrolaze koje dolaze s transportnim vezikulama postale aktivne. Proces završava fuzijom kasnog endosoma i transportnih vezikula koje pupaju iz trans-Golgijeve mrežice (18, 28).

Procesom fagocitoze, specijalizirane stanice poput makrofaga, unose se i razgrađuju velike čestice uključujući bakterije, parazite i stanični debris. Sadržaj se također invaginacijom membrane unose u fagocitozne vakuole koje se potom spoje s lizosomima kako bi se omogućila razgradnja (18, 28).

Unutarstanični sadržaj se razgrađuje u lizosomima procesom autofagije gdje se čitavi stanični organeli ili proteinske nakupine obuhvate dvostrukom membranom kako bi se stvorili autofagosomi koji se potom spajaju s lizosomima (18).

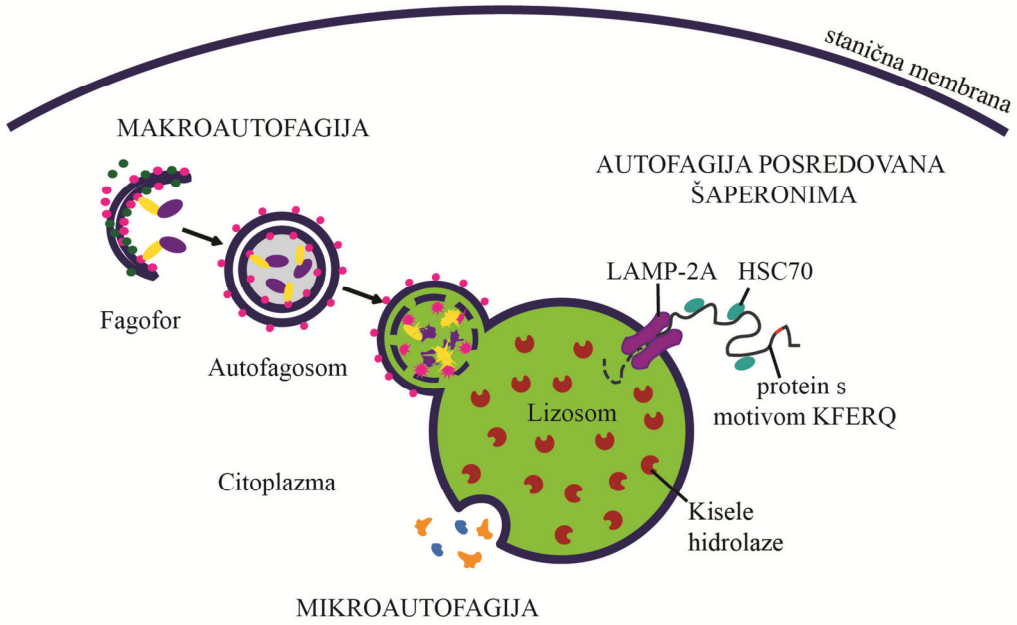


Slika 3. Lizosomski put razgradnje.
Izvanstanični sadržaj unosi se u stanicu procesom endocitoze, a bakterije procesom fagocitoze. Unutarstanični sadržaj razgrađuje se procesom autofagije u kojem membranska struktura obuhvati stanični sadržaj stvarajući autofagosom. Proces završava stapanjem endosoma, fagosoma ili autofagosoma s lizosomom u kojem se sav sadržaj razgradi kiselim hidrolazama.

1.3 Autofagija

Autofagija je evolucijski konzervirani katalitički proces pomoću kojeg stanica doprema citoplazmatski materijal u lizosom na razgradnju. Ovisno o vrsti autofagije, sadržaj se pomoću šaperona, invaginacijom membrane ili autofagosomom dopremi do lizosoma gdje ga kisele hidrolaze razgrade. Zbog svojeg neograničenog kapaciteta za razgradnju, autofagijom se mogu razgraditi sve vrste markomolekula pa i čitavi organeli i velike proteinske nakupine (30-32).

Postoje tri osnovna tipa autofagije: (1) autofagija posredovana šaperonima, (2) mikroautofagija i (3) makroautofagija (slika 4).



Slika 4. Tri vrste autofagije – autofagija posredovana šaperonima, mikroautofagija i makroautofagija.
U autofagiji posredovanoj šaperonima, citoplazmatske proteine s motivom KFERQ prepoznaje šaperon HSC70 te ih dovodi do lizosomskog membranskog receptora LAMP-2A. Proteini se razgrade u lizosomu direktnom translokacijom kroz poru lizosomske membrane koju gradi protein LAMP-2A. Kod mikroautofagije mala količina citoplazmatskog sadržaja invaginacijom membrane lizosoma unese se u lizosom gdje se razgrađuje. U procesu makroautofagije sadržaj se obuhvaća dvostrukom membranom (fagofor) koja se formira u autofagosom koji se konačno fuzionira s lizosomom.

U autofagiji posredovanoj šaperonima, citoplazmatski protein razgradi se u lizosomu direktnom translokacijom kroz poru lizosomske membrane. Šaperon HSC70 (engl. *Heat-Shock Cognate 70*) prepoznaje proteine s motivom za lizosomsku razgradnju lizin-fenilalanin-glutamat-arginin-glutamin (KFERQ), te ih dovodi do lizosomskog membranskog receptora LAMP-2A (engl. *Lysosomal-Associated Membrane Protein 2A*). Proteini se odmotavanju te se odmotani translociraju u lizosom kroz poru u membrani. Ovo je selektivan proces jer se ovim tipom autofagije razgrađuju samo proteini koji sadrže navedeni KFERQ slijed aminokiselina (33-35).

Kod mikroautofagije mala količina citoplazmatskog sadržaja invaginacijom membrane lizosoma unese se u lizosom gdje se razgrađuje (36). Istraživanja mikroautofagije provode se uglavnom na kvascima i do danas je poznato malo detalja o samom mehanizmu tog procesa.

Dok ova dva tipa autofagije razgrađuju manje stanične komponente, uglavnom pojedinačne proteine ili komplekse, makroautofagija je zadužena za razgradnju velikih staničnih komponenti kao što su organeli i proteinski agregati. Dok je autofagija posredovana šaperonima isključivo selektivni proces, mikroautofagija i makroautofagija imaju svoja selektivna i neselektivna svojstva, tj. mogu nasumično odabrati sadržaj namijenjen za razgradnju ili se sadržaj može pomno odabrati.

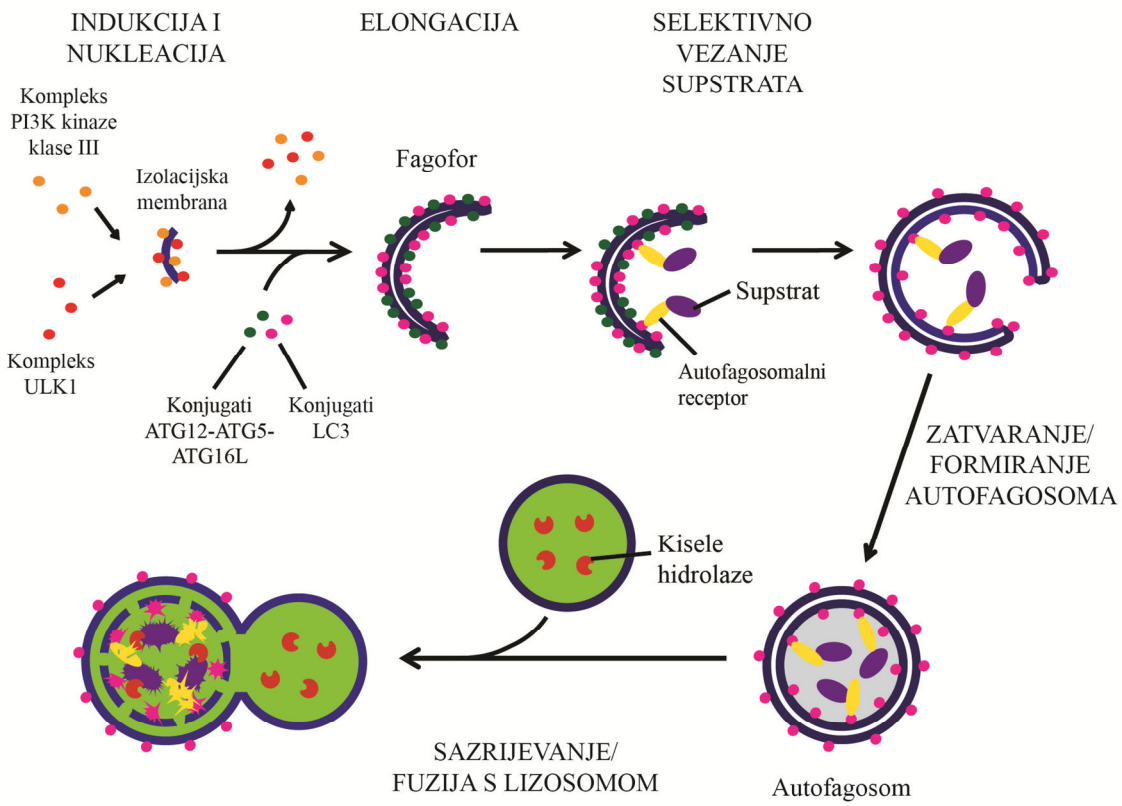
U procesu makroautofagije sadržaj se obuhvaća dvostrukom membranom koja se formira u autofagosom koji se konačno fuzionira s lizosomom. Inicijacija autofagije kao i formiranje autofagosoma je strogo reguliran proces u kojem sudjeluju mnogi proteini. Neovisno o kojem se sadržaju radi, princip autofagije uvijek je isti (30). U daljem tekstu detaljno je opisan mehanizam i regulacija makroautofagije koja će se nadalje navoditi pod pojmom autofagija.

Autofagija je prisutna u svim eukariotskim stanicama kao jedna od glavnih mehanizama kontrole kvalitete te eliminaciji oštećenih i nefunkcionalnih komponenti. Također ima važnu ulogu u embriogenezi i diferencijaciji stanica. Tako kod sisavaca u oociti nakon oplodnje dolazi do razgradnje majčinske mRNA, proteina i mitohondrija spermija (37). Procesom autofagije uklanjaju se mitohondriji prilikom diferencijacije eritrocita i limfocita T. Isto tako proces autofagije sudjeluje i u procesiranju antigena za prezentaciju u sklopu MHC molekula klase I i II (38-40).

1.4 Mehanizam autofagije

Proces autofagije poznat je već pedesetak godina, ali se tek zadnjih desetak godina istražuje molekularna osnova ovog procesa. Veliki pomak u tim istraživanjima bilo je otkriće skupine kvašćevih proteina Atg (engl. *autophagy related proteins*) koji su pokazali veliku konzerviranost sve do sisavaca. Daljnja istraživanja pokazala su da je to vrlo složen proces koji se sastoji od nekoliko glavnih koraka: indukcije, nukleacije fagofora, elongacije i formiranja autofagosoma, te fuzije autofagosoma s lizosomima (slika 5). Početak autofagije kontroliraju složeni regulatorni mehanizmi, i dovode do širenja membranske strukture, tzv. izolacijske membrane. Još uvijek je nepoznato porijeklo ove membrane. Različita istraživanja pokazala su da izvor izolacijske membrane može biti plazma membrana (41), vanjska mitohondrijska membrana (42) ili membrana endoplazmatskog retikuluma (43). Širenjem membrane nastaje fagofor za koji se selektivno veže odabrani citoplazmatski sadržaj. Daljnjim širenjem fagofora i fuzijom njegovih krajeva formira se zatvorena vezikula, autofagosom. Proces završava stapanjem autofagosoma s lizosomom u tzv. autolizosom gdje dolazi do razgradnje sadržaja.

Bazalna razina autofagije važna za održavanje homeostaze prisutna je u svim stanicama. Ta razina može se povećati u uvjetima staničnog stresa, kao što su gladovanje, hipoksija, oksidativni stres, infekcija ili zračenje. Povećanjem razine autofagije stanica se pokušava prilagoditi novonastalim uvjetima.



Slika 5. Mehanizam autofagije.
Indukcija autofagije regulirana je kompleksom ULK1, dok je nukleacija fagofora regulirana kompleksom PI3K kinaze klase III. Konjugat LC3 i konjugat ATG12-ATG5-ATG16L sudjeluju u procesu elongacije. Širenjem membrane nastaje fagofor za koji se selektivno preko autofagosomalnih receptora veže odabrani citoplazmatski sadržaj. Daljnjim širenjem fagofora i fuzijom njegovih krajeva formira se zatvorena vezikula, autofagosom. Proces završava stapanjem autofagosoma s lizosomom u tzv. autolizosom gdje dolazi do razgradnje sadržaja kiselim hidrolazama.

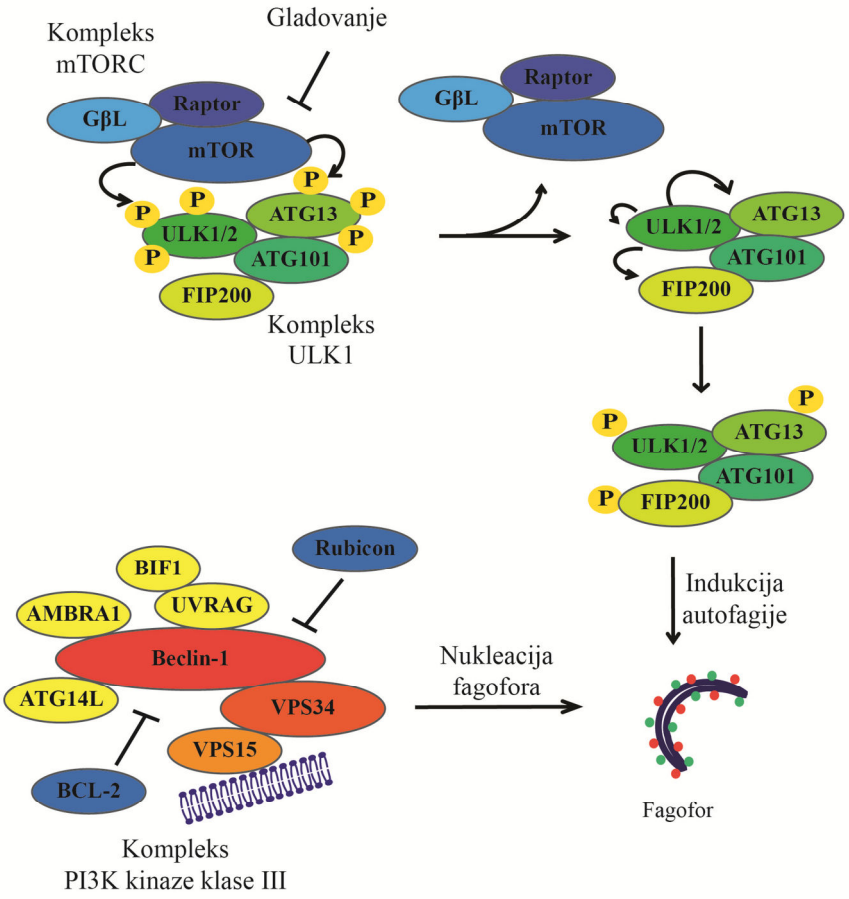
1.4.1 Indukcija i nukleacija fagofora

Početak autofagije reguliran je kompleksom ULK1 (engl. *UNC-51 like kinase*) (44) koji se sastoji od proteina ULK1/2, ATG13, FIP200 (engl. *RB1-inducible coiled-coil 1*) i ATG101. Aktivnost kompleksa ULK1 regulirana je kompleksom mTORC (engl. *Mammalian Target of Rapamycin Complex*) koji se sastoji od proteina Raptor (engl. *Regulatory-associated protein of mTOR*), GβL (engl. *Target of rapamycin complex subunit LST8*) i serin/treonin kinaze mTOR (engl. *Mammalian Target of Rapamycin*). Kompleks mTORC inhibira aktivnost kompleksa ULK1 tako što stupa u interakciju s njime i fosforilira proteine ULK1/2 i ATG13. Na kompleks mTORC u stanici djeluju različiti signali kao što su prisutnost i nedostatak hranjivih tvari, faktori rasta, hormoni, unutarstanična koncentracija kalcijevih iona, razina adenozin-trifosfata i kisika, te nakupljanje nefunkcionalnih proteina. mTORC sudjeluje u kontroli mnogih staničnih procesa poput rasta, proliferacije, sinteze proteina i autofagije. Ukoliko stanica osjeti nedostatak hranjivih tvari, dolazi do inhibicije kompleksa mTORC, što se smatra glavnim okidačem za početak autofagije. Inhibicija kompleksa mTORC rezultira njegovom disocijacijom s kompleksa ULK1 i defosforilacijom proteina ULK1/2 i ATG13. Kompleks ULK1 se potom aktivira fosforilacijom FIP200 i ATG19 od strane ULK1 koji također fosforilira samog sebe. Tako aktivirani kompleks ULK1 potiče stvaranje autofagosomalnih membrana (slika 6) (45, 46).

Osim u inicijaciji autofagije regulirane kompleksom mTORC, kompleks ULK1 također sudjeluje i u nukleaciji dovođenjem drugih proteina ATG na autofagosomalnu membranu (47) te u regulaciji proteina ATG9 (48).

Za formiranje fagofora zaslužan je kompleks PI3K klase III sastavljen od proteina VPS34 (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3*), VPS15 (engl. *phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4*) i Beclin-1 (engl. *Bcl-2 interacting myosin/moesin-like coiled-coil protein 1*) (slika 6) (49). Aktivnost tog kompleksa ovisi o različitim pozitivnim [ATG14L, AMBRA1 (engl. *activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy*), BIF1 (engl. *Bax-interacting factor 1*), UVRAG (engl. *UV radiation resistance-associated gene*)] i negativnim [BCL-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) i Rubicon (engl. *RUN domain protein as Beclin 1-interacting and cysteine-rich CONtaining*)] regulatorima koji vežu Beclin-1. Od proteina koji sudjeluju u formiranju fagofora treba spomenuti i skupinu proteina WIPI (engl. *WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*), WIPI1 i WIPI2. Proteini WIPI vežu fosfatidilinozitol-3-fosfate, u kompleksu su s proteinom ATG9 i važni su za sazrijevanje fagofora, no njihov točan mehanizam djelovanja i funkcija nisu još poznati

(50, 51). Protein ATG9 je transmembranski protein koji sudjeluje u transportu lipida između autofagosoma i trans-Golgijeve mrežice ili kasnog endosoma. U normalnim uvjetima protein ATG9 se nalazi na membranama Golgijeve mrežice i kasnog endosoma te aktivacijom autofagije, protein se translocira na membranu fagofora (52).

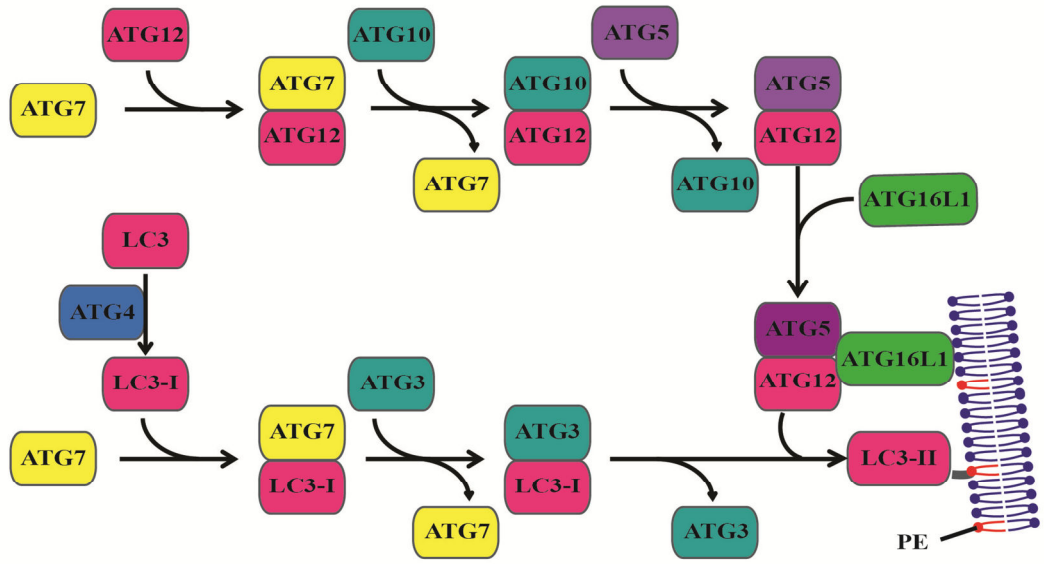


Slika 6. Indukcija i nukleacija fagofora.
U indukciji autofagije sudjeluje kompleks ULK1 koji je reguliran kompleksom mTORC, nakon čega slijedi nukleacija fagofora koja je regulirana kompleksom PI3K klase III.

1.4.2 Elongacija, selektivno vezanje supstrata i formiranje autofagosoma

U rastu i zatvaranju membrane fagofora sudjeluju dva ubikvitinu slična konjugacijska sustava, ATG12 i Atg8/LC3/GABARAP, koji se vežu na fagofor i pospješuju širenje i zaokruživanje njegove dvostruke membrane. Ti proteini ne pokazuju aminokiselinsku sličnost s ubikvitinom već se sličnost očituje na strukturalnoj razini i mehanizmu aktivacije (53). Oba sustava, ATG12 i Atg8/LC3/GABARAP, u prvom koraku aktivacije koriste protein ATG7, koji je analogan enzimu E1 prilikom aktivacije ubikvitina. Konjugaciju ATG12 s ATG5 omogućuje ATG10, protein sličan enzimu E2 ubikvitinskog sustava. Konjugat ATG12-ATG5

stupa u interakciju s proteinom ATG16L vezanim za membranu te zajedno stvaraju veliki kompleks na membrani novonastalog fagofora. Prije aktivacije protein Atg8/LC3/GABARAP pocijepa cisteinska proteaza ATG4 formirajući protein LC3-I. Slijedi aktivacija Atg8/LC3/GABARAP proteinom ATG7. Tako aktivirani Atg8/LC3/GABARAP prenosi se na protein ATG3. Konačnu konjugaciju proteina Atg8/LC3/GABARAP i fosfatidiletanolamina (PE) posreduje kompleks ATG5-ATG12, čija je uloga slična ubikvitinskom enzimu E3 (54). Time protein Atg8/LC3/GABARAP postaje kovalentno vezan za lipidnu komponentu PE novonastajućeg fagofora, te se naziva LC3-II (slika 7).



Slika 7. Konjugacija ATG12 i LC3.
Konjugacija proteina ATG12 s ATG5 i ATG16L1 događa se pomoću enzima ATG7 i ATG10. Protein LC3 prvo se aktivira enzimom ATG4. Slijedi konjugacija pomoću enzima ATG7 i ATG3. Konačni korak konjugacije proteina LC3 i fosfatidiletanolamina (PE) posreduje kompleks ATG5-ATG12.

Kvaščev Atg8 evolucijski je konzervirani protein s čak osam ortologa u sisavcima koji se mogu podijeliti u dvije proteinske obitelji. Obitelj MAP1LC3 (engl. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*) čine četiri člana – dvije varijante LC3A, LC3B i LC3C, te četveročlana obitelj GABARAP/GATE-16 (engl. *gamma-aminobutyric-acid-type-A-receptor-associated protein/Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa*) – GABARAP, GABARAP-L1, GABARAP-L2/GATE-16 i GABARAP-L3. Smatra se da svih osam ortologa proteina Atg8 sudjeluju u formiranju autofagosomalne membrane (55).

Kod autofagije inducirane nedostatkom hranjivih tvari, autofagosomalna membrana neselektivno obuhvaća bilo koji dio citoplazmatskog sadržaja dok se selektivnom autofagijom, preko autofagosomalnih receptora, obuhvaća točno određeni sadržaj koji je određen za razgradnju u lizosomima.

Proces stvaranja autofagosoma završava fuzijom dvaju krajeva rastuće autofagosomalne membrane. Do sada je nepoznato kako se taj proces odvija, ali je predloženo sudjelovanje proteina Atg8/LC3/GABARAP i ATG16L (56). Nakon stvaranja autofagosoma, kompleks ATG12-ATG5 se otpušta s vezikula, dok LC3-II ostaje vezan na membrani te će se degradirati u lizosomu zajedno sa sadržajem autofagosoma. Zbog zadržavanja proteina LC3-II na membrani autofagosoma do konačnog stapanja s lizosomom, LC3 se koristi kao pouzdani marker autofagosomalne aktivnosti (57, 58).

1.4.3 Fuzioniranje s lizosomima

Zreli autofagosomi transportiraju se u perinuklearnu regiju blizu središta organizacije mikrotubula (MTOC, engl. *microtubule-organizing center*), gdje se stapaju s lizosomima. Pokazano je da u transportnom procesu sudjeluju mikrotubularni motorički proteini dinein i kinezin-1 (59, 60).

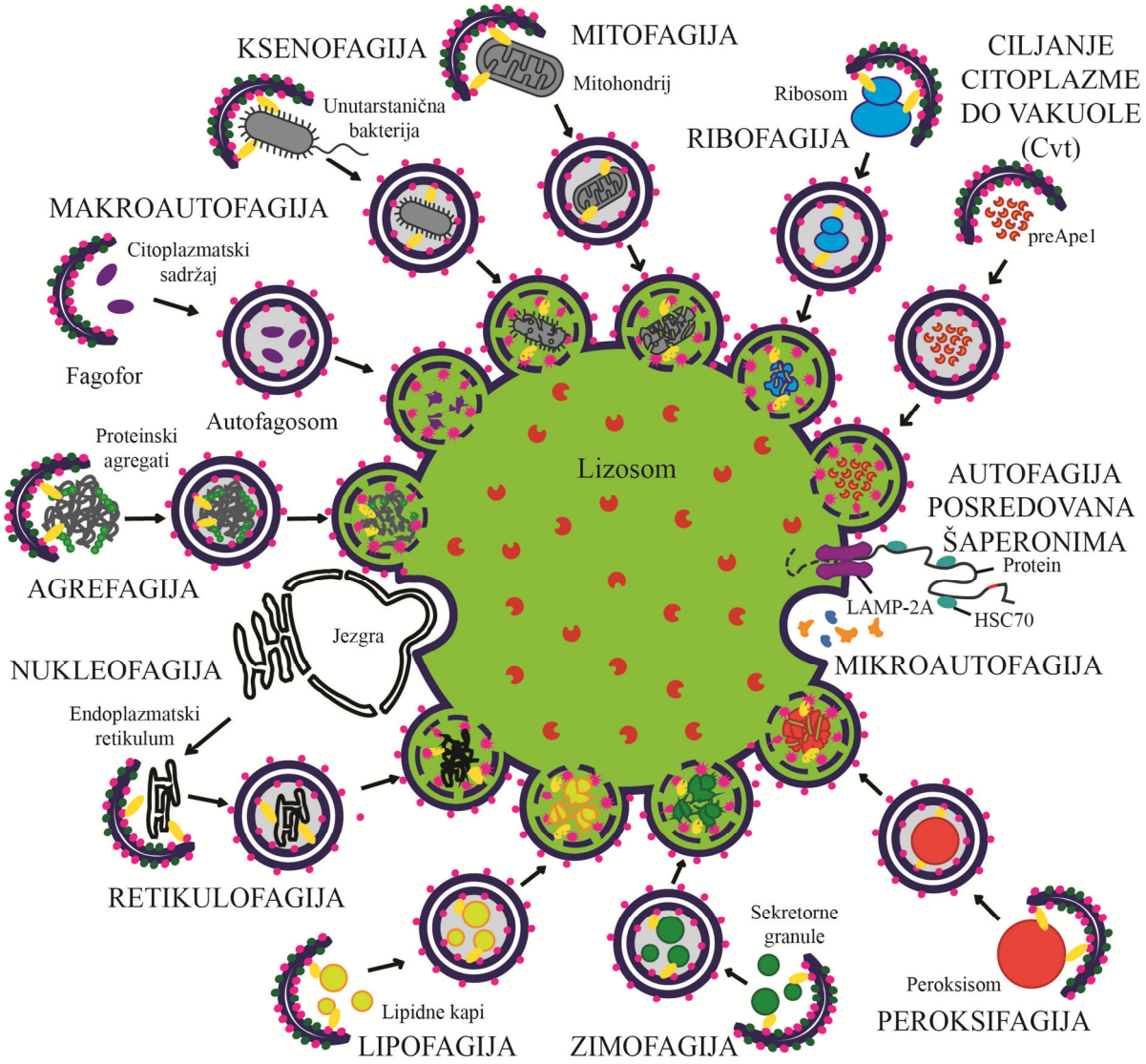
Autofagosom se može direktno spojiti s lizosomom, ali se također, prije spajanja s lizosomom, može spojiti i s nekim komponentama endocitoze (rani endosom, kasni endosom, multivezikularna tijela) tvoreći amfisome (61).

Fuzija autofagosoma s lizosomom odvija se istim principom kao i fuzija drugih vezikula s lizosomom. Protein UVRAG dovodi fuzijski aparat. Dolazi do aktivacije proteina Rab7 (engl. *Ras-related protein Rab-7a*) koji posreduje u LAMP1/2 ovisnom putu lizosomske fuzije (62). Ovaj završni proces kontroliraju i kompleksi SNARE (engl. *soluble N-ethylmalemide-sensitive factor activating protein receptors*), ESCRT (engl. *endosomal sorting complex required for transport*), COPI (engl. *coat protein complex I*) i HOPS (engl. *homotypic fusion and vacuole protein sorting*) (63).

Kao rezultat fuzije nastaje autolizosom u kojem se pomoću kiselih hidrolaza razgradi sav sadržaj te se novonastale male molekule otpuštaju u citoplazmu gdje će se iskoristiti u drugim staničnim procesima.

1.5 Selektivna autofagija

Autofagija se u početku smatrala neselektivnim procesom važnim za opstanak stanice u stanju gladovanja gdje se neselektivno razgrađuje citoplazmatski sadržaj. U međuvremenu je otkriveno kako autofagija može selektivno prepoznati i razgraditi stanične komponente kao što su organeli, ribosomi, stanične nakupine proteina ili patogeni. Ovisno o sadržaju koji se razgrađuje autofagijom, može se razlikovati nekoliko vrsta selektivne autofagije: retikulofagija (razgradnja endoplazmatskog retikuluma), peroksifagija (razgradnja peroksisoma), mitofagija (razgradnja mitohondrija), lipofagija (razgradnja lipidnih kapi), zimofagija (razgradnja sekretornih granula), nukleofagija (razgradnja dijelova jezgre), ksenofagija (razgradnja patogena – bakterija, virusa), ribofagija (razgradnja ribosoma), agrefagija (razgradnja proteinskih agregata) (slika 8) (32). U kvasaca postoji još dodatna vrsta autofagije ciljanje citoplazme do vakuole (Cvt, engl. *cytoplasm to vacuole targeting*) kojom se lizosomske hidrolaze dostavljaju u vakuolu, kvaščev ekvivalent lizosoma (64).



Slika 8. Vrste selektivne autofagije.
Ovisno o sadržaju koji se razgrađuje autofagijom, razlikuje se nekoliko vrsta selektivne autofagije: retikulofagija (razgradnja endoplazmatskog retikuluma), peroksifagija (razgradnja peroksisoma), mitofagija (razgradnja mitohondrija), lipofagija (razgradnja lipidnih kapi), zimofagija (razgradnja sekretornih granula), nukleofagija (razgradnja dijelova jezgre), ksenofagija (razgradnja patogena – bakterija, virusa), ribofagija (razgradnja ribosoma), agrefagija (razgradnja proteinskih agregata).

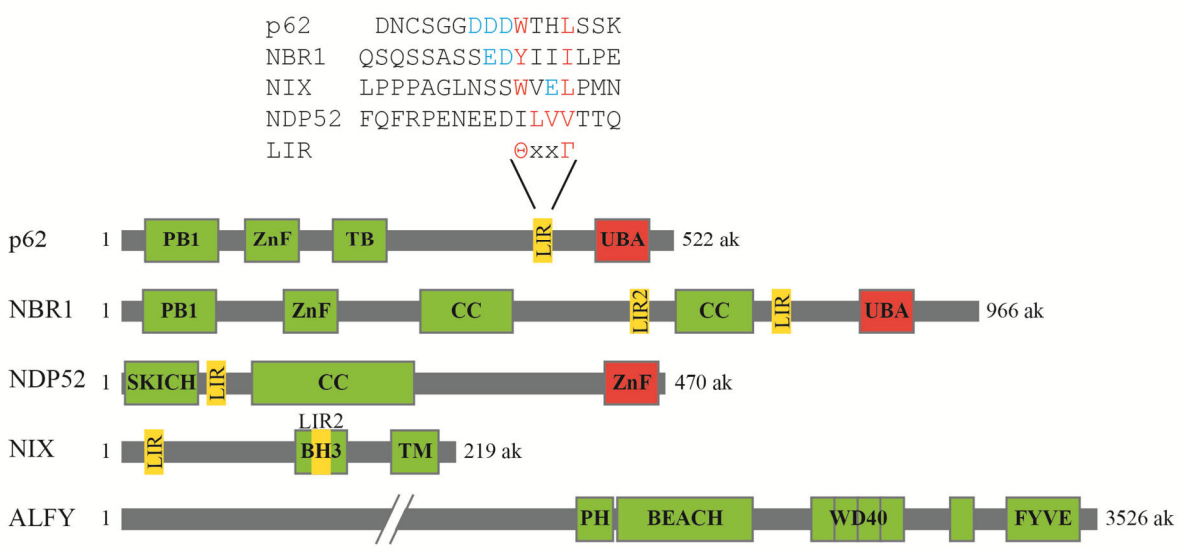
1.5.1 Autofagosomalni receptori

Selektivnost procesa omogućuju autofagosomalni receptori koji se jednim krajem proteina vežu za protein LC3/GABARAP na autofagosomalnoj membrani, a drugim prepoznaju supstrat. Do sada je poznato nekoliko autofagosomalnih receptora. Proteini p62 (engl. *SQSTM/A170*), NBR1 (engl. *neighbor of BRCA1 gene*) i ALFY (engl. *autophagy FTVE protein*) receptori su za autofagiju proteinskih nakupina (65-67). Proteini NIX/BNIP3L (engl. *BC, L2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like*), BNIP3 (engl. *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3*) i FUNDC1 (engl. *FUN14 domain-containing protein 1*) sudjeluju u autofagiji mitohondrija (68-70), dok protein NDP52 (engl. *nuclear dot protein 52 kDa*) sudjeluje u autofagiji bakterije *Salmonella enterica* (71). Osim u autofagiji proteinskih nakupina, protein p62 djeluje kao autofagosomalni receptor i u autofagiji peroksisoma (72), mitohondrija (73), unutarstaničnih bakterija (74) i ribosomskih proteina (75).

U ovom istraživanju dokazali smo da je novi receptor optineurin uključen u autofagiju proteinskih nakupina (76), te je ujedno i receptor za autofagiju bakterije *Salmonella enterica* (77).

Zajedničke karakteristike autofagosomalnih receptora su istovremeno vezanje na autofagosomalni protein LC3/GABARAP preko domene LIR, i za supstrat, što se za većinu receptora događa preko proteina ubikvitina kojim je supstrat obilježen, te sposobnost oligomeriziranja. Prvi opisani autofagosomalni receptor je protein p62/SQSTM (66) koji se sastoji od nekoliko domena, među kojima su N-terminalna oligomerizirajuća domena (PB1), C-terminalna ubikvitin vezujuća domena (UBA) i domena LIR u sredini.

Autofagosomalni receptori vežu protein LC3/GABARAP preko domene LIR (engl. *LC3-Interacting Region*) (slika 9). Domenu LIR karakterizira središnja konsenzus sekvenca ΘxxΓ, gdje je Θ aromatska aminokiselina, x bilo koja aminokiselina a Γ leucin ili izoleucin (65). Prilikom interakcije domene LIR i proteina LC3, aminokiseline Θ i Γ smještaju se u hidrofobni džep proteina LC3. Kisele, negativno nabijene aminokiseline koje prethode samom motivu ΘxxΓ dodatno pojačavaju tu interakciju (78).



Slika 9. Shematski prikaz autofagosomalnih receptora p62, NBR1, NDP52, NIX i ALFY s detaljnim prikaz domene LIR.
PB1 – oligomerizirajuća domena (engl. *Phox and Bem1 domain*), ZnF – domena cinkova prsta (engl. *Zinc finger domain*), TB – TRAF6 vezujuća domena (engl. *TRAF6-binding domain*), UBA – ubikvitin vezujuća domena (engl. *ubiquitin-associated domain*), CC – domena zavojite uzvojnice (engl. *coiled coil domain*), LIR – LC3 vezujuća domena (engl. *LC3-Interacting Region*), SKICH (engl. *skeletal muscle and kidney-enriched inositol phosphatase carboxyl homology domain*), BH3 (engl. *Bcl-2 homology 3 domain*), TM – transmembranska domena, BEACH (engl. *beige and chediak-higashi*), PH (engl. *Pleckstrin homology domain*), WD40 – ponavljanja domene WD40 (engl. *WD40 repeats, beta-transducin repeat*), FYVE (engl. *Fab1, YOTB/ZK632.12, Vac1, and EEA1 domain*) ak – aminokiselina. Domena LIR označena je žutom bojom, domena preko koje protein veže ubikvitinske lance označena je crvenom bojom, dok su sve ostale domene označene zelenom bojom.

1.5.2 Mitofagija

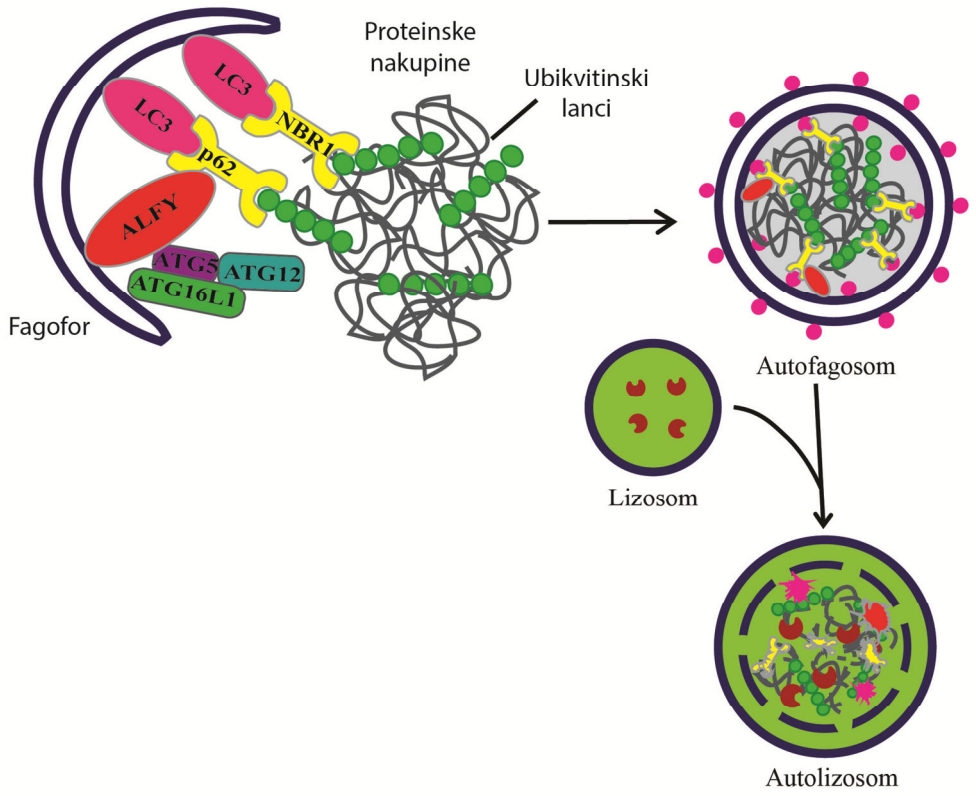
Mitofagija je selektivna autofagija oštećenih mitohondrija ali i neoštećenih mitohondrija prilikom diferencijacije pojedinih staničnih oblika (70). Malo je poznato o samom mehanizmu selektivnog prepoznavanja mitohondrija. Proučavani proteini koji sudjeluju u mitofagiji su kinaza PINK1 i E3 ubikvitin ligaza parkin. Mutacije u genima PINK1 i Parkin povezane su s razvojem Parkinsonove bolesti jer onemogućuju uklanjanje oštećenih mitohondrija (79). Ligaza parkin ubikvitinira proteine mitofuzine, MFN1 i MFN2, važne za fuziju mitohondrija. Ubikvitinacija mitofuzina nužna je za njihovu razgradnju proteasomom čime se zaustavlja mitohondrijska fuzija. Nemogućnost fuzije kao mehanizma popravka oštećenih mitohondrija aktivira mitofagiju (80). Nadalje, protein p62 prepoznaje ubikvitinirani VDAC1 (engl. *Voltage-Dependent Anion Channel 1*) preko svoje UBA domene i dovlači autofagosomalnu membranu vezanjem za protein LC3 (73). Kod mitofagije tijekom razvojnih procesa, uklanjanju se neoštećeni i funkcionalni mitohondriji te je u tom procesu dokazano sudjelovanje dvaju homolognih proteina NIX (69) i BNIP3 (68, 81) te FUNDC1 (82). Ti proteini se nalaze na vanjskoj mitohondrijskoj membrani, preko svoje LIR domene vežu autofagosomalni protein LC3 i tako dovlače autofagosomalnu membranu. Za razliku od drugih autofagosomalnih receptora ne posjeduju vezujuću domenu za ubikvitin te ne djeluju posredstvom ubikvitina već sudjeluju u izravnoj interakciji mitohondrija s proteinima na autofagosomalnoj membrani.

1.6 Razgradnja proteinskih nakupina

Iako se još uvijek raspravlja jesu li proteinske nakupine toksične za stanicu ili štite stanicu od toksičnih oligomernih oblika abnormalnih proteina, sigurno je da eliminacija proteinskih nakupina u stanici povećanjem aktivnosti autofagije i UPS-a ublažuje patogenezu u raznim neurodegenerativnim modelima.

Kako bi se održala homeostaza u stanici, abnormalni i nefunkcionalni proteini moraju se razgraditi i ukloniti iz stanice. Prvi korak je razgradnja abnormalnih i nefunkcionalnih proteina putem ubikvitinskog proteasomalnog sustava i autofagije posredovane šaperonima. Ukoliko ta dva sustava zakažu ili stanica sintetizira puno veću količinu proteina nego ih ta dva sustava mogu razgraditi, dolazi do stvaranja proteinskih nakupina koje su štetne za stanicu. Pomoću selektivne autofagije stanica pokušava ukloniti proteinske nakupine.

U selektivnoj autofagiji proteinskih nakupina, okarakterizirana su tri autofagosomalna receptora, p62, NBR1 i ALFY (slika 10) (66, 67, 83). Proteinske nakupine obilježavaju se lancima proteina ubikvitina. Tako obilježene proteinske nakupine prepoznaju autofagosomalni receptori p62 i NBR1 koji se vežu za ubikvitinske lance proteinskih nakupina preko domene UBA te se preko svoje domene LIR vežu na protein LC3 koji se nalazi na autofagosomalnoj membrani. Tako autofagosomalni receptori sudjeluju u selektivnom dopremanju ubikvitiniranih proteinskih nakupina do fagofora. Proteini p62 i NBR1 su tipični autofagosomalni receptori. Osim domena UBA i LIR, proteini također posjeduju domenu PB1 koja im omogućava oligomerizaciju. Svojom oligomerizacijom stvaraju mrežu i pospješuju slaganje abnormalnih proteina u složene proteinske nakupine i njihovu razgradnju pomoću autofagije. Protein ALFY veže proteine p62 i ATG5 te svojom domenom FVEI fosfatidilinozitol-3-fosfate čime dodatno pospješuje interakciju autofagosomalnih proteina, kompleksa ATG5-ATG12-ATG16 i proteina LC3 lokaliziranih na autofagosomalnoj membrani, s proteinskim nakupinama obilježenim proteinima ubikvitinom i p62 (67, 84).



Slika 10. Autofagija proteinskih nakupina.
Proteinske nakupine obilježene lancima proteina ubikvitina prepoznaju autofagosomalni receptori p62 i NBR1 koji istovremeno vežu protein LC3 na autofagosomalnoj membrani. Protein ALFY veže proteine p62 i ATG5 te svojom domenom FVEI fosfatidilinozitol-3-fosfate čime dodatno pospješuje interakciju autofagosomalnih proteina, kompleksa ATG5-ATG12-ATG16 i proteina LC3 lokaliziranih na autofagosomalnoj membrani, s proteinskim nakupinama obilježenim proteinima ubikvitinom i p62.

Osim ubikvitinacije, posttranslacijske modifikacije kao što su acetilacija, fosforilacija i SUMOilacija abnormalnih proteina važne su za uspješnu autofagiju proteinskih nakupina jer pospješuju njihovu eliminaciju (85-87). Acetilacija abnormalnih proteina može biti signal za razgradnju, (acetilacija huntingtina) (86), ili može služiti kao inhibicijski signal koji sprečava autofagosomalnu razgradnju (protein ataksin 7) (88). Fosforilacija mutiranog proteina huntingtin pomoću kinaze IKK (engl. *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*) pospješuje njegovu razgradnju ali i utječe na druge posttranslacijske modifikacije samog proteina kao što su acetilacija, SUMOilacija i ubikvitinacija.

Protein HDAC6 (engl. *histone deacetylase 6*) još je jedan u nizu proteina povezanih s autofagijom proteinskih nakupina. Proteinske nakupine imaju tendenciju nakupljanja u perinuklearnom području, blizu središta organizacije mikrotubula (MTOC engl. *The microtubule-organizing center*), u složene poliubikvitinirane strukture agresome. Protein

HDAC6, mikrotubularna deacetilaza, vezući motoričke proteine dineine sudjeluje u formiranju i prijenosu agresoma do autofagosomalne mašinerije. Vezanje za proteinske nakupine događa se posredstvom ubikvitinskih lanaca. Također, protein HDAC6 sudjeluje u formiranju F-aktinske mreže čime pospješuje fuzioniranje autofagosoma s lizosomima (89, 90). U stanicama s utišanom ekspresijom proteina HDAC6, ne stvaraju se veliki agresomi već puno malih proteinskih nakupina ravnomjerno raspoređenih po cijeloj stanici (91)

Kao dodatni dokaz uloge autofagije i ubikvitinsko-proteasomalnog sustava su animalni modeli za neurodegenerativne bolesti. Aktivacijom ili inhibicijom tih procesa dolazi do poboljšanja ili pogoršanja fenotipa u tim modelima. Također, ako se u mišjem modelu Alzheimerove bolesti snizi ekspresija proteina Beclin-1 dolazi do povećanog nakupljanja proteinskih nakupina i pogoršanja fenotipa. Obrnuti efekt postiže se s pojačanom ekspresijom Beclin-1 (92). Pokazano je da se razina autofagije smanjuje s godinama (93). Homeostaza je bitna u svim stanicama, ali stanice koje se više ne dijele, kao što su neuroni i miociti, posebno su osjetljive na promjene homeostaze. Kako je autofagija bitna u održavanju homeostaze, smanjenje njezine razine u neuronima pridonosi nakupljanju abnormalnih i nefunkcionalnih proteina u proteinske nakupine dovodeći do njihovog oštećenja i propadanja. Smanjenje razine autofagije tako pridonosi razvoju neurodegenerativnih bolesti.

Istraživanja su pokazala da je nakupljanje i uklanjanje proteinskih nakupina regulirano ubikvitinsko-proteasomalnim sustavom i autofagijom. Sve je više dokaza da su ta dva protealitička sustava povezana, ali još nije poznat mehanizam kojim međusobno komuniciraju. Pokazalo se da utjecajem na aktivnost jednog sustava, dolazi do promjene aktivnosti drugog sustava (94). Pojačana aktivnost autofagije kompenzacijski je mehanizam prilikom inhibicije ubikvitinsko-proteasomalnog sustava (95). S druge strane, inhibicija autofagije blokira proteasomalnu aktivnost tako što se protein p62 veže i nakuplja na ubikvitiniranim abnormalnim proteinima i sprečava njihovo dostavljanje proteasomu, a time i razgradnju putem proteasoma (96). Zajednička karakteristika dvaju degradacijskih putova je signalna molekula ubikvitin te bi ona mogla biti ključna nepoznata poveznica između njih.

1.7 Protein optineurin

Protein optineurin je 67 kDa veliki multifunkcionalni protein koji sudjeluje u mnogim procesima u stanici. Kodira ga gen OPTN (na kraćem kraku kromosoma 10 u regiji 13 – 10p13) koji se sastoji od 3 nekodirajuća egzona u regiji 5'-UTR te 13 egzona koje kodiraju protein od 577 aminokiselina. Postoje tri različite forme mRNA koje sve kodiraju za isti protein, a nastaju različitim prekrajanjem 5'-UTR. Homolozi u drugim kralježnjacima (majmunu, mišu, štakoru i ribi zebrici) pokazuju veliku sličnost s humanim proteinom optineurinom, dok niže vrste pokazuju malu ili nikakvu sličnost. Protein optineurin također pokazuje veliku homologiju na razini proteinske sekvence ali i organizaciji domena s proteinom NEMO (engl. *NF-kappa-B essential modulator*). Eksprimiran je u većini humanih tkiva. Kako optineurinski promotor posjeduje NF-κB vezujuće mjesto, TNFα (tumor nekrotirajući faktor alfa) i infekcije mogu pojačati ekspresiju proteina optineurina u stanici (97-99). Iako je reguliran NF-κB putem te pokazuje sličnost s proteinom NEMO, istraživanja su pokazala da sudjeluje i u mnogim drugim staničnim putovima (100).

Lokalizacija proteina optineurina u stanici još uvijek nije jasna. Pokazalo se da je lokaliziran primarno na trans-Golgijevoj mrežici i post-Golgijevim vezikulama, ali i u perinuklearnoj regiji te difuzno u stanici. Novije istraživanje pokazalo je da se translocira u jezgru tijekom mitoze (101). Iako se pokazalo da je protein optineurin lokaliziran na trans-Golgijevoj mrežici preko proteina Rab8 (engl. *Ras-related protein Rab-8A*), mutacija u UBAN domeni koja onemogućuje vezanje za poliubikvitinske lance uzrokuje redistribuciju proteina difuzno u citoplazmu. Ovo sugerira da je proteinu optineurinu za lokalizaciju na trans-Golgijevoj mrežici, uz vezanje za protein Rab8, potrebna i interakcija s još nepoznatim poliubikvitniranim proteinom.

1.7.1 Građa proteina optineurina

Protein je građen od nekoliko domena (slika 11). Posjeduje tri domene zavojite uzvojnice (CC) koje mu omogućavaju oligomerizaciju te se smatra se da mu je nativna forma dimer iako može raditi i oligomere. Zbog svoje strukturne sličnosti s proteinom NEMO ali i proteinom ABIN, nije isključeno da formira i heteromere. Na C-terminalnom kraju nalazi se domena cinkova prsta (ZnF) i ubikvitin vezujuća domena (UBAN). Proteini ABIN, NEMO i OPTN imaju konzerviranu UBAN domenu preko koje vežu različite ubikvitinske lance, s najvećim afinitetom za linearne ubikvitinske lance, i nešto manjim afinitetom za K63 ubikvitinske lance. U ovom istraživanju okarakterizirali smo domenu LIR između 178 i 181 aminokiseline sa sekvencom FVEI preko koje se veže na autofagosomalni protein LC3.



Slika 11. Shematski prikaz strukture proteina optineurina.
CC – domena zavojite uzvojnice (engl. *coiled coil domain*), LIR – LC3 vezujuća domena (engl. *LC3-Interacting Region*), UBAN – ubikvitin vezujuća domena u proteinima ABIN i NEMO (engl. *Ubiquitin binding in ABIN and NEMO*), ZnF – domena cinkova prsta (engl. *Zinc finger domain*), ak – aminokiselina.

1.7.2 Funkcija proteina optineurina

Protein optineurin otkriven je kao interakcijski partner adenoviralnog protein E3-14.7K te je nazvan 14.7K vezujući protein-2 ili FIP-2 (97). Protein je kasnije povezan s primarnim glaukomom otvorenog kuta (POAG, engl. *primary open-angle glaucoma*) te preimenovan u optineurin prema engl. *optic neuropathy inducing*. U daljnjim istraživanjima pokazano je da stupajući u interakciju s mnogim proteinima (tablica 2) sudjeluje u mnogim staničnim procesima poput membranskog transporta i transporta vezikula, stanične morfogeneze, regulacije signalnog puta NF-κB, signalne transdukcije, regulacije transkripcije te kontrole stanične diobe.

1.7.2.1 Protein optineurin u regulaciji signalnog puta NF-κB

Istraživanja su pokazala da protein optineurin sudjeluje u regulaciji signalnog puta NF-κB. Prilikom stimulacije s TNFα, protein optineurin svojom domene UBAN natječe se s proteinom NEMO za vezanje poliubikvitiniranih supstrata kao što je RIP-1 (engl. *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*) i tako inhibira NF-κB aktivaciju (102). Vezući se na poliubikvitinirani protein RIP-1, omogućio je njegovu deubikvitinaciju pomoću deubikvitinitaze CYLD (engl. *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD*) (103). Istom

domenom protein optineurin veže protein TAX-1 (Contactin-2, engl. *Transient axonal glycoprotein 1*) i zajedno s proteinom TAX1BP1 (engl. *Tax1-binding protein 1*) ubikvitinira TAX-1 što dovodi do aktivacije NF-κB (104). Također je pokazano da se protein optineurin veže i na protein A20, deubikvitinazu koja negativno regulira NF-κB signalni put (105). Pretpostavlja se da bi protein optineurin mogao biti adapter koji dovodi deubikvitinaze do poliubikvitiniranih proteina i tako negativno regulira NF-κB signalni put induciran s TNFα. Nedavno istraživanje je pokazalo se da protein NEMO veže na linearne ubikvitinske lance preko svoje UBAN domene i tako regulira NF-κB signalni put (106). Kako protein optineurin posjeduje istu UBAN domenu, pretpostavlja se da bi i protein optineurin mogao sudjelovati u regulaciji NF-κB signalnog puta ali i drugih signalnih putova vezući se na linearne poliubikvitinske lance. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila točna uloga proteina optineurina u regulaciji NF-κB signalnog puta.

1.7.2.2 Protein optineurin u membranskom transportu

Protein optineurin sudjeluje u membranskom transportu i organizaciji trans-Gogijeve mrežice vezući se s proteinima Rab8, huntingtin i miozin VI. Protein Rab8 mala je GTPaza koja sudjeluje u transportu vezikula između trans-Golgijeve mrežice i plazma membrane. U tom transportu također sudjeluje i protein huntingtin koji zajedno s proteinima Rab8 i optineurin stvara kompleks koji omogućuje transport tih vezikula (107, 108). Protein Rab8 vezan je za membranu trans-Golgijeve mrežice, te se preko optineurina povezuje s huntingtinom koji je vezan za dinein, a time i mikrotubule, te tako omogućuje transport vezikula preko mikrotubula.

Protein miozin VI je multifunkcionalni motorički protein vezan na aktinske filamente koji sudjeluje između ostalog u endocitozi i sekretornom membranskom transportu. Vezući se na protein optineurin koji je preko Rab8 vezan na trans-Gogijevu mrežicu, protein miozin VI sudjeluje u transportu vezikula od trans-Golgijeve mrežice do plazma membrane (109). Inhibirajući ekspresiju bilo kojeg od proteina huntingtin, miozin VI ili optineurina, dolazi do poremećaja organizacije trans-Gogijeve mrežice što pokazuje da su ti proteini važni za organizaciju trans-Gogijeve mrežice. Tako se protein optineurin pokazao kao važan protein u koordinaciji trans-Gogijeve mrežice i transporta vezikula preko aktinskih ili mikrotubularnih filamenata do endosoma, lizosoma ili plazma membrane.

1.7.2.3 Protein optineurin u antivirusnom prirođenom imunološkom odgovoru

Kinaza TBK1 (engl. *TANK-binding kinase 1*) sudjeluje u aktivaciji antivirusnog prirođenog imunološkog odgovora tako što fosforilacijom aktivira transkripcijske faktore IRF3/IRF7 (engl. *Interferon regulatory factor 3/ Interferon regulatory factor 7*), a time i transkripciju gena IFN-B (engl. *Interferon beta*). Protein optineurin negativno regulira antivirusni prirođeni imunološki odgovor tako što inhibira IRF3 fosforilaciju i ekspresiju gena IFN-B vezući se s kinazom TBK1, ali sam mehanizma inhibicije nije još razjašnjen (110). Iako kinaza TBK1 direktno veže protein optineurin svojim N-terminalnim dijelom, u ovom slučaju za tu interakciju odgovorna je domena UBAN što upućuje na regulaciju ubikvitinacijom. U prilog tome ide nedavno istraživanje proteina ABIN, homolognog proteinu optineurinu, koji u kompleksu s deubikvitinazama TAX1BP1 i A20, onemogućuje interakciju E3 ligaze TRAF3 s kinazom TBK1 što dovodi do smanjene ubikvitinacije TBK1 i inhibicije antiviralnog prirođenog imunološkog odgovora (111).

1.7.2.4 Protein optineurin u regulaciji mitoze

Najnovija istraživanja pokazuju sudjelovanje proteina optineurina u regulaciji mitoze. Kinaza Plk1 (engl. *Polo-like kinase 1*) kao glavni regulator stanične diobe regulira nekoliko različitih koraka diobe te je njena aktivnost prostorno i vremenski regulirana na razini transkripcije, razgradnje i fosforilacije (112). Tijekom mitoze kinaza Plk1 fosforilira protein optineurin koji disocira od proteina Rab8 i premješta se s trans-Golgijeve mrežice u jezgru. Protein optineurin potiče fosforilaciju MYPT1 (engl. *Myosin phosphatase-targeting subunit 1*) pomoću Cdk1 (engl. *Cyclin-dependent kinase 1*) koji se zatim veže na kinazu Plk1 i inhibira njenu kinaznu aktivnost. Tako kinaza Plk regulira lokalizaciju proteina optineurin kako bi regulirala vlastitu aktivnost, a time i mitozu stanice (101).

Tablica 2. Lista interakcijskih partnera proteina optineurina.
CoIP – ko-imunoprecipitacija (engl. *co-immunoprecipitation*), TAP-TAG [engl. *TAP (Tandem affinity purification) tagging method*], UBAN – ubikvitin vezujuća domena, Y2H – metoda kvaščevog sustava dvaju hibrida (engl. *yeast two-hybrid*), NA – nije definirano. *Preuzeto i modificirano od Kachaner et al., Cell Cycle, 2012(100).*

Interakcijski partner	**Metoda**	**Interakcijska regija (ak)**	**Funkcija**	**Referenca**
TBK1	Y2H, CoIP	1-127	Indukcija IFN-β i antivirusni odgovor	(110, 113)
MYPT1	TAP-TAG, CoIP	131-170	Dioba i migracija stanica	(101)
Rab8	Y2H, CoIP	141-209	Transport vezikula, stanična morfogeneza	(101, 107, 108)
TFIIIA	Y2H	160-496	Transkripcija	(114)
mGluR1	Y2H	202-246	Regulacija signalnog puta metabotropičnog glutamata	(115)
Tax1	Y2H, CoIP	300-577	HTLV1 onkoprotein	(104)
E3–14.7K	Y2H	395-577	Viralni protein E3 adenovirusa	(97)
Huntingtin	Y2H, CoIP	411-461	Transport vezikula, post-Golgijev transport do lizosoma	(107, 108)
CYLD	Y2H	412-520	Negativni regulator NF-κB	(103)
Miozin VI	Y2H	412-520	Egzocitoza, morfogeneza Golgijeve mrežice	(109)
polyUb RIP1	GST pull down	UBAN	Regulacija NF-κB signalnog puta	(102)
Plk1	CoIP	NA	Regulacija mitoze	(101)
Polycistin-2	CoIP	NA	Kalcijevi kanali	(116)
TAX1BP1	CoIP	NA	Regulacija NF-κB signalnog puta	(104)
Receptor za transferin	CoIP	NA	Recikliranje endocitozom	(117)
A20	Y2H	NA	Negativni regulator NF-κB	(105)
BAT4	Y2H	NA	Imunologija	(105)
TBC1D17	Y2H	NA	Rab-GAP protein	(105)
UXT	Y2H	NA	Pozitivni regulator NF-κB	(105)
ZBTB33	Y2H	NA	Stanični rast i razvoj	(105)
Fos	Pull down	NA	Protoonkogen, transkripcijski faktor	(118)
TRAF3	Pull down	NA	Indukcija IFN-β i antivirusni odgovor	(110)

1.7.3 Protein optineurin u glaukomu i Pagetovoj bolesti kosti

Mutacije u proteinu optineurinu povezane su s primarnim glaukomom otvorenog kuta (POAG, engl. *primary open-angle glaucoma*), posebno s podvrstom glaukomom s normalnim očnim tlakom (NPG, engl. *normal tension glaucoma*) u kojoj se javljaju u 16,7% slučajeva (119). Glaukom je skupina bolesti vidnog živca i jedan od glavnih uzroka sljepoće u svijetu kao posljedica gubitka i oštećenja stanica mrežničkih ganglija. Najčešća mutacija u genu optineurinu, E50K, pokazuje najjaču poveznicu s POAG. U transgeničnom mišu s tom mutacijom, dolazi do spontane apoptoze stanica mrežničkih ganglija i smanjenja debljine retine (120). Analizom štakorskih mrežničkih neurona u kulturi stanica, dokazano je kako je samo ta mutacija dovoljna za njihovu smrt i da mutacija E50K jedino u tim stanicama, od četiri različitih vrsta ispitanih stanica, uzrokuju apoptozu (121). Druga mutacija H486R, pojavljuje se kod mlađih osoba i karakterizirana je težim oblikom bolesti. Nađene su još razne mutacije (H26D, M98K, E103D, T202R, K322E, A336G, A377T, H486R) ali još uvijek nije razjašnjen mehanizam kojim dolazi do propadanja stanica mrežničkih ganglija, kao ni zašto su samo te stanice pogođene mutacijama u genu za optineurin (100).

Druga bolest koja je povezana s mutacijama u genu optineurin je Pagetova bolest kosti. To je kronična bolest kosti gdje dolazi do poremećaja remodeliranja kosti s prekomjernom resorpcijom te pojačanim stvaranjem nove kosti u isto vrijeme što rezultira zadebljanjem i deformacijom kosti. Genetičkom analizom pacijenata s Pagetovom bolesti kosti, nađeni su neki polimorfizmi unutar gena optineurin kao mogući genetski rizici za razvoj bolesti (122, 123). Nisu provedena nikakva daljnja istraživanja u kojima bi se ispitala uloga proteina optineurina u Pagetovoj bolesti kosti.

1.7.4 Protein optineurin u neurodegenerativnim bolestima

U nedavnim istraživanjima mutacije u proteinu optineurinu po prvi put su povezane s amiotrofičnom lateralnom sklerozom. U tom istraživanju pronađene su mutacije u genu u pacijenata s obiteljskim i sporadičnim oblikom ALS iz Japana (124). Osim što su pronađene mutacije u genu, pokazana je prisutnost proteina optineurina u proteinskim inkluzijama u motoričkim neuronima lumbalnog dijela leđne moždine. Do sada je pronađeno 14 različitih mutacija od kojih pet uzrokuje preuranjeni stop kodon (delecija egzona 5, G23X, Q165X, Q398X, insercija c.691-692insAG) i sedam točkastih mutacija (A93P, R96L, T282P, Q314L, E478G, Q454E, K557T), te dvije intronske mutacije (c.552+1delG, c.1401 +4A/G) (124-131). Jedino je insercija c.691-692insAG koja dovodi do preuranjenog stop kodona pronađena

i u POAG-u i ALS-u. Iako je do sada pronađeno ovih nekoliko mutacija, u nekim istraživanjima nisu pronađene nikakve mutacije u genu optineurin (132, 133) te je potrebno napraviti dodatna istraživanja kako bi se moglo sa sigurnošću reći da su mutacije u genu zaista povezane s ALS-om.

Osim u proteinskim inkluzijama u pacijenata s ALS-om, protein optineurin pronađen je lokaliziran na proteinskim inkluzijama u pacijentima s Alzheimerovom (na neurofibrilarnim vlakanima i distrofičnim neuritima), Parkinsonovom (na Lewysovim tjelešcima i Lewysovim neuritima), Creutzfeldt-Jakobovom bolesti (u *ballooned* stanicama), s multiplom sustavnom atrofijom (na glijalnim citoplazmatskim inkluzijama) i Picovom bolesti (na Pickovim tjelešcima) te na proteinskim inkluzijama poliglutaminskih bolesti DRPLA, SCA2 i SCA3 (134-137). Iako optineurin lokalizira u proteinskim inkluzijama u raznim neurodgenerativnim bolestima, samo određeni postotak pacijenata ima optineurinske pozitivne proteinske inkluzije (138).

1.8 Animalni modeli istraživanja neurodegenerativnih bolesti

Animalni modeli za istraživanje neurodegenerativnih bolesti koji se najčešće koriste su miš (*Mus Musculus*), riba zebrica (*Danio rerio*), vinska mušica (*Drosophila melanogaster*) i oblić (*Caenorhabditis elegans*). Najviše istraživanja napravljeno je upotrebom mišjih modela raznih neurodegenerativnih bolesti. Napravljeni su mnogi transgenični mišji modeli s utišanom ekspresijom proteina ili pojačanom ekspresijom mutiranih proteina koji su povezani s neurodegenerativnim bolestima. Postoje transgenični modeli s eksprimirani mutiranim proteinima SOD1, TDP-43, FUS, huntingtin, α synuclein, ataksina i mnogih drugih proteina. Ti modeli ne pokazuju sve aspekte bolesti, ali su dobri za bolje razumijevanje mehanizama razvoja neurodegenerativnih bolesti. Svi oni pokazuju jednake neurodegenerativne promjene kao i u pacijenata s istom mutacijom proteina. Iako je miš najsrodniji ljudima te su tako i rezultati dobiveni u tim istraživanjima najpouzdaniji, zbog skupoće održavanja, malog broja potomaka i dugog trajanja istraživanja, druga tri modela koriste se vrlo uspješno u ovim istraživanjima. Svi imaju brzi razvojni ciklus s velikim brojem potomaka i relativno jeftinim održavanjem. Limitirajuće je što se građom i strukturom tkiva i organa uvelike razlikuju od ljudi, a neki pak ljudski proteini nisu konzervirani u tim modelima. I takvi modeli dobri su za istraživanje glavnih bioloških procesa koji su konzervirani.

Riba zebrica spada u novije modelne organizme, i koristi se prije svega u istraživanjima razvojne biologije i toksikologiji. Ovo je dobar modelni organizam zbog jednostavnog uzgoja i brzog razmnožavanja s velikim brojem embrija, kao i zbog vanjske oplodnje i prozirnosti embrija. Moguća je jednostavna genetička manipulacija mikroinjektiranjem mRNA i morfolino oligonukleotida u embrij. Mikroinjektiranjem mRNA dolazi do kratkotrajne ekspresije nekog proteina, a mikroinjektiranjem morfolino oligonukleotida dolazi do kratkotrajnog utišavanja ekspresije proteina. Morfolino oligonukleotidi kemijski su modificirani oligonukleotidi koji se specifično vežu za mRNA blizu start kodona i time sprečavaju translaciju proteina. Također se mogu vezati za pre-mRNA na prijelazu između egzona i introna čime sprečavaju pravilno prekrajanje i sazrijevanje mRNA (139). Tehnika mikroinjektiranja mRNA i morfolino oligonukleotida pokazala se dobrom, brzom i specifičnom. Nedostatak metode je kratkotrajan efekt ekspresije, svega 72 sata od fertilizacije. Postoje i mnoge transgenetičke linije ribe zebrice gdje se istraživanja rade i na odraslim jedinkama. Pokazala se i kao dobar model za neke bolesti, prije svega neurodegenerativne bolesti kao što su amiotrofična lateralna skleroza, Huntingtonova, Parkinsonova i Alzheimerova bolesti (140).

2 HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Protein optineurin nedavno je povezan s amiotrofičnom lateralnom sklerozom, pronalaženjem mutacija u genu za optineurin u pacijentima s ALS-om, te prisutnošću proteina optineurina u proteinskim nakupinama. Istovremeno smo, u našem laboratoriju, korištenjem kvaščevog sustava dvaju hibrida (engl. *yeast-two-hybrid*), pokazali da je protein optineurin interakcijski partner autofagosomalnog proteina LC3, što ga dovodi u vezu s procesom autofagije.

S obzirom da prisutnost proteina optineurina u proteinskim nakupinama nije proučavana, te je do sada ostala nepoznata veza proteina optineurina i autofagije, postavili smo pitanje: sudjeluje li protein optineurin i na koji način u procesu selektivne autofagije proteinskih nakupina? Stoga, svrha je ovog istraživanja bila utvrditi ulogu proteina optineurina pri uklanjanju proteinskih nakupina kakve nastaju u neurodegenerativnim bolestima. Razumijevanje staničnih mehanizama koji uklanjaju proteinske nakupine može pomoći u razvoju djelotvornih tretmana koji bi se koristili pri liječenju neurodegenerativnih bolesti.

2.1 Hipoteza

Sukladno tome, ovim istraživanjem testirali smo hipotezu da je optineurin novi autofagosomalni receptor za selektivnu autofagiju proteinskih nakupina u neurodegenerativnim bolestima.

2.2 Ciljevi istraživanja

Istraživanje funkcije novih proteina uključenih u proces uklanjanja proteinskih nakupina, koje su glavno obilježje neurodegenerativnih bolesti, ključno je za razumijevanje nastajanja, ali i liječenja tih bolesti. S obzirom na nove spoznaje o proteinu optineurinu, poput njegove prisutnosti u proteinskim nakupinama, postojanju mutacija u genu optineurinu u pacijenata koji boluju od neurodegenerativne bolesti amiotrofične lateralne skreloze kao i povezanosti proteina optineurina s procesom autofagije, važno je razjasniti i detaljno istražiti ulogu optineurina u procesu autofagije proteinskih nakupina.

Stoga je glavni cilj ovog istraživanja razjasniti ulogu proteina optineurina u molekularnim mehanizmima regulacije autofagije proteinskih nakupina, te uključuje specifične ciljeve:

1. potvrditi prisutnost optineurina u proteinskim nakupinama u raznim modelima neurodegenerativnih bolesti,
2. istražiti biokemijske karakteristike interakcije proteina optineurina s proteinskim nakupinama,
3. istražiti ulogu proteina optineurina u procesu autofagije proteinskih nakupina, i
4. ispitati utjecaj mutacije gena za optineurin na nastanak i progresiju ALS-a u modelnom organizmu ribe zebrice.

U ovom istraživanju korištena su dva česta modela proteinskih nakupina: prvi, mutirani protein superoksid dismutaza s mutacijom u glicinu 93 (SOD1 G93C) i drugi, mali fragment proteina huntingtina (prvi egzon koji kodira za 92 aminokiseline) s poliglutaminskim nizom od 103 glutamina (htt ex1 Q103) konjugirane sa zelenim fluorescentnim proteinom (GFP, engl. *green fluorescent protein)*. Istraživanje se je provodilo na staničnoj liniji HeLa. Stanice HeLa s privremeno ili stabilno izraženim mutiranim proteinima GFP-SOD1 G93C i GFP-htt ex1 Q103 korištene su kao stanični model za proteinske nakupine u Huntingtonovoj bolesti i ALS-u (67, 141). Rezultati dobiveni na staničnim kulturama provjereni su na modelima ALS-a u mišu i ribi zebrici. Model miša za ALS bila je transgenična linija C57/B6 s ekspresijom humanog mutiranog proteina SOD1 G93A (142), dok je model ribe zebrice za ALS napravljen privremenom ekspresijom mutiranog proteina SOD1 mikroinjektiranjem mRNA u embrij ribe zebrice (143).

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

Standardne kemikalije korištene u izradi ovog rada (kurzivom su označeni proizvođači): aceton (*Carl Roth GmbH*); adenozin trifosfat (ATP, *Sigma Aldrich*); agar (*Carl Roth GmbH*); agaroza (*Invitrogen*); agarozne kuglice s vezanim proteinom G (engl. *Protein G Agarose*, *Roche*); albumin iz goveđeg seruma (BSA, Carl *Roth GmbH*); amiloidne kuglice (engl. *Amylose beads*, *New England Biolabs*); amonijev persulfat (APS, *Sigma Aldrich*); ampicilin (*Carl Roth GmbH*); aprotinin (*Sigma Aldrich*); BafilomicinA1 (BafA1, *LC laboratories*); bromfenolno plavilo (Carl *Roth GmbH*); cinkov klorid (*Sigma Aldrich*); Coomasie Brilliant Blue R250 (*Carl Roth GmbH*); DAPI (*Sigma Aldrich*); deoksi-nukleotid trifosfat (dNTP, *Invitrogen*); dimetil-sulfoksid (DMSO, *Sigma Aldrich*); dinatrijev hidrogen fosfat (Na_2HPO_4, *Sigma Aldrich*); ditiotreitol (DTT, *Sigma Aldrich*); Dulbeccova modifikacija Eagleovog medija (DMEM, engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, *PAA*); Earlova izotonična slana otopina (EBSS, engl. *Earle's Balanced Salt Solution, Gibco*); ekstrakt kvasca (*Fluka*); etanol (*Sigma Aldrich*); etidijev bromid (*Carl Roth GmbH*); etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA; *Riedel-deHaen*); etilenglikoltetraoctena kiselina (EGTA, *Carl Roth GmbH*); fenilmetilsulfonilfluorid (PMSF, *Carl Roth GmbH*); feniltiourea (PTU, *Sigma Aldrich*); fenol crveno (*Sigma Aldrich*); fetalni goveđi serum (FBS, *PAA*); fotografski film (*Fuji*); glicerol (*Kemika*); β-glicerol fosfat (*Sigma Aldrich*); glicin (*Carl Roth GmbH*); glukoza (*Kemika*); glutationske sefarozne kuglice (engl. *Glutathione Sepharose™ 4B beads*, *GE Healthcare*); glutation (*Sigma Aldrich*); hidroksietil-piperazinetansulforična kiselina (HEPES, *Sigma Aldrich*); imidazol (*Sigma Aldrich*); izopropanol (*Kemika*); izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG, *Carl Roth GmbH*); kalcijev klorid (*Carl Roth GmbH*); kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4, *Sigma Aldrich*); kalijev klorid (KCl, *Sigma Aldrich*); kanamicin (*Carl Roth GmbH*); koktel fosfataznih inhibitora (engl. *PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche*); koktel proteaznih inhibitora (engl. *Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche*); ksilen cijanol (*Sigma Aldrich*); kuglice GFP-Trap® (*ChromoTek*); leupeptin (*Sigma Aldrich*), magnezijev klorid (*Carl Roth GmbH*); magnezijev sulfat ($MgSO_4$, *Sigma Aldrich*); malation (*Sigma Aldrich*); maltoza (Roth); β- merkaptoetanol (*Carl Roth GmbH*); metanol (*Sigma Aldrich*); metilen plavo (*Sigma Aldrich*); MG132 (engl. *Carbobenzoxyl-leucyl-leucyl-leucinal, Sigma Aldrich*); mlijeko u prahu (*Carl Roth GmbH*);

natrijev acetat ($NaCH_2COOH$, *Carl Roth GmbH*); natrijev azid (NaN_3, *Sigma Aldrich*); natrijev deoksikolat (DOC, *Carl Roth GmbH*); natrijev dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4, *Sigma Aldrich*); natrijev dodecilsulfat (SDS, *AppliChem*); natrijev fluorid (NaF, *Sigma Aldrich*); natrijev klorid (NaCl, *Kemika*); natrijev ortovanadat (Na_3VO_4, *Sigma Aldrich*); Ni-NTA agarozne kuglice (*Qiagen*); nitrocelulozna membrana (*GE Healthcare*); N,N,N,N-tetrametil-etilendiamin (TEMED, *Sigma Aldrich*); NP-40 (*Fluka*); octena kiselina (*Kemika*); Opti-MEM medij (Invitrogen); otopina 40% akrilamid/0,8% bisakrilamid (*AppliChem*); paraformaldehid (*Sigma Aldrich*), penicilin-streptomicin (*GIBCO*); pojačivač kemiluminiscencije luminol (*Santa Cruz Biotechnology*); polietilenglikolsorbitan monolaurate (Tween-20, *Carl Roth GmbH*); PonceauS (*Carl Roth GmbH*); puromicin (*Sigma Aldrich*); rapamicin (*Sigma Aldrich*); transfekcijski reagens GeneJuice (*Novagen*); transfekcijski reagens Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen); tripsin (*PAA*); tripton (*Fluka*); Tris baza (*Trizma base, Sigma Aldrich*); Triton X-100 (*Carl Roth GmbH*)

3.1.2 Mikroorganizmi i stanice

Za potrebe umnažanja plazmidne DNA korištene su kompetentne bakterije *Escherichia coli,* soj DH5α, dok je za potrebe proizvodnje proteina korišten soj *E. coli* BL21. Tijekom istraživanja korištene su stanične linije HEK293T i HeLa. Staničnu liniju HeLa sa stabilno izraženim proteinima CFP htt ex1 Q25 i htt ex1 Q103 dobiven je na poklon od dr. Anne Simonsen iz Norveške.

3.1.3 Protutijela

Tablica 3. Značajke primarnih protutijela upotrijebljenih u ovom istraživanju.

Naziv protutijela	Porijeklo	Vrsta protutijela	Proizvođač
anti-actin	miš	monoklonalno	Sigma-Aldrich
anti-Flag M2	miš	monoklonalno	Sigma-Aldrich
anti-GFP	miš	monoklonalno	Roche
anti-GST	miš	monoklonalno	Santa Cruz Biotechnology
anti-HA	miš	monoklonalno	Covance
anti-His	miš	monoklonalno	Novagen
anti-LC3	kunić	poliklonalno	Poklon od dr. Z. Elazar
anti-LC3, PM036	kunić	poliklonalno	MBL
anti-MBP	miš	monoklonalno	Sigma-Aldrich
anti-myc	miš	monoklonalno	Santa Cruz Biotechnology
anti-optineurin, ab23666	kunić	poliklonalno	Abcam
anti-p62	kunić	poliklonalno	Enzo Life Science
anti-pSer177 optineurin	kunić	poliklonalno	Proizvedeno od immunoGLobe®
anti-SOD1	kunić	monoklonalno	Epitomics
anti-synaptic vesicle 2 (SV2)	miš	monoklonalno	DSHB
anti-TBK1	kunić	poliklonalno	Cell Signaling
anti-Ub, FK2	miš	monoklonalno	Enzo Life Science
anti-vinculin	miš	monoklonalno	Sigma-Aldrich

Tablica 4. Značajke sekundarnih protutijela upotrijebljenih u ovom istraživanju

Naziv protutijela	Konjugat	Porijeklo	Proizvođač
anti-kunićje IgG	HRP	koza	Dako
anti-mišje IgG	HRP	koza	BioRad
anti-kunićje IgG	Cy3	magarac	Jackson Immuno Research
anti-mišje IgG	Cy3	magarac	Jackson Immuno Research
anti-mišje IgG	Cy5	koza	Jackson Immuno Research
anti-kunićje IgG	Cy5	koza	Jackson Immuno Research
anti-mišje IgG	Alexa488	magarac	Invitrogen

3.1.4 Enzimi

Tijekom kloniranja za cijepanje vektora i PCR produkata korišteni su restrikcijski enzimi *BamHI, XhoI, EcoRI, XbaI* (*Fermentas*). Enzim *DpnI (Fermentas)* korišten je prilikom *in vitro* mutageneze. U reakcijama PCR za umnažanje fragmentata DNA korištene su polimareze *Taq* (Fermentas) i *Pwo (Peqlab),* a za *in vitro* mutagenezu *PfuII (Agilent)*. Enzim benzonaza (*Merck*), dio pufera za lizu, korišten je za uklanjanje DNA iz proteinskih staničnih lizata. Ligaza T4 (*New England Biolabs*) korištena je u koraku ligacije tijekom kloniranja. Enzim trombin (*GE Healthcare*) korišten je za cijepanje konjugiranog proteina od glutation-S-transferaze (GST). Lambda fosfataza (λ-PPase, engl. *Lambda Protein Phosphatase, New England BIolabs*) je korištena za defosforilaciju proteina optineurina, a rekombinantna kinaza TBK1 (*Upstate, Milipore*) za fosforilaciju proteina optineurina.

3.1.5 Oligonukleotidi

- siRNA oligonukleotidi – korišteni za prolazno utišavanje ekspresije gena u staničnim kulturama:
    - Kontrolna siRNA: Non-Targeting siCONTROL #2 (*Thermo Ficher*)
    - siRNA OPTN #1: 5'-GCACGGCAUUGUCUAAAUA-3'
    - siRNA OPTN #2: 5'-GAAGUUUACUGUUCUGAUU-3'
    - siRNA TBK1: 5'-GACAGAAGUUGUGAUCACA-3'
- morfolino oligonukleotidi (AMO, engl. *antisense morpholino oligonucleotides*; *Gene Tools*):
    - kontrolni AMO: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'
    - OPTN ATG-AMO: 5'-CGATGATCCAGATGCCATGCTTTCT-3'
    - OPTN splice-AMO: 5'- AAATTTCTCTCACCTCAGCTCCACT-3'

3.1.6 Markeri

DNA marker – 1 kb DNA marker (*BioLabs*)

Proteinski marker – Precision plus protein TM Dual color standards (*Bio-Rad*)

– Protein Marker VI (10-245) prestained (*AppliChem*)

3.1.7 Komercijalno dostupni kompleti

- Komplet za izolaciju plazmidne DNA (*GeneJET Plasmid MiniPrep Kit, Fermentas*)
- Komplet za izolaciju plazmidne DNA (*QIAfilter Plasmid Purification Kit – MidiPrep, Qiagen*)
- Komplet za ekstrakciju DNA iz agaroznog gela (*GeneJET Gel Extraction Kit, Fermentas*)
- Komplet za *in vitro* transkripciju (*mMESSAGE mMACHINE® T7 Kit*, *Invitrogen*)

3.1.8 Hranjive podloge za uzgoj bakterija

- Tekuća hranjiva podloga (LB, engl. *Luria-Bertani broth*): 10 g tripton (engl. *bacto tryptone*), 5 g ekstrakt kvasca (engl. *bacto yeast extract*) i 10 g natrijev klorid, do 1 L H_2O
- Kruta hranjiva podloga: 10 g tripton, 5 g ekstrakt kvasca, 10 g natrijev klorid, 15 g agar, do 1 L H_2O

U sve tekuće i krute podloge dodan je ampicilin (50mg/ml) ili kanamicin (25 mg/ml) kao selekcijski antibiotik. Sve hranjive podloge i otopine autoklavirane su 15 minuta pri 120 °C.

3.1.9 Puferi i otopine

- Pufer za lizu stanica – dobivanje proteinskog staničnog lizata: 50 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 25 mM NaF, 1% Triton X-100, 10% glicerol, 10 µg $ZnCl_2$, proteazni inhibitori i inhibitori fosfataza koji se dodaju svježe prije upotrebe (1 mM PMSF, 2 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL aprotinin, 1 mM natrijev ortovanadat)
- RIPA pufer – za lizu embrija zebrica: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% DOC, 1% SDS, proteazni inhibitori i inhibitori fosfataza koji se dodaju svježe prije upotrebe (1 mM PMSF, 2 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL aprotinin, 1 mM natrijev ortovanadat)
- Pufer za lizu stanica – za frakcioniranje citoplazmatskih topivih proteina: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM $MgCl_2$, 0,5% NP-40, proteazni inhibitori i inhibitori fosfataza koji se dodaju svježe prije upotrebe (1 mM PMSF, 2 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL aprotinin, 1 mM natrijev ortovanadat)
- Pufer za lizu stanica – za frakcioniranje netopivih proteinskih nakupina: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM $MgCl_2$, 0,5% NP-40, 2% SDS, benzonaza, proteazni inhibitori i inhibitori fosfataza koji se dodaju svježe prije upotrebe (1 mM PMSF, 2 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL aprotinin, 1 mM natrijev ortovanadat)

- GST inkubacijski pufer: 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 150 mM NaCl, 2,5 mM $CaCl_2$, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 1 mM DTT
- Fosforilacijski pufer: 20mM HEPES, pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 200 μM ATP, 20 mM β-glicerolofosfat, 1 mM DTT, 0,1 mM natrijev ortovanadat
- Defosforilacijski pufer (engl. *NEBuffer for Protein MetalloPhosphatases (PMP), New England Biolabs*): 50 mM HEPES, pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.01% Brij 35
- 50X TAE pufer: 2 M Tris, 0,5 M EDTA, 1 M octena kiselina
- 6X DNA pufer za nanošenje uzoraka: 50% glicerol, 0,1 M EDTA, 1% SDS, 0,2% bromfenolno plavilo, 0,2% ksilen cijanol
- Pufer za gel za razdvajanje (engl. *separation gel*): 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4% SDS
- Pufer za gel za sabijanje (engl. *stacking gel*): 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4% SDS
- 2X Laemmli pufer: 25 mL Tris, pH 6,8, 20 mL glicerol, 20 mL SDS, 10%, 1 mg bromfenolno plavilo, 5% β-merkaptoetanol
- 10X PBS (engl. *Phosphate-Buffered Saline*), pH 7,3: 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g NaH_2PO_4 X $7H_2O$, 2 g KH_2PO_4
- 10X pufera za elektroforezu (engl. *running buffer*): 30 g Tris, 144 g glicin, 10 g SDS, do 1 L H_2O
- 10X pufer za transfer: 22,3 g Tris, 105 g glicin, do 1 L H_2O
- 20X TBS (engl. *Tris-Buffered Saline*), pH 7,6: 201,17 mM Tris, 1,98 M NaCl
- Otopina za ispiranje membrana: 1X TBS, 0,1% Tween, pH 7,4
- Otopina Ponceau S: 0,5 g Ponceau S, 10 mL octena kiselina, do 100 ml H_2O
- Blokirajuća otopina za imunoblot analizu: 1X TBS, pH 7,5, 5% BSA, 0,1% natrijev azid, fenol red
- GST pufer 1: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, pH 8, 5 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0,1% β merkaptoetanol
- GST pufer 2: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, pH 8, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 0,1% β merkaptoetanol
- GST pufer 3: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1% β merkaptoetanol, 0,1% NaN_3
- His pufer 1: 50 mM NaH_2PO_4, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol
- Pufer za eluciju: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 20 mM reducirani glutation ili 10 mM maltoza ili 250 mM imidazol
- Otopina za bojanje Coomassie briliant plavom bojom: 10 ml octena kiselina, 40 ml metanol, 0,025% Coomassie Brilliant Blue R250, do 100 ml H_2O

- Otopina za odbojavanje Coomassie briliant plavom bojom: 10 ml octena kiselina, 20 ml metanol, do 100 ml H_2O
- Otopina za fiksaciju stanica: 2% paraformaldehid u 1X PBS
- Otopina za permeabilizaciju stanica: 1X PBS, 0,2% Triton X-100
- Otopina za ispiranje stanica: 1X PBS, 0,1% Tween
- MOWIOL otopina: 2,4 g Mowiol 4-88, 6 ml glicerol, 6 ml H_2O, 12 ml 0,2 M TrisHCl, pH 8,5
- Otopina E3 (za embrije zebrica): 5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM $CaCl_2$, 0,33 mM $MgSO_4$, 0,1 metilen plavo, 1X otopine PTU (30 mg/L)
- Otopina 50X PTU: 75 mg feniltiourea (PTU), do 50 ml H_2O
- Otopina za fiksaciju tkiva miša i embrija zebrica: 4% paraformaldehid u 1X PBS
- Blokirajuća otopina za imunofluorescenciju embrija zebrice: 1X PBS, 1% BSA, 1% DMSO
- Otopina za ispiranje embrija zebrice: 1X PBS, 1% Triton X-100

3.1.10 Gelovi

- Agarozni gelovi – pripremaju se otapanjem agaroze u 1X TAE puferu, kad se otopina ohladi dodaje se etidijev bromid do konačne koncentracije 0,5 μg/ml i otopina se izlije u kalup za izlijevanje gelova s umetnutim češljićem. Korišteni su 1-2% gelovi ovisno o veličini fragmenta i plazmida koji su se razdvajali u gelu.
- SDS poliakrilamidni gelovi – sastoje se od dva sloja gela
    - Gel za razdvajanje – 8 do 15% - 40% akrilamid/0,8% bisakrilamid, H_2O, pufer za razdvajanje, 10% APS, TEMED
    - Gel za sabijanje: 40% akrilamid/0,8% bisakrilamid (mL), H_2O, pufer za sabijanje, 10% APS, TEMED

3.1.11 Konstrukti (plazmidna DNA) i plazmidni vektori

Konstrukti korišteni u ovom istraživanju su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Lista konstrukta korištenih u ovom istraživanju

Konstrukt	Plazmid	Porijeklo
HA-OPTN	pcDNA3.1(+)	ovo istraživanje
HA-OPTN F178A	pcDNA3.1(+)	ovo istraživanje
HA-OPTN I181A	pcDNA3.1(+)	ovo istraživanje
HA-OPTN E478G	pcDNA3.1(+)	ovo istraživanje
HA-OPTN ak 1-315	pcDNA3.1(+)	ovo istraživanje
HA-OPTN ak 454-520	pcDNA3.1(+)	ovo istraživanje
HA-OPTN Δak 454-520	pcDNA3.1(+)	ovo istraživanje
HA-OPTN 5xS→A (S170, S171, S173, S174, S177)	pcDNA3.1(+)	ovo istraživanje
HA-OPTN 5xS→D (S170, S171, S173, S174, S177)	pcDNA3.1(+)	ovo istraživanje
HA-OPTN 5xS→E (S170, S171, S173, S174, S177)	pcDNA3.1(+)	ovo istraživanje
HA-OPTN rezistencija na shRNA #3, 7 tihih mutacija	pcDNA3.1(+)	ovo istraživanje
HA-OPTN F178A rezistencija na shRNA #3, 7 tihih mutacija	pcDNA3.1(+)	ovo istraživanje
HA-OPTN E478G rezistentan na shRNA #3, 7 tihih mutacija	pcDNA3.1(+)	ovo istraživanje
GFP-OPTN	pEGFP-C1	ovo istraživanje
GFP-OPTN E478G	pEGFP-C1	ovo istraživanje
GFP-OPTN F178A	pEGFP-C1	ovo istraživanje
GFP-LC3A	pEGFP-C1	Vladimir Kirkin
MBP-OPTN	pMAL-c2x	ovo istraživanje
GST	pGEX-4T-1	GE Healthcare
GST-OPTN	pGEX-4T-1	ovo istraživanje
GST-OPTN ak 1-170	pGEX-4T-1	ovo istraživanje
GST-OPTN ak 1-209	pGEX-4T-1	ovo istraživanje
GST-OPTN ak 1-315	pGEX-4T-1	ovo istraživanje

GST-OPTN ak 169-209	pGEX-4T-1	ovo istraživanje
GST-OPTN ak 454-577	pGEX-4T-1	ovo istraživanje
GST-OPTN ak 454-514	pGEX-4T-1	ovo istraživanje
GST-OPTN 5xS→A (S170, S171, S173, S174, S177)	pGEX-4T-1	ovo istraživanje
GST-Atg8	pGEX-4T-1	ovo istraživanje
GST-GABARAP	pGEX-4T-1	Matthias Mann(144)
GST-GABARAPL-1	pGEX-4T-1	Matthias Mann(144)
GST-GABARAPL-2	pGEX-4T-1	Matthias Mann(144)
GST-LC3-A	pGEX-4T-1	Matthias Mann(144)
GST-LC3-B	pGEX-4T-1	Matthias Mann(144)
GST-ISG15	pGEX-4T-1	Matthias Mann(144)
GST-URM1	pGEX-4T-1	Matthias Mann(144)
GST-UFM	pGEX-4T-1	Matthias Mann(144)
GST-SUMO1	pGEX-4T-1	Matthias Mann(144)
GST-Ub	pGEX-4T-1	Matthias Mann(144)
GST-tetraUb	pGEX-4T-1	Fumiyo Ikeda
myc-TBK1	pcDNA3.1-myc-His_6	Joel Pomerantz
myc-TBK1-KM (K38A)	pcDNA3.1-myc-His_6	Fumiyo Ikeda
Flag-SOD1	pcDNA3	Ryosuke Takahashi
Flag-SOD1 G93A	pcDNA3	Ryosuke Takahashi
GFP-SOD1 (homodimer)	pcDNA3.1	ovo istraživanje
GFP-SOD1 (homodimer)	pEGFP-N1	Albrecht M. Clement(145)
GFP-SOD1 G93C (homodimer)	pcDNA3.1	ovo istraživanje
GFP-SOD1 G93C (homodimer)	pEGFP-N1	Albrecht M. Clement(145)
GFP-htt ex1 Q25	pcDNA3	Dimitri Krainc
GFP-htt ex1 Q103	pcDNA3	Dimitri Krainc
His-SOD1	pRSET	ovo istraživanje
His-SOD1 G93C	pRSET	ovo istraživanje
GST-SOD1	pGEX-4T-1	ovo istraživanje
GST-SOD1 G93C	pGEX-4T-1	ovo istraživanje

Konstrukti klonirani u plazmide pcDNA3, pcDNA3.1, pcDNA3.1(+), pEGFP-C1 i pEGFP-N1 (*Invitrogen*) korišteni su u kulturi stanica za transfekciju stanica HeLa i HEK293T. S druge strane, konstrukti klonirani u plazmide pGEX-4T-1 (*GE Healthcare*), pMAL-c2x (*New England BioLabs*) i pRSET (*Invitrogen*) korišteni za proizvodnju proteina GST, MBP ili His fuzioniranih proteina u bakterija BL21. Konstrukti pcDNA3-Flag-SOD1 i pcDNA3-Flag-SOD1 G93A korišteni su za proizvodnju mRNA pomoću kompleta za *in vitro* transkripciju mMESSAGE mMACHINE® T7 Kit.

3.2 Metode

3.2.1 Protokol istraživanja

Istraživanje je provedeno na staničnim kulturama HeLa i HEK293T stanica, laboratorijskim transgeničnim miševima i ribi zebrici. Istraživanje interakcije optineurina s autofagosomalnim proteinom LC3 i proteinskim agregatima napravljeno je pomoću proteina proizvedenih i pročišćenih iz bakterijskih stanica i stanica HeLa i HEK293T transfeciranih odgovarajućim plazmidima. Stanice HeLa s privremeno ili stabilno izraženim mutiranim proteinima GFP-SOD1 G93C i GFP-htt ex1 Q103 korištene su kao stanični modeli abnormalnih proteinskih nakupina u amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi i Huntingtonovoj bolesti.

Transgenična linija C57/B6 s ekspresijom humanog mutiranog proteina SOD1 G93A (142) korištena je kao model miša za ALS na kojem je istražena fosforilacija i vezivanje proteina optineurina, kao i vezivanje proteina TBK1 na proteinske nakupine mutiranog proteina SOD1.

Privremenom ekspresijom mutiranog proteina SOD1 mikroinjektiranjem mRNA u embrij ribe zebrice napravljen je model ribe zebrice za ALS. Ovim modelom istraženo je kako utišavanje proteina optineurina utječe na simptome ALS-a uzrokovane mutiranim proteinom SOD1. Za utišavanje gena OPTN korištena je metoda RNA interferencije.

3.2.2 Kloniranje DNA

U istraživanjima su korišteni razni plazmidni konstrukti (tablica 5) koji su proizvedeni postupcima genetskog inženjeringa, tj. kloniranjem DNA.

Kako bi se dobili konstrukti cDNA određenog gena ili fragmenta tog gena, cDNA ciljanih gena umnoži se lančanom reakcijom polimerazom (PCR).

- PCR reakcija: kalup DNA, 10X pufer za polimerazu, smjesa dNTP-a, početnice 5' i 3', polimeraza, voda
- PCR program: 1. 95ºC početna denaturacija, 2. 95ºC 1 min (denaturacija), 58 ºC 1 min (vezanje početnica za kalup), 72ºC 1 min (sinteza komplementarnih lanaca) – 35 ciklusa, 3. 72ºC 10 min (završno produživanje lanaca)

PCR produkt i plazmid se pocijepaju odgovarajućim restrikcijskim enzimima inkubacijom u pripadajućem puferu jedan sat na 37ºC. DNA se zatim pročisti elektroforezom

i pomoću kompleta za ekstrakciju DNA iz agaroznog gela. Nakon toga slijedi ligacija PCR produkta s plazmidom pomoću ligaze T4. Tako ligirani plazmidi se transformiraju u bakterije kako bi se umnožili.

Ciljana mutageneza gena dobivena je postupcima metode *in vitro* mutageneze. PCR reakcijom umnožava se cijeli plazmid s insertom pomoću početnica u kojima je ubačena mutacija od interesa. Kako bi se riješili početnog kalupa, PCR smjesa tretira se enzimom *DpnI*. Mutiranim plazmidom transformiraju se bakterije kako bi se umnožili.

Ispravnost svih konstrukata provjerena je sekvenciranjem.

3.2.3 Transformacija bakterije *E. coli* soj DH5α i BL21 plazmidnom DNA

Transformacija bakterijskih stanica provodi se metodom toplinskog šoka. Ukratko, 0,1 - 1 µg plazmidne DNA pomiješa se s 100 µl kompetentnih bakterijskih stanica DH5α. Smjesa se potom inkubira na ledu 30 minuta, nakon čega slijede dvije minute toplinskog šoka pri 42°C. Bakterijama se zatim dodaje 1 ml tekućeg medija LB (bez antibiotika) te se smjesa inkubira jedan sat na 37°C uz miješanje na 500 okretaja/min. Nakon inkubacije, smjesa se centrifugira pet minuta pri 4000 g, supernatant se baci, a talog bakterija nasadi na kruti selekcijski medij LB s antibiotikom (ampicilin ili kanamicin) i ostavi preko noći na 37°C u inkubatoru.

3.2.4 Izolacija plazmidne DNA iz bakterija

Ovisno želi li se izolirati manja ili veća količina plazmidne DNA, bakterije se nasade u 5 ml ili 50 ml tekućeg medija LB sa selekcijskim antibiotikom da rastu preko noći na 37°C uz 200 okretaja/min. Bakterije se potom centrifugiraju pet minuta na 4500 g. Daljnji koraci provode se upotrebom komercijalno dostupnih kompleta za izolaciju plazmidne DNA (*Mini prep kit, Fermentas* ili *Midi prep kit, Qiagen*). Ukratko, talog bakterija resuspendira se u puferu za resuspendiranje nakon čega slijedi dodavanje pufera za lizu. Nakon inkubacije od pet minuta, dodaje se neutralizacijski pufer. Koristeći komplet *Mini prep*, lizirane bakterije se centrifugiraju 10 minuta pri 13 000 g, dok koristeći komplet *Midi prep*, lizirane bakterije se protisnu kroz filter. Supernatant se prebacuje na kolonice koje specifično vežu plazmidnu DNA. Prilikom centrifugiranja kroz kolonicu prolazi supernatat, a plazmidna DNA zaostaje vezana na kolonicu. Kolonicu je potrebno dva puta isprati otopinom za ispiranje. Dodavanjem 50 do 300 µl H_2O na kolonicu, dolazi do oslobađanja plazmidne DNA i njenog skidanja s kolonice. Korištenjem kompleta *Midi prep*, plazmidna DNA se jos dodano pročisti

precipitacijom 70% etanolu. Koncentracija plazmidne DNA određuje se spektrofotometrijski, a izolirana DNA čuva na -20°C.

3.2.5 Proizvodnja i pročišćavanje proteina iz bakterija

Za proizvodnju fuzijskih GST, MBP ili His proteina koristi se soj bakterije *E. coli* BL21. Bakterije se transformiraju plazmidnom DNA kako je prije opisano. Jedna kolonija pokupi se s ploče i nasadi u 5 ml tekuće hranjive LB podloge s ampicilinom i ostave se rasti preko noći na 37°C uz trešnju. Drugi dan bakterijska kultura se prebacuje u 200-500 ml svježe hranjive LB podloge s ampicilinom i nastavi s trešnjom na 37°C. Mjeri se optička gustoća bakterija na 600 nm (OD_{600}). Kad gustoća bakterija naraste na 0,4-0,5 dodaje se 0,5 mM IPTG, a bakterije se puste rasti još četiri sata na 37°C ili preko noći na 16°C. Bakterije se potom prebace u 50 ml *Falcon* tube i centrifugiraju 20 minuta pri 3500 g. Sve navedene korake potrebno je odraditi isključivo na ledu, u hladnoj centrifugi i frižideru. Supernatant se ukloni, a bakterijski talog resuspendira u hladnom fosfatnom puferu. Svi talozi spoje se u jednu tubu i ponovno centrifugiraju. Talog se zatim resuspendira u 10 ml GST pufera 1 za GST i MBP fuzionirane proteine ili 10 ml His pufera 1 za His fuzionirane proteine. Smjesa bakterija lizira se upotrebom ultrazvuka, tzv. sonikacijom u potokolu: 1 sekunda pulsa – 1 sekunda pauze do konačnih 60 pulseva. Nakon soniciranja u otopinu se dodaje 250 µl 20% Triton X-100 i centrifugira 20 minuta pri 10 000 g. Supernatant se zatim inkubira s 200-500 µl glutationskih sefaroznih kuglica (engl. *Glutatione Sepharose 4B beads),* amiloidnih kuglica *(*engl. *Amylose beads*) ili Ni-NTA agaroznih kuglica (engl. *Ni-NTA agarose beads*) jedan sat na 4°C uz rotaciju. Nakon inkubacije kuglice se isperu tri puta GST puferom 2 uz centrifugiranje od tri minute pri 2500 g. Nakon zadnjeg ispiranja, na kuglice se dodaje 200 µL GST pufera 3 u kojem se čuvaju na 4°C. Kvaliteta i količina GST proteina potrebnih za eksperimente *GST pull down* provjeri se denaturirajućom elektroforezom u SDS poliakrilamidnom gelu, koji se boji Coomassie briliant plavom bojom. GST konjugirani proteini skidaju se s kuglica pomoću 20 mM reduciranog glutationa pH 8,8, MBP konjugirani proteini pomoću 10 mM maltoze, a His proteini pomoću 200 mM imidazola. Za cijepanje konjugiranog proteina od GST dijela, kuglice se inkubiraju s trombinom preko noći na 16ºC.

3.2.6 Metoda *GST pull down* i imunoprecipitacija

Za provjeru interakcija između proteina korištene su metode *GST pull down* i imunoprecipitacija. Korištenjem metode *GST pull down* provjeravaju se interakcije između proteina. Željeni protein fuzioniran je s glutation S transferazom (GST), induciran i pročišćen iz bakterija, te vezan na glutationske sefarozne kuglice. U svaku reakcijsku smjesu potrebno je staviti jednaku količinu pročišćenog fuzioniranog GST proteina. Protein vezan na glutationske sefarozne kuglice inkubira se četiri sata ili preko noći na 4°C uz rotaciju s 300 µl pufera za lizu i 100 µl staničnog proteinskog lizata. Za analiziranje direktnih interakcija GST kuglice se inkubiraju u 400 µl GST inkubacijskog pufera s pročišćenim MBP ili His konjugiranim proteinima ili nekonjugiranim proteinima dobivenim cijepanjem trombinom s GST-a kuglica. Kuglice se drugi dan isperu tri puta u puferu za lizu ili GST inkubacijskom puferu s centrifugirajnjem od dvije minute pri 5000 g. U završnom ispiranju odstrani se u potpunosti supernatant i doda 2X Laemmli pufer te se uzorak prokuha pet minuta na 95°C. Uzorci se nakon toga razdvajaju denaturirajućom elektroforezom u SDS poliakrilamidnom gelu, prebace na nitrocelulozu membranu i analiziraju imunokemijski. Kao negativna kontrola u reakciji *GST pull down* koristi se samo GST protein na kojeg nije vezan nikakav protein, kako bi se isključilo nespecifično vezanje na GST komponentu fuzijskog proteina. Kod imunoprecipitacije, umjesto pročišćenih proteina vezanih na glutationske sefarozne kuglice, korištena su protutijela koja su inkubirana sa staničnim lizatima. Prvo se stanični lizat inkubira s primarnim protutijelom dva sata ili preko noći na 4ºC uz rotaciju, a potom se dodaju agarozne kuglice s vezanim proteinom G jedan sat na 4ºC uz rotaciju. Ispiranje kuglica i analiza na gelu je ista kao i kod metode *GST pull down*.

3.2.7 Kapljična analiza proteinskih agregata

Purificirani protein His-SOD1 G93C (20 µM) inkubira se u 10 mM fosfatnom puferu s 5 mM EDTA i 10 mM DTT 20 sata na 37ºC kako bi se induciralo *in vitro* stvaranje proteinskih nakupina. Tako stvorene proteinske nakupine inkubirane su s purificiranim proteinima GST i GST-OPTN (20 µM) jedan sat na 37ºC. Uzroci su potom centrifugirani 30 minuta na 4°C pri 13 000 g. Supernatant je odvojen od taloga, a talog je još dodatno ispran tri puta s fosfatnim puferom. Tako pripremljeni uzorci nakapani su na nitrocelulozu membranu i analizirani metodom imunodetekcije s protutijelima anti-His i anti-GST.

3.2.8 *In vitro* fosforilacija i defosforilacija

U metodi *in vitro* fosforilacije purificirani proteini GST-OPTN i GST-OPTN 5xS→A vezani na glutationske sefarozne kuglice inkubirani su s 50 ng rekombinantnog proteina TBK1 u 30 µL fosforilacijskog pufera tijekom 30 minuta na 30ºC. Reakcija je zaustavljena dodatkom 2X Laemmli pufera. Uzroci su analiziraju denaturirajućom elektroforezom u SDS poliakrilamidnom gelu koji se oboji koji se boji Coomassie briliant plavom bojom.

Kod metode *in vitro* defosforilacije, stanice koje eksprimiraju proteine myc-TBK1 i HA-OPTN lizirane su u puferu za lizu s dodatkom koktela proteaznih i fosfataznih inhibitora. Stanični lizati inkubirani su s protutijelom anti-HA tijekom tri sata na 4ºC uz rotaciju, a potom su inkubirani s agaroznim kuglicama s proteinom G jedan sat na 4ºC uz rotaciju. Agarozne kuglice prvo su isprane tri puta puferom za lizu, poslije čega su dva puta isprane u defosforilacijskom puferu. Tako pripremljeni uzorci inkubirani su s 200 jedinica lambda fosfataze u 30 µL defosforilacijskog pufera s dodanim 1 mM $MnCl_2$ tijekom 30 minuta na 30ºC. Reakcija je zaustavljena dodatkom 2X Laemmli pufera. Uzroci su analiziraju denaturirajućom elektroforezom u SDS poliakrilamidnom gelu nakon koje slijedi imunodetekcija.

3.2.9 Kultura stanica

Stanice HEK293T i HeLa uzgajaju se u uvjetima *in vitro*, u inkubatoru za staničnu kulturu, u atmosferi od 5% CO_2 i pri temperaturi od 37°C, u hranjivoj podlozi DMEM nadopunjenoj s 10% fetalnim govođim serumom (FBS, od engl. *fetal bovine serum*). U medij se dodaju antibiotici penicilin (100 U/mL) i streptomicin (100 µL/g). Pasažiranje stanica provodi se svaka tri dana, a za odvajanje stanica od podloge koristi se 1% otopina tripsina. Stanice HeLa s privremeno ili stabilno izraženim mutiranim proteinima GFP-SOD1 G93C i GFP/CFP-htt ex1 Q103 korištene su kao stanični model za proučavanje proteinskih nakupina u ALS-u i Huntingtonovoj bolesti (67, 141).

Za transfekciju stanica HEK293T i HeLa koristi se transfekcijski reagens GeneJuice. Dan prije transfekcije stanice se nasađuju prema uputama proizvođača (količina stanica u odnosu na relativnu površinu posude za staničnu kulturu) u pločice sa 6 ili 12 bunarića (engl. *6-well, 12-well plate*). Stanice se transfeciraju u omjeru DNA (µg) : GeneJuice (µL) 1:3. Za jednu jažicu koristi se od 0,5 do 1 µg DNA. Pripremi se reakcijska smjesa s GeneJuice-om u mediju Opti-MEM u koju se zatim doda plazmidna DNA. Nakon inkubacije od 10 minuta na

sobnoj temperaturi, smjesa se nakapa na stanice. Stanice se 24 do 48 sati nakon transfekcije koriste za daljnje eksperimente.

Za stabilno utišavanje gena OPTN koristio se je sistem lentiviralne transdukcije s kratkim RNA ukosnicama (shRNA) dok se za privremeno utišavanje gena koristi tehnika RNA interferencije upotrebom molekula siRNA i transfekcijskog reagensa Lipofectamine™ RNAiMAX. Stanice su prilikom nasađivanja tretirane sa smjesom molekula siRNA i transfekcijskim reagensom Lipofectamine™ RNAiMAX. U mediju Opti-MEM napravi se smjesa u omjeru 20 μM siRNA (μL) : Lipofectamine™ RNAiMAX (μL) koja se inkubira 15 minuta prije stavljanja u pločice sa stanicama. Stanice se nasađuju u medij DMEM s 10% FBS bez antibiotika te se transfeciraju plazmidima 24 sati nakon nasađivanja. Uspješnost utišavanja gena dokazuje se imunodetekcijom 72 sata nakon nasađivanja stanica.

3.2.10 Indukcija ili inhibicija autofagije. Inhibicija proteasoma

Stanice HeLa i HEK293T su podvrgnute raznim tretmanima koji reguliraju proces autofagije ili proteasomalne razgradnje. Tretiranjem stanica kemikalijom rapamicin inhibira se mTOR signalni put čime se inducira proces autofagije i razgradnja autofagosomalnih vezikula što rezultira smanjenim brojem autofagosomalnih vezikula. Tretiranjem stanica kemikalijom Bafilomicin A1 inhibira se fuzija autofagosomalnih vezikula s lizosomima a time i sam proces autofagije što rezultira povećanom količinom autofagosomalnih vezikula. Tretman stanica izgladnjivanjem u mediju EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) inducira neselektivnu autofagiju kojom se povećava količina autofagosomalnih vezikula. Tretman s kemikalijom Bafilomicin A1 se koristi i u kombinaciji s izgladnjivanjem stanica kako bi se dodatno povećao broj autofagosomalnih vezikula. Za inhibiciju proteasomalne razgradnje stanice su tretirane kemikalijom MG132. Kao negativna kontrola, stanicama se dodaje voda ili DMSO ovisno u kojem otapalu se otapa korištena kemikalija. Kemikalija puromicin inhibira sintezu proteina i uzrokuje nakupljanje krivo smotanih proteina koji stvaraju proteinske nakupine.

3.2.11 Priprava staničnih lizata

Stanice HEK293T ili HeLa se 24-48 sati nakon transfekcije liziraju. Za pripravu staničnog lizata (TCL, od engl. *total cell lysate*) stanicama HEK293T ili HeLa uklanja se hranjiva podloga i dodaje 400 μl pufera za lizu sa svježe dodanim koktelom proteaznih inhibitora. Stranice se inkubiraju na ledu 20 minuta, potom se sastružu s jažica, dobro resuspendiraju u puferu i prebace u hladne 1,5 ml Eppendorf tubice. Lizati se centrifugiraju

20 minuta pri 8000 g u centrifugi na 4°C. Supernatant se dalje koristi u metodi imunoprecipitacije ili *GST pull-down*. Dio supernatanta (50 µl) pomiješa se s 50 µl pufera 2X Laemmli i kuha pet minuta na 95°C. Dio ovako priređenog uzorka nanosi se na SDS poliakrilamidni gel određene gustoće. Za frakcioniranje staničnih komponenti korištena su dva različita pufera. Prvo se stanice liziraju puferom za odvajanje topljive faze s citoplazmatski topivim proteinima koji se nalaze u supernatantu nakon centrifugiranja od 10 minuta pri 6000 g, dok se talog otapa u puferu za odvajanje netopljive faze s netopljivih proteinskih nakupina.

3.2.12 Denaturirajuća elektroforeza u SDS poliakrilamidnom gelu i metoda imunodetekcije (engl. *western blot*)

Na prethodno opisani način pripremljeni uzorci razdvajaju se po veličini pomoću denaturirajuće elektroforeze u SDS poliakrilamidnom gelu. U svakom gelu koristi se biljeg veličine proteina. Prilikom elektroforeze proteini se najprije razdvajaju pri 90 V, a nakon što uzorci napuste gel za sabijanje (gornji dio) pri 120 V, sve dok linija pufera Laemmli ne dođe do ruba gela. Nakon što se uzorci razdvoje u gelu, prenesu se na 0,45 µm nitroceluloznu membranu (200 mA, 90 minuta) u 1X puferu za transfer, u kojeg je dodan 20%-tni (v/v) metanol. Učinkovitost prijenosa kao i količina glutationskih sefaroznih kuglica upotrijebljenih u metodi *GST pull down* potvrđuje se kratkom inkubacijom membrane u otopini Ponceau S koja se potom odbojava u puferu 1X TBS. Membrane se blokiraju u puferu 1X TBS/5% BSA jedan sat na sobnoj temperaturi uz lagano miješanje. Imunodetekcija se izvodi inkubacijom membrana preko noći na 4°C u otopini 1X TBS/5% BSA s odgovarajućim primarnim protutijelom. Membrana se ispire četiri puta po 10 minuta u puferu 1x TBS/0,1% Tween, kako bi se uklonio višak primarnog protutijela Zatim se dodaje odgovarajuće sekundarno protutijelo pripremljeno u puferu 1X TBS s 5% bezmasnog mlijeka u prahu. Membrana se zatim ispire četiri puta po 10 minuta u puferu 1X TBS/0,1% Tween. Sekundarno protutijelo obilježeno je peroksidazom iz hrena (engl. *horseradish peroxidase-HRP*), što omogućuje vizualizaciju proteina metodom kemiluminiscencije. Na membrane se dodaje mješavina vodikovog peroksida i luminola, supstrat enzima peroksidaze, što uzrokuje emitiranje fotona koji se detektiraju na fotografskom filmu. Cijeli postupak, elektroforeza i prijenos na membranu, izvodi se u uređaju Mini Protean 3 (*BioRad*), a detekcija u aparatu za razvijanje fotografskog papira (*Fuji*).

3.2.13 Kvantifikacija proteinskih nakupina

Stanice se transfeciraju plazmidima za ekspresiju mutiranih proteinima GFP-SOD1 G93C i GFP-htt ex1 Q103 te 48 sati nakon transfekcije analiziraju se pomoću epifluoroscencijskog mikroskopa Leica CTR7000 HS. Izbroji se minimalno 500 stanica koje eksprimiraju mutirane proteine za svaki eksperiment u 10 nasumično odabranih vidnih polja, a svaki eksperiment izvodi se u triplikatu, te ponavlja dva puta (n=6). Određuje se postotak stanica s eksprimiranim mutiranim proteinima koje sadrže velike netopljive proteinske nakupine.

3.2.14 Imunofluorescencijska mikroskopija

Za imunofluorescencijsku mikroskopiju stanice se nasade na staklene pokrovnice. Nakon eksperimenta određenih tretmana (transfekcija, izloženost odgovarajućim kemikalijama), stanice se fiksiraju u 2% otopini paraformaldehida 20 minuta na sobnoj temperaturi. Fiksirane stanice permeabiliziraju se u puferu 1X PBS/0,2% Triton X-100. Stanice se zatim ispiru i blokiraju jedan sat na sobnoj temperaturi u 1X PBS/5% BSA. Nakon toga slijedi inkubacija s odgovarajućim primarnim protutijelima jedan sat na sobnoj temperaturi. Stanice se ponovno ispiru pet puta po 10 minuta u puferu 1X PBS/0,1% Tween. Slijedi korak inkubacije s odgovarajućim sekundarnim protutijelima jedan sat na sobnoj temperaturi nakon čega se ponavlja ispiranje stanica. Završno ispiranje stanica provodi se vodom nakon čega se pokrovnice ostave na zraku kako bi se posušile. Osušene pokrovnice se uklope u otopinu MOWIOL u koju je po potrebi dodan DAPI. Stanice se analiziraju konfokalnim mikroskopom. Konfokalna mikroskopija je izvedena na laser-skenirajućem mikroskopu LSM 510 META 487 (Zeiss).

3.2.15 Transgenični miševi, fiksacija tkiva i imunohistokemija

Miševi korišteni u ovom istraživanju su uzgajani, anestezirani i žrtvovani prema europskim i njemačkim smjernicama za brigu i upotrebu laboratorijskih životinja. Transgenična linija miševa C57/B6 s ekspresijom humanog mutiranog proteina SOD1 G93A (142) je model za neurodegenerativnu bolest ALS, a korištena je za izolaciju lumbalnog dijela leđne moždine. Miševi su žrtvovani u dobi od 5 mjeseci (bez znakova bolesti), 7 mjeseci (početni stadij bolesti) i 10 mjeseci (terminalna faza bolesti, definiranoj kao nemogućnost uspravljanja nakon 10 sekundi bočno polegnutih miševa). Životinje su fiksirane postupkom perfuzije, transkardijalnim injiciranjem 4% paraformaldehida. Lumbalni dio leđne moždine izvađen je i držan u fiksativu preko noći nakon čega je prebačen u fosfatni pufer s 20%

sukrozom. Tako pripremljeno tkivo izrezano je pomoću kriostata te je imunoanaliza napravljena na plutajućim sekcijama. Tkivo je analizirano na prisutnost proteina TBK1 i fosforiliranog proteina optineurina na proteinskim nakupinama korištenjem odgovarajućih primarnih i sekundarnih protutijela. Prvi korak je permeabilizacija u puferu 1X PBS/0,5% Triton X-100. Nakon ispiranja u puferu 1X PBS/0,1% Triton X-100, tkivo je blokirano u 1X PBS/3% BSA tijekom dva sata i inkubirano s primarnim protutijelima anti-Ub i anti-TBK2 ili anti-Ser177 optineurin tijekom 48 sati na 4°C. Zatim slijedi ispiranje i inkubacija u otopinama sekundarnih protutijela dva sata na sobnoj temperaturi. Slijedi ispiranje, inkubacija antitijelom anti-SOD1 konjugiranim fluorokromom Cy5 te ponovno ispiranje. Plutajuće sekcije se zatim fiksiraju na stakalca, osuše i uklope u MOWIOL otopinu. Obojeni histološki preparati potom se pregledavaju laser-skenirajućim mikroskopom LSM 510 META (Zeiss).

3.2.16 Riba zebrica (*Danio rerio*)

Drugi modelni organizam korišten u istraživanjima bila je riba zebrica (*Danio rerio*), soj Tuebingen koja je uzgajana i parena prema otpije definiranim uvjetima (146). Zebrica s izraženim divljim tipom proteina Flag-SOD1 i mutiranim proteinom Flag-SOD1 G93A dobivena je mikroinjiciranjem mRNA u embrionalnoj fazi, te je korištena kao model za ALS. Korištenjem morfolino oligonukleotida (AMO) specifičnim za gen OPTN dobila se je zebrica s privremeno utišanim genom OPTN. Utišavanjem gena OPTN u normalnoj ribi zebrici ili u zebrici s izraženim mutiranim SOD1 proteinom testirali smo utjecaj gena OPTN na razvoj ALS-a.

Molekule mRNA Flag-SOD1 i Flag-SOD1 G93A dobivene su *in vitro* transkripcijom pomoću kompleta mMESSAGE mMACHINE® T7 Kit. Uspješnost transkripcije provjerava se elektroforezom u agaroznom gelu. Korištena su dva različita tipa morfolino oligonukleotida specifična za gen OPTN. Prvi koji specifično prepoznaje start kodon na mRNA, OPTN ATG-AMO, i drugi koji se veže na kraj egzona 2 i početak introna 3 čime sprečava pravilno prekrajanje pre-mRNA, OPTN splice-AMO. Morfolino oligonukleotidi otope se u sterilnoj vodi kojoj se dodaje 0,05% fenol crveno boje, a mRNA se razrijedi u 0,1 M otopini KCl. Zbog moguće toksičnosti i problema u razvoju uzrokovane samim iniciranjem mRNA i AMO, prije izvođenja eksperimenata potrebno je odrediti minimalnu potrebnu količinu mRNA i AMO koja dovodi do ekspresije i utišavanja gena, a ne izaziva toksičnost, nespecifične probleme u razvoju ili smrt embrija. Testirajući spektar koncentracija, određena je potrebna količina mRNA i AMO u našim eksperimentima: 1 nl 200 pg Flag-SOD1 i Flag-SOD1 G93A, 1 nl 0,5 mM kontrolni AMO i OPTN slice-AMO te 1 nl 0,4 mM OPTN ATG-

AMO. Pomoću mikroinjektora, navedena količina mRNA i AMO injicirana je u žumanjak (engl. *yolk*) embrija zebrice s 2-4 stanice. Embriji su potom slijedeća dva dana čuvani u puferu E3 pri temperaturi od 28°C te su 48 sati nakon fertilizacije (48 hpf, engl. *hours post fertilization*) fiksirani u 4% formaldehidu. Nakon fiksacije preko noći na 4°C, embriji se ispiru puferom 1X PBS/1% Triton X-100 i permeabiliziraju u acetonu jedan sat na -20°C. Embriji se blokiraju u puferu 1X PBS/1% BSA/1% DMSO tijekom jednog sata na sobnoj temperaturi. Zatim slijedi inkubacija primarnim protutijelom anti-SV2 u puferu 1X PBS/1% DMSO tijekom pet sati na sobnoj temperaturi. Embriji se ispiru 4X blokirajućim puferom, inkubiraju u sekundarnom protutijelu dva sata na sobnoj temperaturi te potom opet ispiru 4X blokirajućim puferom. Embriji su analizirani u svjetlom polju pomoću mikroskopa Leica MZ165 kako bi se utvrdio fenotip. Za analizu motornih neurona koristio se laser-skenirajući mikroskop LSM 510 META (Zeiss). Duljina motornih neurona mjerena je pomoću programa ImageJ. Za svaki embrij izmjerena je duljina prvih 10 neurona nakon žumančane kesice (engl. *yolk sac*) i odredila srednja vrijednost. Embrij s dva ili više preuranjenih grananja aksona motornih neurona označen je kao embrij s abnormalan grananjem. Uspješnost utišavanja i ekspresije proteina u embriju zebrice provjerena je metodom imunodetekcije, a embriji su lizirani u puferu RIPA.

3.2.17 Statistički postupci

Statističke analize izvršene su u programu Graph PadPrism koristeći Studentov t-test za analizu između dva uzorka dok je za usporedbu tri ili više grupiranih ili negrupiranih uzoraka korištena jednosmjerna (engl. *one-way*) ANOVA ili dvosmjerna (engl. *two-way*) ANOVA s post hoc Bonferroni testom.

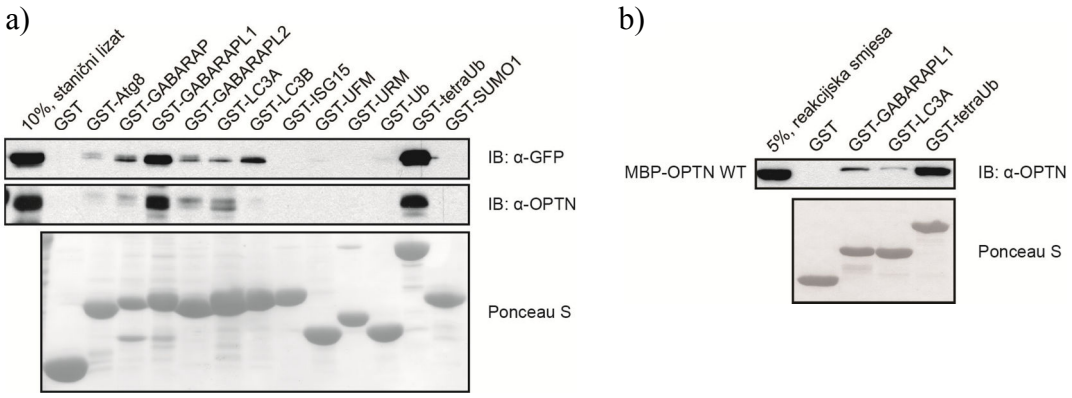
4 REZULTATI

4.1 Optineurin veže autofagosomalne proteine LC3/GABARAP preko domene LIR

Korištenjem kvaščevog sustava dvaju hibrida (Y2H), protein optineurin otkriven je kao novi interakcijski partner autofagosomalnog proteina LC3. Kako bi potvrdili tu interakciju i detaljnije je okarakterizirali koristili smo nekoliko različitih biokemijskih i imunokemijskih metoda.

Prvo smo provjerili interakciju proteina optineurina i autofagosomalnog proteina LC3 ali i drugih ubikvitinu sličnih proteina koristeći metodu *GST pull down*. Stanični lizat inkubirali smo s GST fuzioniranim proteinima vezanim na glutationske sefarozne kuglice: GST-Atg8, GST-GABARAP, GST-GABARAPL1, GST-GABARAPL2, GST-LC3A, GST-LC3B, GST-ISG15 (engl. *GST-Ubiquitin-like protein ISG15*), GST-UFM (engl. *GST-Ubiquitin-fold modifier 1*), GST-URM (engl. *GST-Ubiquitin-related modifier 1 homolog*), GST-Ub, GST-tetraUb i GST-SUMO1 (engl. *GST-Small ubiquitin-related modifier 1*). Pojačano eksprimirani GFP-optineurin u stanicama HEK293T kao i endogeni optineurin u stanicama HeLa vezao je ubikvitinu slične autofagosomalne proteine Atg8, GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, LC3A i LC3B. S druge strane optineurin nije vezao druge ubikvitinu slične proteine kao što su ISG15, Ufm, Urm i SUMO1. Kako je već od prije poznato, optineurin je vezao isključivo linearne lance Ub (GST-tetraUb), a ne i mono ubikvitin. Kao negativnu kontrolu u svim eksperimentima metode *GST pull down* koristi se nefuzionirani GST vezan na glutationske sefarozne kuglice (slika 12a).

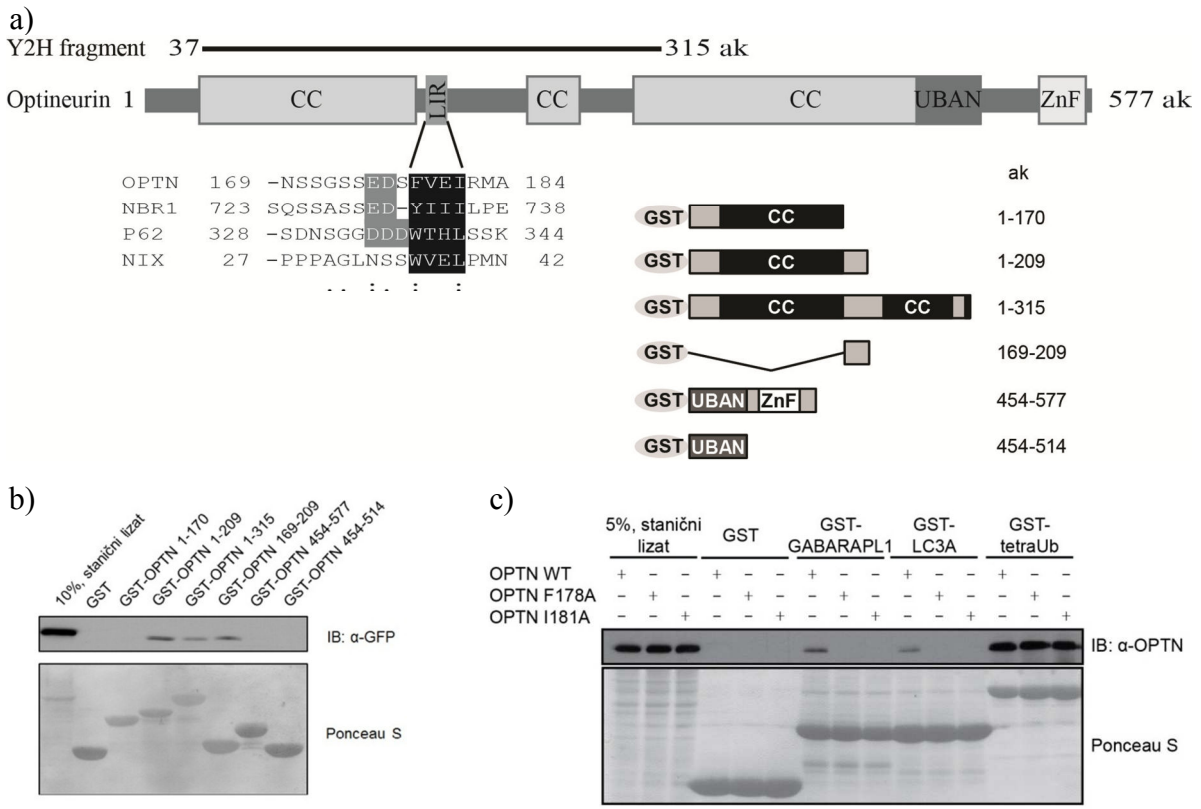
Nakon potvrde vezanja proteina optineurina i autofagosomalnih proteina LC3/GABARAP, htjeli smo također provjeriti da li je vezanje direktno ili indirektno (posredno). Purificirali smo MBP fuzionirani optineurin te smo pomoću metode *GST pull down* provjerili interakciju MBP-optineurina i GST fuzioniranih proteina LC3A i GABARAPL1 vezanih na glutationske sefarozne kuglice. Kao pozitivnu kontrolu koristili smo GST-tetraUb. Protein optineurin vezao je oba proteina kao i pozitivnu kontrolu čime smo dokazali direktnu interakciju između proteina optineurina i autofagosomalnih proteina LC3/GABARAP (slika 12b).



Slika 12. Interakcija proteina optineurina i autofagosomalnih proteina LC3/GABARAP.
a) Provjera interakcije između proteina optineurina i ubikvitinu sličnih proteina pomoću metode *GST pull down*. Stanični lizat stanica HeLa s eksprimiranim proteinom GFP-OPTN (prvi red) ili stanični lizat HEK293T stanica s endogenim proteinom optineurinom (drugi red) inkubiran je s GST fuzioniranim ubikvitinu sličnim proteinima vezanim na glutationske sefarozne kuglice. Gornji dio slike prikazuje imunodetekciju pomoću protutijela anti-GFP ili anti-optineurin, dok donji dio slike prikazuje bojanje membrane bojom PonceauS. **b)** Provjera direktne interakcije proteina optineurina s proteinima LC3A i GABARAPL1 pomoću metode *GST pull down*. Purificirani MBP-OPTN inkubiran je s GST fuzioniranim proteinima LC3A i GABARAPL1 vezanim na glutationske sefarozne kuglice. Gornji dio slike prikazuje imunodetekciju pomoću protutijela anti-optineurin, dok donji dio slike prikazuje bojanje membrane bojom PonceauS. Protein GST-tetraUb je korišten kao pozitivna kontrola dok je nekonjugirani GST vezan na glutationske sefarozne kuglice korišten kao negativna kontrola.

Slijedeće smo htjeli utvrditi koja je domena proteina optineurina odgovorna za to vezanje. Fragment optineurina nađen u metodi Y2H obuhvaća aminokiseline 37 do 315 kako je prikazano na slici 13a, upućujući da upravo ovaj dio proteina sudjeluje u interakciji. Napravili smo nekoliko GST fuzioniranih fragmenata optineurina i provjerili pomoću metode *GST pull down* koji je najmanji fragment potreban za vezanje. Na slici 13a prikazani su fragmenti koji su korišteni u metodi *GST pull down*. Samo su fragmenti 1-209 ak, 1-315 ak, 169-209 ak pokazali vezanje na protein GFP-LC3A eksprimiran u stanicama HEK293T (slika 13b). Ovim eksperimentom pokazali smo da je fragment optineurina koji obuhvaća aminokiseline 169 do 209 odgovoran za interakciju s autofagosomalnim proteinima LC3/GABARAP. Koristeći biokemijski alat za sravnjivanje, ClustalW, navedeni fragment optineurina usporedili smo s poznatim interaktorima ubikvitinu sličnih autofagosomalnih proteina LC3/GABARAP koji sudjeluju u procesu autofagije, kao što su autofagosomalni receptori p62, NBR1 i Nix, te zaključili da optineurin sadrži potencijalnu domenu LIR s aminokiselinskim slijedom fenilalanin-valin-glutaminska kiselina-izoleucin (FVEI).

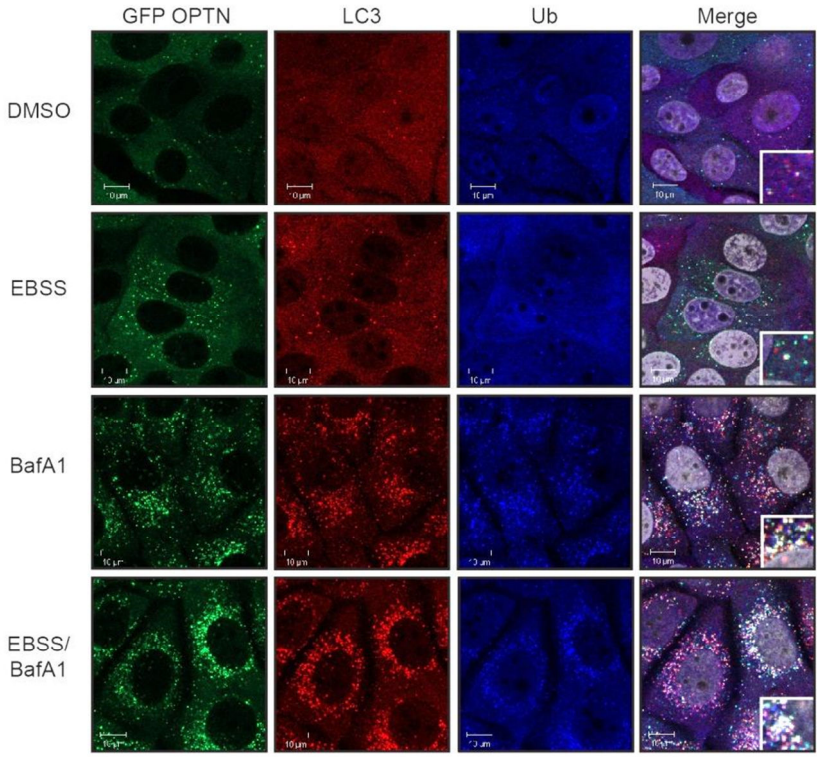
Uvođenjem točkastih mutacija unutar domene LIR (F178A i I181A) pokazali smo da se optineurin preko tog motiva veže s proteinom LC3 (slika 13c). Transfecirali smo stanice HEK293T plazmidom za ekspresiju divljeg tipa proteina HA-OPTN te mutanata HA-OPTN F178A i HA-OPTN I181A. Prvome mutantu 178. aminokiselina fenilalanin zamijenjena je alaninom, a drugome 181. aminokiselina izoleucin zamijenjena alaninom. Svaki od tih staničnih lizata inkubirali smo s proteinima GST-LC3A i GST-GABARAPL1 vezanim na glutationske sefarozne kuglice. Samo divlji tip proteina HA-OPTN vezao je autofagosomalne proteine LC3/GABARAP dok mutante nisu. Kao kontrolu koristili smo GST-tetraUb koji je vezao i divlji tip i mutante unutar domene LIR proteina optineurina.



Slika 13. Interakcija proteina optineurina preko domene LIR s autofagosomalnim proteinima LC3/GABARAP.

a) Shematski prikaz proteina optineurina i njegovih domena (gornji dio), detaljan prikaz domene LIR u proteinima optineurin, NBR1, p62 i NIX (dolje lijevo), prikaz fragmenata fuzioniranih na GST protein i vezanih na glutationske sefarozne kuglice (dolje desno); CC – domena zavojite uzvojnice (engl. *coiled coil domain*), LIR – LC3 vezujuća domena (engl. *LC3-Interacting Region*), UBAN – ubikvitin vezujuća domena u proteinima ABIN i NEMO (engl. *Ubiquitin binding in ABIN and NEMO*), ZnF – domena cinkova prsta (engl. *Zinc finger domain*), GST – glutation S-transferaza (engl. *Glutathione S transferase*), ak – aminokiselina, **:** – konzervirana zamjena, **.** – djelomično konzervirana zamjena. **b)** Provjera interakcije proteina GFP-LC3A i fragmenata proteina optineurina pomoću metode *GST pull down*. Stanični lizat s eksprimiranim GFP-LC3A inkubiran je s GST fuzioniranim fragmentima proteina optineurina vezanim na glutationske sefarozne kuglice (GST-OPTN 1-170, 1-209, 1-315, 169-209, 454-577 i 454-514). Gornji dio slike prikazuje imunodetekciju pomoću protutijela anti-GFP, dok donji dio slike prikazuje bojanje membrane bojom PonceauS. **c)** Provjera interakcije divljeg tipa proteina OPTN i mutanti unutar domene LIR, OPTN F178A i OPTN I181A, s autofagosomalnim proteinima LC3A i GABARAPL1 pomoću metode *GST pull down*. Stanični lizati s eksprimiranim HA-OPTN, HA-OPTN F178A i HA-OPTN I181A inkubirani su s GST fuzioniranim proteinima LC3A i GABARAPL1 vezanim na glutationske sefarozne kuglice. Gornji dio slike prikazuje imunodetekciju pomoću protutijela anti-OPTN, dok donji dio slike prikazuje bojanje membrane bojom PonceauS.

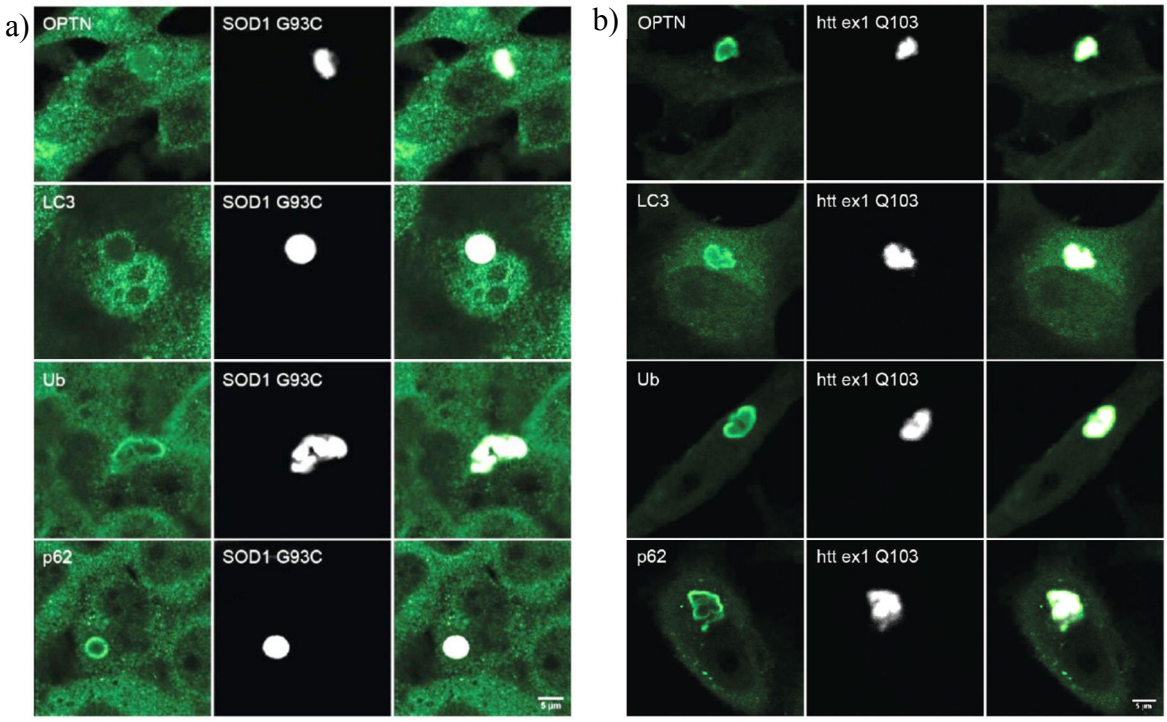
Osim biokemijskim metodama, interakciju optineurina i autofagosomalnih proteina LC3/GAPARAP htjeli smo potvrditi i pomoću imunofluorescencijske mikroskopije (slika 14). Transfecirali smo stanice plazmidom za ekspresiju GFP-OPTN i provjeravali kolokalizaciju proteina optineurina i proteina LC3 i Ub. U normalnim uvjetima, razina autofagije je niska, a time i broj autofagosomalnih vezikula u stanicama je mali (slika 14, prvi red). Kako bi povećali broj tih vezikula radi bolje vizualizacije optineurina na vezikulama bilo je potrebno povećati razinu autofagije. Stranice su tretirane izgladnjivanjem u mediju EBSS u trajanju od dva sata (ND, slika 14, drugi red), kemikalijom Bafilomicin A1 u trajanju od šest sati (BafA1, slika 14, treći red) ili su stanice tretirane na oba načina istovremeno (ND/BafA1, slika 14, četvrti red). Svaki od tih tretmana povećao je broj autofagosomalnih vezikula, a većina vezikula bile su pozitivne na proteine LC3, Ub i optineurin. Fiksirane stanice inkubirane su primarnim protutijelima anti-LC3 i anti-Ub te sekundarnim protutijelima konjugiranim fluorokromima anti-zečji Cy3 i anti-mišji Cy5. Stanice su analizirane konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom. Ovim eksperimentom dokazali smo da je protein optineurin prisutan na autofagosomalnim vezikulama.



Slika 14. Imunofluorescencijska detekcija lokalizacije proteina optineurina, LC3A i Ub na autofagosomalnim vezikulama.
Stanice HeLa s eksprimiranim proteinom GFP-OPTN tretirane su izgladnjivanjem u mediju EBSS tijekom dva sata (drugi red, EBSS), kemikalijom Bafilomicin A1 tijekom šest sati (treći red, BafA1) ili oba dva tretmana zajedno (četvrti red, EBSS/BafA1). Kao kontrolni tretman stanice su tretirane DMSO-om (prvi red). Stanice su nakon tretmana fiksirane i inkubirane protutijelima anti-LC3 (crveno, drugi stupac) i anti-Ub (plavo, treći stupac). Zeleni signal predstavlja protein GFP-OPTN (prvi stupac), a jezgre su obojene bojom DAPI (sivo). Kolokalizacija proteina GFP-OPTN, LC3 i Ub očituje se bijelom bojom (četvrti stupac). Manji kvadratići u zadnjem stupcu predstavljaju uvećanu sliku autofagosomalnih vezikula. Crta mjerila – 10 μm.

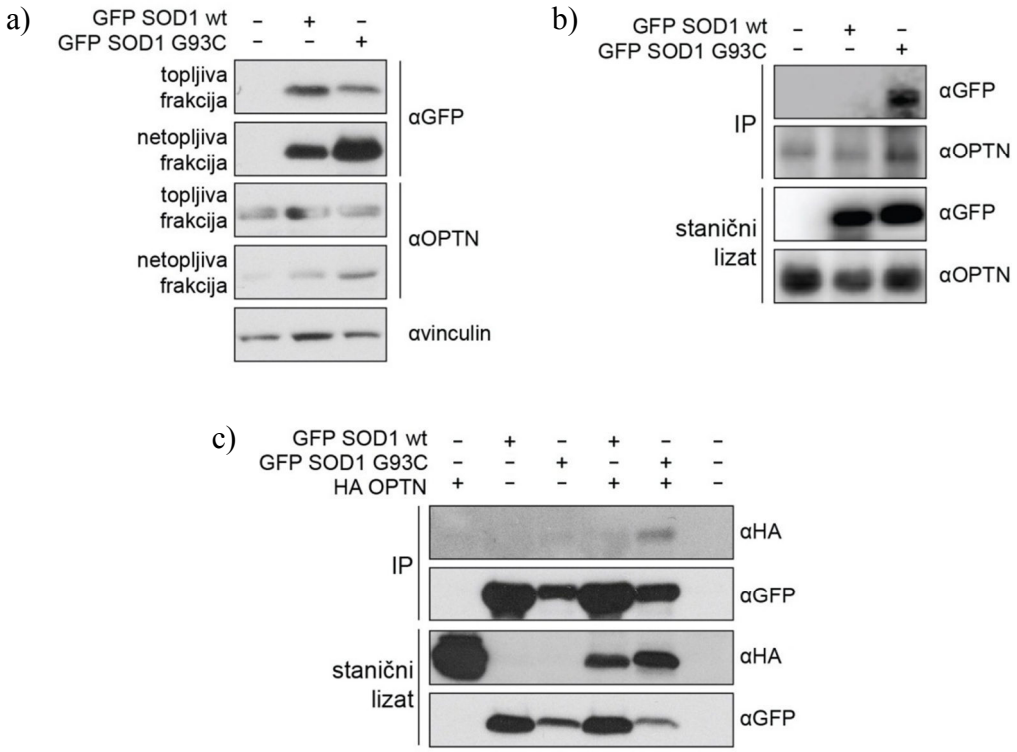
4.2 Optineurin veže proteinske agregate

Nakon što smo dokazali da je protein optineurin autofagosomalni receptor koji veže autofagosomalne proteine LC3/GABARAP preko svoje domene LIR, htjeli smo potvrditi prisutnost proteina optineurina u proteinskim nakupinama u staničnim modelima kao što je otprije pokazano na histološkim preparatima pacijenata oboljelih od ALS-a ili Huntingtonove bolesti (124, 137). Stanice HeLa s privremeno ili stabilno eksprimiranim mutiranim proteinima GFP-SOD1 G93C i CFP/GFP-htt ex1 Q103 korištene su kao stanični model za proteinske nakupine u Huntingtonovoj bolesti i ALS-u (67, 141). Prvo smo pomoću imunofluorescencijske mikroskopije pokazali kolokalizaciju proteina optineurina i proteinskih nakupina proteina GFP-SOD1 G93C (slika 15a) i CFP-htt ex1 Q103 (slika 15b) po istom obrascu kao i proteina LC3, Ub i p62 za koje se je već otprije pokazalo da su prisutni u proteinskim nakupinama (67). Fiksirane stanice inkubirane su primarnim protutijelima anti-OPTN, anti-LC3, anti-Ub i anti-p62 te sekundarnim protutijelima konjugiranim fluorokromima anti-mišji i anti-zečji Cy3. Stanice su analizirane konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom.



Slika 15. Imunofluorescencijska detekcija kolokalizacije proteina optineurina i proteinskih nakupina.
a) Stanice HeLa s privremenom ekspresijom proteina GFP-SOD1 G93C (drugi stupac, bijelo) fiksirane su 48 sati nakon transfekcije i inkubirane protutijelima anti-OPTN (prvi stupac, prvi red, zeleno), anti-LC3 (prvi stupac, drugi red, zeleno), anti-Ub (prvi stupac, treći red, zeleno) i anti-p62 (prvi stupac, četvrti red, zeleno). Kolokalizacija proteina GFP-SOD1 G93C i proteina optineurina, LC3, Ub i p62 prikazana je u trećem stupcu. **b)** Stanice HeLa sa stabilnom ekspresijom proteina CFP-htt ex1 Q103 (drugi stupac, bijelo) fiksirane su i inkubirane protutijelima anti-OPTN (prvi stupac, prvi red, zeleno), anti-LC3 (prvi stupac, drugi red, zeleno), anti-Ub (prvi stupac, treći red, zeleno) i anti-p62 (prvi stupac, četvrti red, zeleno). Kolokalizacija proteina CFP-htt ex1 Q103 i proteina optineurina, LC3, Ub i p62 prikazana je u trećem stupcu. Crta mjerila – 5 µm.

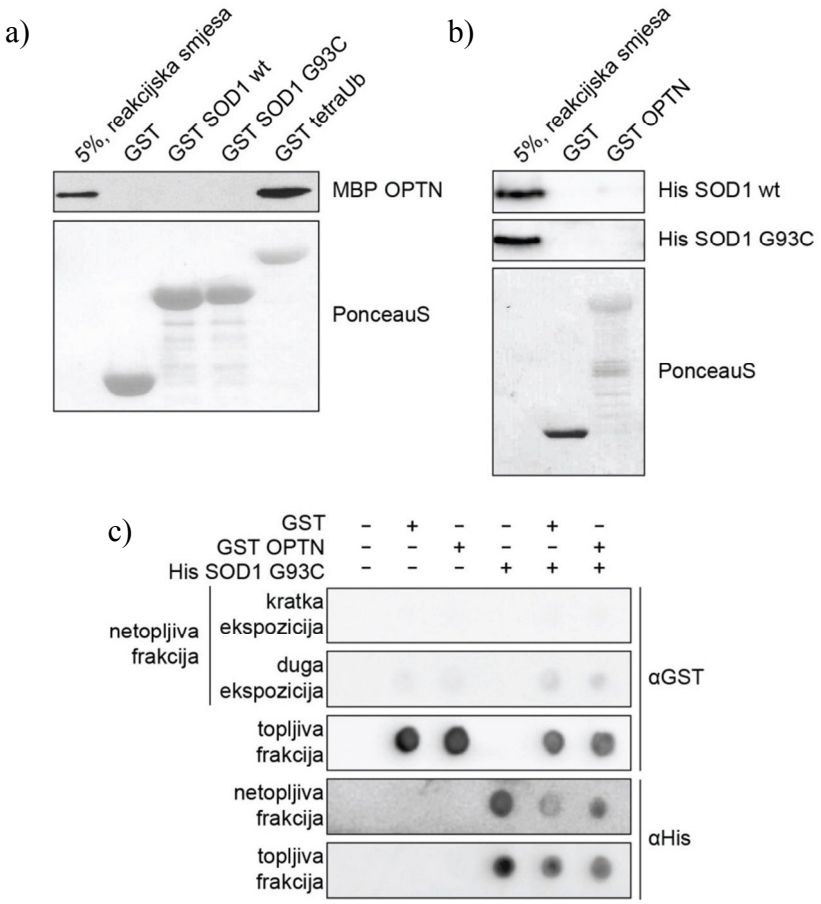
Analiza staničnih lizata koji su razdvojeni u dvije faze koristeći različite pufere, fazu citoplazmatskih topljivih proteina i fazu netopljivih staničnih nakupina, pokazala je da se veća količina proteina optineurina nalazi u fazi netopljivih staničnih nakupina kada je u stanicama eksprimiran mutirani protein GFP-SOD1 G93C (slika 16a). Metoda imunoprecipitacije divljeg tipa proteina GFP-SOD1 i mutiranog proteina GFP-SOD1 G93C sa staničnim lizatima pomoću protutijela anti-GFP pokazala je interakciju mutiranog proteina SOD1 G93C, ali ne i divljeg tipa proteina, i endogenog proteina optineurina (slika 16b) i pojačano eksprimiranog proteina HA-OPTN (slika 16c). Tako smo koristeći tri različite metode, imunofluorescencijsku mikroskopiju, stanično frakcioniranje i imunoprecipitaciju, pokazali da je optineurin u interakciji s proteinskim nakupinama mutiranog proteina SOD1 G93C, ali ne i s divljim tipom proteina.



Slika 16. Interakcija proteina optineurina i proteinskih nakupina.
a) Stanice HeLa s eksprimiranim divljim tipom proteina GFP-SOD1 i mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C lizirane su i frakcionirane u dvije faze od kojih jedna faza sadrži citoplazmatske topljive proteine (topljiva frakcija), a druga faza netopljive proteinske nakupine (netopljiva frakcija). Imunodetekcija tih dviju faza pomoću protutijela anti-GFP i anti-OPTN. Količina nanesenog uzorka provjerena je protutijelom anti-vinculin. U negativnoj kontroli stanice su transfecirane praznim plazmidom. **b)** Provjera interakcije endogenog proteina optineurin i proteinskih nakupina koristeći metodu imunoprecipitacije. Stanični lizati s eksprimiranim divljim tipom proteina GFP-SOD1 i mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C inkubirani su protutijelom anti-GFP preko noći te proteinom G vezanim na agarozne kuglice. Imunodetekcija imunoprecipitacije (IP) i ukupnog staničnog lizata (stanični lizat) pomoću protutijela anti-GFP i anti-OPTN. **c)** Provjera interakcije eksprimiranog proteina HA-optineurin i proteinskih nakupina koristeći metodu imunoprecipitacije. Stanični lizati s eksprimiranim HA-OPTN i divljim tipom proteina GFP-SOD1 G93A ili mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C inkubirani su protutijelom anti-GFP preko noći te proteinom G vezanim na agarozne kuglice. Imunodetekcija imunoprecipitacije (IP) i staničnog lizata (stanični lizat) pomoću protutijela anti-GFP i anti-HA.

4.3 Posredna interakcija proteina optineurina i proteinskih agregata

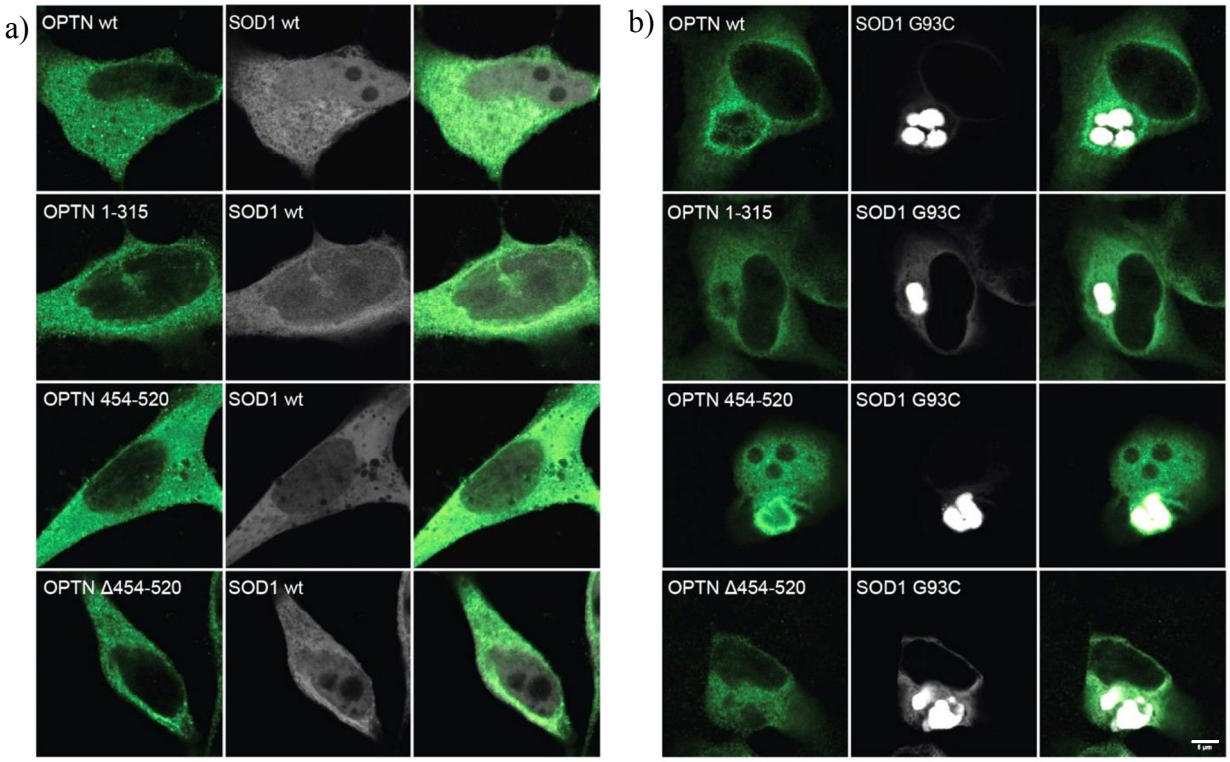
Nakon utvrđivanja interakcije proteina optineurina i proteinskih nakupina, bilo je potrebno utvrditi da li je riječ o direktnoj interakciji. Prvo smo provjerili je li proteini GST-SOD1 i GST-SOD1 G93A vezani na glutationske sefarozne kuglice stupaju u interakciju s purificiranim proteinom MBP-OPTN koristeći metodu *GST pull down* (slika 17a). To smo također provjerili i s proteinom GST-OPTN vezanim na glutationske sefarozne kuglice i purificiranim proteinima His-SOD1 i His-SOD1 G93C koristeći metodu *GST pull down* (slika 17b). U oba eksperimenta protein optineurin nije vezao ni divlji tip proteina SOD1 ni mutirani protein SOD1 G93C te smo tako dokazali da protein optineurin ne stupa u direktnu interakciju s otopljenim monomernim i oligomernim oblicima mutiranog proteina SOD1. Kako bi utvrdili da li protein optineurin stupa u direktnu interakciju s proteinskim agregatima mutiranog proteina SOD1 G93C, purificirani GST-OPTN inkubirali smo s *in vitro* induciranim proteinskim agregatima His-SOD1 G93C. Rezultate smo analizirali kapljičnom metodom gdje smo proteinske agregate nakapali na nitrocelulozu membranu i analizirali metodom imunodetekcije (slika 17c). Protein optineurin nije vezao ni proteinske agregate mutiranog proteina SOD1 G93C što dovodi do zaključka da je interakcija proteina optineurin s proteinskim nakupinama posredna.



Slika 17. Posredna interakcija proteina optineurina i proteinski nakupina.
a) Provjera direktne interakcije optineurina i mutiranog proteina SOD1 G93C pomoću metode *GST pull down*. Purificirani MBP-OPTN inkubiran je s GST fuzioniranim divljim tipom proteina SOD1 i mutiranim proteinom SOD1 G93C vezanim na glutationske sefarozne kuglice. Gornji dio slike prikazuje imunodetekciju pomoću protutijela anti-MBP, dok donji dio slike prikazuje bojanje membrane bojom PonceauS. Protein GST-tetraUb korišten je kao pozitivna kontrola dok je sam GST vezan na glutationske sefarozne kuglice korišten kao negativna kontrola. **b)** Provjera direktne interakcije optineurina s mutiranim proteinom SOD1 G93C pomoću metode *GST pull down*. Purificirani protein His-SOD1 i mutirani protein His-SOD1 G93C inkubirani su s GST fuzioniranim proteinom optineurinom vezanim na glutationske sefarozne kuglice. Gornji dio slike prikazuje imunodetekciju pomoću protutijela anti-His, dok donji dio slike prikazuje bojanje membrane bojom PonceauS. Sam GST vezan na glutationske sefarozne kuglice korišten je kao negativna kontrola. **c)** Kapljična analiza interakcije proteina GST-optineurina i proteinskih nakupina purificiranog proteina His-SOD1 G93C. Purificirani agregirani protein His-SOD1 G93C inkubiran je s purificiranim GST-OPTN. Imunodetekcija pomoću protutijela anti-GST i anti-His.

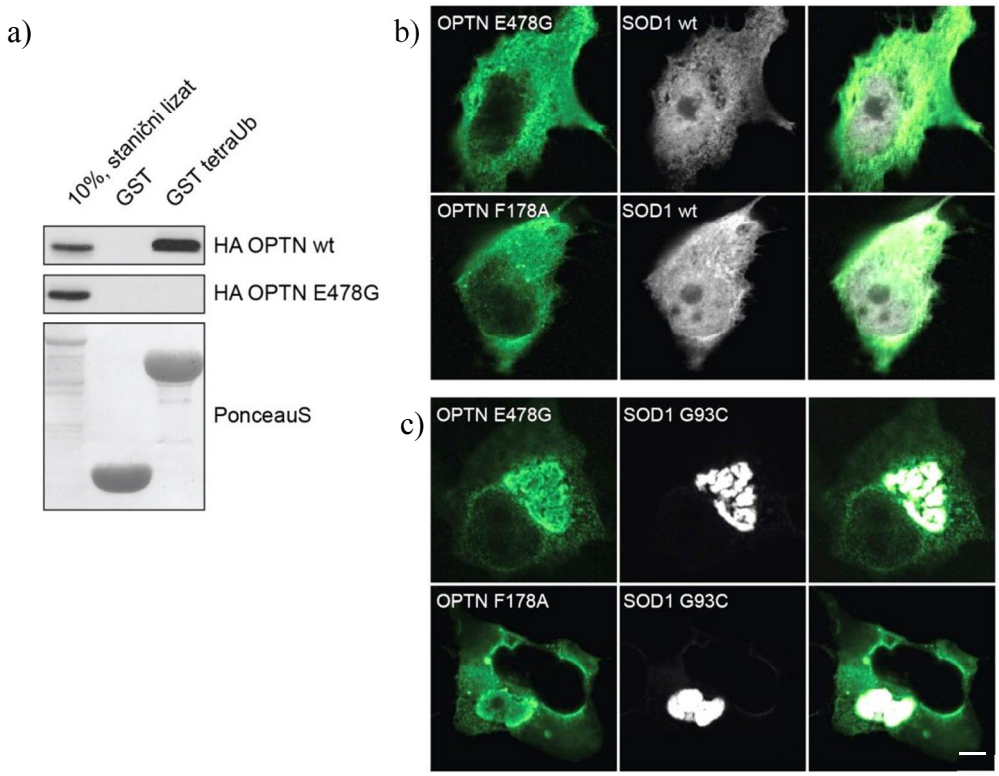
4.4 Optineurin veže proteinske agregate C-terminalnim dijelom neovisno o interakciji s ubikvitinom

Daljnji koraci u karakterizaciji interakcije proteina optineurin i proteinskih agregata bili su utvrđivanje domene odgovorne za tu interakciju i da li je ta interakcija posredovana proteinom ubikvitinom. Pomoću imunofluorescencijske mikroskopije, proučavali smo kolokalizaciju različitih fragmenata proteina optineurina s divljim tipom proteina GFP-SOD1 i njegovim mutantom GFP-SOD1 G93C. Stanice su fiksirane i inkubirane primarnim protutijelom anti-HA te sekunardnim protutijelom konjugiranim fluorokromom anti-mišji Cy3. Kako smo već prije pokazali protein HA-optineurin i proteinski agregati GFP-SOD1 G93C kolokaliziraju (slika 18b, prvi red), ali to se ne događa s divljim tipom GFP-SOD1 koji ne stvara agregate i lokaliziran je difuzno u citoplazmi (slika 18a, prvi red). Imunofluorescencijska mikroskopija stanica s eksprimiranim fragmentima proteina optineurina, HA-OPTN 1-315 ak i HA-OPTN 454-520 ak, pokazala je da fragment proteina 1-315 ak ne kolokalizira s proteinskim agregatima (slika 18b, drugi red) dok fragment proteina 454-520 ak lokalizira (slika 18b, treći red). Kao dodatnu potvrdu da je C-terminalni fragment od 454 do 520 aminokiseline proteina optineurina, važan za interakciju s proteinskim agregatima, eksprimirali smo u stanicama mutirani protein optineurin u kojem smo izrezali taj fragment, HA-OPTN Δ454-577, koji nije kolokalizirao s proteinskim agregatima (slika 18b, četvrti red). Kao kontrolu da navedeni fragmenti proteina optineurina sami ne stvaraju proteinske agregate, iste te konstrukte eksprimirali smo s divljim tipom proteina GFP-SOD1 (slika 18a). Ovim eksperimentom pokazali smo da je za interakciju proteina optineurina i proteinskih agregata potrebna C-terminalna domena optineurina, i to regija koja obuhvaća aminokiseline 454 do 520, koja se naziva ubikvitin-vezujuća domena UBAN.



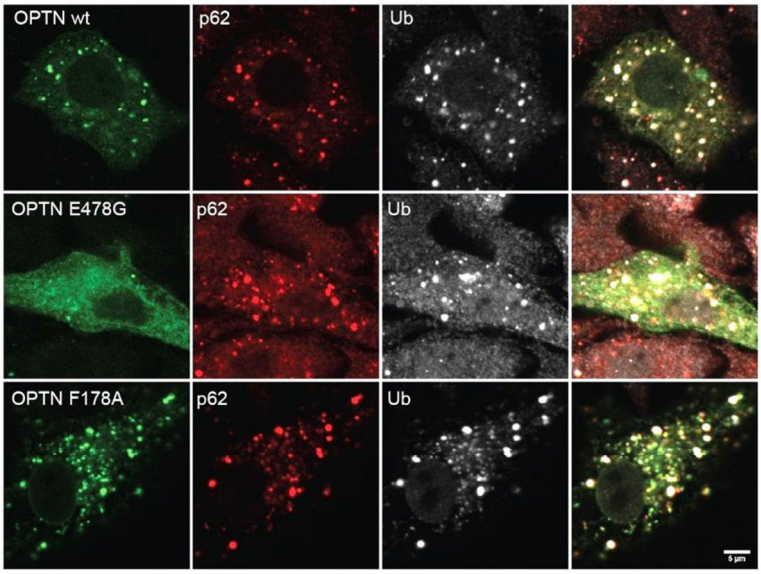
Slika 18. C-terminalna domena zavojite uzvojnice je odgovorna za vezanje proteina optineurina s proteinskim nakupinama.
a) Imunofluorescencijska detekcija lokalizacije fragmenata proteina optineurin HA-OPTN 1-315 ak, 454-520 ak i Δ454-520 ak (prvi stupac, zeleno) s proteinom GFP-SOD1 (drugi stupac, sivo). Fiksirane stanice inkubirane su protutijelom anti-HA (prvi stupac, zeleno). Kolokalizacija proteina GFP-SOD1 s fragmentima proteina HA-optineurina prikazana je u trećem stupcu. **b)** Imunofluorescencijska detekcija lokalizacije fragmenata proteina optineurin HA-OPTN 1-315 ak, 454-520 ak i Δ454-520 ak (prvi stupac, zeleno) s mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C (drugi stupac, sivo). Fiksirane stanice inkubirane su protutijelom anti-HA (prvi stupac, zeleno). Kolokalizacija proteinskih agregata mutiranog proteina GFP-SOD1 s fragmentima proteina HA-optineurina prikazana je u trećem stupcu. Crta mjerila – 5 μm.

Kako je interakcija optineurina i proteinskih agregata posredna i domena preko koje se veže na proteinske agregate ima sposobnost vezanja proteina ubikvitna, htjeli smo provjeriti da li je to vezanje posredovano ubikvitinom. Uvođenjem točkaste mutacije unutar UBAN domene gdje je glutaminska kiselina na poziciji 478 zamijenjena s glicinom (E478G), protein optineurin gubi sposobnost vezanja s ubikvitinom. To smo testirali pomoću metode *GST pull down* (slika 19a), gdje se divlji tip proteina HA-OPTN vezao s GST fuzijskim proteinom koji se sastoji od četiri proteina ubikvitina u nizu (GST-tetraUb) dok mutirani protein HA-OPTN E78G nije. Pomoću metode imunofluorescencijske mikroskopije pokazali smo da je mutirani protein optineurin E478G i dalje lokaliziran na proteinskim agregatima (slika 19c, prvi red) što znači da ta interakcija nije posredovana s proteinom ubikvitinom. Iako se preko te domene protein optineurin veže s proteinom ubikvitinom, interakcija optineurina i proteinskih agregata neovisna je o interakciji proteina optineurina i ubikvitina. Također smo htjeli provjeriti da li je ta interakcija možda posredovana proteinom LC3. Mutirani protein optineurin F178A, s mutacijom unutar domene LIR, također kolokalizira s proteinskim agregatima (slika 19c, drugi red) što pokazuje da optineurin stupa u interakciju s proteinskim agregatima neovisno o proteinu LC3. I u ovom eksperimentu smo kao kontrolu da navedeni mutanti proteina optineurina sami ne stvaraju proteinske agregate, te iste konstrukte eksprimirali s divljim tipom proteina GFP-SOD1 (slika 19b). Sve stanice su fiksirane i inkubirane primarnim protutijelom anti-HA te sekundarnim protutijelom konjugiranim fluorokromom anti-mišji Cy3.



Slika 19. Interakcija optineurina i proteinskih agregata nije posredovana proteinom ubikvitinom.
a) Provjera interakcije proteina HA-OPTN i HA-OPTN E478G s četiri fuzionirana proteina ubikvitina (tetraUb) pomoću metode *GST pull down*. Ukupni stanični lizati s eksprimiranim HA-OPTN i HA-OPTN E478G inkubiran s GST fuzioniranim tetraUb vezanim na glutationske sefarozne kuglice. Gornji dio slike prikazuje imunodetekciju pomoću protutijela anti-HA, dok donji dio slike prikazuje bojanje membrane bojom PonceauS. **b)** Imunofluorescencijska detekcija lokalizacije mutiranih proteina optineurina HA-OPTN E478G i F178A (prvi stupac, zeleno) s proteinom GFP-SOD1 (drugi stupac, sivo). Fiksirane stanice su inkubirane protutijelom anti-HA (prvi stupac, zeleno). Kolokalizacija proteina GFP-SOD1 s mutiranim proteinom HA-optineurina prikazana je u trećem stupcu. **c)** Imunofluorescencijska detekcija lokalizacije mutiranih proteina optineurin HA-OPTN F178A i E478G (prvi stupac, zeleno) s mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C (drugi stupac, sivo). Fiksirane stanice su inkubirane protutijelom anti-HA (prvi stupac, zeleno). Kolokalizacija proteinskih agregata mutiranog proteina GFP-SOD1 G93C s mutiranim proteinima HA-optineurina E478G i F178A prikazana je u trećem stupcu. Crta mjerila – 5 μm.

Stanice tretirane puromicinom stvaraju proteinske nakupine koje su pozitivne na proteine p62 i ubikvitin. Imunofluorescencijskom mikroskopijom smo pokazali da je protein optineurin također lokaliziran i na tim agregatima. Htjeli smo provjeriti da li je ta interakcija posredovana proteinom ubikvitinom te smo u stanicama eksprimirali mutirani protein GFP-OPTN E478G. U ovom slučaju mutirani protein optineurin nije kolokalizirao s proteinskim agregatima čime smo pokazali da protein optineurin lokalizira s proteinskim agregatima nastalim nakon indukcije puromicinom, preko ubikvitina, te je ova interakcija posredovana proteinom ubikvitinom. Protein optineurin mutiran unutar LIR domene, GFP-OPTN F178A je kolokaliziran s proteinskim agregatima (slika 20). Stanice su fiksirane i inkubirane primarnim protutijelima anti-p62 i anti-Ub te sekundarnim protutijelima konjugiranim fluorokromima anti-zečji Cy3 i anti-mišji Cy5.

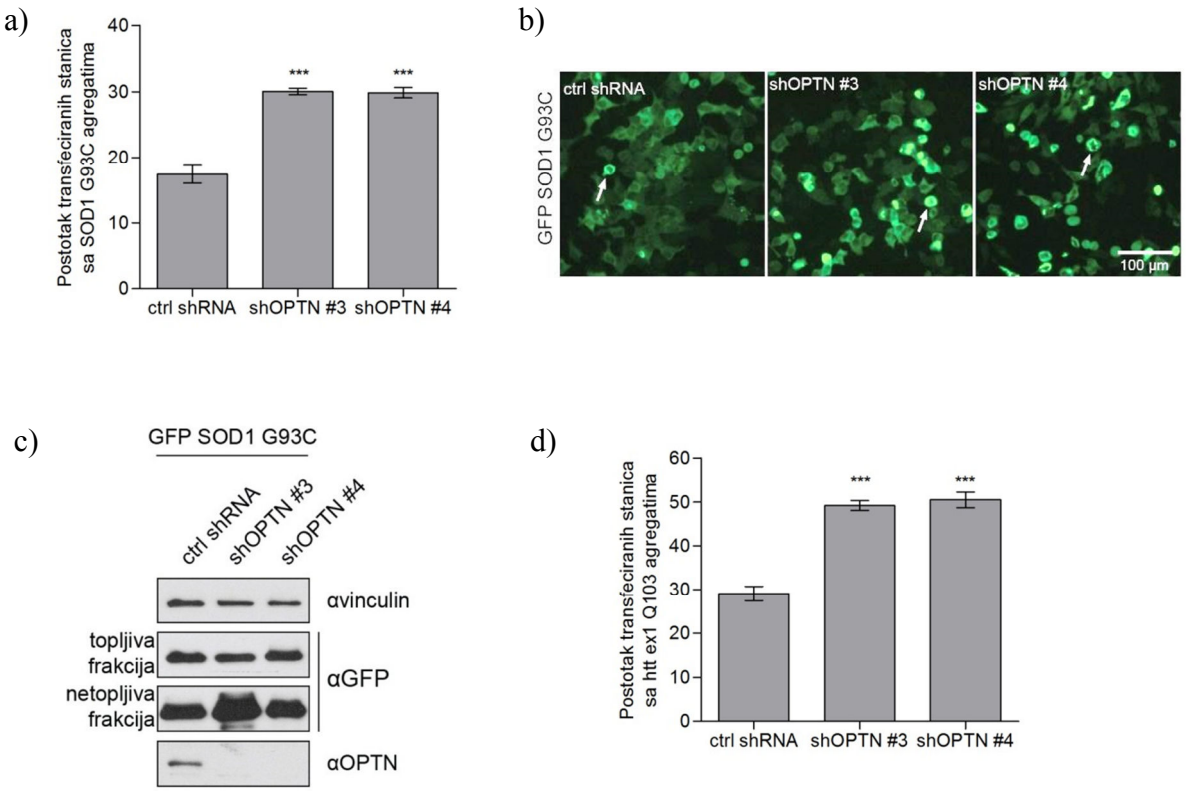


Slika 20. Interakcija proteina optineurina i proteinskih agregata nastalim nakon indukcije puromicinom posredovano ubikvitinom.
Imunofluorescencijska detekcija lokalizacije divljeg tipa i mutanata OPTN E478G i F178A proteina GFP-optineurina (prvi stupac, zeleno) na proteinskim agregatima nastalim nakon indukcije puromicinom koji su pozitivni na proteine p62 (drugi stupac, crveno) i ubikvitin (treći stupac, sivo). Fiksirane stanice su inkubirane protutijelima anti-p62 (drugi stupac, crveno) i anti-Ub (treći stupac, sivo). Kolokalizacija divljeg tipa i mutanti proteina optineurina s proteinima p62 i Ub na proteinskim nakupinama prikazana je u trećem stupcu. Crta mjerila – 5 μm.

Detaljnom analizom pomoću biokemijskih metoda i imunofluorescencijske mikroskopije na staničnim kulturama HeLa pokazali smo da je protein optineurin lokaliziran u proteinskim agregatima preko svoje C-terminalne domene, da je ta interakcija posredna i da je neovisna o proteinu ubikvitin.

4.5 Optineurin utječe na količinu proteinskih nakupina u stanicama

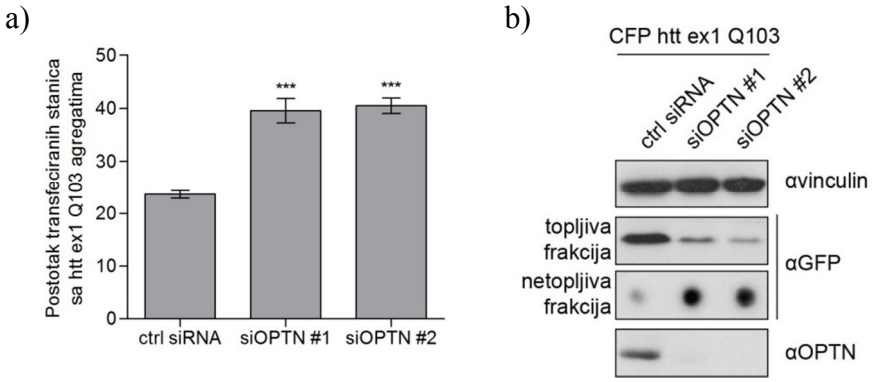
Nakon detaljne biokemijske analize interakcije proteina optineurina s proteinskim nakupinama, potrebno je utvrditi utjecaj proteina optineurina na stvaranje ili uklanjanje proteinskih nakupina. Dobar model za provjeru utjecaja nekih proteina ili procesa na stvaranje ili uklananje proteinskih nakupina je kvantifikacija broja stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C ili GFP-htt ex1 Q103 koje sadrže proteinske nakupine nakon utišavanja ili pojačane ekspresije proteina od interesa te aktivacija ili inhibicija procesa od interesa. U normalnim uvjetima oko 17% stanica HeLa s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C stvaraju proteinske agregate (slika 21a). U stabilnim staničnim linijama s utišanom ekspresijom proteina optineurina dvostruko se povećava postotak stanica koje stvaraju proteinske nakupine (oko 30%) (slika 21a). Na slici 21b prikazane su reprezentativne slike stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C. Osim kvantifikacije staničnih agregata, analizirali smo stanične lizate tih stanica i imunoblot analiza pokazala je povećanje netopljive frakcije mutiranog proteina GFP-SOD1 G93C u stanicama s utišanom ekspresijom proteina optineurina (slika 21c). Dobivene rezultate smo također provjerili i s mutiranim proteinom GFP-htt ex1 Q013. Kvantifikacija stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-htt ex1 Q013 koje sadrže proteinske agregate pokazala je dvostruko povećanje broja tih stanica u staničnoj liniji s utišanom ekspresijom proteina optineurina (slika 21d).



Slika 21. Utišavanje proteina optineurina u stanicama uzrokuje povećano stvaranje proteinskih nakupina.

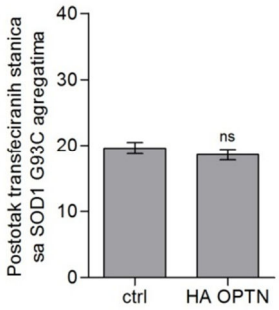
a) Kvantifikacija stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C koje sadrže proteinske agregate. Stabilne stanične linije HeLa s utišanom ekspresijom proteina optineurina (shOPTN #3 i shOPTN#4) i kontrolne stanice (ctrl shRNA) transfecirane su plazmidom za ekspresiju mutiranog proteina GFP-SOD1 G93C te se 48 sati nakon računa postotak stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C koje sadrže proteinske agregate. Grafički prikaz srednjih vrijednosti ± s.e.m. *** P<0.001, n=6. **b)** Reprezentativne slike stanica za svaku staničnu liniju. Strelica pokazuje stanicu s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C koja sadrži proteinske agregate. Crta mjerila – 100 µm. **c)** Imunoanaliza frakcija staničnih lizata. Stabilne stanične linije HeLa s utišanom ekspresijom proteina optineurina (shOPTN #3 i shOPTN#4) i kontrolne stanice (ctrl shRNA) s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C lizirane su u puferima za frakcioniranje topljive i netopljive frakcije. Imunodetekcija tih dviju faza pomoću protutijela anti-GFP. Uspješnost utišavanja ekspresije proteina optineurina provjerena je protutijelom anti-OPTN dok je količina nanešenog uzorka provjerena protutijelom anti-vinculin. **d)** Kvantifikacija stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-htt ex1 Q103 koje sadrže proteinske agregate. Stabilne stanične linije s utišanom ekspresijom proteina optineurina (shOPTN #3 i shOPTN#4) i kontrolne stanice (ctrl shRNA) transfecirane su plazmidom za ekspresiju mutiranog proteina GFP-htt ex1 Q103 te se 48 sati nakon računa postotak stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP- htt ex1 Q103 koje sadrže proteinske agregate. Grafički prikaz srednjih vrijednosti ± s.e.m. *** P<0.001, n=6.

Kako bi bili sigurni da je povećanje broja agregata uzrokovano specifično utišavanjem ekspresije proteina optineurina, dodatno smo to provjerili i u drugom sustavu gdje je u stabilnim staničnim linijama HeLa s eksprimiranim mutiranim proteinom CFP-htt ex1 Q103 prolazno utišana ekspresija proteina optineurina pomoću transfekcije stanica s molekulom siRNA specifičnom za mRNA optineurina. U normalnim uvjetima oko 23% stabilnih staničnih linija HeLa s eksprimiranim CFP-htt ex1 Q103 stvaraju proteinske agregate (slika 22a). Prolazno utišavanje ekspresije proteina optineurina dvostruko povećava broj stanica s proteinskim agregatima (oko 42%). Imunoanaliza tih staničnih lizata potvrdila je dobivene rezultate kvantifikacije. Povećana je netopljiva frakcija mutiranog proteina CFP-htt ex1 Q103 u staničnim lizatima s prolazno utišanom ekspresijom optineurina (slika 22b).



Slika 22. Utišavanje proteina optineurina u stanicama uzrokuje povećano stvaranje proteinskih nakupina.
a) Kvantifikacija stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom CFP-htt ex1 Q013 koje sadrže proteinske agregate. U stabilnoj staničnoj liniji s eksprimiranim CFP-htt ex1 Q013 prolazno je utišana ekspresija proteina optineurina transfekcijom molekule siRNA (siOPTN #1 i siOPTN #2), a u kontroli su stanice transfecirane molekulom kontrolne siRNA (ctrl siRNA). Nakon 72 sata od transfekcije sa siRNA računa se postotak stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom CFP-htt ex1 Q013 koje sadrže proteinske agregate. Grafički prikaz srednjih vrijednosti ± s.e.m. *** $P<0.001$, n=6. **b)** Imunoanaliza frakcija staničnih lizata. Stabilne stanične linije s eksprimiranim CFP-htt ex1 Q013 i prolazno utišanom ekspresijom proteina optineurina ili transfecirane kontrolnom siRNA lizirane su u puferima za frakcioniranje topljive i netopljive frakcije. Imunodetekcija tih dviju faza pomoću protutijela anti-GFP. Uspješnost utišavanja ekspresije proteina optineurina provjerena je s protutijelom anti-OPTN dok je količina nanesenog uzorka provjerena protutijelom anti-vinculin. Topljiva frakcija analizirana je razdvajanjem na SDS poliakrilamidnom gelu dok je netopljiva frakcija analizirana kapljičnom metodom.

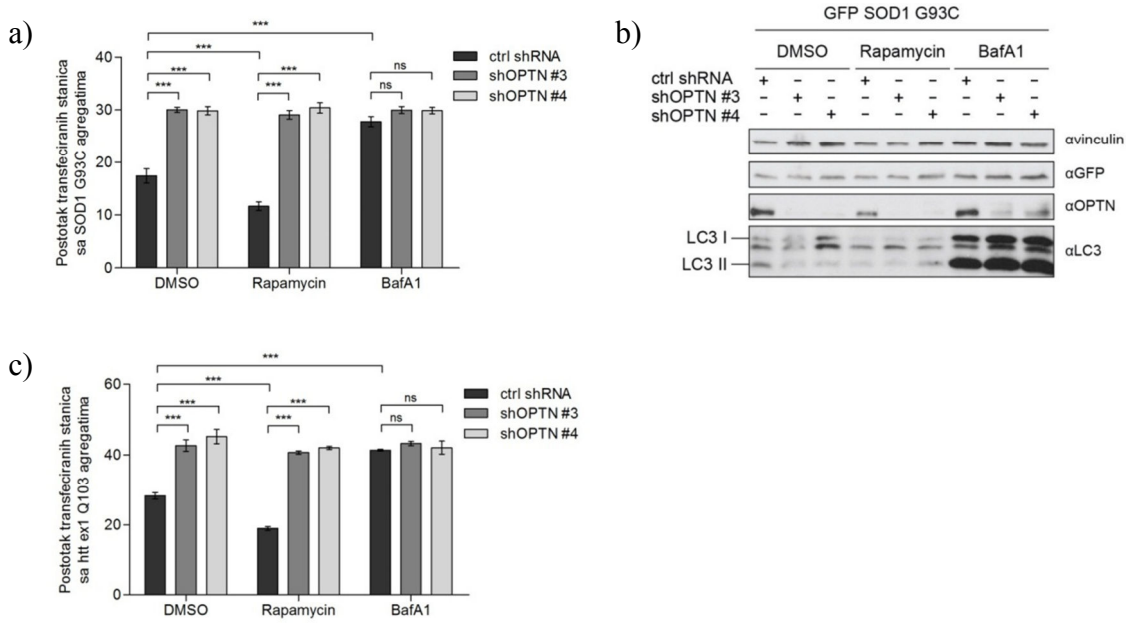
Kako utišavanje ekspresije proteina optineurina uzrokuje povećanje broja stanica s proteinskim nakupinama, postavilo se pitanje kako pojačana ekspresija proteina optineurina utječe na stvaranje i uklanjanje proteinskih nakupina. Analiza stanica koje prekomjerno eksprimiraju protein HA-OPTN i mutirani protein GFP-SOD1 G93C pokazala je da prekomjerna ekspresija ne mijenja broj stanica s proteinskim nakupinama (slika 23).



Slika 23. Pojačana ekspresija proteina optineurina u stanicama ne utječe na stvaranje proteinskih nakupina.
Kvantifikacija stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C i proteinom HA-OPTN koje sadrže proteinske agregate. U staničnoj liniji HeLa eksprimirani su proteini GFP-SOD1 G93C i HA-OPTN te 48 sati nakon računa se postotak stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C i proteinom HA-OPTN koje sadrže proteinske agregate. U kontroli (ctrl) stanice su transfecirane praznim plazmidom. Grafički prikaz srednjih vrijednosti ± s.e.m. ns – nije statistički značajno, n=6.

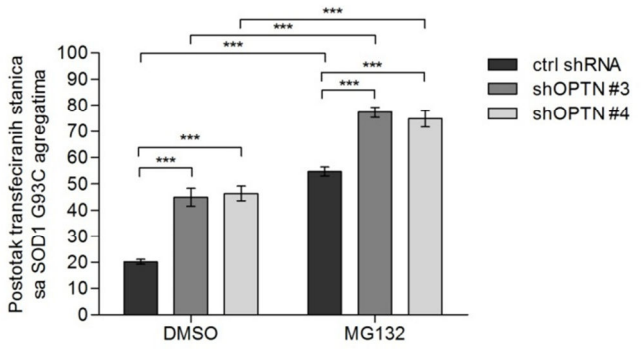
4.6 Protein optineurin sudjeluje u autofagiji proteinskih nakupina

Nakon detaljne biokemijske analize interakcije proteina optineurina i autofagosomalnih proteina LC3/GAPARAP i proteinskih nakupina te analize utjecaja ekspresije proteina na stvaranje i uklanjanje proteinskih nakupina, htjeli smo provjeriti ulogu proteina optineurina u autofagiji proteinskih nakupina. Aktivacija ili inhibicija procesa autofagije utječe na stvaranje proteinskih nakupina tako što aktivacija autofagije pomoću kemikalije rapamicin smanjuje broj stanica s proteinskim nakupinama dok inhibicija autofagije pomoću kemikalije BafilomicinA1 dvostruko povećava broj stanica s proteinskim nakupinama (slika 24a). Utišavanja ekspresije proteina optineurina i inhibicije autofagije uzrokuju jednako povećanje stanica s proteinskim nakupinama. Međutim, inhibicija autofagije u stanicama s utišanom ekspresijom proteina optineurina ne uzrokuje dodatno povećanje broja stanica s proteinskim agregatima. Također, aktivacija autofagije u stanicama s utišanom ekspresijom proteina optineurina ne utječe na broj stanica s proteinskim agregatima. Ovim eksperimentom pokazali smo da optineurin utječe na stvaranje i eliminaciju proteinskih nakupina putem autofagije. Analizirali smo lizate stanica kvantificirane u eksperimentu na slici 24a kako bi provjerili uspješnost ekspresije mutiranog proteina GFP-SOD1 G93C te utišavanja proteina optineurina (slika 24b). Aktivacija i inhibicija autofagije mjeri se analizom proteina LC3 gdje LC3-I predstavlja nekonjugirani oblik, a LC3-II konjugirani oblik proteina. Prilikom tretmana kemikalijom rapamicin dolazi do aktivacije autofagije, time i pojačane fuzije autofagosoma s lizosomom što rezultira smanjenjem konjugiranog proteina LC3-II. S druge strane, prilikom tretmana kemikalijom Bafilomicin A1 dolazi do inhibicije autofagije tako što se inhibira fuzija autofagosoma s lizosomima što rezultira povećanjem broja autofagosoma, a time dolazi do povećanja konjugiranog proteina LC3-II. Isti eksperiment je ponovljen sa stanicama koje eksprimiraju mutirani protein GFP-htt ex1 Q103 (slika 24c) gdje su dobiveni isti rezultati. Ovim eksperimentima smo pokazali da protein optineurin sudjeluje u autofagiji proteinskih nakupina.



Slika 24. Protein optineurin sudjeluje u autofagiji proteinskih nakupina.
a) Kvantifikacija stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C koje sadrže proteinske agregate. Stabilne stanične linije HeLa s utišanom ekspresijom proteina optineurina (shOPTN #3 i shOPTN#4) i kontrolne stanice (ctrl shRNA) transfecirane su plazmidom za ekspresiju mutiranog proteina GFP-SOD1 G93C te 12 sati nakon transfekcije tretirane kemikalijama rapamicin i Bafilomicin A1 (BafA1). Kao kontrola tretmana korišten je DMSO. Nakon 48 sati od transfekcije računa se postotak stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C koje sadrže proteinske agregate. Grafički prikaz srednjih vrijednosti ± s.e.m. *** P<0.001, n=6. **b)** Imunoanaliza staničnih lizata. Stabilne stanične linije HeLa s utišanom ekspresijom proteina optineurina (shOPTN #3 i shOPTN#4) i kontrolne stanice (ctrl shRNA) s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C lizirane su u puferu RIPA. Imunodetekcija pomoću protutijela anti-GFP za kontrolu ekspresije proteina GFP-SOD1 G93C i anti-LC3 za kontrolu tretmana kemikalijama rapamicin i Bafilomicin A1 (LC3-I i LC3-II). Uspješnost utišavanja ekspresije proteina optineurina provjerena je s protutijelom anti-OPTN dok je količina nanesenog uzorka provjerena protutijelom anti-vinculin. **c)** Kvantifikacija stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-htt ex1 Q103 koje sadrže proteinske agregate. Stabilne stanične linije HeLa s utišanom ekspresijom proteina optineurina (shOPTN #3 i shOPTN#4) i kontrolne stanice (ctrl shRNA) transfecirane su plazmidom za ekspresiju mutiranog proteina GFP-htt ex1 Q103 te 12 sati nakon transfekcije tretirane kemikalijama rapamicin i Bafilomicin A1. Kao kontrola tretmana korišten je DMSO. Nakon 48 sati od transfekcije računa se postotak stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-htt ex1 Q103 koje sadrže proteinske agregate. Grafički prikaz srednjih vrijednosti ± s.e.m. *** P<0.001, n=6.

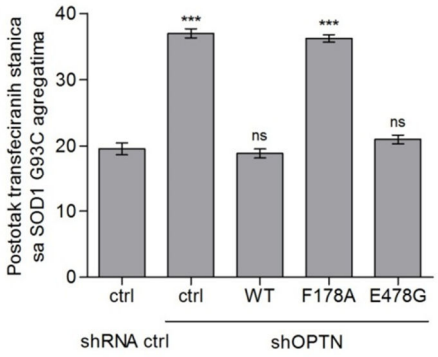
Također smo htjeli usporediti utjecaj inhibicije proteasomalne aktivnosti na stvaranje i uklanjanje proteinskih nakupina u normalnim stanicama i stanicama s utišanom ekspresijom proteina optineurina. Inhibicija proteasomalne aktivnosti pomoću kemikalije MG132 uzrokovala je povećanje broja stanica s proteinskim nakupinama od 2,5 puta (oko 45%) u normalnim uvjetima, te dodatno povećanje (oko 75%) u stanicama s utišanom ekspresijom proteina optineurina (slika 25). Ovi rezultati ukazuju da protein optineurin ne sudjeluje u procesu razgradnje proteina pomoću proteasoma i dodatno potvrđuje da optineurin sudjeluje u autofagiji proteinskih nakupina.



Slika 25. Inhibicije proteasomalne aktivnosti u stanicama uzrokuje povećano stvaranje proteinskih nakupina u normalnim stanicama i u stanicama s utišanom ekspresijom proteina optineurina.
Kvantifikacija stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C koje sadrže proteinske agregate. Stabilne stanične linije HeLa s utišanom ekspresijom proteina optineurina (shOPTN #3 i shOPTN#4) i kontrolne stanice (ctrl shRNA) transfecirane su plazmidom za ekspresiju mutiranog proteina GFP-SOD1 G93C te 12 sati nakon transfekcije tretirane kemikalijom MG132. Kao kontrola tretmana korišten je DMSO. Nakon 48 sati od transfekcije računa se postotak stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C koje sadrže proteinske agregate. Grafički prikaz srednjih vrijednosti ± s.e.m. *** $P<0.001$, $n=6$.

4.7 Protein optineurin dovlači autofagosomalnu membranu na proteinske nakupine vezanjem za proteinske nakupine svojim C-terminalnim dijelom te vezanjem na autogafosomalni protein LC3 svojom domenom LIR

Pokazali smo da protein optineurin svojom C-terminalnom zavojitom domenom veže proteinske agregate te svojom domenom LIR veže autofagosomalne proteine LC3/GABARAP. Također smo pokazali da optineurin sudjeluje u autofagiji proteinskih nakupina. Sve ovo dovodi do pretpostavke da protein optineurin kao autofagosomalni receptor vezući se za proteine LC3/GABARAP dovlači autofagosomalnu membranu na proteinske nakupine. Kako bi to potvrdili eksprimirali smo zajedno s mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C i divlji tip proteina HA-OPTN ili mutirane protein HA-OPTN F178A i E478G u stanicama kojima je utišana ekspresija proteina optineurina. Pojačana ekspresija divljeg tip HA-OPTN smanjila je broj proteinskih agregata u stanicama koje su prvotno imale utišanu endogenu ekspresiju proteina optineurina na broj jednak kao i u kontrolnim stanicama (shRNA ctrl). S druge strane, pojačana ekspresija mutiranog proteina HA-OPTN F178A nije smanjila broj proteinskih agregata u stanicama koje su prvotno imale utišanu endogenu ekspresiju proteina optineurina (slika 26). Nemogućnost vezanja proteina optineurina i autofagosomalnih proteina LC3/GABARAP, onemogućilo je dovođenje autofagosomalne membrane na proteinske nakupine, a time i onemogućilo autofagosomalnu razgradnju proteinskih nakupina. Kako smo dokazali da mutirani protein optineurina E478G ne utječe na interakciju s proteinskim nakupinama, njega smo koristili kao dodatnu kontrolu u ovom eksperimentu. Pojačana ekspresija mutiranog proteina HA-OPTN E478G smanjila je broj proteinskih agregata u stanicama koje su prvotno imale utišanu endogenu ekspresiju proteina optineurina na broj jednak kao i u kontrolnim stanicama.

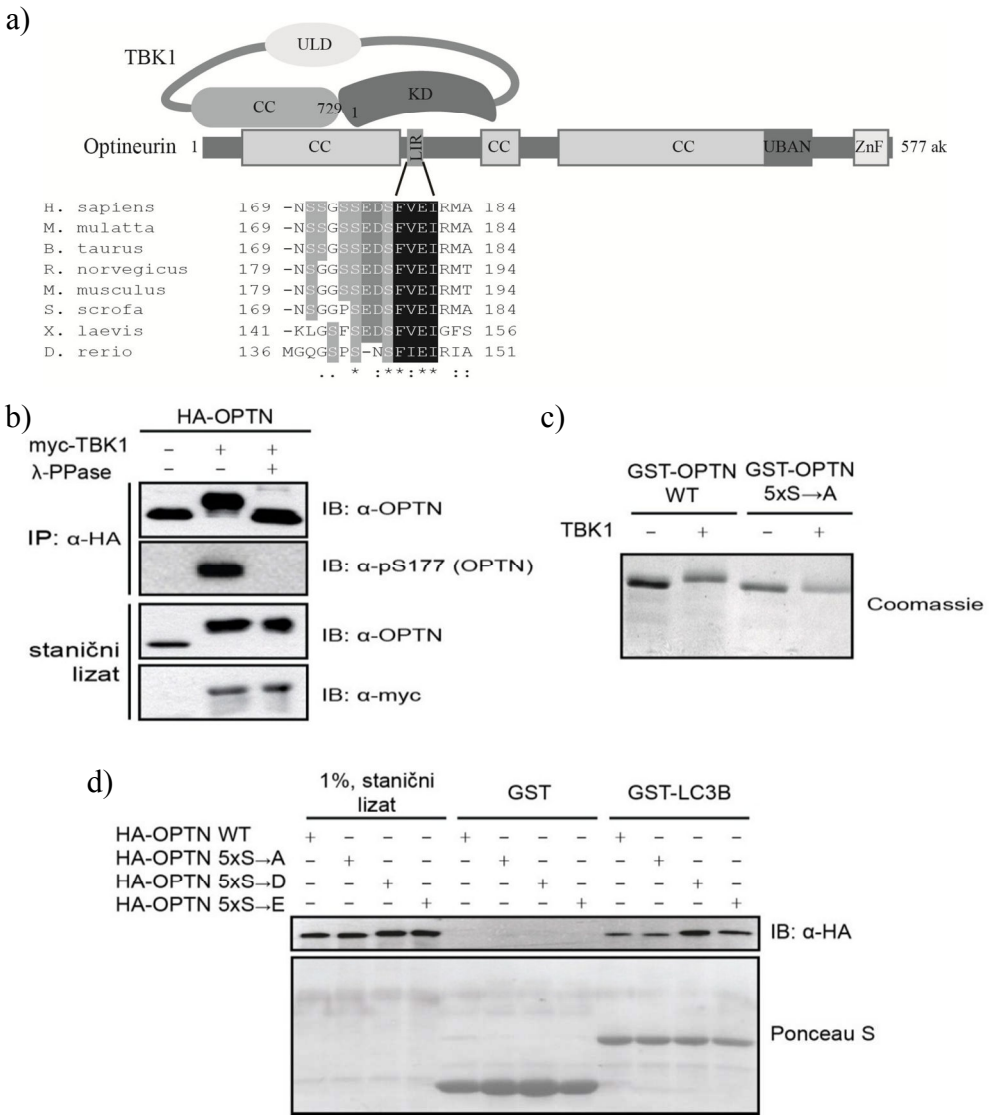


Slika 26. Pojačana ekspresija mutiranog proteina optineurina F178A nije smanjila broj proteinskih agregata u stanicama koje su prvotno imale utišanu endogenu ekspresiju proteina optineurina.

Kvantifikacija stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C koje sadrže proteinske agregate. Stabilne stanične linije HeLa s utišanom ekspresijom proteina optineurina (shOPTN) transfecirane su plazmidom za ekspresiju mutiranog proteina GFP-SOD1 G93C i plazmidom za ekspresiju divljeg tipa proteina HA-OPTN (wt) ili mutiranih proteina HA-OPTN F178A i E478G (F178A, E478G). Kontrolne stanice (shRNA ctrl) i stanice s utišanom ekspresijom proteina optineurina (shOPTN) su transfecirane praznim plazmidom kao kontrola. Nakon 48 sati od transfekcije računa se postotak stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C koje sadrže proteinske agregate. Grafički prikaz srednjih vrijednosti ± s.e.m. *** $P<0.001$, $n=6$.

4.8 Vezanje proteina optineurina i LC3 ovisno je o fosforilaciji serina neposredno prije domene LIR pomoću kinaze TBK1

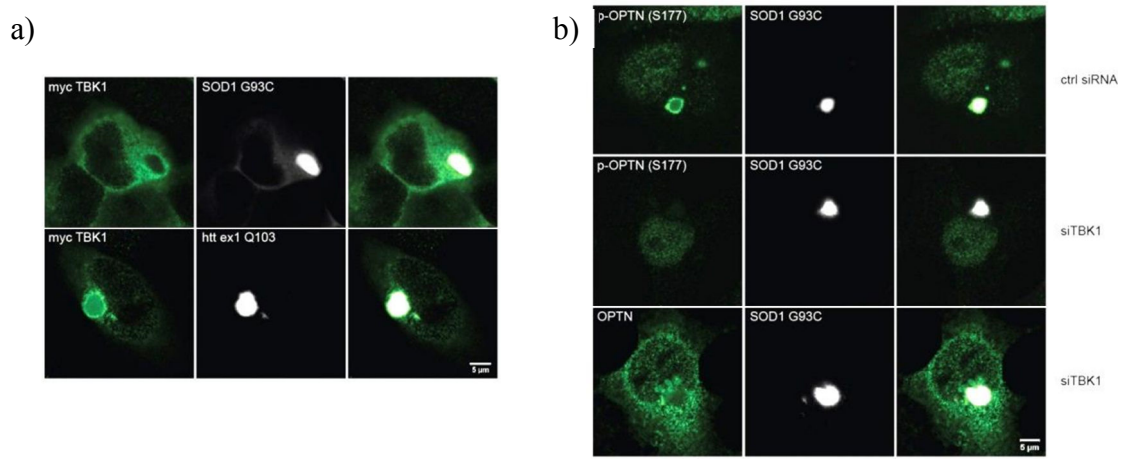
Od prije je poznato da se kinaza TBK1 veže na protein optineurin fosforilirajući ga (113). Analizom aminokiselinskog slijeda proteina optineurina pomoću programa ClustalW, pokazana je prisutnost pet serina u neposrednoj blizini domene LIR (slika 27a) konzerviranih u svim vrstama. Pojačana ekspresija kinaze myc-TBK1 uzrokuje pomak proteina optineurina u SDS poliakrilamidnom gelu što bi odgovaralo fosforilaciji proteina (slika 27b). Dodajući lambda fosfatazu (λ-PPase) u stanični lizat gubi se taj pomak proteina optineurina u gelu što potvrđuje da pomak u gelu uzrokuje fosforilacija proteina. To smo dodatno potvrdili protutijelom anti-pSer177 optineurin koje specifično prepoznaje fosforilirani serin na poziciji 177. Kako bi potvrdili da se radi o fosforilaciji serina neposredno prije domene LIR na proteinu optineurinu pomoću kinaze TBK1 koristili smo metodu *in vitro* fosforilacije. Mutirali smo 5 serina na pozicijama S170, S171, S173, S174 i S178 neposredno prije domene LIR (5S→A) i zamijenili ih s alaninom čime se onemogućuje fosforilacija na tim pozicijama. Inkubirali smo proteine GST-OPTN i GST-OPTN 5S→A vezane na glutationske sefarozne kuglice s rekombinantnom kinazom TBK1 te ih potom razdvojili u gelu i obojali bojom Coomassie (slika 27c). Kinaza TBK1 fosforilira divlji tip proteina optineurina što je vizualizirano pomakom u gelu za razliku od mutanta GST-OPTN 5S→A kod kojeg nije došlo do pomaka u gelu. Ovim eksperimentom dokazali smo kako kinaza TBK1 fosforilira protein optineurin na serinima neposredno prije domene LIR. Pomoću metode *GST pull down* provjerili smo da li fosforilacija utječe na vezanje proteina optineurina i autofagosomalnog proteina LC3 (slika 27d). Divlji tip proteina HA-OPTN, mutirani protein HA-OPTN 5S→A koji onemogućuje fosforilaciju te mutirane proteine HA-OPTN 5S→E i HA-OPTN 5S→D koji imitiraju fosforilaciju inkubirali smo s proteinom GST-LC3B vezanim na glutationske sefarozne kuglice. Imunodetekcija s protutijelom anti-OPTN pokazala je pojačano vezanje mutanata HA-OPTN 5S→E i HA-OPTN 5S→D i proteina GST-LC3. Ovime smo dokazali da je interakcija između proteina optineurina i LC3 regulirana fosforilacijom serina koji se nalaze neposredno prije domene LIR.



Slika 27. Fosforilacija serina neposredno prije domene LIR pomoću kinaze TBK1.
a) Shematski prikaz proteina optineurina i kinaze TBK1 s pripadajućim domenama. Detaljan prikaz sekvence s konzerviranim serinima neposredno prije domene LIR i usporedba između vrsta. CC – domena zavojite uzvojnice (engl. *coiled coil domain*), LIR – LC3 vezujuća domena (engl. *LC3-Interacting Region*), UBAN – ubikvitin vezujuća domena u proteinima ABIN i NEMO (engl. *Ubiquitin binding in ABIN and NEMO*), ZnF – domena cinkova prsta (engl. *Zinc finger domain*), ULD – ubikvitinu slična domena (engl. *Ubiquitin like domain*), KD – katalitička domena (engl. *Kinase domain*). ***** – iste aminokiseline, **:** – konzervirana zamjena, **.** – djelomično konzervirana zamjena. **b)** Imunoprecipitacija staničnih lizata s pojačano eksprimiranim proteinima HA-OPTN i myc-TBK1 pomoću protutijela anti-HA od čega je jedan uzorak poslije tretiran s fosfatazom. Kao negativna kontrola korišten je stanični lizat s pojačanom ekspresijom proteina HA-OPTN bez pojačane ekspresije kinaze TBK1. Imunodetekcija imunoprecipitacije (IP: α-HA) i tretmana te staničnog lizata (stanični lizat) pomoću protutijela anti-optineurin, anti-pSer177 optineurin i anti-myc. **c)** Analiza proteina GST-OPTN i GST-OPTN 5S→A nakon inkubacije s rekombinantnom kinazom TBK1 u SDS poliakrilamidnom gelu obojanim bojom Coomassie. **d)** Analiza interakcije divljeg tipa proteina HA-OPTN i mutiranih proteina HA-OPTN 5S→A, 5S→D i 5S→E i proteina GST-LC3 pomoću metode *GST pull down*. Gornji dio slike prikazuje imunodetekciju pomoću protutijela anti-HA, dok donji dio slike prikazuje bojanje membrane bojom PonceauS.

4.9 TBK1 u proteinskim agregatima fosforilira optineurin

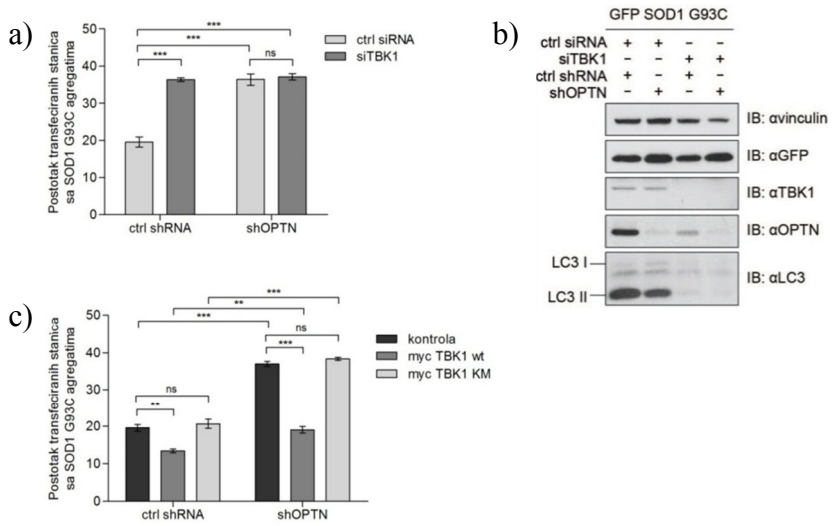
Kako smo dokazali da je protein optineurin autofagosomalni receptor za autofagiju proteinskih nakupina i da je interakcija optineurina i autofagosomalnog proteina LC3 regulirana fosforilacijom pomoću kinaze TBK1, htjeli smo provjeriti da li se kinaza TBK1 također nalazi u proteinskim agregatima i da li je protein optineurin lokaliziran u proteinskim nakupinama fosforiliran. U stanicama HeLa eksprimirali smo myc-TBK1 i pomoću imunofluorescencijske mikroskopije pokazali lokalizaciju na proteinskim nakupinama mutiranih proteina GFP-SOD1 G93C i GFP-htt ex1 Q103 (slika 28a). Stanice su fiksirane i inkubirane primarnim protutijelom anti-myc te sekundarnim protutijelom konjugiranim fluorokromom anti-mišji Cy3. Imunofluoresencijskom mikroskopijom pomoću protutijela anti-pSer177 optineurin dokazali smo da je protein optineurin fosforiliran na proteinskim nakupinama. Kako bi potvrdili da kinaza TBK1 fosforilira protein optineurin, utišali smo ekspresiju kinaze TBK1 te dokazali da protein optineurin lokaliziran na proteinskim nakupinama u tim stanicama nije fosforiliran (slika 28b). Stanice su fiksirane i inkubirane primarnim protutijelima anti- pSer177 optineurin i anti-optineurin te sekundarnim protutijelom konjugiranim fluorokromom anti-zečji Cy3.



Slika 28. Lokalizacija kinaze TBK1 i fosforiliranog proteina optineurina na proteinskim nakupinama.
a) Imunofluorescencijska detekcija lokalizacije kinaze myc-TBK1 (prvi stupac, zeleno) s mutiranim proteinima GFP-SOD1 G93C i GFP-htt ex1 Q103 (drugi stupac, sivo). Fiksirane stanice su inkubirane s protutijelom anti-myc (prvi stupac, zeleno). Kolokalizacija proteina GFP-SOD1 G93C i GFP-htt ex1 Q103 i kinaze myc-TBK1 prikazana je u trećem stupcu. **b)** Imunofluorescencijska detekcija lokalizacije fosforiliranog proteina optineurina (prvi stupac, zeleno) s mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C (drugi stupac, sivo) u kontrolnim stanicama (prvi red) i stanicama s utišanom ekspresijom kinaze TBK1 (drugi red). Fiksirane stanice su inkubirane s protutijelom anti-pSer177 optineurin (prvi stupac, prvi i drugi red, zeleno). Kolokalizacija proteina GFP-SOD1 G93C i fosforiliranog proteina optineurina prikazana je u trećem stupcu. Kao kontrola prisutnosti proteina optineurina na proteinskim nakupinama stanice s utišanom ekspresijom kinaze TBK1 inkubirane su s anti-optineurin (prvi stupac, treći red, zeleno). Crta mjerila – 5 µm.

4.10 TBK1 utječe na količinu proteinskih nakupina u stanicama

Osim što smo pokazali da je kinaza TBK1 prisutna na proteinskim nakupinama i da fosforilira protein optineurin, htjeli smo provjeriti da li ona sama utječe na stvaranje i uklanjanje proteinskih nakupina. Nakon utišavanja ekspresije kinaze TBK1 pomoću siRNA u kontrolnim stanicama (ctrl shRNA), udvostručio se broj stanica s proteinskim nakupinama mutiranog proteina GFP-SOD1 G93C dok nakon utišavanja ekspresije kinaze TBK1 u stanicama s utišanom ekspresijom proteina optineurina (shOPTN) nije došlo do dodatnog povećanja proteinskih nakupina (slika 29a). Na temelju ovih rezultata možemo zaključiti da kinaza TBK1 utječe na stvaranje i uklanjanje proteinskih nakupina istim mehanizmom kao i protein optineurin. Analizom staničnih lizata imunodetekcijom provjerili smo uspješnost utišavanja i ekspresije proteina u eksperimentu (slika 29b). Imunodetekcija proteina LC3 pokazala je gubitak proteina LC3-II u stanicama s utišanom ekspresijom kinaze TBK1 što indicira da je kinaza TBK1 važna u regulaciji procesa autofagije. Prilikom pojačane ekspresije kinaze TBK1 dolazi do smanjenja broja stanica s proteinskim nakupinama kao i kod tretmana kemikalijom rapamicin koja aktivira proces autofagije. Kako bi potvrdili da je za taj efekt odgovorna katalitička aktivnost kinaze TBK1, eksprimirali smo u stanicama kinazu TBK1 kojoj je mutirana katalitička aktivnost te u tim stanicama nije došlo do smanjenja broja stanica s proteinskim nakupinama (slika 29c). Također smo provjerili da li je aktivnost kinaze TBK1 ovisna o prisutnosti proteina optineurin. U stanicama s utišanom ekspresijom proteina optineurina, pojačana ekspresija kinaze TBK1 smanjuje broj stanica s proteinskim nakupinama ali ne do te razine kao u kontrolnim stanicama (slika 29c). Time smo pokazali da kinaza TBK1 sudjeluje u regulaciji autofagije proteinskih nakupina fosforilirajući protein optineurin ali i druge proteine koji sudjeluju u tom procesu.

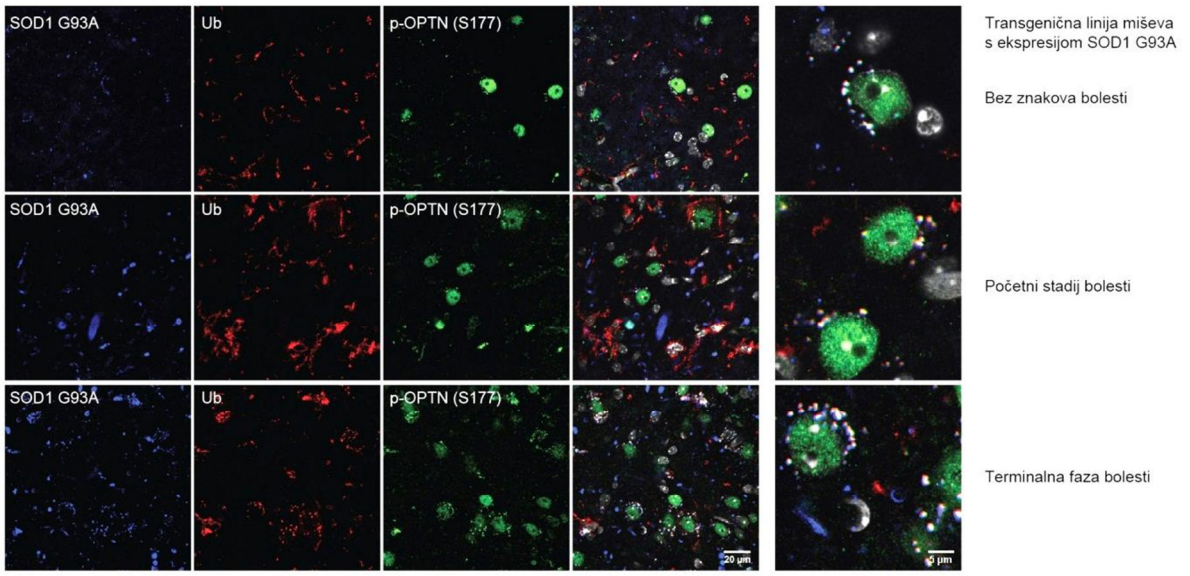


Slika 29. Utišavanje kinaze TBK1 u stanicama uzrokuje povećano stvaranje proteinskih nakupina, dok pojačana ekspresija kinaze TBK1 uzrokuje smanjeno stvaranje proteinskih nakupina.

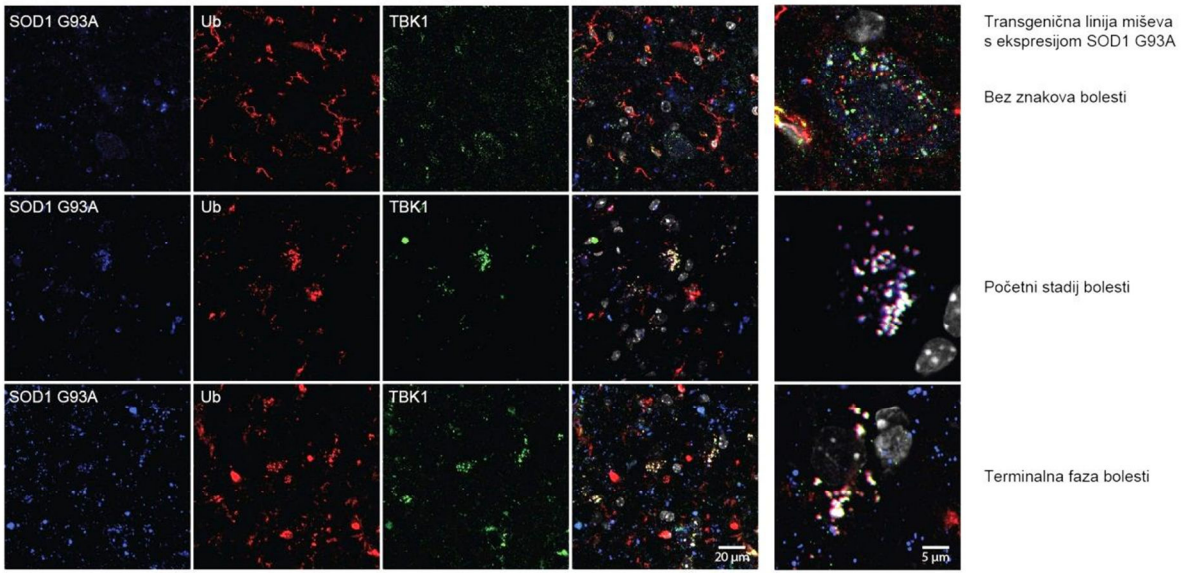
a) Kvantifikacija stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C koje sadrže proteinske agregate. Stabilne stanične linije HeLa s utišanom ekspresijom proteina optineurina (shOPTN) i kontrolne stanice (ctrl shRNA) transfcirane su plazmidom za ekspresiju mutiranog proteina GFP-SOD1 G93C. U stanicama je prolazno utišana ekspresija kinaze TBK1 transfekcijom molekule siRNA (siTBK1), a u kontroli su stanice transfecirane molekulom kontrolne siRNA (ctrl siRNA). Nakon 72 sata od transfekcije siRNA i 48 sati nakon transfekcije plazmida računa se postotak stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C koje sadrže proteinske agregate. Grafički prikaz srednjih vrijednosti ± s.e.m. *** P<0.001, n=6. **b)** Imunoanaliza staničnih lizata. Stabilne stanične linije HeLa s utišanom ekspresijom proteina optineurina (shOPTN) i kontrolne stanice (ctrl shRNA) s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C lizirane su u puferu RIPA. Imunodetekcija pomoću protutijela anti-GFP za kontrolu ekspresije proteina GFP-SOD1 G93C. Uspješnost utišavanja ekspresije proteina optineurina i kinaze TBK1 provjerena je protutijelima anti-OPTN i anti-TBK1 dok je količina nanesenog uzorka provjerena protutijelom anti-vinculin. Pomoću protutijela anti-LC3 je provjeren status proteina LC3 (LC3I i LC3II). **c)** Kvantifikacija stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C koje sadrže proteinske agregate. Stabilne stanične linije HeLa s utišanom ekspresijom proteina optineurina (shOPTN) i kontrolne stanice (ctrl shRNA) transfecirane su plazmidima za ekspresiju mutiranog proteina GFP-SOD1 G93C i ekspresiju divljeg tipa ili mutirane kinaze TBK1 (myc-TBK1 wt i KM). Nakon 48 sati od transfekcije plazmida računa se postotak stanica s eksprimiranim mutiranim proteinom GFP-SOD1 G93C koje sadrže proteinske agregate. Grafički prikaz srednjih vrijednosti ± s.e.m. *** P<0.001, n=6.

4.11 Fosforilirani optineurin i kinaza TBK1 vežu proteinske nakupine u mišjem modelu ALS-a

Kako smo po prvi put pokazali da je kinaza TBK1 lokalizirana na proteinskim nakupinama u stanicama HeLa te da fosforilira protein optineurin na proteinskim nakupinama, htjeli smo to dodatno potvrditi proučavajući proteinske nakupine u transgeničnom mišu s eksprimiranim SOD1 G93A. Analizirali smo lumbalni dio kralježnice miša starosti pet, sedam i deset mjeseci. Imunohistokemijom smo pokazali da su proteinske nakupine pozitivne na mutirani SOD1 G93A i ubikvitin također pozitivne i na fosforilirani protein optineurin (slika 30) i na kinazu TBK1 (slika 31). Fiksirani lumabalni dio leđne moždine izrezan kriostatom je inkubiran primarnim protutijelima anti-Ub i anti- anti-pSer177 ili anti-TBK1 te sekundarnim protutijelima konjugiranim fluorokromima anti-mišji Alexa488 i anti-zečji Cy3 te je naknadno inkubiran s anti-SOD1 konugiranim s fluorokromom Cy5.



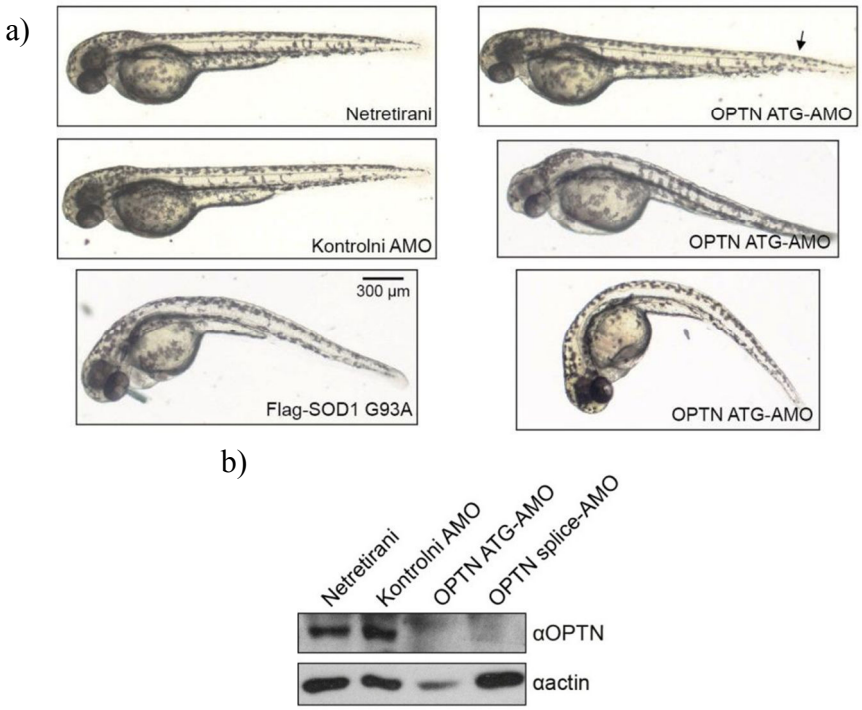
Slika 30. Kolokalizacija fosforiliranog proteina optineurina i proteinskih nakupina u lumbalnom dijelu kralježnice transgeničnog miša s ekspresijom SOD1 G93A.
Imunohistokemija lumbalnog dijela kralježnice transgeničnog miša s ekspresijom SOD1 G93A starosti 5 mjeseci (bez znakova bolesti, prvi red), 7 mjeseci (početni stadij bolesti, drugi red) i 10 mjeseci (terminalna faza bolesti, treći red). Imunodetekcija pomoću protutijela anti-SOD1 (plavo, prvi stupac), anti-Ub (crveno, drugi stupac) i anti-pSer177 (zeleno, treći stupac). Kolokalizacija SOD1-pozitivnih proteinskih nakupina, ubikvitina i fosforiliranog proteina optineurina prikazana je u četvrtom stupcu. Zadnji stupac predstavlja uvećane slike proteinskih nakupina. Crta mjerila – 20 µm (prva četiri stupca), 5 µm (zadnji stupac).



Slika 31. Kolokalizacija kinaze TBK1 i proteinskih nakupina u lumbalnom dijelu kralježnice transgeničnog miša s ekspresijom SOD1 G93A.
Imunohistokemija lumbalnog dijela kralježnice transgeničnog miša s ekspresijom SOD1 G93A starosti 5 mjeseci (bez znakova bolesti, prvi red), 7 mjeseci (početni stadij bolesti, drugi red) i 10 mjeseci (terminalna faza bolesti, treći red). Imunodetekcija pomoću protutijela anti-SOD1 (plavo, prvi stupac), anti-Ub (crveno, drugi stupac) i anti-TBK1 (zeleno, treći stupac). Kolokalizacija SOD1-pozitivnih proteinskih nakupina, ubikvitina i kinaze TBK1 prikazana je u četvrtom stupcu. Zadnji stupac predstavlja uvećane slike proteinskih nakupina. Crta mjerila – 20 µm (prva četiri stupca), 5 µm (zadnji stupac).

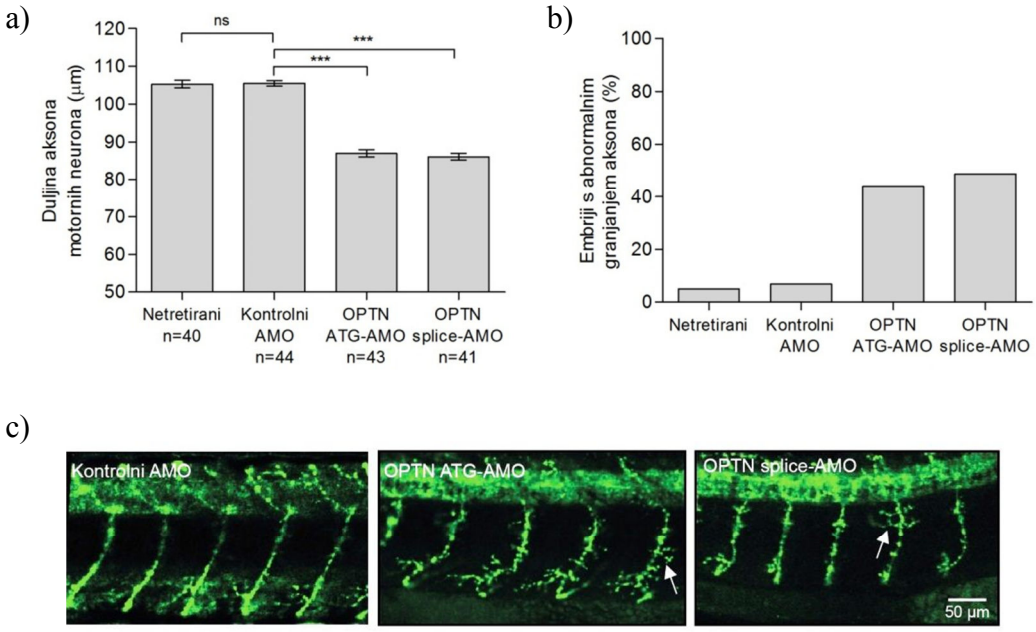
4.12 Utišavanje optineurina u zebrici uzrokuje simptome ALS

U pacijenata koji boluju od amiotrofične lateralne skleroze pronađene su mutacije u genu za optineurin. Koristeći modelni organizam ribu zebricu (dobar model za ALS) htjeli smo provjeriti hoće li utišavanje ekspresije proteina optineurina uzrokovati fenotip ALS-a. Iniciranjem morfolino oligonukleotida specifičnim za gen optineurin u embrij ribice postigli smo kratkotrajno utišavanje ekspresije proteina optineurina. U svim eksperimentima koristili smo dva različita morfolino oligonukleotida kako bi se isključilo nespecifično toksično djelovanje samog morfolino oligonukleotida. Jedan morfolino oligonukleotid veže se na početak mRNA i blokira translaciju proteina (ATG-AMO), a drugi se veže na kraj drugog egzona i početak drugog introna te tako sprječava pravilno prekrajanje pre-mRNA. Embrij ribice s eksprimiranim mutiranim proteinom SOD1 (Flag-SOD1 G93A) izražava fenotip ALS-a koji se očitava u zakrivljenom repu ribice i nemogućnošću odgovora plivanjem na dodir repa embrija 48 sati nakon fertilizacije (slika 32a). Ekspresija mutiranog proteina SOD1 izaziva se iniciranjem mRNA u žumančanu vrećicu embrija. Utišavanjem ekspresije proteina optineurina razvija se embrij s fenotipom sličnim fenotipu ALS-a (slika 32a, desno). Uspješnost utišavanja ekspresije proteina optineurina provjerili smo analizom lizata embrija pomoću imunodetekcije koristeći protutijela anti-OPTN i anti-actin (slika 32b).



Slika 32. Utišavanje ekspresije proteina optineurina u ribi zebrici dovodi do razvoja ALS fenotipa.
a) Prikaz normalnog netretiranog embrija ribe zebrice (gore lijevo) i embrija s injektiranim kontrolnim morfolino oligonukleotidom (kontrolni AMO, sredina lijevo). Nakon 48 sati od injektiranja morfolina oligonukleotida specifičnim za gen OPTN (OPTN ATG-AMO i OPTN splice-AMO), embrio s utišanom ekspresijom optineurina je razvio fenotip (desno, OPTN ATG-AMO, strelica – zakrivljen rep) sličan embriju s pojačanom ekspresijom mutiranog proteina Flag-SOD1 G93A (dolje lijevo). **b)** Analiza lizata embrija ribe zebrice liziranih u puferu RIPA pomoću imunodetekcije. Uspješnost utišavanja ekspresije proteina optineurina provjerena je protutijelom anti-OPTN dok je količina nanesenog uzorka provjerena protutijelom anti-actin. Crta mjerila – 300 µm.

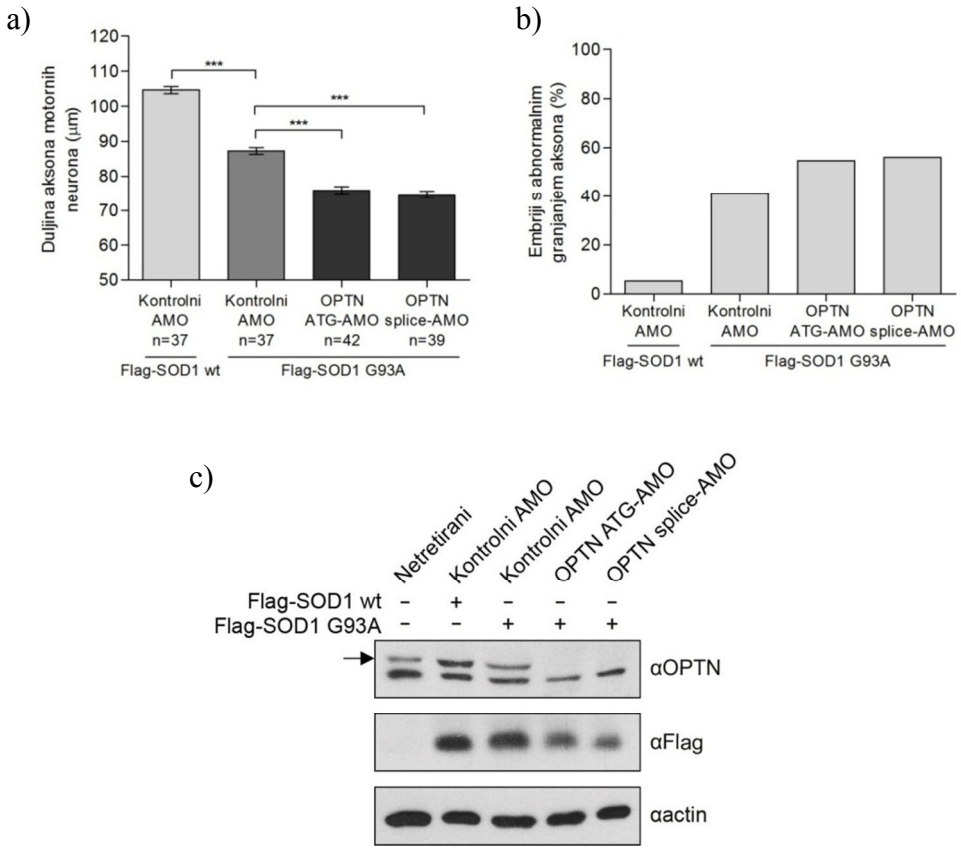
Jedna od karakteristika fenotipa embrija s eksprimiranim mutiranim proteinom SOD1 je skraćivanje aksona motornih neurona kao i njihovo abnormalno grananje. Motorne neurone embrija s utišanom ekspresijom proteina optineurina vizualizirali smo koristeći protutijelo anti-SV2. Analiza motornih neurona pokazala je skraćene aksone neurona te veći broj embrija s aksonima koji se abnormalno granaju (slika 33a i b). Izgled tih neurona prikazan je na slici 33c. Embriji su fiksirani i inkubirani primarnim protutijelom anti-SV2 te sekundarnim protutijelom konjugiranim fluorokromom anti-mišji Cy3.



Slika 33. Utišavanje ekspresije proteina optineurina u ribi zebrici dovodi do skraćenja duljine i abnormalnog grananja aksona motornih neurona
a) Kvantifikacija duljine aksona motornih neurona u netretiranim embrijima te embrijima tretiranim s kontrolnim AMO i AMO specifičnim za gen optineurin (OPTN ATG-AMO i splice-AMO). Duljina aksona motornih neurona predstavlja prosjek duljina prvih 10 aksona nakon žumančane vrećice u jednom embriju. Grafički prikaz srednjih vrijednosti ± s.e.m. *** $P<0.001$, ns – nije statistički značajno, n = prikazan ispod svake skupine embrija. **b)** Kvantifikacija embrija s abnormalnim grananjem aksona prikazan kao postotak embrija koji imaju abnormalno grananje dva ili više aksona. **c)** Reprezentativan prikaz aksona motornih neurona u embrijima tretiranim s kontrolnim AMO i AMO specifičnim za gen optineurin (OPTN ATG-AMO i splice-AMO). Embriji su fiksirani i inkubirani s protutijelom anti-SV2. Strelice pokazuju abnormalno grananje aksona. Crta mjerila – 50 µm.

4.13 Utišavanje optineurina u zebrici pogoršava simptome ALS-a uzrokovane mutiranim proteinom SOD1 G93A

Osim što samo utišavanje ekspresije proteina optineurina uzrokuje fenotip ALS-a u embrijima ribe zebrice, htjeli smo provjeriti utječe li utišavanje ekspresije proteina optineurina na embrije s već izraženim fenotipom ALS-a uzrokovanim ekspresijom mutiranog proteina Flag-SOD1 G93A. Analiza motornih neurona pokazala je da utišavanje ekspresije proteina optineurina u embrijima s eksprimiranim mutiranim proteinom SOD1 uzrokuje dodatno skraćenje motornih neurona i još veći broj embrija s abnormalnim grananjem aksona (slika 34a i b). Uspješnost utišavanja ekspresije proteina optineurina i ekspresije mutiranog proteina Flag-SOD1 G93A provjerili smo analizom lizata embrija pomoću imunodetekcije koristeći protutijela anti-OPTN, anti-Flag i anti-actin (slika 34c).



Slika 34. Utišavanje ekspresije proteina optineurina u ribi zebrici s eksprimiranim mutiranim Flag-SOD1 G93A dovodi do dodatnog skraćenja duljine i abnormalnog grananja aksona motornih neurona.

a) Kvantifikacija duljine aksona motornih neurona u embrijima s eksprimiranim mutiranim proteinom Flag-SOD1 G93A i tretiranim s kontrolnim AMO i AMO specifičnim za gen optineurin (OPTN ATG-AMO i splice-AMO). Duljina aksona motornih neurona predstavlja prosjek duljina prvih 10 aksona nakon žumančane vrećice u jednom embriju. Grafički prikaz srednjih vrijednosti ± s.e.m. *** $P<0.001$, n = prikazan ispod svake skupine embrija. **b)** Kvantifikacija embrija s abnormalnim grananjem aksona prikazan kao postotak embrija koji imaju abnormalno grananje dva ili više aksona. **c)** Analiza lizata embrija ribe zebrice liziranih u puferu RIPA pomoću imunodetekcije. Uspješnost utišavanja ekspresije proteina optineurina provjerena je protutijelom anti-OPTN, a uspješnost ekspresije proteina Flag-SOD1 i Flag-SOD1 G93A protutijelom anti-Flag dok je količina nanesenog uzorka provjerena protutijelom anti-actin. Strelica pokazuje imunodetekciju proteina optineurina.

5 RASPRAVA

U ovom istraživanju proučavali smo ulogu proteina optineurina u autofagiji proteinskih nakupina u neurodegenerativnim bolestima. Koristeći stanični model za proteinske nakupine u Huntingtonovoj bolesti i ALS-u (stanice HeLa s privremeno ili stabilno izraženim mutiranim proteinima GFP-SOD1 G93C i GFP-htt ex1 Q103) pokazali smo lokalizaciju proteina optineurina na proteinskim nakupinama. Biokemijskim metodama, imunofluorescencijskom mikroskopijom i metodom kvantifikacije stanica s izraženim proteinskim nakupinama detaljno smo analizirani mehanizam kojim protein optineurin sudjeluje u autofagiji proteinskih nakupina. Pokazali smo da je optineurin autofagosomalni receptor koji se svojim C-terminalnim dijelom posredno veže za proteinske nakupine, dok preko svoje LIR domene stupa u direktnu interakciju s autofagosomalnim proteinom LC3 i tako dovlači autofagosomalnu membranu do proteinskih nakupina. Nadalje, utvrdili smo kako protein optineurin sudjeluje u autofagiji proteinskih nakupina te da je taj proces reguliran fosforilacijom proteina optineurina posredovanom kinazom TBK1. Također smo pokazali lokalizaciju kinaze TBK1 i fosforiliranog proteina optineurina u proteinskim inkluzijama u motornim neuronima lumbalnog dijela leđne moždine transgenične linije miša C57/B6 s eksprimiranim humanim mutiranim proteinom SOD1 G93A. Na kraju, utišavanjem ekspresije proteina optineurina embrijima ribe zebrice dokazali smo da dolazi do razvoja fenotipa amiotrofične lateralne skleroze.

Proces autofagije smatrao se nespecifičnim procesom do prije nekoliko godina kad su Pankiv i suradnici pokazali da je protein p62 odgovoran za prepoznavanje i selektivnu autofagiju ubikvitiranih proteinskih nakupina stupajući u interakciju s proteinom LC3 na autofagosomalnoj membrani (66). To je navelo istraživače da ispitaju postoje li i drugi takvi receptori slični receptoru p62 koji mogu selektivno označavati materijal za razgradnju. U našem smo laboratoriju koristeći metodu kvaščevog sustava dvaju hibrida pokušali otkriti nove interakcijske partnere autofagosomalnog proteina LC3B. Jedan od pronađenih novih interaktora bio je protein NBR1 koji zajedno s proteinom p62 sudjeluje u autofagiji proteinskih nakupina (65). Još jedan novi interaktor otkriven ovom metodom u našem laboratoriju, protein Nix, identificiran je kao receptor odgovoran za selektivnu autofagiju mitohondrija (69). Oba proteina posjeduju dvije domene LIR preko kojih vežu autofagosomalni protein LC3. Utvrdilo se da obje LIR domene vežu protein LC3, ali da je samo jedna glavna interakcijska domena (LIR1 u proteinu NBR1 i LIR2 u proteinu Nix), dok druga ima manju ili nikakvu ulogu u vezanju.

Na listi potencijalnih novih interaktora našao se i protein optineurin. Interakciju između proteina optineurina i LC3 dodatno smo potvrdili metodom *GST pull down*, te purificiranim proteinima pokazali da je interakcija ovih dvaju proteina direktna (slika 12). Analizom njegove sekvence i usporedbom s drugim poznatim autofagosomalnih receptorima, uočena je potencijalna domena LIR. Detaljnom analizom domene LIR, proteinom mutiranim u toj domeni, potvrdili smo da se protein optineurin veže preko svoje domene LIR, aminokiselinskog slijeda FVEI, na autofagosomalni protein LC3 (slika 13). Imunofluorescencijskom mikroskopijom lokalizirali smo protein optineurin na autofagosomalnim vezikulama što je dodatno potvrdilo interakciju proteina optineurina s autofagosomalnim proteinom LC3 (slika 14). Posjedujući ubikvitinsku vezujuću domenu i domenu LIR, protein optineurin pokazuje karakteristike autofagosomalnog receptora (77).

Nedavna istraživanja pokazala su da je protein optineurin lokaliziran u proteinskim nakupinama u mnogim neurodegenerativnim bolestima kao što su amiotrofična lateralna skleroza (124, 135), Huntingtonova bolesti (137), Alzheimerova, Parkinsonova, Creutzfeld-Jacobsova, Pickova bolesti (134), te još tri različite poliglutaminske bolesti (DRPLA, SCA2, SCA3) (136). Također su nađene mutacije u genu optineurin kod pacijenata s ALS-om (124, 128, 130, 131, 133, 147). Osim što je opisana njegova prisutnost u proteinskim agregatima i mutacije u genu kod ALS pacijenata, ništa nije bilo poznato o njegovoj funkciji u neurodegenerativnim bolestima.

Imajući na umu da smo protein optineurin okarakterizirali kao autofagosomalni receptor, te da je lokaliziran u proteinskim nakupinama, postavili smo slijedeću hipotezu: sudjeluje li protein optineurin u procesu autofagije kao autofagosomalni receptor za uklanjanje proteinskih nakupina? To smo i ovim istraživanjem dokazali te smo pružili uvid u regulaciju tog procesa (76).

Prvo smo potvrdili prisutnost proteina optineurina na proteinskim nakupinama mutiranih proteina SOD1 i huntingtina u stanicama HeLa (slika 15). Protein optineurin pokazao je isti tip lokalizacije, stvarajući krug oko proteinskih agregata, kao i proteini ubikvitin, p62 i LC3, za koje je to već od prije poznato (67).

Dalje smo htjeli potvrditi tu interakciju biokemijskim metodama. Analizirajući topljivu i netopljivu frakciju staničnih lizata, pokazali smo da se veći dio proteina optineurin nalazi u netopljivoj frakciji u kojoj se nalaze netopljivi proteinski agregati kad je u stanicama eksprimiran mutirani protein SOD1 koji stvara proteinske agregate, što potvrđuje njegovu lokaliziranost s proteinskim agregatima. Nadalje, metoda imunoprecipitacije pokazala je kako

protein optineurin stupa u interakciju već s oligomernim formama mutiranog proteina SOD1, ali ne i divljim tipom proteina (slika 16). Također smo analizirali da li se protein optineurin direktno veže za mutirani protein SOD1. Kako je protein optineurin lokaliziran na proteinskim nakupinama u raznim neurodegenerativnim bolestima, jedna od pretpostavki je bila da se protein optineurin veže na paralelne β-nabrane ploče, zajedničku karakteristiku nekih proteinskih nakupina. Metodom *GST pull down* i kapljičnom metodom koristeći purificirane proteine nismo uspjeli dokazati da se protein optineurin direktno veže za monomerne, oligomerne forme ili proteinske agregate (slika 17). Ovi rezultati dovode do zaključka da se radi o posrednoj interakciji proteina optineurina i proteinskih nakupina.

Imunofluorescencijskom mikroskopijom raznih fragmenata pokazali smo da je fragment optineurina koji obuhvaća aminokiseline 454 do 520 odgovoran za interakciju s proteinskim nakupinama (slika 18). Kako je to dio proteina, nazvan domena UBAN, s kojim protein optineurin veže ubikvitinske lance, kao glavni kandidat u posredovanju nametnuo se ubikvitin. U prilog tome govori i činjenica da ubikvitin sudjeluje u interakciji drugih autofagosomalnih receptora i proteinskih nakupina (83). Također, dokazali smo da je protein optineurin autofagosmalni receptor za unutarstanične bakterije *Salmonella enterica* i da je ta interakcija posredovana ubikvitinskim lancima koje protein optineurin veže svojom domenom UBAN (77). Povrh svega, pokazali smo da je interakcija s puromicinom induciranim proteinskim nakupinama pozitivnim na p62 i ubikvitin ovisna o domeni UBAN s kojom protein veže poliubikvitinske lance. Međutim, interakcija s proteinskim nakupinama mutiranih proteina SOD1 i htt nije posredovana ubikvitinskim lancima. Protein s mutacijom u domeni UBAN lokaliziran je na proteinskim nakupinama kao i divlji tip proteina (slika 19), ali gubi sposobnost vezanja za ubikvitinske lance (slika 19), puromicinom inducirane proteinske nakupine (slika 20) i bakteriju *Salmonella enterica* (77). Uz imunofluorescencijsku mikroskopiju, to smo potvrdili i imunoprecipitacijom (nije prikazano). Ovim smo dokazali kako ubikvitinski lanci nisu signal kojim protein optineurin prepoznaje proteinske nakupine i dovlači ih do autofagosoma. Ovo nije prvi takav slučaj. Već se otprije zna kako ubikvitin nije univerzalni signal za prepoznavanje proteinskih nakupina. Dokazano je da protein p62 veže proteinske nakupine mutiranog SOD1 (148) i neubikvitirane proteinske nakupine mutiranog proteina STAT5A_ΔE18 (149) neovisno o ubikvitinu. Povrh toga, šaperon BAG3, također neovisno o ubikvitinu, sudjeluje u selektivnoj autofagiji agregata mutiranog SOD1 (150). Nadalje, sve proteinske nakupine u pacijentima s ALS-om nisu ubikvitinirane (134, 151). Ovim istraživanjem nismo uspjeli identificirati protein koji posreduje u toj interakciji te su

potrebna daljnja istraživanja da bi se dobio odgovor koji je protein medijator koji pomaže proteinu optineurinu prepoznavanje proteinskih nakupina i koje točno aminokiseline u regiji koja obuhvaća aminokiseline 454 do 520 su odgovorne za tu interakciju.

Daljnji fokus ovog istraživanja bilo je pokazati kojim mehanizmom protein optineurin sudjeluje u autofagiji proteinskih nakupina. Prvo smo htjeli ispitati kako će utišavanje i prekomjerna ekspresija proteina optineurina utjecati na stvaranje i eliminaciju proteinskih nakupina. Ova istraživanja napravili smo koristeći kulturu stanica s eksprimiranim mutiranim proteinima SOD1 i huntingtin. Kvantifikacija stanica s proteinskim nakupinama pokazala se kao dobar metoda praćenja dinamike stvaranja i uklanjanja proteinskih nakupina. Imunofluorescencijskom mikroskopijom brojane su stanice s eksprimiranim mutiranim proteinom koje tvore proteinske nakupine. Postotak stanica s proteinskim nakupinama se mijenja bilo utjecanjem na ekspresiju određenog proteina ili na aktivnost određenih staničnih procesa. Tako se, inhibirajući aktivnost proteasoma ili autofagije, dvostruko se povećava udio stanica s proteinskim agregatima. Vrijedi i obrnuto, povećavajući njihovu aktivnost udio stanica smanjuje se za polovinu. Ukoliko se inhibiraju oba procesa udio stanica s proteinskim nakupinama još se dodatno povećava budući da svaki od tih procesa pridonosi na svoj način nakupljanju i uklanjanju proteinskih nakupina. Dokazali smo da utišana ekspresija proteina optineurina povećava udio stanica s proteinskim nakupinama (slika 21 i 22), a pojačana ekspresija s druge strane ne utječe na broj stanica s proteinskim nakupinama (slika 23). Kombinirajući utišavanje ekspresije proteina optineurina i aktivirajući ili inhibirajući aktivnost autofagije i proteasoma, dokazali smo da protein optineurin modulira razgradnju proteinskih nakupina mutiranih proteina SOD1 i huntingtin putem autofagije (slika 24 i 25). Kao dodatnu potvrdu u stanicama s utišanom ekspresijom proteina optineurina pojačano je eksprimiran divlji tip proteina i mutant u LIR domeni. Dok je pojačana ekspresija divljeg tipa optineurina kompenzirala efekt utišavanja ekspresije proteina, pojačana ekspresija mutiranog proteina nije (slika 26). Nemogućnost vezanja proteina optineurina na autofagosomalni protein LC3, onemogućilo je dovođenje autofagosomalne membrane na proteinske nakupine, a time i njihovu razgradnju putem autofagije.

Detaljna analiza aminokiselinskog slijeda pokazala je da se neposredno prije domene LIR nalaze pet serina s konsenzus sekvencom kinaze TBK1 SxxxpS i da je to konzervirano unutar vrsta (slika 27). Također, kinaza TBK1 poznati je interakcijski partner proteina optineurin i veže se na njegov N-terminalni na prvih 127 aminokiselina što je neposredno prije domene LIR s pripadajućim serinima (113). Biokemijskim metodama, koristeći stanične

lizate i purificirane proteine, dokazali smo fosforilaciju proteina optineurin kinazom TBK1. Također smo dokazali da fosforilacija pet serina neposredno prije domene LIR utječe na afinitet vezanja na autofagosomalni protein LC3 (slika 27). Po prvi put je pokazano da je interakcija vezanja proteina optineurina na autofaogosomalni protein regulirana posttranslacijskom modifikacijom fosforilacijom čime se dokazuje još jedna razina regulacije selektivne autofagije. Pokazalo se je da je ta fosforilacija važna za vezanje na autofaogosmalni protein LC3 i dovođenje autofagosomalne membrane na unutarstaničnu bakteriju *Salmonella enterica* (77).

Imajući to sve na umu, provjerili smo da li je sama kinaza TBK1 lokalizirana na proteinskim nakupinama i da li je protein optineurin koji je lokaliziran na proteinskim nakupinama fosforiliran. Imunofluoresencijskom mikroskopijom pokazali smo po prvi put da je kinaza TBK1 lokalizirana na proteinskim nakupinama te smo pokazali da fosforilira protein optineurin na proteinskim nakupinama (slika 28). Kako je protein optineurin lokaliziran na proteinskim nakupinama neovisno o fosforilaciji, pretpostavlja se da prvo protein regrutira na proteinske nakupine, koji zatim prepoznaje i fosforilira kinaza TBK1. Tako fosforilirani protein se veže na autofagosomalni protein LC3 čime se dovlači autofagosomalna membrana na proteinske nakupine.

Utišavanje ili pojačana ekspresija kinaze TBK1 utječe na udio stanica s proteinskim nakupinama jednako kao inhibicija i aktivacija autofagije (slika 29). Ovime smo još dodatno potvrdili da kinaza TBK1 fosforilacijom regulira autofagiju proteinskih nakupina. Zanimljivo je da u stanicama s utišanom ekspresijom proteina optineurin, pojačana ekspresija kinaze TBK1 može utjecati na smanjenje udjela stanica s proteinskim nakupinama (slika 29). Ova činjenica nam govori da kinaza TBK1 fosforilira i druge proteine koje sudjeluju u autofagiji proteinskih nakupina. Potencijalni kandidati su drugi autofagosomalni receptori p62, ALFY i NBR1.

Analiza staničnih lizata s utišanom ekspresijom kinaze TBK1 pokazala je smanjenu konjugaciju proteina LC3 na autofagosomalnu membranu (smanjenje forme proteina LC3-II). Ovakav efekt dobije se utišavanjem ekspresije proteina koji sudjeluju u inicijaciji i nukleaciji fagofora, što pokazuje da bi kinaza TBK1 fosforilacijom mogla regulirati i komplekse ULK1 i PI3K (152). Naše istraživanje je po prvi put povezalo kinazu TBK1 s procesom autofagije te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se točno utvrdilo kako točno kinaza TBK1 regulira autofagiju.

Naša zapažanja na stanicama HeLa potvrdili smo na modelu ALS-a u mišu i ribici. Imunohistokemijskom metodom dokazali smo da kinaza TBK1 i fosforilirani protein optineurin lokaliziraju s proteinskim inkluzijama mutiranog proteina SOD1 u motoričkim neuronima lumbalnog dijela leđne moždine mišjeg modela za ALS (slika 30 i 31) (142). Većina proteinskih inkluzija bila je pozitivna na fosforilirani optineurin, kinazu TBK1 i protein ubikvitin čak i u miša u ranoj fazi bolesti bez razvijenih simptoma u kojem skoro da i nema proteinskih inkluzija. To se podudara s našim biokemijskim rezultatima gdje je protein optineurin u interakciji s monomernim ili oligomernim formama mutiranog proteina SOD1.

Također je zapažena blaga nepodudarnost između lokaliziranosti ubikvitina i fosforiliranog optineurina na proteinskim nakupinama jer su neke proteinske nakupine bile pozitivne samo na ubikvitin ili samo na fosforilirani protein To potvrđuje naše rezultate u kojima smo pokazali da je interakcija optineurina s proteinskim nakupinama neovisna o ubikvitinu. Tako da se nije očekivala apsolutna podudarnost. Istraživanja na pacijentima s ALS-om su također pokazala da proteinske inkluzije nisu u svim pacijentima pozitivne na optineurin i ubikvitin (138). Kao mogući uzrok tome može biti nedostatak signala kojim protein optineurin prepoznaje proteinske nakupine. Daljnja su istraživanja potrebna kako bi se otkrio signal koji bi mogao biti neki protein ili posttranslacijska modifikacija. Također je potrebno potvrditi prisutnost kinaze TBK1 i fosforiliranog proteina na pacijentima s neurodegenerativnim bolestima.

Kao drugi modelni organizam koristili smo ribu zebricu. Kako je protein optineurin u ribi zebrici pokazuje visoku homologiju s humanim proteinom (konzervirana domena LIR i C-terminalna domena) pokazao se kao dobar model za testirati utjecaj proteina optineurina na razvoj ALS. Zadnjih godina riba zebrica se koristi se kao dobar model za proučavanje raznih neurodegenerativnih bolesti, pa tako i ALS. Utišavanje proteina optineurina u embriju ribe zebrice dovelo je do razvoja istog fenotipa ALS-a (slika 32 i 33) kao i kad je u ribi zebrici eksprimiran mutirani protein SOD1. Fenotip se očituje u zakrivljenju repa i slabog ili nikakvog odgovora plivanjem nakon dodira repa, ali i promjene u samom izgledu motoričkih neurona, njihovo skraćivanje i abnormalno grananje (143). Ovi rezultati podržavaju genetička istraživanja o prisutnosti mutacija u genu optineurinu u pacijentima s ALS-om.

Kako je utišavanje ekspresije proteina optineurina u ribi zebrici s eksprimiranim mutiranim proteinom SOD1 dovelo do još izraženijeg fenotipa (slika 34), sugerira da su njihovi patološki mehanizmi komplementarni. Kako je izraženost fenotipa ovisna o količini ekspresije mutiranog proteina SOD1, utišana ekspresija proteina optineurina može uzrokovati

dodatno nakupljanje proteinskih nakupina zbog nemogućnost njihovog otklanjanja autofagijom.

U ovom istraživanju dokazali smo kako je protein optineurin važan za autofagiju proteinskih nakupina, pa bi zbog mutacije u proteinu optineurinu moglo doći disfunkcije autofagije, a time i nemogućnosti otklanjanja abnormalnih i oštećenih proteina sklonih agregiranju putem autofagije. Također je dokazano da se razina autofagije smanjuje s godinama što dodatno pridonosi nakupljanju abnormalnih proteina u stanicama i time pospješuje razvoj neurodegenerativnih bolesti (93). To bi moglo objasniti uzrok razvoja fenotipa ALS-a u pacijentima i ribi zebrici s mutacijom u proteinu optineurinu. Također, prisutnost proteina optineurina na proteinskim nakupinama u pacijentima bez mutacije u genu optineurinu mogu značiti pokušaj proteina optineurina da eliminira proteinske nakupine putem autofagije.

Zaključno, dokazali smo da protein optineurin regulira agregiranje proteina procesom autofagije djelujući kao autofagosomalni receptor koji se istovremeno veže na proteinske nakupine svojom C-terminalnom domenom i na protein LC3 preko svoje domene LIR. Taj proces reguliran je fosforilacijom posredovanom kinazom TBK1 ali i drugih proteina uključenih u proces autofagije. Ovi rezultati također podupiru zaštitnu ulogu proteina optineurina i kinaze TBK1 u neurodegenerativnim bolestima.

6 ZAKLJUČCI

Rezultati ovog istraživanja doveli su do slijedećih zaključaka:

- Protein optineurin je autofagosomalni receptor koji veže autofagosomalne proteine LC3/GABARAP svojom domenom LIR.
- Protein optineurin veže proteinske nakupine C-terminalnim dijelom i ta interakcija je posredna i neovisna o interakciji s ubikvitinom, za razliku od drugih autofagosomalnih receptora.
- Protein optineurin sudjeluje u autofagiji proteinskih nakupina.
- Kinaza TBK1 regulira proces autofagije fosforilacijom proteina optineurina ali i drugih proteina uključenih u taj proces.
- Fosforilirani optineurin i kinaza TBK1 vežu proteinske nakupine u mišjem modelu ALS-a.
- Utišavanjem gena optineurina u modelnom organizmu zebrici dovodi do razvoja fenotipa ALS-a kao i pogoršanja fenotipa u ribici s razvijenim fenotipom ALS-a.

7 SAŽETAK

UVOD Jedno od glavnih obilježja neurodegenerativnih bolesti je nakupljanje mutiranih i nepravilno smotanih proteina u proteinske agregate što za posljedicu ima oštećenje i propadanje neurona. Protein optineurin prisutan je na proteinskim nakupinama u raznim neurodegenerativnim bolestima kao što su amiotrofična lateralna skleroza (ALS), Huntingtonova, Alzheimerova, Parkinsonova, Creutzfeld-Jacobsova i Pickova bolest. Također, u pacijentima s ALS-om pronađene su mutacije u genu optineurinu. Međutim, uloga proteina optineurina u procesu stvaranja i uklanjanja proteinskih nakupina bila je nepoznata.

METODE Istraživanje je provedeno na staničnim kulturama stanica HeLa i HEK293T, laboratorijskim miševima i ribi zebrici. Stanice HeLa s privremeno ili stabilno izraženim malim fragmentom proteina huntingtin s poliglutaminskim nizom od 103 glutamina i mutiranim proteinom superoksid dismutaza (SOD1) s mutacijom u glicinu 93 korištene su kao stanični modeli za proteinske nakupine u Huntingtonovoj bolesti i ALS-u. Kao model miša za ALS korištena je transgenična linija C57/B6 s ekspresijom humanog mutiranog proteina SOD1 G93A, dok je model ribe zebrice za ALS napravljen privremenom ekspresijom mutiranog proteina SOD1 mikroinjektiranjem mRNA u embrij ribe zebrice.

REZULTATI U ovom istraživanju pokazali smo da je C-terminalna domena proteina optineurina odgovorna za njegovu lokalizaciju na proteinskim nakupinama. Za razliku od drugih autofagosomalnih receptora, interakcija proteina optineurina s proteinskim nakupinama je posredna i neovisna o interakciji s poliubikvitinskim lancima. Protein optineurin detaljno je istražen i opisan kao autofagosomalni receptor koji svojom domenom LIR veže autofagosomalni protein LC3. Protein kinaza TBK1 (engl. *TANK1 binding kinase 1*) također je vidljiva na proteinskim nakupinama i zajedno s proteinom optineurinom sudjeluje u autofagiji proteinskih nakupina. Vezanje proteina optineurina i autofagosomalnog receptora LC3 modulirano je fosforilacijom proteina optineurina na serinu 177 uz djelovanje kinaze TBK1. Pristunost fosforiliranog optineurina i kinaze TBK1 na proteinskim nakupinama potvrđena je u mišjem modelu ALS-a. Utišavanje ekspresije proteina optineurina uzrokovalo je povećano stvaranje proteinskih nakupina u stanicama HeLa, dok je u modelnom organizmu ribi zebrici dovelo do razvoja ALS fenotipa kao i pogoršanja fenotipa u ribici s ALS-om.

ZAKLJUČAK Ovim istraživanjem dokazali smo da je protein optineurin autofagosomalni receptor koji sudjeluje u procesu autofagije proteinskih nakupina reguliranim aktivnošću kinaze TBK1.

8 SUMMARY

The role of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates in neurodegenerative diseases

BACKGROUND Aggregation of misfolded proteins and the associated loss of neurons are considered a hallmark of numerous neurodegenerative diseases. Optineurin is present in protein inclusions observed in various neurodegenerative diseases including amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Huntington's, Alzheimer's, Parkinson's, Creutzfeld-Jacob's and Pick's disease. Optineurin deletion mutations have also been described in ALS patients. However, the role of optineurin in mechanisms of protein aggregation remains unclear.

METHODS HeLa and HEK293T cell lines, transgenic mice and zebrafish were used as models in this research. Stably or transiently transfected HeLa cells with short fragment of the huntingtin protein carrying an extended polyglutamine (polyQ) mutation and superoxide dismutase 1 (SOD1) protein with point mutation at position Gly-93 were used as cell models of protein aggregation in Huntington's disease and ALS, respectively. Transgenic line C57/B6 expressing human mutant SOD1 G93A was used as a mouse model. Zebrafish model of ALS was generated by overexpression of mutant form of SOD1 by microinjecting mRNA in zebrafish embryo.

RESULTS In this research, we demonstrate that optineurin recognizes various protein aggregates via its C-terminal coiled-coil domain in a ubiquitin-independent manner. We also show that optineurin depletion significantly increases protein aggregation in HeLa cells and that morpholino-silencing of the optineurin ortholog in zebrafish causes the motor axonopathy phenotype similar to a zebrafish model of ALS. A more severe phenotype is observed when optineurin is depleted in zebrafish carrying ALS mutations. We characterized optineurin as autophagy receptor for protein aggregates containing LIR domain. Furthermore, TANK1 binding kinase 1 (TBK1) is colocalized with optineurin on protein aggregates and together with optineurin is important in clearance of protein aggregates through the autophagy-lysosome pathway. TBK1 phosphorylates optineurin at serine 177 and regulates its ability to interact with autophagy modifiers. Colocalization of TBK1 and phosphorylated optineurin with protein aggregates was confirmed in mouse model of ALS.

CONCLUTION This study provides evidence for a ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates as well as additional relevance for TBK1 as an upstream regulator of the autophagic pathway.

9 LITERATURA

1. Aguzzi A, O'Connor T. Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. Nat Rev Drug Discov. 2010;9(3):237-48. Epub 2010/03/02.

2. Woulfe J. Nuclear bodies in neurodegenerative disease. Biochimica et biophysica acta. 2008;1783(11):2195-206.

3. Lajoie P, Snapp EL. Formation and toxicity of soluble polyglutamine oligomers in living cells. PloS one. 2010;5(12):e15245-e.

4. Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. Orphanet journal of rare diseases. 2009;4:3. Epub 2009/02/05.

5. Nassif M, Matus S, Castillo K, Hetz C. Amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: a journey through the secretory pathway. Antioxidants & redox signaling. 2010;13(12):1955-89.

6. Redler RL, Dokholyan NV. The complex molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Progress in molecular biology and translational science. 2012;107:215-62. Epub 1.

7. Cozzolino M, Pesaresi MG, Gerbino V, Grosskreutz J, Carri MT. Amyotrophic lateral sclerosis: new insights into underlying molecular mechanisms and opportunities for therapeutic intervention. Antioxid Redox Signal. 2012;17(9):1277-330. Epub 2012/03/15.

8. Krainc D. Clearance of mutant proteins as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. Archives of neurology. 2010;67(4):388-92.

9. Ha AD, Fung VS. Huntington's disease. Current opinion in neurology. 2012;25(4):491-8. Epub 2012/07/10.

10. Rubinsztein DC, Carmichael J. Huntington's disease: molecular basis of neurodegeneration. Expert Rev Mol Med. 2003;5(20):1-21. Epub 2003/10/31.

11. Orr HT. Polyglutamine neurodegeneration: expanded glutamines enhance native functions. Current opinion in genetics & development. 2012;22(3):251-5. Epub 2012/01/31.

12. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(2):101-12. Epub 2007/01/25.

13. Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Genetic insights in Alzheimer's disease. Lancet Neurol. 2013;12(1):92-104. Epub 2012/12/15.

14. Talbot K, Ansorge O. Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: common pathways in neurodegenerative disease. Human molecular genetics. 2006;15 Spec No(2):R182-7.

15. Rademakers R, Neumann M, Mackenzie IR. Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia. Nat Rev Neurol. 2012;8(8):423-34. Epub 2012/06/27.

16. Crosiers D, Theuns J, Cras P, Van Broeckhoven C. Parkinson disease: insights in clinical, genetic and pathological features of monogenic disease subtypes. Journal of chemical neuroanatomy. 2011;42(2):131-41. Epub 2011/08/04.

17. Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. Annual review of neuroscience. 2005;28:57-87.

18. Martinez-Vicente M, Cuervo AM. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. Lancet neurology. 2007;6(4):352-61.

19. Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. Cell Death Differ. 2005;12(9):1178-90. Epub 2005/08/12.

20. Wong E, Cuervo AM. Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2010;2(12):a006734-a.

21. Hoeller D, Crosetto N, Blagoev B, Raiborg C, Tikkanen R, Wagner S, et al. Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination. Nature cell biology. 2006;8(2):163-9.

22. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. Annu Rev Biochem. 1998;67:425-79. Epub 1998/10/06.

23. Hoeller D, Hecker C-M, Dikic I. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. Nature reviews Cancer. 2006;6(10):776-88.

24. Ciechanover A, Iwai K. The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. IUBMB life. 2004;56(4):193-201. Epub 2004/07/03.

25. Tanaka K. The proteasome: overview of structure and functions. Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences. 2009;85(1):12-36.

26. Xie Y. Structure, assembly and homeostatic regulation of the 26S proteasome. Journal of molecular cell biology. 2010;2(6):308-17.

27. Braulke T, Bonifacino JS. Sorting of lysosomal proteins. Biochim Biophys Acta. 2009;1793(4):605-14. Epub 2008/12/03.

28. Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. Lysosomes: fusion and function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(8):622-32. Epub 2007/07/20.

29. Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(9):623-35. Epub 2009/08/13.

30. Mizushima N. Autophagy in protein and organelle turnover. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. 2011;76:397-402.

31. Mizushima N, Klionsky DJ. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. Annual review of nutrition. 2007;27:19-40.

32. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. Nat Cell Biol. 2007;9(10):1102-9. Epub 2007/10/03.

33. Dice JF. Chaperone-mediated autophagy. Autophagy. 2007;3(4):295-9. Epub 2007/04/04.

34. Kaushik S, Bandyopadhyay U, Sridhar S, Kiffin R, Martinez-Vicente M, Kon M, et al. Chaperone-mediated autophagy at a glance. Journal of cell science. 2011;124(Pt 4):495-9.

35. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. Trends in cell biology. 2012;22(8):407-17.

36. Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. Cell Mol Life Sci. 2012;69(7):1125-36. Epub 2011/11/15.

37. Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, Mizushima N. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. Science. 2008;321(5885):117-20. Epub 2008/07/05.

38. Pua HH, Guo J, Komatsu M, He YW. Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. J Immunol. 2009;182(7):4046-55. Epub 2009/03/21.

39. Mortensen M, Simon AK. Nonredundant role of Atg7 in mitochondrial clearance during erythroid development. Autophagy. 2010;6(3):423-5. Epub 2010/03/11.

40. Crotzer VL, Blum JS. Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. J Immunol. 2009;182(6):3335-41. Epub 2009/03/07.

41. Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. Nat Cell Biol. 2010;12(8):747-57. Epub 2010/07/20.

42. Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. Cell. 2010;141(4):656-67. Epub 2010/05/19.

43. Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. J Cell Biol. 2008;182(4):685-701. Epub 2008/08/30.

44. Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL, et al. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. J Cell Biol. 2008;181(3):497-510. Epub 2008/04/30.

45. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. Mol Biol Cell. 2009;20(7):1981-91. Epub 2009/02/13.

46. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. Mol Biol Cell. 2009;20(7):1992-2003. Epub 2009/02/20.

47. Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. Curr Opin Cell Biol. 2010;22(2):132-9. Epub 2010/01/09.

48. Young AR, Chan EY, Hu XW, Kochl R, Crawshaw SG, High S, et al. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. J Cell Sci. 2006;119(Pt 18):3888-900. Epub 2006/08/31.

49. Simonsen A, Tooze SA. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. J Cell Biol. 2009;186(6):773-82. Epub 2009/10/03.

50. Proikas-Cezanne T, Waddell S, Gaugel A, Frickey T, Lupas A, Nordheim A. WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly

expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. Oncogene. 2004;23(58):9314-25. Epub 2004/12/17.

51. Polson HE, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Urbe S, Clague MJ, et al. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. Autophagy. 2010;6(4). Epub 2010/05/28.

52. Webber JL, Tooze SA. New insights into the function of Atg9. FEBS Lett. 2010;584(7):1319-26. Epub 2010/01/20.

53. Geng J, Klionsky DJ. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. EMBO Rep. 2008;9(9):859-64. Epub 2008/08/16.

54. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. Autophagy. 2011;7(3):279-96.

55. Weidberg H, Shpilka T, Shvets E, Abada A, Shimron F, Elazar Z. LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis. Developmental cell. 2011;20(4):444-54. Epub 2011/04/19.

56. Noda T, Fujita N, Yoshimori T. The late stages of autophagy: how does the end begin? Cell Death Differ. 2009;16(7):984-90. Epub 2009/05/09.

57. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. Annual review of cell and developmental biology. 2011;27:107-32.

58. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Autophagy. 2012;8(4):445-544.

59. Geeraert C, Ratier A, Pfisterer SG, Perdiz D, Cantaloube I, Rouault A, et al. Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation. J Biol Chem. 2010;285(31):24184-94. Epub 2010/05/21.

60. Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. Cell structure and function. 2008;33(1):109-22. Epub 2008/04/05.

61. Yamamoto A, Simonsen A. The elimination of accumulated and aggregated proteins: a role for aggrephagy in neurodegeneration. Neurobiology of disease. 2011;43(1):17-28.

62. Liang C, Sir D, Lee S, Ou JH, Jung JU. Beyond autophagy: the role of UVRAG in membrane trafficking. Autophagy. 2008;4(6):817-20. Epub 2008/07/10.

63. Takahashi R, Miller J, Klionsky DJ. SNARE Dance: a musical interpretation of Atg9 transport to the tubulovesicular cluster. Autophagy. 2012;8(3):294-6. Epub 2012/03/01.

64. Harding TM, Morano KA, Scott SV, Klionsky DJ. Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. J Cell Biol. 1995;131(3):591-602. Epub 1995/11/01.

65. Kirkin V, Lamark T, Sou Y-s, Bjørkøy G, Nunn JL, Bruun J-A, et al. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. Molecular cell. 2009;33(4):505-16.

66. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. The Journal of biological chemistry. 2007;282(33):24131-45.

67. Filimonenko M, Isakson P, Finley KD, Anderson M, Jeong H, Melia TJ, et al. The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy. Molecular cell. 2010;38(2):265-79.

68. Zhu Y, Massen S, Terenzio M, Lang V, Chen-Lindner S, Eils R, et al. Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis. J Biol Chem. 2013;288(2):1099-113. Epub 2012/12/05.

69. Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, et al. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. EMBO reports. 2010;11(1):45-51.

70. Novak I. Mitophagy: a complex mechanism of mitochondrial removal. Antioxidants & redox signaling. 2012;17(5):794-802.

71. Thurston TLM, Ryzhakov G, Bloor S, von Muhlinen N, Randow F. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. Nature immunology. 2009;10(11):1215-21.

72. Kim PK, Hailey DW, Mullen RT, Lippincott-Schwartz J. Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105(52):20567-74.

73. Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. Nature cell biology. 2010;12(2):119-31.

74. Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell JH. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2009;183(9):5909-16.

75. Ponpuak M, Davis AS, Roberts EA, Delgado MA, Dinkins C, Zhao Z, et al. Delivery of cytosolic components by autophagic adaptor protein p62 endows autophagosomes with unique antimicrobial properties. Immunity. 2010;32(3):329-41. Epub 2010/03/09.

76. Korac J, Schaeffer V, Kovacevic I, Clement AM, Jungblut B, Behl C, et al. Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates. J Cell Sci. 2012. Epub 2012/11/28.

77. Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov VV, Brady NR, et al. Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. Science (New York, NY). 2011;333(6039):228-33.

78. Kraft C, Peter M, Hofmann K. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. Nature cell biology. 2010;12(9):836-41.

79. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. Science. 2004;304(5674):1158-60. Epub 2004/04/17.

80. Tanaka A, Cleland MM, Xu S, Narendra DP, Suen DF, Karbowski M, et al. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. J Cell Biol. 2010;191(7):1367-80. Epub 2010/12/22.

81. Hanna RA, Quinsay MN, Orogo AM, Giang K, Rikka S, Gustafsson AB. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. J Biol Chem. 2012;287(23):19094-104. Epub 2012/04/17.

82. Liu L, Feng D, Chen G, Chen M, Zheng Q, Song P, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. Nat Cell Biol. 2012;14(2):177-85. Epub 2012/01/24.

83. Kirkin V, Lamark T, Johansen T, Dikic I. NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. Autophagy. 2009;5(5):732-3.

84. Clausen TH, Lamark T, Isakson P, Finley K, Larsen KB, Brech A, et al. p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. Autophagy. 2010;6(3):330-44.

85. Wang Y, Lin F, Qin ZH. The role of post-translational modifications of huntingtin in the pathogenesis of Huntington's disease. Neuroscience bulletin. 2010;26(2):153-62. Epub 2010/03/25.

86. Jeong H, Then F, Melia TJ, Mazzulli JR, Cui L, Savas JN, et al. Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation. Cell. 2009;137(1):60-72.

87. Thompson LM, Aiken CT, Kaltenbach LS, Agrawal N, Illes K, Khoshnan A, et al. IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. The Journal of cell biology. 2009;187(7):1083-99.

88. Mookerjee S, Papanikolaou T, Guyenet SJ, Sampath V, Lin A, Vitelli C, et al. Posttranslational modification of ataxin-7 at lysine 257 prevents autophagy-mediated turnover of an N-terminal caspase-7 cleavage fragment. J Neurosci. 2009;29(48):15134-44. Epub 2009/12/04.

89. Iwata A, Riley BE, Johnston Ja, Kopito RR. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. The Journal of biological chemistry. 2005;280(48):40282-92.

90. Lee J-Y, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao Y-S, et al. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. The EMBO journal. 2010;29(5):969-80.

91. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. Cell. 2003;115(6):727-38. Epub 2003/12/17.

92. Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, et al. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. The Journal of clinical investigation. 2008;118(6):2190-9. Epub 2008/05/24.

93. Martinez-Vicente M, Sovak G, Cuervo AM. Protein degradation and aging. Experimental gerontology. 2005;40(8-9):622-33. Epub 2005/08/30.

94. Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. FEBS letters. 2010;584(7):1393-8.

95. Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray Ba, Ritson GP, Nedelsky NB, et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. Nature. 2007;447(7146):859-63.

96. Korolchuk VI, Mansilla A, Menzies FM, Rubinsztein DC. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. Molecular cell. 2009;33(4):517-27.

97. Li Y, Kang J, Horwitz MS. Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains. Molecular and cellular biology. 1998;18(3):1601-10.

98. Schwamborn K, Weil R, Courtois G, Whiteside ST, Israël a. Phorbol esters and cytokines regulate the expression of the NEMO-related protein, a molecule involved in a NF-kappa B-independent pathway. The Journal of biological chemistry. 2000;275(30):22780-9.

99. Sudhakar C, Nagabhushana A, Jain N, Swarup G. NF-kappaB mediates tumor necrosis factor alpha-induced expression of optineurin, a negative regulator of NF-kappaB. PloS one. 2009;4(4):e5114-e.

100. Kachaner D, Génin P, Laplantine E, Weil R. Toward an integrative view of Optineurin functions. Cell cycle (Georgetown, Tex). 2012;11(15):2808-18.

101. Kachaner D, Filipe J, Laplantine E, Bauch A, Bennett KL, Superti-Furga G, et al. Plk1-dependent phosphorylation of optineurin provides a negative feedback mechanism for mitotic progression. Molecular cell. 2012;45(4):553-66.

102. Zhu G, Wu C-J, Zhao Y, Ashwell JD. Optineurin negatively regulates TNFalpha-induced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. Current biology : CB. 2007;17(16):1438-43.

103. Nagabhushana A, Bansal M, Swarup G. Optineurin is required for CYLD-dependent inhibition of TNFα-induced NF-κB activation. PloS one. 2011;6(3):e17477-e.

104. Journo C, Filipe J, About F, Chevalier Sa, Afonso PV, Brady JN, et al. NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF-kappaB by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. PLoS pathogens. 2009;5(7):e1000521-e.

105. Chalasani ML, Swarup G, Balasubramanian D. Optineurin and its mutants: molecules associated with some forms of glaucoma. Ophthalmic research. 2009;42(4):176-84.

106. Tokunaga F, Sakata S-i, Saeki Y, Satomi Y, Kirisako T, Kamei K, et al. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. Nature cell biology. 2009;11(2):123-32.

107. Hattula K, Peränen J. FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis. Current biology : CB. 2000;10(24):1603-6.

108. Toro D, Alberch J, La F, Xifro X, Egea G, Canals JM. Mutant Huntingtin Impairs Post-Golgi Trafficking to Lysosomes by Delocalizing Optineurin / Rab8 Complex from the Golgi Apparatus ´ n. Molecular Biology of the Cell. 2009;20:1478-92.

109. Sahlender Da, Roberts RC, Arden SD, Spudich G, Taylor MJ, Luzio JP, et al. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. The Journal of cell biology. 2005;169(2):285-95.

110. Mankouri J, Fragkoudis R, Richards KH, Wetherill LF, Harris M, Kohl A, et al. Optineurin negatively regulates the induction of IFNbeta in response to RNA virus infection. PLoS Pathog. 2010;6(2):e1000778. Epub 2010/02/23.

111. Gao L, Coope H, Grant S, Ma A, Ley SC, Harhaj EW. ABIN1 protein cooperates with TAX1BP1 and A20 proteins to inhibit antiviral signaling. J Biol Chem. 2011;286(42):36592-602. Epub 2011/09/03.

112. Archambault V, Glover DM. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(4):265-75. Epub 2009/03/24.

113. Morton S, Hesson L, Peggie M, Cohen P. Enhanced binding of TBK1 by an optineurin mutant that causes a familial form of primary open angle glaucoma. FEBS letters. 2008;582(6):997-1002.

114. Moreland RJ, Dresser ME, Rodgers JS, Roe Ba, Conaway JW, Conaway RC, et al. Identification of a transcription factor IIIA-interacting protein. Nucleic acids research. 2000;28(9):1986-93.

115. Anborgh PH, Godin C, Pampillo M, Dhami GK, Dale LB, Cregan SP, et al. Inhibition of metabotropic glutamate receptor signaling by the huntingtin-binding protein optineurin. The Journal of biological chemistry. 2005;280(41):34840-8.

116. Li X, Magenheimer BS, Xia S, Johnson T, Wallace DP, Calvet JP, et al. A tumor necrosis factor-alpha-mediated pathway promoting autosomal dominant polycystic kidney disease. Nat Med. 2008;14(8):863-8. Epub 2008/06/17.

117. Nagabhushana A, Chalasani ML, Jain N, Radha V, Rangaraj N, Balasubramanian D, et al. Regulation of endocytic trafficking of transferrin receptor by optineurin and its impairment by a glaucoma-associated mutant. BMC cell biology. 2010;11:4-.

118. Miyamoto-Sato E, Ishizaka M, Horisawa K, Tateyama S, Takashima H, Fuse S, et al. Cell-free cotranslation and selection using in vitro virus for high-throughput analysis of protein-protein interactions and complexes. Genome Res. 2005;15(5):710-7. Epub 2005/05/04.

119. Chalasani ML, Balasubramanian D, Swarup G. Focus on molecules: optineurin. Experimental eye research. 2008;87(1):1-2.

120. Chi Z-L, Akahori M, Obazawa M, Minami M, Noda T, Nakaya N, et al. Overexpression of optineurin E50K disrupts Rab8 interaction and leads to a progressive retinal degeneration in mice. Human molecular genetics. 2010;19(13):2606-15.

121. Chalasani ML, Radha V, Gupta V, Agarwal N, Balasubramanian D, Swarup G. A glaucoma-associated mutant of optineurin selectively induces death of retinal ganglion cells which is inhibited by antioxidants. Investigative ophthalmology & visual science. 2007;48(4):1607-14.

122. Albagha OM, Visconti MR, Alonso N, Langston AL, Cundy T, Dargie R, et al. Genome-wide association study identifies variants at CSF1, OPTN and TNFRSF11A as genetic risk factors for Paget's disease of bone. Nature genetics. 2010;42(6):520-4. Epub 2010/05/04.

123. Chung PY, Beyens G, Boonen S, Papapoulos S, Geusens P, Karperien M, et al. The majority of the genetic risk for Paget's disease of bone is explained by genetic variants close to the CSF1, OPTN, TM7SF4, and TNFRSF11A genes. Human genetics. 2010;128(6):615-26. Epub 2010/09/15.

124. Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. Nature. 2010;465(7295):223-6.

125. Belzil VV, Daoud H, Desjarlais A, Bouchard J-P, Dupré N, Camu W, et al. Analysis of OPTN as a causative gene for amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiology of aging. 2011;32(3):555.e13-4.

126. Millecamps S, Boillée S, Chabrol E, Camu W, Cazeneuve C, Salachas F, et al. Screening of OPTN in French familial amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiology of aging. 2011;32(3):557.e11-3.

127. Tümer Z, Bertelsen B, Gredal O, Magyari M, Nielsen KC, Lucamp, et al. Novel heterozygous nonsense mutation of the OPTN gene segregating in a Danish family with ALS. Neurobiology of aging. 2012;33(1):208.e1-5.

128. Del Bo R, Tiloca C, Pensato V, Corrado L, Ratti a, Ticozzi N, et al. Novel optineurin mutations in patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry. 2011;82(11):1239-43.

129. Iida A, Hosono N, Sano M, Kamei T, Oshima S, Tokuda T, et al. Optineurin mutations in Japanese amyotrophic lateral sclerosis. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry. 2012;83(2):233-5.

130. Iida A, Hosono N, Sano M, Kamei T, Oshima S, Tokuda T, et al. Novel deletion mutations of OPTN in amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. Neurobiol Aging. 2012;33(8):1843 e19-24. Epub 2012/03/10.

131. van Blitterswijk M, van Vught PW, van Es MA, Schelhaas HJ, van der Kooi AJ, de Visser M, et al. Novel optineurin mutations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. Neurobiol Aging. 2012;33(5):1016 e1-7. Epub 2011/08/02.

132. Rollinson S, Bennion J, Toulson G, Halliwell N, Usher S, Snowden J, et al. Analysis of optineurin in frontotemporal lobar degeneration. Neurobiology of aging. 2012;33(2):425.e1-2.

133. Sugihara K, Maruyama H, Kamada M, Morino H, Kawakami H. Screening for OPTN mutations in amyotrophic lateral sclerosis in a mainly Caucasian population. Neurobiol Aging. 2011;32(10):1923 e9-10. Epub 2011/05/10.

134. Osawa T, Mizuno Y, Fujita Y, Takatama M, Nakazato Y, Okamoto K. Optineurin in neurodegenerative diseases. Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology. 2011;31(6):569-74.

135. Ito H, Fujita K, Nakamura M, Wate R, Kaneko S, Sasaki S, et al. Optineurin is co-localized with FUS in basophilic inclusions of ALS with FUS mutation and in basophilic inclusion body disease. Acta Neuropathol. 2011;121(4):555-7. Epub 2011/02/18.

136. Mori F, Tanji K, Toyoshima Y, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, et al. Optineurin immunoreactivity in neuronal nuclear inclusions of polyglutamine diseases (Huntington's, DRPLA, SCA2, SCA3) and intranuclear inclusion body disease. Acta neuropathologica. 2012;123(5):747-9.

137. Schwab C, Yu S, McGeer EG, McGeer PL. Optineurin in Huntington's disease intranuclear inclusions. Neuroscience letters. 2012;506(1):149-54.

138. Hortobágyi T, Troakes C, Nishimura AL, Vance C, van Swieten JC, Seelaar H, et al. Optineurin inclusions occur in a minority of TDP-43 positive ALS and FTLD-TDP cases and are rarely observed in other neurodegenerative disorders. Acta neuropathologica. 2011;121(4):519-27.

139. Corey DR, Abrams JM. Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. Genome biology. 2001;2(5):REVIEWS1015. Epub 2001/06/02.

140. Xi Y, Noble S, Ekker M. Modeling neurodegeneration in zebrafish. Current neurology and neuroscience reports. 2011;11(3):274-82.

141. Witan H, Gorlovoy P, Kaya AM, Koziollek-Drechsler I, Neumann H, Behl C, et al. Wild-type Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) does not facilitate, but impedes the formation of protein aggregates of amyotrophic lateral sclerosis causing mutant SOD1. Neurobiology of disease. 2009;36(2):331-42.

142. Gurney ME, Pu H, Chiu aY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. Science (New York, NY). 1994;264(5166):1772-5.

143. Lemmens R, Van Hoecke A, Hersmus N, Geelen V, D'Hollander I, Thijs V, et al. Overexpression of mutant superoxide dismutase 1 causes a motor axonopathy in the zebrafish. Human molecular genetics. 2007;16(19):2359-65.

144. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nat Biotechnol. 2008;26(12):1367-72. Epub 2008/11/26.

145. Witan H, Kern A, Koziollek-Drechsler I, Wade R, Behl C, Clement AM. Heterodimer formation of wild-type and amyotrophic lateral sclerosis-causing mutant Cu/Zn-superoxide dismutase induces toxicity independent of protein aggregation. Human molecular genetics. 2008;17(10):1373-85.

146. Westerfield M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio). 4 ed. Eugene: University of Oregon Press; 2000.

147. Tumer Z, Bertelsen B, Gredal O, Magyari M, Nielsen KC, Lucamp, et al. Novel heterozygous nonsense mutation of the OPTN gene segregating in a Danish family with ALS. Neurobiol Aging. 2012;33(1):208 e1-5. Epub 2011/08/20.

148. Gal J, Ström A-L, Kwinter DM, Kilty R, Zhang J, Shi P, et al. Sequestosome 1/p62 links familial ALS mutant SOD1 to LC3 via an ubiquitin-independent mechanism. Journal of neurochemistry. 2009;111(4):1062-73.

149. Watanabe Y, Tanaka M. p62/SQSTM1 in autophagic clearance of a non-ubiquitylated substrate. Journal of cell science. 2011;124(Pt 16):2692-701.

150. Gamerdinger M, Kaya aM, Wolfrum U, Clement AM, Behl C. BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. EMBO reports. 2011;12(2):149-56.

151. Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, et al. Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. J Neurosci. 2002;22(21):9340-51. Epub 2002/11/06.

152. Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. Nature. 2010;466(7302):68-76. Epub 2010/06/22.

10 ŽIVOTOPIS

Jelena Korać, dipl.ing.

Datum i mjesto rođenja: 05. siječnja 1983., Zagreb, Hrvatska
Adresa: Paška 14, 10 000 Zagreb, Hrvatska
Telefon: +385 21 557 892
E-pošta: jelena.korac@mefst.hr
jelenakora@yahoo.com

Obrazovanje

10/2008 – 06/2013 **Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu**
Doktorski studij: Biologija novotvorina

09/2004 – 07/2011 **Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu**
Dipl. ing. medicinske biokemije

09/2001 – 04/2007 **Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu**
Dipl. ing. biologije - molekularne biologije

Radno iskustvo

06/2011 – danas **Medicinski fakultet, Katedra za imunologiju i medicinsku genetiku, Sveučilište u Splitu, Hrvatska**
Znanstveni novak – asistent
Projekt: Uloga upalnih procesa u nastanku malignih tumora
Voditelj projekta: prof. dr. sc. Janoš Terzić

Znanstveno iskustvo

10/2012 – danas **Medicinski fakultet, Katedra za imunologiju i medicinsku genetiku, Sveučilište u Splitu, Hrvatska**
Projekt: Uloga upalnih procesa u nastanku malignih tumora
Voditelj projekta: prof. dr. sc. Janoš Terzić

08/2010 – 10/2012 **Medicinski fakultet, Katedra za imunologiju i medicinsku genetiku, Sveučilište u Splitu, Hrvatska**
Projekt: Uloga proteina ubikvitina u regulaciji proteinske razgradnje, doktorski rad
Voditelj projekta: prof. dr. sc. Ivan Đikić

05/2007 – 08/2010 **Mediteranski institut za istraživanje života, Split, Hrvatska**
Projekt: Uloga proteina ubikvitina u regulaciji proteinske razgradnje, diplomski rad
Voditelj projekta: prof. dr. sc. Ivan Đikić

03/2006 – 04/2007 **Institut Ruđer Bošković, Zavod za molekularnu medicinu, Zagreb, Hrvatska**
Projekt: Uloga gena nm23 u karcinomu pločastog epitela usne šupljine
Voditelj projekta: dr. sc. Maja Herak Bosnar

06/2006 – 08/2006 **Baylor College of Medicine, Zavod za molekularnu i staničnu biologiju, Houston, SAD**
Projekt: Razvoj mliječnih žlijezdi i razvoj tumora dojke
Voditelj projekta: prof. dr. sc. Jeffrey Rosen

11/2004 – 02/2006 **Medicinski fakultet, Zavod za fiziologiju, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska**
Projekt: Membranska topologija epitelnog Na/H izmjenjivača NHE3
Voditelj projekta: dr. sc. Mirza Žižak

09/ 2004 – 10/2004 **Medicinski fakultet, Zavod za fiziologiju, Sveučilište u Splitu, Hrvatska**
Projekt: Istraživanje nasljedne nedostatne aktivnosti glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, diplomski rad
Voditelj projekta: prof. dr. sc. Janoš Terzić

Nastavno iskustvo

10/2012 – danas **Asistentica**, sudjelovanje u nastavi
Predmet "Molekularna biologija sa genetikom", studij Farmacija
Predmet "Imunologija i medicinska genetika", studij Medicina
Predmet "Imunologija i medicinska genetika", studij Dentalna medicina

10/2003 – 07/2005 **Student demonstrator i voditeljica Računalne učionice**

10/2003 – 06/2004 **Student demonstrator**
Predmet "Biokemija", studij molekularna biologija
Predmet "Biologija stanice", studij molekularna biologija

Stipendije i nagrade

01/2012 – 03/2012 **The Boehringer Ingelheim Fonds travel grant**
Institute of Biochemistry II, Medical Faculty of the Goethe University, Frankfurt, Njemačka, Laboratorij dr. Ivana Đikića

01/2009 – 03/2009 **FEBS Collaborative Experimental Scholarships for Central & Eastern Europe**
Institute of Biochemistry II, Medical Faculty of the Goethe University, Frankfurt, Njemačka, Laboratorij dr. Ivana Đikića

2006 **Nagrada Znanost** – Nacionalna zaklada za znanost, visoko školstvo i tehnologijski razvoj Republike Hrvatske u suradnji s Novim listom

04/2007 – 06/2011 **Stipendija Grada Splita**

10/2004 – 04/2007 **Stipendija Grada Zagreba**

10/2001 – 09/2004 **Stipendija Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa**

Publikacije

1. **Korac J**, Schaeffer V, Kovacevic I, Clement AM, Jungblut B, Behl C, Terzic J, Dikic I (2013) Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates. *J Cell Sci*. 126(Pt 2):580-92.
2. Zizak M, Chen T, Bartonicek D, Sarker R, Zachos NC, Cha B, Kovbasnjuk O, **Korac J**, Mohan S, Cole R, Chen Y, Tse CM, Donowitz M (2012) Calmodulin kinase II constitutively binds, phosphorylates, and inhibits brush border Na+/H+ exchanger 3 (NHE3) by a NHERF2 protein-dependent process. *J Biol Chem*. 287(16):13442-56.
3. Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov VV, Brady NR, Richter B, **Korac J**, Waidmann O, Choudhary C, Dötsch V, Bumann D, Dikic I (2011) Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science*. 333(6039):228-33.
4. **Korac J**, Barisic M, Pavlinac I, Krzelj V, Marusic E, Vulliamy T, Terzic J (2005) Characterization of G6PD deficiency in southern Croatia: description of a new variant, G6PD Split. *J Hum Genet.* 50(11):547-9.

Kongresna priopćenja

1. **Korac J**, Schaeffer V, Kovacevic I, Clement AM, Jungblut B, Behl C, Terzic J, Dikic I (2012) Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates, Abstract Book, Quality Control – From Molecules to Organelles, Heidelberg, Njemačka
2. **Korac J**, Waidmann O, Dikic I, Husnjak K (2010) E3 ligase parkin is recruited to 26S proteasome via proteasome ubiquitin receptor Rpn13, Abstract Book, Rubicon sponsored International workshop - Role of various type of ubiquitin chains in membrane trafficking, Paris, Francuska
3. **Korac J**, Waidmann O, Dikic I, Husnjak K (2010) E3 ligase parkin is recruited to 26S proteasome via proteasome ubiquitin receptor Rpn13, Abstract Book, 2nd EMBO Conference on Cellular Signaling & Molecular Medicine, Dubrovnik, Hrvatska
4. **Korac J**, Koraljka H, Dikic I (2009) Pleckstrin homology domain as ubiquitin binding domain, Abstract book, Spetses, Grčka
5. Kulis T, Bartonicek D, **Korac J**, Zizak M (2005) Calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) binds and inhibits NHE3 under basal condition, Abstract Book, Zagreb International Medical Summit-a 2005, Zagreb, Hrvatska

Konferencije i tečajevi

Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama
16. – 24. studenog, 2012, Zagreb, Hrvatska

2nd EFCC-UEMS Congress
10. – 12. listopada, 2012, Dubrovnik, Hrvatska

EMBO Practical Course on Anatomy and Embryology of the Mouse
8. – 16. rujna, 2012, Split, Hrvatska

EMBO Practical Course SUMO and Ubiquitin 2012
1. – 8. rujna, 2012, Alghero, Sardinia, Italija

2nd EMBO Conference on Cellular Signaling & Molecular Medicine
21. – 26. svibnja, 2010, Dubrovnik, Hrvatska

Rubicon sponsored International workshop - Role of various type of ubiquitin chains in membrane trafficking
20. – 2.1 svibnja, 2010 – Pariz, Francuska

Advanced lecture course - Molecular mechanisms in signal transduction and cancer
16. – 24. kolovoza, 2009, Spetses, Grčka
FEBS Youth Travel Grant

EMBO Practical Course SUMO and Ubiquitin 2008
12. – 19. kolovoza, 2008, Split, Hrvatska

MedILS Summer School 2008 – Hottest Topics in Protein Research
19. – 26. srpnja, 2008, Split, Hrvatska

EMBO Conference on Cellular Signaling and Molecular Medicine
29. svibnja – 4. lipnja, 2008, Dubrovnik, Hrvatska

Organizacija

EMBO Practical Course SUMO and Ubiquitin 2012 – instruktor
1. – 8. rujna, 2012, Alghero, Sardinia, Italija

EMBO Practical Course SUMO and Ubiquitin 2008 – lokalni organizator
12. – 19. rujna, 2008, Split, Hrvatska

MedILS Summer School 2008 – Hottest Topics in Protein Research – organizator
19. – 26. srpnja, 2008, Split, Hrvatska

Članstva u društvima

2009 do danas Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju (FEBS member)
2010 do danas Hrvatsko društvo za istraživanje raka (EACR member)

Strani jezici

hrvatski (materinski jezik), engleski (aktivno u govoru i pismu), njemački (pasivno u govoru i pismu)