

Regulacija aktivnosti receptora autofagije proteina NIX u selektivnom uklanjanju mitohondrija

Marinković, Mija

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:836758>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

MIJA MARINKOVIĆ

**REGULACIJA AKTIVNOSTI RECEPTORA AUTOFAGIJE
PROTEINA NIX U SELEKTIVNOM UKLANJANJU
MITOHONDRIJA**

DOKTORSKI RAD

Split, 2020.

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu u sklopu Uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „*The role of autophagy receptors in selective removal of mitochondria – AutoMito*“ (HRZZ UIP–5246) te Projekta razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti „*The role of autophagy receptors in selective removal of mitochondria*“ (DOK–2014–06–9538) voditeljice izv. prof. dr. sc. Ivane Novak Nakir.

VODITELJ RADA: izv. prof. dr. sc. Ivana Novak Nakir

SADRŽAJ

1. UVOD	12
1.1. Važnosti proteostaze u održavanju ravnoteže stanice.....	13
1.2. Mehanizmi održavanja proteostaze - ubikvitin-proteosomalni sustav i autofagija	13
1.3. Autofagija.....	16
1.3.1. Molekularni mehanizmi autofagije kod sisavaca	18
1.3.1.1. Indukcija autofagije	18
1.3.1.2. Nastajanje autofagosoma.....	19
1.3.1.3. Fuzija autofagosoma s lizosomom.....	20
1.4. Selektivna autofagija.....	22
1.4.1. Receptori selektivne autofagije	23
1.5. Mitofagija - selektivna autofagija mitohondrija	24
1.5.1. Uloga mitohondrija u stanicima	24
1.5.2. Mehanizmi mitofagije	27
1.5.2.1. PINK1-Parkin-posredovana mitofagija.....	27
1.5.2.2. Mitofagija posredovana receptorima	28
1.5.2.2.1. FUNDC1.....	31
1.5.2.2.2. BCL2L13	32
1.5.2.2.3. FKBP8.....	33
1.5.2.2.4. AMBRA1	33
1.5.2.2.5. Prohibitin 2	34
1.5.2.2.6. Kardiolipin.....	35
1.5.2.2.7. Receptori BNIP3 i NIX/BNIP3L.....	35
1.6. Dosadašnja saznanja o regulaciji aktivnosti receptora NIX.....	37
1.7. Uloga receptora NIX u eritropoezi	40
1.8. Uloga mitofagije u neurodegenerativnim bolestima i tumorima.....	40
2. CILJEVI I HIPOTEZE	44
3. MATERIJALI I METODE	46
3.1. Materijali.....	47
3.1.1. Osnovne kemikalije	47
3.1.2. Aparati.....	49

3.1.3. Puferske otopine	50
3.1.4. Osnovne otopine	51
3.1.5. Bakterijske stanice	51
3.1.6. Stanične linije	51
3.1.7. LB hranjive podloge (engl. <i>Luria-Bertani broth</i>).....	52
3.1.8. Kompleti.....	52
3.1.9. Protutijela	52
3.1.10. Enzimi	53
3.1.11. Biljezi	53
3.1.12. Plazmidi korišteni u studiji.....	54
3.2. Metode	57
3.2.1. Priprema plazmidnih konstrukata za proučavanje fosforilacije i dimerizacije receptora NIX.....	57
3.2.2. Imunoblot detekcija proteina i GST <i>pull down</i> analiza	59
3.2.3. Izotermalna titracijska kalorimetrija (prema engl. <i>Isothermal Titration Calorimetry, ITC</i>).....	60
3.2.4. Kristalografija	61
3.2.5. Izolacija mitohondrijske frakcije	61
3.2.6. Imunofluorescencijska analiza kolokalizacije proteina NIX i TOMM20	62
3.2.7. Imunofluorescencijska analiza regrutacije autofagosoma na oštećene mitohondrije	62
3.2.8. Praćenje uklanjanja mitohondrija metodom protočne citometrije.....	63
3.2.9. RNA interferencija.....	65
3.2.10. Statistička analiza podataka.....	65
4. REZULTATI	66
4.1. Analiza fosforilacije domene LIR kao mehanizam regulacije aktivnosti receptora mitofagije proteina NIX.....	67
4.1.1. Kreiranje mutanti za ispitivanje mehanizma fosforilacije domene LIR i provjera njihove stanične lokalizacije imunofluorescencijskom mikroskopijom	67
4.1.2. Detekcija interakcija LIR mutanti receptora NIX i LC3A/B proteina <i>pull down</i> analizom.....	69
4.1.3. Izotermalna titracijska kalorimetrija proteina LC3B i NIX P0/P2 peptida	70
4.1.4. Kristalna struktura kompleksa fosforiliranog receptora NIX i proteina LC3B	70
4.1.5. GST <i>pull down</i> analiza interakcija kompleksa fosforiliranog receptora NIX i LC3B proteina	72

4.1.6. Imunofluorescencijska detekcija utjecaja fosforilacije domene LIR na regrutaciju LC3 vezikula	73
4.1.7. Analiza utjecaja fosforilacije domene LIR na učinkovitost uklanjanja mitohondrija metodom protočne citometrije	76
4.2.1. Imunoblot detekcija dimerizacije proteina NIX	78
4.2.2. Detekcija stabilnosti proteina NIX u denaturirajućim uvjetima imunoblot metodom....	80
4.2.3. Detekcija lokalizacije TM dimerizacijskih NIX mutanti imunofluorescencijskom mikroskopijom i staničnim frakcioniranjem	81
4.2.4. Detekcija interakcija NIX dimerizacijskih mutanti i autofagosomalnih proteina LC3/GABARAP GST <i>pull down</i> analizom	83
4.2.5. Imunofluorescencijska detekcija regrutacije autofagosoma na mitohondrije s prekomjerno izraženim dimerizacijskim mutantama receptora NIX	86
4.2.6. Analiza uklanjanja mitohondrija koji prekomjerno izražavaju dimerizacijske mutante protočnom citometrijom	87
4.2.7. Analiza regulacije dimerizacije fosforilacijom C-terminalnog kraja receptora NIX	88
4.2.8. Imunoblot detekcija dimerizacije proteina NIX putem fosforilacije/defosforilacije C-terminalnog kraja proteina	89
4.2.9. GST <i>pull down</i> analiza interakcija NIX S212 mutanti i proteina LC3A	91
4.2.10. Detekcija lokalizacije C-terminalnih mutanti proteina NIX metodama imunofluorescencijske mikroskopije i staničnog frakcioniranja.....	92
4.2.11. Imunofluorescencijska detekcija regrutacije autofagosoma na mitohondrije koji prekomjerno izražavaju C-terminalne S212A i S212E mutante proteina NIX.....	94
4.2.12. Analiza uklanjanja mitohondrija protočnom citometrijom u stanicama koje prekomjerno izražavaju C-terminalne mutante proteina NIX	95
4.2.13. Analiza regulacije aktivnosti receptora NIX udruženim mehanizmom LIR-ovisne regrutacije autofagosoma i dimerizacije	96
4.2.14. Imunofluorescencijska detekcija regrutacije autofagosoma na mitohondrije koji prekomjerno izražavaju kombinirane NIX Δ LIR i TM/C-terminalne dimerizacijske mutante	98
4.2.15. Analiza utjecaja dimerizacije receptora NIX na aktivaciju mitofagije u sustavu bez endogenog proteina NIX.....	99
5. RASPRAVA	103
5.1. Fosforilacija domene LIR kao mehanizam regulacije aktivnosti receptora NIX	105
5.2. Regulacija aktivnosti receptora NIX mehanizmom dimerizacije.....	110
6. ZAKLJUČCI	120
7. LITERATURA	123

8. SAŽETAK	145
9. SUMMARY	147
10. ŽIVOTOPIS	149

POPIS OZNAKA I KRATICA

3-MA – 3-metiladenin (engl. *3-methyladenine*)

5-FU – 5-florouracil (engl. *5-fluorouracil*)

AIM – motiv koji sudjeluje u interakciji s proteinima Atg8-obitelji (engl. *Atg8-family interacting motif*)

AMBRA1 – aktivirajući faktor protein 1 u BECN1-reguliranoj autofagiji (engl. *activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1*)

AMPK – protein kinaza aktivirana AMP-om (engl. *AMP-activated protein kinase*)

Atg – geni povezani s autofagijom (engl. *autophagy related genes*)

ATG – proteini povezani s autofagijom (engl. *autophagy related proteins*)

ATP – adenzin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

Baf A1 – bafilomicin A1 (engl. *bafilomycin A1*)

BCL2L13 – Bcl2-sličan protein 13 (engl. *Bcl2-like 13*)

BH3 – Bcl-2 homolog 3 (engl. *Bcl-2 homology 3*)

BNIP3 – BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-vezujući protein 3 (engl. *BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3*)

CCCP – karbonil cijanid 3-klorofenilhidrazon (engl. *carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazone*)

CK2 – kazein kinaza 2 (engl. *casein kinase 2*)

CMA – autofagija posredovana šaperonima (engl. *chaperone-mediated autophagy*)

CMT2A – Charcot-Marie-Tooth nasljedna neuropatija tipa 2A (engl. *Charcot-Marie-Tooth hereditary neuropathy type 2A*)

CVT – dopremanje citoplazmatskog sadržaja u vakuolu, proces autofagije opisan kod kvasaca (engl. *cytoplasm to vacuole targeting*)

DNM2 – dinamin 2 (engl. *dynamain 2*)

DRP1 – dinaminu sličan protein 1 (engl. *dynamain-related protein 1*)

EGFP – pojačani zeleni fluorescentni protein (engl. *enhanced green fluorescent protein*),

FIP200 – 200 kDa veliki protein koji je u interakciji s obitelji kinaza fokalne adhezije (engl. *focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa*)

FIS1 – protein mitohondrijske fuzije 1 (engl. *mitochondrial fission 1 protein*)

FKBP8 – FK506 vezujući protein 8 (engl. *FK506 binding protein 8*)

FL3 – flavaglins spoj 3 (engl. *flavaglins compound 3*)

FUNDC1 – protein 1 koji posjeduje domenu FUN14 (engl. *FUN14 domain-containing protein 1*)

GABARAP – protein udružen s GABA receptorom skupine A (engl. *GABA type A receptor-associated protein*)

GAPDH – gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

GATE-16 – pojačivač ATPaze povezan s Golgijem (engl. *golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa*)

GSK3 β – kinaza glikogen sintaze 3 β (engl. *glycogen synthase kinase-3 β*)

GTP – gvanozin trifosfat (engl. *guanosine triphosphate*)

HP – hidrofobni džep (engl. *hydrophobic pocket*)

HRP – peroksidaza iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*)

Hsc70 – protein toplinskog šoka srodan HSP70 obitelji proteina (engl. *heat shock cognate of the Hsp70 family*)

HSP – protein toplinskog šoka (engl. *heat shock protein*)

HTT – huntingtin (engl. *huntingtin*)

HUWE1 – E3 ligaza 1 koja posjeduje domene HECT, UBA i WWE (*HECT, UBA and WWE domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1*)

IKK α – I κ B kinaza α (engl. *I κ B kinase α*)

ITC – izotermalna titracijska kalorimetrija (engl. *isothermal titration calorimetry*)

K_D – konstanta disocijacije (engl. *dissociation constant*)

LAMP2A – protein 2A udružen s membranom lizosoma (prema engl. *lysosomal-associated membrane protein 2A*)

LC3 – laki lanac 3 (engl. *light chain 3*)

LIR – domena za interakciju s proteinima LC3 (engl. *LC3-interacting region*)

LIRL – motiv sličan LIR-u (engl. *LIR motif-like*)

MAP1LC3 (LC3) – protein LC3 1 povezan s mikrotubulima (engl. *microtubule-associated protein 1 LC3*)

MARCH5 – mitohondrijska E3-ubikvitin ligaza pridružena membrani RING-CH (engl. *membrane-associated RING-CH*)

MFF – čimbenik fizije mitohondrija (engl. *mitochondrial fission factor*)

MFN1/2 – mitofuzin 1/2 (engl. *Mitofusin 1/2*)

MiD49/51 – proteini mitohondrijske dinamike 49/51 (engl. *mitochondrial dynamics proteins 49/51*)

mTORC1 – proteinski kompleks kod sisavaca na kojeg djeluje rapamicin (engl. *mammalian target of rapamycin (TOR) complex 1*)

NBR1 – u blizini BRCA1 gena (engl. *neighbor of BRCA1 gene 1*)

NDP52 – protein 52 nuklearne domene 10 (engl. *nuclear domain 10 protein 52*)

NIX/BNIP3L – protein sličan BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-vezujućem proteinu-3 (engl. *BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3-like*)

NMR – nuklearna magnetska rezonanca (engl. *nuclear magnetic resonance*)

OPA1 – protein optičke atrofije (engl. *optic atrophy 1 protein*)

OPTN – optineurin (engl. *optineurin*)

PARL – presenilin-udružen sličan romboidu (engl. *presenilin associated rhomboid like*)

PAS – mjesto sklapanja fagofora (engl. *phagophore assembly site*)

PE – fosfatidiletanolamin (engl. *phosphatidylethanolamine*)

PGAM5 – član 5 obitelji proteina fosfoglicerat mutaze (engl. *phosphoglycerate mutase family member 5*)

PHB2 – prohibitin 2 (engl. *prohibitin 2*)

PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*)

PI3P – fosfatidilinozitol-3-fosfat (engl. *phosphatidylinositol 3-phosphate*)

PINK1 – PTENom inducirana kinaza 1 (engl. *PTEN-induced putative kinase 1*)

PKA – protein kinaza A (engl. *protein kinase A*)

Ppg1 – PP2A-tip protein fosfataza (engl. *(PP2A)-type protein phosphatase*)

RAB – GTP-vezujući protein srodan proteinu RAS (engl. *RAS-related GTP-binding protein*)

sHSP – mali protein toplinskog šoka (engl. *small heat shock protein*)

SLR – receptori slični proteinu p62/SQSTM1 (engl. *p62/SQSTM1-like receptor*)

SNARE – proteinski receptor vezan za toplivi N-etilmaleimid-osjetljivi faktor (engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*)

SQSTM1 – sekvestosom-1 (engl. *sequestosome-1*)

SRC – koaktivator steroidnog receptora (engl. *steroid receptor coactivator*)

TAX1BP1 – protein 1 koji vezuje TAX1 (engl. *TAX1 binding protein 1*)

TBK1 – kinaza koja vezuje Tank 1 (engl. *Tank-binding kinase 1*)

TCL – ukupni stanični lizat (engl. *total cell lysate*)

TM – transmembranski (engl. *transmembrane*)

TOMM20 – translokaza vanjske mitohondrijske membrane 20 (engl. *translocase of outer mitochondrial membrane 20*)

TSC/Rheb – kompleks tuberozne skleroze/Ras homolog zastupljen u mozgu (engl. *tuberous sclerosis complex/Ras homolog enriched in brain*)

UBA – ubikvitinom udružena domena (engl. *ubiquitin-associated domain*)

ULK1 - kinaza slična proteinu Unc-51 (engl. *Unc-51-like kinase 1*)

UPS – ubikvitin-proteasomalni sustav (engl. *ubiquitin-proteasome system*)

VDAC1 – naponom reguliran anionski kanal 1 (engl. *voltage-dependent anion channel 1*)

VPS34 – sortirajući protein vakuole 34 (engl. *vacuolar protein sorting 34*)

WIPI2 – protein s WD ponavljajućom domenom koji vezuje fosfoinozolid 2 (engl. *WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2*)

1. UVOD

1.1. Važnosti proteostaze u održavanju ravnoteže stanice

Proteini su zasigurno najvažnije makromolekule većine naših stanica. Osim što su najzastupljeniji, nedvojbeno je njihova višestruka uloga u održavanju ravnoteže ili homeostaze, na razini stanice, ali i čitavog organizma. Zbog toga je nužna karika u održavanju ove ravnoteže zapravo proteostaza, odnosno homeostaza proteoma u stanici. Zanimljivo, desetljećima je većina znanstvenih studija bila isključivo usmjerena na razumijevanje mehanizama proteinske izgradnje, odnosno na procese transkripcije i translacije. Interes za proučavanje mehanizama njihove razgradnje bio je izrazito slab, premda je ključna uloga proteostaze zapravo zaštita stanice od štetnih posljedica nakupljanja pogrešno smotanih ili oštećenih proteina koji jako remete staničnu funkciju. Upravo je nakupljanje proteina povezano sa starenjem i bolestima povezanih sa starenjem, uključujući neurodegeneraciju, rak i različite imunološke te metaboličke bolesti, od kojih je većina trenutno neizlječiva (1). Zbog temeljne važnosti proteostaze, stanice su razvile višestruke i sofisticirane mehanizme za održavanje kvalitete proteina kojima se kontinuirano nadgleda stanični proteom i to već od trenutka translacije, preko pravilnog smatanja, remodeliranja i popravka proteina te konačno do proteinske razgradnje. Od sredine prošlog stoljeća, posebice otkrićima dvaju glavnih unutarstaničnih mehanizama za razgradnju i održavanje kvalitete proteina u stanici, ubikvitin-proteosomalnog sustava (UPS, prema engl. *ubiquitin-proteasome system*) i autofagije, interes za mehanizme proteinske razgradnje nezaustavljivo raste. Oba sustava proteinske razgradnje od temeljne su važnosti za održavanje proteostaze u svim stanicama, a potvrda tome su i dvije Nobelove nagrade dodijeljene za otkriće razgradnje proteina posredovane ubikvitinom (Aaron Ciechanover, Avram Hershko i Irwin Rose, Nobelova nagrada za kemiju 2004. godine) i molekularnih mehanizama autofagije (Yoshinori Ohsumi, Nobelova nagrada za medicinu i fiziologiju 2016. godine).

1.2. Mehanizmi održavanja proteostaze - ubikvitin-proteosomalni sustav i autofagija

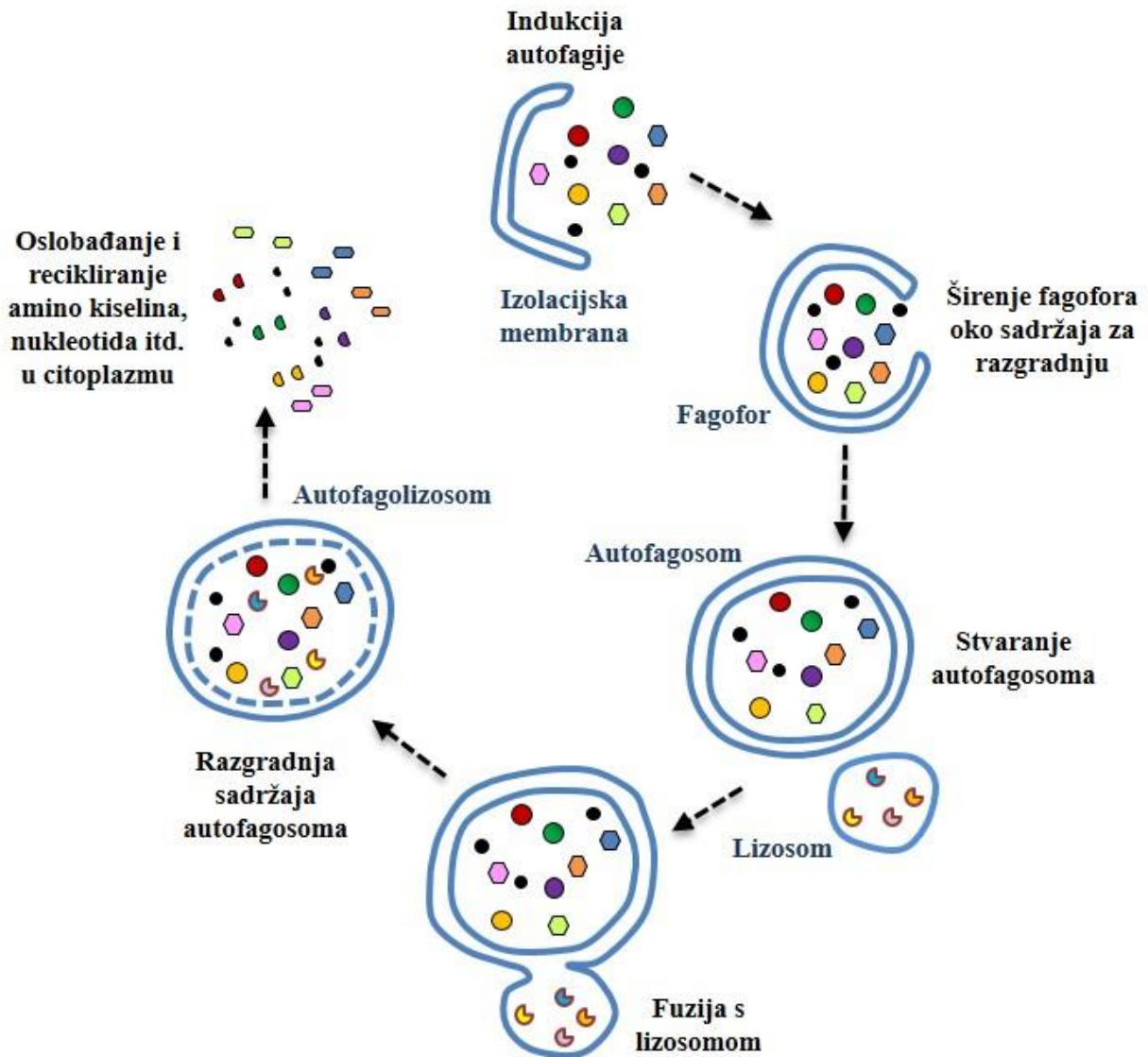
Funkcionalnost ukupnog staničnog proteoma održava nekoliko skupina molekularnih šaperona; HSP70, HSP90, DNAJ/HSP40, šaperonin/HSP60 i sHSP (prema engl. *small HSP*). Samostalno ili u kombinaciji s drugim šaperonima, reguliraju proteinske interakcije, smatanje, razdvajanje, razgradnju i promet proteina u stanici (2,3). Kada postanu nefunkcionalni, zato što su krivo smotani ili su u nakupinama, šaperoni pomažu usmjeravanju proteina na jedan od dva

sustava za razgradnju u stanici; pojedinačno na proteasom (4) ili one u nakupinama u lizosomom posredovani put razgradnje, tj. autofagiju (5).

Ubikvitin-proteosomalni sustav, prvo spomenuti sustav razgradnje proteina, odgovoran je za razgradnju oko 90% proteina u stanici, uključujući mnoge proteine kratkog vijeka, abnormalne i denaturirane, općenito oštećene i nefunkcionalne proteine koji predstavljaju nepotreban stanični materijal (6). Kako se ovim mehanizmom uklanjaju proteini uključeni u različite stanične procese, poput transkripcije, staničnog ciklusa, DNA popravka, endocitoze ili apoptoze, UPS predstavlja temeljni mehanizam održavanja proteostaze u stanici. Proteasom je veliki proteolitički kompleks, a sastoji se od 19S regulatornog dijela i 20S proteolitičke jezgre (7). Da bi bio usmjeren na proteasom, protein mora na sebe imati kovalentno vezan lanac proteina ubikvitina. Na taj način 19S regulatorna podjedinica prepoznaje ubikvitinirani supstrat kao materijal za razgradnju, uklanja ubikvitinske lance te odmotava protein kako bi on mogao u nativnom stanju ući u jezgru proteasoma gdje se proteolitički cijepa (4,8). Proces proteosomalne razgradnje započinje dodavanjem ubikvitina na proteinski kompleks putem djelovanja tri skupine enzima; E1-enzimi za aktivaciju ubikvitina, E2-enzimi za konjugaciju ubikvitina i E3-ubikvitin ligaze (8). Ubikvitinski lanci vezuju se na ciljni polipeptid preko izopeptidne veze koja se stvara između C-terminalnog glicina na ubikvitinu i, gotovo uvijek, lizina na supstratu (9–13). Osim vezanja jednog ubikvitina za supstrat tzv. monoubikvitinacija, zbog postojanja sedam lizina u aminokiselinskoj sekvenci ubikvitina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 i K63), ali i N-terminalnog metionina, moguće je uzastopno konjugiranje ubikvitina i stvaranje poliubikvitinskih lanaca različite topologije i funkcije čime i ovako složeni ubikvitinski kod postaje još kompleksniji (14–16). Za razgradnju u proteasomu najčešće je ipak stvaranje K48 poliubikvitinskih lanaca na supstratima (17). Supstrati, ubikvitinirani ostalim poliubikvitinskim lancima, razgrađuju se putem lizosoma (18) ili se preusmjeravaju u potpuno druge stanične procese poput proteinskog transporta, DNA popravka ili aktivacije drugih enzima (19–21).

Iako se većina proteina u stanici uklanja posredstvom proteasoma, biofizičke karakteristike i ograničenje središnje pore 20S srži proteasoma dozvoljavaju razgradnju isključivo jednostavnih polipeptidnih lanaca, ali ne i krivo smotanih te velikih proteinskih kompleksa (4). Ipak, pretjerano nakupljanje ovakvih struktura remeti homeostazu stanice pa je nužno i njihovo uklanjanje iz stanice. Jedan mehanizam njihovog uklanjanja jest putem specijaliziranih molekularnih šaperona uz čiju pomoć krivo smotani proteini disociraju iz

nakupine i usmjeravaju se na proteasom (22). Alternativno, veći proteinski supstrati razgrađuju se putem lizosoma, staničnih organela koji sadržavaju niz proteaza za razgradnju različitog materijala (5), u procesu autofagije (Slika 1).



Slika 1. Pojednostavnjeni shematski prikaz procesa autofagije.

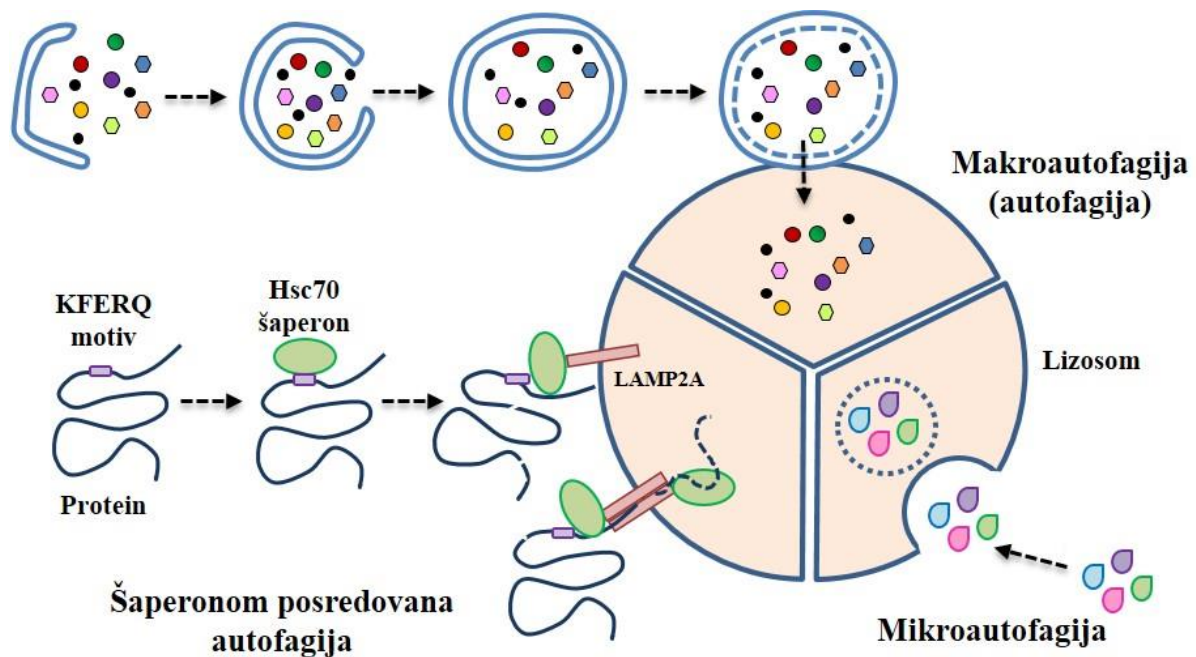
1.3. Autofagija

Otkrićem lizosoma 1955. godine, belgijski citolog i biokemičar Christian René de Duve (23), odredio je početak u istraživanju do tada posve nepoznatog staničnog fenomena. Otkriće lizosoma uvelike je promijenilo dotadašnje poimanje stanične biologije, pa je tako 1974. godine de Duve za to otkriće nagrađen Nobelovom nagradom iz fiziologije i medicine. Dopremanje i razgradnju različitog staničnog materijala putem lizosoma, de Duve je 1963. godine nazvao „autofagija“ (prema grčkoj izvedenici *αυτός* („*autos*“) i *φαγεῖν* („*phagei*“)) što bi u prijevodu značilo „samo proždiranje“. Međutim, u sljedećih 30-ak godina autofagija nije doživjela veći znanstveni interes pa tako, osim proučavanja bazičnih mehanizma regulacije (24), njezina fiziološka važnost i molekularni mehanizmi samog procesa autofagije ostali su potpuno neistraženi. Devedesetih godina prošlog stoljeća, u laboratoriju japanskog znanstvenika Yoshinori Ohsumija, napravljen je genetički probir kako bi se identificirali geni zaduženi za regulaciju autofagije u kvasaca (25). U Ohsumijevom laboratoriju tada je otkriveno 15 Atg gena (prema engl. *autophagy related genes*) nužnih za dopremanje zapakiranog staničnog sadržaja do vakuole (vakuola je ekvivalent lizosomu kod kvasaca i biljaka) čime je objašnjen osnovni molekularni proces autofagije kod kvasaca. Od tada, istraživanja u području autofagije nezaustavljivo rastu, pa tako danas znamo da je fiziološka važnost autofagije uključena u održavanje homeostaze svakog višestaničnog organizma.

Poznato je da autofagija ima nezamjenjivu i višestruku ulogu u održavanju homeostaze većine stanica. S jedne strane, razgradnjom dopremljenog materijala, autofagijom se osigurava potreban stanični materijal i energija za niz anaboličkih radnji u uvjetima nedostatka nutrijenata ili drugih oblika staničnog stresa. Iako se u ranim fazama vjerovalo da je autofagija isključivo odgovor stanice na stresne uvjete, danas sa sigurnošću znamo da je autofagija, kao bazalna autofagija, aktivna i u fiziološkim uvjetima, prilikom uklanjanja oštećenih organela ili štetnih komponenti te tako djeluje kao normalni fiziološki mehanizam održavanja stanične homeostaze u većini organa, tijekom različitih stadija razvoja organa i stanica te u prevenciji bolesti poput neurodegeneracije, bolesti jetre i srca ili tumora (26–28).

Dok je proteasom zadužen za razgradnju isključivo malih proteina, autofagijom je moguće razgraditi ne samo velike proteinske strukture nego i makromolekularne komplekse lipidnog ili ugljikohidratnog sastava, cijele stanične organele te unutarstanične patogene poput virusa ili bakterija čija veličina znatno premašuje prostorni kapacitet proteasoma.

Do sada su, kod sisavaca, opisana tri osnovna tipa autofagije; makroautofagija, mikroautofagija i šaperonima posredovana autofagija, CMA (prema engl. *chaperone-mediated autophagy*). Iako svaki od ova tri oblika autofagije konačno završava s lizosomima kako bi se u njima dopremljeni sadržaj iz autofagosoma razgradio i reciklirao natrag u citoplazmu, razlika između ova tri oblika autofagije jest put kojim se materijal namijenjen za razgradnju usmjerava do lizosoma. Prvi oblik autofagije, makroautofagija, zapravo je klasičan oblik autofagije koji je generalno i najbolje proučen. Stoga se u znanstvenom žargonu najčešće umjesto pojma „makroautofagija“ koristi samo „autofagija“. Karakteristika ovog oblika autofagije je stvaranje membranske strukture tzv. fagofora koji sazrijevanjem zarobljava dio citoplazmatskog sadržaja u vezikulu nazvanu autofagosom. Zreli autofagosom se transportira uzduž mikrotubula prema njihovim minus krajevima gdje se konačno stapa s lizosomom. Detaljni molekularni mehanizmi mikroautofagije tek trebaju biti otkriveni iako je poznato da je proces ovisan o GTP hidrolizi i kalciju. Ono što karakterizira ovaj oblik autofagije jest to da se putem uvlačenja lizosomalne membrane direktno u lumen lizosoma unosi mali dio citoplazme zajedno s njezinim sadržajem (29). Šaperonima posredovana autofagija, do danas, je jedino opisana kod sisavaca i to isključivo za proteine koji u svojem aminokiselinskom sastavu posjeduju specifičan pentapeptidni, KFERQ, motiv. Citoplazmatski šaperon Hsc70 (prema engl. *heat shock cognate of the Hsp70 family*) specifično prepoznaje ovaj motiv na proteinima i odvodi ih do receptora LAMP2A (prema engl. *lysosomal-associated membrane protein 2A*) na membrani lizosoma. Proteini se na membrani odmotavaju i konačno transportiraju u lumen lizosoma (30) (Slika 2).



Slika 2. Tri glavna oblika autofagije: makroautofagija, mikroautofagija i šaperonom-posredovana autofagija.

1.3.1. Molekularni mehanizmi autofagije kod sisavaca

Cijeli proces autofagije visoko je koordiniran i strogo reguliran aktivacijom mnogobrojnih proteinskih kompleksa. Ovi kompleksi, sastavljeni od različitih ATG proteina, čine osnovnu mašineriju autofagije i odgovorni su za indukciju autofagije, stvaranje autofagosoma, dopremanje autofagosoma do lizosoma i konačno njegovo stapanje s lizosomom. Za pravilno napredovanje ovog kompleksnog i reguliranog kataboličkog procesa, neophodno je postojanje 17 konzerviranih ATG proteina koji se, ovisno o fazi procesa, hijerarhijski regrutiraju, od mjesta stvaranja budućeg autofagosoma (PAS) (prema engl. *phagophore assembly site*) do konačnog mjesta spajanja s lizosomom.

1.3.1.1. Indukcija autofagije

Različiti signali mogu aktivirati proces autofagije, a zajednička karakteristika svih induktora autofagije jest ta da za stanicu predstavljaju stanje stresa kojeg stanica nastoji prevladati aktivirajući mehanizam razgradnje vlastitih sastavnih dijelova. Tako autofagija može biti započeta manjkom nutrijenata (aminokiselina ili glukoze), nedostatkom faktora rasta (inzulina i inzulinu sličnih faktora rasta), smanjenom razinom energije u stanici (sniženi ATP),

različitim oblicima staničnog stresa (hipoksijom, oštećenjima organela, nakupljanjem agregiranih proteina) ili infekcijama patogenima (31). Nedostatak aminokiselina ili faktora rasta, dva su najučinkovitija induktora autofagije i oba su povezana s regulacijom mTORC1 (prema engl. *mammalian target of rapamycin (TOR) complex 1*) signalnog puta (32). Kada su u stanici nutrijenti prisutni u dovoljnoj količini, serin/treonin protein kinaza TOR fosforilira komponente ULK1 kompleksa, kinazu ULK1 (prema engl. *Unc-51-like kinase 1*) i protein ATG13 (33,34) čime se sprječava inicijacija autofagije. U suprotnom, prilikom nedostatka nutrijenta, mTORC1 je inhibiran, a defosforilirani protein ATG13 pospješuje stvaranje stabilnog i aktivnog ULK1 kompleksa građenog od proteina FIP200 (prema engl. *focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa*), ATG101, ULK1 i ATG13. Kinaza ULK1, važna je za modifikaciju i regrutaciju nizvodnih proteina ATG, uključujući ATG13 i FIP200 potrebne za stvaranje aktivnog ULK1 kompleksa (35).

1.3.1.2. Nastajanje autofagosoma

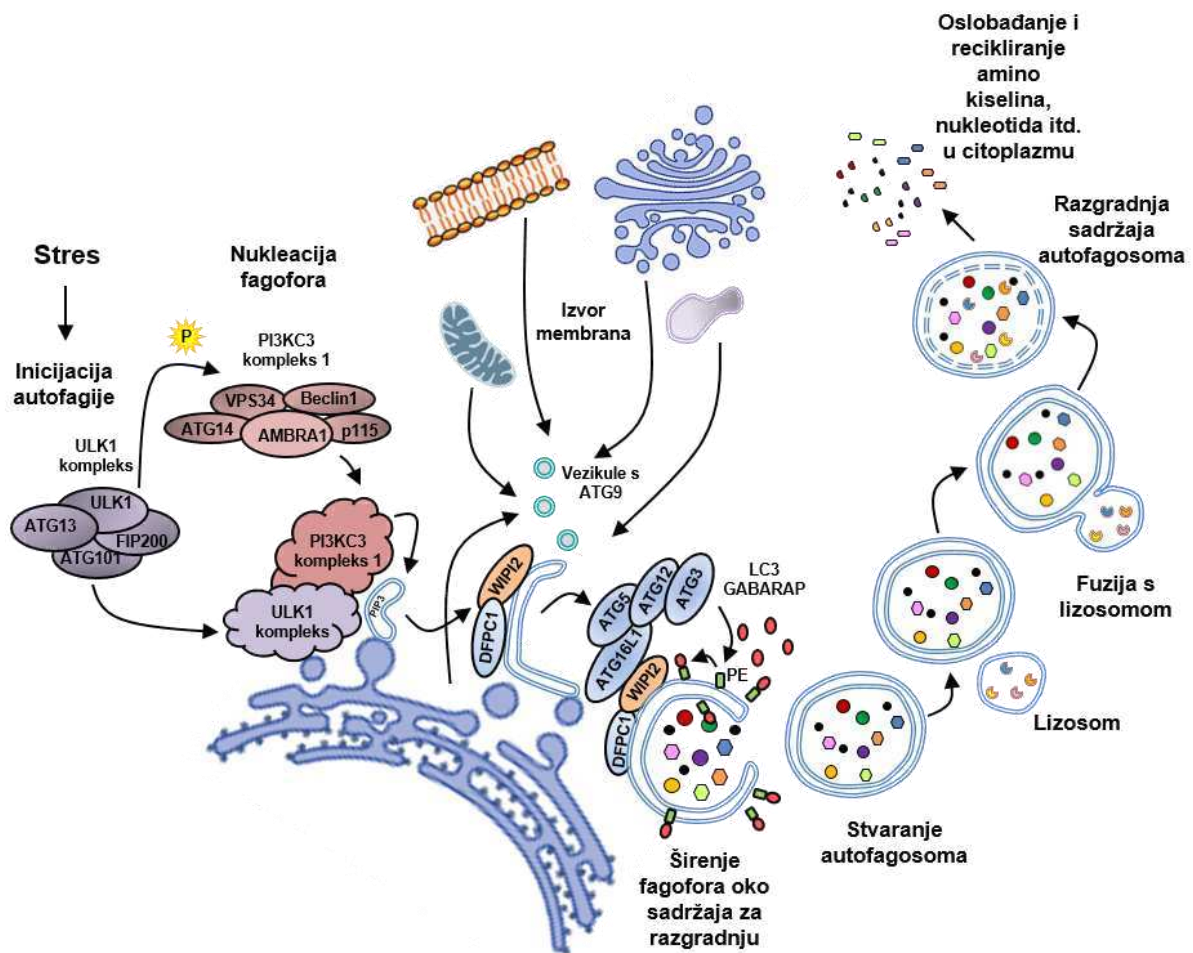
Nakon stvaranja ULK1 kompleksa, PI3K kompleks (prema engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*) se regrutira na izolacijsku membranu od koje će se kasnije stvoriti autofagosom. Aktivna kinaza ULK1 fosforilira i aktivira katalitičku podjedinicu PI3K kompleksa, protein VPS34 (prema engl. *vacuolar protein sorting 34*) čime se na mjestu nukleacije izolacijske membrane proizvodi PI3P (prema engl. *phosphatidylinositol 3-phosphate*), marker autofagosomalne membrane. Podrijetlo membranske strukture za tvorbu izolacijske membrane nije jednoznačno definirano budući da je nekoliko studija pokazalo da izvor ove membrane može biti bilo koja membrana u stanici (plazma membrana, membrana endoplazmatskog retikuluma, mitohondrijska membrana, itd.) (36–41). Nakon što su ULK1 i PI3K kompleksi lokalizirani na izolacijskoj membrani, regrutiraju se drugi proteini ATG pod čijim djelovanjem započinje širenje i deformacija membrane u oblik polumjesečaste membranske strukture tzv. fagofora. Uz PI3K kompleks, za vrijeme nukleacije, ULK1 kompleks također regrutira i protein ATG9, jedini transmembranski protein ATG. Preko vezikula koje sadržavaju ATG9, ovaj se protein izmjenjuje između izolacijske membrane i drugih membranskih komponenti (36–41) čime se omogućava rast i širenje izolacijske membrane, a sam transport proteina ATG9 potpomažu proteini WIPI2 (prema engl. *WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2*) i ATG2 (42,43). Za daljnje produljivanje izolacijske membrane nužna su dva

ubikvitinu slična sustava konjugacije: ATG12 i Atg8/LC3 (prema engl. *light chain 3*) sustavi. Kvašček Atg8 ima čak osam ortologa u sisavaca: obitelj MAP1LC3 (LC3) (prema engl. *microtubule-associated protein 1 LC3*) ima četiri člana (dvije LC3A varijante, LC3B i LC3C) i obitelj GABARAP/GATE-16 (prema engl. *golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa*) čiji su članovi GABARAP, GABARAP-L1, GATE-16/GABARAP-L2 i GABARAP-L3 (44). Sličnost s ubikvitinom, ATG12 i LC3 proteini ne pokazuju na razini aminokiselinskoga sastava već na strukturnoj razini te na vrlo sličnom mehanizmu aktivacije djelovanjem E1, E2 i E3 enzimskih sustava (45,46). Protein ATG12 se, nakon aktivacije proteinima ATG7 i ATG10 konjugira na ATG5 i stvara ATG12-ATG5-ATG16L1 kompleks koji se uz pomoć WIPI2 regrutira na izolacijsku membranu. LC3 sustav ponešto je drugačiji jer se prije konjugacije LC3 mora proteolitički pocijepati djelovanjem cisteinske proteaze ATG4 kako bi se izložio C-terminalni glicin (LC3-I oblik). Citoplazmatski LC3-I aktivira se E1-sličnim ATG7 i E2-sličnim ATG3 enzimima i konačno pomoću E3-slične ligaze ATG12-ATG5-ATG16L1 konjugira na lipidni nosač fosfatidiletanolamin, PE (prema engl. *phosphatidylethanolamine*) koji mu omogućava ugradnju u izolacijsku membranu (LC3-II) (47). ATG12 nalazimo isključivo na izolacijskoj membrani dok je LC3-II prisutan na membrani tijekom čitavog procesa autofagije, od stvaranja izolacijske membrane do spajanja s lizosomom (48). Postepenim produljivanjem i daljnjim zaokruživanjem membrane, fagofor zarobljava dio citoplazme. Sljedeći korak u procesu autofagije je spajanje krajeva fagofora u oblik zaokružene vezikule s dvostrukom membranom poznatijom pod nazivom autofagosom.

1.3.1.3. Fuzija autofagosoma s lizosomom

Autofagosom sa zarobljenim citoplazmatskim sadržajem preko mikrotubula dolazi do lizosoma pa slijedi fuzija vanjske membrane autofagosoma s membranom lizosoma i nastajanje autofagolizosoma (49). Točan molekularni mehanizam kojim se odvija ovaj posljednji korak nije u potpunosti poznat. Tri skupine proteina igraju važnu ulogu u spajanju autofagosoma s lizosomom. Općenito su proteini uključeni u ovom koraku autofagije zaduženi za transport i kretanje membranskih struktura unutar stanice. To su redom: RAB GTPaze, SNARE proteini i tzv. kompleksi koji učvršćuju membrane (prema engl. *membrane-tethering complexes*). RAB (prema engl. *RAS-related GTP-binding protein*) GTPaze regrutiraju specifične efektorske proteine poput receptorskih adaptera i motornih proteina na autofagosom čime omogućavaju

njegovo pokretanje duž mikrotubula do membrane lizosoma (50). Faktori koji učvršćuju membrane (prema engl. *membrane-tethering factors*) reguliraju spajanje i fuziju autofagosoma i lizosoma na način da premošćuju dvostruku membranu autofagosoma i membranu lizosoma te potiču stvaranje SNARE kompleksa (prema engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) (51). Opuštanjem sadržaja autofagosoma u hidrolitički lumen lizosoma dolazi do razgradnje dopremljenog citoplazmatskog sadržaja kao i dijela strukture autofagosoma. Hidrolizirani sadržaj autofagolizosoma, poput aminokiselina nastalih razgradnjom proteina, otpušta se i reciklira natrag u citoplazmu (52,53) (Slika 3).

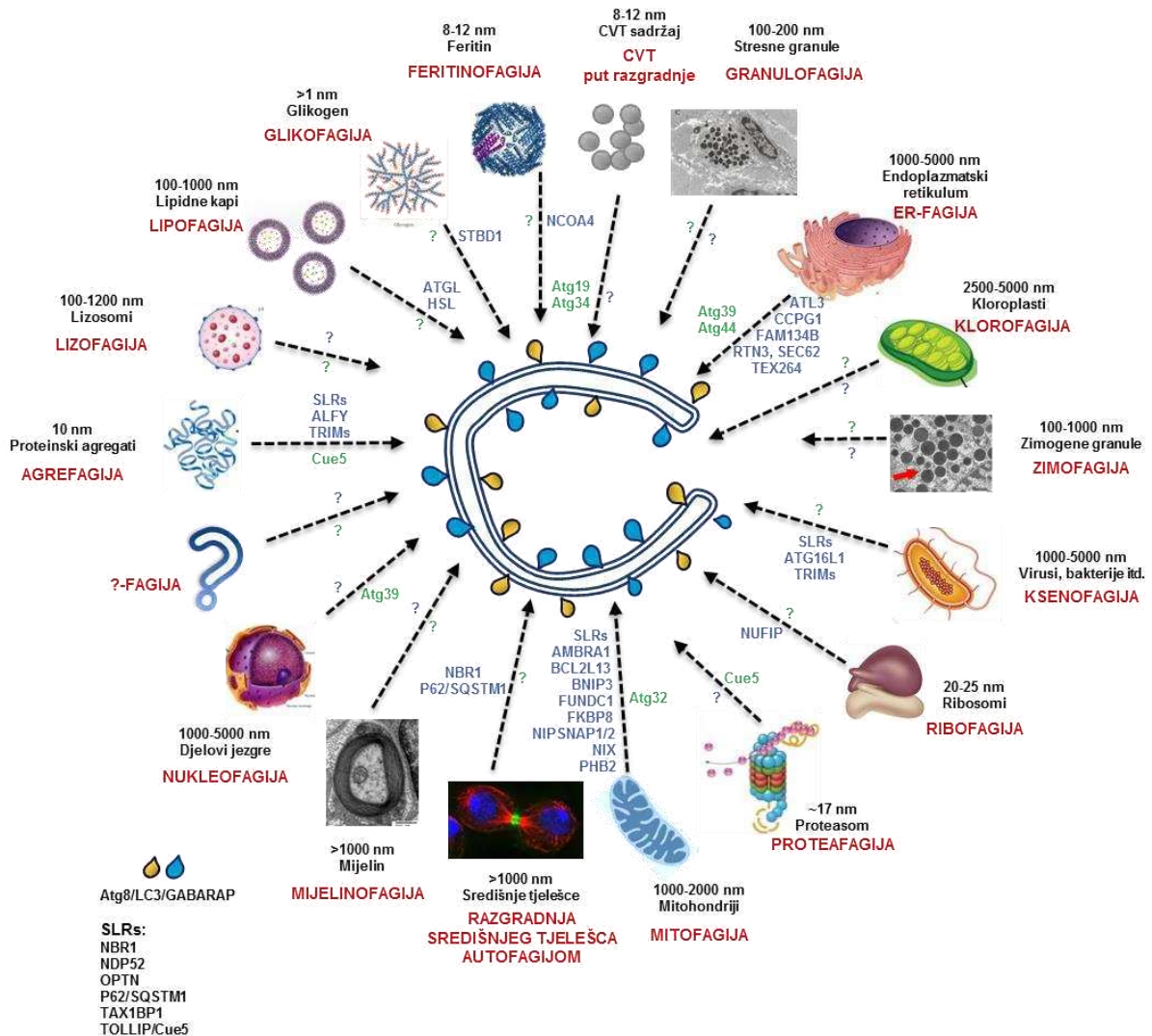


Slika 3. Molekularni mehanizmi autofagije kod sisavaca.

1.4. Selektivna autofagija

Gotovo pola stoljeća vjerovalo se da je autofagija isključivo neselektivni proces, neophodan za zadovoljavanje staničnih nutritivnih i energetske potrebe tijekom stresnog razdoblja, poput gladovanja. Već je 1965. godine Christian de Duve primijetio da autofagosom može nastati, ne samo oko slučajnog dijela citoplazme, već i oko točno definiranog staničnog sadržaja ili organela poput mitohondrija, ribosoma ili endoplazmatskog retikuluma (54). Zadnjih desetak godina napravljen je ogroman znanstveni iskorak u razumijevanju mehanizama selektivnog odabira, pakiranja i razgradnje točno određenog sadržaja putem evolucijski konzerviranog procesa selektivne autofagije (55). Tako danas znamo da je odabir materijala za razgradnju ovim procesom izrazito specifičan i složen te vrlo vjerojatno igra važniju ulogu od neselektivne autofagije u održavanju stanične homeostaze.

Mnogi dijelovi citoplazme selektivno mogu biti zarobljeni u autofagosom uključujući organele poput mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma, peroksisoma, ribosoma ili dijelova jezgre. Nadalje, selektivna autofagija mehanizam je uklanjanja proteinskih agregata, granuliranih struktura različitog sastava, ali i unutarstaničnih patogena poput bakterija i virusa. Jednom kada je selektivno zarobljen, dopremanje sadržaja autofosoma do lizosoma za razgradnju, nastavlja se putem koji uključuje isti molekularni mehanizam i regulatore kao i proces neselektivne autofagije. Selektivna autofagija prvotno je opisana za peroksisome i mitohondrije, pa su tako „peksofagija“ i „mitofagija“ prvi definirani termini korišteni za specifično imenovanje razgradnje ovih organela putem selektivne autofagije (34,56). Kasnije su uslijedila otkrića dodatnih staničnih struktura koje se mogu selektivno ukloniti autofagijom, kao i uvođenje novih termina za svaki sljedeći otkriveni oblik selektivne autofagije. Terminologija različitih oblika selektivne autofagije zasniva se na kombinaciji sastavljenoj od prefiksa koji dolazi od sadržaja za selektivnu razgradnju (npr. mito-, ribo-, ER-, pekso- itd.) i sufiksa -fagija. Tako razlikujemo selektivnu autofagiju endoplazmatskog retikuluma poznatu kao retikulofagija ili ERfagija, peksofagiju (autofagiju peroksisoma), mitofagiju (mitohondrija), lipofagiju (lipidnih kapi), zimofagiju (sekretornih granula), nukleofagiju (dijelova jezgre), ribofagiju (ribosoma) ili agregofagiju (proteinskih agregata) (55). Uobičajeno se za selektivnu autofagiju patogena koristi termin ksenofagija. Prikaz do sada poznatih oblika selektivne autofagije i receptora uključenih u pojedini oblik naveden je na slici 4.



Slika 4. Vrste selektivne autofagije (crveno). Na isprekidanim strelicama navedeni su nazivi receptora za pojedinu vrstu selektivne autofagije. Receptori kod kvasca (zeleno), receptori kod sisavaca (plavo). Upitnicima su naznačeni, za sada, nepoznati receptori selektivne autofagije. SLRs označava grupu selektivnih receptora sličnih p62/SQSTM1 (prema engl. *p62/SQSTM1-like receptor*) koji su navedeni u legendi slike (dolje lijevo).

1.4.1. Receptori selektivne autofagije

Iako je već sama po sebi šaperonima posredovana autofagija selektivna prema proteinima s KFERQ sekvencom, mikroautofagija i makroautofagija također mogu biti selektivne. Selektivno prepoznavanje specifičnog citoplazmatskog sadržaja od strane novonastajućeg autofagosoma omogućeno je zbog postojanja niza tzv. receptora selektivne autofagije koji imaju mogućnost povezivanja materijala namijenjenog za razgradnju, s jedne strane, i proteina smještenih na membrani autofagosoma, s druge strane. Najčešće, receptori

smješteni na površini materijala za razgradnju, posjeduju domenu LIR (prema engl. *LC3-interacting region*) preko koje je moguće izravno vezanje za Atg8/LC3/GABARAP proteine na membrani autofagosoma. Također, moguće je vezanje preko tzv. proteina adaptora koji posjeduju LIR i domenu za vezanje ubikvitina te na taj način djeluju kao adaptori između ubikvitinom obilježenog citoplazmatskog sadržaja i proteina konjugiranih na površini autofagosoma. Iako je do danas kod kvasaca opisano najmanje 10 receptora selektivne autofagije, a čak više od 30 kod sisavaca, molekularni mehanizmi selektivnog prepoznavanja i pakiranja sadržaja u autofosome još su uvijek nedovoljno istraženi.

1.5. Mitofagija - selektivna autofagija mitohondrija

Od svih oblika selektivne autofagije, selektivno uklanjanje mitohondrija, jedan je od prvih opisanih oblika selektivne autofagije, te je ujedno i najbolje proučen. Zbog činjenica da su mitohondrijska oštećenja i disfunkcionalnost selektivne autofagije mitohondrija povezani s nastankom cijelog niza neurodegenerativnih bolesti i tumora, znanstveni interes za područje mitofagije i dalje nezaustavljivo raste.

1.5.1. Uloga mitohondrija u stanicama

Po mnogim karakteristikama mitohondriji su izrazito neobični, ali i jedinstveni te funkcionalno neophodni organeli većine eukariotskih stanica. Uz staničnu jezgru, mitohondriji omeđeni dvostrukom membranom, jedini su organeli animalnih eukariotskih stanica koji sadrže vlastiti genom te samostalni molekularni sustav za sintezu RNA i proteina. Većina proteina neophodna za mitohondrijsku funkciju zapravo je kodirana genomom jezgre, sintetizira se na slobodnim ribosomima u citoplazmi i posebnim transportnim mehanizmima se naknadno unosi u mitohondrije. Jednostavnom fizijom, mitohondriji se dijele, neovisno o diobi stanice u kojoj su smješteni i tako nedvojbeno podsjećaju na svoje evolucijske pretke, primitivne aerobne bakterije. Izuzev nekih vrsta stanica, poput eritrocita, sve animalne stanice posjeduju mitohondrije, a količina mitohondrija u stanici uvelike ovisi o metaboličkoj aktivnosti pojedine vrste stanica pa tako kod izrazito aktivnih stanica, poput mišićnih i jetrenih, mitohondrijska populacija zauzima i do 25% citoplazmatskog volumena stanice. Protozoe posjeduju samo jedan mitohondrij u cijeloj stanici, dok većina somatskih stanica sadrži čak 200 do 2000 mitohondrija po stanici. Zanimljiv su slučaj ljudske spolne stanice gdje zreli spermiji imaju

fiksna broj od 16 mitohondrija po stanici, za razliku od oocita koje mogu imati i do 100.000 mitohondrija (57).

Mitohondriji imaju višestruke i neophodne funkcije u stanici. Njihova najvažnija uloga je osiguravanje energije potrebne za stanični metabolizam procesom oksidativne fosforilacije pa se stoga ovi organeli nerijetko znaju nazivati i malim staničnim elektranama (58). Osim ATP proizvodnje, mitohondriji također imaju ključne uloge u mnogim fiziološkim procesima poput homeostaze kalcija, biosinteze aminokiselina, lipida, hema, metabolizmu sumpora, signalnih uloga u regulaciji urođene imunosti i prilikom različitih oblika staničnog stresa te reprogramiranju matičnih stanica (59–61). Također, imaju važnu ulogu u regulaciji programirane stanične smrti, apoptoze, i autofagije stoga je očigledno da su mitohondriji ključni za dva temeljna procesa staničnog preživljavanja i stanične smrti (62).

Mitohondriji su izrazito dinamični organeli koji koordiniranim i reguliranim procesima fuzije i fizije, poznatim pod izrazom „mitohondrijska dinamika“, mogu mijenjati svoju morfologiju i prilagoditi svoje višestruke funkcije trenutačnim potrebama stanice. Mitohondrijskom dinamikom reguliran je oblik, veličina, broj te položaj mitohondrija u citoplazmi (63,64). Fiziju mitohondrija karakterizira podjela jednog mitohondrija na dva čime se stanica opskrbljuje novim mitohondrijima koji mogu biti transportirani i raspoređeni na citoplazmatske dijelove s većim energetske zahtjevima. S druge strane, fizijom se osigurava odvajanje oštećenog dijela mitohondrija od funkcionalnog te posljedično njegova selektivna razgradnja procesom mitofagije, čime se održava zdrava mitohondrijska populacija u stanici i njihova homeostaza. Mitohondrijskom fuzijom, odnosno spajanjem više mitohondrija u jedan, omogućava se razmjena mitohondrijskog sadržaja i stimulacija oksidativne fosforilacije (65). Također, fuzija mitohondrija predstavlja i mehanizam preživljavanja stanice jer se fuzijom stvorena mitohondrijska mreža obnavlja (66). Poremećena regulacija mitohondrijske dinamike rezultira nakupljanjem fragmentirane mitohondrijske populacije koju karakterizira velik broj malih, okruglastih mitohondrija ili pak stvaranje složene mitohondrijske mreže s izduženim i povezanim mitohondrijima. Stoga je ravnoteža ova dva procesa neophodna kako bi se očuvala pravilna funkcija mitohondrija i zadovoljile metaboličke potrebe stanice (64). Svi procesi mitohondrijske dinamike, uključujući pokretanje mitohondrija, fuziju, fiziju i mitofagiju, strogo su regulirani procesi usklađeni djelovanjem velikog broja proteina, ali su i pod utjecajem različitih signala, koji održavaju mitohondrijsku morfologiju, distribuciju i funkciju.

Mitochondrijska fizija je stupnjeviti proces u kojem presudnu važnost ima GTPaza, protein DRP1 (prema engl. *dynamamin-related protein 1*) te niz efektorskih proteina (FIS1 (prema engl. *mitochondrial fission 1 protein*), Mff (prema engl. *mitochondrial fission factor*), MiD49/51 (prema engl. *Mitochondrial dynamics proteins 49/51*)) čija je uloga regulacija regrutacije proteina DRP1 na mjesto dijeljenja mitohondrija. Iako većinom citoplazmatski protein, DRP1 se za vrijeme mitohondrijske diobe regrutira na vanjsku mitohondrijsku membranu gdje oligomerizira u prstenastu strukturu koja, uslijed hidrolize GTP molekule, mijenja svoju konformaciju i uzrokuje konstrikciju mitohondrijske membrane. Konačno, potpuno cijepanje vanjske mitohondrijske membrane nastaje GTPaznom aktivnošću proteina dinamin 2 (DNM2). Zanimljivo, sama aktivnost GTPaza nije dostatna za potpuni proces mitohondrijske fizije. Smatra se da fizija mitohondrija započinje na kontaktnim mjestima endoplazmatskog retikuluma i mitohondrija, gdje se tubuli endoplazmatskog retikuluma namotavaju oko mitohondrija i stvaraju pre-konstricijsko mjesto gdje se dalje regrutiraju GTPaze i mnogi motorni proteini (poput F-aktina i miozina IIA) potrebnih za stvaranje mehaničke snage za proces fizije. I u proces mitohondrijske fuzije su uključene GTPaze slične dinaminu koje omogućavaju fuziju dviju vanjskih i unutarnjih mitohondrijskih membrana: MFN1/2 (prema engl. *mitofusin 1/2*) i OPA1 (prema engl. *optic atrophy 1 protein*). Fuzija vanjske membrane posredovana je proteinima koji se nalaze na vanjskoj mitohondrijskoj membrani, MFN1 i MFN2, koji na citoplazmatskom dijelu imaju GTP-vezujuću domenu. Dimerizacijom mitofuzina sa suprotnih mitohondrija i njihovom GTPaznom aktivnošću, dolazi do konformacijskih promjena proteina, njihovog približavanja te konačne fuzije dviju vanjskih mitohondrijskih membrana. Fuzija unutarnjih mitohondrijskih membrana odvija se interakcijom kraće i duže izoforme OPA1 GTPaze s dvije susjedne unutarnje mitohondrijske membrane.

Mnoge mutacije gena koji kodiraju regulatore procesa mitohondrijske fuzije i fizije, povezane su s nastankom različitih poremećaja, što dodatno naglašava fiziološku važnost mitohondrijske dinamike u homeostazi stanice. Većinom su ove mutacije povezane s poremećajima neuromuskulatornog i središnjeg živčanog sustava poput Charcot–Marie–Tooth (CMT) 2A neuropatije koju karakterizira progresivno propadanje perifernih osjetnih i motoričkih neurona uslijed patogenih mutacija MFN2 (67,68) i DNM2 (69). Niz dominantnih mutacija GTPazne domene proteina OPA1, povezan je s jednom od najčešćih nasljednih

optičkih neuropatija, optičkom atrofijom, koju karakterizira propadanje optičkog živca i gubitak vida (70–72).

1.5.2. Mehanizmi mitofagije

Kod sisavaca, mitofagiju je moguće aktivirati preko dva različita signalna puta. Jedan je ovisan o receptorima smještenim na mitohondrijima dok je drugi vezan za sustav proteina čije djelovanje rezultira ubikvitinacijom mitohondrijskih proteina važnih za inicijaciju procesa mitofagije. Iako su oba tipa mitofagije, mitofagija posredovana receptorom i PINK1-Parkin posredovana mitofagija detaljno proučavane, još uvijek su nedovoljno istraženi mehanizmi njihove regulacije.

1.5.2.1. PINK1-Parkin-posredovana mitofagija

Disfunkcija mitohondrija jedna je od bitnih karakteristika u patogenezi Parkinsonove bolesti, a sama bolest često se povezuje s mutacijama gena koji kodiraju proteine Parkin i PINK1 (prema engl. *PTEN-induced putative kinase 1*). Parkin je citoplazmatska E3 ligaza, a točkaste mutacije ili delecije Parkin gena (Park2) povezane su s autosomalno recesivnim oblikom Parkinsonove bolesti. PINK1 je serin/treonin kinaza vanjske mitohondrijske membrane s kinaznom domenom koja strši u citoplazmu. Mutacije Park6 gena, koji kodira za PINK1, također su povezane s nasljednim oblikom Parkinsonove bolesti. Genetske studije na modelu vinske mušice pokazale su da mutante kojima nedostaju PINK1 ili Parkin proteini pokazuju isti fenotip kao i mutante kojima nedostaju oba proteina što dokazuje da PINK1 i Parkin proteini sudjeluju u istom signalnom putu. Prekomjernim izražajem Parkina u vinskoj mušici s uklonjenom kinazom PINK1, djelomično je moguće povratiti fenotip divljeg tipa, međutim suprotnom kombinacijom, prekomjernom ekspresijom proteina PINK1 u sustavu bez proteina Parkin, nemoguće je uspostaviti normalan fenotip. Ovo dokazuje da je kinaza PINK1 uzvodni efektor u PINK1-Parkin signalnom putu (73–75).

PINK1-Parkin sustav nužan je za održavanje mitohondrijske homeostaze preko nekoliko mehanizama regulacije kvalitete mitohondrijske populacije u stanici od kojih je najvažniji uklanjanje oštećenih i nefunkcionalnih mitohondrija procesom mitofagije. Kod zdravih mitohondrija, razina kinaze PINK1 održava se na niskoj razini preko mehanizama procesiranja i cijepanja djelovanjem proteina PARL (prema engl. *presenilin associated rhomboid like*) na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani ili procesirajućih peptidaza matriksa

(76), posljedičnim otpuštanjem kinaze u citoplazmu i finalnoj razgradnji u proteasomu. Prilikom mitohondrijskog oštećenja, slično kao i za vrijeme djelovanja protonofora membrane, poput CCCP (prema engl. *carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazone*) kemikalije koja povećava protonsku propusnost membrane i smanjuje potencijal unutarnje mitohondrijske membrane, PINK1 se stabilizira na vanjskoj mitohondrijskoj membrani i ne uspijeva se procesirati te se nakuplja na vanjskoj mitohondrijskoj membrani. Njegova stabilizacija rezultira pojačanom regrutacijom Parkin ligaze i posljedično ubikvitinacijom proteina MFN1 i MFN2 važnih za mitohondrijsku fuziju. Ubikvitinirani MFN1 i MFN2 odvođe se do proteasoma na razgradnju te se time inhibira proces mitohondrijske fuzije, a mitohondriji se potom fragmentiraju što je ujedno i početni korak nužan za aktivaciju mitofagije (77). Također, PINK1-Parkin sustav djeluje i preko poliubikvitinacije proteina VDAC1 (prema engl. *voltage-dependent anion channel 1*) dodavanjem K27-vezanih ubikvitinskih lanaca. Ove poliubikvitinske lance prepoznaje protein adaptor p62 svojom UBA (prema engl. *ubiquitin-associated*) domenom, koji se pak sa svojom LIR domenom veže za proteine LC3/GABARAP na membrani autofagosoma te tako omogućava pakiranje mitohondrija u autofagosom (78).

1.5.2.2. Mitofagija posredovana receptorima

Prethodno opisanim mehanizmom mitofagije posredovane PINK1-Parkin sustavom, većinom se uklanjaju oštećeni i nefunkcionalni mitohondriji. Osim oštećenih mitohondrija, tijekom razvoja pojedinih specijaliziranih stanica, nužno je ukloniti čitavu populaciju sasvim funkcionalnih i zdravih, ali za normalnu funkciju pojedinog tkiva, nepotrebnih mitohondrija. Stoga mitofagija ne djeluje samo kao mehanizam kontrole kvalitete mitohondrija, već kao i neophodni razvojni mehanizam kontrole mitohondrijske kvantitete u pojedinim tkivima. Najpoznatiji primjer fiziološke funkcije mitofagije tijekom razvoja jest potpuno uklanjanje mitohondrija za vrijeme terminalne faze eritropoeze. Kod sisavaca, za potpunu diferencijaciju retikulocita u zrele eritrocite potrebno je ukloniti jezgru i većinu organela, poput mitohondrija, kako bi eritrocit imao što veći kapacitet za vezanje i prijenos kisika (79). Zanimljivo je također, da mitofagija ima vrlo važnu ulogu već za vrijeme rane embriogeneze pa se tako ovim mehanizmom selektivno uklanjaju očevi mitohondriji u oplodenoj oociti što osigurava isključivo nasljeđivanje majčine mitohondrijske DNA (80,81). Nadalje, mitofagija je povezana s razvojem i diferencijacijom masnog tkiva (82). Ranu adipogenezu karakterizira nagla mitohondrijska biogeneza i stvaranje velike mitohondrijske mreže, neophodne za proizvodnju

toplina u smeđem masnom tkivu. Tijekom diferencijacije bijelog masnog tkiva, procesom mitofagije se uklanja velika većina aktivnih mitohondrija, a adipocitni prostor ispunjavaju velike lipidne kapi za skladištenje energije (83). Diferencijacija i sazrijevanje limfocita T također je povezana s reguliranim smanjenjem mitohondrijske populacije u pretečama ovih stanica, timocitima (84). Naposljetku, programirano uklanjanje mitohondrija neophodno je i u normalnom razvoju očne leće čija prozirnost ovisi o metaboličkoj aktivnosti i količini mitohondrija u njoj (85,86).

PINK1-Parkin mehanizam aktivacije mitofagije nije uključen kod navedenih programiranih oblika uklanjanja funkcionalnih, ali nepotrebnih mitohondrija. Štoviše, iako je mitofagija normalno prisutna kod kvasaca, kvašćevi homologe PINK1-Parkin sustava do sada nisu opisani. Međutim, kod kvasaca do programiranog uklanjanja mitohondrija tijekom razvoja dolazi putem posebnih receptora mitofagije smještenih na vanjskoj mitohondrijskoj membrani čiji je mehanizam djelovanja sličan kao kod prethodno opisanih receptora selektivne autofagije koji zbog posjedovanja domene LIR za vezanje proteina na autofagosomalnoj membrani mogu posredovati u selektivnoj regrutaciji različitih citoplazmatskih struktura u autofagosom.

Opisivanje molekularnih mehanizama i regulacije mitofagije posredovane receptorima započeto je kod kvasaca i to otkrivanjem prvog i za sada jedino opisanog receptora mitofagije, kvašćevog proteina Atg32. Delecija Atg32 dovodi do potpune inhibicije mitofagije, ali ne i do zaustavljanja drugih oblika selektivne autofagije ili neselektivne autofagije (87,88). Do danas nisu otkriveni ortolozi proteina Atg32 kod sisavaca. Atg32 je 59-kDa veliki protein vanjske mitohondrijske membrane čiji se C-terminalni kraj nalazi u međumembranskom prostoru dviju mitohondrijskih membrana, a veći dio (43-kDa) pripada N-terminalnom djelu i strši u citoplazmu. Na citoplazmatskom dijelu proteina Atg32 nalazi se tetrapeptidna WQAI sekvenca, tzv. AIM motiv (prema engl. *Atg8-family interacting motif*), neophodna za vezanje proteina Atg8, kvašćevog homologa proteina LC3/GABARAP kod sisavaca, i regrutaciju mitohondrija na autofagosom te razgradnju putem vakuole (kvašćev ekvivalent lizosomu). Slično kao i kod domene LIR, mutacije u domeni AIM značajno smanjuju vezanje proteina Atg32 i Atg8, što za posljedicu ima i smanjenu učinkovitost razgradnje mitohondrija kod kvasaca (89). Za potpunu mitofagiju sama interakcija proteina Atg32 i Atg8 nije dovoljna jer mutacije domene AIM samo djelomično inhibiraju mitofagiju (90). Stoga se vjeruje da su ove interakcije važne samo za produživanje izolacijske membrane oko mitohondrija, ali ne i za prepoznavanje receptora i autofagosomalnog proteina Atg8. Ključnu ulogu u prepoznavanju

receptora imaju Atg32-Atg11 interakcije, također putem N-terminalnog citoplazmatskog kraja (91) te se na taj način stvara kompleks Atg32-Atg11-Atg8 koji omogućava regrutaciju ostalih komponenti autofagosomalne mašinerije i uspješniji završetak mitofagije. Fosforilacija S114 i S119 na N-terminalnom kraju receptora Atg32 potrebna je za inicijaciju mitofagije (92) te pospješuje vezanje proteina Atg32 i Atg11, ali ne utječe na interakcije s proteinom Atg8. Sama fosforilacija posljedica je djelovanja kinaze CK2 (prema engl. *casein kinase 2*). Zanimljivo, CK2 je konstitutivno aktivna kinaza iako se fosforilacija i aktivacija Atg32 receptora odvija isključivo u uvjetima potaknute mitofagije (93) što predlaže da postoji mehanizam supresije fosforilacije Atg32 proteina kako bi se spriječio nepotreban gubitak mitohondrija u normalnim staničnim uvjetima. Fosfataza Ppg1 (prema engl. *(PP2A)-type protein phosphatase*) je nedavno otkriveni negativni regulator fosforilacije Atg32 receptora (94) čija delecija dovodi do konstitutivne Atg32 fosforilacije i aktivacije čak i u uvjetima kada mitofagija nije potaknuta.

Za razliku od kvasaca, kod višestaničnih organizma postoji veći broj receptora za selektivno uklanjanje mitohondrija, ali i nekoliko molekularnih mehanizama kojima ovi receptori djeluju čime je omogućena specifična i stroža regulacija procesa ovisno o različitim poticajima i vrsti tkiva u kojoj se mitofagija odvija. Regrutacija mitohondrija na autofagosom u nastajanju odvija se preko dva mehanizma mitofagije posredovane receptorima: (1) preko receptora koji vežu ubikvitin i (2) preko receptora koji ne vežu ubikvitin.

Pet tzv. adaptorskih proteina, p62/SQSTM1 (prema engl. *sequestosome-1*), OPTN (Optineurin), NDP52 (engl. *nuclear domain 10 protein 52*), TAX1BP1 (engl. *TAX1 binding protein 1*) i NBR1 (engl. *neighbor of BRCA1 gene 1*), posjeduju domenu za vezanje ubikvitina, preko koje vežu K63 poliubikvitirane mitohondrijske proteine, i domenu LIR kojom mogu vezati proteine LC3/GABARAP na autofagosomu, te tako služe kao adaptor koji selektivno povezuju mitohondrije i autofosome (95). Među njima, OPTN je najbolje opisani i najvažniji adaptor za regrutaciju fagofora na mitohondrije (96), a osim u mitofagiji sudjeluje i u ksenofagiji *Salmonelle* (97) te agregaciji ubikvitiniranih proteinskih agregata (98). Mehanizam njegovog djelovanja u mitofagiji povezan je s aktivnošću PINK1-Parkin sustava (99). Nakon regrutacije OPTN na mitohondrije, kinaza TBK1 (prema engl. *Tank-binding kinase 1*) fosforilira adaptor i time ga dodatno aktivira (96,100).

Mitofagija posredovana PINK1-Parkin mehanizmom i receptorima ovisnim o ubikvitinaciji glavni je mehanizam uklanjanja oštećenih mitohondrija u stanici. Međutim, zbog potrebe za uklanjanjem i funkcionalnih mitohondrija tijekom razvoja i diferencijacije pojedinih

specijaliziranih vrsta stanica, posebno kod sisavaca, razvijen je dodatni mehanizam mitofagije posredovane receptorima. Za razliku od receptora mitofagije kojima je potrebna prethodna ubikvitinacija aktiviranom Parkin ligazom, ovaj tip receptora ne ovisi o ubikvitinaciji. Štoviše, ovakvi receptori smješteni su na mitohondrijskoj membrani, a na svome citoplazmatskom kraju imaju domenu LIR za direktnu regrutaciju rastućeg fagofora na mitohondrije pa tako ne zahtijevaju posredovanje adaptora za uspješno započinjanje mitofagije. Prethodno opisani mehanizam Atg32-ovisne mitofagije kod kvasca poprilično je sličan ovakvom tipu mitofagije posredovane receptorima kod sisavaca. Osim evolucijske konzerviranosti strukture i funkcije, sve je više studija koje pokazuju da postoji i sličnost u molekularnom mehanizmu djelovanja između kvašćevog receptora Atg32 i receptora mitofagije kod sisavaca (objedinjeno u (101)). Pravi homolog kvašćevog Atg32, kod sisavaca još uvijek nije otkriven, međutim nekoliko proteina vanjske mitohondrijske membrane pokazuju identične funkcionalne karakteristike kao i Atg32: FUNDC1 (prema engl. *FUN14 domain-containing protein 1*), BNIP3 (prema engl. *BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3*), NIX/BNIP3L (prema engl. *BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3-like*), BCL2L13 (prema engl. *Bcl2-like 13*), FKBP8 (prema engl. *FK506 binding protein 8*) i AMBRA1 (prema engl. *activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1*) (102–107). Osim navedenih receptora smještenih na vanjskoj mitohondrijskoj membrani, nedavno su otkriveni protein PHB2 (prema engl. *Prohibitin 2*) (108) te lipid kardiolipin (109) na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani, koji također mogu direktno vezati proteine LC3/GABARAP i regrutirati rastući autofagosom na mitohondrije. Ovo dokazuje da i komponente unutrašnje mitohondrijske membrane mogu aktivno sudjelovati u selektivnom uklanjanju mitohondrija iako je mehanizam njihovog djelovanja još uvijek diskutabilan i najvjerojatnije uključuje prethodno oštećenje vanjske membrane mitohondrija i izlaganje unutrašnjih struktura mašineriji autofagije. Sažetiji prikaz receptora mitofagije i osnove njihove regulacije opisani su dalje u tekstu.

1.5.2.2.1. FUNDC1

FUNDC1 je protein vanjske mitohondrijske membrane, a povezuje se s mitofagijom induciranom hipoksičnim uvjetima (105). FUNDC1 regulira PINK1-Parkin neovisnu mitofagiju i direktno se vezuje za protein LC3 u nedostatku kisika. U normoksičnim uvjetima inhibirana je njegova funkcija receptora mitofagije djelovanjem kinaza SRC (prema engl. *steroid receptor coactivator*) (105) i CK2 (110) koje fosforiliraju aminokiseline Y18, u domeni

LIR, i S13 uzvodno od domene LIR proteina FUNDC1 i tako onemogućavaju vezanje za LC3. U hipoksičnim uvjetima, djelovanjem fosfataze PGAM5 (prema engl. *phosphoglycerate mutase family member 5*) na fosforilirani S13 i fosforilacijom S17 kinazom ULK1, receptor FUNDC1 je aktiviran i sposoban regrutirati autofagosome (110,111). Iako je fosforilacija glavni mehanizam regulacije aktivnosti receptora FUNDC1, posttranslacijska modifikacija, poput ubikvitinacije K119 djelovanjem mitohondrijske E3 ligaze MARCH5 (prema engl. *membrane-associated RING-CH*), pomalo paradoksalno, može u početnoj fazi hipoksije značajno smanjiti količinu proteina FUNDC1 njegovom razgradnjom u proteasomu, kako bi se izbjeglo nepotrebno uklanjanje mitohondrija (112). Vrlo vjerojatno se produljenom hipoksijom aktivira glavni mehanizam regulacije aktivnosti FUNDC1, defosforilacija S13 pomoću fosfataze PGAM5 čime se omogućava napredovanje mitofagije.

Osim kao receptor mitofagije, opisana je i uloga proteina FUNDC1 u regulaciji procesa mitohondrijske fizije i fuzije i to putem interakcija s proteinima DNMI1L/DRP1 i OPA1, glavnim modulatorima mitohondrijske dinamike. Hipoksični uvjeti pospješuju interakciju FUNDC1 i DRP1 te regrutaciju na mitohondrijsku membranu kao i inicijaciju mitohondrijske fizije, važnom koraku koji prethodi mitofagiji. Istodobno inicijacijom mitofagije smanjuje se vezanje i aktivacija važnog regulatora mitohondrijske fuzije proteina OPA1 koji je u bazalnim uvjetima prisutan u stabilnoj interakciji s receptorom FUNDC1. Vjerojatno su ove interakcije regulirane fosforilacijskim statusom receptora što predlaže da fosforilacija receptora, osim koordinacije mitofagije ima važnu ulogu u regulaciji dinamike mitohondrijske populacije u stanici (113).

1.5.2.2.2. BCL2L13

Protein BCL2L13 po svim je molekularnim karakteristikama jednak tipičnom receptoru mitofagije: nalazi se u vanjskoj mitohondrijskoj membrani, posjeduje čak dvije domene LIR na citoplazmatskom dijelu te veže proteine LC3/GABARAP, a prekomjerno izražen u stanicama potiče mitohondrijsku fragmentaciju i inicijaciju mitofagije čak i kod kvasaca kojima je uklonjen protein Atg32. Djelomično je poznata molekularna mašinerija uključena u regulaciju mitofagije posredovane BCL2L13, a uključuje fosforilaciju S272 u blizini druge domene LIR, aktivaciju receptora te konačno regrutaciju proteina LC3 na depolarizirane mitohondrije (114). Posljednja istraživanja receptora BCL2L13 pokazuju da su za regrutaciju proteina LC3 i učinkovitu mitofagiju neophodne komponente ULK1 kompleksa

(115). Međutim, pitanje koje ostaje otvoreno jest je li i ako je kojaod komponenti ULK1 kompleksa u konačnici aktivira receptor BCL2L13.

1.5.2.2.3. FKBP8

FKBP8 protein pripada FKBP obitelji proteina čije su karakteristike posjedovanje FK506-vezujuće domene i peptidil-prolil-cis–trans izomerazne aktivnost koja je isključivo aktivirana vezanjem kalmomodulina, a omogućava regulaciju smatanja i eksporta proteina (116). Protein je smješten u vanjskoj mitohondrijskoj membrani (117), a poznat je po svojim ulogama u sidrenju proteasoma za mitohondrije, blokiranju apoptoze regrutacijom i vezanjem proteina BCL-2 i BCL-XL za mitohondrijsku membranu (118), te neophodnoj ulozi tijekom embriogeneze pa su tako *Fkbp8*^{-/-} miševi embrionalno letalni i pokazuju defektan razvoj neuralne cijevi (119,120). Bhujabal i sur. su opisali da je protein FKBP8 jedan od receptora mitofagije, s mogućnošću vezanja proteina LC3A, neovisan o PINK1-Parkin putu u uvjetima CCCP-inducirane mitofagije, a njegov prekomjerni izražaj dovodi do mitohondrijske fragmentacije (107). Najnovija istraživanja pokazala su dvostruku mitohondrijsku funkciju proteina FKBP8 u hipoksičnim uvjetima a to su regulacija mitohondrijske fragmentacije i mitofagije. Za regulaciju dinamike neophodna je domena LIRL (prema engl. *LIR motif-like*) na N-terminalnom kraju receptora koja je važna za vezanje i inhibiciju aktivnosti proteina OPA1 (121). Zanimljivo je da iako FKBP8 djeluje kao receptor mitofagije, on se ne razgrađuje zajedno s ostalim komponentama mitohondrija u autofagolizosomu, već se nakon vezanja proteina LC3 i regrutacije autofagosoma u nastajanju, skupa s proteinom BCL-2 translocira na endoplazmatski retikulum. Vjeruje se da je uloga ove translokacije supresija apoptoze inhibicijom proapoptotske aktivnosti proteina BCL-2 i učinkovitijeg napredovanja mitofagije (122).

1.5.2.2.4. AMBRA1

AMBRA1 je izrazito zanimljiv receptor jer je pokazano da sudjeluje u oba puta mitofagije, PINK1-Parkin ovisnoj i neovisnoj mitofagiji (123,124). Iako nije supstrat E3 ligaze Parkin, depolarizacija mitohondrijske membrane pospešuje interakcije AMBRA1 i Parkina te aktivira PI3K važnu za stvaranje autofagosoma oko nakupine depolariziranih mitohondrija. Aktivacija proteina AMBRA1 i uspješna progresija mitofagije nisu funkcionalni u sustavu bez ligaze Parkin iako točan molekularni mehanizam kojim Parkin aktivira protein AMBRA1 još

uvijek nije poznat (123). S druge strane, AMBRA1 je klasični receptor mitofagije, sposoban aktivirati specifično uklanjanje mitohondrija iz stanice vezanjem autofagosomalnih proteina neovisno o PINK1-Parkin mehanizmu mitofagije (125,126). Mehanizam indukcije mitofagije putem receptora AMBRA1 donekle je i poznat. AMBRA1 djeluje kao koaktivator E3 ligaze HUWE1 (prema engl. *HECT, UBA and WWE domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1*) tijekom inicijacije mitofagije. Aktivirana E3 ligaza HUWE1 ubikvitinira regulatore mitohondrijske fuzije, među ostalima protein MFN2, što uzrokuje njegovu razgradnju u proteasomu i započinjanje mitofagije. Također, IKK α (prema engl. *I κ B kinase α*) fosforilira S1014 uzvodno od domene LIR proteina AMBRA1 čime dodatno pospješuje vezanje receptora za proteine autofagosomalne membrane i učinkovitije uklanjanje mitohondrija, a čini se da je za uspješnost ove fosforilacije neophodna prisutnost E3 ligaze HUWE1 (126).

1.5.2.2.5. Prohibitin 2

Prohibitin 2 je transmembranski protein unutrašnje mitohondrijske membrane, a djelovanjem depolarizatora mitohondrija direktno veže lipidirani oblik proteina LC3. PHB2 je stabilan isključivo u kompleksu s PHB1 proteinom (127), a za razliku od prethodno navedenih receptora mitofagije smještenih na vanjskoj mitohondrijskoj membrani, domenom LIR, PHB2 veže samo LC3, ali ne i GABARAP proteine autofagosoma. Od potencijalno tri domene LIR, za vezanje proteina LC3 važna je samo ona koja se nalazi u međumembranskom prostoru što predlaže da su interakcije proteina PHB2 i LC3 ovisne o prethodnoj depolarizaciji vanjske mitohondrijske membrane i narušavanju njezine strukture djelovanjem proteasoma. Mitofagija posredovana receptorom PHB2 zbog ovoga je vjerojatno ovisna o prethodnom djelovanju PINK1-Parkin sustava, ubikvitinaciji i razgradnji proteina vanjske mitohondrijske membrane u proteasomu te izlaganju receptora unutrašnje membrane autofagosomalnoj mašineriji. Također, pokazano je da se PHB2 posredovanim mehanizmom mitofagije uspješno uklanjaju očeve mtDNA tijekom rane embriogeneze kod *Cenorabditis elegans* (108). Zadnja istraživanja mehanizma djelovanja PHB2 pokazuju da je PHB2 regulator PINK1-Parkin puta mitofagije te je ta njegova funkcija neovisna o njegovom vezanju za proteine LC3. U ovom mehanizmu PHB2 djeluje kao inhibitor mitohondrijske proteaze PARL, važne za procesiranje kinaze PINK1 (76), čime se stabilizira kinaza PINK1 i povećava regrutacija ligaze Parkin na vanjsku mitohondrijsku membranu. Dodatni mehanizam je i inhibicija proteaze PARL, te neuspješno procesiranje fosfataze PGAM5 koja također stabilizira kinazu PINK1 na depolariziranoj

mitohondrijskoj membrani (128). Istraživanja na receptoru PHB2 otišla su korak dalje u usporedbi s ostalim receptorima. FL3 (prema engl. *flavaglines compound 3*) molekula, od prije poznati ligand receptora PHB2 (129), inhibira PHB2-PINK1-Parkin posredovanu mitofagiju i u malim koncentracijama zaustavlja proliferaciju nekoliko malignih staničnih linija što predlaže da bi inhibicija mitofagije (inhibicijom receptora PHB2) mogla biti učinkovita strategija u antitumorskoj terapiji (130).

1.5.2.2.6. Kardiolipin

Čini se kako je jedan od ranih događaja u mitofagiji kolaps asimetrične distribucije lipida mitohondrijskih membrana (131). Kardiolipin je, za sada jedini opisani, neproteinski receptor mitofagije. Osim što ga nalazimo u bakterijskoj membrani, sastavni je dio unutrašnje mitohondrijske membrane gdje sudjeluje u organizaciji mitohondrijskih krista i proteinskih kompleksa respiratornog lanca. U prisutnosti vanjskih signala, poput 6-hidroksidopamina, rotenona i 1-metil-4-fenilpiridina, kardiolipin se translocira na vanjsku mitohondrijsku membranu i takav je sposoban vezati proteine LC3 pa pojavnost kardiolipina na vanjskoj mitohondrijskoj membrani djeluje kao signal za inicijaciju mitofagije (132).

1.5.2.2.7. Receptori BNIP3 i NIX/BNIP3L

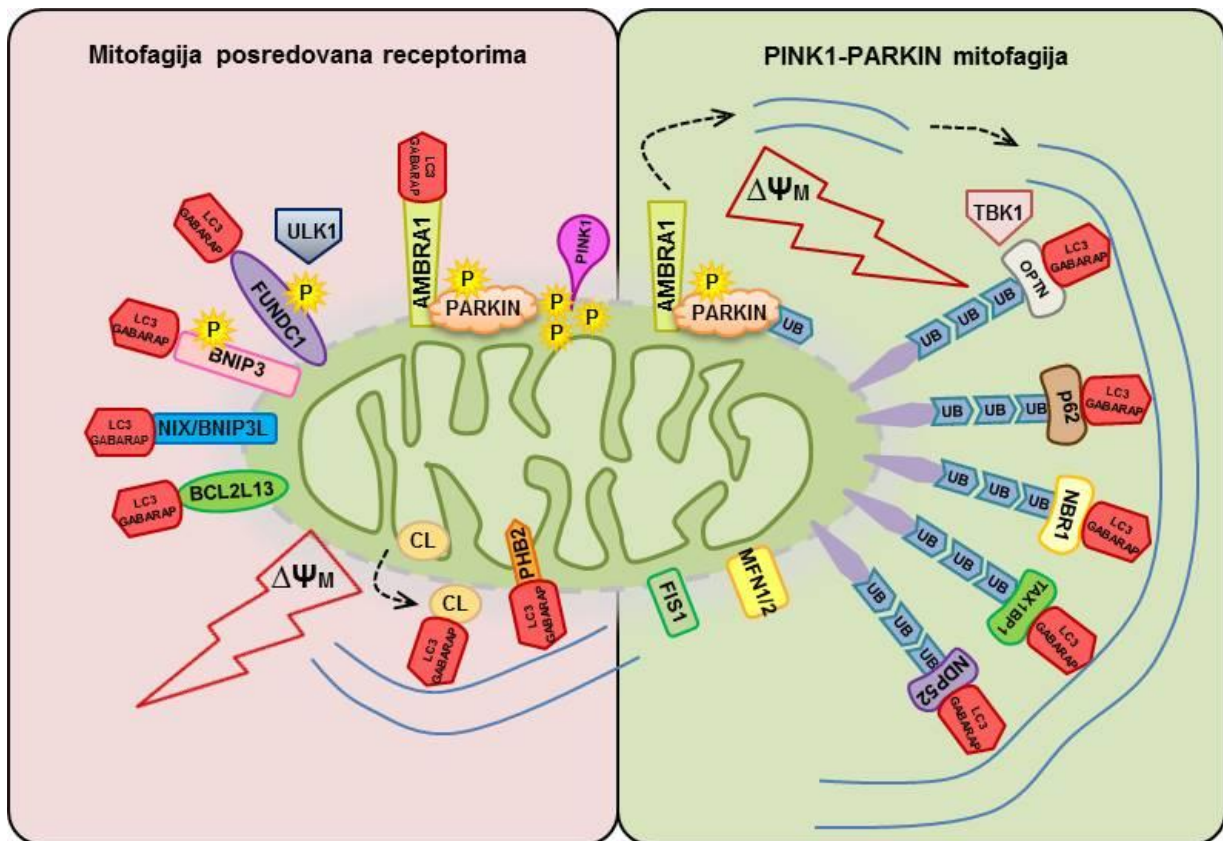
BNIP3 (prema engl. *BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3*) i BNIP3-like (BNIP3L), poznatiji kao NIX, su proteini koji zbog posjedovanja domene BH3 (prema engl. *Bcl-2 homology 3*) imaju dvostruku ulogu u stanici. S jedne strane mogu izazvati staničnu smrt dok s druge sudjeluju u procesu mitofagije te kao takvi imaju važnu ulogu u određivanju konačne stanične sudbine, smrt ili opstanak, što ih čini izrazito zanimljivim u istraživanjima. Osim ove karakteristike, oba proteina pokazuju niz strukturnih i funkcionalnih sličnosti te se vrlo često proučavaju u istome kontekstu.

Protein BNIP3 je jedan od tri proteina, BNIP1, BNIP2 i BNIP3, otkrivenih prilikom identifikacije interaktora Bcl-22 i E1B 19 kDa proteina (133). BNIP3 i njegov homolog NIX (imaju približno 50% identičnih aminokiselina), su transmembranski proteini koji svojom transmembranskom domenom (TM) jednom prolaze kroz vanjsku membranu mitohondrija. Veći dio oba proteina zapravo je citoplazmatski, a svega desetak aminokiselina nalazi se u međumembranskom prostoru između vanjske i unutrašnje mitohondrijske membrane. Bioinformatičke analize pokazuju da je citoplazmatska domena generalno nedefinirane

strukture, ali posjeduje nekoliko regija s definiranom sekundarnom strukturom. Tako oba proteina posjeduju netipičnu domenu BH3 zaduženu za proapoptotsku aktivnost proteina BNIP3 i NIX u određenim uvjetima iako je mehanizam indukcije apoptoze posredovan ovim proteinima ovisan o gubitku potencijala mitohondrijske membrane i otpuštanju citokroma c, a nije kao kod BH3 proteina neovisan o gubitku potencijala na membrani (134,135).

Uz BH3, na citoplazmatskom kraju proteina smještena je i domena LIR važna za vezanje proteina Atg8/LC3/GABARAP, međutim ne i ubikvitina (104). Ova domena, kao i kod ostalih receptora selektivne autofagije, sadrži središnju konsenzus sekvencu $\Theta xx\Gamma$ (gdje je: Θ -aromska aminokiselina, x-bilo koja aminokiselina, a Γ leucin i ili izoleucin) (55). Oko domene LIR proteina BNIP3 nalazi se nekoliko važnih serinskih ostataka, S17 i S24, čija se fosforilacija pokazala važnim u aktivaciji receptora (136) slično mehanizmu aktivacije proteina Optineurina (97). Nažalost, uzvodni signali koji doprinose ovoj fosforilaciji i aktivaciji receptora BNIP3 nisu poznati, međutim aminokiselinski sastav oko domene LIR proteina NIX upućuje na moguće postojanje sličnog mehanizma regulacije.

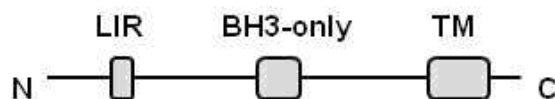
Transmembranske domene proteina NIX i BNIP3 dijele 80% homologije, a sastoje se od 21 aminokiseline. Domena TM neophodna je za lokalizaciju u vanjskoj mitohondrijskoj membrani (137) pa tako mutante proteina BNIP3, kojima je uklonjena TM, nisu smještene na mitohondrijima već u citoplazmi. U poliakrilamidnom gelu BNIP3 se vidi kao monomer od ~30 kDa i homodimer od ~60 kDa (138). Također, i NIX putuje kao monomer od ~42 kDa, ali je dominantno prisutan kao dimer ~80 kDa, a koeksprimirani NIX i BNIP3 tvore stabilni heterodimer veličine ~65 kDa (139). Uloga dimerizacije ovih proteina je potpuno nepoznata, iako je prilikom proučavanja uloge proteina BNIP3 u regulaciji apoptoze istražena biofizička pozadina stvaranja ovih dimera. Ovom analizom ustanovljeno je da se dimeri stvaraju posredstvom krajnjeg motiva GxxxG (gdje je G glicin, a x bilo koja aminokiselina) domene TM te da pojedinačne aminokiselinske supstitucije čitave domene TM mogu utjecati na promjenu sposobnosti dimerizacije (140). Objedinjeni shematski prikaz prethodno opisanih mehanizama mitofagije prikazan je na slici 5.



Slika 5. Pojednostavljeni molekularni mehanizmi dva osnovna oblika mitofagije: mitofagija posredovana receptorima (lijevo) i PINK1-Parkin mitofagija (desno)

1.6. Dosadašnja saznanja o regulaciji aktivnosti receptora NIX

Protein NIX ima odlike idealnog receptora za selektivno uklanjanje mitohondrija: sposobnost izravnog vezanja autofagosomnih proteina LC3 i GABARAP putem domene LIR na N-terminalnom dijelu dok je transmembranskom domenom direktno usidren u vanjsku mitohondrijsku membranu pa služi kao receptor za regrutaciju mitohondrija na membranu autofosoma. Međutim, molekularni mehanizmi regulacije mitofagije posredovane proteinom NIX nisu još uvijek detaljno istraženi. Na slici 6 shematski je prikazana struktura proteina NIX i organizacija njegovih funkcionalnih domena.



Slika 6. Shematski prikaz proteina NIX i organizacija njegovih funkcionalnih domena. Oznake skraćenica na shemi: BH3-only (BCL2 homology 3), C (C-terminalni kraj proteina), LIR (LC3-interacting region), N (N-terminalni kraj proteina), TM (transmembranska domena).

Svi opisani receptori selektivne autofagije vezuju Atg8-slične proteine preko konzerviranog tetrapeptidnog slijeda poznatog kao LIR koji sadrži jedinstvenu peptidnu sekvencu, Θ_0 -X₁-X₂- Γ_3 , u kojoj je Θ_0 aromatska aminokiselina (W/F/Y), X₁ i X₂ mogu biti bilo koje aminokiseline, a Γ_3 je aminokiselina s velikim hidrofobnim nastavkom (L/V/I) koji ujedno i ulazi u hidrofobne džepove HP1 i HP2 (prema engl. *hydrophobic pocket*) na Atg8-sličnim proteinima stvarajući stabilni kompleks receptor:Atg8. Dodatna stabilnost ovog proteinskog kompleksa postiže se stvaranjem elektrostatskih interakcija između pozitivno nabijenih aminokiselina na Atg8 proteinima i negativno nabijenih aminokiselina koje se često nalaze uzvodno od motiva LIR na receptoru (141). Poznato je da je za vezanje proteina LC3/GABARAP i NIX, zaslužna domena LIR na receptoru NIX (104,142). Kod receptora NIX delecija čitave domene (Δ LIR), ili bar pojedinačna zamjena prve aminokiseline iz tetrapeptidnog slijeda W-X-X-L, triptofana u alanin (W36A), uzrokuje nemogućnost vezanja proteina LC3 i GABARAP (104) i posljedično inhibiciju regrutacije oštećenih mitohondrija na membranu autofagosoma. Također, kod receptora se uočava slijed negativno nabijenih aminokiselina uzvodno od motiva LIR, serinski ostaci S34 i S35 koji se potencijalno mogu fosforilirati i kao takvi sudjelovati u stvaranju stabilnog kompleksa NIX:LC3 pa su s obzirom na njihovu prisutnost postavljeni prvi cilj i hipoteza ove doktorske disertacije (poglavlje ciljevi i hipoteze).

Nadalje, Novak i sur. (2010) su pokazali da uklanjanje mitohondrija iz retikulocita posredovano receptorom NIX najvjerojatnije nije regulirano samo njegovom domenom LIR (104). Naime, eksperiment proveden na retikulocitima *Nix*^{-/-} miševa, koji su transducirani s *Nix* WT i *Nix* LIRW35A virusnim vektorima, pokazao je nepotpuni utjecaj domene LIR na učinkovitost mitofagije što predlaže moguće postojanje drugih mehanizama NIX posredovane mitofagije kojima se ostvaruje pravilno sazrijevanje retikulocita. Kao i njegov funkcionalni homolog BNIP3, receptor NIX u stanicama je prisutan kao izrazito stabilan homodimer za što je odgovorna TM domena (138,143). Zanimljivo, NIX homodimer, bilo endogeni (143) ili

prekomjerno izražen (104), zapravo je dominantniji oblik u odnosu na NIX monomer. Budući da je domena LIR nedostatna za potpuno uklanjanje mitohondrija prilikom sazrijevanja retikulocita, postavljena je sumnja da je za učinkovitiju mitofagiju u retikulocitima odgovorna i dimerizacija receptora što je i drugi cilj i hipoteza ove disertacije (poglavlje ciljevi i hipoteze). Dimerizacija receptora, kao mogući mehanizam regulacije selektivne autofagije, do sada još nije opisan. Najsličniji mehanizam poznat je kod proteina p62 koji kao protein adaptor posreduje agregaciju ubikvitiniranih proteinskih agregata (144). Oligomerizacijom proteina p62 stvara se veći i dodatno stabilniji kompleks proteinski agregati:LC3 čime se postiže znatno veća učinkovitost agregacije (145). Receptor za selektivno uklanjanje bakterija iz stanica, protein NDP52, djeluje preko sličnog mehanizma stvaranja multimernog proteinskog kompleksa. U ovom slučaju NDP52 dimer lakše stvara heteroheksamerni kompleks s dva monomerna galektina-8 i dva monomerna proteina LC3C te omogućava uspješnije pakiranje patogena u autofagosom (146).

Transmembranska domena receptora NIX dijeli oko 80% homologije s TM domenom proteina BNIP3 (Slika 17). Biofizička analiza Sulistijo ES i MacKenzie KR (2006) ukazuje na ključne aminokiselinske ostatke u mišjoj sekvenci domene TM proteina BNIP3, $S^{172}H^{173}XXA^{176}XXL^{179}G^{180}XXI^{183}G^{184}$, koji su neophodni za njegovu dimerizaciju. Upravo su ove aminokiseline konzervirane kod receptora NIX (Slika 17), a obuhvaćaju i C-terminalni GxxxG motiv tzv. glicinski zatvarač kojeg nalazimo u mnogim membranskim proteinima (140,147,148). Kako je domena TM odgovorna za dimerizaciju receptora, studija Sulistijo ES i MacKenzie KR (2006) poslužila je kao temelj za određivanje koje supstitucijske mutante domene TM receptora NIX treba uvrstiti i ispitati u proučavanju učinka dimerizacije na započinjanje i napredovanje mitofagije. C-terminalna domena receptora NIX dio je koji se nalazi u prostoru između vanjske i unutarnje mitohondrijske membrane i sastavljena je od svega 11 aminokiselina. Promatrajući aminokiselinski sastav C-terminalnog kraja primjećuje se čak šest aminokiselinskih ostataka s potencijalom za fosforilaciju (Slika 28). U međumembranskom mitohondrijskom prostoru nalazi se čitav niz regulatora programirane stanične smrti, a osim uloge u autofagiji, NIX je opisan kao i proapoptotski protein (143). Stoga je moguće da se putem interakcija s drugim proteinima međumembranskog prostora tj. putem fosforilacije C-terminalnog kraja receptora NIX odvija i regulacija apoptoze i/ili autofagije.

1.7. Uloga receptora NIX u eritropoezi

Kontrolirano uklanjanje mitohondrija neophodno je za normalno funkcioniranje pojedinih vrsta stanica poput kardiomiocita i neurona. Uklanjanje mitohondrija fiziološka je pojava i tijekom normalnog razvoja, kao kod razvoja očne leće ili eritrocita. Tijekom terminalne diferencijacije eritrocita, u koštanoj srži i prvih nekoliko dana u cirkulaciji, nezreli eritrociti poznatiji kao i retikulociti, prolaze intenzivno remodeliranje staničnog sadržaja kako bi postali zreli funkcionalni eritrociti (142,149–151). Čini se da veliku ulogu u ovoj remodelaciji ima proces autofagije. Nakon uklanjanja jezgre, retikulociti još uvijek sadrže ribosome i organele omeđene membranama poput, mitohondrija i malu količinu endoplazmatskog retikuluma koji se 2 do 3 dana nakon enukleacije uklanjaju procesom autofagije. Do sada je najbolje objašnjen proces selektivnog uklanjanja mitohondrija tijekom terminalne eritropoeze, a nedvojbenu ulogu u ovom procesu ima receptor selektivne autofagije, protein NIX (102,103).

U stanicama eritroidne loze, tijekom završnog sazrijevanja retikulocita protein NIX je prekomjerno izražen (152), a to je povezano s nizom molekularnih događaja koji prethode procesu mitofagije; smanjenjem potencijala mitohondrijskih membrana, stvaranjem autofagosoma te lipidaciji proteina LC3 i stvaranje lipidiranog oblika LC3-II. U retikulocitima $Nix^{-/-}$ miševa, pokazano je neučinkovito uklanjanje mitohondrija, što dovodi do zaustavljanja normalnog sazrijevanja eritrocita i razvoja anemije. Kod ovih miševa primijećeno je da se mitohondriji nakupljaju oko pravilno stvorenih autofagosoma, ali je inhibiran proces pakiranja mitohondrija u autofosome što predlaže da sam proces autofagije nije narušen i da zaista protein NIX ima ključnu ulogu u selektivnom uklanjanju mitohondrija u retikulocitima (102,103).

1.8. Uloga mitofagije u neurodegenerativnim bolestima i tumorima

S obzirom da je autofagija neophodan stanični proces važan za održavanje generalne homeostaze organizma, ne iznenađuje činjenica da su poremećaji procesa autofagije povezani s nastankom brojnih bolesti, od neurodegenerativnih bolesti, infekcija i upalnih bolesti (npr. Chronova bolest), dijabetesa, pretilosti, kardiovaskularnih i bolesti mišićnog sustava te tumora (153). Stoga je sve veći broj studija koje su usmjerene na proučavanje modulacije procesa autofagije kao obećavajuće strategije u terapiji ovih bolesti.

Oštećenje mitohondrija i neučinkovito uklanjanje istih karakteristična je pojava kod nekoliko neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove, Parkinsonove ili Huntingtonove

bolesti (154,155). Kao što je prethodno navedeno, mutacije gena Pink1 i Parkin povezane su s nasljednim oblikom Parkinsonove bolesti (156,157) uslijed čega dolazi do nakupljanja nefunkcionalnih mitohondrija u mozgu oboljelih. Osim toga, poremećena mitohondrijska dinamika i mitofagija primijećeni su i kod sporadičnog oblika Parkinsonove bolesti (158).

Brojne studije su pokazale da je razvoj Alzheimerove bolesti također povezan s poremećajem mitofagije (159). Na mišjem modelu bolesti, osim karakterističnog nakupljanja plakova proteina β -amiloida primijećena je povećana razina mRNA cijelog niza gena uključenih u regulaciju i proces mitofagije (160). Nadalje, abnormalnosti u samoj mitohondrijskoj strukturi primijećeni su kod pacijenata s Alzheimerovom bolesti (161). Plakovi β -amiloida imaju generalno citotoksičan efekt na stanicu, a posebno na mitohondrije za koje je ustanovljeno da su mjesto na kojima ovi plakovi imaju tendenciju nakupljanja (162). Iako postoji više teorija kako nakupljeni β -amiloidi remete mitohondrijsku funkciju i onemogućavaju uspješno uklanjanje nefunkcionalnih mitohondrija u neuronima pacijenta s Alzheimerovom bolesti, ipak je najprihvaćenije ono koje uključuje višestruko izravno remećenje mitohondrijske funkcije i strukture direktnim umetanjima amiloidnih prekursora u mitohondrijsku membranu (163).

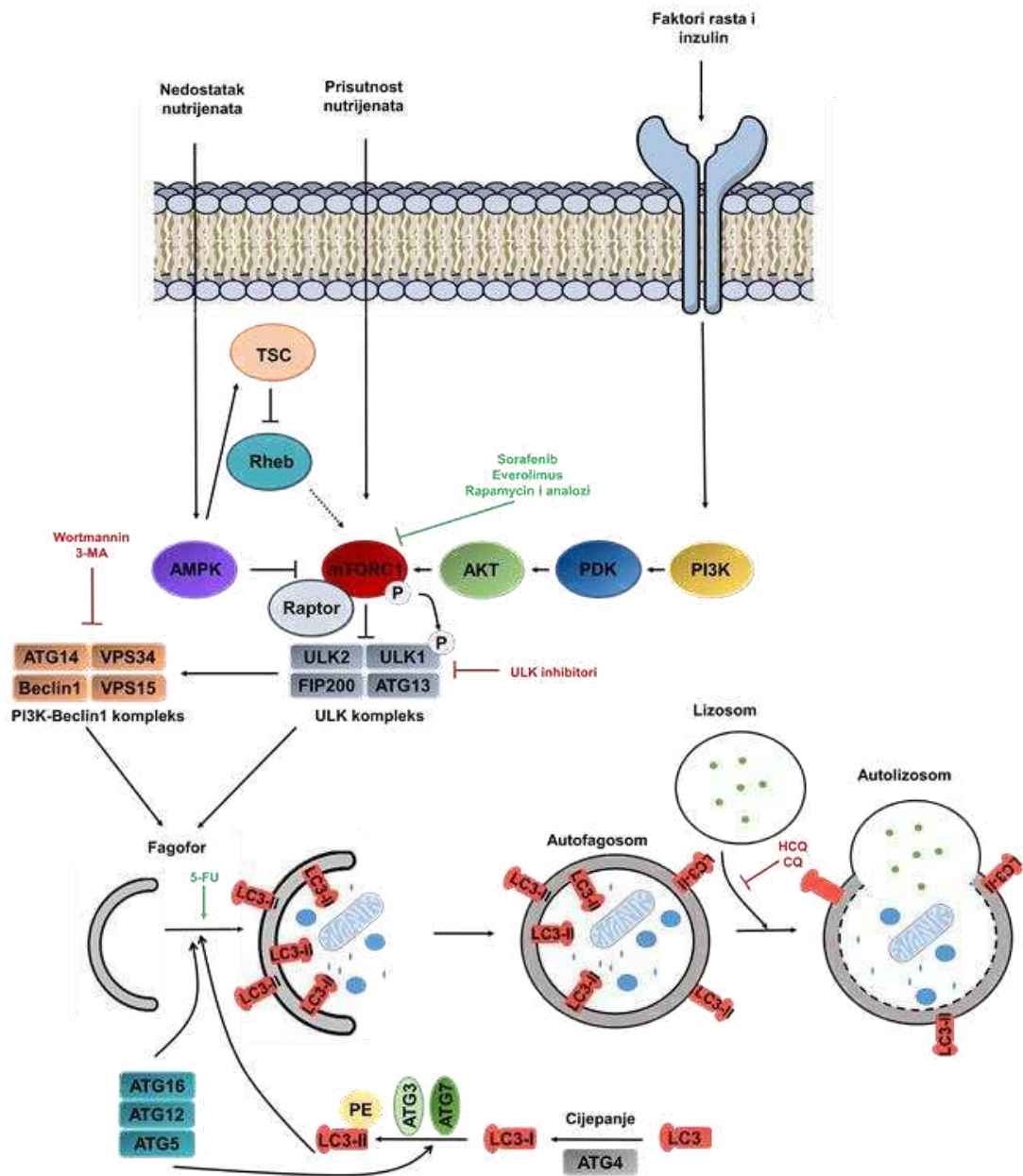
Dok su Alzheimerova i Parkinsonova bolest povezane s mutacijama nekoliko gena, Huntingtonova bolest je isključivo monogenska autosomno dominantna bolest uzrokovana ekspanzijom CAG trinukleotida u genu Huntingtin (Htt). Kod pacijenata s Huntingtonovom bolesti, kao i kod transgeničnog mišjeg modela za ovu bolest, primijećena je povezanost pojave mutiranog gena Htt i disfunkcije mitohondrija poput smanjenja membranskog potencijala mitohondrija, smanjene učinkovitosti funkcije kompleksa II, poremećenog unosa kalcija kao i mitohondrijske dinamike (smanjena mitohondrijska fuzija u odnosu na fiziju) te promjene u samoj ultrastrukturi mitohondrija (164,165). Točan mehanizam djelovanja mutiranog Huntingtina na mitohondrije i poremećeno uklanjanje oštećenih mitohondrija iz živčanih stanica još uvijek nije poznat iako mutirani HTT lako asocira s mitohondrijima (166) pa je njegova biokemijska funkcija najvjerojatnije u samoj regulaciji inicijacije mitofagije, tj. kontroli mitohondrijske fizije.

Poremećena autofagija je prvotno bila povezana s nastankom i progresijom pojedinih vrsta tumora (167). Autofagija zapravo ima dvojni ulogu u tumorigenezi i upravo je to glavni razlog, uz kompleksnost tumora, zašto je razvoj protutumorskih lijekova koji su temeljeni na modulaciji procesa autofagije, toliko zahtjevan. Tako je kod nekih tumora primijećena

povećana razina autofagije, dok je kod drugih razina autofagije značajno manja i ne prelazi onu bazalnu razinu. Njezina dvojna uloga očituje se u tome da u nekim vrstama tumora autofagija ima tumor-supresorsku ulogu, odnosno zaustavlja inicijaciju tumora, dok u nekim drugim vrstama tumora autofagija djeluje kao tumor-promotor odnosno doprinosi nastanku i napredovanju tumora na način da inhibira apoptozu tumorskih stanica (168,169).

Modulatori autofagije najčešće djeluju na molekule AMPK (prema engl. *AMP-activated protein kinase*) i mTOR u osnovnom signalnom putu autofagije (170). Ove molekule djeluju kao važni senzori staničnog stresa odnosno opskrbljenosti energijom i nutrijentima te se vjeruje da se modulacijom aktivnost ovih regulatornih molekula može spriječiti nastanak i razvoj pojedinih oblika tumora. Neki od modulatora autofagije, poput rapamicina (aktivator autofagije) i njegovih derivata temsirolimusa i everolimusa, već se primjenjuju kao kemoterapeutici. Tako je FDA, 2007. i 2009. godine, odobrila korištenje temsirolimusa i everolimusa u liječenju uznapredovanog raka bubrega (171,172), a od 2011. se everolimus koristi i kod progresivnog raka gušterače (173) te u liječenju pojedinih oblika raka dojke (174). Iako izgledaju kao obećavajuće protutumorske strategije, ovi modulatori autofagije poput rapamicina, klorokina ili hidroklorokina, prvenstveno nisu razvijeni u svrhu protutumorske terapije i najčešće se ne primjenjuju zasebno u terapiji već u kombinaciji s klasičnim oblicima liječenja poput raznih konvencionalnih kemoterapeutika ili radioterapijom. Pretkliničke studije pokazuju, da usprkos uvriježenom korištenju kombinirane terapije, monoterapija ovim modulatorima autofagije zapravo ima jako malo nuspojava u odnosu na klasičnu kombiniranu terapiju poput remisije tumora, metastaziranja, metaboličkih poremećaja ili infekcija. Nažalost, još uvijek nemamo dovoljno saznanja da li aktivacija ili inaktivacija autofagije ovim modulatorima utječe na druge signalne puteve u stanici i koje su posljedice toga (168,169).

Stoga, iako modulacija autofagije predstavlja izrazito dobru strategiju u protutumorskoj terapiji, zbog same heterogenosti i kompleksnosti tumora, ali i složenosti i još uvijek nedovoljne istraženosti procesa autofagije, dodatna istraživanja bazičnih procesa tumorigeneze i autofagije te razvoj novih modulatora i njihova implementacija u pretkliničke modele i kliničke studije je neophodna kako bi razumjeli i na koncu uspješno primijenili modulaciju autofagije u liječenju tumora, ali i drugih oboljenja (Slika 7).



Slika 7. Shematski pregled procesa autofagije i djelovanja modulatora autofagije. Aktivacija AMPK i inhibicija mTORC, uslijed nedostatka nutrijenta, dovodi do aktivacije kompleksa ULK. Aktivirani kompleks ULK fosforilira BECLIN1 i aktivaciju VPS34 te početak stvaranja autofagosoma. Aktivni kompleks ULK sastavljen je od proteina ULK1, ULK2, FIP200 i ATG13. VPS34, regulatorna podjedinica, VPS15 i BECLIN1 se vežu za dodatni regulatorni faktor ATG14 i stvaraju funkcionalni kompleks PI3K-BECLIN1. Aktivacija AMPK inhibira mTORC preko TSC/Rheb (prema engl. *tuberous sclerosis complex/Ras homolog enriched in brain*) signalnog puta. Niz proteina ATG sačinjavaju dva ubikvitinu-slična konjugacijska sustava i posreduju u nastanku lipidiranih LC3 proteina koji se ugrađuju u membranu fagofora. Konačno, izduženi fagofor se zatvara u vezikulu autofagosom koja se spaja s lizosomom što dovodi do razgradnje dopremljenog sadržaja i njegovog recikliranja. Modulatori autofagije, koji se trenutno primjenjuju, djeluju na nekoliko ključnih koraka u ovom signalnom putu: sorafenib, everolimus, rapamicin i analozi blokiraju kompleks mTORC i aktiviraju autofagiju, ULK inhibitori inhibiraju ULK i sprječavaju autofagiju, 3-MA (prema engl. *3-methyladenine*) i wortmanin blokiraju kompleks PI3K, 5-FU (prema engl. *5-fluorouracil*) pospješuje stvaranje autofagosoma, dok klorokin i hidrosiklorokin zaustavljaju autofagiju na kraju, blokirajući spajanje autofagosoma s lizosomom (preuzeto i doradeno prema (169)).

2. CILJEVI I HIPOTEZE

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj doktorske disertacije je objasniti molekularne mehanizme regulacije mitofagije posredovane receptorom NIX i to:

1. Mehanizam fosforilacije domene LIR proteina NIX
2. Mehanizam dimerizacije proteina NIX putem defosforilacije C-terminalnog kraja proteina NIX
3. Združeni mehanizam fosforilacije domene LIR i dimerizacije proteina NIX

HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Aktivacija mitofagije posredovane receptorom, NIX, regulirana je mehanizmima fosforilacije domene LIR i dimerizacijom proteina NIX koja je izravna posljedica defosforilacije C-terminalnog kraja receptora. Zajedno, oba mehanizma doprinose potpunoj aktivaciji receptora NIX, većoj regrutaciji autofagosomalne mašinerije na oštećene mitohondrije i konačno učinkovitijem uklanjanju mitohondrija procesom mitofagije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Osnovne kemikalije

2-propanol (Kemika)

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

4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma Aldrich)

Agar (Carl Roth)

Agarozna (Sigma Aldrich)

Akrični amid (AppliChem)

Albumin goveđeg seruma (BSA) (Carl Roth)

Amonijev persulfat (APS) (Sigma Aldrich)

Ampicilin (Carl Roth)

Aprotinin (Sigma Aldrich)

Bafilomicin A1 (Sigma Aldrich)

Bakto tripton (Fluka)

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

Brom fenol plavo (Kemika)

Cinkov klorid (Fluka)

Coomasie Brilliant Blue (Carl Roth)

Deoksi-nukleotid trifosfat (dNTP) (Invitrogen)

Dimetil sulfoksid (DMSO) (Carl Roth)

Ekstrakt kvasca (Fluka)

Etanol (Kemika)

Etidijev bromid (Sigma Aldrich)

Etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA) (Carl Roth)

Etilenglikol-bis (β -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraoctena kiselina (EGTA) (Carl Roth)

Fenilmetilsulfonilfluorid (PMSF) (Carl Roth)

Fenol crveno (Sigma Aldrich)

Fetalni goveđi serum (FBS) (GIBCO)

GFP-Trap kuglice (ChromoTek)

Glicerol (Kemika)

Glicin (Carl Roth)

Glutation sefarozne kuglice *Glutathione Sepharose 4B* (GE Healthcare Bio-Science AB)
Izopropanol (Kemika)
Izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) (Carl Roth)
Kalcijev klorid (Kemika)
Kalijev dihidrogenfosfat (Kemika)
Kalijev klorid (Kemika)
Kanamicin (Carl Roth)
Karbonil cijanid 3-klorofenilhidrazon (CCCP) (Sigma Aldrich)
Kobalt klorid (Sigma Aldrich)
Leupeptin (Sigma Aldrich)
Medij za uzgoj stanica u kulturi *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma Aldrich)
Metanol (Sigma Aldrich)
Mlijeko u prahu (Carl Roth)
MOPS (Carl Roth)
N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) (Carl Roth)
Natrijev acetat (Carl Roth)
Natrijev azid (Kemika)
Natrijev dodecil sulfat (SDS) (Carl Roth)
Natrijev fluorid (Fluka)
Natrijev hidrogenfosfat heptahidrat (Kemika)
Natrijev klorid (Kemika)
Natrijev ortovanadat (Sigma Aldrich)
Natrijev-deoksikolat (Sigma Aldrich)
Nitrocelulozna membrana (GE Healthcare)
NP-40 (Fluka)
Octena kiselina (Kemika)
Paraformaldehid (Sigma Aldrich)
Penicilin-streptomicin (GIBCO)
Piperazin-N, N'-bis(2-etansumporna kiselina) (PIPES) (Carl Roth)
Ponceau S (Carl Roth)
Saharoza (Kemika)

Transfekcijski reagens jetPrime (Polyplus)
Transfekcijski reagens Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen)
Trypsin-EDTA (PAA)
Trypton (Fluka)
Tris (Sigma Aldrich)
Triton-X-100 (Carl Roth)
Voda oslobođena od nukleaza (Invitrogen)
β-merkaptotanol (Fluka)

3.1.2. Aparati

Aparatura za elektroforezu *Mini Protean 3* (Bio-Rad)
Aparatura za horizontalnu elektroforezu (Bio-Rad)
Aparatura za izlivanje gelova (Bio-Rad)
Automatizirani brojač stanica *Countess™ II Automated Cell Counter* (Thermo Fisher Scientific)
Centrifuga *Biofuge primo R* (Heraeus)
Centrifuga *Heraeus Fresco 17 centrifuge* (Thermo Fisher Scientific)
Fluorescencijski mikroskop *Axiomager D1, Carl 165 Zeiss, Inc., (programski alat: AxioVision software version 4.4; Carl Zeiss, Inc.)* (Carl Zeiss)
Inkubator (GALLENKAMP)
Inkubator *Heraeus Hera Cell 150* (Thermo Fisher Scientific)
PCR uređaj *Arktik Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific)
Protočni citometar *BD Accuri 6 flow cytometer* (Beckman Coulter)
Sonikator SONOPULS HD 2200 (Bandelin)
Spektrofotometar *DU 530 Life Science UV/VIS Spectrophotometer* (BECKMAN COULTER)
Spektrofotometar *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific)
Sustav za prijenos proteina *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad)
Termoblok *Terma Shaker Incubator Thriller* (PREQLAB)
Uređaj za rotaciju uzoraka *General rotator STR4* (Stuart)
Uređaj za imunoblot detekciju *Chemi Doc XRS (programski alat: Image Lab™ 6.0.1)* (Bio Rad)
Uređaju za titracijsku kalorimetriju *VP-ITC microcalorimeter* (MicroCal Inc., MA, USA)

Vibracijska miješalica *BioVortex VI* (BIOSAN)

3.1.3. Puferske otopine

1X PBS napravljen iz 10X koncentrirane otopine (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 2.0 mM KH₂PO₄)

1X pufer za elektroforezu („*running buffer*“) pripremljen iz 10X koncentrirane otopine (250 mM Tris, 2 M glicin, 1% SDS u ddH₂O)

1X pufer za prijenos („*transfer buffer*“) pripremljen iz 10X koncentrirane otopine (250 mM Tris, 2 M glicin, 20% v/v metanol u ddH₂O)

1X TAE pufer pripremljen iz 50X koncentrirane otopine TAE pufera (2 M Tris, 5.7% ledene octene kiseline, 100 mM EDTA pH 8.0 u ddH₂O)

1X TBS pufer pripremljen iz 10X koncentrirane otopine (500 mM Tris, 1.5 M NaCl, pH 7.5 u ddH₂O)

2X pufer za nanošenje uzoraka (*Leamml sample buffer*) (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 5,6% SDS, 0,01% bromfenol plavo u ddH₂O)

4X Tris-HCl/SDS pufer za razdvajanje pH 8.8 (1.5 M Tris, 0.4% SDS u dH₂O)

4X Tris-HCl/SDS pufer za sabijanje pH 6.8 (0.5 M Tris, 0.4% SDS u dH₂O)

GST pufer 1 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.5 mM EGTA, pH 8.5, 150 mM NaCl u ddH₂O)

GST pufer 2 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100 u ddH₂O)

GST pufer 3 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5 u ddH₂O)

IBc buffer za izolaciju proteina mitohondrijske frakcije pH 7,4 (0.1 M MOPS/Tris, 0.1 M EGTA/Tris, 1 M saharoza)

Modificirani RIPA pufer pH 7,5 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1% Na- deoksikolat)

Pufer za blokiranje TBS-BSA pH 7.4 (5% BSA, 0.1% Na-azid, fenol crveno u sterilnom 1X TBS u ddH₂O)

Pufer za ispiranje membrana pH 7.4 (1X TBS, 0.05% Tween u ddH₂O)

Pufer za lizu stanica pH 7.5 (50 mM HEPES, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 25mM NaF, 1% Triton x-100, 10 µM ZnCl₂ u ddH₂O)

Pufer za rekonstituciju LC3 proteina i NIX peptida pH 7.0 (40 mM Na₂HPO₄, 80 mM NaCl u ddH₂O)

RIPA pufer pH 7,4 (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na- deoksikolat, 0.2% SDS, 25 mM Tris)

3.1.4. Osnovne otopine

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

Coomassie otopina (15% v/v etanol, 17% v/v octena kiselina, 0.25%v/v *Coomassie brilliant blue* u dH₂O)

Otopina za odbojavanje *Commassie* boje (20% v/v metanol, 10% v/v octena kiselina u dH₂O)

Otopina CaCl₂ pH 7.0 (60 mM CaCl₂, 15 % glicerol, 10 mM PIPES)

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

Otopina za fiksaciju i permeabilizaciju stanica (2%-tna otopine paraformaldehida uz dodatak 0.15% Triton X-100 napravljena u 1X PBS-u)

Ponceau S otopina (10% v/v koncentrirana octena kiselina, 0.5% v/v Ponceau S u dH₂O)

3.1.5. Bakterijske stanice

Escherichia coli soj **DH5a** korištene su za umnažanje plazmidne DNA

Escherichia coli soj **BL21** korištene su za proizvodnju GST fuzioniranih proteina

3.1.6. Stanične linije

U istraživanju su korištene dvije humane stanične linije:

HEK293 - humane embrionalne stanice bubrega

HeLa - stanice adenokarcinoma cerviksa maternice

Stanice su uzgajane u inkubatoru za uzgoj stanica u sterilnim uvjetima pri konstantnoj temperaturi od 37°C i 5% CO₂ u DMEM mediju uz dodatak 10% FBS i 1% otopine penicilina/streptomicina. Nakon postizanja gotovo potpune konfluentnosti, stanice su redovito pasažirane pomoću tripsina i presađivane na nove ploče za uzgoj stanica ili su pripremljene za postupak transfekcije i daljnjih postupaka.

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

Za uzgoj bakterija *E. coli* korištena je tekuća (1.0% bakto tripton, 0.5% ekstrakt kvasca, 0.5% NaCl) i kruta (1.0% bakto tripton, 0.5% ekstrakt kvasca, 0.5% NaCl, 0.5% agar) sterilizirana hranjiva podloga LB. U podlogu LB koja se koristila za selekciju transformiranih bakterija, ovisno o korištenom plazmidu, dodani su kanamicin konačne koncentracije 25 mg/ml (ako su bakterije transformirane plazmidom pEGFP-C1) i ampicilin konačne koncentracije 50 mg/ml (ako su bakterije transformirane plazmidima pGEX-4T1 ili pcDNA3.1(+)).

3.1.8. Kompleti

Kompleti za izolaciju i pročišćavanje plazmidne DNA:

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

Komplet za transfekciju *jetPRIME* (Polyplus)

Komplet za transfekciju Lipofectamine RNAiMax (Thermo Fisher Scientific)

Komplet za uklapanje *ProLong Antifade Kit* (Invitrogen)

Komplet za utišavanje endogenog proteina BNIP3L *ON-TARGETplus human BNIP3L (665) siRNA SMARTpool i ON-TARGETplus Non-targeting (Ctrl)* (Dharmacon, L-011815- 00-0005)

3.1.9. Protutijela

a) Primarna protutijela

Monoklonalno anti-Flag protutijelo proizvedeno u mišu (Sigma Aldrich, 1:1000)

Monoklonalno anti-GFP protutijelo proizvedeno u mišu (Roche, 1:1000)

Poliklonalno anti-GFP protutijelo proizvedeno u kuniću (Clontech, 1:1000)

Poliklonalno anti-TOMM20 protutijelo proizvedeno u kuniću (Santa Cruz Biotech, 1:1000)

Monoklonalno anti- β -ACTIN protutijelo proizvedeno u mišu (Sigma Aldrich, 1:5000)

Monoklonalno anti-GAPDH protutijelo proizvedeno u kuniću (Sigma Aldrich, 1:1000)

Monoklonalno anti-BNIP3L/NIX protutijelo proizvedeno u kuniću (Cell Signaling Technology, 1:1000)

b) Sekundarna protutijela

Anti-mišje IgG protutijelo proizvedeno u kozi konjugirano s HRP (Bio-Rad, 1:5000)

Anti-kuniće IgG protutijelo proizvedeno u kozi konjugirano s HRP (Dako, 1:5000)

Anti-mišje IgG protutijelo proizvedeno u magarcu konjugirano s Alexa Fluor488 (Thermo Fisher Scientific, 1:1000)

Anti-kuniće IgG protutijelo proizvedeno u magarcu konjugirano s Alexa Fluor488 (Thermo Fisher Scientific, 1:1000)

Anti-mišje IgG protutijelo proizvedeno u kozi konjugirano s Alexa Fluor568 (Thermo Fisher Scientific, 1:1000)

Anti-kuniće IgG protutijelo proizvedeno u kozi konjugirano s Alexa Fluor568 (Thermo Fisher Scientific, 1:1000)

3.1.10. Enzimi

DNaza (Koncentracija matične otopine 1 mg/ml)

DpnI restrikcijska endonukleaza, enzimske aktivnosti 10 u/μl, s pripadajućim *DpnI* puferom (Thermo Fisher Scientific)

PfuII polimeraza s pripadajućim 10X *PfuUltraII* puferom (Fermentas)

3.1.11. Biljezi

Proteinski biljezi

Precision plus protein TM dual color standards (Bio Rad)

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

DNA biljeg

1 kb DNA Step Ladder (Promega)

3.1.12. Plazmidi korišteni u studiji

Tablica 1. Plazmidi i njihove karakteristike korišteni u studiji fosforilacije domene LIR proteina NIX

Vektor/Plazmid	Opis	Izvor
pEGFP-C1/NIX WT	GFP obilježeni humani NIX	Novak i sur., 2010.
pEGFP-C1/NIX W36A	GFP obilježeni humani NIX s mutiranim triptofanom 36 u alanin	Novak i sur., 2010.
pEGFP-C1/NIX S34,35A	GFP obilježeni humani NIX s mutiranim serinima 34 i 35 u alanin	Ova studija
pEGFP-C1/NIX S34,35D	GFP obilježeni humani NIX s mutiranim serinima 34 i 35 u asparaginsku kiselinu	Ova studija
pEGFP-C1/NIX S34,35E	GFP obilježeni humani NIX s mutiranim serinima 34 i 35 u glutaminsku kiselinu	Ova studija
pcDNA3.1/Flag-Nix Wt	Flag obilježeni mišji Nix	Novak i sur., 2010
pcDNA3.1/Flag-Nix W35A	Flag obilježeni mišji Nix s mutiranim triptofanom 35 u alanin	Novak i sur., 2010
pcDNA3.1/Flag-Nix S33,34A	Flag obilježeni mišji Nix s mutiranim serinima 33 i 34 u alanin	Ova studija
pcDNA3.1/Flag-Nix S33,34D	Flag obilježeni mišji Nix s mutiranim serinima 33 i 34 u asparaginsku kiselinu	Ova studija
pcDNA3.1/Flag-Nix S33,34E	Flag obilježeni mišji Nix s mutiranim serinima 33 i 34 u glutaminsku kiselinu	Ova studija
pcDNA3.1/Flag-Nix S33A	Flag obilježeni mišji Nix s mutiranim serinom 33 u alanin	Ova studija
pcDNA3.1/Flag-Nix S33D	Flag obilježeni mišji Nix s mutiranim serinom 33 u asparaginsku kiselinu	Ova studija
pcDNA3.1/Flag-Nix S33E	Flag obilježeni mišji Nix s mutiranim serinom 33 u glutaminsku kiselinu	Ova studija
pcDNA3.1/Flag-Nix S34A	Flag obilježeni mišji Nix s mutiranim serinom 34 u alanin	Ova studija
pcDNA3.1/Flag-Nix S34D	Flag obilježeni mišji Nix s mutiranim serinom 34 u asparaginsku kiselinu	Ova studija
pcDNA3.1/Flag-Nix S34E	Flag obilježeni mišji Nix s mutiranim serinom 34 u glutaminsku kiselinu	Ova studija
pGEX-4T1/GST-LC3A	GST obilježeni LC3A protein	Kirkin i sur., 2009.
pGEX-4T1/GST-LC3B	GST obilježeni LC3B protein	Kirkin i sur., 2009.
pGEX-4T1/LC3B R10A	GST obilježeni LC3B protein s mutiranim argininom 10 u alanin	Ova studija
pGEX-4T1/LC3B R11A	GST obilježeni LC3B protein s mutiranim argininom 11 u alanin	Ova studija
pGEX-4T1/LC3B K49A	GST obilježeni LC3B protein s mutiranim lizinom 49 u alanin	Ova studija
pGEX-4T1/LC3B K51A	GST obilježeni LC3B protein s mutiranim lizinom 51 u alanin	Ova studija

Tablica 2. Plazmidi i njihove karakteristike korišteni u studiji NIX dimerizacije

Vektor/Plazmid	Opis	Izvor
pEGFP-C1/NIX	GFP obilježeni humani NIX	Ova studija
pEGFP-C1/NIX Δ LIR	GFP obilježeni humani NIX, Δ LIR (Δ WVEL)	Novak i sur., 2010
pEGFP-C1/NIX H197A	GFP obilježeni humani NIX, histidin 197 mutiran u alanin	Ova studija
pEGFP-C1/NIX A200L	GFP obilježeni humani NIX, alanin 200 mutiran u leucin	Ova studija
pEGFP-C1/NIX G202A	GFP obilježeni humani NIX, glicin 202 mutiran u alanin	Ova studija
pEGFP-C1/NIX G204A	GFP obilježeni humani NIX, glicin 204 mutiran u alanin	Ova studija
pEGFP-C1/NIX G208V	GFP obilježeni humani NIX, glicin 208 mutiran u valin	Ova studija
pEGFP-C1/NIX Δ TM	GFP obilježeni humani NIX, Δ TM (188-208)	Ova studija
pEGFP-C1/NIX S212A	GFP obilježeni humani NIX, serin 212 mutiran u alanin	Ova studija
pEGFP-C1/NIX S212E	GFP obilježeni humani NIX, serin 212 mutiran u glutaminsku kiselinu	Ova studija
pEGFP-C1/NIX S212 Stop	GFP obilježeni humani NIX, serin 212 mutiran u Stop kodon	Ova studija
pEGFP-C1/NIX T213A	GFP obilježeni humani NIX, treonin 213 mutiran u alanin	Ova studija
pEGFP-C1/NIX T213E	GFP obilježeni humani NIX, treonin 213 mutiran u glutaminsku kiselinu	Ova studija
pEGFP-C1/NIX S215A	GFP obilježeni humani NIX, serin 215 mutiran u alanin	Ova studija
pEGFP-C1/NIX S215E	GFP obilježeni humani NIX, serin 215 mutiran u glutaminsku kiselinu	Ova studija
pEGFP-C1/NIX S217A	GFP obilježeni humani NIX, serin 217 mutiran u alanin	Ova studija
pEGFP-C1/NIX S217E	GFP obilježeni humani NIX, serin 217 mutiran u glutaminsku kiselinu	Ova studija
pEGFP-C1/NIX T218A	GFP obilježeni humani NIX, treonin 218 mutiran u alanin	Ova studija
pEGFP-C1/NIX T218E	GFP obilježeni humani NIX, treonin 218 mutiran u glutaminsku kiselinu	Ova studija
pEGFP-C1/NIX Y219A	GFP obilježeni humani NIX, tirozin 219 mutiran u alanin	Ova studija
pEGFP-C1/NIX Y219E	GFP obilježeni humani NIX, tirozin 219 mutiran u glutaminsku kiselinu	Ova studija
pEGFP-C1/NIX Δ LIR,G202A	GFP obilježeni humani NIX, Δ LIR (Δ WVEL), glicin 202 mutiran u alanin	Ova studija
pEGFP-C1/NIX Δ LIR,G204A	GFP obilježeni humani NIX, Δ LIR (Δ WVEL), glicin 204 mutiran u alanin	Ova studija
pEGFP-C1/NIX Δ LIR,S212A	GFP obilježeni humani NIX, Δ LIR (Δ WVEL), serin 212 mutiran u alanin	Ova studija

pEGFP-C1/NIX ΔLIR,S212E	GFP obilježeni humani NIX, ΔLIR (ΔWVEL), serin 212 mutiran u glutaminsku kiselinu	Ova studija
pEGFP-C1/NIX ΔC terminus	GFP obilježeni humani NIX, ΔC terminus (209-219)	Ova studija
pcDNA3.1/Flag-NIX	Flag obilježeni humani NIX	Novak i sur., 2010.
pcDNA3.1/Flag-NIXΔLIR	Flag obilježeni humani, ΔLIR (ΔWVEL)	Ova studija
pcDNA3.1/Flag-NIX G202A	Flag obilježeni humani, glicin 202 mutiran u alanin	Ova studija
pcDNA3.1/Flag-NIX G204A	Flag obilježeni humani, glicin 204 mutiran u alanin	Ova studija
pcDNA3.1/Flag-NIX S212A	Flag obilježeni humani, serin 212 mutiran u alanin	Ova studija
pcDNA3.1/Flag-NIX S212E	Flag obilježeni humani, serin 212 mutiran u glutaminsku kiselinu	Ova studija
pcDNA3.1/Flag-LC3	Flag obilježeni humani LC3	Kirkin i sur., 2009.
pGEX-4T-1/hLC3-A	GST obilježeni humani LC3-A	Kirkin i sur., 2009.
pGEX-4T-1/hLC3-B	GST obilježeni humani LC3-B	Kirkin i sur., 2009.
pGEX-4T-1/hGABARAP	GST obilježeni humani GABARAP	Kirkin i sur., 2009.
pGEX-4T-1/hGABARAP-L1	GST obilježeni humani GABARAP-L1	Kirkin i sur., 2009.
pGEX-4T-1/hGABARAP-L2	GST obilježeni humani GABARAP-L2	Kirkin i sur., 2009.
pEGFP-C1/BNIP3	GFP obilježeni humani BNIP3	Ova studija
pEGFP-C1/BNIP3 H173A	GFP obilježeni humani BNIP3, histidin 173 mutiran u alanin	Ova studija
pEGFP-C1/BNIP3 H176L	GFP obilježeni humani BNIP3, histidin 176 mutiran u leucin	Ova studija
pEGFP-C1/BNIP3 G180A	GFP obilježeni humani BNIP3, glicin 180 mutiran u alanin	Ova studija

3.2. Metode

3.2.1. Priprema plazmidnih konstrukata za proučavanje fosforilacije i dimerizacije receptora NIX

Uvođenje ciljnih mutacija u plazmidnu DNA, napravljeno je prema protokolu detaljnije opisanom u (Ambriović-Ristov, 2007). Metodom mutageneze *in vitro* primjenom PCR-a napravljene su ciljane mutacije u dijelu proteina NIX ukloniranom u plazmidne vektore, pEGFP-C1 i pcDNA3.1(+), te na LC3B proteinu ukloniranom u pGEX-4T1 vektor. Sve mutante izražene s pEGFP-C1 plazmida na N-terminalnom kraju imaju fuzioniranu varijantu zelenog fluorescentnog proteina EGFP (prema engl. *enhanced green fluorescent protein*), a one izražene s pcDNA3.1(+) specifični aminokiselinski slijed od 8 aminokiselina (DYKDDDDK) tzv. Flag oznaku. LC3 i GABARAP proteini te mutante LC3B proteina izražene su s pGEX-4T1 plazmida i na N-terminalnom kraju imaju GST afinitetnu oznaku. U Tablicama 1 i 2 navedene su sve uvedene mutacije proteina korištene u studiji.

Sve oligonukleotidne početnice korištene u studiji su dizajnirane ručno prema ciljnoj mutaciji poštujući pravila o dizajnu početnica za mjesno specifičnu mutagenezu. Dizajnirane početnice naručene su i sintetizirane preko Microsynth servisa (Švicarska).

Za svaku ciljnu mutaciju napravljena je zasebna PCR reakcijska smjesa koja je sadržavala:

H ₂ O (oslobođena od nukleaza)	33,5 µl
10X <i>PfuUltra</i> II pufer (Fermentas)	5 µl
DNA kalup (10 ng/µl)	5 µl
dNTP mix (10 mM) (Invitrogen)	1 µl
5' početnica (10 pmol/µl) (Microsynth)	1 µl
3' početnica (10 pmol/µl) (Microsynth)	1 µl
5% DMSO	2,5 µl
<i>Pfu</i> II polimeraza (Fermentas)	<u>1 µl</u>
Ukupno	50 µl

Reakcije su provedene u *Arktik Thermal Cycler* (Thermo Scientific) PCR uređaju korištenjem navedenog protokola:

1. 95°C 3 min (početna denaturacija DNA kalupa)
2. 95°C 1 min (denaturacija DNA kalupa)
3. 58°C 1 min (vezanje početnica na kalup)
4. 68°C 12 min 30 sek (sinteza komplementarnih lanaca)
2.- 4. x 18 ciklusa
5. 68°C 12 min 30 sek (završno produživanje lanaca)
6. 4°C ∞

Ovisno o svojstvima početnica, temperatura vezanja početnica za kalup, prilagođavana je u rasponu od 56°C do 63°C. Uspješnost PCR reakcije određena je prisutnošću signala odgovarajuće veličine na 1%-tnom agaroznom gelu. Uklanjanje DNA kalupa iz produkta napravljeno je korištenjem restriktivne endonukleaze *Dpn* I u reakciji sastava: 44 µl PCR produkta, 5 µl *Dpn* I pufera i 1 µl *Dpn* I (10 units/µl) enzima pri uvjetima inkubacije od 1 h na 37°C. Prije same potvrde ispravnosti uvedenih mutacija (postupka sekvenciranja) plazmidna DNA umnožena je u većoj količini. Za postupak umnažanja plazmidne DNA kompetentne *E.coli* bakterije, soj DH5α, transformirane su odgovarajućim PCR produktima prema tzv. metodi toplinskog šoka opisanoj u (Ambriović-Ristov, 2007). Bakterije transformirane plazmidom pEGFP-C1 nacijspljene su na LB hranjivu podlogu s kanamicinom, a one transformirane plazmidima pcDNA3.1(+) i pGEX-4T1 na podlogu s ampicilinom.

Transformirane bakterije korištene su za umnažanje plazmidne DNA u svrhu određivanja primarne strukture DNA (sekvenciranje) ili za daljnju transfekciju stanica u kulturi. Za izdvajanje plazmidne DNA iz bakterija korištena su dva komercijalno dostupna kompleta: *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) i *QIAfilter Plasmid Purification Kit (Midi)* (QIAGEN), a postupci izolacije napravljeni su slijedeći upute proizvođača. Količina i kakvoća izdvojene plazmidne DNA (pomoću oba kompleta) određena je mjerenjem apsorbancije pri 260 nm i 280 nm na NanoDrop 1000 spektrofotometru. Izolirana plazmidna DNA razrijeđena je na konačnu koncentraciju od 80 ng/µl za provjeru ispravnosti uvedenih mutacija ili na radnu koncentraciju od 1 µg/µl za transfekciju stanica u kulturi.

Za provjeru ispravnosti uvedenih mutacija napravljeno je sekvenciranje izolirane plazmidne DNA. Pripremljena DNA poslana je na sekvenciranje (Microsynth, Švicarska) koje je napravljeno koristeći prethodno odabrane početnice iz standardne Microsynth baze početnica. Za sekvenciranje mutanti uvedenih u pEGFP-C1 plazmid korištena je početnica EGFP-C-for čiji je nukleotidni slijed 5' GTCCTGCTGGAGTTCGTG 3', za pcDNA 3.1.(+) početnica T7 slijeda 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' i za pGEX-4T1 početnica pGEX Fwd 5'GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG 3'. Dobivene sekvence su analizirane i uspoređene s nukleotidnim sekvencama divljeg tipa proteina u kojem su napravljene mutacije kako bi se provjerila uspješnost uvođenja mutacija.

3.2.2. Imunoblot detekcija proteina i GST pull down analiza

GST pull down metoda je korištena za dokazivanje potencijalnih interakcija između mitohondrijskog proteina NIX, njegovih mutanti i proteina na membrani autofagosoma LC3A, LC3B, GABARAP-L1 i GABARAP-L2. Također, u dijelu koji proučava mehanizam fosforilacije LIR domene, pull down je korišten za dokazivanje vezanja mutiranih LC3B proteina i različitih fosforiliranih/nefosforiliranih oblika proteina NIX. Pri tome su autofagosomalni proteini LC3A, LC3B, GABARAP-L1 i GABARAP-L2 označeni enzimom glutation S-transferazom (GST) veličine ~26 kDa te imobilizirani na glutation-sefarozne kuglice, dok se GFP-NIX fuzijski proteini nalaze u ukupnom lizatu stanica koje ih prekomjerno izražavaju. Proizvodnja i pročišćavanje GST fuzijskih proteina napravljeni su prema postupcima detaljno opisanim u (Ambriović-Ristov, 2007).

Ukratko, za izradu GST-fuzijskih proteina imobiliziranih na glutation sefarozne kuglice korišteni su plazmidi pGEX-4T1, koji sadrže uklonirane nukleotidne sekvence proteina LC3A, LC3B, GABARAP-L1 i GABARAP-L2. Bakterije *E.coli*, soj BL21, transformirane su navedenim plazmidima (175). S obzirom da je promotor GST fuzijskog proteina IPTG inducibilan, indukcija proizvodnje GST fuzijskih proteina postignuta je djelovanjem induktora IPTG (izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid) do konačne koncentracije 0.5 mM u trajanju od 4h.

Nakon indukcije bakterijska kultura lizirana je u GST puferu 1 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.5 mM EGTA, pH 8.5, 150 mM NaCl u ddH₂O) uz dodatak 1 mM PMSF i 0.1% β -merkaptioetanol i dodatno sonicirana.

GST fuzionirani proteini vezani su za prethodno pročišćene glutation sefarozne kuglice (GE Healthcare) te su nakon serije ispiranja (u GST puferu 2 sastava (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100 u ddH₂O) uz dodatak 1 mM PMSF i 0.1% β -merkaptioetanol) pročišćene kuglice rekonstituirane u GST puferu 3 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5 u ddH₂O) uz dodatak 0.1% β -merkaptioetanol i 0.1% NaN₃ te konačno analizirane elektroforezom u 10%-tnom poliakrilamidnom gelu kako bi bio određen najprikladniji volumen glutation sefaroznih kuglica pogodan za GST pull down analizu.

Nakon elektroforetskog razdvajanja, gelovi su inkubirani u Coomassie otopini, a potom u otopini za odbojavanje (20% v/v metanol, 10% v/v octena kiselina u dH₂O) kako bi se odredile količine glutation sefaroznih kuglica za GST pull down analizu.

Za prekomjerni izražaj NIX mutanti 10⁶ HEK293 stanica transfecirano je s 1 μ g GFP-NIX/Flag-NIX plazmidne DNA pomoću *jetPRIME* kompleta (Polyplus) prema uputama

proizvođača. Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije stanice su lizirane u puferu za lizu stanica (50 mM HEPES, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 25mM NaF, 1% Triton x-100, 10 μ M ZnCl₂ u ddH₂O, pH 7.5) s dodanim proteaznim inhibitorima (PMSF, leupeptin, aprotinin, natrijev ortovanadat) te DNaz-om. Udio od 20% ukupnog staničnog lizata inkubiran je s prethodno određenom količinom glutation sefarnih kuglica koje sadrže vezane GST fuzijske proteine, a nakon inkubacije i serije ispiranja kuglica, vezani proteini otopljeni su u 2X puferu za nanošenje uzoraka, denaturirani na temperaturi od 95°C i analizirani elektroforezom u 12% poliakrilamidnom gelu u 1X puferu za elektroforezu. 10% ukupnog staničnog lizata korišteno je za provjeru staničnog izražaja svih uzoraka. Nakon razdvajanja proteina u poliakrilamidnom gelu napravljen je prijenos proteina na nitroceluloznu membranu u 1X puferu za prijenos proteina na membranu (250 mM Tris, 2 M glicin, 20% v/v metanol u ddH₂O). Konačno, detekcija ciljnih proteina izvršena je aplikacijom specifičnih primarnih protutijela razrijeđenih u TBS-BSA puferu (5% BSA, 0.1% Na-azid, fenol crveno u sterilnom 1X TBS, pH 7.4 u ddH₂O) te odgovarajućih sekundarnih protutijela razrijeđenih u 5%-tnoj otopini mlijeka u prahu. S obzirom da su sekundarna protutijela konjugirana HRP (prema engl. *horseradish peroxidase*) enzimom, napravljena je kemiluminiscencijska detekcija proteina u uređaju za imunoblot detekciju *Chemi Doc XRS* (programski alat: *Image LabTM 6.0.1*) (Bio Rad).

3.2.3. Izotermalna titracijska kalorimetrija (prema engl. *Isothermal Titration Calorimetry, ITC*)

Eksperiment izotermalne titracijske kalorimetrije napravljen je u laboratoriju prof. Vladimira V. Rogova (Institute of Biophysical Chemistry and Center for Biomolecular Magnetic Resonance, Goethe University, D-60438, Frankfurt, Germany). Izotermalna titracijska kalorimetrija je kvantitativna biofizička metoda kojom se određuju termodinamički parametri interakcija molekula u otopini. U ovoj studiji izotermalna titracijska kalorimetrija provedena je na uređaju za titracijsku kalorimetriju VP-ITC microcalorimeter (MicroCal Inc., MA, USA) pri konstantnoj temperaturi od 25°C. LC3B protein pročišćen je i pripremljen prema prethodno opisanim protokolima (176,177). Kreirani peptid NIX s nefosforiliranom domenom LIR P0: AGLN**SSW**VELPMN**SSNG** i oligopeptid s dvostrukom fosforilacijom serina uzvodno od domene LIR receptora NIX P2; AGLN**pSp**SWVELPMN**SSNG** naručeni su od GenScript USA Inc (N.J., USA). Sintetizirani oligopeptidi korišteni su u eksperimentu izotermalne

titracijske kalorimetrije za određivanje jačine vezanja autofagosomalnog proteina LC3B. Prije provođenja eksperimenta proteini i peptidi su rekonstituirani u puferu koji sadrži 40 mM Na₂HPO₄, 80 mM NaCl, pH 7.0 uz dodatak koktela proteaznih inhibitora. Dobiveni podaci analizirani su u ITC-Origin 7.0 programu. Peptidi NIX koncentracije 0.31 mM korišteni su za titraciju LC3B proteina koncentracije 0.018 mM u seriji od 25 koraka. Koncentracije proteina i peptida prethodno su spektrofotometrijski određene.

3.2.4. Kristalografija

Kristalna struktura kompleksa NIX peptida s fosforiliranom domenom LIR i LC3B proteinom, NIX-LIR^{S34,35E}-LC3B²⁻¹¹⁹, napravljena je u suradnji s prof. Hironori Suzukijem (Structural Biology Research Center, Photon Factory, Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization (KEK), Tsukuba, Ibaraki, 305-0801, Japan) koristeći prethodno poznatu i uhodanu metodologiju (178).

3.2.5. Izolacija mitohondrijske frakcije

U svrhu potvrde lokalizacije proteina NIX i uvedenih mutanti na vanjskoj mitohondrijskoj membrani napravljena je izolacija proteina mitohondrijske frakcije. Kako bi bila dobivena dovoljna količina mitohondrija, stanice HEK293 su uzgojene u 10 cm posudama za uzgoj stanica. Kada su postigle optimalnu gustoću za transfekciju od oko 60%, stanice su transfecirane GFP-NIX WT ili mutantama NIX proteina. Korišteno je 5 µg plazmidne DNA za svaku mutantu. Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije, stanice su odlijepljene i isprane u 5 ml 1X PBS pufera, prebačene u Falcon tube i centrifugirane 20 min, 600x g, 4°C. Dalje je pelet homogeniziran u 2 ml IBC pufera (0.1 M MOPS/Tris, 0.1 M EGTA/Tris, 1 M saharoza, pH 7,4) koristeći stakleni homogenizator do pojave jednolične suspenzije (oko 50 puta povlačenjem tučka homogenizatora). Svi koraci izolacije rađeni su na ledu kako bi se umanjilo djelovanje proteaza na proteine. Stanični homogenat centrifugiran je 20 min, 600x g, 4°C kako bi sedimentirali jezgre, stanični debris i zaostale netaknute stanice, a supernatant je dodatno centrifugiran 20 min, 7000x g, 4°C kako bi izdvojili mitohondrije (supernatant iz ovog koraka korišten je za detekciju citopazmatskih proteina). Konačno, pelet koji sadrži mitohondrije resuspendiran je u 200 µl IBC pufera nakon čega je ponovljen korak snažnog centrifugiranja 20 min, 7000x g, 4°C. Mitohondrijski pelet liziran je u modificiranom RIPA puferu (150 mM

NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-deoksikolat, 0.2% SDS, 25 mM Tris, pH 7,4) uz dodatak proteaznih inhibitora. Lizirani mitohondriji centrifugirani su 20 min, 16000x g, 4°C, a supernatant iz ovog koraka korišten je kao frakcija mitohondrijskih proteina.

3.2.6. Imunofluorescencijska analiza kolokalizacije proteina NIX i TOMM20

Za određivanje stanične lokalizacije mutanti proteina NIX napravljena je imunofluorescencijska analiza kolokalizacije GFP-NIX proteina i proteina vanjske mitohondrijske membrane TOMM20. U analizi lokalizacije mutanti proteina NIX korišteni su plazmidi GFP-NIX s uvedenim mutacijama i endogeni protein TOMM20. Količina od 0.2×10^6 HeLa stanica nasadena je na autoklavirane staklene pokrovnice promjera 12 mm i transfecirana s 0.5 µg plazmidne DNA koristeći *jetPRIME* komplet slijedeći upute proizvođača (Polyplus). Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije stanice su isprane u 1 ml 1X PBS-a te fiksirane i permeabilizirane 20 min u 2%-tnoj otopini paraformaldehida uz dodatak 0.15% 10%-tnog Triton X-100. Nakon serije ispiranja, uzorci su inkubirani preko noći na 4°C u 3%-tnoj otopini BSA kako bi kasnije smanjili nespecifično vezanje primarnog protutijela. Nakon blokiranja, stakalca sa stanicama su inkubirana u otopini primarnih protutijela specifičnih za GFP (mouse monoclonal anti- GFP, Roche), odnosno TOMM20 (rabbit polyclonal anti-TOMM20, Santa Cruz Biotechnology), razrijeđenih u otopini za blokiranje 1 h na njihovoj, a potom isprana u 1X PBS-u. Nakon ispiranja uzorci su inkubirani u otopini sekundarnih (Goat-anti-rabbit Alexa Fluor 568, Invitrogen i Donkey anti-mouse Alexa Fluor 488, Invitrogen) protutijela 30 min na njihovoj te konačno isprani u 1X PBS-u. Za vizualizaciju jezgara korištena je boja DAPI (0.5 µg/ml) kojom su stanice bile tretirane 30 sekundi nakon čega je slijedilo ispiranje u 1X PBS-u. Osušene pokrovnice, uklopljene su u medij za uklapanje pomoću *ProLong Antifade* kompleta (Invitrogen). Imunofluorescencijska detekcija napravljena je koristeći AxioImager (Carl Zeiss) fluorescentni mikroskop, a potvrda lokalizacije proteina NIX određena je preklapanjem zelenog (GFP) i crvenog (TOMM20) signala, odnosno prisustvom žute boje. U slučaju izostanka kolokalizacije, ova se dva signala vide odvojeno kao zasebni zeleni odnosno crveni signal.

3.2.7. Imunofluorescencijska analiza regrutacije autofagosoma na oštećene mitohondrije

Mitofagija inducirana djelovanjem depolarizatora mitohondrijske membrane CCCP-a, praćena je regrutacijom LC3A proteina autofagosoma na mitohondrije. Za praćenje mitofagije

0.2 x 10⁶ HeLa stanica je nasađeno na staklene pokrovnice promjera 18 i transfecirano smjesom koja sadrži 0.3 µg GFP-NIX i 0.3 µg Flag-LC3A plazmidne DNA koristeći *jetPRIME* komplet (Polyplus) prema uputama proizvođača. Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije stanice su podvrgnute djelovanju 10 µM CCCP-a u trajanju od 2 h kako bi se depolarizacijom mitohondrijske membrane potakla fragmentacija mitohondrija i konačno mitofagija.

Fiksacija, permeabilizacija, imuno fluorescencijska analiza proteina i uklapanje stanica napravljeni su prema postupku opisanom u prethodnom poglavlju. Korištena su primarna protutijela anti-FLAG monoklonoalno protutijelo proizvedeno u mišu (Sigma) i anti-GFP poliklonoalno protutijelo proizvedeno u kuniću (Clontech). Primijenjena sekundarna protutijela obilježena su fluorescencijskim bojama Alexa Fluor488 (Invitrogen) i Alexa Fluor568 (Invitrogen).

Imunofluorescencijska analiza napravljena je AxioImager (Carl Zeiss) fluorescentnim mikroskopom. Regrutacija autofagosoma na oštećene mitohondrije praćena je proteinima LC3A/LC3B koji se na mitohondrije regrutiraju kao točkasti signali. Kvantifikacija broja autofagosoma tj. LC3A/LC3B signala, napravljena je analizirajući 100 stanica dvostruko pozitivnih za GFP-NIX i Flag-LC3A/B za svaku od navedenih NIX mutanti i to u tri odvojena biološka i tehnička eksperimenta, a u obzir su uzeti samo jasni i pojedinačni signali. Konačno, aktivnost mitofagije prikazana je kao promjena broja autofagosoma izbrojenih u 100 stanica za svaki uzorak u odnosu na broj autofagosoma izbrojen za divlji tip.

3.2.8. Praćenje uklanjanja mitohondrija metodom protočne citometrije

Za praćenje napredovanja mitofagije odnosno učinkovitosti uklanjanja mitohondrija iz stanica, korištena je metoda protočne citometrije. Ukoliko ispitane mutante proteina NIX lokaliziraju u vanjskoj mitohondrijskoj membrani mogu se koristiti kao markeri mitohondrija i u svrhu proučavanja funkcionalne važnosti fosforilacije domene LIR ili dimerizacije proteina NIX na aktivnost mitofagije. Također, sve korištene mutante napravljene su u pEGFP-C1 plazmidu s prethodno kloniranim humanim proteinom NIX, stoga je moguće praćenjem intenziteta fluorescencije zelenog fluorescentnog proteina, pratiti mitohondrijsku populaciju u stanici odnosno njezino uklanjanje u uvjetima potaknute mitofagije. Kako bi se ispitalo utječe li fosforilacija domene LIR na učinkovitost progresije mitofagije odnosno na konačno uklanjanje mitohondrija iz stanice, potrebno je omogućiti uvjete regrutacije autofagosoma, pakiranje mitohondrija u autofagosom, fuziju lizosoma s autofagosomom i konačno razgradnju

mitohondrija u autofagolizozomu. S tim ciljem stanice HEK293 transfecirane su različitim GFP-NIX mutantama te nakon 24 h tretirane depolarizatorom mitohondrijske membrane, 10 μ M CCCP u trajanju od 24 h. Duljina tretmana dovoljna je da se dogodi progresija mitofagije i konačno uklanjanje mitohondrija iz stanice, a samo uklanjanje mitohondrija može se pratiti padom intenziteta fluorescencije GFP signala kojim su obilježene sve NIX mutante za koje je prethodno imunofluorescencijskom mikroskopijom potvrđeno da se nalaze na vanjskoj mitohondrijskoj membrani. Količina od 10^6 HEK293 stanica transfecirana je transfekcijskom smjesom koja sadrži 1 μ g GFP-NIX plazmidne DNA (WT i određene mutante) koristeći *jetPRIME* komplet (Polyplus) prema uputama proizvođača. Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije, stanice su tretirane 10 μ M CCCP, 100 μ M CoCl_2 ili u kombinaciji s 100 nM Bafalomicinom A1 (Baf A1) u trajanju od 24 h. Nakon tretmana stanice su isprane u 1 ml 1X PBS-u, tripsinizirane i resuspendirane. Zaustavljanje djelovanja tripsina napravljeno je dodavanjem medija DMEM s 10% FBS-a. Uklanjanje staničnih nakupina napravljeno je dodatnim resuspendiranjem u 1X PBS-u i provlačenjem resuspendirane stanične suspenzije kroz 70 μ m filtere koji propuštaju samo pojedinačne stanice. Za daljnju analizu odvojeno je 10^6 stanica. Prije fiksacije, stanice su dva puta isprane u 1X PBS-u nakon čega su lagano centrifugirane 5 min, 500x g, na sobnoj temperaturi. Fiksiranje stanica napravljeno je u svježe pripremljenoj otopini 4% paraformaldehida u 1X PBS-u u trajanju od 10 min na sobnoj temperaturi nakon čega su stanice ponovno isprane dva puta u istim uvjetima i inkubirane u otopini propidijevog jodida (PI) kako bi fluorescentno vizualizirali mrtve stanice. Prije analize na protočnom citometru, stanice su ponovno isprane dva puta u po 1 ml 1X PBS-a. Za svaki uzorak analizirano je po 10^5 detektiranih signala¹ na *BD Accuri 6 flow cytometer* (Beckman Coulter) protočnom citometru. Srednja vrijednost intenziteta fluorescencije u FL1 (GFP) i FL2 (PI) kanalima je sakupljena za 10^5 signala za svaku GFP-NIX mutantu u nekoliko različitih tretmana (DMSO, CCCP, CCCP + Baf A1, CoCl_2 ili CoCl_2 + Baf A1). Dobiveni podaci analizirani su FlowLogic programskim alatom i to na način da su prvo odvojeni singleti (samo pojedinačne stanice) na FSC-A/FSC-H grafu te uklonjene PI pozitivne (mrtve) stanice. Rezultati su prikazani kao odnos promjene intenziteta fluorescencije u FL1 kanalu u odnosu na promjenu intenziteta fluorescencije u istome kanalu za divlji tip u DMSO tretmanu.

¹ Pod pojmom „signal“ u ovom slučaju podrazumijeva se bilo kakav laserom citometra detektiran događaj u uzorku (stanica, stanični debris, nakupina stanica itd.)

3.2.9. RNA interferencija

Utišavanje endogenog proteina NIX napravljeno je koristeći komercijalno dostupan set ON-TARGETplus human BNIP3L (665) siRNA SMARTpool (Dharmacon, L-011815-00-0005) ili ON-TARGETplus Non-targeting (Ctrl). Stanice su transfecirane s 40 nM siBNIP3L ili siCtrl koristeći transfekcijski reagens Lipofectamine RNAiMax (Thermo Fisher Scientific) prema uputama proizvođača. Četrdeset i osam sati nakon siRNA transfekcije, stanice su transfecirane plazmidnom DNA koristeći *jetPRIME* komplet za transfekciju prema prethodno opisanom postupku. Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije plazmidnom DNA, stanice su tretirane kemikalijama DMSO, CCCP ili CoCl_2 u naznačenim koncentracijama i vremenskom periodu. Nakon tretmana stanice su analizirane metodama imunofluorescencijske mikroskopije i protočne citometrije kako je prethodno opisano. Mala količina stanica također je uzeta za imunoblot detekciju kako bi se potvrdila uspješnost utišavanja endogenog NIX proteina i učinkovitost transfekcije.

3.2.10. Statistička analiza podataka

Za statističku analizu podataka korišten je programski alat *GraphPad Prism 8*, a svi statistički detalji izneseni su na slikama i u opisima slika. Student t-test korišten je za usporedbu vjerojatnosti statističke značajnosti prilikom usporedbe efikasnosti vezivanja LC3A proteina između NIX monomera i dimera u GST *pull down* analizi (n=3). Jednosmjerna (one-way) ANOVA s post hoc Turkey testom korištena je za usporedbu statističke razlike u regrutaciji autofagosoma na oštećene mitohondrije u stanicama koje prekomjerno izražavaju različite GFP-NIX proteine (n=3). Za statističku analizu rezultata protočne citometrije korištena je dvosmjerna (two-way) ANOVA s post hoc Turkey testom (n=3). Sve vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD) dobivena iz najmanje tri neovisna biološka i tehnička triplikata. *P = < 0.05, ** = P < 0.01, *** = P < 0.001, **** = P < 0.0001 uzete su kao vrijednosti statističke značajnosti, a oznakom ns (prema engl. *not significant*) označeni su rezultati među kojima nije potvrđena značajnost statističke razlike.

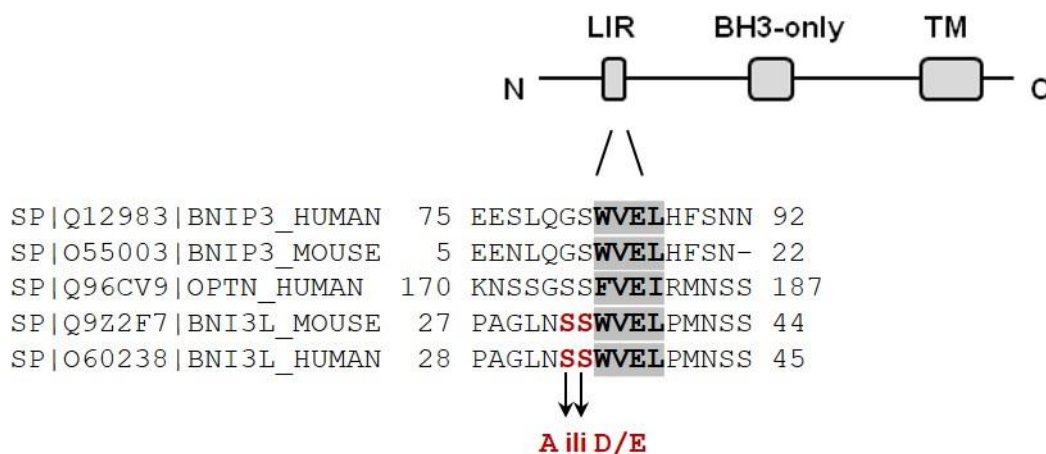
4. REZULTATI

4.1. Analiza fosforilacije domene LIR kao mehanizam regulacije aktivnosti receptora mitofagije proteina NIX

Prvi dio rezultata odnosi se na analizu fosforilacije serina 34 i 35 koji se nalaze uzvodno od domene LIR proteina NIX kao mogućeg novog mehanizma u regulaciji aktivnosti receptora selektivne autofagije, proteina NIX. U ovome dijelu napravljena je detaljna biofizička i biokemijska analiza interakcija fosforiliranog proteina NIX i proteina LC3B te je ispitana njihova funkcionalna važnost na staničnoj razini.

4.1.1. Kreiranje mutanti za ispitivanje mehanizma fosforilacije domene LIR i provjera njihove stanične lokalizacije imunofluorescencijskom mikroskopijom

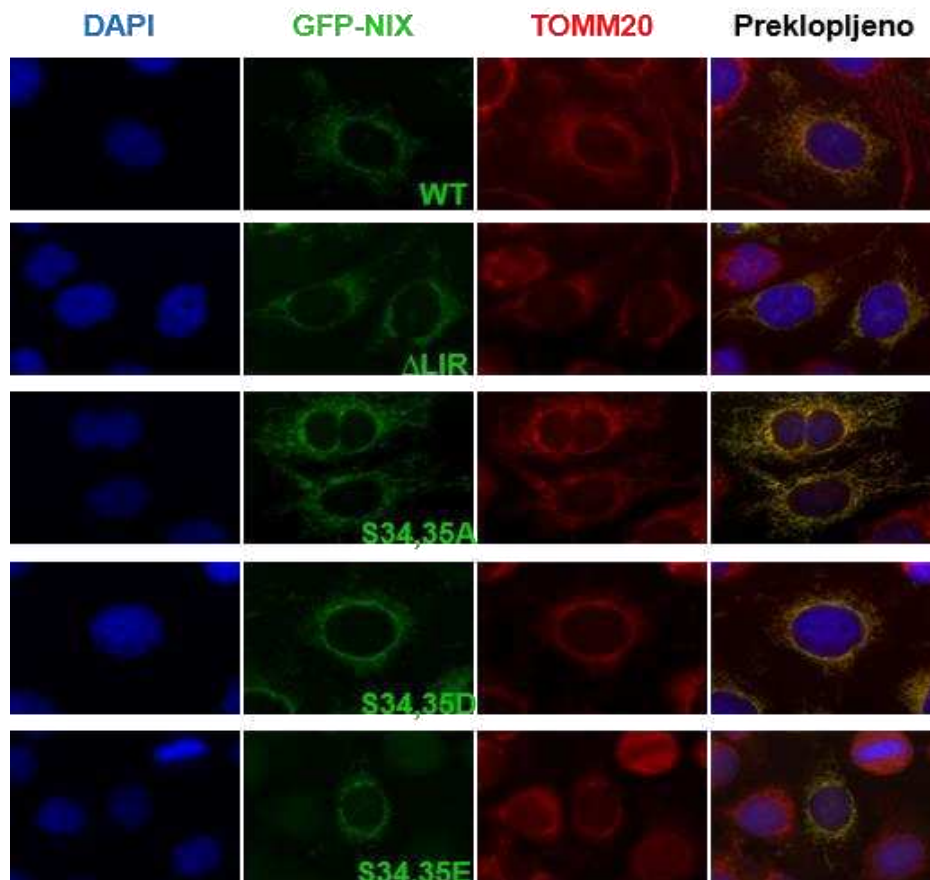
U svrhu ispitivanja moguće uloge fosforilacije serina uzvodno od domene LIR receptora NIX u aktivaciji mitofagije, kreirane su dvije vrste NIX mutanti: 1) mutante koje se ponašaju kao fosforilirana varijanta receptora, NIX S34D, NIX S34E i NIX S35D, NIX S35E (mutirani serinski ostaci na pozicijama 34 i 35 u glutaminsku ili asparaginsku kiselinu) i 2) mutante koje nemaju sposobnost fosforilacije, NIX S34A i NIX S35A (mutirani serinski ostaci na pozicijama 34 i 35 u alanin) (Slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz receptora NIX s istaknutom domenom LIR. U donjem dijelu slike prikazana je konzerviranost aminokiselinskog slijeda domene LIR receptora NIX i njegovog funkcionalnog homologa BNIP3 te proteina Optineurina (siva regija). Crvenom bojom označene su aminokiseline u humanoj i mišjoj sekvenci receptora NIX na kojima je napravljena zamjena aminokiselina u svrhu proučavanja mehanizma fosforilacije (pojedinačne ili dvostruke supstitucije S34 i S35 u A ili D/E).

Ciljanom mutagenozom *in vitro* napravljene su željene mutante receptora NIX u humanoj i mišjoj varijanti. Osim pojedinačnih zamjena aminokiselina (S34A, S35A, S34D,

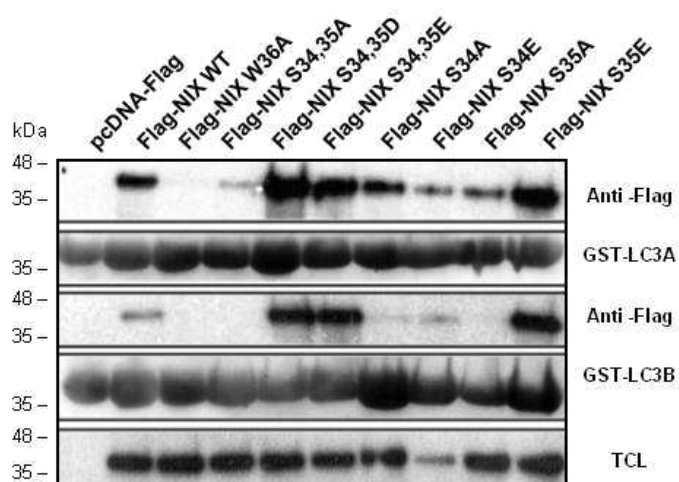
S35D, S34E, S35E) napravljene su i dvostruke mutante (S34,35A, S34,35D i S34,35E) kako bi se i na njima ispitaio učinak fosforilacije na jačinu vezivanja autofagosomalnih proteina i posljedično aktivnosti mitofagije. U tu svrhu ispitivanja remete li uvedene mutacije uzvodno od domene LIR normalnu lokalizaciju proteina NIX u vanjskoj mitohondrijskoj membrani, imunofluorescencijskom mikroskopijom provjerena je stanična lokalizacija NIX mutanti. Ovom metodom potvrđeno je da niti jedna uvedena mutacija ne remeti normalnu lokalizaciju receptora NIX te da sve mutante, uključujući i mutantu s potpuno uklonjenom domenom LIR, i dalje potpuno kolokaliziraju s proteinom TOMM20 koji se koristi kao marker vanjske mitohondrijske membrane (Slika 9).



Slika 9. Imunofluorescencijska detekcija lokalizacije NIX mutanti korištenih u proučavanju mehanizma fosforilacije domene LIR. GFP-NIX i njegove mutante (Δ LIR, S34,35A, S34,35E i S34,35D) prekomjerno su izraženi u HeLa stanicama (zeleno), a njihova lokalizacija u stanici određena je s obzirom na izražaj TOMM20 markera vanjske mitohondrijske membrane (crveno). Kolokalizacija proteina NIX i TOMM20 prikazana je žutom bojom u posljednjem stupcu (preklopljeno). Plavom bojom (DAPI) prikazana je stanična jezgra.

4.1.2. Detekcija interakcija LIR mutanti receptora NIX i LC3A/B proteina *pull down* analizom

Za ispitivanje fosforilacije serina, uzvodno od LIR domene receptora NIX, kao mogućeg mehanizma aktivacije receptora mitofagije, napravljena je *pull down* analiza kako bi pokazali utječe li fosforilacija serina uzvodno od domene LIR na sposobnost vezanja proteina LC3A/B. U GST *pull down* analizi korišteni su prethodno proizvedeni i pročišćeni GST fuzionirani proteini LC3A i LC3B (postupak proizvodnje i pročišćavanja detaljno je opisan u poglavlju *Materijali i metode*) i lizati stanica HEK293 s prekomjerno izraženim Flag-NIX mutantama (W36A, S34,35A, S34,35D, S34,35E, S34A, S34E, S35A i S35E). *Pull down* analizom pokazano je da NIX mutante koje nemaju mogućnost fosforilacije serina uzvodno od LIR domene (S34,35A, S34A i S35A) znatno slabije vezuju LC3A i LC3B u odnosu na mutante serina na istim aminokiselinskim pozicijama koje djeluju kao fosforilirani serini (S34,35D, S34,35E, S34D i S35E). Očekivano, NIX mutanta sa zamjenom triptofana u alanin, na poziciji 36, pokazala je potpunu odsutnost vezanja autofagosomalnih proteina. Zanimljivo, usporedbom jačine vezanja GST-LC3A i GST-LC3B u odnosu na dvostruke i pojedinačne serinske mutante receptora, uočeno je da dvostruke mutante (S34,35D i S34,35E) značajno jače vezuju LC3A i LC3B u odnosu na pojedinačne mutante (S34E i S35E) što sugerira da prisutnost dvostrukog negativnog naboja oko domene LIR doprinosi stvaranju stabilnijeg kompleksa NIX:LC3. Također, generalno gledano efekt vezanja proteina NIX i LC3B značajno je slabiji u odnosu vezanja NIX i LC3A (Slika 10).



Slika 10. Imunoblot detekcija interakcija proteina LC3A/LC3B i NIX mutanti s različitim obrascem i mogućnostima fosforilacije serina uzvodno od LIR domene (NIX WT, W36A, S34,35A, S34,35D, S34,35E, S34A, S34E, S35A i S35E). Ekspresija NIX mutanti korištena u *pull down* analizi prikazana je u zadnjem redu na slici kao ukupni stanični lizat, TCL (prema engl. *total cell lysate*).

4.1.3. Izotermalna titracijska kalorimetrija proteina LC3B i NIX P0/P2 peptida

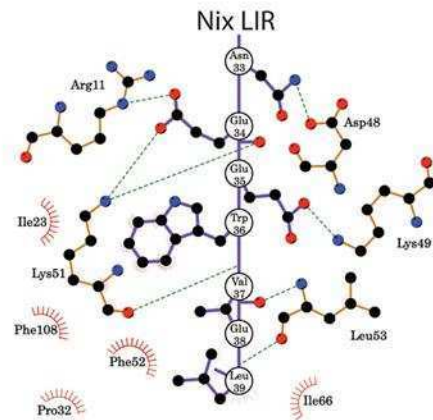
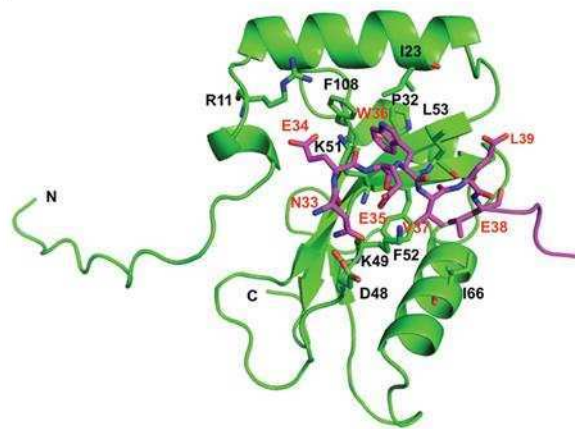
Nadalje, interakcije između fosforiliranog receptora NIX i LC3B proteina biofizički su opisane metodama izotermalne titracijske kalorimetrije i NMR analize. Sintetizirani oligopeptidi P0; AGLNSSWVELPMNSSNG i P2; AGLN pSp SWVELPMNSSNG korišteni su u eksperimentu izotermalne titracijske kalorimetrije za određivanje jačine vezanja autofagosomalnog proteina LC3B. Izotermalnom titracijskom kalorimetrijom pokazano je da fosforilirani NIX peptid (P2; AGLN pSp SWVELPMNSSNG) ima ~100 puta veći afinitet vezanja proteina LC3B u odnosu na nefosforilirani NIX peptid (P0; AGLNSSWVELPMNSSNG). Izmjerena K_D za P0 peptid je 99 μ M dok je K_D vrijednost za P2 peptid iznosila 0,83 μ M. Ovo pokazuje da fosforilirani serini uzvodno od domene LIR receptora NIX uzrokuju povećanje afiniteta vezanja u odnosu na nefosforilirani receptor NIX.

4.1.4. Kristalna struktura kompleksa fosforiliranog receptora NIX i proteina LC3B

Za daljnju karakterizaciju interakcija fosforiliranog NIX peptida i proteina LC3B, napravljena je kristalna struktura ovog kompleksa. U tu svrhu napravljen je kimerni konstrukt koji sadrži dvostruko fosforilirani NIX fragment od 12 aminokiselina oko domene LIR (PAGLN pSp SWVELP) C-terminalno fuzioniran za LC3B fragment (2-119 aminokiseline), NIX-LIR^{S34,35E}-LC3B²⁻¹¹⁹. Struktura kompleksa fosforilirani NIX:LC3B pokazuje postojanje dvije simetrične molekule kompleksa (molekula A i molekula B). Kod oba kompleksa u stvaranju interakcija sudjeluje isti dio fosforiliranog fragmenta receptora NIX; W36, V37 i L39, dok je aktivni dio LC3B fragmenta donekle sličan. Hidrofobni džep proteina LC3B u molekuli A sačinjavaju redom I23, P32, K49, K51, F52, L53, I66 i F108 dok je u molekuli B sastavljen od I23, K49, K51, F52, L53, L63, L66 i F108 (Slika 11).

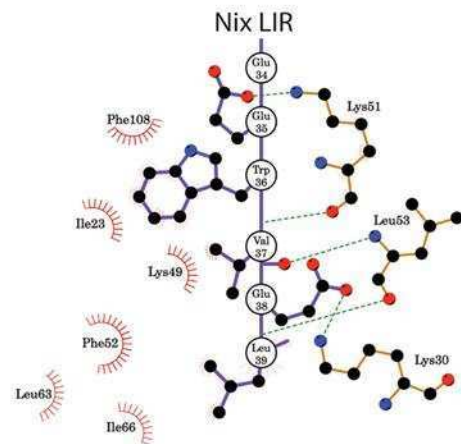
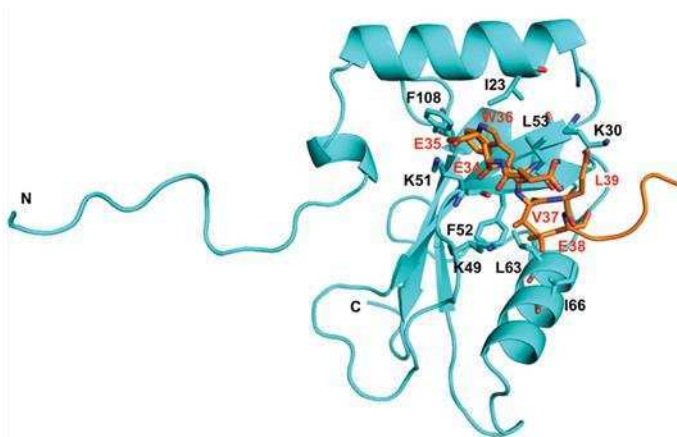
Molekula A

Kompleks NIX-LIR S34,35E-LC3B 2-119



Molekula B

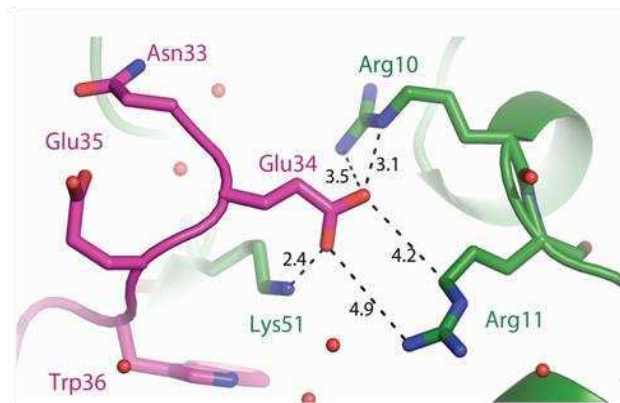
Kompleks NIX-LIR S34,35E-LC3B 2-119



Slika 11. Strukture NIX-LIR^{S34,35E}-LC3B²⁻¹¹⁹ molekula A i B. U simetričnim molekulama kompleksa LC3B fragment (2-119) prikazan je zelenom (molekula A) ili plavom bojom (molekula B), a fosforilirani fragment NIX (28-39) ljubičastom (molekula A) ili narančastom bojom (molekula B) (lijevo). Zorniji prikaz interakcija u NIX:LC3B kompleksu prikazan je na desnom modelu. Kisikovi atomi su prikazani crveno, a dušikovi plavom.

Prema kristalnoj strukturi kompleksa, bočni ogranak E34, fosforiliranog NIX fragmenta, sudjeluje u stvaranju interakcija s bočnim ograncima R10 i K51 proteina LC3B. Također, u neposrednoj blizini E34 je i R11 na proteinu LC3B pa je moguće da i njegov pozitivni bočni ogranak sudjeluje u stabilizaciji kompleksa. Na molekuli A dodatno se uočava

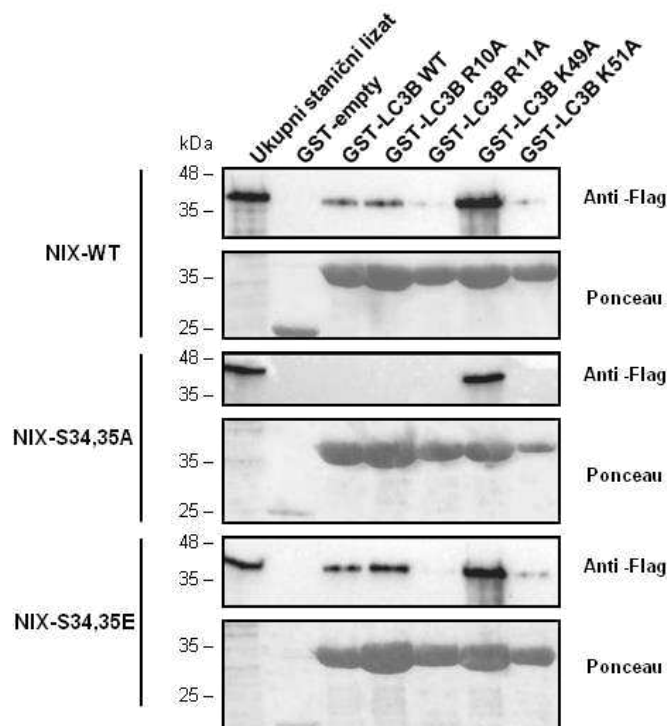
interakcija K49 LC3B fragmenta i E35 (Slike 11 i 12) te je ovaj aminokiselinski ostatak također uvršten u kasniju *pull down* analizu.



Slika 12. Detaljni strukturni prikaz interakcija u kompleksu NIX LIR:LC3B. Fosforilirani NIX fragment kompleksa prikazan je ružičastom, a LC3B dio zelenom bojom. Na prikazu su posebno naglašene interakcije između E34 (NIX) i R10, R11 i K51 (LC3B) (isprekidane crne linije) te udaljenosti između atoma bočnih ogranaka (Å).

4.1.5. GST *pull down* analiza interakcija kompleksa fosforiliranog receptora NIX i LC3B proteina

Prethodno opisane interakcije fosforiliranog receptora NIX i proteina LC3B dodatno su biokemijski opisane. U tu svrhu napravljene su mutante proteina LC3B onih aminokiselina koje su se pokazale važne za stvaranje stabilnog kompleksa: fosforilirani NIX:LC3B; GST-LC3B R10A, GST-LC3B R11A, GST-LC3B K49A i GST-LC3B K51A. Korištenjem staničnog lizata HEK293 stanica koje prekomjerno izražavaju NIX WT, NIX S34,35A i NIX S34,35E mutante napravljena je *pull down* analiza s pročišćenim GST-LC3B mutantama i ispitana sposobnost vezanja NIX mutanti. Očekivano, LC3B WT slabo veže NIX WT. Štoviše, LC3B WT uopće nije pokazao vezanje s NIX S34,35A, međutim pokazuje jaku interakciju s NIX S34,35E. Nadalje, mutacije pozitivno nabijenih aminokiselina R11 i K51 u alanin na proteinu LC3B, značajno smanjuju sposobnost vezanja NIX S34,34E u odnosu na divlji tip proteina LC3B, dok LC3B K49A mutanta pokazuje izrazito jako vezanje sa svim ispitanim varijantama proteina NIX: WT, S34,35A i S34,35E. Mutanta LC3B R10A nije pokazala značajnu promjenu u vezanju receptora NIX u odnosu na divlji tip iako se u biofizičkim analizama pokazala važnom (Slika 13).



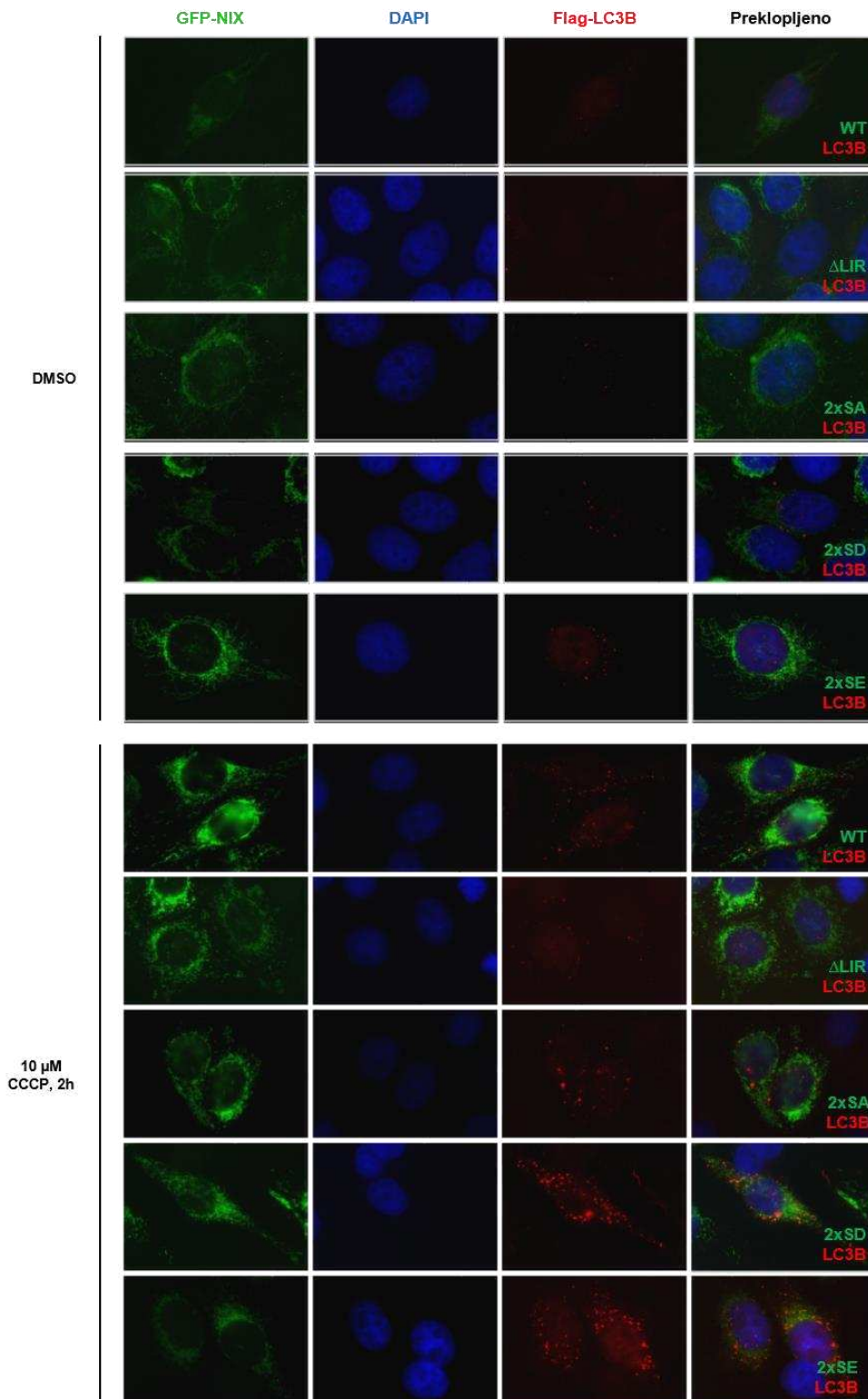
Slika 13. Imunoblot prikaz GST *pull down* analize za potvrdu važnosti aminokiselina R10, R11, K49 i K51 proteina LC3B u vezivanju receptora NIX s fosforiliranim serinima uzvodno od njegove domene LIR (S34 i S35).

4.1.6. Imunofluorescencijska detekcija utjecaja fosforilacije domene LIR na regrutaciju LC3 vezikula

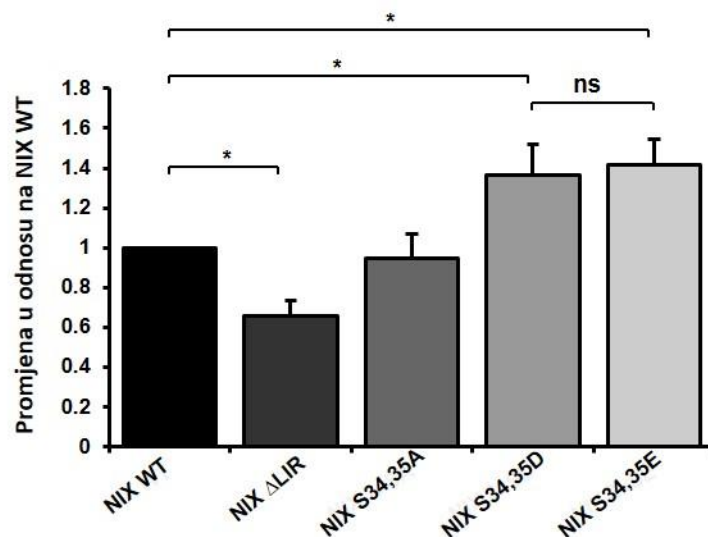
Konačno, efekt fosforilacije domene LIR receptora NIX na vezanje proteina LC3B, dobiven biofizičkim i biokemijskim metodama, ispitan je i na staničnoj razini. S obzirom da je pokazano da fosforilacija domene LIR doprinosi stvaranju novih međumolekulskih veza u kompleksu NIX:LC3B i da je biokemijski potvrđena važnost ovih interakcija za uspostavljanje stabilnosti kompleksa, cilj je pokazati doprinos fosforilacije domene LIR u regrutaciji autofagosoma na mitohondrije i posljedično uklanjanje mitohondrija iz stanice.

Utjecaj fosforilacije aminokiselina uzvodno od domene LIR receptora NIX na sposobnost regrutacije autofagosoma na oštećene mitohondrije ispitan je metodom imunofluorescencijske detekcije regrutacije proteina LC3B na mitohondrije podvrgnute CCCP tretmanu koji prekomjerno izražavaju različite LIR mutante proteina NIX. Rezultati kvantifikacije imunofluorescencijske mikroskopske analize pokazuju značajno veću regrutaciju autofagosoma (broja LC3B signala) u stanicama koje izražavaju NIX S34,35E i S34,35D mutante u odnosu na NIX WT i S34,35A. Očekivano, regrutacija autofagosoma najmanja je

kod NIX Δ LIR mutante i značajno se razlikuje od regrutacije autofagosoma u stanicama koje izražavaju ostale NIX mutante (Slike 14 i 15) što predlaže da bi fosforilacija serina uzvodno od domene LIR receptora NIX mogla biti mogući mehanizam regulacije aktivnosti receptora.



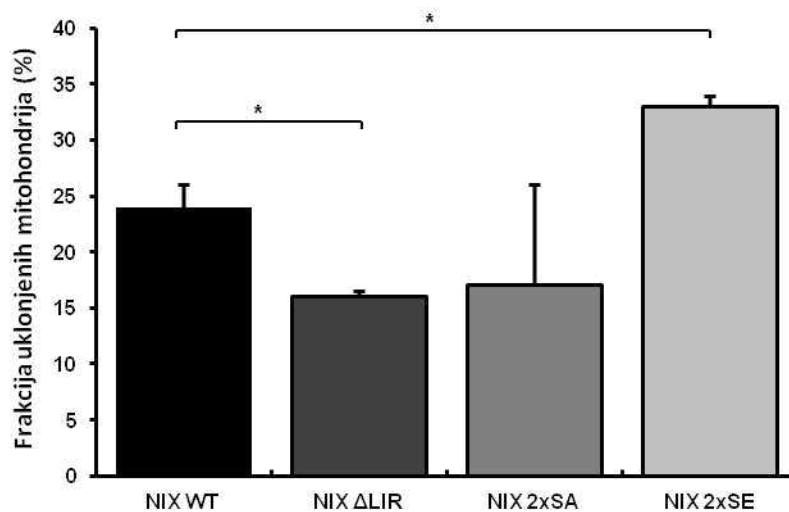
Slika 14. Analiza imunofluorescencijske mikroskopije regrutacije autofagosoma na mitohondrije u HeLa stanicama koje prekomjerno izražavaju GFP-NIX (WT, ΔLIR, S34,35A, S34,35E i S34,35D) (zeleno) i Flag-LC3B (točkasti crveni signal). Gornji dio slike: kontrolne stanice tretirane s DMSO, donji dio: stanice tretirane 10 μM kemikalijom CCCP u trajanju od 2 h.



Slika 15. Kvantifikacija autofagosoma u HeLa stanicama koje prekomjerno izražavaju GFP-NIX (WT, Δ LIR, S34,35A, S34,35E i S34,35D) proteine u uvjetima CCCP-inducirane mitofagije. Grafički prikaz relativnog broja autofagosoma u odnosu na broj autofagosoma u NIX WT stanicama sa standardnim devijacijama za biološke i tehničke triplicate. Statistička analiza provedena je *GraphPad Prism 8* alatom korištenjem *one way ANOVA* (*Tukey's multiple comparisons*) testa. Statistička značajnost: * $P < 0.05$; ns, nije značajno; intervali pogreške označavaju standardnu devijaciju, $n=3$.

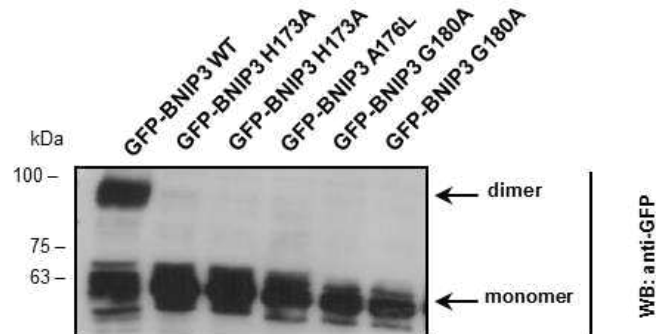
4.1.7. Analiza utjecaja fosforilacije domene LIR na učinkovitost uklanjanja mitohondrija metodom protočne citometrije

Dosadašnji rezultati potvrđuju da fosforilacija S34 i S35 uzvodno od domene LIR receptora NIX stabilizira kompleks NIX:LC3B i doprinosi jačoj regrutaciji autofagosoma na oštećene mitohondrije, dakle pospješuje proces inicijacije mitofagije. Metodom protočne citometrije ispitan je utjecaj fosforilacije domene LIR na učinkovitost progresije mitofagije odnosno na konačno uklanjanje mitohondrija iz stanice. Analizom intenziteta fluorescencije GFP signala, ustanovljeno je značajno smanjenje signala kod stanica transfeciranih GFP NIX S34,35E mutantom s obzirom na ostale promatrane mutante proteina. Kako GFP signal ujedno označava i količinu preostalih mitohondrija u stanici ovaj rezultat znači da je uklanjanje mitohondrija u stanicama koje prekomjerno izražavaju fosforilirani oblik receptora NIX učinkovitije nego kod onih koji imaju divlji tip proteina ili mutantu s potpuno uklonjenom domenom LIR (Slika 16).



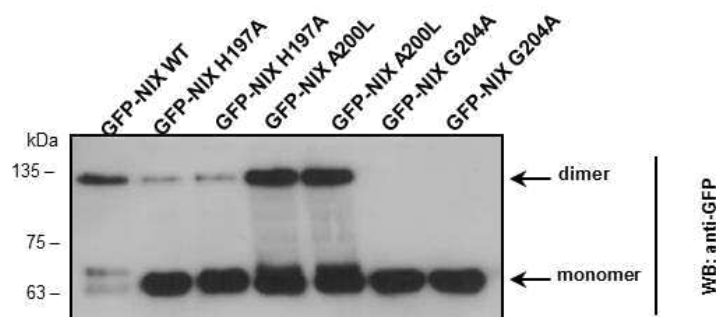
Slika 16. Grafički prikaz analize uklanjanja mitohondrija protočnom citometrijom. Analiza je provedena na stanicama koje prekomjerno izražavaju GFP-NIX WT, Δ LIR, S34,35A (2xSA) i S34,35E (2xSE) mutante nakon 24 h djelovanja 10 μ M CCCP. Rezultat je prikazan kao srednja vrijednost frakcije uklonjenih mitohondrija iz tri neovisna eksperimenta, u svakom konstrukt u odnosu na količinu mitohondrija u stanicama koje nisu bile podvrgnute CCCP tretmanu (DMSO). Statistička analiza provedena je *GraphPad Prism 8* alatom korištenjem *two way ANOVA (Tukey's multiple comparisons)* testa. Statistička značajnost: * $P < 0.05$; ns, nije značajno; intervali pogreške označavaju standardnu devijaciju, $n=3$.

Uistinu, sve ispitane BNIP3 TM mutante pokazuju odsutnost dimernog oblika proteina koja je uobičajeno prisutna kod BNIP3 WT ukazujući na važnost ovih aminokiselina u stvaranju BNIP3 dimera (Slika 18).



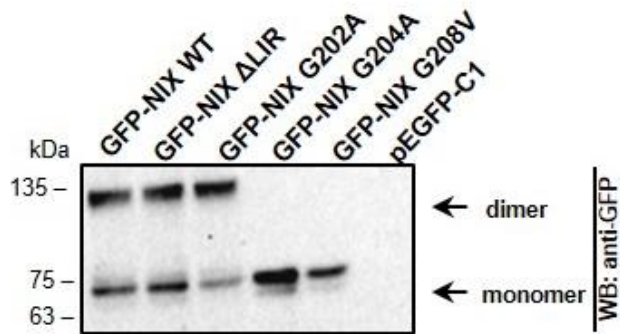
Slika 68. Analiza dimerizacije proteina BNIP3 i njegovih TM mutanti imunoblotom. Izražaj GFP-BNIP3 (WT, H173A, A176L i G180A) ispitan je korištenjem anti-GFP protutijela.

Analizom odgovarajućih NIX mutanti dobiveni su nešto drugačiji rezultati. Mutante NIX H197A i A200L, koje su se kod proteina BNIP3 pokazale važnima za dimerizaciju, u ovom su slučaju imaju isti obrazac dimerizacije kao i NIX WT. Suprotno, mutanta G204A, prva u pentapeptidnom GxxxG motivu, na imunoblotu prikazuje se isključivo kao monomer, što ukazuje na njezinu važnost u stvaranju dimerne strukture receptora NIX jer je minimalna aminokiselinska zamjena, dodatak samo jedne metilne skupine, rezultirao potpunim gubitkom dimera (Slika 19).



Slika 19. Analiza dimerizacije receptora NIX i njegovih TM mutanti imunoblotom. Izražaj GFP-NIX (WT, H197A, A200L i G204A) ispitan je korištenjem anti-GFP protutijelom.

Imajući na umu da je cijeli GxxxG motiv važan za dimerizaciju transmembranskih proteina, također je u analizu uključen i posljednji, G208. Prema Sulistijo ES i MacKenzie KR (2006), i ovaj je glicin važan za dimerizaciju proteina BNIP3 (G184 u proteinu BNIP3), međutim njegova aminokiselinska zamjena u alanin rezultira fenotipom kod kojeg se javlja i dimerni oblik proteina pa je zamjena napravljena u valin koji rezultira potpunim gubitkom dimerne forme (140). U analizu je uključena i G202A NIX mutanta jer je G202 zbog svoje blizine motivu GxxxG potencijalno važan u dimerizaciji. Imunoblot analiza ovih TM mutanti receptora NIX pokazala je da zamjena G202A ne pridonosi promjeni dimerizacijskog obrasca proteina te je u daljnjoj analizi ova mutanta, povremeno korištena kao dodatna kontrola za divlji tip receptora NIX. Nadalje, G208V se očekivano kao i G204A mutanta pojavljuje isključivo kao monomerni oblik što ukazuje da su oba krajnja glicina u motivu GxxxG ključna za stvaranje NIX dimera (Slika 20).

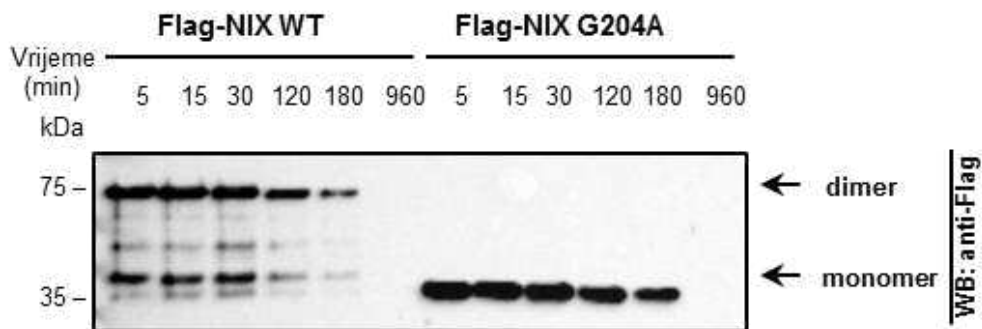


Slika 207. Analiza dimerizacije receptora NIX i njegovih mutanti imunoblotom. Izražaj GFP-NIX proteina (WT, ΔLIR, G202A, G204A i G208V) ispitan je korištenjem anti-GFP protutijelom.

4.2.2. Detekcija stabilnosti proteina NIX u denaturirajućim uvjetima imunoblot metodom

Poliakrilamidnom denaturirajućom gel elektroforezom pokazano je kako se protein BNIP3 dominantno javlja kao 60 kDa veliki dimer u odnosu na manje zastupljeni 30 kDa veliki monomer (138). Dimeri BNIP3 proteina izrazito su stabilni u denaturirajućim uvjetima iako njihova funkcionalna važnost do sada nije proučavana (179). Novak i sur. su u svojoj studiji iz 2010. pokazali sličan efekt kod receptora NIX koji je inače velik 24 kDa, ali je izražen i kao dvostruko veći 48 kDa protein što upućuje na mogući dimerizacijski oblik (104). Stabilnost NIX proteina dodatno je testirana u lizatima HEK293 stanica koje prekomjerno izražavaju Flag-NIX WT i Flag-NIX G204A mutantu bez dimerizacijske sposobnosti. Stanice su lizirane u

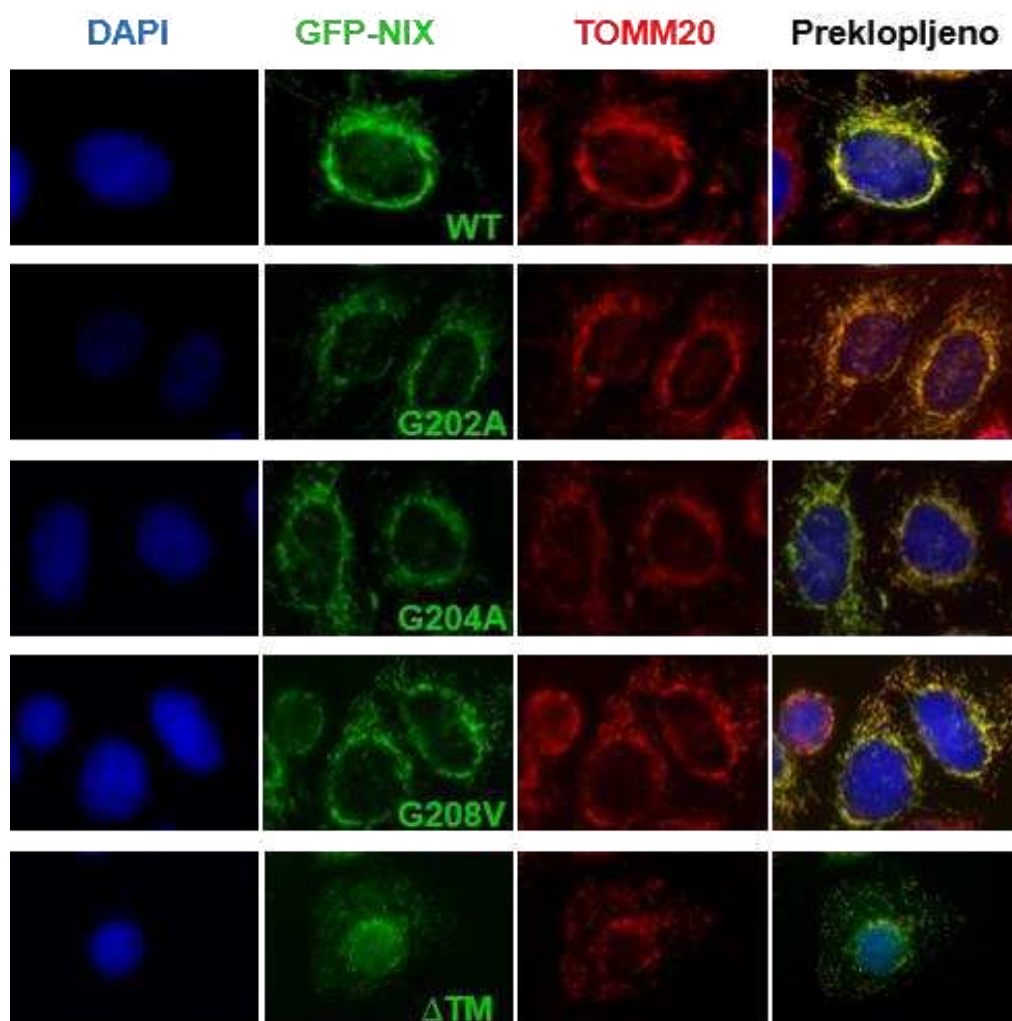
pufere s visokom koncentracijom detergenata (1% NP-40, 0.5% natrijev deoksikolat, 0.2% natrijev dodecil sulfat) i podvrgnute temperaturnoj denaturaciji (95°C) kroz različite vremenske periode kako bi se ispitala stabilnost receptora NIX. Analiza imunoblota pokazala je izrazitu temperaturnu i kemijsku stabilnost oba oblika receptora NIX, dimera i monomera, koji tek nakon više od 3 h izloženosti ekstremnim denaturirajućim uvjetima pokazuju nestabilnost, a njihova potpuna denaturacija uočena je tek nakon 12-satnog tretmana (Slika 21). Ovaj fenomen, izrazito stabilnog NIX proteina, pogotovo njegovog dimernog oblika u denaturirajućim uvjetima, sugerira njegovu funkcionalnu važnost.



Slika 21. Analiza stabilnosti receptora NIX u denaturirajućim uvjetima. Stabilnost NIX WT i G204A u uvjetima visoke koncentracije detergenata (1% NP-40, 0.5% natrijev deoksikolat, 0.2% natrijev dodecil sulfat) i navedenom vremenskom intervalu djelovanja visoke temperature (95°C). U analizi receptora NIX korišteno je anti-Flag protutijelo.

4.2.3. Detekcija lokalizacije TM dimerizacijskih NIX mutanti imunofluorescencijskom mikroskopijom i staničnim frakcioniranjem

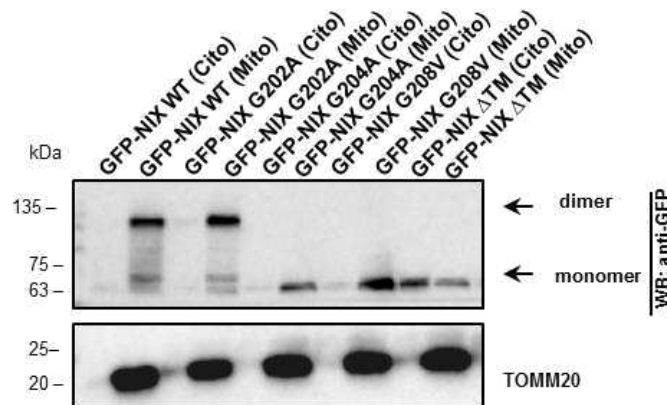
U svrhu provjere pravilne lokalizacije NIX mutanti, napravljena je analiza stanične lokalizacije WT, G202A, G204A, G208V i Δ TM NIX mutanti metodom imunofluorescencijske detekcije njihove stanične lokalizacije. GFP-NIX fuzionirani proteini prekomjerno su izraženi u HeLa stanicama, a njihova lokalizacija određena je u odnosu na kolokalizaciju s proteinom vanjske mitohondrijske membrane, TOMM20. Mutante GFP-NIX G202A, G204A i G208V, usprkos aminokiselinskoj zamjeni u TM domeni, i dalje u potpunosti kolokaliziraju s proteinom TOMM20, identično kao i NIX WT pa je zato u daljnjoj analizi moguće njihovo korištenje u proučavanju utjecaja dimerizacije na aktivnost mitofagije. Δ TM mutanta pokazala je gubitak normalne lokalizacije proteina NIX jer je nađena raspršena u citoplazmi (Slika 22).



Slika 22. Analiza lokalizacije NIX TM dimerizacijskih mutanti imunofluorescencijskom mikroskopijom. Jezgre su obojane DAPI bojom (plavo), GFP-NIX i označene mutante prikazane su zelenom, a TOMM20 crvenom bojom. Kolokalizacija NIX (zeleno) i TOMM20 (crveno) prikazana je na zadnjem dijelu slike žutom bojom.

Iako je imunofluorescencijskom mikroskopijom potvrđeno da odsustvo dimerizacije ne remeti pravilnu lokalizaciju TM mutanti, u svrhu proučavanja dimerizacije kao mogućeg mehanizma regulacije aktivnosti receptora mitofagije NIX, napravljen je eksperiment staničnog frakcioniranja s ciljem dodatne potvrde lokalizacije NIX TM mutanti u vanjskoj membrani mitohondrija. Imunoblot analizom, nakon odvajanja mitohondrijske i citoplazmatske frakcije HEK293 stanica koje prekomjerno izražavaju proteine GFP-NIX (WT, G202A, G204A, G208V i Δ TM), potvrđena je prisutnost svih pojedinačnih NIX TM mutanti isključivo u mitohondrijskoj frakciji (Slika 23). Također, u mitohondrijskoj frakciji u jednakoj mjeri su zastupljeni dimerni i monomerni oblici NIX proteina, jednako kao što je bio slučaj u analizi izražaja ukupnog staničnog lizata. U skladu s rezultatima imunofluorescencijske mikroskopije

NIX mutanti, i ova analiza je pokazala preferencijalnu lokalizaciju NIX Δ TM mutante u citoplazmi dok su ostale mutante pokazale mitohondrijsku lokalizaciju (Slika 23). Na kraju, korištenjem dviju metoda, imunofluorescencijske mikroskopije i staničnog frakcioniranja, potvrđeno je da gubitak dimerizacije receptora NIX ne utječe na promjenu njegove lokalizacije u stanici i da se neovisno o dimerizacijskim sposobnostima, navedene NIX TM mutante, G204A i G208V, dalje mogu analizirati u svrhu njihove mitofagijske aktivnosti.



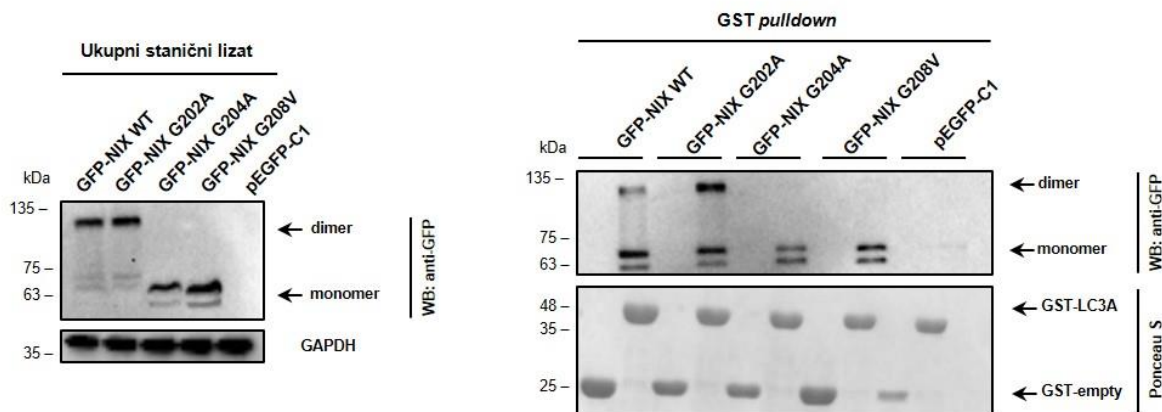
Slika 23. Analiza lokalizacije GFP-NIX dimerizacijskih mutanti imunoblotom. Izražaj GFP-NIX mutanti u citoplazmatskoj (Cito) i mitohondrijskoj (Mito) frakciji ispitan je anti-GFP protutijelom. Za potvrdu izolacije mitohondrijske frakcije korišteno je anti-TOMM20 protutijelo.

4.2.4. Detekcija interakcija NIX dimerizacijskih mutanti i autofagosomalnih proteina LC3/GABARAP GST pull down analizom

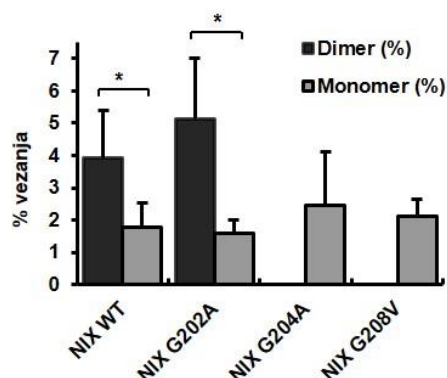
Interakcije između receptora selektivne autofagije, uključujući receptor NIX i autofagosomalne proteine LC3/GABARAP, ključne su za pravilno odvođenje materijala namijenjenog za razgradnju, u ovom slučaju mitohondrija, na membranu autofosoma u nastajanju. Za uspostavljanje ovih interakcija i napredovanje mitofagije neophodno je postojanje konzervirane domene LIR na N-terminalnom kraju receptora NIX (104,180). Kako bi se ispitalo je li dimerizacija proteina NIX uopće povezana s aktivacijom receptora i učinkovitijom mitofagijom, nužno je testirati sposobnost dimerizacijskih mutanti G204A i G208V u vezanju proteina LC3 i GABARAP. U tu svrhu napravljena je *pull down* analiza u kojoj su korišteni prethodno proizvedeni i pročišćeni fuzijski protein GST-LC3A te stanični lizati stanica HEK293 koji prekomjerno izražavaju proteine GFP-NIX WT, G202A, G204A i G208V. Rezultati pokazuju da gubitak dimerizacije kod mutanti G204A i G208V ne remeti njihovu sposobnost vezanja proteina LC3 tj. da uz postojanje domene LIR, receptor NIX veže

autofagosomalne proteine u onom obliku u kojem postoji izražen u stanici (Slika 24 A). Štoviše, usporedbom učinkovitosti vezivanja proteina LC3A između dimernog i monomernog oblika receptora NIX, kod GFP-NIX WT i GFP-NIX G202A koji pokazuju oba oblika, pokazan je značajno veći postotak vezivanja proteina LC3A za dimer receptora NIX u odnosu na njegov monomer (Slika 24 B).

A

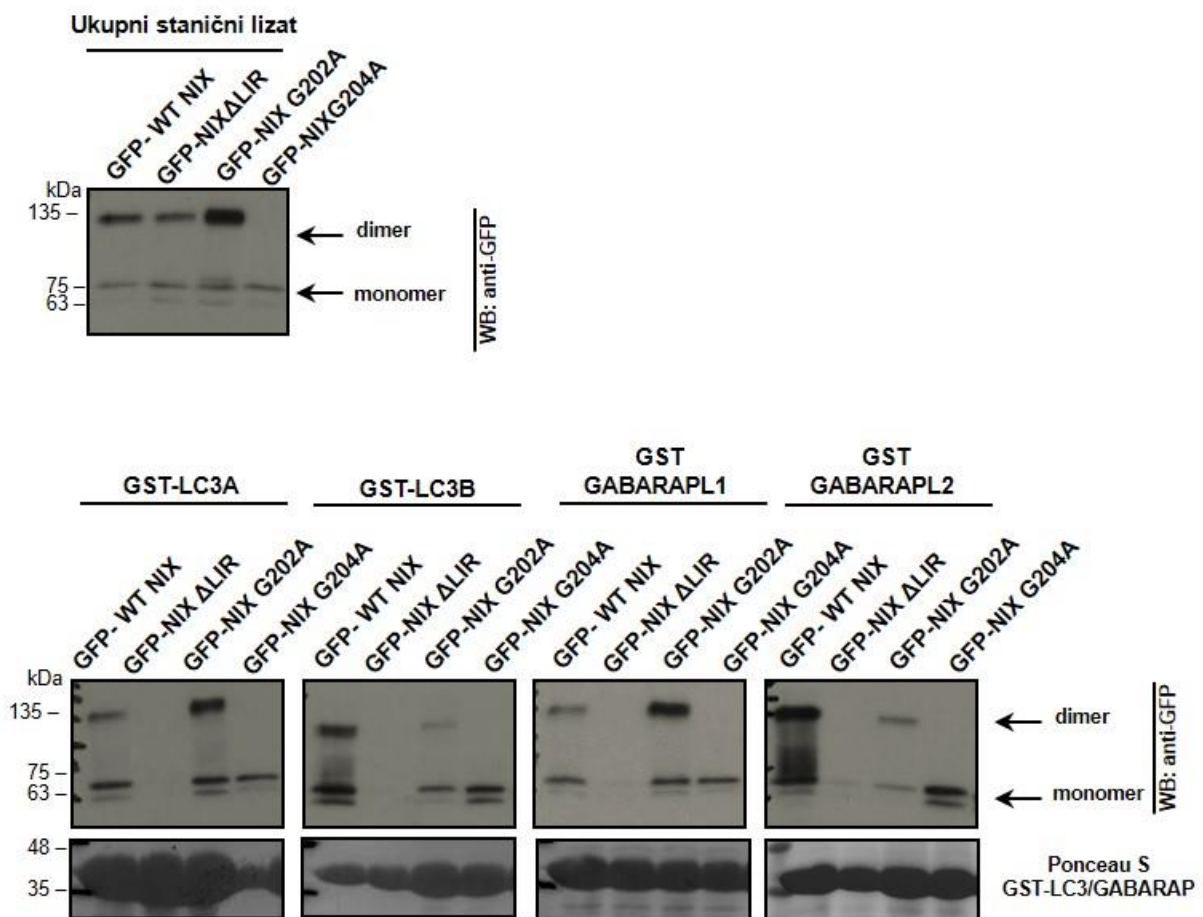


B



Slika 24. (A) Analiza ukupnog staničnog lizata korištenog u *pull down* analizi (lijevo) i imunoblot prikaz *pull down* analize s pročišćenim GST-LC3A/empty proteinima i GFP-NIX TM dimerizacijskim mutantima (desno). Prikaz GST-LC3A i GST-empty proteina korištenih u *pull down* reakciji obojanih bojom Ponceau S (donji dio). Anti-GFP antitijelo korišteno je za detekciju ekspresije NIX proteina. GAPDH protein korišten je kao kontrola nanošenja količine proteinskog uzorka na gel. (B) Grafički prikaz kvantifikacije učinkovitosti vezivanja LC3A proteina između NIX dimera i monomera. Denzitometrijska analiza tri neovisna imunoblota napravljena je pomoću *Image Lab* programa. Statistička analiza provedena je u *GraphPad Prism 8* programu korištenjem T-testa. Statistička značajnost: * $P < 0.05$; intervali pogreške označavaju standardnu devijaciju, $n=3$.

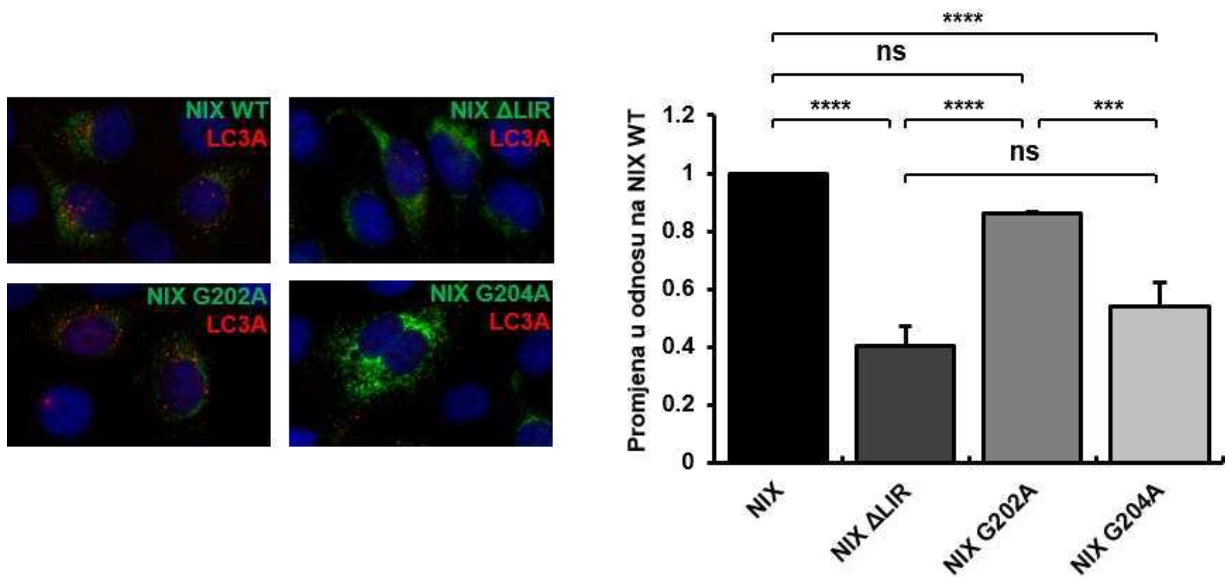
Nadalje, slična *pull down* analiza napravljena je koristeći i druge autofagosomalne proteine, GST-LC3B, GST-GABARAPL1 i GST-GABARAPL2, s ciljem dokazivanja da ovaj efekt nije specifičan samo za vezanje proteina LC3A. Očekivano, identični obrazac interakcija pokazali su i ostali homologni proteina Atg8 (Slika 25). Ovi rezultati ukazuju da gubitak dimerizacije proteina NIX ne utječe na sposobnost vezanja proteina LC3/GABARAP budući da je za njihovo vezanje ionako neophodna domena LIR. Međutim daju naslutiti da bi dimerizacija uistinu mogla biti mehanizam aktivacije receptora NIX s obzirom da je dimerni oblik receptora NIX, kod WT i kod G202A mutante, pokazao značajno veći afinitet za vezanje LC3A proteina.



Slika 25. Analiza ukupnog staničnog lizata korištenog u *pull down* analizi. Na slici je prikazano 10% količine ukupnog staničnog lizata s kojim je izveden GST *pull down*. Anti-GFP protutijelo korišteno je za detekciju izražaja proteina NIX (gornji imunoblot). Imunoblot prikaz *pull down* analiza s pročišćenim GST-LC3A/LC3B/GABARAPL1 i GABARAPL2 proteinima i GFP-NIX TM dimerizacijskim mutantama, uključujući i LIR mutantu (donji imunoblotovi). Prikaz GST-LC3A i GST-empty proteina korištenih u *pull down* reakciji obojanih bojom Ponceau S (donji dio na *pull down* imunoblotovima).

4.2.5. Imunofluorescencijska detekcija regrutacije autofagosoma na mitohondrije s prekomjerno izraženim dimerizacijskim mutantama receptora NIX

Pull down analize pokazale su da se dimerizacijom receptora pojačava afinitet vezanja proteina LC3/GABARAP na membrani autofagosoma, međutim dodatni eksperimenti potrebni su kako bi se pokazalo utječe li dimerizacija i na ostale korake u procesu autofagije, progresiju tj. regrutaciju autofagosoma na oštećene mitohondrije i konačno njihovo uklanjanje posredstvom lizosoma u autofagolizosomu. Učinak dimerizacije na aktivaciju mitofagije posredovanu receptorom NIX ispitan je imunofluorescencijskom mikroskopijom analizirajući regrutaciju LC3A na oštećene mitohondrije u HeLa stanicama koje prekomjerno izražavaju mutante NIX receptora (WT, Δ LIR, G202A i G204A). Prethodno je, za sve ispitane mutante, potvrđeno da lokaliziraju u vanjskoj mitohondrijskoj membrani (Slike 22 i 23) i da normalno vezuju LC3/GABARAP (Slike 24 i 25) čime su zadovoljeni kriteriji za proučavanje dimerizacijskih mutanti u kontekstu funkcionalnih receptora selektivne autofagije. G204A dimerizacijska mutanta receptora, pokazala je značajno manji broj regrutiranih autofagosoma u odnosu na NIX WT ili NIX G202A mutantu. Također, ovo smanjenje regrutacije ne razlikuje se od onog koje je uočeno kod mutante receptora bez domene LIR, što upućuje na jednaku važnost dimerizacije receptora kao i funkcionalne domene LIR u regrutaciji proteina LC3 (Slika 26).

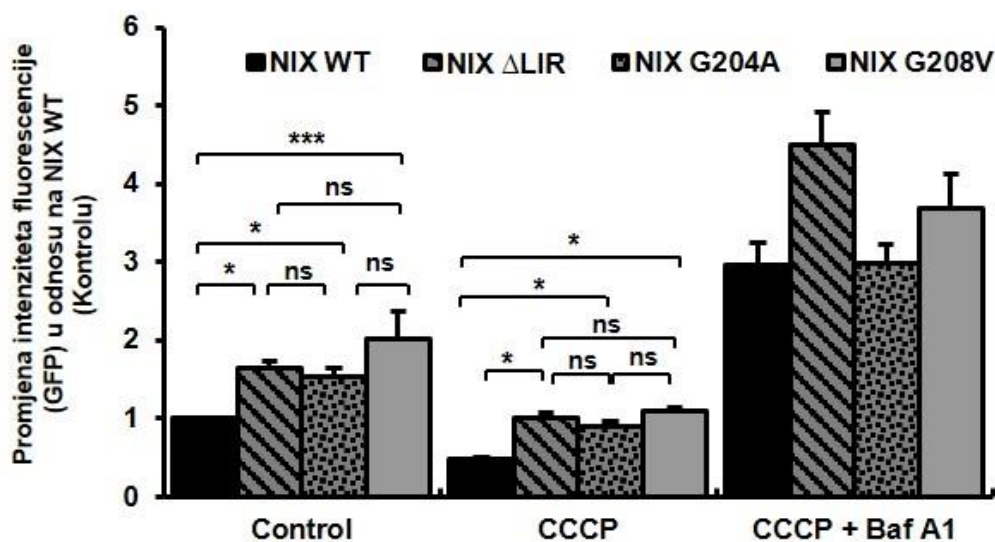


Slika 26. Analiza regrutacije autofagosoma na mitohondrije s prekomjerno izraženim GFP-NIX mutantama u uvjetima mitofagije inducirane 10 μ M CCCP kemikalijom u trajanju od 2 h. Na slikama su GFP-NIX proteini (mitohondriji) prikazani zeleno, a LC3A signali (autofagosomi) crveno dok je plavi signal jezgra obojana DAPI bojom (lijevo). Kvantifikacija broja LC3A signala u 100 kotransfeciranih stanica za svaku NIX mutantu. Rezultati su prikazani u odnosu na NIX WT (srednja vrijednost \pm SD) u tri neovisna biološka i tehnička eksperimenta. Statistička analiza provedena je *GraphPad Prism 8* alatom korištenjem *one way ANOVA (Tukey's multiple comparisons)* statističkog testa. Statistička značajnost: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, nije značajno; intervali pogreške označavaju standardnu devijaciju, $n=3$.

4.2.6. Analiza uklanjanja mitohondrija koji prekomjerno izražavaju dimerizacijske mutante protočnom citometrijom

Kako bi se ispitaio utjecaj dimerizacije receptora NIX na učinkovitost uklanjanja mitohondrija procesom selektivne autofagije u stanicama HEK293 prekomjerno su izražene različite dimerizacijske NIX mutante te su takve stanice analizirane protočnom citometrijom. S obzirom da je prethodno potvrđena lokalizacija svih NIX TM mutanti u vanjskoj mitohondrijskoj membrani (Slike 22 i 23), korištenjem NIX konstrukata koji su označeni fluorescentnim proteinom GFP, moguće je protočnom citometrijom pratiti dinamiku uklanjanja mitohondrijske populacije u stanicama koje su podvrgnute različitim tretmanima. Analizom intenziteta GFP signala, pokazano je da je razgradnja mitohondrija značajno učinkovitija u stanicama koje izražavaju divlji tip receptora u odnosu na stanice transfecirane bilo kojom dimerizacijskom mutantom, G204A ili G208V. Nadalje, učinkovitost uklanjanja mitohondrija u ovim stanicama ne razlikuje se značajno u usporedbi sa stanicama koje izražavaju LIR mutantu receptora što dodatno upućuje da bi dimerizacija receptora NIX zapravo mogla biti dodatni mehanizam regulacije NIX posredovane mitofagije neovisan o LIR-u. U stanicama

tretiranim kombinacijom 10 μ M CCCP i 100 nM Baf A1, uočeno je nakupljanje mitohondrija kod svih ispitanih GFP-NIX mutanti što indicira da bi dimerizacija mogla utjecati na početne korake selektivnog procesa, aktivaciju receptora i regrutaciju autofagosoma, ali nema presudnu ulogu u završnom koraku fuzije autofagosoma s lizosomom (Slika 27).



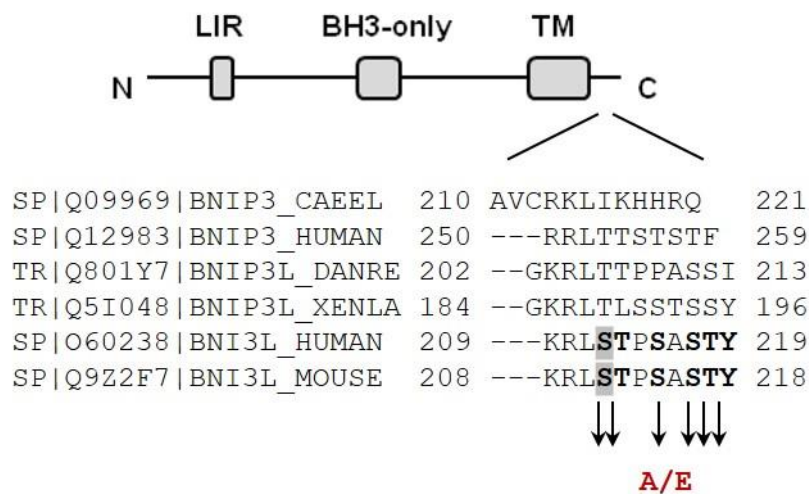
Slika 27. Grafički prikaz analize razgradnje mitohondrija protočnom citometrijom. Analiza je provedena na stanicama koje prekomjerno izražavaju GFP-NIX WT, Δ LIR, G204A i G208V proteine nakon 24 h djelovanja 10 μ M CCCP i kombinacije 10 μ M CCCP/100 nM Baf A1. Intenzitet fluorescencije za svaku mutantu prikazan je kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija te normaliziran s intenzitetom za GFP-NIX WT (DMSO tj. kontrola). Statistička analiza provedena je *GraphPad Prism 8* alatom korištenjem *two way ANOVA (Tukey's multiple comparisons)* testa. Statistička značajnost: *P = < 0.05, **P = < 0.01; ***P = < 0.001; ns, nije značajno; intervali pogreške označavaju standardnu devijaciju, n=3.

4.2.7. Analiza regulacije dimerizacije fosforilacijom C-terminalnog kraja receptora NIX

Aminokiselinski sastav C-terminalne domene receptora NIX, smješten u prostoru između vanjske i unutarnje mitohondrijske membrane, upućuje na moguću regulaciju putem mehanizma fosforilacije i defosforilacije s obzirom da su od 11 aminokiselina čak šest onih aminokiselinskih ostataka s potencijalom za fosforilaciju (Slika 28).

Kako bi se provjerio utjecaj fosforilacije C-terminalnog kraja receptora NIX na aktivnost mitofagije, ispitana je dimerizacijska sposobnost serije C-terminalnih supstitucijskih mutanti i to onih aminokiselinskih ostataka koji se potencijalno mogu fosforilirati: S212, T213, S215, S217, T218 i Y219. Kao i kod proučavanja fosforilacije domene LIR, ove aminokiseline mutirane su u alaninske mutante kako bi dobili negativne fosforilacijske mutante serina, treonina i tirozina: S212A, T213A, S215A, S217A, T218A i Y219A. Također, napravljene su

i glutaminske mutante kako bi stvorili mutante koje strukturno nalikuju fosforiliranom serinu, treoninu ili tirozinu: S212E, T213E, S215E, S217E, T218E i Y219E (Slika 28).

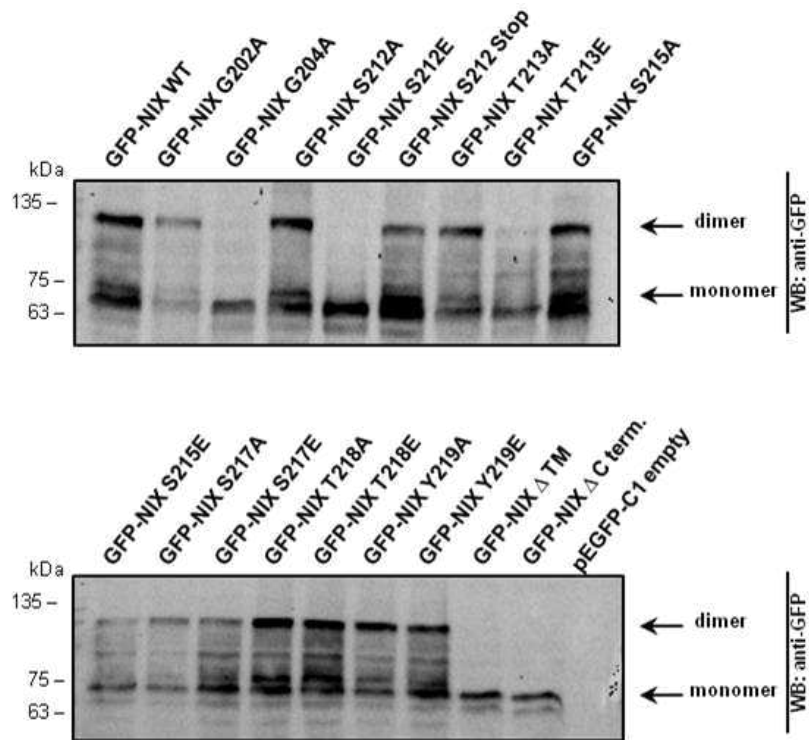


Slika 28. Shematski prikaz receptora NIX s istaknutim C-terminalnim međumembranskim krajem. Donji dio slike: aminokiselinska konzerviranost C-terminalnog kraja receptora NIX i funkcionalnog homologa BNIP3 u naznačenim vrstama. Crnom bojom su istaknute aminokiseline mišjeg i humanog receptora NIX koje se potencijalno mogu fosforilirati (S212, T213, S215, S217, T218 i Y219). Sivo istaknuta regija označava S212 važan za regulaciju aktivnosti receptora NIX. Niže su označene aminokiselinske supstitucije napravljene za proučavanje mehanizma dimerizacije putem defosforilacije C-terminalnog kraja receptora NIX.

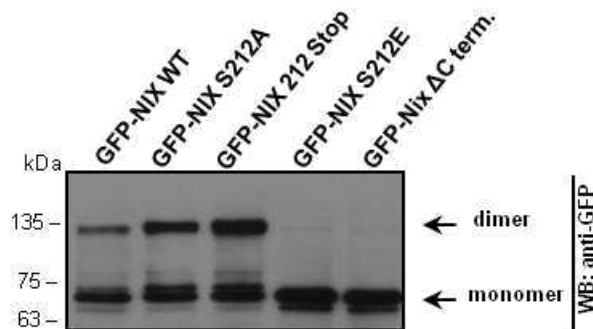
4.2.8. Imunoblot detekcija dimerizacije proteina NIX putem fosforilacije/defosforilacije C-terminalnog kraja proteina

Prije ispitivanja fosforilacije C-terminalnog kraja receptora NIX na regulaciju mitofagije, analiziran je izražaj navedenih mutanti u HEK293 staničnoj liniji. Sve C-terminalne mutante napravljene su u pEGFP-C1 plazmidu s prethodno kloniranom sekvencom humanog receptora NIX tako da se u stanicama izražavaju kao fuzijski proteini s fluorescencijskim proteinom GFP na N-terminalnom dijelu proteina. Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije imunoblot metodom analiziran je stanični lizat s prekomjerno izraženim C-terminalnim mutantama. Zanimljivo, od svih analiziranih mutanti, jedino je S212E mutanta pokazala identično ponašanje, tj. potpuni gubitak dimernog oblika, kao i prethodno proučavane G204A, G208V ili mutanta kojoj potpuno nedostaje C-terminalni dio (Slike 29 i 30). Ostale mutante s nemogućnošću fosforilacije, alaninske mutante, pokazuju podjednako zastupljeni monomerni i dimerni oblik proteina. Za razliku od njih, C-terminalne glutaminske mutante, pokazuju različite dimerizacijske obrasce. Tako je kod T213E, S215E i S217E mutanti monomerni oblik značajno izraženiji od dimernog koji je samo prisutan u tragovima za razliku od T218E i Y219E

mutanti koje pokazuju fenotip divljeg tipa receptora NIX, jednako zastupljeni dimerni i monomerni oblik (Slika 29).



Slika 29. Analiza izražaja TM i C-terminalnih mutanti receptora NIX imunoblotom. Izražaj GFP-NIX proteina (WT, G202A, G204A, S212A, S212E, S212Stop, T213A, T213E, S215A, S215E, S217A, S217E, T218E, T218E, Y219A, Y219E, Δ TM, Δ C-terminalni kraj) analiziran je anti-GFP protutijelom.

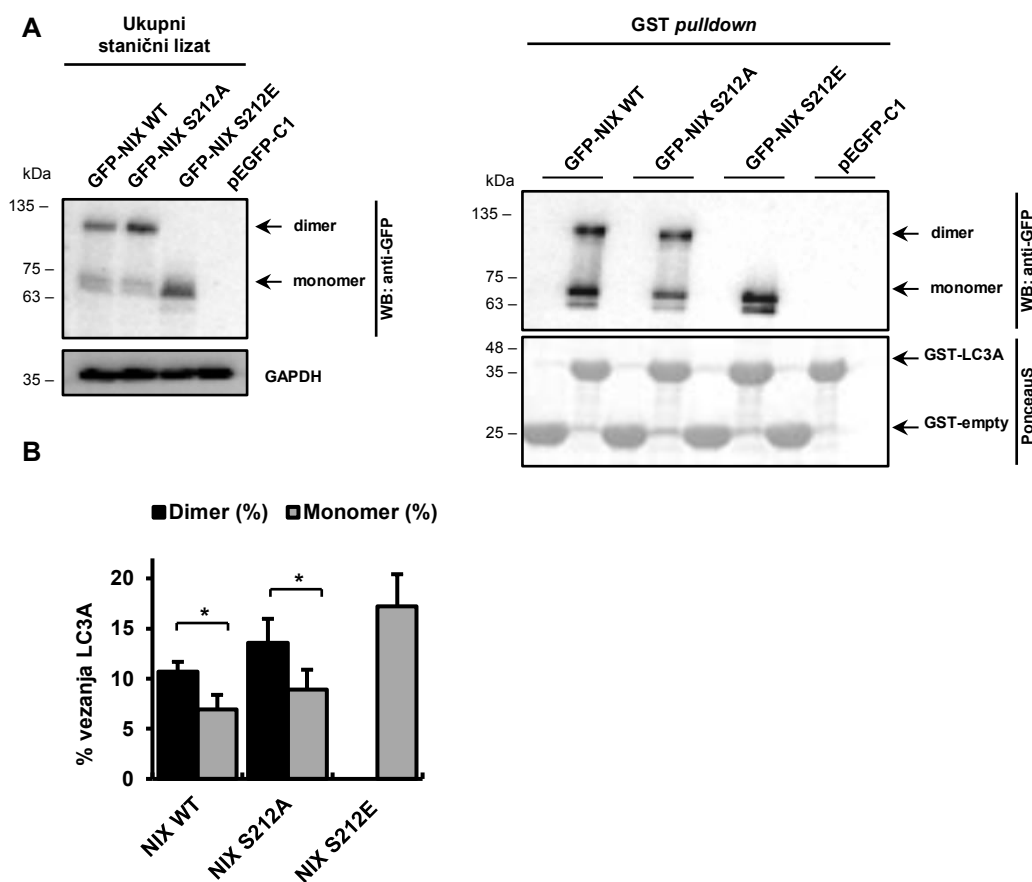


Slika 30. Analiza izražaja C-terminalnih mutanti receptora NIX. Izražaj GFP-NIX proteina (WT, S212A, S212Stop, S212E i Δ C-terminalni dio) analiziran je anti-GFP protutijelom.

4.2.9. GST *pull down* analiza interakcija NIX S212 mutanti i proteina LC3A

Iako sve C-terminalne mutante pokazuju pravilnu lokalizaciju receptora NIX u vanjskoj mitohondrijskoj membrani, a također vezuju LC3A, u daljnjoj analizi utjecaja fosforilacije C-terminalnog kraja receptora NIX na učinak dimerizacije i konačnu aktivaciju mitofagije, istraživanje je usmjereno isključivo na S212E mutantu koja je jedina pokazala fenotip s nemogućnošću dimerizacije kao i prethodno ispitane G204A i G208V TM mutante.

GST *pull down* analiza lizata stanica HEK293 koje prekomjerno izražavaju GFP fuzijske C-terminalne mutante NIX, S212A i S212E, s prethodno proizvedenim i pročišćenim GST-LC3A, pokazala je da obje S212 mutante vežu protein LC3A. Ovo potvrđuje da fosforilacija C-terminalnog S212 i posljedično gubitak dimerizacije receptora NIX ne remeti sposobnost vezivanja autofagosomalnih proteina, identično kao što je prethodno pokazano za TM mutante (Slike 24 i 25). Štoviše, kvantifikacija *pull down* analize pokazala je da dimerni oblik S212A mutante ima značajno veći kapacitet vezanja LC3A u usporedbi s monomernim oblikom S212A mutante, identično kao i dimeri divljeg tipa receptora NIX i G202A mutante (Slike 31 i 24).

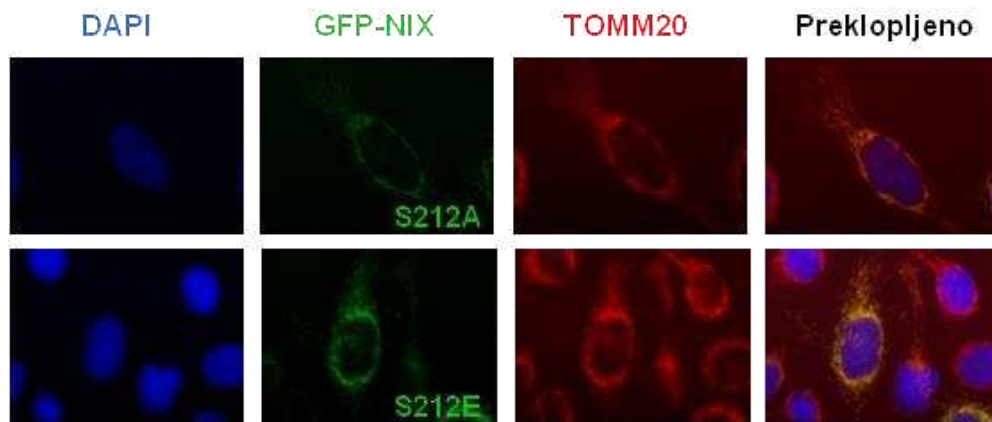


Slika 31. (A) Analiza ukupnog staničnog lizata korištenog u *pull down* analizi. Na slici je prikazano 10% količine ukupnog staničnog lizata s kojim je izveden GST *pull down*. Anti-GFP protutijelo korišteno je za analizu ekspresije NIX proteina. GAPDH protein poslužio je kao kontrola nanošenja količine proteinskog uzorka na gel (lijevo). Imunoblot prikaz *pull down* analize s pročišćenim GST-LC3A i GFP-NIX C-terminalnim mutantima. Prikaz količine GST-LC3A i GST-empty proteina korištenih u *pull down* reakciji obojanih bojom Ponceau S (desno). **(B)** Grafički prikaz kvantifikacije učinkovitost vezanja LC3A između NIX dimera i monomera. Denzitometrijska analiza tri neovisna imunoblota napravljena je pomoću *Image Lab* alata. Statistička analiza provedena je *GraphPad Prism 8* alatom korištenjem T-testa. Statistička značajnost: * $P < 0.05$; intervali pogreške označavaju standardnu devijaciju, $n=3$.

4.2.10. Detekcija lokalizacije C-terminalnih mutanti proteina NIX metodama imunofluorescencijske mikroskopije i staničnog frakcioniranja

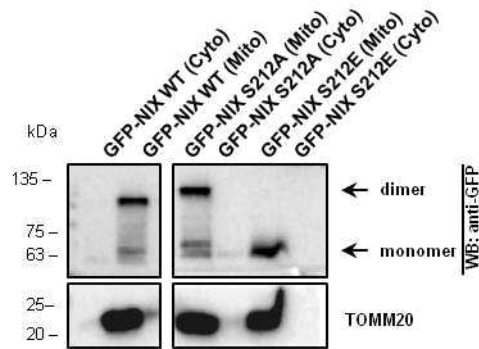
U svrhu proučavanja utjecaja fosforilacije C-terminalnog kraja receptora NIX na regulaciju dimerizacije i aktivnost mitofagije, nužno je potvrditi pravilnu lokalizaciju S212 mutanti u vanjskoj mitohondrijskoj membrani kako bi se one mogle proučavati u kontekstu receptora selektivne autofagije. Mutantima GFP-NIX S212A i S212E, prekomjerno izraženim u stanicama HeLa, lokalizacija je određena prema lokalizaciji proteina vanjske mitohondrijske membrane TOMM20. Usprkos aminokiselinskoj zamjeni, obje S212 mutante i dalje u

potpunosti kolokaliziraju s proteinom TOMM20, identično kao i NIX WT, pa se zato mogu koristiti za proučavanje učinka fosforilacije C-terminalnog dijela receptora NIX na aktivaciju mitofagije (Slika 32).



Slika 32. Analiza lokalizacije NIX C-terminalnih mutanti S212A i S212E imunofluorescencijskom mikroskopijom. Jezgre su obojane DAPI bojom (plavo), GFP-NIX i označene mutante prikazane su zelenom, a TOMM20 crvenom bojom. Kolokalizacija NIX (zeleno) i TOMM20 (crveno) rezultira žutom bojom (preklopljeno).

Imunofluorescencijskom mikroskopijom potvrđeno je da obje C-terminalne S212 mutante potpuno kolokaliziraju s TOMM20 u vanjskoj mitohondrijskoj membrani. Međutim, u svrhu detaljnijeg proučavanja fosforilacije međumembranskog dijela receptora NIX, dodatno je napravljen eksperiment staničnog frakcioniranja s ciljem potvrde lokalizacije NIX C-terminalnih mutanti u vanjskoj membrani mitohondrija. Analiza mitohondrijske i citoplazmatske frakcije stanica HEK293 koje prekomjerno izražavaju S212A i S212E mutante potvrdila je prisutnost svih mutanti isključivo u mitohondrijskoj frakciji (Slika 33). Na kraju, korištenjem dviju metoda, imunofluorescencijske mikroskopije i staničnog frakcioniranja, potvrđeno je da uz prisutnost fosforilacije S212 i nemogućnosti dimerizacije kao i uz odsustvo fosforilacije S212 i posljedične dimerizacije receptora NIX, C-terminalne NIX mutante, S212A i S212E se i dalje nalaze u vanjskoj mitohondrijskoj membrani i kao takve mogu biti proučavane u kontekstu receptora mitofagije.



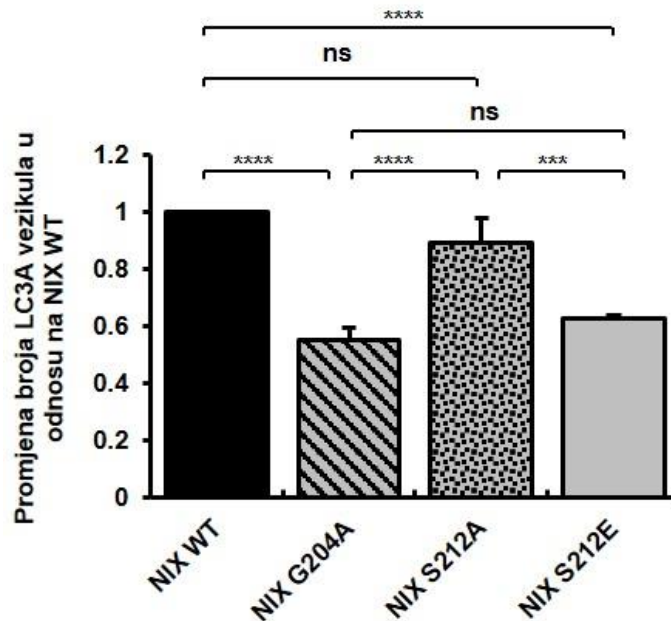
Slika 33. Analiza lokalizacije GFP-NIX S212 mutanti. Izražaj navedenih mutanti u citoplazmatskoj (Cito) i mitohondrijskoj (Mito) frakciji utvrđen je anti-GFP protutijelom. Za potvrdu izolacije mitohondrijske frakcije korišteno je anti-TOMM20 protutijelo.

4.2.11. Imunofluorescencijska detekcija regrutacije autofagosoma na mitohondrije koji prekomjerno izražavaju C-terminalne S212A i S212E mutante proteina NIX

Za potvrdu biokemijskih rezultata *pull down* analize, gdje defosforilacija receptora uvjetuje njegovu dimerizaciju i pojačava afinitet za vezanje autofagosomalnih proteina, napravljeni su eksperimenti imunofluorescencijske mikroskopije i protočne citometrije. Imunofluorescencijskom mikroskopijom je ispitana učinkovitost regrutacije autofagosoma na oštećene mitohondrije koji prekomjerno izražavaju C-terminalne mutante receptora NIX, dok je protočna citometrija korištena u svrhu praćenja daljnjeg napredovanja mitofagije tj. kasnijih faza razgradnje oštećenih mitohondrija iz stanice.

Učinak dimerizacije na početak procesa mitofagije posredovane defosforilacijom C-terminalnog kraja receptora NIX ispitano je analizom regrutacije LC3A na oštećene mitohondrije u stanicama HeLa koje prekomjerno izražavaju C-terminalne NIX mutante, S212A i S212E. Kao dodatna kontrola, u analizu je uvrštena i dimerizacijska mutanta TM domene, G204A, koja je biokemijskim analizama pokazala identično ponašanje kao i fosforilirana varijanta S212E. Svim mutantama je prethodno potvrđena lokalizacija u vanjskoj mitohondrijskoj membrani (Slike 32 i 33) te normalna sposobnost vezanja LC3A na autofagosomalnoj membrani (Slika 31) pa se iz ovih razloga navedene C-terminalne NIX mutante mogu analizirati u kontekstu funkcionalnih receptora selektivne autofagije. Regrutacija autofagosoma na oštećene mitohondrije inducirana je i praćena kako je navedeno u dijelu u kojem je proučavana dimerizacija receptora putem TM domene. Mutanta S212E koja se javlja isključivo kao monomer, pokazuje značajno manju regrutaciju autofagosoma na mitohondrije u odnosu na

stanice koje izražavaju dimerni i monomerni oblik poput WT ili S212A (Slika 34). Očekivano, S212E mutanta, pokazala je značajno manji broj regrutiranih autofagosoma (slično kao i G204A) u odnosu na NIX WT ili NIX S212A mutantu koja ima normalnu sposobnost dimerizacije. Ovo pokazuje da fosforilacija S212, osim što remeti dimerizaciju receptora, ima isti funkcionalni učinak kao i TM mutante G204A i G208V na učinkovitost regrutacije autofagosoma (Slika 34).

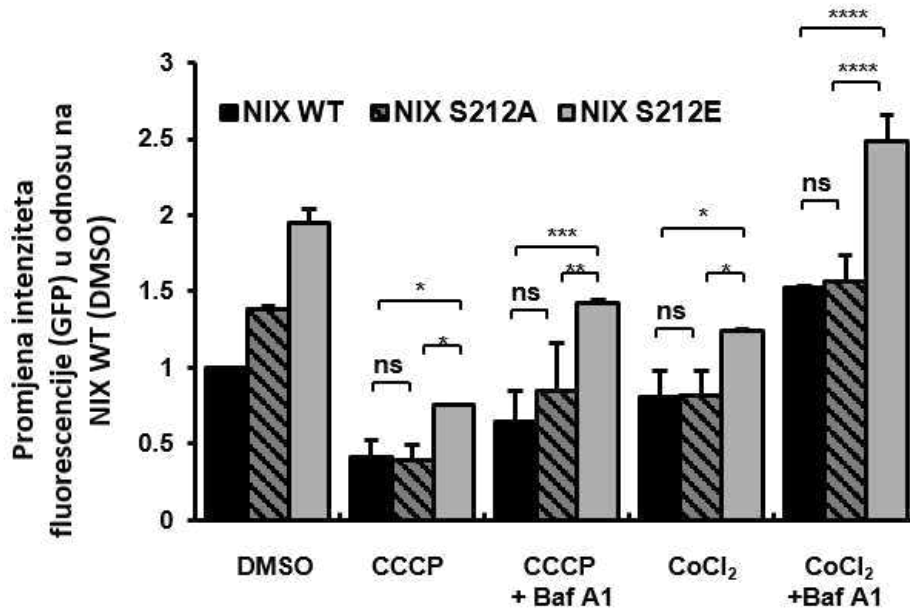


Slika 34. Kvantifikacija LC3A signala u 100 kotransficeranih stanica za svaku NIX mutantu. Rezultati su prikazani (srednja vrijednost \pm SD) u odnosu na NIX WT u tri neovisna biološka i tehnička eksperimenta. Statistička analiza provedena je u *GraphPad Prism 8* softveru korištenjem *one way ANOVA (Tukey's multiple comparisons)* testa. Statistička značajnost: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, nije značajno; intervali pogreške označavaju standardnu devijaciju, $n=3$.

4.2.12. Analiza uklanjanja mitohondrija protočnom citometrijom u stanicama koje prekomjerno izražavaju C-terminalne mutante proteina NIX

Stanice HEK293, transfecirane različitim GFP-NIX proteinima (WT, S212A i S212E), tretirane su 10 μ M CCCP ili 10 μ M CCCP/100 Baf A1 s ciljem zaustavljanja procesa autofagije. Također, s obzirom da je u ovome dijelu istraživanje usmjereno na funkcionalne NIX mutante, koje bi mogle biti fosforilirane i defosforilirane, napravljen je i dodatni tretman stanica s ciljem indukcije mitofagije pomoću CoCl_2 . CoCl_2 u stanicama izaziva učinak sličan hipoksiji koja također potiče mitofagiju. Analizom intenziteta GFP signala, pokazano je da je uklanjanje mitohondrija značajno učinkovitije u stanicama koje izražavaju divlji tip receptora i S212A u

odnosu na stanice transfecirane C-terminalnom S212E mutantom. Djelovanje CoCl_2 ima sličan učinak na mitofagiju kao i CCCP tretman, dok je kod kombiniranog djelovanja CCCP/Baf A1 primijećeno nakupljanje mitohondrija i zaustavljanje procesa mitofagije u svim konstruktima GFP-NIX proteina (Slika 35).



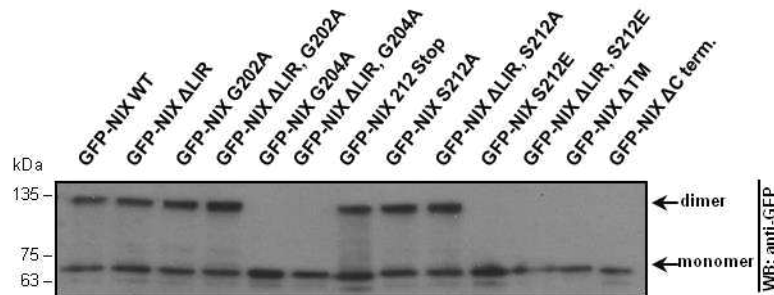
Slika 358. Analiza uklanjanja mitohondrija protočnom citometrijom. Analiza je provedena na stanicama koje prekomjerno izražavaju GFP-NIX WT, S212A i S212E proteine nakon 24 h djelovanja $10 \mu\text{M}$ CCCP i $10 \mu\text{M}$ CCCP/ 100 nM Baf A1 te $100 \mu\text{M}$ CoCl_2 i $100 \mu\text{M}$ CoCl_2 / 100 nM Baf A1. Intenzitet fluorescencije za svaku mutantu prikazan je kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija u odnosu na intenzitet GFP-NIX WT (DMSO). Statistička analiza provedena je *GraphPad Prism 8* alatom korištenjem *two way ANOVA (Tukey's multiple comparisons)* testa. Statistička značajnost: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, nije značajno; intervali pogreške označavaju standardnu devijaciju, $n=3$.

4.2.13. Analiza regulacije aktivnosti receptora NIX udruženim mehanizmom LIR-ovisne regrutacije autofagosoma i dimerizacije

Dosadašnji eksperimenti su pokazali da niti jedan mehanizam zasebno, LIR-ovisna regrutacija autofagosoma i dimerizacija receptora NIX, nisu dovoljni za potpuno uklanjanje mitohondrija. Stoga je ispitan združeni učinak ova dva mehanizma na aktivaciju receptora NIX i učinkovitost uklanjanja oštećenih mitohondrija iz stanice.

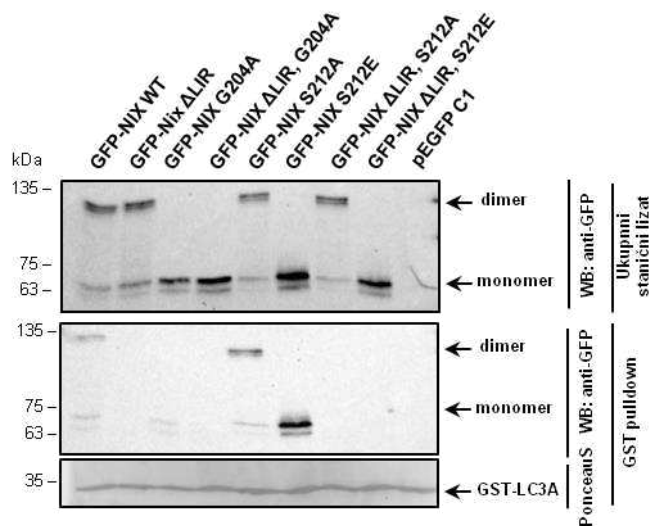
S ovim ciljem, napravljene su dvostruke ΔLIR i TM/C mutante receptora NIX prethodno ukloniranog u pEGFP-C1 plazmid: $\Delta\text{LIR G202A}$, $\Delta\text{LIR G204A}$, $\Delta\text{LIR S212A}$ i $\Delta\text{LIR S212E}$. Prije same provjere učinka združenog mehanizma na mitofagiju, provjeren je izražaj navedenih mutanti u stanicama i njihova sposobnost vezanja proteina LC3A GST pull down metodom.

Analiza staničnih lizata s prekomjerno izraženim Δ LIR/TM/C mutantama očekivano je pokazala da se mutante kojima nedostaje sposobnost dimerizacije, Δ LIR G204A i Δ LIR S212E, na imunoblotu javljaju isključivo kao monomerni oblik dok su mutante Δ LIR G202A i Δ LIR S212A prisutne kao monomer i dimer (Slika 36).



Slika 369. Analiza izražaja Δ LIR/TM/C mutanti receptora NIX. Izražaj GFP-NIX proteina (WT, Δ LIR, G202A, Δ LIR G202A, G204A, Δ LIR G204A, S212Stop, S212A, Δ LIR S212A, S212E, Δ LIR S212E, Δ TM i Δ C-terminalni dio) analiziran je anti-GFP protutijelom.

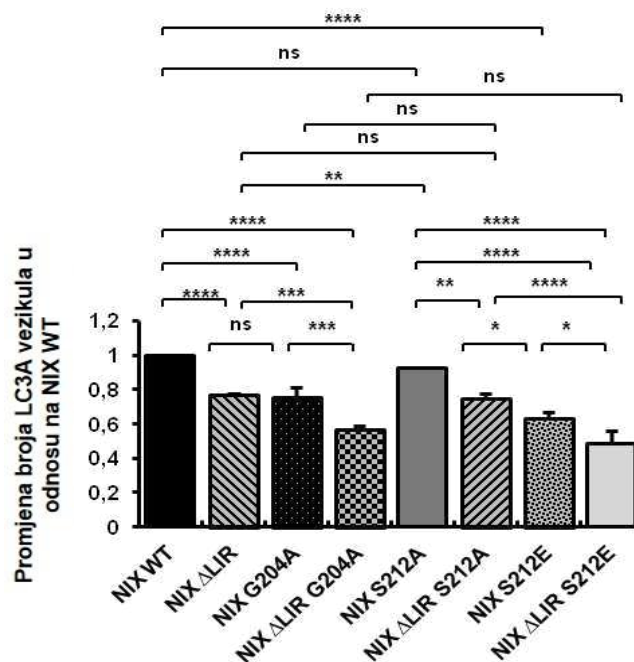
Također, *pull down* analiza u kojoj su korišteni stanični lizati s prekomjerno izraženim mutantima WT, Δ LIR, G204A, Δ LIR G204A, S212A, S212E, Δ LIR S212A i Δ LIR S212E i pročišćeni GST-LC3A, pokazala je nemogućnost vezivanja autofagosomalnog proteina kod svih mutanti kojima nedostaje domena LIR, uključujući i mutante Δ LIR, Δ LIR G204A, Δ LIR S212A i Δ LIR S212E) što ukazuje na važnost domene LIR u vezivanju i inicijaciji mitofagije neovisno o dimerizacijskim sposobnostima receptora NIX (Slika 37).



Slika 37. Analiza ukupnog staničnog lizata korištenog u *pull down* analizi. Na slici je prikazano 10% količine ukupnog staničnog lizata s kojim je izveden GST *pull down* (gornji dio). *Pull down* analiza s pročišćenim GST-LC3A i dvostrukim GFP-NIX Δ LIR/TM/C mutantama (sredina). Anti-GFP protutijelo korišteno je za analizu izražaja receptora NIX. GST-LC3A, korišten u *pull down* reakciji, obojan je Ponceau S bojom (donji dio).

4.2.14. Imunofluorescencijska detekcija regrutacije autofagosoma na mitohondrije koji prekomjerno izražavaju kombinirane NIX ΔLIR i TM/C-terminalne dimerizacijske mutante

Združeni mehanizmi LIR-ovisne regrutacije autofagosoma na oštećene mitohondrije i dimerizacije NIX receptora, konačno je provjeren i na staničnoj razini analizom regrutacije proteina LC3 na oštećene mitohondrije koji izražavaju različite NIX mutante, bilo dvostruke ili pojedinačne. Imunofluorescencijska mikroskopija pokazala je da dvostruke mutante, ΔLIR G204A i ΔLIR S212E, kojima nedostaje domena LIR i nemaju sposobnost dimerizacije, pokazuju značajno manju regrutaciju LC3A pozitivnih vezikula na oštećene mitohondrije u odnosu na pojedinačne mutante ΔLIR, G204A ili S212E. Naravno, razlika je još izraženija ako se dvostruke mutante uspoređuju s NIX WT ili NIX S212A mutantom koje posjeduju domenu LIR i normalno dimeriziraju (Slika 38). Ovaj rezultat dokazuje da su za uspješnu inicijaciju mitofagije i učinkovitu regrutaciju autofagosoma na oštećene mitohondrije nužna oba mehanizma: funkcionalna LIR domena i dimerizacija receptora.

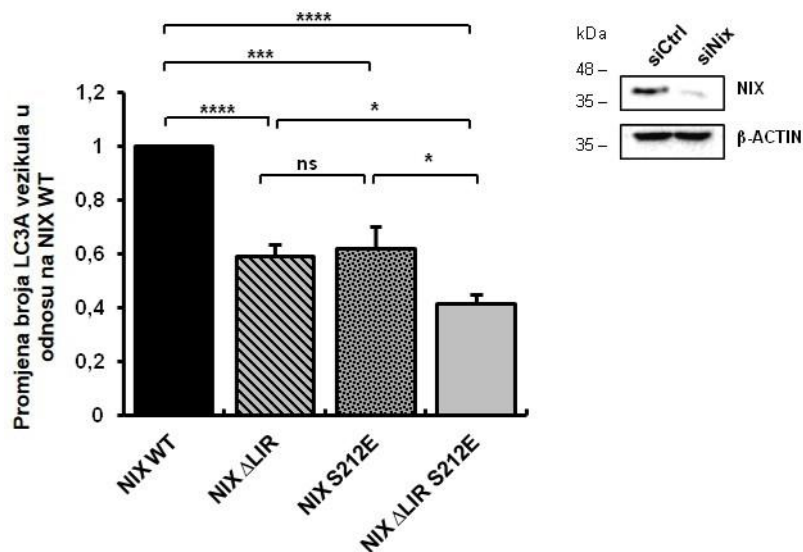


Slika 38. Analiza regrutacije autofagosoma na mitohondrije s prekomjerno izraženim GFP-NIX mutantama (WT, ΔLIR, G204A, ΔLIR G204A, S212A, ΔLIR S212A, S212E i ΔLIR S212E) u uvjetima mitofagije inducirane 10 μM CCCP u trajanju od 2 h. Kvantificiran je LC3A signal u 100 kotransfeciranih stanica za svaku NIX mutantu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD broja LC3A signala normaliziran u odnosu na broj LC3A signala kod NIX WT u tri neovisna biološka i tehnička eksperimenta. Statistička analiza provedena je *GraphPad Prism 8* alatom korištenjem *one way ANOVA (Tukey's multiple comparisons)* testa. Statistička značajnost: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; ns, nije značajno; intervali pogreške označavaju standardnu devijaciju, n=3.

4.2.15. Analiza utjecaja dimerizacije receptora NIX na aktivaciju mitofagije u sustavu bez endogenog proteina NIX

Cijela studija dimerizacije receptora NIX napravljena je u stanicama HEK293 i HeLa koje normalno izražavaju određenu količinu endogenog receptora NIX i to oba njegova oblika, dimer i monomer. Iako je učinak dimerizacije ispitan u sustavu s prekomjerno izraženim mutantama GFP-NIX, čija količina znatno premašuje količinu endogenog proteina, potrebno je provjeriti je li dimerizacija endogenog receptora utječe na dobiveni rezultat. Stoga je pripremljen stanični sustav s utišanim endogenim receptorom NIX koristeći metodu RNA interferencije te su u tom sustavu provedeni funkcionalni eksperimenti utjecaja dimerizacije receptora NIX na aktivaciju mitofagije. U sustavu s utišanim endogenim receptorom NIX, uz WT protein korištene su isključivo funkcionalne mutante proteina NIX: Δ LIR, S212E i Δ LIR S212E.

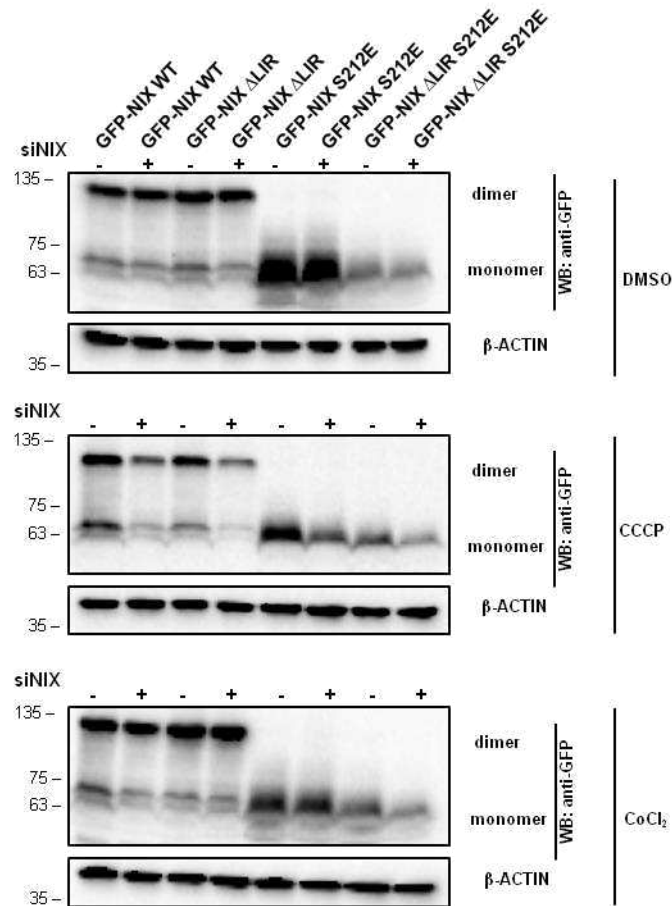
Imunofluorescencijskom mikroskopijom analizirana je regrutacije autofagosoma na oštećene mitohondrije u stanicama HeLa s prethodno utišanim endogenim NIX proteinom i prekomjerno izraženim proteinima GFP-NIX WT, Δ LIR, S212E i Δ LIR S212E. Pokazan je identičan učinak kao i u sustavu s endogenim receptorom NIX. Monomerna S212E mutanta, slično kao i Δ LIR mutanta, pokazuje značajno smanjenu regrutaciju proteina LC3A na mitohondrije u usporedbi s divljim tipom koji ima sposobnost dimerizacije. Nadalje, dvostruka mutanta Δ LIR S212E pokazuje kumulativni učinak nedostatka domene LIR i dimerizacije na regrutaciju autofagosoma pa prema tome regrutira značajno manji broj LC3A vezikula u odnosu na pojedinačne, Δ LIR i S212E mutante, ili pak NIX WT (Slika 39).



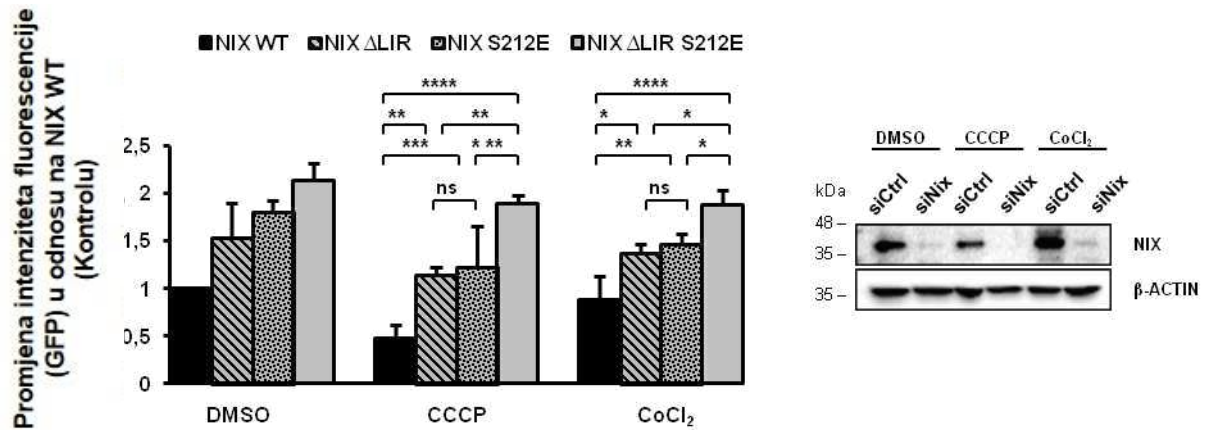
Slika 39. Analiza regrutacije autofagosoma na mitohondrije s prekomjerno izraženim GFP-NIX mutantama (WT, ΔLIR, S212E i ΔLIR S212E) u sustavu s utišanim endogenim receptorom NIX, u uvjetima mitofagije inducirane 10 μM CCCP kemikalijom u trajanju od 2 sata. Napravljena je kvantifikacija LC3A signala u 100 kotransfeciranih stanica za svaku NIX mutantu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD LC3A signala normaliziran u odnosu na broj LC3A signala kod NIX WT u tri neovisna biološka i tehnička eksperimenta. Statistička analiza provedena je *GraphPad Prism 8* alatom korištenjem *one way ANOVA (Tukey's multiple comparisons)* testa. Statistička značajnost: *P < 0.05, **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001; ns, nije značajno; intervali pogreške označavaju standardnu devijaciju, n=3. Desno je prikazan imunoblot s potvrdom utišavanja endogenog receptora NIX u Hela stanicama. Kao kontrola nanošenja količine uzorka korišteno je protutijelo β-AKTIN.

Također je napravljen i eksperiment protočne citometrije kako bi se u sustavu bez endogenog receptora NIX pratilo napredovanje mitofagije i učinkovitost razgradnje mitohondrija u stanicama HEK293 koje izražavaju funkcionalne NIX mutante. Nakon potvrde utišavanja endogenog receptora, HEK293 stanice transfecirane su GFP-NIX WT, ΔLIR, S212E i ΔLIR S212E mutantama i podvrgnute djelovanju 10 μM CCCP ili 100 μM CoCl₂ u trajanju od 24 h kako bi se specifično omogućilo napredovanje mitofagije i uklanjanje mitohondrija iz stanice (Slika 40). Analiza intenziteta fluorescencije proteina GFP pokazala je statistički značajan porast signala u stanicama koje prekomjerno izražavaju dvostruku mutantu ΔLIR S212E, u oba uvjeta inducirane mitofagije, u odnosu na pojedinačne ΔLIR ili S212E mutante. Ovo potvrđuje da je učinkovitost uklanjanja mitohondrija u stanicama s nefunkcionalnom domenom LIR i nemogućnosti dimerizacije značajno smanjena u odnosu na stanice u kojima je funkcionalan barem jedan od mehanizama ili pak u onima koje normalno mogu vezivati proteine LC3 i imaju sposobnost dimerizacije (Slika 41). Identičan učinak prethodno je uočen u sustavu s endogenim NIX što potvrđuje da učinak dimerizacije endogenog NIX nema utjecaj

da dobivene rezultate i još jednom potvrđuje hipotezu da je dimerizacija receptora NIX, posredovana prethodnom defosforilacijom C-terminalnog kraja proteina, novi mehanizam regulacije aktivnosti receptora NIX. Štoviše, za potpunu aktivnost receptora nije nužna samo dimerizacija proteina već i funkcionalna domena LIR što je potvrđeno združenim mehanizmom s dvostrukim mutantama.



Slika 40. Analiza izražaja GFP-NIX WT, Δ LIR, S212E i Δ LIR S212E u stanicama HEK293 s prethodno utišanim endogenim proteinom NIX koje su podvrgnute djelovanju 10 μ M CCCP ili 100 μ M CoCl₂ u trajanju od 24 h. Izražaj GFP-NIX proteina analiziran je anti-GFP protutijelom, a kao kontrola nanošenja količine uzorka na gel korišten je β -AKTIN.



Slika 41. Analiza uklanjanja mitohondrija protočnom citometrijom u sustavu bez endogenog proteina NIX. Analiza je provedena u stanicama koje prekomjerno izražavaju GFP-NIX WT, ΔLIR, S212E i ΔLIR S212E nakon 24 h djelovanja 10 μM CCCP ili 100 μM CoCl₂. Intenzitet fluorescencije za svaku mutantu prikazan je kao srednja vrijednost ± SD normalizirana u odnosu na intenzitet GFP-NIX WT (DMSO). Statistička analiza provedena je *GraphPad Prism 8* alatom korištenjem *two way ANOVA (Tukey's multiple comparisons)* testa. Statistička značajnost: *P = < 0.05, **P = < 0.01; ***P = < 0.001; ****P = < 0.0001; ns, nije značajno; intervali pogreške označavaju standardnu devijaciju, n=3.

5. RASPRAVA

Znanstveni interes za istraživanja na području autofagije, kao neophodnog unutarstaničnog procesa održavanja homeostaze, nezaustavljivo raste. U prilog tome govori i podatak da je od otkrića osnovnih mehanizama autofagije početkom 90-tih godina, pa do Ohsumijeve Nobelove nagrade 2016. godine, samo broj godišnjih publikacija, prema PubMed bazi, porastao s manje od 100 na više od 6000 publikacija godišnje (181). Štoviše, gotovo da nema bolesti koja nije na neki način povezana s poremećenim procesom autofagije (182), a sve češća je i pojava različitih tzv. modulatora autofagije kojima se nastoji djelovati na poremećenu autofagiju s ciljem uspješnog liječenja pojedinih bolesti (168). Selektivna autofagija, a pogotovo mitofagija koja je i najviše proučavani oblik selektivne autofagije, također bilježi sličan trend. Postojanje heterogenosti molekularnih mehanizama mitofagije, od fiziološke mitofagije potpuno funkcionalnih mitohondrija pa preko različitih oblika mitofagije oštećenih i nefunkcionalnih mitohondrija, predstavlja dodatni izazov u istraživanju ovoga procesa.

NIX je prvi opisan receptor selektivnog uklanjanja mitohondrija iz stanice procesom autofagije (104) iako je već i prije njegova funkcija prepoznata važnom u kontekstu terminalne eritropoeze (102,103). Dosadašnja istraživanja ovog proteina više su bila usmjerena na njegovu proapoptotsku funkciju s obzirom da se, zbog posjedovanja domene BH3, NIX svrstava u ne baš uobičajene proteine s jednom domenom BH3 koji su u mogućnosti potaknuti programiranu staničnu smrt, apoptozu (143). Postoji velika strukturna i funkcionalna sličnost između proteina NIX i njegovog homologa BNIP3 čija proapoptotska aktivnost također ovisi o BH3, ali i o transmembranskoj domeni (143,183). Ova dvostruka uloga receptora NIX gdje s jedne strane djeluje kao proapoptotski čimbenik i odvodi stanicu u smrt, a s druge djeluje kao receptor autofagije i omogućava opstanak stanice u uvjetima stresa, čini protein NIX izrazito zanimljivim za istraživanje iako je mehanizam regulacije ova dva stanična procesa posredovan proteinom NIX potpuno nepoznat.

Danas je poznato da je uklanjanje mitohondrija iz retikulocita tijekom sazrijevanja eritrocita ovisno o regrutaciji autofagosoma posredstvom domene LIR, koja se nalazi na N-terminalnom kraju proteina NIX, međutim detaljniji molekularni mehanizmi ovog procesa još uvijek nisu dovoljno poznati. Nepoznato je koji to uzvodni signali dovode do aktivacije receptora i kakav je nizvodni mehanizam djelovanja aktiviranog receptora. Također, potpuno je nejasno na koji se način odabiru i odvajaju oštećeni od zdravih mitohondrija koji se trebaju ukloniti selektivnom autofagijom i koji je točan mehanizam uklanjanja kompletne zdrave mitohondrijske populacije za vrijeme diferencijacije eritrocita.

S obzirom na važnu ulogu proteina NIX tijekom diferencijacije, ali i u održavanju sveobuhvatne homeostaze organizma, te na nedovoljno istraženu pozadinu njegovog molekularnog djelovanja, cilj ove doktorske disertacije je istražiti i objasniti molekularne mehanizme kojima se regulira aktivnost proteina NIX za vrijeme selektivnog uklanjanja mitohondrija iz stanice. Prvi dio istraživanja usmjeren je na proučavanje fosforilacije domene LIR kao mehanizma kojim se aktivira receptor NIX dok se drugi dio bavi novim mehanizmom regulacije, dimerizacijom proteina.

5.1. Fosforilacija domene LIR kao mehanizam regulacije aktivnosti receptora NIX

Fosforilacija je najčešća je reverzibilna post translacijska modifikacija proteina kojom se regulira aktivnost čak 13.000 proteina humanog proteoma (184). Dodavanje negativno nabijenog fosfata na ciljne aminokiseline djeluje kao mehanizam uključivanja ili isključivanja aktivnosti cijelog niza proteina različitih funkcija. U autofagiji, fosforilacijom se regulira aktivnost osnovnog signalnog puta autofagije i to na razini nekoliko ključnih proteina (Slika 3), dok je u selektivnoj autofagiji mitohondrija fosforilacija više puta dokazana kao važan mehanizam regulacije PINK1-Parkin puta kao i receptorom posredovane mitofagije (Slika 5). Kao mehanizam regulacije aktivnosti nekog od receptora selektivne autofagije, fosforilacija je prvi puta opisana za protein Optineurin koji je potreban za uklanjanje ubikvitiranih citosolnih bakterija *Salmonella enteritica*. Fosforilacija čak pet serina uzvodno od domene LIR Optineurina doprinosi jačoj aktivaciji receptora i učinkovitijoj ksenofagiji *Salmonelle* (97). Kasnije studije također potvrđuju sličan mehanizam za receptore BNIP3, p62, NDP52 i TAXBP1, a zanimljivo je to da se kod svih, izuzev proteina BNIP3, fosforilacija ostvaruje djelovanjem kinaze TBK1 (prema engl. *Tank-binding kinase 1*) (97,136,185). S obzirom da su mitohondriji, prema endosimbiotskoj teoriji, potekli od aerobnih bakterija, moguće je da su neki od mehanizama ksenofagije i mitofagije evolucijski konzervirani između bakterija i mitohondrija.

Neposredno uz domenu LIR receptora NIX nalaze se dva serina, S34 i S35 u humanoj sekvenci proteina (Slika 8). S ciljem provjere utječe li fosforilacija ovih aminokiselina na aktivaciju receptora, napravljene su jednostruke i dvostruke serinske mutante koje strukturno nalikuju fosforiliranom serinu (glutaminska i asparaginska kiselina) i mutante koje predstavljaju varijantu koja nije u mogućnosti biti fosforilirana (alanin). Sve mutante u potpunosti lokaliziraju u vanjskoj mitohondrijskoj membrani (Slika 9) i, za razliku od mutante

NIX ΔLIR, vežu proteine LC3A/B (Slika 10) pa se kao takve mogu koristiti za proučavanje funkcionalne važnosti receptora. GST *pull down* analizom interakcija navedenih mutanti s pročišćenim proteinima LC3A i LC3B pokazalo se općenito bolje vezanje proteina LC3A u odnosu na LC3B kao što je i prethodno ustanovljeno (104)). Zanimljivo, sve mutante serina u glutaminsku ili asparaginsku kiselinu, bilo jednostruke ili dvostruke, značajno jače vežu LC3A i LC3B proteine u odnosu na alaninske mutante (Slika 10). Sličan učinak, pokazan je prethodno za protein BNIP3 kod kojeg glutaminske mutante S17 i S24 pokazuju jače vezanje LC3B i GABARAP-L2 proteina u odnosu na alaninske (136).

Međutim, strukturne karakteristike ovog kompleksa, fosforiliranog proteina BNIP3 i proteina LC3B nisu dalje istraživane, stoga su u ovom istraživanju napravljene i dodatne biofizičke analize, s ciljem detaljnijeg uvida u strukturnu prirodu ovih interakcija. Izotermalnom titracijskom kalorimetrijom pokazano je da fosforilirani peptid proteina NIX veže LC3B protein čak 100 puta jače nego nefosforilirani peptid. Poznato je da je LC3B znatno slabiji interakcijski partner u vezanju različitih receptora selektivne autofagije pa tako i receptora NIX (104), u odnosu na ostale poznate Atg8-slične proteine, ali za određivanje detaljnijih interakcija fosforiliranog receptora NIX i autofagosomalnih proteina izabran je upravo najslabiji interaktor LC3B iz nekoliko razloga. Naime, osim što je najbolje istražen od svih proteina iz obitelji Atg8, dosadašnje biokemijske studije interakcija s fosforiliranim varijantama ostalih receptora, BNIP3, Optineurin i p62 napravljene su upravo na LC3B proteinu (97,136,144). Također, za pretpostaviti je da će učinak vezanja fosforiliranog peptida NIX, u odnosu na divlji tip, biti puno izraženiji kod onog proteina kod kojeg je pokazano najslabije vezanje. Detaljna analiza kristalne strukture kompleksa NIX-LIR^{S34,35E}-LC3B²⁻¹¹⁹ pokazala je postojanje dviju simetričnih molekula kompleksa (molekula A i B). Kod obje molekule u interakciji sudjeluje isti dio proteina NIX, W36, V37 i L39, dok je aktivni dio LC3B fragmenta samo donekle sličan. Naime, hidrofobni džep proteina LC3B u molekuli A tvore I23, P32, K49, K51, F52, L53, I66 i F108 dok je u molekuli B hidrofobni džep sastavljen od I23, K49, K51, F52, L53, L63, L66 i F108. Kristalna struktura kompleksa pokazuje da D34, fosforiliranog peptida NIX, sudjeluje u stvaranju interakcija s R10 i K51 u proteinu LC3B, a moguće je da u stabilizaciji kompleksa sudjeluje i blizak pozitivni bočni ogranak R11. U molekuli A vidljiva je interakcija između K49 LC3B fragmenta i D35 na peptidu NIX (Slike 11 i 12). Posljednja interakcija važna je za stvaranje kompleksa Atg13LIR:LC3A. Ovaj kompleks važan je za sam početak stvaranja autofagosoma pri čemu protein LC3 izravno veže dio kompleksa ULK1 i to

protein Atg13, preko C-terminalne domene LIR (186). Pri tome, bočni ogranak K49 u proteinu LC3A regulira vezanje domene LIR proteina Atg13 preko tzv. *gating* mehanizma u kojem se prilikom stvaranja kompleksa bočni ogranak K49 pomiče kako bi otvorio vezno mjesto na hidrofobnom džepu proteina LC3A i stvorio mjesto vezivanja V445 na domeni LIR proteina Atg13 (187). Uz strukturnu potvrdu, biokemijska *pull down* analiza s mutantama proteina LC3B (R10, R11, K49 i K51), pokazala je važnost K51 u vezanju fosforiliranog proteina NIX pa je tako u mutanti K49A inaktiviran *gating* mehanizam koji rezultira neometanim i jačim vezanjem svih oblika proteina NIX, uključujući i fosforilirane varijante. Nadalje, mutiranjem R11 i K51 u alanin u proteinu LC3B, značajno se smanjuje sposobnost vezanja NIX S34,34E u odnosu na divlji tip proteina LC3B, što potvrđuje važnost ovih aminokiselinskih ostataka na proteinu LC3B u postizanju interakcija s fosforiliranim proteinom NIX. Mutanta R10A nije pokazala značajnu promjenu u vezanju proteina NIX u odnosu na divlji tip iako se u biofizičkim analizama pokazala važnom. To ukazuje na moguću veću *in vitro* važnost ovog aminokiselinskog ostatka u vezanju fosforiliranog proteina NIX u odnosu na *in vivo* (Slika 13).

Već je 2008. godine prva NMR spektroskopska analiza objasnila detaljnu interakciju nekog receptora selektivne autofagije. U toj studiji, analizom proteina p62 i LC3, pokazano je kako se ostvaruje interakcija putem aminokiselinske regije 335–345 proteina p62 koja zahvaća i njegovu domenu LIR te bočnih ogranaka D19, I23, P32, I34, K51, L53 i F108 prvog i F52, V54, P55, L63, I66 i I67 drugog hidrofobnog džepa proteina LC3. Tripeptidni niz asparaginskih kiselina, smještenih uzvodno od domene LIR proteina p62, pospješuje stabilnost kompleksa p62:LC3 stvarajući interakcije s aminokiselinskim ostacima R10 i R11 proteina LC3 (188). Izrazita sličnost vidljiva je uspoređujući aminokiselinski sastav hidrofobnih džepova proteina LC3B dobiven u našoj studiji s proteinom NIX što još jednom ukazuje na evolucijsku konzerviranost molekularnih mehanizama različitih oblika selektivne autofagije (Slika 11). Tome u prilog doprinosi i analiza kristalne strukture interakcije proteina Atg19 i Atg8, homologa proteina p62 i LC3 kod kvasca (189), koja je gotovo identična prethodno navedenoj analizi interakcija p62:LC3 (188).

Slična biofizička karakterizacija napravljena je za interakcije receptora mitofagije FUNDC1 i proteina LC3B. FUNDC1 posjeduje tipični motiv LIR (Y18-E19-V20-L21) na N-terminalnom kraju koji strši u citoplazmu. U fiziološkim uvjetima, S13, koji se nalazi uzvodno od domene LIR, fosforiliran je djelovanjem kinaze CK2 (prema engl. *casein kinase 2*) dok je Y18 fosforiliran kinaznom aktivnošću kinaze SRC (prema engl. *Src-family kinase*). Čini se da

ove dvije fosforilacije inhibiraju interakciju s proteinima LC3 i sprječavaju mitofagiju. Usljed hipoksije, fosfataza PGAM5 (prema engl. *phosphoglycerate mutase 5*) uklanja fosfat čime defosforilira receptor koji je zatim u mogućnosti vezati proteine LC3 i na taj način dovesti do aktivacije mitofagije (105,110). Ovaj mehanizam vezanja proteina LC3, ovisan o defosforilaciji domene LIR, u potpunosti je suprotan vezanju ostalih receptora s domenom LIR kod kojih fosforilacija povećava afinitet za vezanje proteina autofagije i pospješuje njeno napredovanje (97,136,190).

Biofizičke analize interakcija proteina FUNDC1 i LC3B također su, kao i naša studija, pokazale važnost K49 i K51 proteina LC3B u stvaranju kompleksa FUNDC1:LC3B. Međutim ova studija pokazuje da za razliku od prethodno proučavanih LIR:LC3B interakcija (187,188), domena LIR proteina FUNDC1 (Y18-E19-V20-L21) u ovom kompleksu poprima neobičnu konformaciju. Takva konformacija razlikuje se po tome što se kod receptora FUNDC1 treća aminokiselina u domeni LIR, hidrofobni V20, nalazi umetnut u HP1 hidrofobni džep, dok kod ostalih receptora taj ostatak strši izvan HP1 džepa. Kao rezultat navedenog, prva aromatska Y18 aminokiselina u domeni LIR receptora FUNDC1 pomaknuta je u stranu i ne uspijeva ući duboko u HP1 džep, kao što je slučaj kod ostalih receptora, već se nalazi u bliskom kontaktu s D19 u HP1 džepu. Logično, SRC fosforilacijom Y18 dolazi do elektrostatskog odbijanja fosfatne grupe i bočnog ogranka D19 što remeti inače stabilan kompleks fosforilirane domene LIR i proteina LC3. Uz konzervirane Y18 i L21 LIR domene, prethodno spomenuti S13 koji je fosforiliran djelovanjem kinaze CK2 također pridonosi elektrostatskom odbijanju i nepovoljno djeluje na stvaranje kompleksa i započinjanje mitofagije (191). Zanimljivo, FUNDC1 pokazuje najveći afinitet za vezanje proteina LC3B iako vezuje i ostale homologe (105) za razliku od receptora NIX kod kojeg je afinitet za vezanje proteina LC3B izrazito nizak (104) i (Slike 10 i 13). Moguće je da ova razlika proizlazi upravo iz strukturnih karakteristika kompleksa NIX:LC3B i FUNDC1:LC3B, a upućuje na mogućnost specifične regulacije pojedinih oblika receptorom-potaknute mitofagije ovisno o prisutnosti pojedinih vrsta receptora mitofagije i proteina autofagije.

Konačno, u ovoj disertaciji istražena je i funkcionalna uloga stabilnog kompleksa fosforiliranog receptora NIX i proteina LC3 na staničnoj razini. Rekrutacija autofagosoma na mitohondrije podvrgnute tretmanu CCCP, pokazala je da se značajno veći broj LC3 pozitivnih vezikula nakuplja u stanicama koje prekomjerno izražavaju mutante proteina NIX kojima je fosforilirana domena LIR, NIX S34,35D i NIX S34,35E, u odnosu na stanice s divljim tipom

proteina ili nefosforiliranom LIR mutantom, NIX S34,35A. Ipak, u odnosu na mutantu kojoj u potpunosti nedostaje domena LIR, sve ostale mutante pokazuju značajnije veću regrutaciju autofagosoma (Slike 14 i 15). Ovo upućuje na zaključak da je za uspješnu funkciju proteina NIX, u smislu receptora selektivne autofagije i inicijacije mitofagije, nužna funkcionalna domena LIR te da je receptor dodatno reguliran i aktiviran fosforilacijom serina uzvodno od domene LIR. Rezultati pokazuju da, osim inicijacije mitofagije, fosforilacija receptora NIX doprinosi i učinkovitijem napredovanju mitofagije odnosno boljem uklanjanju oštećenih mitohondrija iz stanica (Slika 16).

Na kraju, rezultati ovoga dijela doktorske disertacije sugeriraju da fosforilacija serina 34 i serina 35, u neposrednoj blizini domene LIR, djeluje kao mehanizam aktivacije receptora NIX te omogućava jače vezanje proteina LC3. Posljedica toga je uspješnija aktivacija NIX-posredovane mitofagije i učinkovitije uklanjanje mitohondrija. Čini se da je fosforilacija domene LIR univerzalni mehanizam aktivacije većine do sada istraživanih receptora selektivne autofagije. Tako djelovanjem kinaze TBK1, proteini OPTN i NDP52 bivaju fosforilirani prilikom uklanjanja bakterija iz stanice čime se pospješuje učinak ksenofagije (97,185). Nadalje, fosforilacija S17 i S24 domene LIR proteina BNIP3 doprinosi jačem vezanju proteina LC3B i GABARAP-L2 i inducira mitofagiju, ali također definira ulogu proteina kao receptora mitofagije. Kada domena LIR nije fosforilirana, receptor BNIP3 djeluje kao klasični protein s BH3 domenom i potiče apoptozu (136). Za sada, jedini izuzetak predstavlja protein FUNDC1 kod kojeg fosforilacija ima negativan učinak na vezanje proteina autofagije i aktivaciju mitofagije (105).

S obzirom da većina receptora selektivne autofagije, uključujući i nedavno opisane receptore mitofagije poput AMBRA1 i BCL2L13 ili kvašćevog Atg32, imaju izrazito konzerviranu domenu LIR s nekoliko okolnih serina, bilo bi jako zanimljivo ispitati predloženi mehanizam i kod ovih proteina. Vezano za NIX, sljedeće studije trebale bi biti usmjerene na određivanje kinaza koje reguliraju fosforilaciju S34 i S35. Kao kandidat iz naše preliminarne studije nameće se kinaza GSK3 β (prema engl. *glycogen synthase kinase-3 β*) jer sekvenca domene LIR i okolnih aminokiselina odgovara predviđenom fosforilacijskom mjestu djelovanja kinaze GSK3 β . Također, ovaj protein povezuje se s regulacijom cijelog niza aktivnosti vezanih za mitohondrije, od mitohondrijske biogeneze, stvaranja energije, dinamike pa do regulacije apoptoze (192). Osim navedenog, zanimljivo bi bilo istražiti funkciju serina nizvodno od domene LIR receptora NIX, S43 i S44, u regulaciji aktivnosti NIX-posredovane mitofagije.

Zbog neposredne blizine domene LIR moguće je da njihova fosforilacija/defosforilacija također utječe na vezanje autofagosomalnih proteina kao što je to slučaj kod Optineurina i proteina BNIP3 (97,136).

5.2. Regulacija aktivnosti receptora NIX mehanizmom dimerizacije

Studija Novak i sur. (2010) ukazala je na mogućnost da uz LIR mehanizam postoje i dodatni mehanizmi regulacije aktivnosti receptora NIX s obzirom da *Nix*^{-/-} miševi koji su transducirani s potpuno funkcionalnim receptorom *Nix* ipak ne pokazuju potpuno uklanjanje mitohondrija iz retikulocita tijekom terminalne eritropoeze. Ista studija, prva je koja je predložila funkcionalnu važnost dimera proteina NIX, iako je od prije poznato da protein NIX, slično kao i njegov homolog protein BNIP3, u poliakrilamidnom gelu migrira kao monomer veličine ~42 kDa i kao zastupljeniji dimerni oblik veličine ~80 kDa. Nadalje, pokazano je i da su u stanicama zajedno izraženi proteini NIX i BNIP3 sposobni stvarati stabilne heterodimere veličine ~65 kDa (104,139). Dimerizacija ovih proteina do sada nije istraživana, međutim poznato je da je domena TM proteina NIX i BNIP3 onaj dio proteina koji je neophodan za uspješno stvaranje dimera kao i za njihovo pravilno smještanje u vanjsku mitohondrijsku membranu. To ukazuje da je lokalizacija na mitohondriju nužan, ali ne i jedini preduvjet za uspješnu dimerizaciju receptora (137,138).

U drugome dijelu ove studije istražena je moguća uloga dimerizacije receptora NIX u regulaciji mitofagije. Kako bi bilo moguće proučavati dimerizaciju receptora, napravljene su mutante proteina NIX koje nemaju mogućnost dimerizacije i koje za razliku od divljeg tipa u poliakrilamidnom gelu migriraju isključivo kao monomerni oblici proteina. Ove mutante proizvedene su na temelju biofizičke studije napravljene na homolognom receptoru, proteinu BNIP3, čija domena TM uvelike nalikuje domeni TM proteina NIX (140) i (Slika 17). Ovom studijom određeni su važni aminokiselinski ostaci u mišjoj varijanti receptora BNIP3, S¹⁷²H¹⁷³XXA¹⁷⁶XXL¹⁷⁹G¹⁸⁰XXI¹⁸³G¹⁸⁴, čija pojedinačna supstitucija dovodi do gubitka dimerizacije. Ekvivalenti ovih aminokiselinskih supstitucija, napravljeni su u sekvenci humanog proteina NIX, međutim od svih provjerenih mutanti jedino su mutante G204A i G208V pokazale ključni gubitak dimerizacijske sposobnosti receptora (Slike 19 i 20). Za razliku od gubitka dimerizacije kod proteina BNIP3 (Slika 18), mutante H197A i A200L, u receptoru NIX pokazuju identični obrazac dimerizacije kao i divlji tip, monomer veličine ~63

kDa i dimer veličine ~135 kDa² (Slika 19). Važnost G204A i G208V u regulaciji dimerizacije receptora je i očekivana s obzirom da se ove aminokiseline nalaze u sastavu tzv. glicinskog zatvarača, niza od pet aminokiselina omeđenih krajnjim glicinima, GxxxG, koje nerijetko susrećemo u transmembranskim proteinima koji oligomeriziraju (147,148,193). Dodatna potvrda važnosti marginalnog TM pentapeptida, G²⁰⁴I²⁰⁵Y²⁰⁶I²⁰⁷G²⁰⁸, je i mutanta NIX G202A, koja pokazuje identičnu pojavnost u poliakrilamidnom gelu kao i divlji tip NIX (Slika 20).

S obzirom da se radi o receptoru selektivne autofagije, smještenom u vanjskoj mitohondrijskoj membrani, ali i da se ključne aminokiseline odgovorne za dimerizaciju, G204 i G208, nalaze unutar domene TM koja je neophodna za pravilnu lokalizaciju receptora (137) nužan preduvjet za ispitivanje funkcije dimerizacije proteina NIX u regulaciji mitofagije jest potvrda da dimerizacijske mutante, G204A i G208V, usprkos uvedenim supstitucijama i dalje pravilno lokaliziraju u vanjskoj mitohondrijskoj membrani (Slike 22 i 23). Upravo iz ovog razloga sve navedene dimerizacijske mutante, kao i divlji tip, mogu se proučavati u kontekstu funkcionalnih receptora.

Oba oblika proteina NIX, monomer i dimer, pokazuju izrazitu stabilnost u denaturirajućim uvjetima nastalim djelovanjem jakih detergenata i dugoj izloženosti visoke temperature (Slika 21). Promatrajući stabilnost divljeg tipa receptora, jasno se uočava da je obrazac gubitka stabilnosti identičan za monomer i dimer te da oba oblika započinju denaturaciju tek nakon 120 min. Štoviše, denaturacijom dimernog oblika ne povećava se količina monomera u uzorku što ukazuje na podjednaku stabilnost oba oblika proteina te predlaže da je protein NIX sam po sebi stabilan i da za postizanje stabilnosti nije nužna asocijacija s drugim proteinima.

GST *pull down* analizom pokazano je da sve mutante TM vežu proteine LC3/GABARAP u onom obliku u kojem se nalaze prekomjerno izražene u stanici, bilo kao monomer i dimer ili isključivo kao monomer, kao što je to slučaj u TM dimerizacijskih mutanti G204A i G208V. Potpuni gubitak sposobnosti vezanja vidljiv je jedino kod mutante ΔLIR (W35A) kao što je to prethodno pokazano prilikom proučavanja fosforilacije domene LIR (Slike 10 i 25). Prema tome, dimerizacija receptora ne remeti sposobnost vezanja proteina autofagije i to najvjerojatnije stoga što u stvaranju dimera nije uključena domena LIR receptora na N-terminalnom kraju već domena TM na krajnjem C-terminalnom dijelu (Slike 24 i 25). Međutim, s obzirom da se dimerizacijom receptora u blizak kontakt dovode dvije domene LIR,

² Veličine se odnose na GFP fuzijske varijante proteina NIX

napravljena je kvantifikacija kojom je uspoređena razlika afiniteta vezanja NIX dimera i monomera s pročišćenim LC3A. Kvantifikacijom je pokazano da dimer receptora ima značajno veći afinitet vezanja za LC3A od njegovog monomernog oblika, a taj se obrazac vezanja pokazao istim i za divlji tip receptora kao i TM mutantu G202A (Slika 24). Dobiveni rezultat u skladu je s rezultatima studije provedene na oligomerizaciji p62 proteina (194). Iako drugačijim metodološkim pristupom ova studija pokazala je da se oligomerizacijom proteina p62 dodatno stabiliziraju interakcije proteina LC3B i linearnih ubikvitinskih lanaca. S obzirom da je p62 monomer u mogućnosti vezati isključivo monoubikvitinirane supstrate, mehanizam oligomerizacije povećava učinkovitost vezanja poliubikvitiniranih supstrata i njihovu jaču regrutaciju na autofagosome.

Nadalje, ispitan je učinak dimerizacije receptora NIX na proces mitofagije. Kako dimer proteina NIX jače veže protein LC3A, pretpostavljeno je da će dovođenje autofagosoma na oštećene mitohondrije biti uspješnije kod onih stanica koje izražavaju dimer receptora. Imunofluorescencijska analiza regrutacije autofagosoma doista je pokazala značajno veći broj LC3 signala kod WT i G202A transfeciranih stanica u odnosu na one koje izražavaju dimerizacijsku mutantu G204A. Iako je prisutna i u dimernom obliku, Δ LIR mutanta pokazuje znatno smanjenje u dovođenju autofagosoma na mitohondrije u odnosu na ostale proteine NIX koji se izražavaju i u dimernom obliku što je u skladu s prethodno objavljenim rezultatima (104). Štoviše, u odnosu na mutantu G204A, razina regrutacije nije značajno različita što upućuje da su mehanizmi LIR-ovisnog vezanja proteina LC3 i dimerizacije receptora jednako važni za inicijaciju mitofagije (Slika 26). Ovo otvara novo pitanje vezano za regulaciju NIX-posredovane mitofagije: u kakvom su odnosu ova dva mehanizma i kakav je njihov kumulativni učinak na učinkovitost započinjanja i dovršetka mitofagije?

Prema dobivenim rezultatima, osim inicijacije, dimerizacija proteina NIX je i mehanizam kojim se pospješuje završna faza mitofagije. Naime, uklanjanje mitohondrija praćeno protočnom citometrijom, pokazalo je veći gubitak fluorescencijskog signala u stanicama transfeciranim divljim tipom proteina NIX u usporedbi s obje monomerne mutante, G204A i G208V, što znači da je mitofagija uspješnija u slučaju prisutnosti dimernog receptora. Nedostatak domene LIR slično djeluje kao i gubitak dimerizacije te ovo dodatno potvrđuje pretpostavku da su netaknuta domena LIR i dimerizacija receptora neophodne za učinkovitu inicijaciju i progresiju mitofagije (Slika 27).

S obzirom na rezultate, izvjesno je da dimerizacija receptora NIX ima ulogu u uspješnijem vezanju proteina autofagije, boljoj regrutaciji autofagosoma na oštećene mitohondrije te konačno na učinkovitije uklanjanje mitohondrija iz stanice. Opisane uvedene mutacije u domeni TM nisu očekivani biološki događaj te s obzirom da je evidentno da se dimerizacijom regulira aktivnost proteina NIX, sljedeći korak u ovome istraživanju uključivao je određivanje fiziološkog mehanizma koji je u podlozi dimerizacije receptora.

Krajnji C-terminalni dio proteina NIX nalazi se u prostoru između vanjske i unutarnje mitohondrijske membrane i sastavljen je od samo 11 aminokiselina. U njihov sastav uključena su čak tri serina, dva treonina i jedan tirozin, aminokiseline koje se potencijalno mogu fosforilirati (Slika 28), a kako je u međumembranskom prostoru čitav niz regulatora apoptoze, za koje je već od prije poznato da stupaju u interakciju s proteinom NIX, moguće je da se upravo u međumembranskom C-terminalnom dijelu proteina NIX odvija regulacija suprotnih uloga receptora, aktivacija apoptoze i autofagije, mehanizmom fosforilacije.

Provjerom prekomjernog izražavanja pojedinačnih mutanti C-terminalnog kraja proteina NIX (S212A, S212D, T213A, T213D, S215A, S215D, S217A, S217D, T218A, T218D i Y219A, Y219D) kod nekih mutanti asparaginskih kiselina primijećen je gubitak dimernog oblika receptora koji se normalno javlja u divljem tipu proteina ili C-terminalnim alaninskim mutantama. Zanimljivo, jedini potpuni gubitak dimerizacije, onakav kakav je prethodno određen za mutante TM, G204A i G208V, zabilježen je kod mutante S212D. Ostale mutante, posebno one bliže C-terminalnom kraju, imaju fenotip divljeg tipa, dok mutante asparaginskih kiselina bliže S212 pokazuju samo djelomičan gubitak dimernog oblika proteina (Slika 29). Ovaj rezultat predlaže da je dimerizacija receptora NIX zapravo regulirana defosforilacijom međumembranskog S212 i da prisutnost negativnog fosfata na fosforiliranim susjednim S212 uzrokuje elektrostatska odbijanja proteina u dimeru i nastanak monomernog oblika (kao što je slučaj u mutanti NIX S212D). Ipak, zanimljiv je podatak da i mutante s fosforiliranim susjednim potencijalnim mjestima fosforilacije (T213D, S215D i S217D), uz nepromijenjeni S212, pokazuju fenotip koji se razlikuje do uobičajenog fenotipa divljeg tipa receptora NIX. Kako navedene mutante ipak nemaju potpuni gubitak dimernog oblika, u daljnjoj analizi uključene su samo mutante S212. Međutim, ovaj rezultat svakako bi trebalo detaljnije istražiti jer postoji mogućnost da je za potpunu aktivnost dimernog oblika receptora potrebna defosforilacija više uzastopnih fosforiliranih mjesta. Štoviše, čini se da je u regulaciji selektivne autofagije često prisutan mehanizam istovremene višestruke fosforilacije/defosforilacije. Primjer toga je i

dvostruka fosforilacija serina uz domenu LIR receptora OPTN1, BNIP3 (97,136), ali i receptora NIX koja je pokazana u prvome dijelu ove studije.

Očekivano, obje S212 mutante proteina NIX pokazuju sposobnost vezanja LC3A proteina (Slika 31) te kao i do sada korištene mutante u potpunosti lokaliziraju u vanjskoj mitohondrijskoj membrani (Slika 32) ili su izolirane isključivo u mitohondrijskoj frakciji (Slika 33). Ispunjenje ovih kriterija, vezanje proteina autofagije i pravilne lokalizacije, dozvoljavaju da se NIX S212A i NIX S212D mutante mogu proučavati u kontekstu receptora mitofagije. Učinkovitost vezanja proteina LC3A, kao i kod divljeg tipa proteina ili mutante TM G202A, ponovno je značajno veća za dimer S212A u odnosu na monomer (Slika 31).

Prekomjerno izražena mutanta NIX S212D značajno smanjuje inicijaciju i progresiju mitofagije. Imunofluorescencijskom analizom razina regrutacije LC3A pozitivnih vezikula u GFP NIX S212D stanicama ne razlikuje se od regrutacije autofagosoma kod dimerizacijske TM mutante G204A pa se može zaključiti da fosforilacija S212 ima isti funkcionalni učinak na inicijaciju mitofagije kao i dimerizacija receptora ostvarena transmembranskom domenom (Slika 34). Također, napredovanje mitofagije značajno je smanjeno kod fosforiliranog S212 čak i u slučaju kada je mitofagija potaknuta kemijski izazvanom hipoksijom djelovanjem CoCl_2 (Slika 35). Konačno, ovim rezultatima potvrđuje se hipoteza studije o funkcionalnoj važnosti dimerizacije receptora NIX u aktivaciji mitofagije. Dimerizacija proteina NIX ostvaruje se posebnim regulacijskim mehanizmom defosforilacije S212 na C-terminalnom međumembranskom dijelu, čija je posljedica veća regrutacija autofagosoma na oštećene mitohondrije, jače vezanje proteina autofagosoma za receptor i učinkovitije uklanjanje mitohondrija iz stanice.

Važnost domene LIR i dimerizacije receptora pokazali su se kao učinkoviti mehanizmi za uspješnu NIX-posredovanu mitofagiju. Iako značajno doprinose boljem uklanjanju mitohondrija, niti jedan od ovih mehanizama zasebno nije dostatan za potpuno uklanjanje mitohondrija kakvo je neophodno npr. prilikom terminalne diferencijacije eritrocita. Kombinirajući ova dva mehanizma i analizom dvostrukih Δ LIR/dimerizacijskih mutanti (Δ LIR G204A, Δ LIR S212A i Δ LIR S212D) ustanovljen je njihov kumulativni učinak na inicijaciju i progresiju mitofagije (Slika 38) nakon što su prethodno potvrđeno pravilno izražavanje i smještanje mutanti NIX u stanici te regrutacija LC3A vezikula (Slika 37). Svaka od kombiniranih mutanti pokazala je značajno veću regrutaciju autofagosoma na mitohondrije od njihovih pojedinačnih LIR i dimerizacijskih mutanti, koje međusobno i ne pokazuju značajnu

razliku u regrutaciji (Slika 38). Također, identičan rezultat pokazan je u sustavu s utišanim endogenim proteinom NIX (Slike 39 i 41) iako je ovom prilikom kombinirani efekt LIR-ovisne regrutacije autofagosoma i dimerizacije receptora ispitan isključivo na razini tzv. fizioloških mutanti NIX proteina, Δ LIR, S212D i Δ LIR S212D. Ovim je potvrđena ispravnost modela koji je korišten u cijeloj studiji, tzv. prekomjerno izraženi sustav, te je dokazano da endogeni protein NIX koji također posjeduje dimerni oblik nema značajnog utjecaja na dobivene rezultate.

Dobivenim rezultatima pokazano je da je dimerizacija receptora mitofagije proteina NIX novi mehanizam kojim se regulira njegova aktivnost u stanici. Novi mehanizam dimerizacije receptora jako je sličan od prije opisanoj tendenciji nekih receptora selektivne autofagije da oligomeriziraju (195). Ovakvim načinom organizacije olakšava se i pospješuje pakiranje citoplazmatskog sadržaja za razgradnju u rastući autofagosom, a do sada je mehanizam opisan kod uklanjanja oštećenih mitohondrija u sisavaca putem p62 receptora (145,196) ili prilikom agregacije u stanicama sisavaca (197), ali i u mozgu vinske mušice (198). Onemogućavanje oligomerizacije receptora, dovodi do stvaranja inkluzijskih tijela koji sadržavaju poliubikvitinirane proteinske agregate koji su karakteristično obilježje brojnih neurodegenerativnih bolesti poput Parkinsonove ili Alzheimerove (144,198,199). Također, nije isključena mogućnost da upravo i NIX stvara oligomere, pogotovo ako imamo na umu da je početno NIX opisan kao proapoptotski protein, a poznato je da upravo brojni proteini uključeni u regulaciju apoptoze na mitohondrijskoj membrani često stvaraju oligomerne strukture. Ipak, u našim laboratorijskim uvjetima još uvijek nismo uspjeli dokazati prisutnost mogućih NIX oligomera. Činjenica da kombinirani mehanizam LIR ovisne regrutacije autofagosoma i dimerizacije receptora NIX doprinosi većoj, ali još uvijek necjelovitoj aktivaciji receptora i potpunoj mitofagiji, ostaje mogućnost da postoje i dodatni mehanizmi regulacije u koje bi se s opravdanim razlozima mogla uključiti i oligomerizacija receptora.

U kontekstu funkcionalne važnosti dimerizacije receptora mitofagije, svakako je važno osvrnuti se na rezultate rada Liu i Frazier (2015) (200). U ovome radu pokazano je da fosforilacija C-terminalnog kraja proteina BNIP3, dovodi do cijelog niza molekularnih događaja koji su u suprotnosti s fenotipskim obilježjima koji prethode mitofagiji. Tako fosforilacija, u ovome slučaju inhibira oštećenja mitohondrija, gubitak mitohondrijskog potencijala i nakupljanje reaktivnih oblika kisika te u konačnici sprječava uklanjanje mitohondrija iz stanice. Uz navedeno, zabilježena je manja regrutacija GFP-LC3A pozitivnih vezikula u usporedbi sa stanicama koje prekomjerno izražavaju mutante s nefosforiliranim C-

terminalnim krajem. Zanimljivo, čini se da se fosforilacijom C-terminalnog kraja proteina BNIP3 zapravo regulira njegova proapoptotska aktivnost, a ova regulacija se dovodi u vezu s interakcijama receptora BNIP3 i proteina uključenih u regulaciju mitohondrijske dinamike, poput proteina OPA1. Protein OPA1 jedan je od ključnih faktora fuzije unutarnje mitohondrijske membrane te je u stabilnoj interakciji s proteinom BNIP3 čije su interakcije važne su za fragmentaciju mitohondrija te indukciju apoptoze (201,202). Fosforilacija C-terminalnog kraja receptora BNIP3 uvelike narušava OPA1-BNIP3 interakcije, čime protein OPA1 ostaje slobodan i aktivan u svojoj ulozi poticanja fuzije mitohondrijske membrane, a posljedica toga je inhibicija apoptoze. Ipak, u ovome radu, fosforilacija C-terminalnog kraja proteina BNIP3 ne dovodi se u vezu s dimerizacijom receptora. Uspoređujući razlike molekularnih obilježja do kojih dovode fosforilacija i defosforilacija C-terminalnog kraja proteina BNIP3, a koji se u ovome slučaju povezuju s apoptozom kod fosforilirane varijante receptora, nailazimo na poveznicu s rezultatima dimerizacije proteina NIX iz ove disertacije. Defosforilacija S212 krajnjeg C-terminalnog dijela proteina NIX dovodi do dimerizacije receptora i aktivacije mitofagije, dok je monomer proteina manje aktivni oblik receptora, u kontekstu mitofagije. Ipak, imajući na umu da i NIX djeluje kao proapoptotski protein, moguće je, s obzirom na objedinjene rezultate (200) i ove disertacije, da se upravo regulacija njegove proapoptotske uloge i uloge u autofagiji, odvija preko kombiniranog mehanizma fosforilacije Ser212 i dimerizacije receptora. Upravo bi ovo bio ključni događaj koji određuje u kojem će se smjeru stanična sudbina u stanju stresa stanica odvijati: hoće li autofagijom žrtvovati pojedine komponente na račun opstanka čitave stanice ili će aktivirati mehanizme apoptoze i tako krenuti u programiranu staničnu smrt.

Nadalje, fiziološka uloga fosforilacije C-terminalnog kraja receptora NIX, potvrđena je u studiji da Silva Rosa koja je, kao još uvijek neobjavljeni rad, dostupna u bioRxiv bazi. Prema ovome radu, povećana izražajnost proteina NIX uslijed masne dijeta, dovodi se u vezu s poremećenom mitohondrijskom dinamikom (fizijom), indukcijom mitofagije i poremećenom funkcijom mitohondrija (203). Čini se da su prekomjerno nakupljanje lipida (lipotoksičnost) i disfunkcija mitohondrija ključni čimbenici koji dovode do inzulinske rezistencije u mišićnim stanicama, a posljedica ove rezistencije su razvoj pretilosti ili dijabetesa tipa 2 (204–206). Proučavajući mehanizam djelovanja proteina NIX u ovom procesu, *in silico* analizom, pronađen je konzervirani konsenzus motiv fosforilacije PKA (prema engl. *protein kinase A*) koji uključuje upravo S212 na C-terminalnom dijelu proteina NIX. Masenom spektrometrijom

i kristalnom analizom potvrđeno je da se jedino fosforilacija ovog aminokiselinskog ostatka, od potencijalnih šest na C-terminalnom kraju, ostvaruje djelovanjem navedene kinaze. Za napomenu, ovo posljednje bila je i sumnja u našoj studiji, s obzirom da smo imunoblot analizom primijetili djelomičan gubitak dimerizacije i kod T213D, S215D i S217D mutanti proteina NIX iako smo, zbog jasno definiranog monomera S212D mutante, konačno u analizu uvrstili samo S212 (Slika 29). Prema iznesenoj studiji, PKA fosforilacija S212 ima inhibitorni učinak na aktivaciju NIX-posredovane mitofagije te aktivira normalnu inzulinsku signalizaciju i predlaže da bi se modulacijom aktivnosti receptora NIX moglo utjecati na inzulinsku rezistenciju u mišićnim stanicama. Zaključno, iako studija ne navodi da je posljedica PKA fosforilacije S212 zapravo gubitak dimerizacije proteina NIX, rezultati su u skladu s rezultatima naše studije i potvrđuju hipotezu da dimerizacija receptora, nastala kao posljedica defosforilacije S212, aktivira receptor NIX i pospješuje NIX posredovano uklanjanje mitohondrija iz stanice. Štoviše, otkriven je i uzvodni signal, PKA fosforilacija, koja regulira aktivnost receptora te je objašnjena fiziološka uloga ovog procesa koja dovodi do uspostavljanja normalne inzulinske rezistencije u miocitima.

Preliminarna i neobjavljena studija Wu i sur., iznosi funkcionalnu važnost NIX dimera i to u aktivaciji mitofagije prilikom regeneracije neurona nakon moždanog udara. Autofagijom se naime uklanjaju oštećeni mitohondriji te se na taj način sprječava mitohondrijima-posredovana aktivacija apoptoze i odumiranje neurona zahvaćanih moždanim udarom (207,208). Ovo posljednje potvrđuje i našu pretpostavku da bi dimerizacija receptora NIX mogla biti mehanizam kojim se regulira njegova funkcija receptora mitofagije kao i proapoptotska funkcija. Ukratko, navedena studija *in vitro* i *in vivo* eksperimentima na mišjem modelu ishemije mozga pokazuje kako monomeri proteina, mišje Nix S195A i G203A mutante, ne uspijevaju reaktivirati mitofagiju u onoj mjeri kao divlji tip Nix koji je u stanici prisutan i kao dominantniji dimerni oblik. Ipak, primijećeno je da je razina mitofagije u regijama mozga zahvaćenih infarktomb uvelike smanjena u odnosu na zdravi dio. Osim toga, u zahvaćenim dijelovima uočena je značajno veća pojavnost ubikvitiranog dimera proteina Nix. Ovakav ubikvitinirani Nix dimer podložniji je proteasomalnoj razgradnji od neubikvitiniranog Nix monomera čime se razina Nix-posredovane mitofagije značajno smanjuje. Djelovanjem proteasomalnih inhibitora koji nisu neurotoksični, poput karfilzomiba, moguće je blokirati razgradnju NIX dimera i reaktivirati mitofagiju potrebnu za oporavak oštećenih neurona. Stoga,

bi stabilizacija NIX dimera i reaktivacija mitofagije mogla bila izvrsna terapijska strategija u oporavku neurona nakon moždanog udara.

Hipoteza dijela doktorske disertacije, usmjerenog na dimerizaciju receptora NIX kao novog mehanizma regulacije njegove aktivnosti, dodatno je potvrđena i rezultatima navedenih studija (200) te dvjema neobjavljenim (de Rosa i sur.) i (Wu i sur.). Osim toga, neke od njih temelje se na pravim patološkim modelima i ukazuju na funkcionalnu važnost dimerizacije receptora *in vivo*. Štoviše, postavljaju NIX dimer kao neizravnu terapijsku metu za uspješni oporavak oštećenih neurona. Ipak, sve one otvaraju i niz novih pitanja, a posebno onih koji se odnose na uzvodne mehanizme signalizacije NIX-posredovane mitofagije. Prvenstveno koja kinaza aktivira NIX i doprinosi fosforilaciji serina uzvodno od LIR domene? Kakav je mehanizam aktivacije dimerizacije, odnosno koja fosfataza regulira uklanjanje fosfata s C-terminalnog kraja NIX monomera i zaslužna je za dimerizaciju i aktivaciju receptora? Nadalje, koja je kinaza odgovorna za održavanje neaktivnog monomernog stanja proteina NIX? Te, kakva je vremensko-prostorna regulacija fosforilacije/defosforilacije receptora s obzirom da je za učinkovitiju aktivaciju mitofagije potrebna funkcionalna domena LIR i dimerizirani receptor? Na kraju, djeluje li uistinu dimerizacija proteina NIX kao mehanizam kojim se određuje stanična sudbina, smrt, aktivacijom apoptoze ili preživljene, aktivacijom mitofagije? Djelomičan odgovor na neke od ovih pitanja daju i preliminarne studije provedene nakon objave radova na kojima se temelji ova doktorska disertacija. Posebno odgovor na pitanje regulacije dimerizacije receptora. Kao obećavajući kandidati nameću se proteini čija je aktivna domena smještena u međumembranskom prostoru vanjske i unutarnje mitohondrijske membrane, s obzirom da tamo smješten ključni S212. Izbor samim time ostaje poprilično sužen, jer je takvih proteina izuzetno malo, uzimajući u obzir i one koji se posebnim translokacijskim mehanizmima unosa proteina u mitohondrije mogu smjestiti u međumembranski prostor (209). U kontekstu regulacije dimerizacije receptora mehanizmom defosforilacije C-terminalnog kraja, zanimljivije su same fosfataze. Nekoliko ključnih fosfataza izdvojeno je za buduće studije, a među njima svakako valja istaknuti protein PGAM5, prethodno opisan kao regulator FUNDC1-ovisne mitofagije, ali i PINK1-Parkin mehanizma (130,210,211).

Također, važno je dodatno istražiti ulogu receptora NIX i njegove mehanizme regulacije mitofagije tijekom svih fizioloških procesa u kojima sudjeluje receptor, od terminalne diferencijacije eritrocita, razvoja očne leće i ispravnog razvoja oplođene jajne stanice. Osim navedenog, buduća istraživanja trebala bi se usmjeriti i na proučavanju uloge novo otkrivenih

mehanizama regulacije NIX-ovisne mitofagije u razvoju velikog broja neurodegenerativnih bolesti i tumora koji u svojoj patološkoj osnovi imaju poremećeni mehanizam uklanjanja i nakupljanje oštećenih mitohondrija, a s obzirom da je proces mitofagije prepoznat kao ključni mehanizam na kojem se temelji razvoj ovih poremećaja, modulacija mitofagije mogla bi djelovati kao obećavajuća terapijska strategija.

6. ZAKLJUČCI

1. Mehanizam fosforilacije domene LIR proteina NIX aktivira receptor i doprinosi uspješnijoj inicijaciji i progresiji mitofagije.

- 1) Fosforilacija serina uzvodno od domene LIR proteina NIX, S34 i S35, pridonosi jačem vezanju proteina LC3B. Dvostruko fosforilirani receptor (S34,35D i S34,35E) bolje veže protein LC3B u odnosu na receptor s jednostrukom fosforilacijom (S34E i S35E).
- 2) Fosforilirani NIX peptid (P2; AGLNpSpSWVELPMNSSNG) ima ~100 puta veći afinitet prema proteinu LC3B u odnosu na nefosforilirani NIX peptid (P0; AGLNSSWVELPMNSSNG).
- 3) Kristalna struktura kompleksa NIX-LIR^{S34,35E}-LC3B²⁻¹¹⁹ ukazuje važnost aminokiselina E34, E35, W36, V37 i L39 proteina NIX i aminokiselina R10, I23, P32, K49, K51, F52, L53, I66 i F108 tj. R10, I23, K49, K51, F52, L53, L63, L66 i F108 na proteinu LC3B u formiranju stabilnog kompleksa.
- 4) Biokemijska analiza pokazuje dodatnu važnost R11 i potvrđuje važnost R10, K49 i K51 proteina LC3B u stvaranju kompleksa fosforiliranog receptora NIX i proteina LC3B.
- 5) Fosforilacija serina uzvodno od domene LIR receptora NIX doprinosi jačoj regrutaciji autofagosoma na mitohondrije tretirane CCCP-om.
- 6) Fosforilacija serina uzvodno od domene LIR receptora NIX uzrokuje uspješnije napredovanje mitofagije i konačno uklanjanje CCCP tretiranih mitohondrija iz stanice.

2. Mehanizam dimerizacije proteina NIX putem defosforilacije C-terminalnog kraja proteina NIX aktivira receptor i doprinosi uspješnijoj inicijaciji i progresiji mitofagije.

- 1) G204 i G208 u transmembranskoj domeni ključni su za dimerizaciju receptora NIX.
- 2) Monomer i dimer proteina NIX izrazito su stabilni u ekstremno denaturirajućim uvjetima.
- 3) Dimerizacija receptora NIX regulirana je defosforilacijom S212 u međumembranskom mitohondrijskom prostoru.

4) Gubitak dimerizacije receptora NIX ne remeti njegovu normalnu lokalizaciju u vanjskoj mitohondrijskoj membrani i ne utječe na sposobnost vezanja autofagosomalnih proteina LC3/GABARAP.

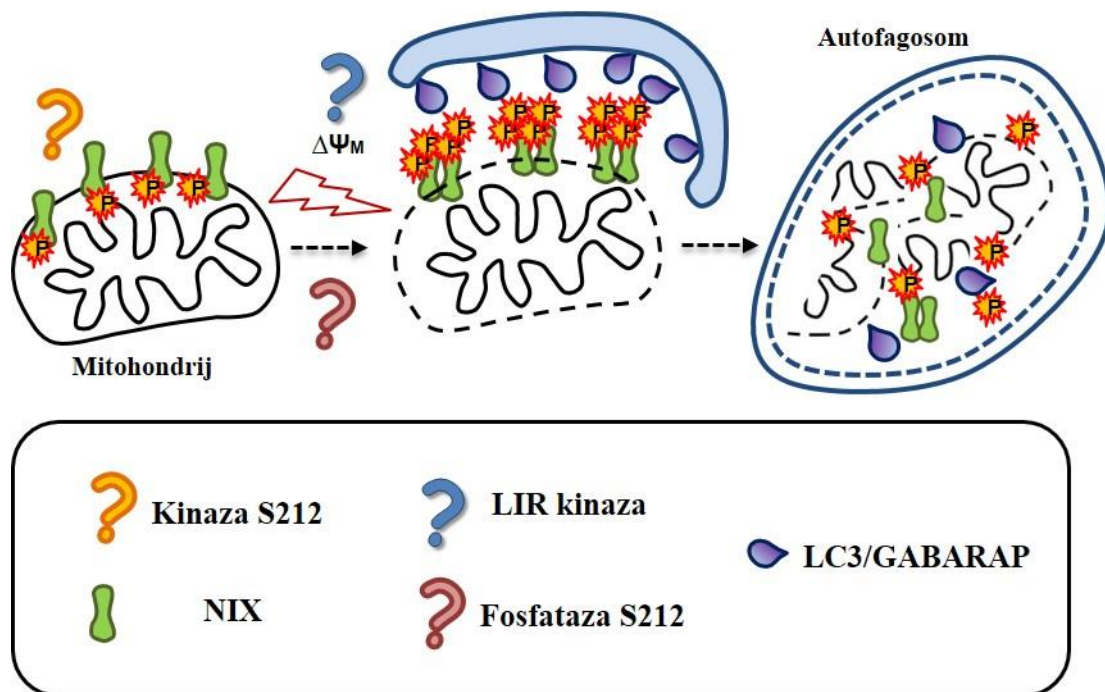
5) Dimer proteina NIX značajnije jače vezuje LC3 u odnosu na njegov monomer.

6) Dimerizacija proteina NIX uzrokuje veću regrutaciju autofagosoma na oštećene mitohondrije.

7) Dimerizacija proteina NIX omogućava bolje napredovanje mitofagije u uklanjanje oštećenih mitohondrija iz stanice.

3. Združeni mehanizam LIR-ovisne regrutacije autofagosoma i dimerizacije receptora NIX zajedno doprinosi učinkovitijem započinjanju mitofagije i konačnom uklanjanju oštećenih mitohondrija.

Predloženi mehanizam regulacije NIX-ovisne mitofagije prikazan je na slici 42.



Slika 42. Predloženi mehanizam regulacije NIX-ovisne mitofagije

7. LITERATURA

1. Labbadia J, Morimoto RI. The Biology of Proteostasis in Aging and Disease. *Annu Rev Biochem.* 2015;84(1):435–64.
2. Haslbeck M, Weinkauff S, Buchner J. Small heat shock proteins: Simplicity meets complexity. *J Biol Chem.* 2019;294(6):2121–32.
3. Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Ulrich Hartl F. Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. Vol. 82, *Annual Review of Biochemistry.* 2013. 323–355 p.
4. Finley D. Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:477–513.
5. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(2):124–31.
6. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 1994;78(5):761–71.
7. Coux, O., Tanaka K. GL. Structure and Functions of the 20S and 26S Proteasomes. *Annu Rev Biochem.* 1996;65(1):801–47.
8. Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem.* 1999;274(6):3363–71.
9. Ciechanover AH and A. The ubiquitin system. *Nature.* 2009;458(7237):421.
10. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: On protein death and cell life. *EMBO J.* 1998;17(24):7151–60.
11. Wang X, Herr RA, Hansen TH. Ubiquitination of substrates by esterification. *Traffic.* 2012;13(1):19–24.
12. Bhogaraju S, Kalayil S, Liu Y, Bonn F, Colby T, Matic I, et al. Phosphoribosylation of

- Ubiquitin Promotes Serine Ubiquitination and Impairs Conventional Ubiquitination. *Cell*. 2016;167(6):1636-1649.e13.
13. Nordgren M, Francisco T, Lismont C, Hennebel L, Brees C, Wang B, et al. Export-deficient monoubiquitinated PEX5 triggers peroxisome removal in SV40 large T antigen-transformed mouse embryonic fibroblasts. *Autophagy*. 2015;11(8):1326–40.
 14. Akutsu M, Dikic I, Bremm A. Ubiquitin chain diversity at a glance. *J Cell Sci*. 2016;129(5):875–80.
 15. Ohtake F, Tsuchiya H. JB special review - Recent topics in ubiquitin-proteasome system and autophagy: The emerging complexity of ubiquitin architecture. *J Biochem*. 2017;161(2):125–33.
 16. Dwane L, Gallagher WM, Chonghaile TN, O'Connor DP. The emerging role of nontraditional ubiquitination in oncogenic pathways. *J Biol Chem*. 2017;292(9):3543–51.
 17. Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(8):599–609.
 18. Grumati P, Dikic I. Ubiquitin signaling and autophagy. *J Biol Chem*. 2018;293(15):5404–13.
 19. Pickart CM, Fushman D. Polyubiquitin chains: Polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol*. 2004;8(6):610–6.
 20. Yang Y, Kitagaki J, Wang H, Hou DX, Perantoni AO. Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy. *Cancer Sci*. 2009;100(1):24–8.
 21. Lim J, Yue Z. Neuronal Aggregates: Formation, Clearance, and Spreading. *Dev Cell*. 2015;32(4):491–501.
 22. Doyle SM, Genest O, Wickner S. Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(10):617–29.
 23. De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmanns F. Tissue fractionation

- studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J.* 1955;60(4):604–17.
24. Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol.* 1967;33(2):437–49.
 25. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1993;333(1–2):169–74.
 26. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(10):722–37.
 27. Santana-Codina N, Mancias JD, Kimmelman AC. The Role of Autophagy in Cancer. *Annu Rev Cancer Biol.* 2017;1(1):19–39.
 28. Thompson MK and CB. Autophagy: Basic Principles and Relevance to Disease. *Annu Rev Pathol Dis.* 2008;3:67–97.
 29. Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: Lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(7):1125–36.
 30. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: A unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 2012;22(8):407–17.
 31. He C, Klionsky DJ. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009;43(1):67–93.
 32. Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress. *Mol Cell.* 2010;40(2):310–22.
 33. Nao Hosokawa, Taichi Hara, Takeshi Kaizuka, Chieko Kishi, Akito Takamura, Yutaka Miura, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Kenji Takehana, Naoyuki Yamada, Jun-Lin Guan, Noriko Oshiro and NM. Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol Biol Cell.* 2009;20:1981–1991.
 34. Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by

- mitophagy. *Arch Biochem Biophys*. 2007;462(2):245–53.
35. Chang Hwa Jung,* Chang Bong Jun,* Seung-Hyun Ro,* Young-Mi Kim,* Neil Michael Otto,* Jing Cao MK, Kim* and D-H. ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Mol Biol Cell*. 2009;20:1992–2003.
 36. 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.
 37. Ge L, Wilz L, Schekman R. Biogenesis of autophagosomal precursors for LC3 lipidation from the ER-Golgi intermediate compartment. *Autophagy*. 2015;11(12):2372–4.
 38. Ge L, Zhang M, Kenny SJ, Liu D, Maeda M, Saito K, et al. Remodeling of ER -exit sites initiates a membrane supply pathway for autophagosome biogenesis . *EMBO Rep*. 2017;18(9):1586–603.
 39. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*. 2009;11(12):1433–7.
 40. 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.
 41. Takahashi Y, Meyerkord CL, Hori T, Runkle K, Fox TE, Kester M, et al. Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy*. 2011;7(1):61–73.
 42. Gómez-Sánchez R, Rose J, Guimarães R, Mari M, Papinski D, Rieter E, et al. Atg9 establishes Atg2-dependent contact sites between the endoplasmic reticulum and phagophores. *J Cell Biol*. 2018;217(8):2743–63.
 43. Orsi A, Razi M, Dooley HC, Robinson D, Weston AE, Collinson LM, et al. Dynamic

- and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol Biol Cell*. 2012;23(10):1860–73.
44. 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. *Dev Cell*. 2011;20(4):444–54.
 45. Paz Y, Elazar Z, Fass D. Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p. *J Biol Chem*. 2000;275(33):25445–50.
 46. Suzuki NN, Yoshimoto K, Fujioka Y, Ohsumi Y, Inagaki F. The crystal structure of plant ATG12 and its biological implication in autophagy. *Autophagy*. 2005;1(2):119–26.
 47. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*. 2004;117(13):2805–12.
 48. Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell*. 2007;130(1):165–78.
 49. Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC. The itinerary of autophagosomes: From peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic*. 2008;9(4):574–87.
 50. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(8):513–25.
 51. Bröcker C, Engelbrecht-Vandré S, Ungermann C. Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Curr Biol*. 2010;20(21):943–52.
 52. Abada A, Elazar Z. Getting ready for building: signaling and autophagosome biogenesis. *EMBO Rep*. 2014;15(8):839–52.
 53. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728–41.

54. Wattiaux de D. Functions of lysosomes. *Annu Rev Phys.* 1966;28(1):435–92.
55. Johansen T, Lamark T. Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *J Mol Biol.* 2019;
56. Hutchins MU, Veenhuis M, Klionsky DJ. Peroxisome degradation in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway. *J Cell Sci.* 1999;112(22):4079–87.
57. Cole LW. The evolution of per-cell organelle number. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4(AUG):1–7.
58. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Curr Biol.* 2006;16(14):551–60.
59. Kamer KJ, Mootha VK. The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(9):545–53.
60. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2013;1833(12):3448–59.
61. Rambold AS, Pearce EL. Mitochondrial Dynamics at the Interface of Immune Cell Metabolism and Function. *Trends Immunol.* 2018;39(1):6–18.
62. Abate M, Festa A, Falco M, Lombardi A, Luce A, Grimaldi A, et al. Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;98(May):139–53.
63. Liesa M, Palacín M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev.* 2009;89(3):799–845.
64. Wai T, Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab.* 2016;27(2):105–17.
65. Mishra P, Chan DC. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol.* 2016;212(4):379–87.

66. Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(25):10190–5.
67. Züchner S, Mersiyanova I V., Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*. 2004;36(5):449–51.
68. Kijima K, Numakura C, Izumino H, Umetsu K, Nezu A, Shiiki T, et al. Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum Genet*. 2005;116(1–2):23–7.
69. Züchner S, Noureddine M, Kennerson M, Verhoeven K, Claeys K, De Jonghe P, et al. Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Genet*. 2005;37(3):289–94.
70. Ferré M, Amati-Bonneau P, Tourmen Y, Malthiery Y, Reynier P. eOPA1 : An online database for OPA1 mutations . *Hum Mutat*. 2005;25(5):423–8.
71. Alexander C, Votruba M, Pesch UEA, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, et al. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet*. 2000;26(2):211–5.
72. Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, et al. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet*. 2000;26(2):207–10.
73. Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, et al. *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*. 2006;441(7097):1162–6.
74. Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, et al. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature*. 2006;441(7097):1157–61.
75. Yang Y, Gehrke S, Imai Y, Huang Z, Ouyang Y, Wang JW, et al. Mitochondrial

- pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(28):10793–8.
76. Jin SM, Lazarou M, Wang C, Kane LA, Narendra DP, Youle RJ. Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol*. 2010;191(5):933–42.
 77. 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.
 78. 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. *Nat Cell Biol*. 2010;12(2):119–31.
 79. Mortensen M, Ferguson DJP, Edelmann M, Kessler B, Morten KJ, Komatsu M, et al. Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(2):832–7.
 80. Sato M, Sato K. Degradation of Paternal Mitochondria. *Science* (80-). 2011;37(November):1141–4.
 81. Sara Al Rawi, Sophie Louvet-Vallée, Abderazak Djeddi, Martin Sachse, Emmanuel Culetto, Connie Hajjar, Lynn Boyd, Renaud Legouis VG. Postfertilization Autophagy of Sperm Organelles Prevents Paternal Mitochondrial DNA Transmission. *Science* (80-). 2011 Nov 25;334(6059):1141–4.
 82. Sarraf SA, Youle RJ. Parkin mediates mitophagy during beige-to-white fat conversion. *Sci Signal*. 2018;11(527):1–3.
 83. Lee JH, Park A, Oh KJ, Lee SC, Kim WK, Bae KH. The role of adipose tissue mitochondria: Regulation of mitochondrial function for the treatment of metabolic diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19).
 84. Pua HH, Guo J, Komatsu M, He Y-W. Autophagy Is Essential for Mitochondrial

- Clearance in Mature T Lymphocytes. *J Immunol.* 2009;182(7):4046–55.
85. Costello MJ, Brennan LA, Basu S, Chauss D, Mohamed A, Gilliland KO, et al. Autophagy and mitophagy participate in ocular lens organelle degradation. *Exp Eye Res.* 2013 Nov;116:141–50.
 86. Esteban-Martínez L, Sierra-Filardi E, McGreal RS, Salazar-Roa M, Mariño G, Seco E, et al. Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation. *EMBO J.* 2017;36(12):1688–706.
 87. Kanki T, Wang K, Cao Y, Baba M, Klionsky DJ. Atg32 Is a Mitochondrial Protein that Confers Selectivity during Mitophagy. *Dev Cell.* 2009;17(1):98–109.
 88. Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y. Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Dev Cell.* 2009;17(1):87–97.
 89. Kondo-Okamoto N, Noda NN, Suzuki SW, Nakatogawa H, Takahashi I, Matsunami M, et al. Autophagy-related protein 32 acts as autophagic degron and directly initiates mitophagy. *J Biol Chem.* 2012;287(13):10631–8.
 90. Yu ZQ, Sun LL, Jiang Z Di, Liu XM, Zhao D, Wang HT, et al. Atg38-Atg8 interaction in fission yeast establishes a positive feedback loop to promote autophagy. *Autophagy.* 2020;0(0):1.
 91. Klionsky TY and DJ. Atg11 Links Cargo to the Vesicle-forming Machinery in the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway. *Mol Biol Cell.* 2005;16(April):1593–1605.
 92. Aoki Y, Kanki T, Hirota Y, Kurihara Y, Saigusa T, Uchiumi T, et al. Phosphorylation of serine 114 on Atg32 mediates mitophagy. *Mol Biol Cell.* 2011;22(17):3206–17.
 93. Kanki T, Kurihara Y, Jin X, Goda T, Ono Y, Aihara M, et al. Casein kinase 2 is essential for mitophagy. *EMBO Rep.* 2013;14(9):788–94.
 94. Furukawa K, Fukuda T, Yamashita S ichi, Saigusa T, Kurihara Y, Yoshida Y, et al. The PP2A-like Protein Phosphatase Ppg1 and the Far Complex Cooperatively Counteract CK2-Mediated Phosphorylation of Atg32 to Inhibit Mitophagy. *Cell Rep.*

- 2018;23(12):3579–90.
95. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. 2011;7(3):279–96.
 96. Moore AS, Holzbaur ELF. Dynamic recruitment and activation of ALS-associated TBK1 with its target optineurin are required for efficient mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(24):E3349–58.
 97. Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov V V., Brady NR, et al. Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts *Salmonella* growth. *Science* (80-). 2011;333(6039):228–33.
 98. Jelena Korac, Veronique Schaeffer, Igor Kovacevic, Albrecht M. Clement, Benno Jungblut, Christian Behl JT and ID. Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates. *J Cell Sci*. 2012;(February).
 99. Wong YC, Holzbaur ELF. Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(42):E4439–48.
 100. Richter B, Sliter DA, Herhaus L, Stolz A, Wang C, Beli P, et al. Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(15):4039–44.
 101. Furukawa K, Innokentev A, Kanki T. Regulatory Mechanisms of Mitochondrial Autophagy: Lessons From Yeast. *Front Plant Sci*. 2019;10(November):1–6.
 102. Schweers RL, Zhang J, Randall MS, Loyd MR, Li W, Dorsey FC, et al. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Dec 4;104(49):19500–5.
 103. Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, Schumacher A, Prchal JT, Chen M, et al. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature*. 2008;454(7201):232–5.
 104. Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, et al. Nix is a

- selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep.* 2010 Jan;11(1):45–51.
105. 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 Feb;14(2):177–85.
 106. Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, Hikoso S, Takeda T, Oka T, et al. Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nat Commun.* 2015 Jul 6;6.
 107. Bhujabal Z, Birgisdottir ÁB, Sjøttem E, Brenne HB, Øvervatn A, Habisov S, et al. FKBP8 recruits LC3A to mediate Parkin-independent mitophagy. *EMBO Reportseports.* 2017;18(6):947–61.
 108. Wei Y, Chiang WC, Sumpter R, Mishra P, Levine B. Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell.* 2017;168(1–2):224–238.e10.
 109. Antón Z, Landajuela A, Hervás JH, Montes LR, Hernández-Tiedra S, Velasco G, et al. Human Atg8-cardiolipin interactions in mitophagy: Specific properties of LC3B, GABARAPL2 and GABARAP. *Autophagy.* 2016;12(12):2386–403.
 110. Chen G, Han Z, Feng D, Chen Y, Chen L, Wu H, et al. A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy. *Mol Cell.* 2014;54(3):362–77.
 111. Wu W, Tian W, Hu Z, Chen G, Huang L, Li W, et al. ULK1 translocates to mitochondria and phosphorylates FUNDC1 to regulate mitophagy. *EMBO Rep.* 2014;15(5):566–75.
 112. Chen Z, Liu L, Cheng Q, Li Y, Wu H, Zhang W, et al. Mitochondrial E3 ligase MARCH 5 regulates FUNDC 1 to fine-tune hypoxic mitophagy. *EMBO Rep.* 2017;18(3):495–509.
 113. Chen M, Chen Z, Wang Y, Tan Z, Zhu C, Li Y, et al. Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy. *Autophagy.* 2016;12(4):689–702.

114. Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, Hikoso S, Takeda T, Oka T, et al. Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nat Commun.* 2015;6(7527):1–14.
115. Murakawa T, Okamoto K, Omiya S, Taneike M, Yamaguchi O, Otsu K. A Mammalian Mitophagy Receptor, Bcl2-L-13, Recruits the ULK1 Complex to Induce Mitophagy. *Cell Rep.* 2019;26(2):338-345.e6.
116. Edlich F, Weiwad M, Erdmann F, Fanghänel J, Jarczowski F, Rahfeld JU, et al. Bcl-2 regulator FKBP38 is activated by Ca²⁺/calmodulin. *EMBO J.* 2005;24(14):2688–99.
117. Shirane M, Nakayama KI. Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2003;5(1):28–37.
118. Nakagawa T, Shirane M, Lemura SI, Natsume T, Nakayama KI. Anchoring of the 26S proteasome to the organellar membrane by FKBP38. *Genes to Cells.* 2007;12(6):709–19.
119. Bulgakov O V., Eggenschwiler JT, Hong DH, Anderson K V., Li T. FKBP8 is a negative regulator of mouse sonic hedgehog signaling in neural tissues. *Development.* 2004;131(9):2149–59.
120. Wong RLY, Wlodarczyk BJ, Min KS, Scott MI, Kartiko S, Yu W, et al. Mouse Fkbp8 activity is required to inhibit cell death and establish dorso-ventral patterning in the posterior neural tube. *Hum Mol Genet.* 2008;17(4):587–601.
121. Yoo SM, Yamashita S ichi, Kim H, Na DH, Lee H, Kim SJ, et al. FKBP8 LIRL-dependent mitochondrial fragmentation facilitates mitophagy under stress conditions. *FASEB J.* 2020;34(2):2944–57.
122. Saita S, Shirane M, Nakayama KI. Selective escape of proteins from the mitochondria during mitophagy. *Nat Commun.* 2013;4:1–14.
123. Van Humbeeck C, Cornelissen T, Vandenberghe W. Ambra1: A Parkin-binding protein involved in mitophagy. *Autophagy.* 2011;7(12):1555–6.
124. Strappazzon F, Nazio F, Corrado M, Cianfanelli V, Romagnoli A, Fimia GM, et al.

- AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death Differ.* 2015;22(3):419–32.
125. Strappazon F, Vietri-Rudan M, Campello S, Nazio F, Florenzano F, Fimia GM, et al. Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy. *EMBO J.* 2011;30(7):1195–208.
 126. Di Rita A, Peschiaroli A, D'Acunzo P, Strobbe D, Hu Z, Gruber J, et al. HUWE1 E3 ligase promotes PINK1/PARKIN-independent mitophagy by regulating AMBRA1 activation via IKK α . *Nat Commun.* 2018 Dec 1;9(1).
 127. Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in *C. elegans*. *Nature.* 2009;461(7265):793–7.
 128. Lu W, Karuppagounder SS, Springer DA, Allen MD, Zheng L, Chao B, et al. Genetic deficiency of the mitochondrial protein PGAM5 causes a Parkinsons-like movement disorder. *Nat Commun.* 2014;5:1–11.
 129. Polier G, Neumann J, Thuaud F, Ribeiro N, Gelhaus C, Schmidt H, et al. The natural anticancer compounds rocaglamides inhibit the Raf-MEK-ERK pathway by targeting prohibitin 1 and 2. *Chem Biol.* 2012;19(9):1093–104.
 130. Yan C, Gong L, Chen L, Xu M, Abou-Hamdan H, Tang M, et al. PHB2 (prohibitin 2) promotes PINK1-PRKN/Parkin-dependent mitophagy by the PARL-PGAM5-PINK1 axis. *Autophagy.* 2019;0(0):1–16.
 131. Ikon N, Ryan RO. Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. Vol. 1859, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.* Elsevier B.V.; 2017. 1156–1163 p.
 132. Chu CT, Ji J, Dagda RK, Jiang JF, Tyurina YY, Kapralov AA, et al. Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol.* 2013;15(10):1197–205.
 133. Boyd JM, Malstrom S, Subramanian T, Venkatesh LK, Schaeper U, Elangovan B, et al. Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell.* 1994;79(2):341–51.

134. Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, et al. BNIP3 and Genetic Control of Necrosis-Like Cell Death through the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Mol Cell Biol.* 2000;20(15):5454–68.
135. Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: Life-or-death switch. *FEBS Lett.* 2000;466(1):6–10.
136. 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.
137. Motoaki Yasuda‡, Paul Theodorakis‡, T. Subramanian‡ and GC. Adenovirus E1B-19K/BCL-2 Interacting Protein BNIP3 Contains a BH3 Domain and a Mitochondrial Targeting Sequence. *J Biol Chem.* 1998;273, 20(May 15):12415–12421.
138. Chen BG, Ray R, Dubik D, Shi L, Cizeau J, Bleackley RC, et al. Mitochondrial Protein that Activates Apoptosis. *J Exp Med.* 1997;186(12):1975–83.
139. Ohi N, Tokunaga A, Tsunoda H, Nakano K, Haraguchi K, Oda K, et al. A novel adenovirus E1B19K-binding protein B5 inhibits apoptosis induced by Nip3 by forming a heterodimer through the C-terminal hydrophobic region. *Cell Death Differ.* 1999;6(4):314–25.
140. Sulistijo ES, MacKenzie KR. Sequence Dependence of BNIP3 Transmembrane Domain Dimerization Implicates Side-chain Hydrogen Bonding and a Tandem GxxxG Motif in Specific Helix-Helix Interactions. *J Mol Biol.* 2006 Dec 15;364(5):974–90.
141. Rogov V, Dötsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between Autophagy Receptors and Ubiquitin-like Proteins Form the Molecular Basis for Selective Autophagy. *Mol Cell.* 2014;53(2):167–78.
142. Svetina S, Kuzman D, Waugh RE, Zihelr P, Žekš B. The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells. *Bioelectrochemistry.* 2004;62(2):107–13.
143. Imazu T, Shimizu S, Tagami S, Matsushima M, Nakamura Y, Miki T, et al. Bcl-2/E1B

- 19 kDa-interacting protein 3-like protein (Bnip3L) interacts with Bcl-2/Bcl-x(L) and induces apoptosis by altering mitochondrial membrane permeability. *Oncogene*. 1999 Aug 12;18(32):4523–9.
144. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*[S]. *J Biol Chem*. 2007;282(33):24131–45.
145. Itakura E, Mizushima N. p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *J Cell Biol*. 2011;192(1):17–27.
146. Kim BW, Beom Hong S, Hoe Kim J, Hoon Kwon D, Song HK. Structural basis for recognition of autophagic receptor NDP52 by the sugar receptor galectin-8. *Nat Commun*. 2013;4:4–11.
147. Senes A, Gerstein M, Engelman DM. Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: The GxxxG motif occurs frequently and association with β -branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol*. 2000;296(3):921–36.
148. Russ WP, Engelman DM. The GxxxG motif: A framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol*. 2000 Feb 25;296(3):911–9.
149. Gronowicz G, Swift H, Steck TL. Maturation on the reticulocyte in vitro. *J Cell Sci*. 1984;VOL. 71:177–97.
150. Koury MJ, Koury ST, Kopsombut P, Bondurant MC. In vitro maturation of nascent reticulocytes to erythrocytes. *Blood*. 2005;105(5):2168–74.
151. Ovchinnikova E, Agliarolo F, von Lindern M, van den Akker E. The shape shifting story of reticulocyte maturation. *Front Physiol*. 2018;9(JUL):1–14.
152. Aerbajinai W, Giattina M, Lee YT, Raffeld M, Miller JL. The proapoptotic factor Nix is coexpressed with Bcl-xL during terminal erythroid differentiation. *Blood*. 2003;102(2):712–7.
153. Beau I, Mehrpour M, Codogno P. Autophagosomes and human diseases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(4):460–4.

154. Cha MY, Kim DK y., Mook-Jung I. The role of mitochondrial DNA mutation on neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med*. 2015;47(3):e150.
155. Nah J, Yuan J, Jung YK. Autophagy in neurodegenerative diseases: From mechanism to therapeutic approach. *Mol Cells*. 2015;38(5):381–9.
156. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MMK, Harvey K, Gispert S, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* (80-). 2004;304(5674):1158–60.
157. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998;392(6676):605–8.
158. Hsieh CH, Shaltouki A, Gonzalez AE, Bettencourt da Cruz A, Burbulla LF, St. Lawrence E, et al. Functional Impairment in Miro Degradation and Mitophagy Is a Shared Feature in Familial and Sporadic Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell*. 2016;19(6):709–24.
159. Kerr JS, Adriaanse BA, Greig NH, Mattson MP, Cader MZ, Bohr VA, et al. Mitophagy and Alzheimer's Disease: Cellular and Molecular Mechanisms. *Trends Neurosci*. 2017;40(3):151–66.
160. Martín-Maestro P, Gargini R, Perry G, Avila J, García-Escudero V. PARK2 enhancement is able to compensate mitophagy alterations found in sporadic Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2016;25(4):792–806.
161. Baloyannis SJ. Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2006;9(2):119–26.
162. Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH. Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer's disease neurons: Implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet*. 2006;15(9):1437–49.
163. Chakravorty A, Jetto CT, Manjithaya R. Dysfunctional Mitochondria and Mitophagy as

- Drivers of Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Front Aging Neurosci.* 2019;11.
164. Bossy-Wetzel E, Petrilli A, Knott AB. Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.* 2008;31(12):609–16.
 165. Wang X, Su B, Lee HG, Li X, Perry G, Smith MA, et al. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2009;29(28):9090–103.
 166. Orr AL, Li S, Wang CE, Li H, Wang J, Rong J, et al. N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *J Neurosci.* 2008;28(11):2783–92.
 167. Schwarze PE, Seglen PO. Reduced autophagic activity, improved protein balance and enhanced in vitro survival of hepatocytes isolated from carcinogen-treated rats. *Exp Cell Res.* 1985;157(1):15–28.
 168. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Levine B, Green DR, Kroemer G. Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;
 169. Marinković M, Šprung M, Buljubašić M, Novak I. Autophagy modulation in cancer: Current knowledge on action and therapy. Vol. 2018, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2018.
 170. Villanueva Paz M, Cotán D, Garrido-Maraver J, Cordero MD, Oropesa-Ávila M, De La Mata M, et al. Targeting autophagy and mitophagy for mitochondrial diseases treatment. *Expert Opin Ther Targets.* 2016;20(4):487–500.
 171. Kwitkowski VE, Prowell TM, Ibrahim A, Farrell AT, Justice R, Mitchell SS, et al. FDA Approval Summary: Temsirolimus as Treatment for Advanced Renal Cell Carcinoma. *Oncologist.* 2010;15(4):428–35.
 172. Anandappa G, Hollingdale AE, Eisen TG. Everolimus - A new approach in the treatment of renal cell carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2010;2(1):61–70.
 173. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, et al. Everolimus for

- advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2011;364(6):514–23.
174. Dhillon PK, Yeole BB, Dikshit R, Kurkure AP, Bray F. Trends in breast, ovarian and cervical cancer incidence in Mumbai, India over a 30-year period, 1976-2005: An age-period-cohort analysis. *Br J Cancer*. 2011;105(5):723–30.
175. Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. Vol. 34, *Molecular Cell*. 2009. p. 259–69.
176. Rozenknop A, Rogov V V., Rogova NY, Löhr F, Güntert P, Dikic I, et al. Characterization of the interaction of GABARAPL-1 with the LIR motif of NBR1. *J Mol Biol*. 2011;410(3):477–87.
177. Rogov V V., Suzuki H, Fiskin E, Wild P, Kniss A, Rozenknop A, et al. Structural basis for phosphorylation-triggered autophagic clearance of Salmonella. *Biochem J*. 2013;454(3):459–66.
178. Hiraki M, Kato R, Nagai M, Satoh T, Hirano S, Ihara K, et al. Development of an automated large-scale protein-crystallization and monitoring system for high-throughput protein-structure analyses. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2006;62(9):1058–65.
179. Sulistijo ES, Jaszewski TM, Mackenzie KR. Sequence-specific Dimerization of the Transmembrane Domain of the “BH3-only” Protein BNIP3 in Membranes and Detergent. 2003;278(51):51950–6.
180. Schwarten M, Mohrlüder J, Ma P, Stoldt M, Thielmann Y, Stangler T, et al. Nix directly binds to GABARAP: A possible crosstalk between apoptosis and autophagy. *Autophagy*. 2009;5(5):690–8.
181. Kirkin V. History of the Selective Autophagy Research: How Did It Begin and Where Does It Stand Today? *J Mol Biol*. 2020;432(1):3–27.
182. Condello M, Pellegrini E, Caraglia M, Meschini S. Targeting autophagy to overcome human diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):1–27.
183. Motoaki Yasuda, Paul Theodorakis, T. Subramanian and GC. Adenovirus E1B-

- 19K/BCL-2 Interacting Protein BNIP3 Contains a BH3 Domain and a Mitochondrial Targeting Sequence. *J Biol Chem.* 1998;273(20):12415–12421.
184. Vlastaridis P, Kyriakidou P, Chaliotis A, Van de Peer Y, Oliver SG, Amoutzias GD. Estimating the total number of phosphoproteins and phosphorylation sites in eukaryotic proteomes. *Gigascience.* 2017;6(2):1–11.
185. Thurston TLM. The *tbk1* adaptor and autophagy receptor *ndp52* restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat Immunol.* 2009;10(11):1215–22.
186. Alemu EA, Lamark T, Torgersen KM, Birgisdottir AB, Larsen KB, Jain A, et al. ATG8 family proteins act as scaffolds for assembly of the ULK complex: Sequence requirements for LC3-interacting region (LIR) motifs. *J Biol Chem.* 2012;287(47):39275–90.
187. Suzuki H, Tabata K, Morita E, Kawasaki M, Kato R, Dobson RCJ, et al. Structural basis of the autophagy-related LC3/Atg13 LIR complex: Recognition and interaction mechanism. *Structure.* 2014;22(1):47–58.
188. Noda NN, Kumeta H, Nakatogawa H, Satoo K, Adachi W, Ishii J, et al. Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes to Cells.* 2008;13(12):1211–8.
189. Shintani T, Huang WP, Stromhaug PE, Klionsky DJ. Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Dev Cell.* 2002;3(6):825–37.
190. Farré JC, Burkenroad A, Burnett SF, Subramani S. Phosphorylation of mitophagy and pexophagy receptors coordinates their interaction with Atg8 and Atg11. *EMBO Rep.* 2013;14(5):441–9.
191. Kuang Y, Ma K, Zhou C, Ding P, Zhu Y, Chen Q, et al. Structural basis for the phosphorylation of FUNDC1 LIR as a molecular switch of mitophagy. *Autophagy.* 2016;12(12):2363–73.
192. Yang K, Chen Z, Gao J, Shi W, Li L, Jiang S, et al. The Key Roles of GSK-3 β in Regulating Mitochondrial Activity. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(4):1445–59.

193. Mark A. Lemmon, Hebert R. Treutlein, Paul D. Adams ATB and DME. A dimerization motif for transmembrane alpha helices. *Struct Biol.* 1994;1(9):157–63.
194. Wurzer B, Zaffagnini G, Fracchiolla D, Turco E, Abert C, Romanov J, et al. Oligomerization of p62 allows for selection of ubiquitinated cargo and isolation membrane during selective autophagy. *Elife.* 2015;4(September 2015):1–28.
195. Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol.* 2014;16(6):495–501.
196. Narendra DP, Kane LA, Hauser DN, Fearnley IM, Youle RJ. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy.* 2010;6(8):1090–106.
197. Kirkin V, Lamark T, Johansen T, Dikic I. NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy.* 2009;5(5):732–3.
198. Nezis IP, Simonsen A, Sagona AP, Finley K, Gaumer S, Contamine D, et al. Ref(2)P, the *Drosophila melanogaster* homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain. *J Cell Biol.* 2008;180(6):1065–71.
199. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou Y shin, Ueno T, Hara T, et al. Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice. *Cell.* 2007;131(6):1149–63.
200. Liu KE, Frazier WA. Phosphorylation of the BNIP3 C-terminus inhibits mitochondrial damage and cell death without blocking autophagy. *PLoS One.* 2015;10(6):1–28.
201. Landes T, Emorine LJ, Courilleau D, Rojo M, Belenguer P, Arnauné-Pelloquin L. The BH3-only Bnip3 binds to the dynamin Opa1 to promote mitochondrial fragmentation and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO Rep.* 2010;11(6):459–65.
202. Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko G V., Rudka T, et al. OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. *Cell.* 2006;126(1):177–89.
203. Mughal W, Nguyen L, Pustynnik S, Da Silva Rosa SC, Piotrowski S, Chapman D, et al.

- A conserved MADS-box phosphorylation motif regulates differentiation and mitochondrial function in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. *Cell Death Dis.* 2015;6(10):1–13.
204. Gordon JW, Dolinsky VW, Mughal W, Gordon GRJ, McGavock J. Targeting Skeletal Muscle Mitochondria to Prevent Type 2 Diabetes in Youth. *Cell Biol.* 3(2):1–61.
205. Hesselink MKC, Schrauwen-Hinderling V, Schrauwen P. Skeletal muscle mitochondria as a target to prevent or treat type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(11):633–45.
206. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest.* 2016;126(1):12–22.
207. Anzell AR, Maizy R, Przyklenk K, Sanderson TH. Mitochondrial Quality Control and Disease: Insights into Ischemia-Reperfusion Injury. *Mol Neurobiol.* 2018;55(3):2547–64.
208. Yuan Y, Zheng Y, Zhang X, Chen Y, Wu X, Wu J, et al. BNIP3L/NIX-mediated mitophagy protects against ischemic brain injury independent of PARK2. *Autophagy.* 2017;13(10):1754–66.
209. Lim S, Smith KR, Lim STS, Tian R, Lu J, Tan M. Regulation of mitochondrial functions by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Biosci.* 2016;6(1):1–15.
210. Park YS, Choi SE, Koh HC. PGAM5 regulates PINK1/Parkin-mediated mitophagy via DRP1 in CCCP-induced mitochondrial dysfunction. *Toxicol Lett.* 2018;284(December 2017):120–8.
211. Chen G, Han Z, Feng D, Chen Y, Chen L, Wu H, et al. A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy. *Mol Cell.* 2014;54(3):362–77.

8. SAŽETAK

Autofagijom se uklanjaju štetne ili nepotrebne tvari iz stanice od makromolekularnih nakupina do čitavih organela poput mitohondrija. Procesom selektivnog uklanjanja mitohondrija, tzv. mitofagijom, uklanjaju se nefunkcionalni mitohondriji čije nakupljanje može dovesti do razvoja neurodegenerativnih bolesti i tumora. Osim toga, mitofagija je neophodna prilikom diferencijacije i razvoja pojedinih stanica, poput eritrocita, kada se ovim procesom uklanjaju svi zdravi i funkcionalni mitohondriji iz eritrocitnih prekursora. Svi oblici selektivne autofagije izrazito su specifični prema citoplazmatskom sadržaju koji se pakira u autofagosom zahvaljujući receptorima selektivne autofagije iako mehanizmi njihovog djelovanja nisu u potpunosti poznati.

U ovoj doktorskoj disertaciji proučavani su molekularni mehanizmi regulacije uklanjanja mitohondrija putem receptora selektivne autofagije proteina NIX, smještenog u vanjskoj mitohondrijskoj membrani. Fosforilacija serina, uzvodno od domene LIR proteina NIX, doprinosi stvaranju novih i stabilnih veza između receptora i proteina LC3B, većoj regrutaciji autofagosoma i učinkovitijem uklanjanju mitohondrija iz stanice. Dimerizacija receptora drugi je mehanizam aktivacije, a ostvaruje se specifičnom defosforilacijom S212 smještenog u međumembranskom mitohondrijskom dijelu te ima isti učinak na započinjanje i napredovanje mitofagije kao i fosforilacija domene LIR. Konačno, kombinirani mehanizmi LIR-ovisne regrutacije autofagosoma i dimerizacije receptora pokazuju kumulativni učinak na aktivaciju receptora NIX.

Poznavanje molekularne osnove regulacije NIX-ovisne mitofagije ključno je za bolje razumijevanje mehanizama diferencijacije pojedinih stanica te određenih patoloških stanja koji u svojoj podlozi imaju poremećeni proces mitofagije.

9. SUMMARY

Autophagy is important for removal of harmful and unnecessary components in the cells, from macromolecular aggregates to entire organelles such as mitochondria. Mitophagy, a process of selective removal of mitochondria, is crucial for elimination of dysfunctional mitochondria whose accumulation can lead to the development of neurodegenerative diseases and tumors. Furthermore, mitophagy is essential for differentiation and development of particular cell types, such as erythrocytes, for elimination of complete healthy and functional mitochondrial population from the erythrocyte's precursors. All forms of selective autophagy are highly specific to the cytoplasmic content packaged inside the autophagosomes due to the selective autophagy receptors whose mechanisms of action are not fully identified.

This doctoral thesis studies the molecular mechanisms of mitochondrial removal via selective autophagy receptor NIX located in the outer mitochondrial membrane. Phosphorylation of two serines, juxtaposed to NIX LIR domain, provide the formation of new and stable interactions between the receptor and LC3B protein, also more robust recruitment of autophagosomes and efficient removal of mitochondria. The second mechanism of NIX activation, dimerization, is achieved by specific S212 dephosphorylation located in the intermembrane mitochondrial space and has the same effect on mitophagy initiation and progression as LIR phosphorylation. Finally, the combined mechanisms of LIR-dependent autophagosomal recruitment and receptor dimerization show a cumulative effect on NIX receptor activation.

The knowledge of the molecular basis of NIX-dependent mitophagy regulation is crucial for better understanding the mechanisms of individual cell's differentiation and the development of pathological conditions that underlie the disturbed process of mitophagy.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Mija Marinković
Datum i mjesto rođenja: 22. kolovoza 1988, Split
Adresa: Put Skalica 19, 21000 Split
Kontakt: 099 835 4442
E-mail: mija.marinkovic@mefst.hr

Matični broj znanstvenika: 357894
ResearcherID: D-8626-2017
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8702-9126>

OBRAZOVANJE

2014 – Poslijediplomski studij Biologija Novotvorina
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2010 – 2013 Diplomski sveučilišni studij Molekularne biologije
Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2007 – 2010 Preddiplomski sveučilišni studij Molekularne biologije
Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2003 – 2007 Opća gimnazija Antun Matijašević Karamaneo, Vis

RADNO ISKUSTVO

Siječanj 2015-

Doktorand na uspostavnom istraživačkom projektu hrvatske zaklade za znanost:
„Uloga receptora autofagije u selektivnom uklanjanju mitohondrija – AutoMito“
Voditelj projekta: izv. prof. dr. sc. Ivana Novak Nakir
Laboratorij za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu
Istraživanje uloge autofagosomalnih receptora u regulaciji mitofagije

Siječanj 2014-Siječanj 2015

Asistent na Katedri za imunologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
Izvedba praktičnog dijela nastave iz kolegija Imunologija i medicinska genetika za studente medicine, dentalne medicine i medicine na engleskom jeziku te kolegija Imunologija i cjepiva za studente farmacije.

Laboratorij za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu
Istraživanje uloge proteina DVC1 u popravku DNA

Prosinac 2013-Siječanj 2014

Laboratorij za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu

Osmišljavanje strategije i provođenje testiranja interakcija proteina fibrinogena i proteinskih agregata uključenih u razvoj neurodegenerativnih bolesti

Veljača 2013-Prosinac 2013

Laboratorij za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu

Istraživanje mehanizama (fosforilacija i dimerizacija) regulacije aktivnosti mitohondrijskog proteina Nix u mitofagiji

Veljača 2012 - Veljača 2013

Laboratorij za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu

Izrada diplomskog rada pod nazivom „Uloga dimerizacije mitohondrijskog proteina Nix u aktivaciji mitofagije“

Ljetni semestar akademske godine 2010/2011

Laboratorij za glikobiologiju, Genos d.o.o., Zagreb

Analiza sastava N-glikana plazme s obzirom na različita pato/fiziološka stanja i životne navike

ZNANSTVENA USAVRŠAVANJA

13. – 17. rujna, 2019

EMBO workshop: The Ubiquitin system: Biology, mechanisms and roles in disease

Cavtat, Hrvatska – sudionik

2. – 5. rujna, 2018

FEBS3+ Meeting: From molecules to living systems

Siófok, Mađarska – poster prezentacija

09.-10. svibnja, 2018

Flow Cytometry Mini Congress and S32TM Cell Sorter radionica

Mediterranski institut za istraživanje života, Split, Hrvatska – sudionik

24. travnja, 2018

Applications of Cell-Based Luciferase Reporter Assays.

Prirodoslovno matematički fakultet Split, Split, Hrvatska - sudionik

18. – 23. ožujka, 2018

Gordon Research Conference: “Autophagy in Stress, Development and Disease (GRC)”

Barga, Italija – pozvano predavanje i poster prezentacija

17. – 18. ožujka, 2018

Gordon Research Seminar: “Autophagy in Stress, Development and Disease (GRS)”

Barga, Italija – poster prezentacija

23. – 27. listopada, 2017

Intezivni tečaj iz protočne citometrije

Dječja bolnica Srebrnjak, Zagreb - sudionik

16. – 24. kolovoza, 2017

Spetses Summer School an EACR-FEBS advanced lecture course „Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Cancer“

Spetses, Grčka – poster prezentacija

2. – 6. listopada, 2016

10th Copenhagen Bioscience Conference „Protein Signaling - from pathways to networks“
Copenhagen, Danska – poster prezentacija

1.- 4. lipnja, 2016.

Kongres Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju,
Split-poster prezentacija

20-22. listopada, 2014

InnoMol Bioimaging Workshop
Institut Ruđer Bošković, Zagreb - sudionik

2011

The Seventh ISABS Conference on Forensic, Anthropologic and Medical Genetics, Bol,
Hrvatska, sudionik i asistent lokalnog organizatora

2009, 2010, 2011

Sudjelovanje u znanstveno-popularnoj manifestaciji „Noć biologije“ pri Biološkom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Zimski semestar akademske godine 2008/2009

Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Biološki odsjek, Zavod za
zoologiju

Demonstrator praktikuma iz kolegija Zoologija

NAGRADE I PRIZNANJA

2018 – FEBS Junior stipendija za sudjelovanje na konferenciji FEBS3+ Meeting: From
molecules to living systems,
Siófok, Mađarska

2017 – EACR-FEBS stipendija za sudjelovanje na Spetses Summer School an EACR-FEBS
advanced lecture course „Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Cancer“,
Spetses, Grčka

2016 – Novo Nordisk stipendija za sudjelovanje na 10th Copenhagen Bioscience Conference
„Protein Signaling - from pathways to networks“ ,
Copenhagen, Danska

2008 – 2010 Državna stipendija Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa

2007 – 2012 Godišnja srednjoškolska i studentska nagrada za uspješne učenike i studente Grada Komiže

2002 Osvojeno 1. mjesto na Državnom susretu mladih biologa
Istraživački rad Ekologija umjetnih pokrova u staništu komiškog rogača

PUBLIKACIJE

- **Mija Marinković**, Matilda Šprung & Ivana Novak, „*Dimerization of mitophagy receptor BNIP3L/NIX is essential for recruitment of autophagic machinery*“, *Autophagy* (2020), DOI: 10.1080/15548627.2020.1755120
 - **Mija Marinković**, Matilda Šprung, Maja Buljubašić, and Ivana Novak, “*Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy*”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018, Article ID 8023821, 18 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8023821>
 - Rogov VV, Suzuki H, **Marinkovic M**, Lang V, Kato R, Kawasaki M, et al. *Phosphorylation of the mitochondrial autophagy receptor Nix enhances its interaction with LC3 proteins*. *Sci Rep* (2017) 7:1131.10.1038/s41598-017-01258-6
 - **Mija Marinković** and Ivana Novak. *The Role of Autophagy Receptors in Mitophagy*, “Autophagy - Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, and Infection”, izdavača Elsevier *Autophagy*, Volume 6, chapter 17 (2015)
-

POSEBNA ZNANJA I VJEŠTINE

Znanje svjetskih jezika:

hrvatski (materinji jezik)

aktivno korištenje engleskog jezika u govoru i pismu

pasivno korištenje talijanskog jezika u govoru i pismu

Poznavanje rada na računalu:

aktivno korištenje aplikacijama programskog paketa *Microsoft Office (Word, Excel, Access, PowerPoint)*, svakodnevno služenje *Internetom* i elektroničkom poštom