Utjecaj proteotoksičnog stresa na agregaciju i toksičnost tau proteina čovjeka izraženog u kvascu Saccharomyces cerevisiae

Zubčić, Klara

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:562482

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-16**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Klara Zubčić

Utjecaj proteotoksičnog stresa na agregaciju i toksičnost tau proteina čovjeka izraženog u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Klara Zubčić

Utjecaj proteotoksičnog stresa na agregaciju i toksičnost tau proteina čovjeka izraženog u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

Disertacija je izrađena na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, temeljem projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) "Razvoj karijera mladih istraživača - izobrazba novih doktora znanosti" (br. DOK-2018-01-9299, voditeljica dr. sc. Mirta Boban), predloženog u okviru projekta HRZZ-a „Hiperfosforilacija, agregacija i transsinaptički prijenos tau proteina u Alzheimerovoj bolesti: analiza likvora i ispitivanje potencijalnih neuroprotektivnih spojeva" IP-2014-09-9730, na kojem je voditeljica rada dr. sc. Mirta Boban suradnica, a voditelj projekta prof. dr. sc. Goran Šimić.

Voditelji rada: dr. sc. Mirta Boban, znanstvena suradnica

prof. dr. sc. Goran Šimić

Ovo istraživanje financirano je sredstvima Hrvatske zaklade za znanost, projekti Hrvatske zaklade za znanost:
1. „Hiperfosforilacija, agregacija i transsinaptički prijenos tau proteina u Alzheimerovoj bolesti: analiza likvora i ispitivanje potencijalnih neuroprotektivnih spojeva" HRZZ IP-2014-09-9730, voditelj projekta prof. dr. sc. Goran Šimić
2. „Uloga krvno-moždane barijere, urođene imunosti i oligomerizacije tau proteina u patogenezi Alzheimerove bolesti" HRZZ IP-2019-04-3584, voditelj projekta prof. dr. sc. Goran Šimić
3. "Kontrola kvalitete proteina putem selektivne razgradnje u stanicama u mirovanju", PZS-2019-02-3610, voditeljica projekta dr. sc. Mirta Boban, znanstvena suradnica.

te sredstvima Znanstvenog centra izvrsnosti za temeljnu, kliničku i translacijsku neuroznanost, projekt: „Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi, KK.01.1.1.01.0007“, voditelj: prof. dr. sc. Miloš Judaš.

Četiri godine provedene na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga pri izradi ovog doktorskog rada ispunile su me neizmjernom zahvalnošću.
Hvala Mirti na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju i istinskom mentoriranju, čija će mi akademska čestitost uvijek biti inspiracija.
Hvala profesoru Šimiću na vrijednim savjetima, podršci i prilikama.
Hvala najboljim kolegama i prijateljima s HIIM-a.

Ovu disertaciju posvećujem svojim roditeljima Rajni i Zdravku.

Sadržaj

1. UVOD I SVRHA RADA 1
1.2. Alzheimerova bolest 2
1.3. Protein tau – fiziološka uloga 3
1.3.2. Patološka uloga tau proteina u Alzheimerovoj bolesti 4
1.4. Sustav kontrole kvalitete proteina 5
1.5. Stres endoplazmatskog retikuluma (ER-stres) i odgovor stanice na ER-stres 6
1.6. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* kao modelni organizam u istraživanjima neurodegenerativnih bolesti 8
1.7. Reporterski sustav NanoBiT za detekciju interakcija između proteina putem luminiscencije 10
2. HIPOTEZA 13
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 14
3.1.OPĆI CILJ 14
3.1.1 SPECIFIČNI CILJEVI 14
4. MATERIJALI I METODE 15
4.1. Materijali 15
4.1.1. Sojevi kvasca 15
4.1.2. Sojevi bakterija 15
4.1.3. Plazmidi 16
4.1.4. Oligonukleotidi 16
4.1.5. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 20
4.1.6. Hranjive podloge za uzgoj bakterija 21
4.1.7. Protutijela 21
4.2. Metode 21
4.2.1. *In silico* metode 23
4.2.2. Molekulsko kloniranje i konstrukcija plazmida 23
4.2.3. Izolacija rekombinantnih plazmida 25
4.2.4. Restrikcijska analiza 25
4.2.5. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu 26
4.2.6. Transformacija stanica kvasca *S. cerevisiae* litij acetatnom metodom (68) 26
4.2.7. Izolacija genomske DNA iz stanica kvasca 26
4.2.8. Ispitivanje ekspresije proteina 27

4.2.9. Uzgoj replikativno starih stanica kvasca Saccharomyces cerevisiae 27
4.2.10. Priprema stanica za mikroskopiju 27
4.2.11. Mjerenje luminiscencije 28
4.2.12. Stanični testovi 28
4.2.13. Statistička analiza 28
5. REZULTATI 29
5.1. Analiza toksičnosti tau proteina čovjeka eksprimiranog u stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 29
5.1.1. Ispitivanje utjecaja ekspresije proteina tau s povećanom fosforilacijom na vijabilnost stanica 30
5.1.2. Ispitivanje utjecaja ekspresije proteina tau na vijabilnost stanica kvasca u uvjetima proteotoksičnog stresa 33
5.2. Ispitivanje unutarstanične lokalizacije proteina tau čovjeka eksprimiranog u stanicama kvasca 38
5.2.1. Ispitivanje unutarstanične lokalizacije proteina tau čovjeka eksprimiranog u stanicama kvasca tijekom staničnog starenja 41
5.3. Dizajn, konstrukcija i uspostava luminiscentnog reportera za ispitivanje oligomerizacije tau proteina čovjeka eksprimiranog u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* 46
5.3.1. Optimizacija ekspresije konstrukata tau-LgBiT i tau-SmBiT 49
5.3.2. Ispitivanje aktivacije tau-NanoBiT reportera 53
5.3.4. Aktivacija reporterskog sustava tau-NanoBiT u mutantima s povišenom razinom agregata tau proteina netopljivih u sarkozilu 61
5.3.5. Aktivacija tau-NanoBiT reportera u uvjetima proteotoksičnoga stresa 63
6. RASPRAVA 70
6.1. Utjecaj ekspresije proteina tau na rast stanica kvasca 70
6.2. Ispitivanje agregata tau proteina u stanicama kvasca 72
6.3. Uspostava luminiscentnog reportera tau-NanoBiT 73
6.4. Utjecaj proteotoksičnog stresa na agregaciju proteina tau u stanicama kvasca 77
6.4.1. Povezanost agregacije proteina tau s narušenom funkcijom proteasoma 77
6.4.2. Povezanost agregacije proteina tau s narušenom odgovorom stanice na pogrešno smotane proteine. 79
7. ZAKLJUČAK 82
8. SAŽETAK 84
9. SUMMARY 85
10. LITERATURA 86

11. ŽIVOTOPIS.....104

KRATICE

ATP	adenozin trifosfat (*adenosine triphosphate*)
Aβ	amiloid β
AzC	L-azetidin-karboksilna kiselina
BSA	goveđi serumski albumin (*bovine serum albumin*)
CA	*Cornu Ammonis*
CDK5	kinaza 5 ovisna o ciklinu (*cyclin dependent kinase 5*)
ER	endoplazmatski retikulum
ERAD	razgradnja proteina povezana s endoplazmatskim retikulumom (*ER-associated protein degradation*)
FTDP-17	frontotemporalna demecija s parkinsonizmom povezana s kromosomom 17
GSK-3β	Glikogen-sintaza-kinaza 3β
HRP	peroksidaza iz hrena (*horseradish peroxidase*)
IgG	imunoglobulin G
LTD	dugoročna depresija (*long-term depression*)
LTP	dugoročna potencijacija (*long-term potentiation*)
MAPT	s mikrotubulima povezan protein tau (microtubule-associated protein tau)
NanoBiT	NanoLuc binarna tehnologija (*NanoLuc Binary Technology*)
SD	standardna devijacija
SDS-PAGE	elektroforeza s natrij dodecil sulfat poliakrilamidnim gelovima (*sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*)
UPR	odgovor stanice na nesmotane proteine (*unfolded protein response*)
UPRE	dijelovi odgovora na nesmotane proteine(*unfolded protein response elements*)
UPS	sustav ubikvitin-proteasom (*ubiquitin-proteasome system*)
WB	Western blot
WT	divlji tip (*wild type*)

1. UVOD I SVRHA RADA

Alzheimerova bolest je neurodegenerativna bolest karakterizirana ireverzibilnim i progresivnim gubitkom sinapsi i neurona (1). Starenjem populacije, sve veći javnozdravstveni teret društvu postaju neurodegenerativne bolesti, s Alzheimerovom bolešću najučestalijom među njima. Istovremeno je uložen ogroman napor u pronalazak uzroka nastanka ove bolesti, no patofiziološka podloga još uvijek je uvelike nerazjašnjena.

Jedna od glavnih neuropatoloških karakteristika Alzheimerove bolesti je nakupljanje agregata proteina tau u neurofibrilarne snopiće u neuronima i glija stanicama zahvaćenih dijelova mozga. Iako ne nastaje zbog mutacija *MAPT* gena koji kodira za protein tau, Alzheimerova bolest svrstana je u skupinu sekundarnih tauopatija, neurodegenerativnih bolesti koje karakterizira patološka agregacija proteina tau. Samo napredovanje bolesti, kao i stupanj kognitivnog oštećenja, u izravnoj su korelaciji s brojnošću neurofibrilarnih snopića (2). Osim razvoja učinkovite terapije za liječenje Alzheimerove bolesti, veliki izazov je i rana dijagnostika, s obizirom da je poznato da se prvi simptomi bolesti javljaju godinama nakon početnih patoloških promjena.

Unatoč brojnim istraživanjima, molekularni putevi koji dovode do agregacije proteina tau još uvijek su velikim dijelom nepoznati, kao i uzroci toksičnosti oligomera i agregata tau proteina. Kako bismo bolje razumjeli rane korake u patogenezi Alzheimerove bolesti, u ovom doktorskom radu željeli smo istražiti puteve koji dovode do agregacije proteina tau.

1.2. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest neizlječiva je i progresivna neurodegenerativna bolest. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije procjenjuje se da u svijetu trenutno više od 35 milijuna ljudi ima Alzheimerovu bolest. Jedna od najvažnijih neuropatoloških promjena u Alzheimerovoj bolesti je nakupljanje agregata proteina tau u obliku neurofibrilarnih snopića u neuronima i glija stanicama zahvaćenih područja mozga (3). U područjima mozga zahvaćenim patološkim procesom događa se progresivni gubitak neurona, no poznato je da nisu svi neuroni jednako podložni toksičnosti izazvanoj patološkim promjenama proteina tau. Tako su najosjetljiviji zvjezdoliki i modificirani piramidni neuroni sloja II entorinalne moždane kore, gdje se često uočavaju prve patološke promjene u sporadičnoj Alzheimerovoj bolesti, a otporni su primjerice piramidni neuroni CA2 i CA3 polja hipokampusa (4). Podloga ove selektivne vulnerabilnosti i dalje ostaje nejasna (5). Također, i dalje nije posve jasno je li agregacija proteina tau toksičan ili protektivni mehanizam (6,7).

Progresija bolesti opisana je Braakovim stadijima širenja neurofibrilarnih promjena (8). Prema simptomima bolest se dijeli u 3 faze koje koreliraju sa opisanih šest Braakovih stadija širenja neurofibrilarnih snopića, odnosno topografske progresije neurofibrilarne degeneracije (8). U ranoj fazi bolesti simptomi su gubitak kratkotrajnog pamćenja, otežano zapamćivanje novih sadržaja, poteškoće svakodnevnog funkcioniranja, promjene osobina ličnosti, oscilacije raspoloženja, što odgovara Braakovim stadijima I i II koji obuhvaćaju promjene u transentorinalnom području. U srednjoj fazi dolazi do deterioracije logičkog mišljenja, oštećenja dugotrajnog pamćenja, afazije, apraksije, agnozije, gubitka prostorne i vremenske orijentacije, depresije, anksioznosti, psihotičnosti, nesanice, agitacije, gubitka kontrole impulsa, agresivnosti, što odgovara Braakovim stadijima III i IV u temporalnom, frontalnom i parijetalnom neokorteksu. Na kraju, u kasnoj fazi, odnosno Braakovim stadijima V i VI, promjene zahvaćaju unimodalna te primarna osjetna i motorička polja korteksa, što prati propadanje svih kognitivnih sposobnosti, osiromašenje govora, inkontinencija, nepokretnost, nemogućnost gutanja i epileptički napadi (3).

Za liječenje demencije uzrokovane Alzheimerovom bolesti, u svijetu su trenutno odobrena četiri lijeka koji utječu na smanjenje simptoma: tri inhibitora kolinesteraza (donepezil, galantamin, rivastigmin) i antagonist NMDA receptora - memantin. Ni jedan od tih lijekova ne liječi samu bolest niti zaustavlja njezinu progresiju (1,4).

1.3. Protein tau – fiziološka uloga

Protein tau kodiran je genom *MAPT* (od engl. microtubule-associated protein tau) koji se nalazi na kromosomu 17q21.31. Protein tau podijeljen je na N-terminalni dio, regiju bogatu prolinom, domenu kojom se veže za mikrotubule i C-terminalni dio. Alternativnim prekrajanjem gena *MAPT* nastaje 6 izoformi koje se međusobno razlikuju brojem insercija u N-terminusu (0N, 1N ili 2N) i brojem ponavljanja u domeni kojom se veže za mikrotubule (3R ili 4R). Dok se tijekom fetalnog razvoja u mozgu eksprimira samo najkraća 0N3R izoforma, u odraslom mozgu prisutno je svih 6 izoformi (3).

Tau podliježe mnogobrojnim postranslacijskim modifikacijama: fosforilacija, acetilacija, ubikvitinilacija, sumoilacija, metilacija, glikacija, glikozilacija, poliaminacija, nitracija, izomeracija i oksidacija (9). Prirodno je neuređene tercijarne strukture. U fiziološkim uvjetima, visoko je topljiv protein koji povezuje α i β podjedinice mikrotubula – glavnih elemenata citoskeleta, a lokaliziran je uglavnom u aksonima. Tau regulira dinamiku mikrotubula nadzirući sklapanje, elongaciju i maturaciju mikrotubula (10). Na mikrotubulima može biti vezan kao pojedinačna molekula ili stvarati dinamične kondenzate – "otočiće" te tako fizički regulirati prolaz motornih proteina i aksonski transport molekula (11,12). Osim toga, tau „otočići" sprječavaju razgradnju mikrotubula hidrolazom kataninom i tako reguliraju njihovu dinamiku (12). Na mikrotubule tau je vezan preko domene kojom se veže na mikrotubule, dok njegova N-terminalno projekcijska domena strši prema citosolu i može biti u interakciji s brojnim drugim proteinima (3). Interakcijama sa sinaptičkim receptorima NMDA (od engl. *N-methyl-D-aspartate*) i proteinima uključenim u regulaciju receptora AMPA (od eng. *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)*, tau regulira i sinaptičku plastičnost, odnosno ima ulogu u nastanku i održavanju dugoročne potencijacije (engl. *long-term potentiation*, LTP)

i depresije (engl. *long-term depression*, LTD) (13,14). Osim toga, tau ima ulogu u održavanju integriteta DNA i RNA molekula s kojima ulazi u interakcije preko utora bogatih AT-parovima baza te čuva njihovu stabilnost u uvjetima oksidacijskog stresa (15).

1.3.2. Patološka uloga tau proteina u Alzheimerovoj bolesti

U oboljelih od Alzheimerove bolesti, protein tau je hiperfosforiliran, disocira s mikrotubula i nakuplja se u tijelu neurona, gdje stvara sparene zavijene filamente (engl. *paired helical filaments*, PHF) te se dalje agregira u velike neurofibrilarne snopiće (engl. *neurofibrilary tangles*, NFT) (3,16). Iako su neurofibrilarni snopići najkarakterističnije neuropatološko obilježje Alzheimerove bolesti, novija istraživanja pokazuju da je neurotoksičnost, barem djelomično, uzrokovana oligomerima i agregatima tau proteina u ranom stadiju koji prethode oblikovanju fibrila (17–19). Sukladno tome, razine tau oligomera povišene su u postmortalnim uzorcima mozga Alzheimerove bolesti u usporedbi s kontrolama (20).

Smatra se kako važnu ulogu u patološkoj promjeni proteina tau imaju posttranslacijske modifikacije, od kojih su najznačajnije fosforilacija i acetilacija te proteolitičko cijepanje molekule tau (3). Osim konformacijskih promjena, sklonost agregaciji može biti i posljedica mutacija u genu *MAPT* za tau, koje mijenjaju njegova biokemijska i biofizička svojstva. Primjer takve mutacije je mutacija P301L koja dovodi do frontotemporalne demecije s parkinsonizmom zbog mutacije *MAPT* gena (FTDP-17) (21), no mutacije gena *MAPT* nisu povezane s nastankom Alzheimerove bolesti (13). Osim promjena u samom proteinu tau, mnogi drugi čimbenici povezani su s nastankom neurofibrilarnih promjena, kao što su nakupljanje amiloida-β (22) ili kronični oksidacijski stres (23).

Patološki promijenjen tau, osim što gubi svoju fiziološku ulogu, narušava fiziološke procese u stanici pa je tako nedavno pokazano da hiperfosforilirani tau u Alzheimerovoj bolesti narušava normalni jezgrin transport, interakcijama s proteinom kompleksa jezgrine pore, nukleoporinom Nup98 (24).

1.4. Sustav kontrole kvalitete proteina

Jedna od najvažnijih funkcija zdrave stanice jest održavanje homeostaze proteina regulacijom njihove sinteze, smatanja, sklapanja i razgradnje. Tako važnu zadaću stanica vrši različitim staničnim mehanizmima koji zajedno čine sustav kontrole kvalitete proteina. Taj sustav održava homeostazu proteina, ili proteostazu, djelujući na nekoliko razina – pomažući smatanje nepotpuno ili pogrešno smotanih proteina pomoću molekulskih šaperona, putem sekvestracije pogrešno smotanih proteina u specijaliziranim intracelularnim inkluzijama (25) te, u slučaju terminalno pogrešno smotanih ili oštećenih proteina, putem selektivne degradacije proteina sustavom ubikvitin-proteasom (26). Ukoliko stanica iz bilo kojeg razloga ne može održavati proteostazu, dolazi do nakupljanja pogrešno smotanih, aberantnih ili nepoželjnih proteina i posljedičnog proteotoksičnog stresa (27).

Sustav ubikvitin-proteasom (UPS) temelji se na prepoznavanju signala degradacije pomoću mehanizma za ubikvilitaciju koji obilježava pogrešno smotane proteine s ubikvitinom i usmjerava ih na razgradnju pomoću multiproteinskog proteolitičkog kompleksa, 26S proteasoma.

Selektivna razgradnja supstrata osigurana je ubikvitin vezujućim proteinima unutar 19S regulativne podjedinice, koji specifično prepoznaju ubikvitinilirane proteinske supstrate. ATPaze u 19S podjedinici odmataju supstrat i translociraju ga u 20S komoru radi proteolize. Podjedinica 20S vrši tri različite enzimske aktivnosti koje režu supstratne proteine u kratke peptide. Nakon izlaska iz proteasoma, većina peptida se dalje cijepa u aminokiseline pomoću citosolnih peptidaza. Kako je kanal za translokaciju uzak, njime ne mogu proći smotani proteini i kompleksi.

Važno je naglasiti da su komponente puteva UPS-a, uključujući proteasome, strojeve za ubikvilitaciju, šaperone i pomoćne proteine, evolucijski visoko konzervirane od kvasca do čovjeka (28).

Smatra se kako bi narušena funkcija selektivne razgradnje proteina mogla biti jedan od temeljnih uzroka mnogih neurodegenerativnih bolesti karakteriziranih agregacijom proteina (29), dok specifična stanična funkcija agregiranih proteina vjerojatno nije povezana sa samom patogenezom bolesti. Nadalje, glavni rizični čimbenik za nastanak sporadične Alzheimerove bolesti je starenje. Još uvijek nije poznato koji procesi promijenjeni uslijed starenja vode k agregaciji proteina tau. Budući da se sposobnost stanice da održava proteostazu smanjuje starenjem (14), narušena proteostaza smatra se mogućim čimbenikom u nastanku tauopatija (30,31).

1.5. Stres endoplazmatskog retikuluma (ER-stres) i odgovor stanice na ER-stres

Nedavna istraživanja ukazala su na povezanost stresa endoplazmatskog retikuluma (ER-stres) i Alzheimerove bolesti (32–35). Endoplazmatski retikulum (ER) je organel u citoplazmi stanice koji se sastoji od membranom okruženog lumena u obliku cisterna i tubula. ER ima važnu funkciju u sintezi i transportu membranskih i sekretornih proteina, smatanju proteina pomoću molekulskih šaperona u lumenu ER-a, posttranslacijskim modifikacijama kao što su glikozilacija i disulfidne veze te sintezi lipida. U stanicama čovjeka membranski i sekretorni proteini koji prolaze kroz ER čine čak jednu trećinu proteoma (36).

Prekomjerna količina nesmotanih (engl. *unfolded*) ili pogrešno smotanih (engl. *misfolded*) proteina u odnosu na kapacitet ER-a za smatanje proteina dovodi do ER-stresa, uslijed čega se aktiviraju signalni putevi zajednički nazvani „odgovor stanice na nesmotane proteine“ (engl. *unfolded protein response*, UPR) (36 – 38). Odgovor stanice na ER-stres uključuje nekoliko strategija: (1) privremeno smanjenje sinteze novih proteina, (2) povećanje volumena ER-a putem biosinteze ER-membrane, (3) povećanje kapaciteta ER-a za smatanje proteina putem povećanja razine šaperona, uključujući BiP (engl. *binding immunoglobulin protein*) (GPR78), kao i povećanje razine foldaza, (4) povećanje razgradnje proteina ER-a putem molekulskog puta ERAD (engl. *Endoplasmic*

reticulum (ER)-associated protein degradation) i autofagije te (5) u slučaju kronične aktivacije UPR-a i neuspješnog razrješenja ER-stresa, programiranu staničnu smrt (36).

U membrani ER-a nalaze se tri transmembranska senzora za ER-stres, Ire1 (engl. *Inositol-requiring enzyme 1*), PERK (engl. *Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase*) i Atf6 (engl. *Activating transcription factor 6*), koji detektiraju prisutnost nesmotanih proteina u lumenu ER-a, uslijed čega se aktiviraju signalni putevi UPR-a. Ire1-ovisna grana UPR odgovora dovodi do povećane transkripcije gena za molekulske šaperone, foldaze, enzime biosinteze lipida i komponente za razgradnju proteina (36). O transmembranskom senzoru Ire1 ovisna grana UPR-a evolucijski je visoko konzervirana od kvasca do čovjeka (39). Aktivacija senzora ER-stresa kinaze PERK posredno dovodi do smanjenja globalne translacije proteina, čime se smanjuje opterećenje ER-a nesmotanim proteinima, dok Atf6-ovisna grana UPR-a dovodi do povećanja volumena ER-a.

U neuronima hipokampusa bolesnika s Alzheimerovom bolesti aktiviran je odgovor stanice na ER-stres (UPR) molekulskim putevima ovisnim o senzorima ER-stresa Ire1, PERK i ATF6 (40). Zanimljivo je da je UPR aktiviran primarno u neuronima s difuznim signalom za tau, a manje u neuronima s neurofibrilarnim snopićima, što bi moglo ukazati na to da se ER-stres javlja u ranim stadijima patologije tau. Iako u tkivu mozga bolesnika s Alzheimerovom bolesti postoje razlike u nalazima što se tiče XBP1 (engl. *X-box binding protein 1*) i razine ER-šaperona BiP (41,42), nalazi vezano za aktivaciju puteva UPR-a ovisnih o senzorima Ire1, PERK i eIF2 (engl. *Eukaryotic Initiation Factor 2*) su konzistentni u različitim studijama (32). U skladu s nalazima ER-stresa u mozgu bolesnika s tauopatijama, genetske studije su identificirale polimorfizam u *XBP1*, genu za transkripcijski čimbenik koji je nizvodna meta Ire1-ovisnog signalnog puta UPR-a, kao rizični čimbenik Alzheimerove bolesti (43) te *PERK* kao genetski rizični čimbenik za tauopatiju progresivna supranuklearna paraliza (44).

Moguća uloga ER-stresa kao jednog od uzroka patološke promjene proteina tau temelji se na nekoliko pronalazaka. Naime, neuroni pozitivni za aktiviranu kinazu PERK pokazali su povišeni signal za kinazu GSK-3β (engl. *Glycogen synthase kinase-3 beta*), koja je odgovorna za fosforilaciju tau (40), ukazujući na daljnju moguću poveznicu između ER-stresa, odnosno UPR-a, i fosforilacije tau, koja posljedično može pospješiti agregaciju

tau. U skladu s time, tretman primarne kulture kortikalnih neurona animalnog modela s aktivatorom ER-stresa doveo je do povišene fosforilacije tau (45). Nadalje, metabolički stres, jedan od rizičnih čimbenika za Alzheimerovu bolest, može inducirati fosforilaciju proteina tau putem aktivacije puteva UPR-a (46).

S druge strane, ER-stres može biti posljedica patološke promjene i nakupljanja proteina tau te amiloida-β. Prisutnost patološki promijenjenog proteina tau u modelu tauopatije izazvane u miša te u modelu bubrežnih embrionalnih stanica čovjeka HEK-293 stanica u kulturi, dovela je do aktivacije UPR-a te smanjila funkcionalnost molekulskog puta razgradnje proteina ERAD (47). U tim stanicama je uočena povišena razina fosforiliranog, tj. aktiviranog senzora za ER-stres PERK i ER-šaperona BiP. ER-stres nastaje uslijed prekomjernog nakupljanja nesmotanih ili pogrešno smotanih proteina u lumenu ER-a. Budući da se tau i amiloid-β nakupljaju u citoplazmi, odnosno izvanstaničnom prostoru, utjecaj tau i amiloida-β na ER-stres u tom slučaju odvija se neizravnim putem (33).

Utjecaj ER-stresa na razvoj Alzheimerove bolesti moguć je i putem neuroinflamacije, budući da ER-stres može dovesti do upalnih odgovora koji su povezani s patogenezom više bolesti (48). Uzimajući u obzir da se Alzheimerova bolest sve više povezuje s ranom aktivacijom upalnih mehanizama u mozgu, to može biti jedan od puteva kojima ER-stres pridonosi patogenezi Alzheimerove bolesti.

1.6. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* kao modelni organizam u istraživanjima neurodegenerativnih bolesti

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je eukariotski nepatogeni jednostanični organizam iz carstva *Fungi*. Njegov genom sadrži otprilike 6000 gena na 16 kromosoma, a 31% gena ima ortologe u genomu čovjeka (49). Kvasac je prvi organizam čiji je genom u potpunosti sekvencioniran 1996. godine (50). Dobro poznat genom i proteom potaknuo je razvoj raznovrsnih i sveobuhvatnih genetičkih metoda, što je rezultiralo kolekcijama delecijskih mutanata za gotovo svaki gen u genomu te kolekcijama sojeva s prekomjernom ekspresijom pojedinih gena. Kvasac je izuzetno pogodan za genetički

probir i istraživanja koja zahtijevaju manipulaciju gena. Relativno jednostavnom metodom mogu se inaktivirati geni važni za funkcioniranje određenog molekulskog puta te na temelju uočenog fenotipa donositi zaključci o važnosti pojedinih molekulskih puteva za promatrani proces.

Također, kvasac može postojati i razmnožavati se mitozom u diploidnom ili haploidnom obliku, što uvelike olakšava manipulaciju gena. Nadalje, kulture stanica kvasca jednostavno je uzgojiti na selektivnim hranjivim podlogama uz relativno kratko generacijsko vrijeme od samo 1,5 sat na bogatom mediju. Sve navedene činjenice čine kvasac pogodnim ne samo za istraživanje staničnih procesa i s njima povezanih patoloških procesa, već omogućuje i korištenje stanica kvasca i kao platforme za genetske probire visoke protočnosti i generaciju velikog obima podataka u relativno kratkom vremenu. Neke od prvih studija vezanih uz cjelovitu karakterizaciju i kvantifikaciju proteina nekog organizma, njihove interakcije, transkripciju i translaciju te metabolizam (proteomika, interaktomika, transkriptomika, metabolomika) provedene su na kvascu (51).

Iako je evolucijska divergencija kvasca i čovjeka velika, kvasac sadrži mnoge stanične procese i puteve koji su tijekom evolucije ostali konzervirani, što primjerice uključuje stanični ciklus, vezikularni transport, autofagiju, metabolizam lipida, odgovor na pogrešno smotane proteine, biogenezu i metabolizam mitohondrija, kao i procese starenja i apoptoze (52). Također, putevi kontrole kvalitete proteina koji održavaju staničnu proteostazu su visoko evolucijski konzervirani, osobito putevi selektivne razgradnje proteina sustavom ubikvitin-proteasoma (15, 28). S obzirom na sve navedeno, logično je zaključiti da kvasac može predstavljati dobar model i za proučavanje procesa agregacije proteina. Čak i u slučaju nepostojanja homolognih gena, zbog mogućnosti heterologne ekspresije gena čovjeka kvasac opet može biti dobar modelni organizam, kao što je to slučaj u proučavanju proteina tau. Kvasac je već korišten kao model za proučavanje molekularnih procesa vezanih uz tau protein čovjeka (49,53,54). Pokazalo se da je tau protein čovjeka eksprimiran u kvascu fosforiliran te da može tvoriti agregate (55,56). Za razliku od α-sinukleina (57), amiloida-β (58) i C9orf72-DPR (engl. *chromosome 9 open reading frame 72 - dipeptide repeat*) (59), koji su pokazali toksičnost

uslijed ekspresije u kvascu, humani tau (55) i mutirani Huntingtin (57) nisu doveli do toksičnosti u kvascu divljeg tipa.

Kvasac tokom rasta prolazi tri različite faze – lag faza neposredno nakon nacijepljivanja i prije početka fermentacije, logaritamska faza u kojoj se stanice eksponencijalno dijele i koriste glikolizu za stvaranje ATP-a te stacionarna faza u kojoj stanice uspore i zatim potpuno se prestanu dijeliti, a za proizvodnju ATP-a prelaze na oksidativnu fosforilaciju (60). Starenjem stanice kvasca pokazuju slične značajke koje tokom starenja prolaze i stanice viših eukariota, poput nakupljanja aberantnih proteina, skraćenih telomera, oksidacijskog oštećenja i disfunkcije mitohondrija. Zapravo, kvasac je jedan od glavnih staničnih modela u proučavanju starenja (17, 61) te se koristi za proučavanje dvaju tipova starenja – replikativnog i kronološkog. Kronološki životni vijek je maksimalno vrijeme koje stanica može preživjeti u mirovanju u stacionarnoj fazi, bez stanične diobe (17). Replikativni životni vijek označava broj dioba kroz koje stanica majka može proći prije nego se prestane dijeliti, što je obično 20 – 25 dioba te odgovara mitotički aktivnim stanicama. S obzirom da se stanice kvasca dijele asimetrično, moguće je razlikovati veliku stanicu majke i manju stanicu kćeri - pup (61). Modeli kvasca pružili su uvid u molekulske temelje procesa starenja i patologije patoloških promjena u bolestima povezanih sa starošću koje nastaju u starijoj životnoj dobi (62).

Složenost i sveobuhvatnost gena uključenih u nastanak i napredovanje Alzheimerove bolesti zahtjeva razvoj platformi za velike probire kako gena uključenih u patološke promjene, tako i za probire potencijalnih modulatora narušenih staničnih procesa, a opisana obilježja kvasca čine ga dobrom polaznom točkom u takvim istraživanjima.

1.7. Reporterski sustav NanoBiT za detekciju interakcija između proteina putem luminiscencije

Interakcije proteina mogu se pratiti pomoću molekulskih alata koji se temelje na rekonstituciji reporter gena koji je prethodno podijeljen na fragmente. Komplementarni fragmenti reportera u tim sustavima genski su spojeni s proteinima od interesa te mogu

povratiti aktivnost reporterskog gena ukoliko dođu u neposrednu blizinu prilikom interakcija njihovih fuzijskih partnera, odnosno proteina od interesa. Aktivnost reportera stoga je neizravna mjera interakcije proteina spojenih s fragmentima toh reportera.

NanoBiT (od engl. *NanoLuc Binary Technology*) sustav za ispitivanje protein-protein interakcija temelji se na luciferazi NanoLuc koja je izolirana iz dubokomorskog organizma *Oplophorus gracilirostris* (63). Luciferazu NanoLuc karakterizira mala masa proteina, svega 19,1 kDa, te svijetla i stabilna luminescencija koju je moguće mjeriti u živim stanicama (63). U sustavu NanoBiT ta luciferaza podijeljena je u dvije nejednake podjedinice, polipeptidne fragmente, malu SmBiT (1,3 kDa) (engl. *small bit,* SmBiT) i veliku podjedinicu LgBiT (18 kDa) (engl. *large bit*, LgBiT). Ove podjedinice same nemaju veliki afinitet vezanja pa rekonstitucija enzima ovisi o njihovim fuzijskim partnerima, odnosno interakciji između fuzijskih partnera, uslijed koje dolazi do bliske udaljenosti podjedinica i rekonstitucije enzima. Luciferinski supstrat čiju razgradnju katalizira NanoLuc je sintetički spoj furimazin, a reakcijom neovisnom o ATP-u, nastaje luminiscencija visokog intenziteta (λ_{max} = 465 nm) (63). Za razliku od reporterskih sustava koji se temelje na komplementaciji podijeljenih fluorescentnih proteina što „zarobljavaju“ komplekse, komplementacija fragmenata NanoBiT sustava je reverzibilan proces, zbog čega je NanoBiT pogodan za proučavanje dinamike interakcije proteina. NanoBiT sustav se nedavno koristio u stanicama sisavaca za proučavanje dimerizacije proteina Sod1 (eng. *superoxide dismutase type 1*) i TDP-43 (eng. *TAR DNA-binding protein 43*), procesa impliciranih u nastanku amiotrofične lateralne skleroze (31,32). Nedavna studija proučavala je oligomerizaciju proteina tau koristeći stanice čovjeka HEK-293 te reporter na bazi luciferaze Gaussia, koji je konstruiran spajanjem fragmenata luciferaze na C-terminalni kraj proteina tau (64). Studija je pokazala da je tau formirao oligomere uslijed ekspresije u HEK-293 stanicama te da je dodatak poznatih katalizatora agregacije tau stanicama doveo do nešto brže oligomerizacije.

Kako bismo bolje razumjeli rane korake u patogenezi Alzheimerove bolesti i razjasnili puteve koji vode do agregacije proteina tau, u ovom smo radu konstruirali luminiscentni reporter za otkrivanje interakcija proteina tau u živim stanicama te smo istraživali čimbenike agregacije koristeći prednosti genetike kvasca na modelu stanica

kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. U daljnjim istraživanjima taj će se reporter koristiti u genetskom probiru za čimbenike koji utječu na oligomerizaciju tau, proces koji može biti jedan od koraka u formiranja većih, patoloških agregata proteina tau (64,65). Identifikacija tih čimbenika u kvascu dat će nam saznanja o tome koji bi putevi i procesi mogli biti narušeni pri agregaciji i toksičnom djelovanju proteina tau u stanicama sisavaca.

2. HIPOTEZA

Proteotoksični stres dovodi do povećane agregacije i toksičnosti tau proteina čovjeka u stanicama kvasca.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1.OPĆI CILJ

Ispitati utjecaj proteotoksičnog stresa na agregaciju i toksičnost tau proteina čovjeka u staničnom modelu kvasca *Saccharomyces cerevisiae.*

3.1.1 SPECIFIČNI CILJEVI

1) Konstruirati i uspostaviti luminiscentni reporter tau-NanoBiT za detekciju oligomerizacije tau proteina u stanicama kvasca

2) Ispitati korelira li aktivacija reporterskog sustava tau-NanoBiT s razinom agregata tau proteina netopljivih u sarkozilu (“sarkozil-netopljivog tau”)

3) Ispitati utjecaj proteotoksičnog stresa na agregaciju tau proteina

4) Ispitati utjecaj proteotoksičnog stresa na toksičnost tau proteina

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Sojevi kvasca

Sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* korišteni u ovom radu izogenični su divljem tipu soja S288C te su navedeni u tablici 4.1.

Tablica 1. *Sojevi kvasca Saccharomyces cerevisiae korišteni u ovom radu*

soj	genotip	izvor
BY4741	*MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*	Euroscarf (Oberursel, Njemačka)
BY4742	*MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0*	Euroscarf (Oberursel, Njemačka)
pho85Δ, Y12797	*BY4742; MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YPL031c::kanMX4*	Euroscarf (Oberursel, Njemačka)
sod2Δ, Y16605	*BY4742; MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YHR008c::kanMX4*	Euroscarf (Oberursel, Njemačka)
rim1Δ, Y10936	*BY4742; MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YHL027w::kanMX4*	Euroscarf (Oberursel, Njemačka)
rpn4Δ, Y03716	*BY4741; MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YDL020c::kanMX4*	Euroscarf (Oberursel, Njemačka)
ire1Δ, Y01907	*ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; ire1D::kanMX4*	Euroscarf (Oberursel, Njemačka)

hac1∆, Y05650	*ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; hac1D::kanMX4*	Euroscarf (Oberursel, Njemačka)
MEP alpha 15937, UCC5181	*ade2::hisG his3 leu2 met15D::ADE2 trp1D63 ura3DO hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-natMx lox-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-intron-loxP-HPHMx*	Antonio Bedalov laboratorij
ply1348	*cim3-1;ura3-52;leu2D1;ssd1*	Per Ljungdahl laboratorij
CAY220	*ura3-51;leu2D1;ssd1*	Per Ljungdahl laboratorij
BY4741_Nup49_ mScarlet	*BY4741; MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;YGL172W::Nup49-mScarlet-URA3*	ova studija

4.1.2. Sojevi bakterija

Za umnožavanje i izolaciju plazmida korištene su komercijalno dostupne visokokompetentne stanice bakterije Escherichia coli soja DH5α proizvođača New England Biolabs (Ipswich, SAD)

4.1.3. Plazmidi

- pXP731 (#46057) (66), pXP722 (#46056) (66), pFA6a-link-ymScarletI-URA3 (#168055) (67) nabavljeni su iz repozitorija plazmida Addgene (Watertown, Massachusetts, SAD)
- pRS316 dobiven je ljubaznošću prof. dr. sc. Per Ljungdahl
- pCA1016 dobiven je ljubaznošću prof. dr. sc. Claes Andreasson

Tablica 2. *Plazmidi konstruirani i korišteni u ovom radu*

Naziv plazmida	okosnica	genski insert
pKZ01	pEX-A258	gen za tau s kodonima optimiziranima za ekspresiju u kvascu omeđen restrikcijskim mjestima za enzime (RE) SpeI and XhoI
pKZ02	pEX-A128	C-terminus tau-2xHA-GS-SmBiT-Tsynht8 (RE XhoI/XhoI)
pKZ03	pEX-A128	C-terminustau-V5-GS-LgBiT-Tsynth27 (RE XhoI)
pKZ04	pRS316, CEN, *URA3*	P_{TDH3}-tau-2xHA-linker-SmBiT-Tsynht8
pKZ05	pRS315, CEN, *LEU2*	P_{TDH3}-tau-2xHA-SmBIT-Tsynht8
pKZ06	pRS316, CEN, *URA3*	P_{TDH3}-tau-V5-LgBiT-Tsynth27
pKZ07	pRS315, CEN, *LEU2*	P_{TDH3}-tau-V5-LgBiT
pKZ 08	pRS316, CEN, *URA3*	tau-NanoBiT: P_{TDH3}-tau-2xHA-SmBIT P_{TDH3}-tau-V5-LgBiT
pKZ09	pRS316, CEN, *URA3*	P_{TDH3} -V5-LgBiT
pKZ10	pXP731, CEN, *LEU2*	P_{CUP1}-tau-CYC1
pKZ11	pXP732, CEN, *URA3*	P_{CUP1}-tau-CYC1
pKZ12	pXP722, CEN, *URA3*	P_{GAL1}-tau-CYC1
pKZ13	pRS317, CEN, *LYS2*	P_{TDH3}-tau-HA-SmBiT
pKZ15	pRS316, CEN, *URA3*	P_{TDH3}-TDH3-V5-LgBiT
pKZ16	pRS316, CEN, *URA3*	P_{TDH3}-TDH3-V5-LgBiT–P_{TDH3}–tau-HA-SmBiT
pKZ18	pRS315, CEN, *LEU2*	P_{TDH3}-TDH3-HA-SmBiT

pKZ20	pRS316, CEN, *URA3*	P_{TDH3}-13myc-LgBiT
pKZ21	pFA6a-link-yoSuperfolderGFP-CaURA3, *URA3*	P_{TDH3}-tau-HA- sfGFP
pKZ24	pMB152, CEN, *URA3*	P_{TEF1}-tau-sfGFP
pKZ35	pRS316, CEN, *URA3*	P_{TDH3}-tau-HA-SmBIT P_{TDH3}-tau-V5-LgBiT (povećan razmak između terminatora)
pKZ37	pMB152, CEN, *URA3*	P_{PIR3}-tau-sf.GFP
pKZ38	pRS316, CEN, *URA3*	P_{TDH3}-TDH3-V5-LgBiT
pKZ41	pXP731, CEN, *LEU2*	P_{PIR3}-tau
pKZ44	pMB152, CEN, *URA3*	P_{PIR3}-sfGFP
pKZ45	pMB281, integracijski, *HIS3*	P_{Z}-tau-sfGFP
pKZ49	pMB152, CEN, *URA3*	P_{Z}-tau-sfGFP
pKZ51	pXP731, CEN, *LEU2*	P_{PIR3}-NeonGreen-tau

4.1.4. Oligonukleotidi

Oligonukleotidi korišteni u radu popisani su u tablici 4.3.
Oligonukleotidi prKZ9, prKZ10, prKZ11 i prKZ12 sintetizirani su u tvrtki Eurofins Genomics (Luksemburg), a svi ostali su od tvrtke Macrogen (Seoul, Južna Koreja).

Tablica 3. *Oligonukleotidi korišteni u ovom radu*

naziv	sekvenca 5’ → 3’
prKZ9	AATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGC CTGCTGTAACCCGTACATG

prKZ10	GTCCCAGCGTGATCTTCCATCACTTCGAACTCCTGACGGGGCTCAGCCATTTTGTTTGTTTATGTGTG
prKZ11	TGGGTACCGGGCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCCTGCTGTAACCCGTACATG
prKZ12	CCAGAAGAACCAGTAGAATCCAAACCCAACAATGGATTTGGAATTGGTTTACCTTTGTTTGTTTATGTGTG
prKZ19	AAGTCATCGAAATAGATATTAAGAAAAACAAACTGTACAATCAATCAATCAATCATCACATAAACCTAGGATGGCTGAGCCCCGTCAGGA
prKZ20	GCGGATGTGGGGGGAGGGCGTGAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGTTACTACAAACCCTGCTTGGCCAG
prKZ26	CATGGTAGACTCGCCCCAGCTAGCCACTCTAGCTGACGAGGTGTCTGCCTCCCTGGCCAAG
prKZ27	GCATAGTCGGGGACATCGTAGGGGTACCCACCCAAACCCTGCTTGGCCAGGGAGGCAGAC
prKZ28	CGATGTCCCCGACTATGCATCTTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTAGCGTTACTGGT
prKz29	GTAAATGAGTTTATATATTATCACAAAATTTCTTCGAACAATCTGTAACCAGTAACGCTAGCGTAATC
prKZ30	GATAATATATAAACTCATTTACTTATGTAGGAATAAAGAGTATCATCTTTCAAATCTAGAACTAGTGG
prKZ31	CCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGATTTG
prKZ32	CCGTCGTTTACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTATTTGAAAGATGATACTCTT
prKZ32	TAAAACGACGGCCAGTGAAT
prKZ33	TGAGCGGATAACAATTTCACA
prKZ34	AGAAGCAAAAAGAGCGATGC
prKZ35	TTTTGTCATCGCTTCCAGTC
prKZ36	TGGCGGAGGAAATAAAAAGA
prKZ37	CCCAAAACCTTCTCAAGCAA
prKZ38	TAAAACGACGGCCAGTGAAT
prKZ39	GGGACACTTCTCCACGTCAT
prKZ40	TGTGGAATTGTGAGCGGATA
prKZ41	TAGTTTTAAAACACCAAGAACTTAGTTTCGAATAAACACACATAAACAAACAAACTCTAGAACTAGTATGGTTAGAGTTGCTATTAAC
prKZ43	AAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCACTAGTATGGCTGAGCCCCGTCAGG

prKZ72	CGCTGCAGGTCGACATGGCTGAGCCCCGTCAGGA
prKZ75	GTCTGCCTCCCTGGCCAAGCAGGGTTTGGGTGGGTACCCCTACGATGTCCC CGACTATGCATCTTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTAGCCCTAGGATGT CTAAAGGCGAGGAATTG
prKZ76	CAACAACAACAACAACAACACTAGTTCTAGATTTGAAAGATGATACTCTTTATT CCTACATAAGTAAATGAGTTTATATATTATCATTAATTAATTTGTACAATTCGTC CATTC
prKZ105	GGGGGGACTAGTGGTTTCTAAAATGTGCAACC
prKZ106	GGCGGCCCTAGGGACTTATAAACAGTACTTGTTTTATGAG
prKZ111	GAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAGGTAGTGGATCCCCCGGGCTG CAGGAATTC
prKZ129	ACTGTTTATGGATATCGCTGAGAGAATCGCCGTGTTACATCAAAAAACGAAAA CACTGGCATCATTGAGCATAATCGGTGACGGTGCTGGT
prKZ130	TATAAATTACATTTGTACAAGACATTTGTACTTGTTATACGCACTATATAAACTT TCAGGGCGATTTACCAGCAGTATAGCGACCAGCAT
prKZ135	CTTTAGATAATTATTACATTTACATCAATAAGAAATCTCATAAAACAAGTACTGT TTATAAGTCCCTAGGATGGTCTCTAAGGGTGAAG
prKZ136	GATCTTCCATCACTTCGAACTCCTGACGGGGCTCAGCACCAGAAGAACCACCA CCACCAGAACCACCCCGCGGCTTGTACAATTCGTCCATAC

4.1.5. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Za uzgoj sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* korištene su **YPD** (engl. *Yeast Extract Peptone Dextrose*) hranjive podloge sastava 1% kvaščev ekstrakt, 2% pepton, 2% glukoza i selektivne sintetske hranjive podloge CSD (engl. *synthetic complete drop-out*) sastava 6,7 g L^{-1} medija za uzgoj kvasca bogatog dušikom bez amonijaka (YNB, engl. *yeast nitrogen base*), 5 g L^{-1} amonij sulfata, 2% glukoze te uz dodatak odgovarajućih esencijalnih aminokiselina, ovisno o auksotrofnosti soja. Krute hranjive podloge jednakog su sastava kao i tekuće, uz dodatak 16 g L^{-1} agara.

Stanice temperaturno osjetljivih mutanata, uzgajane su na 27 °C (permisivna temperatura) i zatim prebacivane na 37 °C radi inaktivacije temperaturno osjetljivih proteina. Prilikom prebacivanja na 37 °C stanice su bile u logaritamskog fazi rasta. U eksperimentima u kojima nisu korišteni temperaturno osjetljivi mutanti, stanice su uzgajane na 30 °C.

4.1.6. Hranjive podloge za uzgoj bakterija

Za uzgoj *E. coli* korištena je selektivna tekuća podloga LB-Amp sastava: 15 g L^{-1} baktotripton; 10 g L^{-1} NaCl, 100 µg mL^{-1} karbenicilin. Krute podloge su osim navedenih komponenata sadržavale još i 20 g L^{-1} agara.

4.1.7. Protutijela

Primarna protutijela korištena za analizu proteina metodom Western blot popisana su u tablici 4.4.

Korišteno sekundarno protutijelo je anti-mouse IgG, protutijelo na mišji IgG F_c fragment konjugirano s peroksidazom hrena (engl. *horse-radish peroxidase*, HRP), proizvedeno u konju, korišteno u koncentraciji 1:1000 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, SAD #7076, RRID:AB_330924).

***Tablica 4**. Primarna protutijela korištena u ovom radu*

Ciljani protein	**Primarno protutijelo**	**Proizvođač, kataloški broj i RRID**	**Organizam porijekla**	**Korišteno razrjeđenje**
Anti- tau	tau5, monoklonsko protutijelo na ljudski tau	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD # MA5-12808, RRID: AB_10980631	miš	1:1000

Anti-V5	monoklonsko protutijelo na V5	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD RRID: AB_2556564	miš	1:5000
anti-HA	monoklonsko protutijelo na oznaku epitopa HA	[12CA5]	miš	1:1000
anti-myc	monoklonsko protutijelo na c-myc	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD AB_558470	miš	1:1000
anti-pgk1	monoklonsko protutijelo na nativni protein pGK1 iz *S. cerevisiae*	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD # 459250 RRID:AB_2532235	miš	1:10 000

4.2. Metode

4.2.1. *In silico* metode

Dizajn konstrukata *in silico* napravili smo u programima Gene Construction Kit® 4.5.0 (Textco BioSoftware, Raleigh, Sjeverna Karolina, SAD) i SnapGene®5.2.5.1. (GSL Biotech LLC, San Diego, Kalifornija, SAD).
Kodoni gena *MAPT* za tau protein čovjeka optimizirani su za ekspresiju u kvascu pomoću alata za optimizaciju rijetkih kodona GenSmart Optimization verzija Beta 1.0 (Genscript Biotech, Piscataway, New Jersey, SAD).

4.2.2. Molekulsko kloniranje i konstrukcija plazmida

Standardnim tehnikama rekombinantne DNA (PCR, enzimska restrikcija i ligacija) te pomoću homologne rekombinacije u kvascu klonirani su plazmidi popisani u tablici 4.2. Načini konstrukcije plasmida detaljnije su opisani u tablici 4.5.

***Tablica 5**. Metode konstrukcije i kloniranja plazmida konstruiranih u ovoj studiji*

Naziv	**Način konstrukcije**
pKZ4	- kotransformacija: 1) PCR produkt (prKZ9,10/pCA1016), 2) pKZ1 porezan s restrikcijskim enzimima (RE) SpeI i XhoI, 3) *assembly* PCR produkt (prKZ26,27,28,29,30,31), pRS316 porezan s RE NotI i BamHI - odabrane su kolonije na mediju bez uracila - plazmid provjeren sekvenciranjem (prKZ38,39,40)
pKZ5	- pKZ4 porezan s RE NotI, BamHI i ligiran s jednako porezanim pRS316 - restrikcijskom digestijom s HindIII provjerena ispravnost ligacije

pKZ6	- kotransformacija pRS316 porezanog s RE EcoRI i XhoI, PCR produkt (prKZ10,11/pCA1016), pKZ1 porezan RE XhoI i SpeI, pKZ3 porezan RE XhoI; - odabrane su kolonije na mediju bez uracila - plazmid provjeren sekvenciranjem (prKZ14)
pKZ7	- pKZ6 porezan RE SacI, EagI i ligiran s pRS315 - restrikcijska analiza s EagI
pKZ8	- pKZ4 i pKZ6 porezani s RE EcoRi, XhoI i ligirani - restrikcijska analiza s HindII, NdeI
pK 9	- kotransformacija PCR produkta (prKZ11,12/pCA1016), plazmida pKZ3 porezanog s XhoI, pRS316 porezanog s RE EcoRI, XhoI - sekvenciran početnicama prKZ32,33,41
pKZ10	- kotransformacija PCR produkta (prKZ19,20/pKZ5) i pXP731 porezanog s RE AvrII i XhoI - sekvenciran početnicama prKZ34,35,36,37
pKZ11	- pKZ10 porezan RE AvrII, XhoI i ligiran s jednako porezanim pXP732
pKZ12	- kotransformacija PCR produkta (prKZ20,43/pKZ10) i pXP722 porezanog s RE XhoI, SpeI
pKZ13	- pKZ4 porezan s RE ClaI, NotI i ligiran s jednako porezanim pRS317
pKZ14	- sintetizirani gen (Eurofins Genomics) s restrikcijskim mjestima: -5' SacII, 3' XhoI
pKZ15	- pRS316 porezan s RE EcoRI/KpnI i ligiran s jednako porezanim pKZ14 - restrikcijska analiza s RE AvrII i SpeI
pKZ16	- pKZ14 porezan RE EcoRI/SalI i ligiran s jednako porezanim pKZ5 - restrikcijska analiza sa RE SpeI i AvrII
pKZ17	- sintetizirani gen (Biomatik, Ontario, Kanada)
pKZ18	- pKZ17 porezan sa SacII i KpnI i ligiran s jednako porezanim pRS316
pKZ19	- gen optimiziran za ekspresiju u kvascu i sintetiziran (Eurofins Genomics, Luksemburg)
pKZ20	- pKZ19 porezan s RE ClaI/SpeI i ligiran s pRS316

pKZ21	- PCR produkt (prKZ75,76/pKZ4) porezan s RE AvrII i PacI i ligiran u pMB206
pKZ24	- PCR produkt (prKZ72,81/pKZ19) porezan s RE SalI i BamHI te ligiran s jednako porezanim pMB152 - restrikcijska analiza s RE NcoI - sekvenciran početnicama prKZ82,83,84
pKZ33	- pKZ17 porezan s RE KpnI/NotI te ligiran s jednako porezanim pRS316 - restrikcijska analiza RE SpeI/AvrII
pKZ35	- pKZ33 porezan s RE SpeI/NotI i ligiran s jednako porezanim pKZ6
pKZ37	- pKZ24 porezan s RE XhoI/KpnI i liginran s jednako porezanim pMB211
pKZ38	- pKZ15 porezan s RE EcoRI/SacI i ligiran s jednako porezanim DNA oligonukleotidom prKZ111 kako bi se mutiralo restrikcijsko mjesto SpeI u MCS (*multi cloning site*)
pKZ41	- PCR produkt (prKZ105,106/genomska DNA) porezan sa RE SpeI/AvrII i ligiran s jednako porezanim pKZ10 - restrikcijska analiza s RE SpeI/XbaI

4.2.3. Izolacija rekombinantnih plazmida

Rekombinantni plazmidi su izolirani iz 5 mL prekonoćnih bakterijskih kultura komercijalno dostupnim setom reagensa NucleoSpin Plasmid (Macherei Nagel, Dueren, Njemačka) prema uputama proizvođača.

4.2.4. Restrikcijska analiza

Analize plazmida provedene su restrikcijskim endonukleazama. Svi korišteni enzimi proizvođača su New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD) te su restrikcijske analize provedene prema uputama proizvođača.

4.2.5. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

PCR produkti i produkti restrikcijske digestije analizirani su horizontalnom elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu, obojanom s Gel red bojom (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, Biotium (San Francisco, Kalifornija, SAD)). Elektroforeza se odvijala pri stalnom naponu 120 V / 35 min u sustavu za elektroforezu (Biorad, Laboratories, Hercules, CA, SAD). Dobiveni fragmenti na gelu su vizualizirani na uređaju Uvitec (Uvitec Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo).

4.2.6. Transformacija stanica kvasca *S. cerevisiae* litij acetatnom metodom (68)

Stanice kvasca uzgojene su u orbitalnoj tresilici na tekućoj podlozi YPD do logaritamske faze rasta. Stanice su odvojene od podloge centrifugiranjem (5 min / 1500 g), a talog je ispran sterilnon H_2O volumenom jednakim volumenu početne tekuće podloge. Nakon ponovnog centrifugiranja, talog je resuspendiran u pola volumena sterilnog 100 mM litijevog acetata te su stanice ponovo odvojene centifugiranjem. Zatim je talog resuspendiran u 50 µL 100 mM litijevog acetata. 50 µL suspenzije stanica odpipetirano je u Eppendorf epruvetu, dodana je denaturirana DNA testisa lososa (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka), DNA za transformaciju (1 – 5 µg) i 300 µL otopine 39% polietilenglikola 4000 u 100 mM litij acetat te je sve skupa snažno protreseno pa inkubirano 40 minuta na 42°C, nakon čega su stanice odvojene centrifugiranjem (1 min / 8000 rpm). Talog je resuspendiran u 120 µL sterilne vode i nacijepljen na krute selektivne podloge.

4.2.7. Izolacija genomske DNA iz stanica kvasca

Izolacija genomske DNA iz stanica kvasca provedena je pomoću kita YeaStar Genomic DNA Kit™ (Zymo Research, Irvine, California, SAD) prema uputama proizvođača.

4.2.8. Ispitivanje ekspresije proteina

Razinu proteina ispitali smo u ukupnim lizatima stanica (69) metodom Western blot, protutijelima na oznake epitopa (HA, V5, myc) i na protein tau (tau5). Proteini su vizualizirani kemiluminiscencijom pomoću uređaja ChemiDoc XRS+ (BioRad Laboratories, Hercules, CA, SAD) i programa ImageLab (BioRad Laboratories). Normalizacija signala napravljena je prema ukupnim proteinima u uzorku pomoću stain-free metode (BioRad Laboratories) ili prema ekspresiji proteina Pgk1 (engl. *Phosphoglycerate Kinase 1*) u uzorku. Kako bi se kvantitativno analizirala ekspresija proteina korišten je javno dostupan ImageLab 6.0 računalni program kompatibilan s Chemidoc sustavom za vizualizaciju.

4.2.9. Uzgoj replikativno starih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Nakon prekonoćnog uzgoja do rane logaritamske faze u kompletnom tekućem mediju, stanice su označene dodatkom reagensa EZ-Link Sulfo-NHS-LC- biotina, a zatim je u medij dodan β-estradiol, kojim se inhibira dioba stanica kćeri. Stanice majke vizualizirane su primjenom fluorescentne mikroskopije, označavanjem stanica s fluorescentnim komercijalno dostupnim reagensom NeutrAvidinom, koji sadrži modificirani protein avidin koji veže biotin u staničnoj stijenci označenih stanica majki.

4.2.10. Priprema stanica za mikroskopiju

Za fiksaciju stanica, u 1 ml logaritamski rastućih stanica ili 100 µL stacionarne kulture stanica dodan je 4% formaldehid do konačne koncentracije 0,8%. Stanice su inkubirane 10 min na sobnoj temperaturi te su centrifugirane i isprane dva puta u PBS-u. Talog stanica resuspendiran je u 50 µL PBS-a te je 5 µL suspenzije nakapano na pokrovna stakalca premazana *concavalinom* A za imobilizaciju stanica.

4.2.11. Mjerenje luminiscencije

Intenzitet luminiscencije izmjeren je u živim stanicama kvasca pomoću čitača mikroploča Glomax Explorer (Promega, Madison, WI, SAD) i NanoGlo luciferaznog testa (Promega), prema protokolu proizvođača. Supstrat za luciferazu, NanoGlo, razrijeđen je u puferu za razjeđivanje 1:100 te dodan u omjeru 1:10 u stanice. Signal je normaliziran prema gustoći stanica, mjerenoj pomoću OD_{600} te izražen po mililitru stanične suspenzije.

4.2.12. Stanični testovi

Reproduktivni kapacitet stanica kvasca određen je standardnim testom na temelju rasta kolonija kvasca nacjepljivanjem decimalnih razrjeđenja stanica na krutu podlogu (37). Test rasta je semikvantitativna metoda za određivanje vijabilnosti stanica. Stanice kvasca uzgojene su na optimalnoj temperaturi (27°C za termosenzitivne sojeve te 30 °C za sve ostale sojeve) do logaritamske faze rasta u tekućoj hranjivoj podlozi. Kulturi je spektrofotometrijski određena gustoća stanica (OD_{600}/ml) koja je zatim prilagođena na 1 OD_{600}/ml. Decimalna razrjeđenja nacijepljena su na krutu hranjivu podlogu, a potom inkubirane na optimalnoj ili povišenoj temperaturi 3 dana.

4.2.13. Statistička analiza

Za statističke analize korišten je računalni program GraphPad Prism 8. Jačina luminiscentnog signala reportera NanoBiT te signala proteina na Western blotu izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Nakon utvrđivanja normalnosti raspodjele pojedinih skupina podataka D'Agostino-Pearsonov testom, za podatke koji prate normalnu raspodjeluju upotrijebljeni su parametrijski testovi dvostrani t test, ANOVA i post hoc Tukey test, a za podatke koji ne prate normalnu raspodjelu neparametrijski test Mann-Whintey. Za razinu statističke značajnosti u svim testovima uzeto je $\alpha=0.05$.

5. REZULTATI

Iako su glavna neuropatološka karakteristika Alzheimerove bolesti i drugih tauopatija nakupine neurofibrilarnih snopića proteina tau, novija istraživanja pokazuju da je neurotoksičnost kod neuropatija barem dijelom uzrokovana ranim stadijima agregata tau, poput tau oligomera, koji prethode formiranju neurofibrila (56). Čimbenici koji dovode do oligomerizacije i agregacije proteina tau te uzroci toksičnosti tau oligomera i agregata još uvijek su velikim dijelom nepoznati.

Kako bismo istražili ova pitanja, u ovom radu eksprimirali smo tau protein čovjeka u stanicama jednostaničnog eukariota kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pogodnog za genetička istraživanja te ispitali toksičnost i agregaciju tau proteina u različitim uvjetima. S ciljem boljeg poznavanja ranih koraka u patogenezi Alzheimerove bolesti, kod koje nalazimo agregate divljeg tipa tau, u ovom istraživanju ispitivali smo divlji tip tau. Koristili smo tau izoformu 2N4R koja sadrži dvije insercije u N-terminalnoj domeni i četiri ponavljajuće regije u mikrotubul-vezajućoj domeni te se najčešće proučava u istraživanjima na staničnim kulturama.

5.1. Analiza toksičnosti tau proteina čovjeka eksprimiranog u stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

U prvom koraku istraživanja eksprimirali smo tau protein čovjeka u stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* te ispitali dovodi li ekspresija ovog proteina do toksičnosti u prisutnosti proteotoksičnog stresa i povišene fosforilacije proteina tau.

cDNA sekvenca 2N4R-izoforme divljeg tipa tau proteina čovjeka optimizirana je za ekspresiju u kvascu na način da su najrjeđe korišteni kodoni zamijenjeni učestalijima. Kako bismo omogućili induciranu ekspresiju proteina tau, konstruirali smo plazmide s tau pod kontrolom inducibilnih promotora gena *CUP1* i *GAL1* (pKZ10-12 u Tablici 2.), koji se induciraju putem dodatka iona bakra (P_{CUP1}), ili galaktozom (P_{GAL1}). Konstrukti su klonirani u centromerni plazmid koji je u stanici prisutan u jednoj do dvije kopije te se zbog

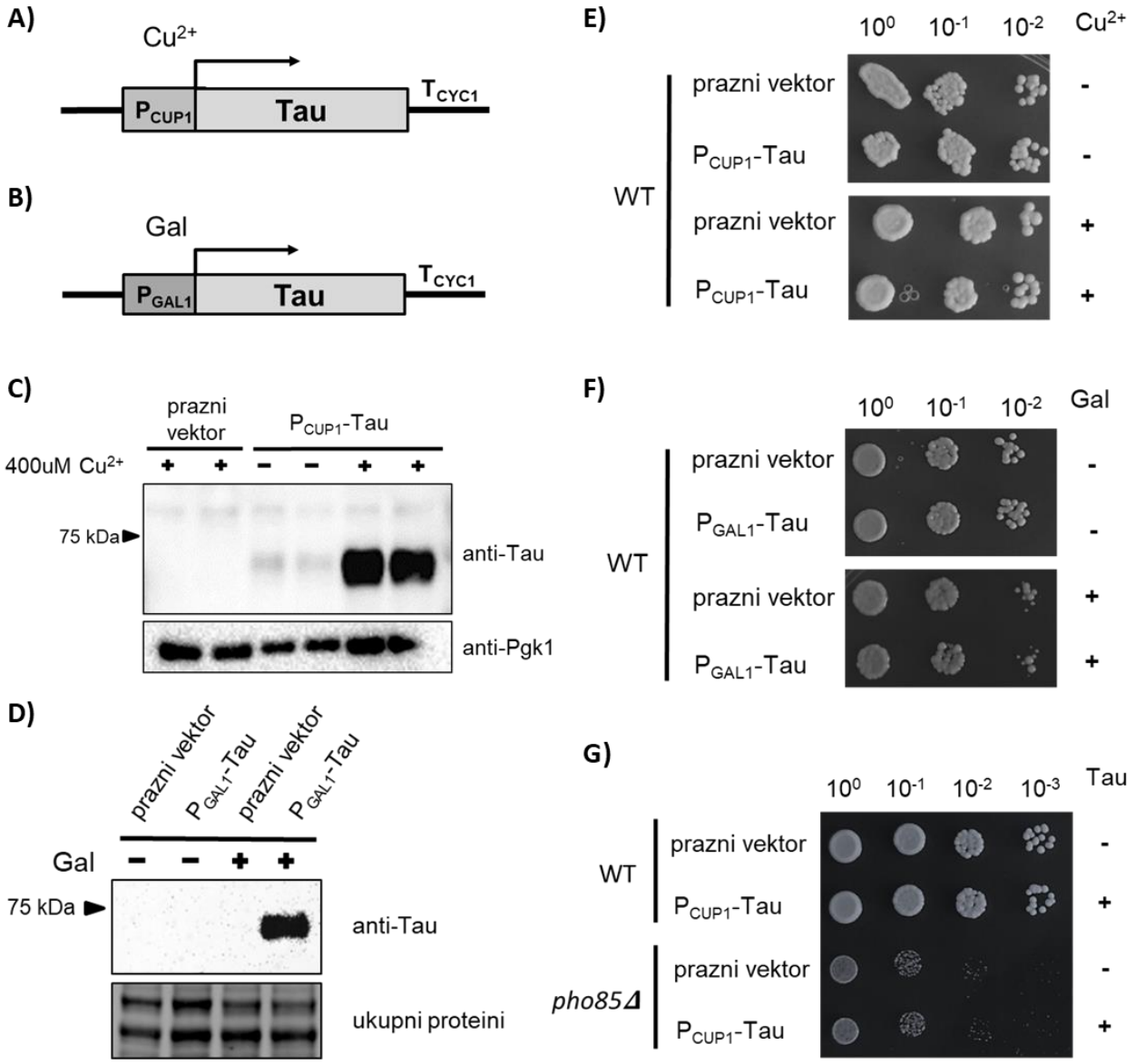
prisutnosti centromerne regije prilikom stanične diobe pravilno segregira između stanica majke i kćeri. Plazmidi su transformirani u divlji tip kvasca te je metodom *Western* blota koristeći anti-tau protutijelo ispitana ekspresija proteina tau u neinducirajućim i inducirajućim uvjetima (slika 1.A-D). Kao kontrolu za specifičnost anti-tau signala smo koristili stanice transformirane s praznim plazmidom koji je korišten kao okosnica za konstrukciju plazmida $P_{CUP1/GAL}$-tau. Indukcija ekspresije konstrukta P_{CUP1}-tau je provedena dodatkom 400 μM $CuSO_4$ u uzgojni medij, a u slučaju konstrukta P_{GAL1}-tau korištenjem medija s galaktozom te inkubacijom od dva sata. Dobiveni rezultati na Western blotu pokazuju proteinske vrpce odgovarajuće veličine prisutne nakon indukcije ekspresije tau, tj. induciranu ekspresiju tau proteina (slika 1.A-D).

Toksičnost tau proteina ispitali smo mjerenjem vijabilnosti, odnosno reproduktivnog kapaciteta stanica koje inducibilno eksprimiraju tau protein. Kako bismo ispitali utječe li ekspresija tau na vijabilnost i reproduktivni kapacitet stanica, koristili smo kvalitativno-semikvantitativnu metodu testa rasta. Ovim testom posredno se zaključuje o vijabilnosti stanica na temelju njihovog reproduktivnog kapaciteta, odnosno sposobnosti stanica da se podijele. Stanice logaritamske kulture nacijepljene su u decimalnim razrjeđenjima na krute podloge s ili bez inducirajućeg agensa te je praćen porast kolonija nakon tri dana inkubacije. Usporedbom rasta stanica divljeg tipa koje nose plazmid za inducibilnu ekspresiju tau i onih koje nose prazni vektor, nije uočena razlika te rezultat pokazuje da ekspresija tau ne utječe na vijabilnost stanica divljeg tipa kvasca (slika 1.E,F), što je u skladu s ranije objavljenim nalazima (55).

5.1.1. Ispitivanje utjecaja ekspresije proteina tau s povećanom fosforilacijom na vijabilnost stanica

Povišena fosforilacija tau u korelaciji je s nakupljanjem agregata proteina tau u neurofibrilarne snopiće u neuronima zahvaćenih dijelova mozga, a samo napredovanje bolesti, kao i stupanj kognitivnog oštećenja, u izravnoj su korelaciji s brojnošću neurofibrilarnih snopića. Ranija studija je pokazala kako je tau u kvascu fosforiliran te u mutantima s delecijom za fosfokinazu Pho85 (koja indirektnim učinkom na kinazu Mds1

dovodi do smanjene fosforilacije tau (70)) dolazi do hiperfosforilacije tau i konformacijskih promjena koje pokreću agregaciju tau u stanicama kvasca (55). Kako bismo istražili je li ekspresija proteina tau s povišenom fosforilacijom toksična za stanice kvasca, ispitali smo vijabilnost stanica soja u uvjetima povećane fosforilacije tau. U tu svrhu koristili smo soj s delecijskom mutacijom za gen *PHO85* (*pho85*Δ), za koji je prethodno pokazano da ima povećanu fosforilaciju tau te smo u ovom soju inducirali ekspresiju tau s konstrukta P_{CUP1}-tau dodatkom 100 μM $CuSO_4$ u medij. Usporedbom porasta stanica divljeg tipa i *pho85*Δ koje nose plazmid za inducibilnu ekspresiju tau i onih koje nose prazni vektor, nije uočena razlika u rastu stanica, osim generalno sporijeg rasta stanica *pho85*Δ koji je neovisan o ekspresiji tau te je vidljiv i u slučaju stanica transformiranih s praznim plazmidom. Rezultat pokazuje kako ekspresija proteina tau ne utječe na vijabilnost stanica soja mutanta *pho85*Δ *(slika 1.G)*, što ukazuje na to da tau s povišenom razinom fosforilacije nije toksičan za divlji tip stanica kvasca.

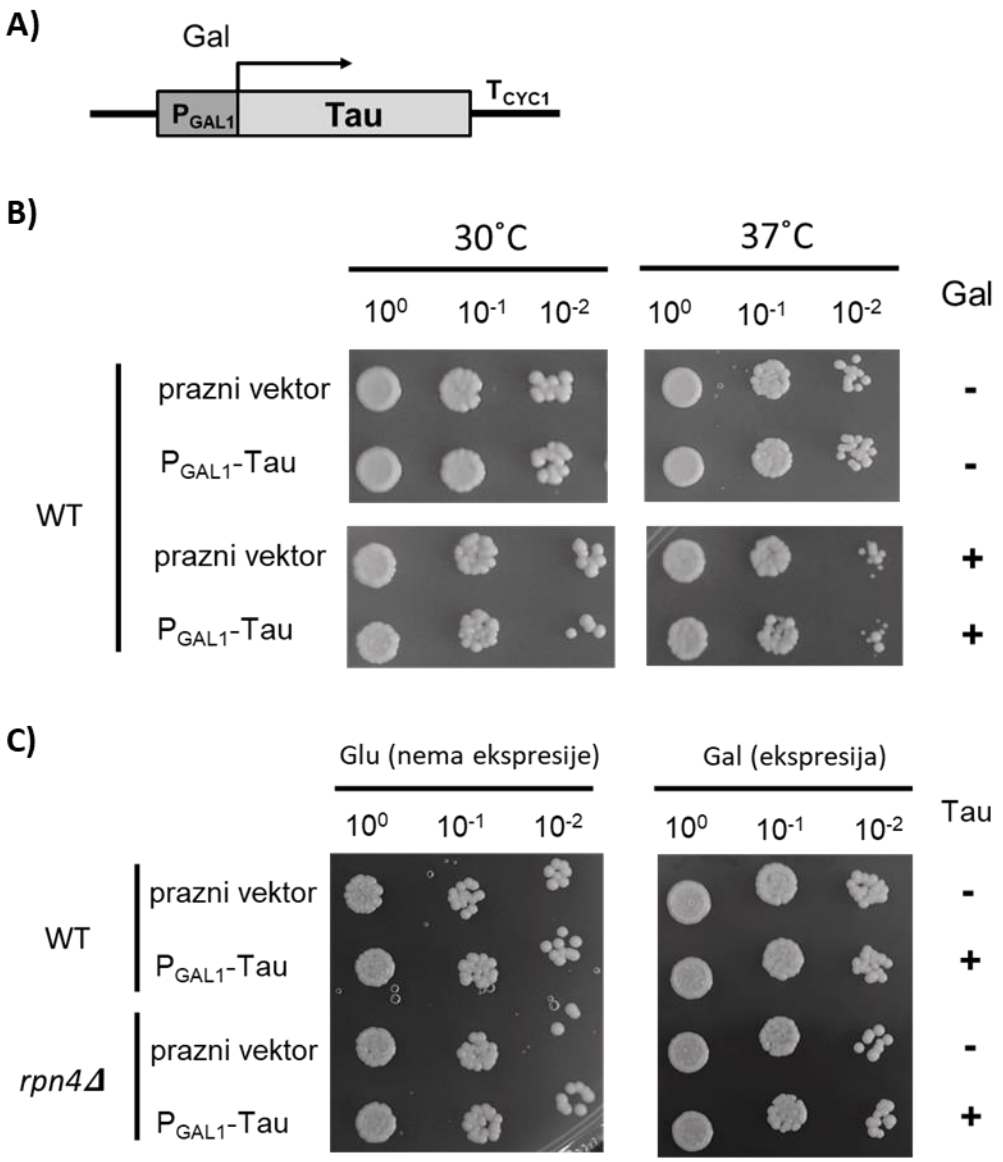


Slika 1. Vijabilnost stanica kvasca divljeg tipa uz induciranu ekspresiju proteina tau. *(A) Shema konstrukta P_{CUP1}-tau za indukciju ekspresije neobilježenog proteina tau ionima bakra. (B) Inkubacijom 2 h u mediju s 400 μM $CuSO_4$ inducirana je ekspresija tau pod kontrolom promotora CUP1. (C) Shema konstrukta P_{GAL1}-tau za indukciju ekspresije neobilježenog proteina tau galaktozom. (D) Uzgojem stanica dva sata na galaktozi inducirana je ekspresija tau pod kontrolom promotora GAL1, dok u stanicama uzgajanim na mediju s glukozom nema ekspresije proteina tau. (E) i (F) Stanice su uzgojene do logaritamske faze rasta te su decimalna razrjeđenja kulture nacijepljena na krutu podlogu sa i bez 400 μM $CuSO_4$ (E) ili s galaktozom odnosno glukozom (F). Ploče su fotografirane nakon 3 dana rasta. Ekspresija proteina tau ne utječe na rast stanica divljeg tipa. (G) Eskpresija proteina tau ne utječe na vijabilnost stanica mutanta pho85Δ. U eksperimentu je korišten konstrukt s neobilježenim proteinom tau pod kontrolom inducibilnog promotora CUP1 koji se inducira ionima bakra. Decimalna razrjeđenja stanica nacijepljena su na ploče sa 100 μM CuSO4, inkubirane pri temperaturi od 30˚C i fotografirane nakon 3 dana. Reprezentativna slika iz 3 neovisna eksperimenta.*

5.1.2. Ispitivanje utjecaja ekspresije proteina tau na vijabilnost stanica kvasca u uvjetima proteotoksičnog stresa

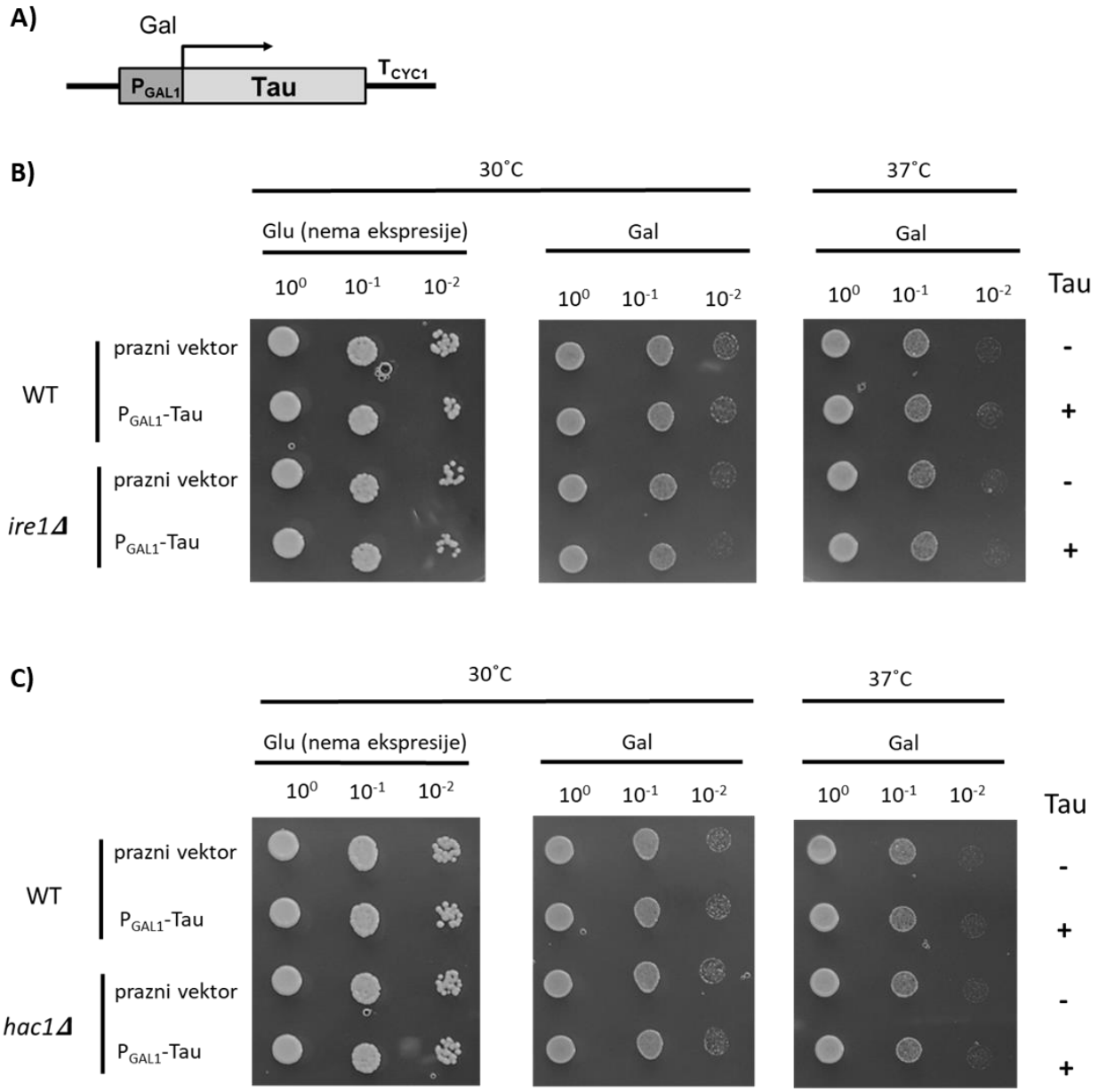
Prethodni rezultati pokazali su kako ekspresija tau proteina čovjeka ne dovodi do toksičnosti kod kvasca divljeg tipa (slika 1.). No, budući da je moguće da u stanicama divljeg tipa sustav za održanje homeostaze proteina kompenzira učinke nakupljanja proteina tau, u sljedećem koraku željeli smo ispitati dovodi li kombinacija ekspresije proteina tau do sintetskog učinka na vijabilnost stanica u uvjetima opterećenja stanica pogrešno smotanim proteinima, tj. proteotoksičnog stresa.

Kako bismo inducirali nakupljanje pogrešno smotanih proteina u stanici te tako izazvali proteotoksični stres, najprije smo izložili stanice blagom temperaturnom stresu. Ekspresija tau je inducirana u stanicama izloženim blagom temperaturnom stresu (37 ˚C, u odnosu na 30 ˚C, što je optimalna temperatura za rast kvasca) koje imaju veće opterećenje pogrešno smotanim proteinima, i više proteinskih agregata (71). Nadalje, kako bismo postigli uvjete proteotoksičnoga stresa, eksprimirali smo tau u delecijskom mutantu za gen *RPN4* (*rpn4*Δ). Rpn4 je transkripcijski čimbenik za gene (26S) proteasoma, stoga stanice *rpn4*Δ mutanta imaju smanjeni kapacitet razgradnje proteina sustavom ubikvitin-proteasoma, nužnog za održavanje homeostaze proteina. Usporedbom porasta stanica s inducibilnom ekspresijom tau uzgojenih na optimalnoj i povišenoj temperaturi te rasta stanica *rpn4*Δ mutanta i divljeg tipa, nije uočena razlika. Budući da ekspresija proteina tau ne utječe na vijabilnost stanica uzgajanih pri povišenoj temperaturi od 37˚C (slika 2.B), kao ni na vijabilnost *rpn4*Δ mutanta s narušenim kapacitetom sustava ubikvitin-proteasoma (slika 2.C), rezultati ukazuju na to da protein tau ne dovodi do toksičnosti u kombinaciji s blagim proteotoksičnim stresom u stanicama kvasca.



Slika 2. Ekspresija tau u uvjetima proteotoksičnog stresa ne utječe na vijabilnost stanica kvasca. *(A) U eksprimentima je korišten plazmid pKZ12 s konstruktom PGAL1-tau, u kojem se neobilježeni protein tau nalazi pod kontrolom inducibilnog promotora GAL1 čija se ekspresija inducira rastom stanica na mediju s galaktozom. (B) Ekspresija proteina tau ne utječe na rast stanica s narušenim sustavom kontrole kvalitete proteina. Decimalna razrjeđenja stanica nacijepljena su na ploče s glukozom ili galaktozom, inkubirane pri temperaturi od 30˚C i fotografirane nakon 3 dana. Reprezentativna slika iz 3 neovisna eksperimenta. (C) Ekspresija proteina tau ne utječe na rast stanica uzgajanim pri povišenoj temperaturi od 37˚C. Decimalna razrjeđenja stanica nacijepljena su na ploče s glukozom ili galaktozom, inkubirane pri temperaturi od 30˚C i 37˚C te fotografirane nakon 3 dana. Reprezentativna slika iz 3 neovisna eksperimenta.*

Nakupljanje oštećenih ili pogrešno smotanih proteina aktivira stanični odgovor na oštećene proteine (UPR). Bitne komponente signalizacijskog puta UPR su Ire1, protein koji funkcionira kao senzor stresa ER-a i dovodi do aktivacije proteina Hac1 te Hac1, transkripcijski čimbenik koji aktivira ekspresiju gena za suzbijanje posljedica proteotoksičnog stresa, kao što su ER šaperoni i komponente puta razgradnje pogrešno smotanih proteina. Budući da ekspresija pogrešno smotanih proteina u stanicama inducira UPR te u mutantima *ire1*Δ i *hac1*Δ dovodi do sporijeg rasta stanica (72), kako bismo ispitali inducira li tau u kvascu UPR, tau je inducibilno eksprimiran u stanicama s deletiranim genima za Ire1 i Hac1 koje su izložene povišenoj temperaturi uslijed čega dolazi do povećane količine pogrešno složenih proteina u stanici. U usporedbi s divljim tipom, stanice mutanata za UPR *ire1*Δ i *hac1*Δ pokazale su jednaku stopu rasta s ili bez ekspresije tau (slika 3. B i C, usporedba rasta stanica na 30 ˚C na mediju s galaktozom, odnosno glukozom), a slično je uočeno i u uvjetima uzgoja stanica na povišenoj temperaturi (slika 3. B i C). Budući ekspresija proteina tau ne utječe na rast stanica mutanata *ire1*Δ i *hac1*Δ, rezultat ukazuje na to da ekspresija proteina tau u kvascu ne inducira UPR, odnosno da protein tau čovjeka eksprimiran u stanici kvasca nije pogrešno smotan ili prepoznat kao aberantan protein te tau ne interferira sa staničnim putem UPR-a kvasca.

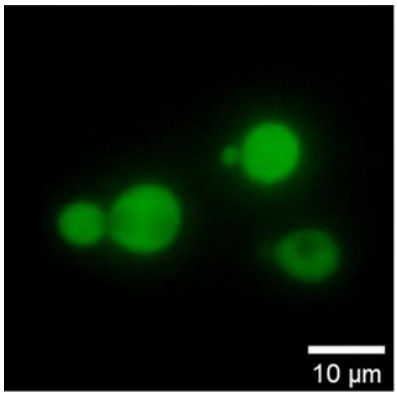


Slika 3. Ekspresija tau u uvjetima narušenog UPR-a ne utječe na vijabilnost stanica kvasca. *(A) U eksprimentima je korišten plazmid pKZ12 s konstruktom PGAL1-tau, u kojem se neobilježeni protein tau nalazi pod kontrolom inducibilnog promotora GAL1 čija se ekspresija inducira rastom stanica na mediju s galaktozom. (B) Ekspresija proteina tau ne utječe na rast stanica s narušenim UPR-om u mutantima ire1∆. Decimalna razrjeđenja stanica nacijepljena su na ploče s glukozom ili galaktozom, inkubirane pri temperaturi od 30˚C i 37˚C te fotografirane nakon 3 dana. Reprezentativna slika iz 3 neovisna eksperimenta. (C) Ekspresija proteina tau ne utječe na rast stanica s narušenim UPR-om u mutantima hac1∆. Decimalna razrjeđenja stanica nacijepljena su na ploče s glukozom ili galaktozom, inkubirane pri temperaturi od 30˚C i 37˚C te fotografirane nakon 3 dana. Reprezentativna slika iz 3 neovisna eksperimenta.*

Zaključno, rezultati ispitivanja utjecaja tau na vijabilnost stanica ukazuju na to da ekspresija tau u kvascu ne dovodi do toksičnog učinka kako u uvjetima normalnog rasta stanica, tako ni u ispitanim uvjetima proteotoksičnog stresa.

5.2. Ispitivanje unutarstanične lokalizacije proteina tau čovjeka eksprimiranog u stanicama kvasca

Kako bismo ispitali lokalizaciju proteina tau čovjeka eksprimiranog u stanicama kvasca, konstruirali smo fuzijski protein tau-sfGFP u kojem je tau na C-terminalnom kraju fuzioniran sa zelenim fluorescentnim proteinom, tzv. *superfolder* GFP (sfGFP) te ga stavili pod kontrolu konstitutivnog promotora gena *TEF1* (pKZ24 u Tablici 2). Konstrukt P_{TEF1}-tau-sfGFP na plazmidu je unesen u stanice kvasca divljeg tipa koje su uzgojene do logaritamske faze rasta, u kojoj se stanice aktivno dijele te je lokalizacija fuzijskog proteina ispitana pomoću fluorescentnog mikroskopa. tau-sfGFP difuzno je lokaliziran u citoplazmi stanica logaritamski rastuće kulture divljeg tipa kvasca (slika 4.), što je u skladu s ranije objavljenim nalazima (74) te ukazuje na to da tau u stanicama kvasca ne tvori vidljive agregate.

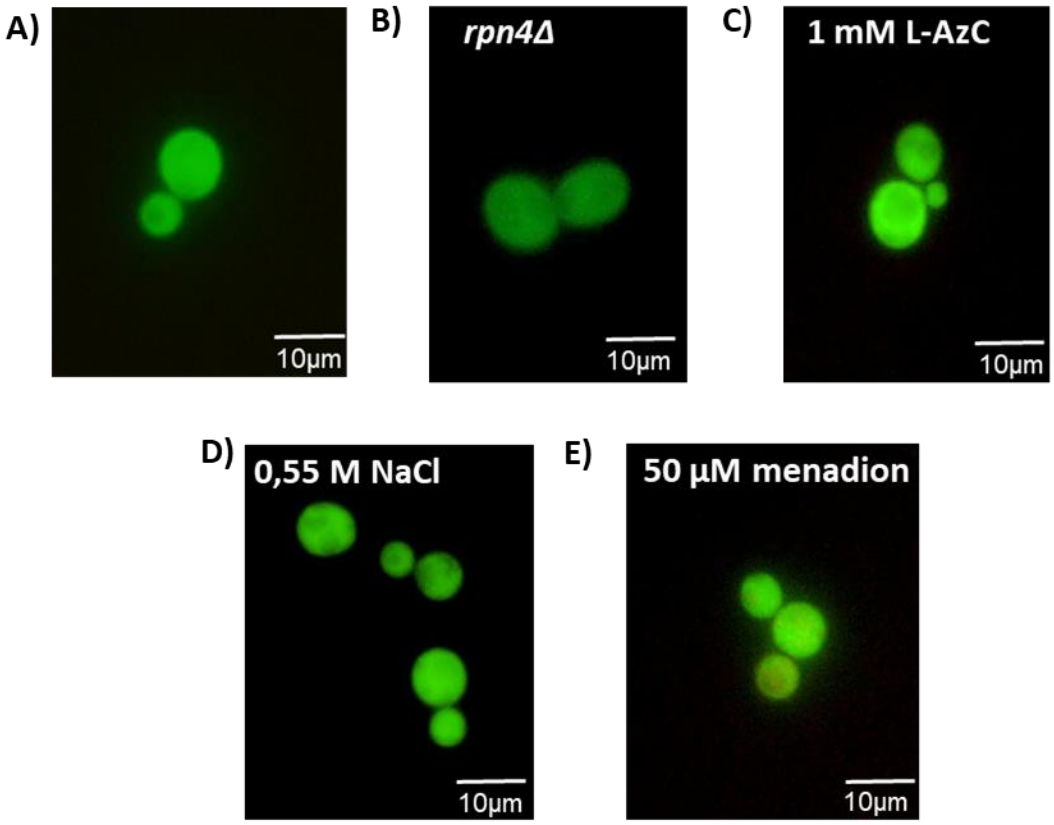


***Slika 4. Lokalizacija tau proteina u stanicama kvasca**. Kultura stanica kvasca divljeg tipa u logaritamskoj fazi, s konstruktom P_{TEF1}-tau-sfGFP (pKZ24)*

U sljedećem koraku ispitali smo dovodi li proteotoksični stres do pojave vidljivih agregata tau u stanicama kvasca. Lokalizaciju tau-sfGFP ispitali smo u stanicama tretiranim dva sata 1 mM L-azetidin-karboksilnom kiselinom (AzC), koja je toksični analog L-prolina te uzrokuje povišenu razinu pogrešno smotanih proteina u stanici (slika 5.E) te u *rpn4*Δ mutantu sa smanjenim kapacitetom razgradnje proteina proteasomima (slika 5.D). U opisanim uvjetima lokalizacija tau-sfGFP u citoplazmi je bila difuzna, slično kao u kontrolnim stanicama divljeg tipa kvasca (slika 5.A).

Nadalje, u svrhu ispitivanja lokalizacije proteina tau pri uvjetima drugih vrsta stresa, logaritamski rastuće stanice divljeg tipa kvasca koji eksprimiraju tau-sfGFP su podvrgnute hiperosmotskom stresu izazvanim tretmanom dva sata s 0,55 M natrijevim kloridom (slika 5.B) te oksidacijskom stresu izazvanim tretmanom od dva sata s 50 μM menadionom (slika 5.C). Slično kao u netretiranim stanicama (slika 5.A), tau-sfGFP je pokazao difuznu lokalizaciju u citoplazmi.

Zaključno, ispitani uvjeti staničnog stresa ne dovode do pojave vidljivih agregata proteina tau u stanicama kvasca.



Slika 5. Lokalizacija tau proteina u uvjetima različitih tipova staničnog stresa. *Ispitivani uvjeti nisu utjecali na lokalizaciju tau-sfGFP fuzija u stanicama logaritamski rastuće kulture divljeg tipa kvasca. (A) netretirane stanice (B) stanice mutanta rpn4Δ (C) tretman 1 mM L-azetidin-karboksilnom kiselinom, koja izaziva proteotoksični stres u stanicama (D) tretman 0,55 M NaCl, koji izaziva hiperosmotski stres u stanicama (E) tretman 50 μM menadionom, koji izaziva oksidacijski stres u stanicama.*

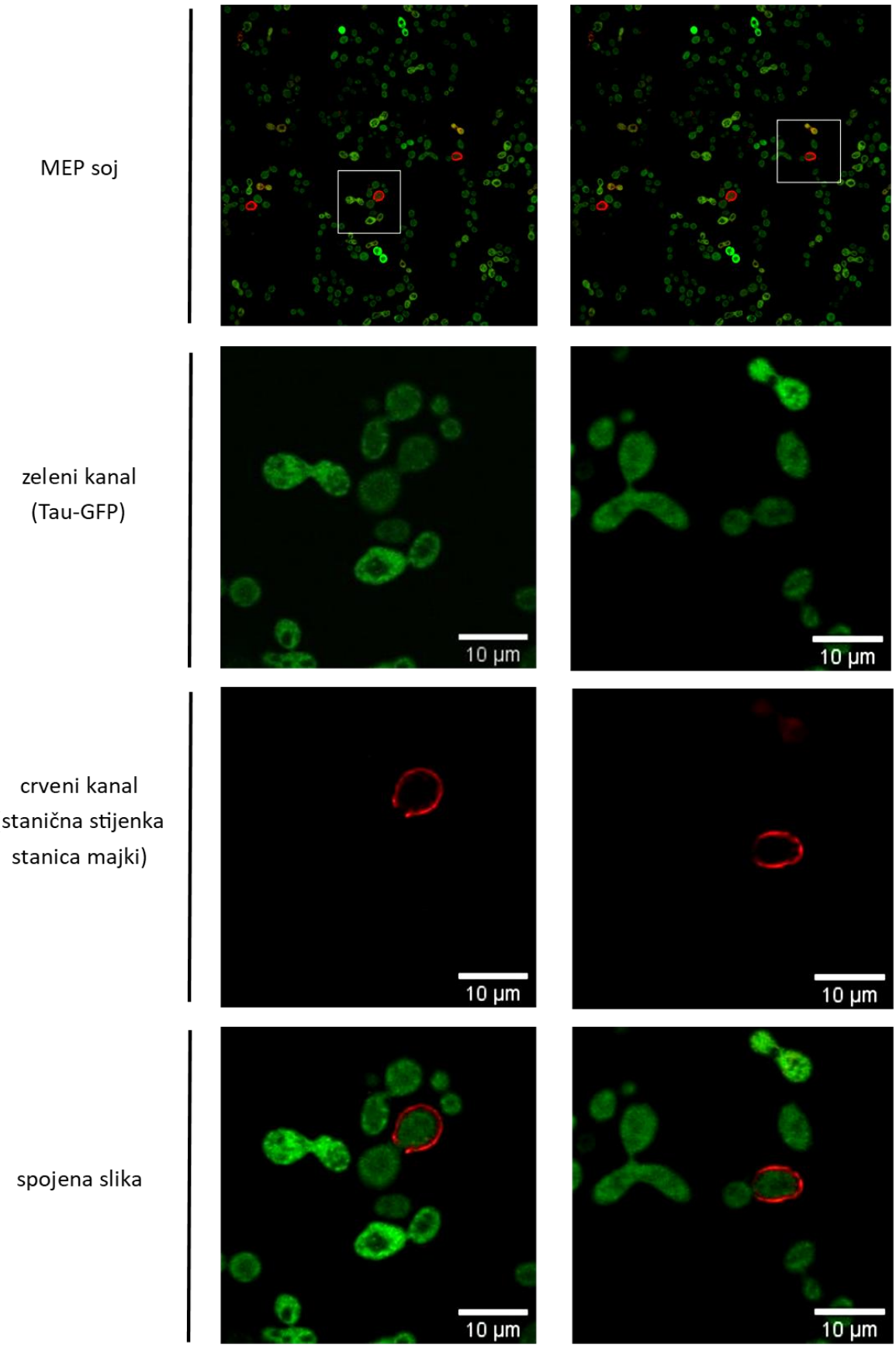
5.2.1. Ispitivanje unutarstanične lokalizacije proteina tau čovjeka eksprimiranog u stanicama kvasca tijekom staničnog starenja

Budući da je starenje jedan od glavnih čimbenika u nastanku patologije povezane s agregacijom proteina tau kod Alzheimerove bolesti te da starenjem opada sposobnost stanica da održavaju homeostazu proteina, što se očituje u nakupljanju oštećenih i pogrešno smotanih proteina u agregate (75), na modelu tau proteina čovjeka eksprimiranog u stanicama kvasca željeli smo ispitati utječe li proces staničnog starenja na pojavu vidljivih agregata proteina tau.

U sljedećem koraku ispitali smo utječe li proces staničnog starenja na pojavu agregata tau. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* često je korišten model u istraživanju staničnog starenja te kod kvasca postoji mogućnost istraživanja dvije vrste starenja, kronološkog i replikativnog. Replikativno starenje opisuje potencijal stanice da se podijeli i označava broj dioba koje stanica majka može proći prije senescencije, a temelji se na asimetričnoj diobi gdje se mogu razlučiti stanice majke i kćeri. Kronološko starenje s druge strane opisuje kapacitet stanice koja se ne dijeli da u stacionarnoj fazi kroz vrijeme zadrži reproduktivni kapacitet.

Budući da logaritamski rastuća kultura sadrži vrlo mali postotak replikativno starih stanica, (u svrhu obogaćivanja replikativno starih stanica) koristili smo protokol za obogaćivanje kulture stanicama majkama (engl. *mother enrichment program*, MEP). Protokol se temelji na MEP-soju s inducibilnim genetskim sustavom koji omogućava normalan replikativni životni vijek stanica majki, dok je proliferativni potencijal stanica kćeri eliminiran (76) te na označavanju stanica majki vezanjem biotina na staničnu stijenku. U stanicama MEP-soja smo eksprimirali tau-sfGFP s promotora gena *TEF1*, kulturu stanica obogatili za stanice majke putem MEP-protokola te označili stanice majke s biotinom i crveno fluorescentno obojenim neutravidinom. Stanice su skupljene 24 h nakon pokretanja programa za obogaćivanje stanica majki, kada su stanice majke označene biotinom stare oko 15-20 generacija (76). Reprezentativni rezultat pokazan je na slici 6.A, gdje zeleni kanal pokazuje fuzije tau-sfGFP, dok su na crvenom kanalu vidljive biotinom i neutravidinom crveno obilježene stanične stijenke stanica majki. Lokalizacija fuzijskog proteina u replikativno starim stanicama majkama pokazala je

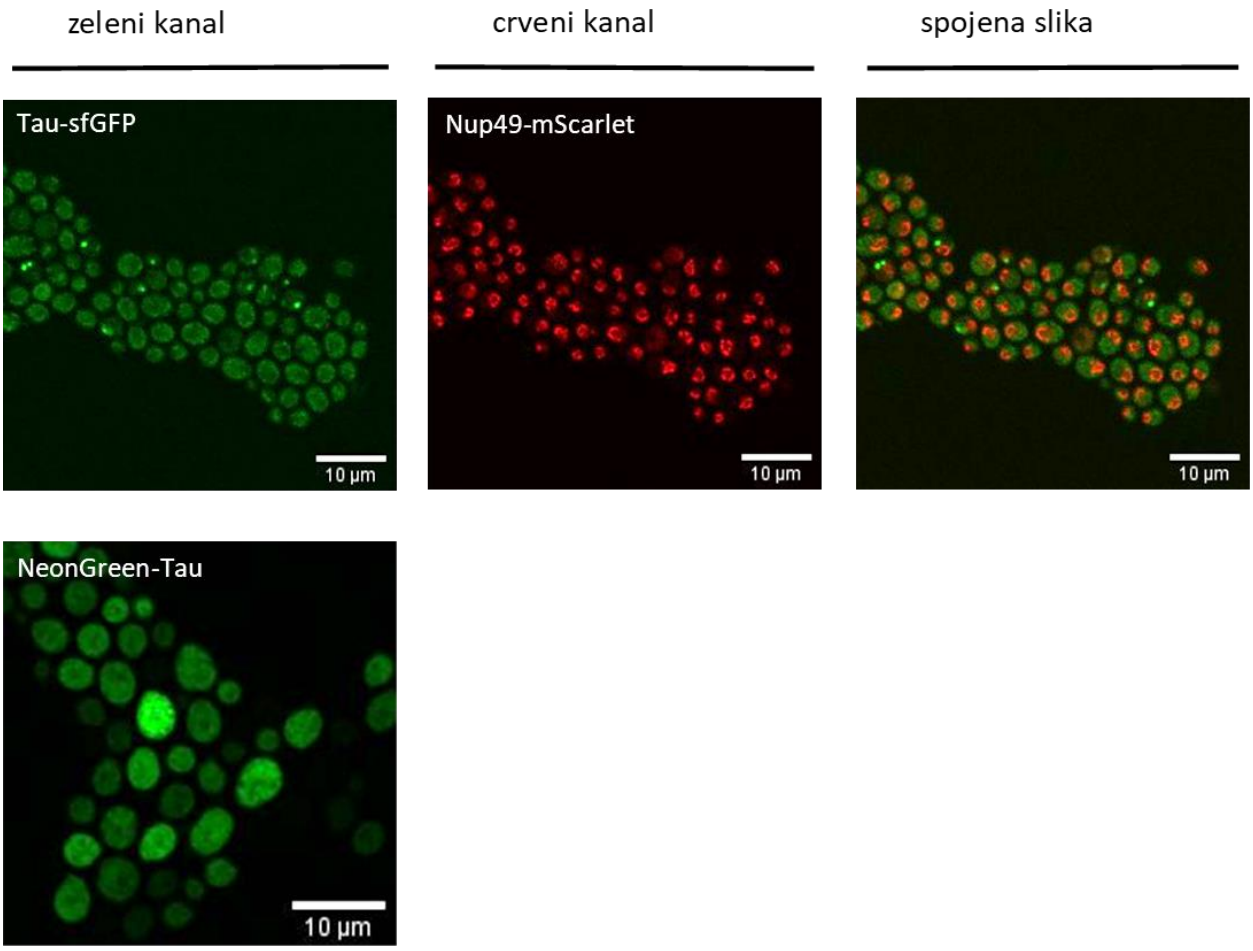
difuznu lokalizaciju tau-sfGFP bez inkluzija te bez uočljive razlike u lokalizaciji tau-sfGFP između stanica majki i stanica kćeri (slika 6.). Rezultat ukazuje na to da tijekom replikativnog starenja u stanicama kvasca ne dolazi do nakupljanja proteina tau u vidljive agregate ili inkluzije.


MEP soj
zeleni kanal
(Tau-GFP)
crveni kanal
(stanična stijenka
stanica majki)
spojena slika
10 µm
10 µm
10 µm
10 µm
10 µm
10 µm

Slika 6. Lokalizacija tau proteina u klulturi obogaćenoj replikativno starim stanicama. *Stanice MEP soja transformirane plazmidom pKZ24 (pTEF1-tau-sfGFP) 48 h nakon indukcije MEP programa dodatkom estradiola finalne koncentracije 1 μM. Stanična stjenka stanica majki obilježena biotinom i obojana crveno fluorescirajućim neutravidinom. Snimljeno konfokalnim mikroskopom.*

U svrhu istraživanja kronološkog starenja kvasca, stanice se uzgajaju u tekućoj kulturi više dana bez promjene medija, što dovodi do iscrpljenja glukoze u mediju i posljedičnog zaustavljanja staničnog ciklusa te kronološkog starenja stanica. Budući da promotor gena *TEF1*, koji je bio korišten za ekspresiju tau-sfGFP u logaritamski rastućim i replikativno starim stanicama, nije bio eksprimiran u stanicama u starvaciji (podatak nije prikazan), za ekspresiju tau-sfGFP tijekom kronološkog starenja koristili smo promotor gena *PIR3*, koji kodira protein stanične stijenke. Promotor gena *PIR3* aktivan je samo u prva tri dana uzgoja stanica u uvjetima starvacije za glukozu (podatak nije prikazan), stoga je ispitivanje lokalizacije proteina tau ispitano trećeg dana kulture stanica, tj. u ranoj fazi kronološkog starenja kvasca.

Provjera lokalizacije fuzijskog proteina tau-sfGFP u tri dana kronološki starim stanicama pokazala je kako otprilike 10 % stanica ima perinuklearno lokalizirane točkaste inkluzije (slika 7.). Kako bismo provjerili jesu li opaženi tau-sfGFP agregati u kronološki starim stanicama neovisni o fuzioniranom fluorescentnom reporteru, konstruirali smo fuzijski protein u kojem je tau na N-terminalnom kraju označen s drugim fluorescentnim proteinom, NeonGreen (NeonGreen-tau, slika 7.). Ispitivanje lokalizacije fuzijskog proteina NeonGreen-tau u stanicama tri dana stare kulture pokazalo je difuznu lokalizaciju signala te nisu uočene inkluzije (Slika 7.). Rezultat ukazuje na to da tijekom ispitanih početnih faza kronološkog starenja ne dolazi do stvaranja vidljivih agregata proteina tau te da su agregati tau-sfGFP primijećeni u 10 % kronološki starih stanica vjerojatno posljedica agregacije proteina sfGFP, a ne agregacije proteina tau uslijed starvacije za glukozu ili kronološkog starenja.

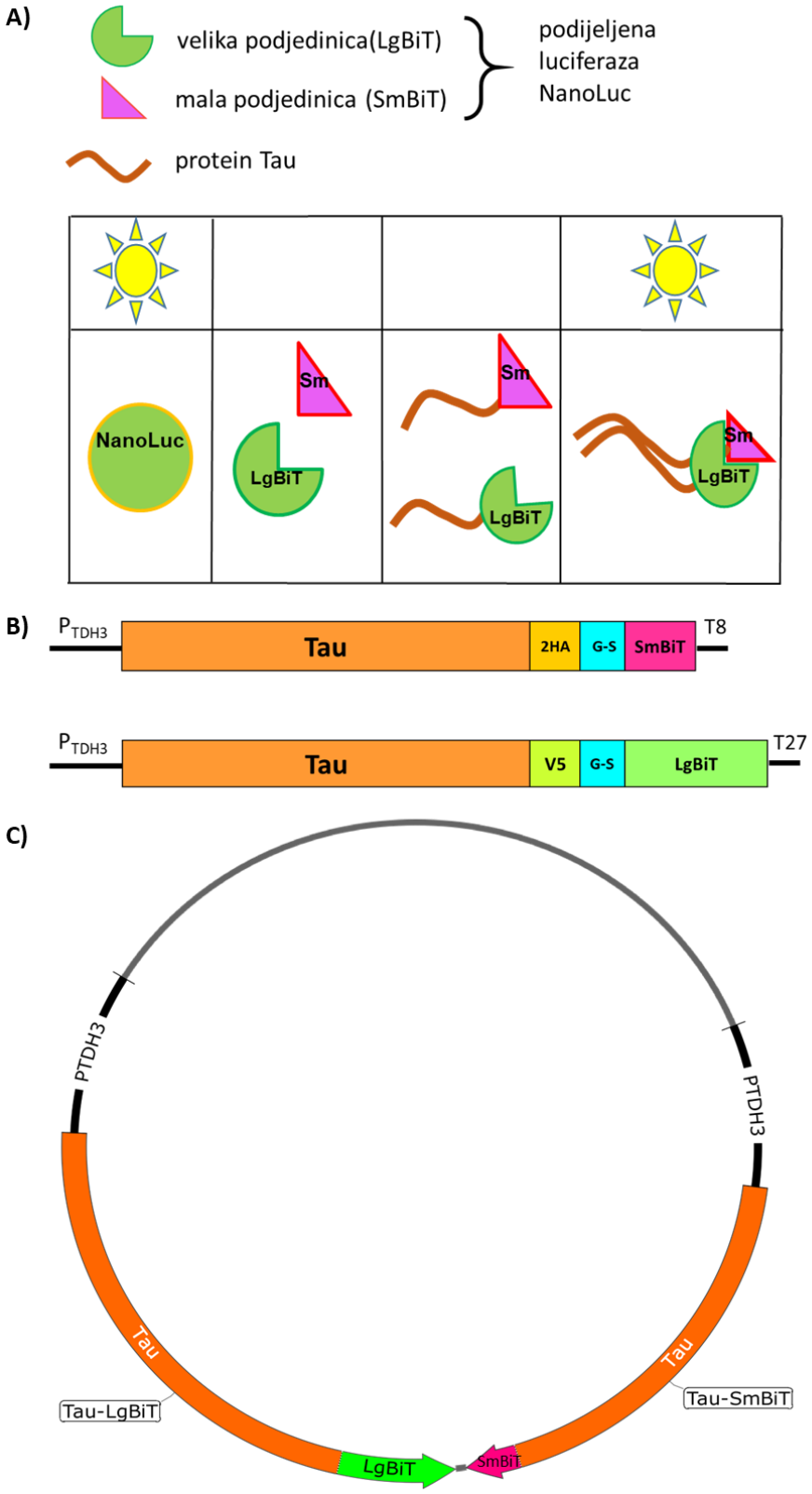


Slika 7. Lokalizacija tau proteina u 3 dana starim stanicama stacionarne kulture kvasca. *Divlji tip BY4741 transformiran plazmidom pKZ37 (PPIR3-tau-sfGFP) i s crveno obilježenim proteinom jezgrine pore Nup49-mScarlet – gornji panel, te stanice divljeg tipa BY4741 transformirane plazmidom pKZ51 (PPIR3-NeonGreen-tau) – donji panel. 3 dana stare stanice stacionarne kulture snimljene konfokalnim mikroskopom.*

Zaključno, rezultati ispitivanja lokalizacije proteina tau ukazuju na to da tau u stanicama kvasca ne tvori agregate vidljive fluorescentnim mikroskopom. Kako bismo ispitali dolazi li u stanicama kvasca do stvaranja ranih struktura u nastanku tau agregata, poput topljivih tau oligomera te koji čimbenici pospješuju stvaranje oligomera, u nastavku istraživanja konstruirali smo luminiscentni reporter tau-NanoBiT za detekciju interakcija proteina tau-tau.

5.3. Dizajn, konstrukcija i uspostava luminiscentnog reportera za ispitivanje oligomerizacije tau proteina čovjeka eksprimiranog u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*

U svrhu istraživanja čimbenika oligomerizacije i agregacije proteina tau, konstruirali smo reporterski sustav za detekciju interakcija proteina tau, temeljen na luciferazi – tau-NanoBiT, prilagođen za korištenje u stanicama kvasca (slika 8.A).



Slika 8. Dizajn reporterskog sustava tau-NanoBiT *(A) Ilustracija testa NanoBiT za kvantifikaciju oligomerizacije proteina tau. Reporter je modificirana luciferaza (NanoLuc), koja*

uslijed interakcije dvaju molekula tau obilježenih s njezinim dijelovima – malom podjedinicom (SmBiT) i velikom podjedinicom (LgBiT) – formira funkcionalan enzim, što se može mjeriti enzimskom aktivnosti luciferaze putem očitavanja luminiscencije. (B) Dizajn konstrukata tau-NanoBit. Sheme prikazuju mape ekspresijskih kazeta vektora za ekspresiju u kvascu. Genski inserti su pod kontrolom umjerenog konstitutivnog promotora TDH3 (P_{TDH3}) i sadrže C-terminalne fuzije epitopskih oznaka HA i V5. Konstrukti su integrirani na jedan zajednički plazmidni vektor (pKZ8) u antiparalelnom smjeru.

NanoBiT reporter za detekciju interakcije proteina temelji se na luciferazi NanoLuc podijeljenoj na dvije podjedinice, malu podjedinicu veličine 1.3 kDa, (SmBiT) i veliku podjedinicu veličine 18 kDa (LgBiT). Mala i velika podjedinica imaju vrlo nizak afinitet međusobnog vezanja, stoga njihova interakcija, odnosno rekonstitucija enzima luciferaze, ovisi o mogućnosti interakcije proteina fuzioniranih s podjedinicama.

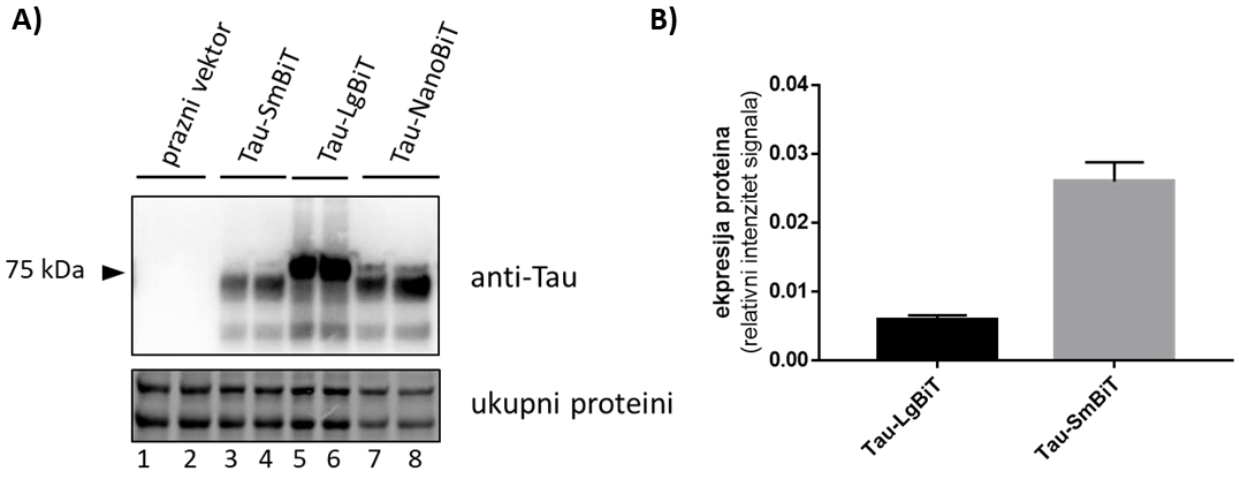
Reporterski sustav tau-NanoBiT za ispitivanje interakcija između dvaju molekula proteina tau dizajnirali smo tako da smo podjedinice luciferaze NanoLuc - SmBiT i LgBiT - spojili na C-terminalni kraj proteina tau, izoforme 2N4R. Shema konstrukata prikazana je na slici 5.8.B. Sekvence smo optimizirali za ekspresiju u *Saccharomyces cerevisiae* na način da smo kodone izvorne sekvence koji se najrjeđe koriste u kvascu zamijenili učestalijima. Kako bismo na Western blotu mogli razlikovati ekspresiju fuzijskih proteina tau-SmBiT i tau-LgBiT, svaki konstrukt smo genetski označili različitom oznakom epitopa (epitop HA u slučaju tau-SmBiT, odnosno epitop V5 u slučaju tau-LgBiT), a kako bismo smanjili vjerojatnost utjecaja fuzije na strukturu proteina, između epitopskih oznaka i C-terminalno spojenih podjedinica postavili smo fleksibilne poveznice aminokiselinskog slijeda Gly-Ser (tau-HA-Gly-Ser-SmBiT, odnosno tau-V5-Gly-Ser-LgBiT). Zbog jednostavnosti, u nastavku teksta, konstrukti se nazivaju tau-SmBiT i tau-LgBiT.

Oba konstrukta stavili smo pod kontrolu konstitutivno aktivnog promotora gena *TDH3*. Konstrukte P_{TDH3}-tau-LgBiT i P_{TDH3}-tau-SmBiT smo integrirali u jedan zajednički plazmidni vektor, ali u antiparalelnom smjeru, tj. u obrnutim orijentacijama, kako bi se izbjegao gubitak sekvenci zbog homologne rekombinacije između istih dijelova sekvenci za tau. Kako bismo osigurali umjerenu razinu ekspresije proteina tau te na taj način smanjili vjerojatnost nespecifične interakcije proteina uslijed prekomjerne ekspresije podjedinica, kao okosnicu plazmida odabrali smo vektorski plazmid s centromernom

(CEN) sekvencom koja omogućuje segregaciju plazmida s kromosomima kvasca tijekom stanične diobe te se u stanici kvasca nalazi u jednoj do dvije kopije.

5.3.1. Optimizacija ekspresije konstrukata tau-LgBiT i tau-SmBiT

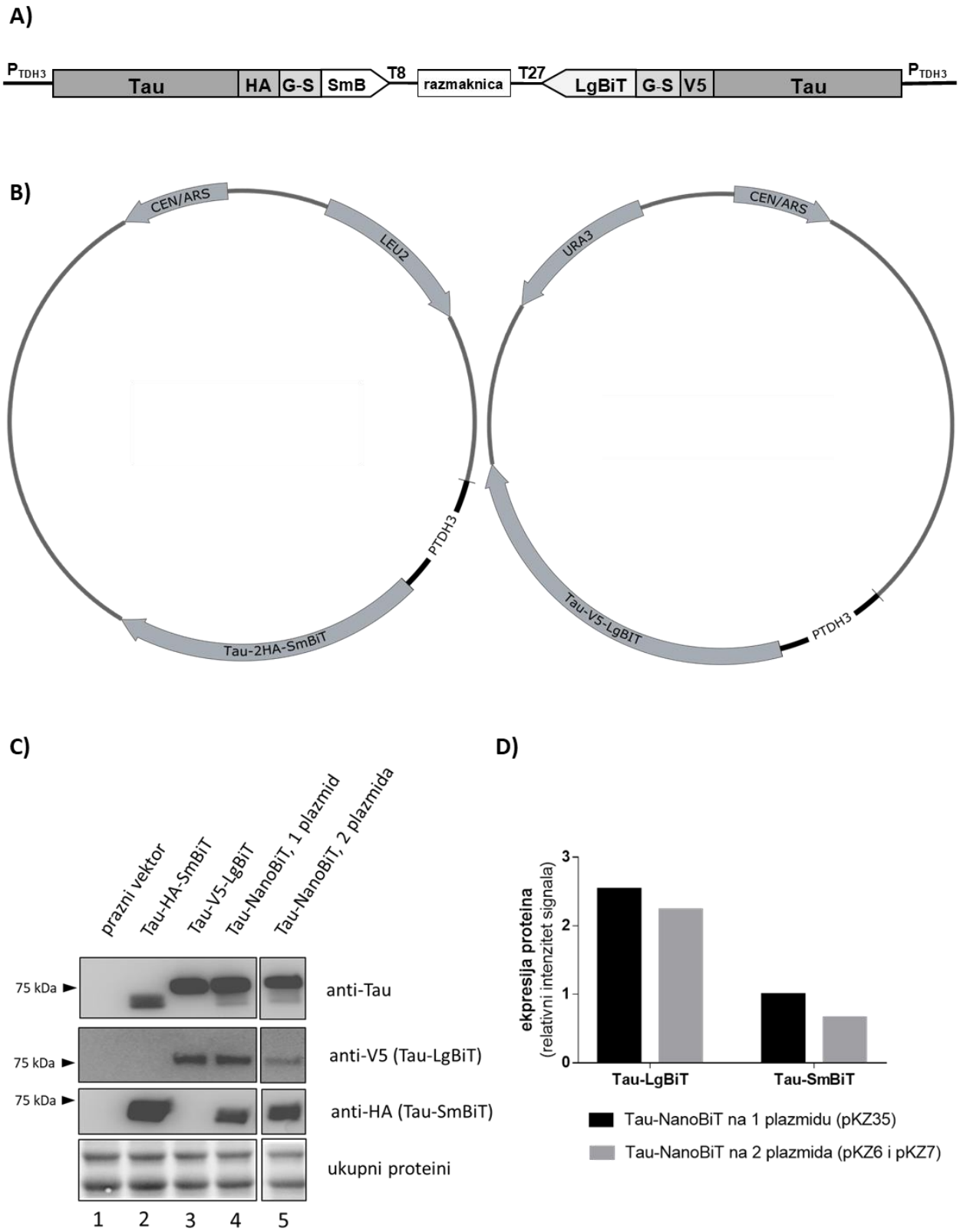
U početnom dizajnu reportera, oba konstrukta (tau-LgBiT i tau-SmBiT) su se nalazila na jednom zajedničkom plazmidu (pKZ08). Ekspresiju fuzijskih proteina u stanicama kvasca provjerili smo metodom Western blota koristeći protutijelo tau5 koje prepoznaje protein tau (slika 9.A). Stanice su bile transformirane s plazmidom koji nosi samo tau-SmBiT (slika 9.A – jažice 3 i 4), samo tau-LgBiT (slika 9.A – jažice 5 i 6), ili oba konstrukta (slika 9.A – jažice 7 i 8, pKZ08). Kada su oba konstrukta bila prisutna u istoj stanici (jažice 7 i 8 na slici 9.A), podjedinice tau-SmBiT i tau-LgBiT nisu bile eksprimirane do slične razine, već je razina proteina tau-SmBiT bila četiri puta viša (kvantifikacija prema ukupnom sadržaju proteina je prikazana na slici 9.B), moguće zbog utišavanja ekspresije na razini transkripcije gena (77).



Slika 9. Ekspresija reporterskog sustava tau-NanoBiT u stanicama kvasca *(A) Ispitivanje ekspresije konstrukata tau-NanoBiT u kvascu divljeg tipa soja BY4741. Stanice su uzgajane do logaritamske faze rasta te su ukupni proteini analizirani Western blotom. Razine ekspresije tau-NanoBiTa u staničnom lizatu detektirane su pomoću protutijela protiv tau (protutijelo tau5). Jažice 1-2 sadrže proteine dva neovisna uzorka stanica divljeg tipa transformiranih praznim vektorom, 3-4 stanice transformirane pKZ06 koji nosi konstrukt samo za tau-SmBiT, 5-6 stanice s pKZ07*

koji nosi konstrukt tau-LgBiT, 7-8 stanice s pKZ08 koji nosi oba konstrukta. Kontrola nanošenja uzoraka na gel su ukupni stanični proteini vizualizirani „stain free“ tehnologijom. (B) Kvantifikacija tau5 signala prema ukupnom sadržaju proteina u stanicama koje eksprimiraju oba konstrukta – tau-NanoBiT (jažice 7 i 8 na slici A).

Iako je u ranijim studijama oligomerizacije proteina uspješno korišten sustav podijeljene luciferaze u uvjetima neujednačene ekspresije dvaju podjedinica (78,79), kako bismo omogućili višu aktivaciju reportera tau-NanoBiT, u sljedećem koraku primijenili smo dva pristupa za smanjenje razlike u razini ekspresije konstrukata tau-SmBiT i tau-LgBiT. Prvo, budući da je moguće kako blizina konstrukata na plazmidu dovodi do interferencije u transkripciji, konstruirali smo vektor (pKZ35) s dodatnim DNA fragmentom od 84 parova baza (pb), tj. razmaknicom, između DNA regija koje kodiraju za tau-LgBiT i tau-SmBiT (slika 10.A). U drugom pristupu, konstrukti su klonirani na dva zasebna plazmida (pKZ06 i pKZ07) s različitim selekcijskim markerima (*URA3* i *LEU2*) u svrhu kotransformacije u istu stanicu (slika 10.B). Provjera ekspresije konstrukata Western blotom pokazala je manju neujednačenost ekspresije dvaju podjedinica s plazmida pKZ35 (Slika 10. B-D) u odnosu na početni plazmid bez razmaknice pKZ08 (Slika 10. A), iako je prisutnost gena za oba konstrukta u istoj stanici, bilo s jednog zajedničkog plazmida s razmaknicom (pKZ35) ili s dva zasebna plazmida (pKZ06/ pKZ07), još uvijek rezultirala smanjenjem razine ekspresije tau-SmBiT u odnosu na tau-LgBiT (slika 10.D).



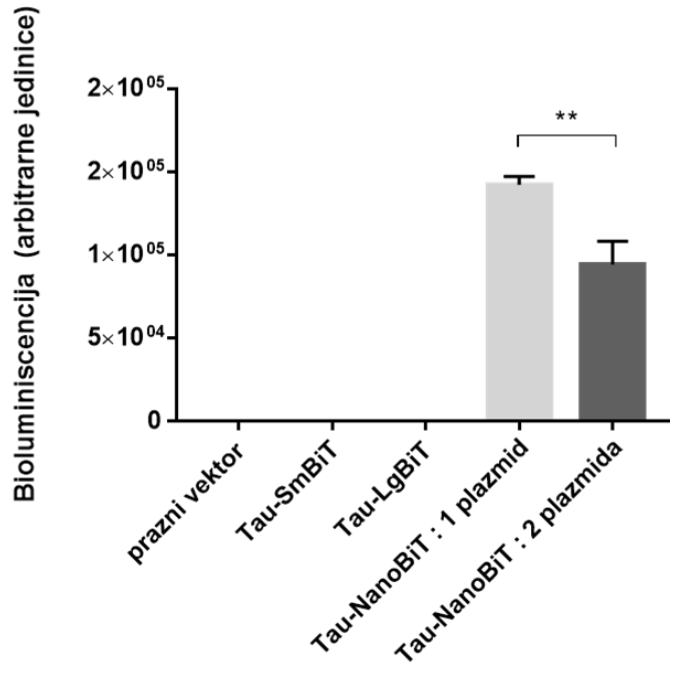
Slika 10. *Optimizacija konstrukata tau-NanoBiT u svrhu ujednačene ekspresije dvaju podjedinica luciferaze. (A) Mapa vektora pKZ35. Između DNA regija koje kodiraju za tau-LgBiT i tau-SmBiT*

umetnut je dodatni DNA fragment - razmaknica. (B) tau-LgBiT i tau-SmBiT klonirani su u dva zasebna vektora s različitim markerima selekcije (pKZ06 i pKZ07), tau-LgBiT je u vektor sa selekcijom za uracil, a tau-SmBiT u vektor sa selekcijom za leucin. (C) Stanice su uzgajane do logaritamske faze rasta te su ukupni proteini analizirani Western blotom. Razine ekspresije tau-NanoBiTa u staničnom lizatu detektirane su pomoću protutijela protiv tau (tau5) i oznake epitopa (HA i V5). U jažici 1 su uzorci stanica koje nose prazni plazmid, 2 stanice s pKZ06, 3 stanice s pKZ07, 4 stanice s pKZ35, 5 stanice s pKZ06 i pKZ07. (D) Kvantifikacija tau5 signala prema ukupnom sadržaju proteina u stanicama koje eksprimiraju oba konstrukta – tau-NanoBiT (jažice 4 i 5 na slici C).

Zaključno, promijenjenim dizajnom ekspresijskih plazmida smanjena je neujednačenost u razini ekspresije dvaju podjedinica te smo u sljedećem koraku ispitali rekonstituciju enzimatske aktivnosti reportera tau-NanoBiT.

5.3.2. Ispitivanje aktivacije tau-NanoBiT reportera

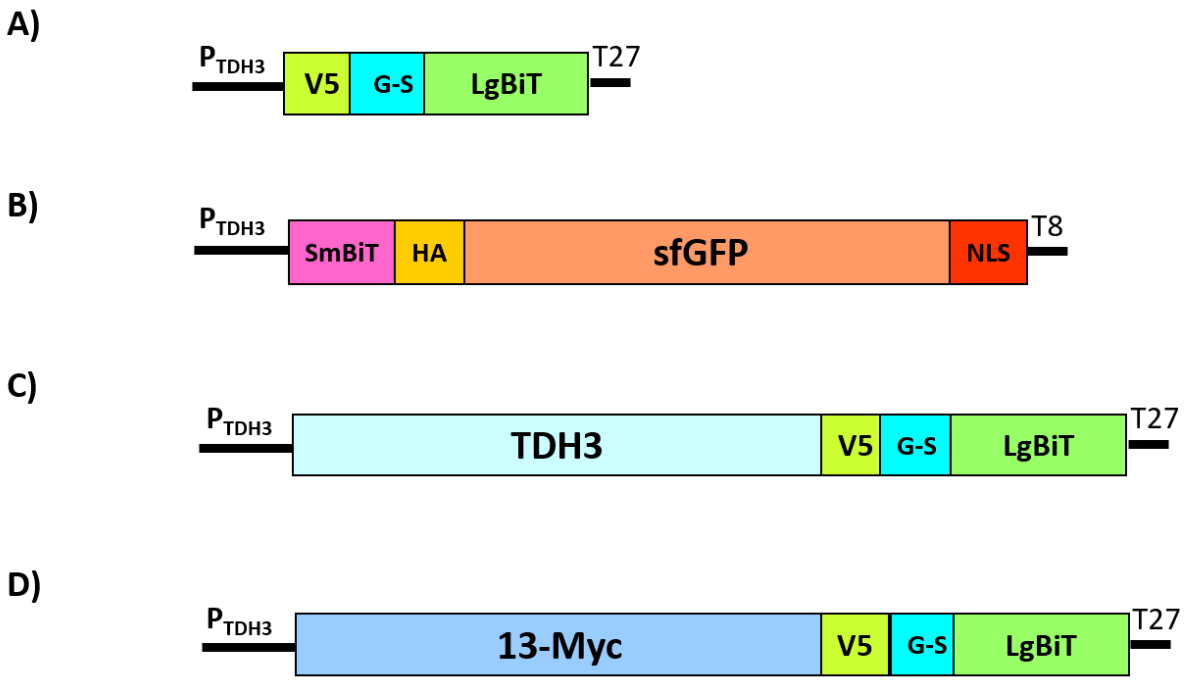
Reporter NanoBiT dizajniran je tako da dimerizacijom dvaju fuzijskih proteina dolazi do komplementacije enzima luciferaze i time rekonstitucije aktivnosti koja, nakon dodatka supstrata Nano-Glo® za luciferazu NanoLuc, rezultira luminisencijom (63). Mjerenje luminiscencije je pokazalo kako je razina luminiscencije stanica koje eksprimiraju pojedinačno samo tau-SmBiT ili samo tau-LgBiT zanemariva u odnosu na stanice koje eksprimiraju tau-NanoBiT, tj. oba konstrukta (slika 11.). U stanicama koje su izražavale oba konstrukta, tau-SmBiT i tau-LgBiT (tj.tau-NanoBiT), došlo je do povećanja bioluminiscencije 3000 puta u stanicama s plazmidom pKZ35, odnosno 2200 puta kad su konstrukti bili na zasebnim plazmidnim vektorima pKZ6 i pKZ7 (slika 11.). Zbog više razine aktivacije reportera tau-NanoBiT te radi jednostavnije provedbe eksperimenata, u daljnjim eksperimentima koji zahtijevaju ekspresiju tau-NanoBiT-a (tj. ekspresiju oba konstrukta, tau-LgBiT i tau-SmBiT, u istoj stanici) korišten je plazmid pKZ35 s razmaknicom od 84 pb između njihovih terminatora (slika 10.A).



Slika 5.11. Aktivacija reportera tau-NanoBiT u stanicama kvasca. *Aktivnost luciferaze u živim stanicama divljeg tipa kvasca soja BY4741. Svaka vrijednost predstavlja srednju vrijednost ± standardnu devijaciju srednje vrijednosti iz tri neovisne kulture. (**P<0.001)*

Kako bismo ispitali je li uočena aktivacija reportera tau-NanoBiT (slika 11.) rezultat prisutnosti tau-oligomera u stanicama, odnosno rezultat specifične interakcije proteina tau-tau, ili se radi o bazalnoj razini aktivacije reportera uslijed ko-ekspresije i ko-lokalizacije fuzijskih proteina, razinu luminiscencije u stanicama koje eksprimiraju fuzije tau s malom i velikom podjedinicom luciferaze usporedili smo s razinom luminiscencije stanica u kojima je podjedinica luciferaze SmBiT fuzionirana s tau (tau-SmBiT), a podjedinica LgBiT samo s epitopom V5 (V5-LgBiT, slika 12.A). No, budući da je provjerom ekspresije konstrukta V5-LgBiT Western blotom utvrđeno kako V5-LgBiT u stanicama nije eksprimiran, ili je njegova razina preniska za detekciju Western blotom (rezultati nisu prikazani), ovaj konstrukt nije bilo moguće koristiti kao kontrolu specifičnosti aktivacije reportera NanoBiT.

Stoga smo, u svrhu provjere specifičnosti aktivacije reportera tau-NanoBiT, u sljedećem koraku razinu luminiscencije stanica koje eksprimiraju tau-NanoBiT usporedili s razinom luminiscencije stanica u kojima je jedna podjedinica luciferaze fuzionirana s tau, a druga podjedinica je fuzionirana s proteinom za koji se prema literaturnim podacima i ne očekuje interakcija s tau proteinom. S tim ciljem, podjedinice luciferaze fuzionirali smo s proteinima: zeleni fluorescentni protein sa sekvencom za lokalizaciju proteina u jezgru (sfGFP-NLS, od engl. *nuclear localization signal*, NLS) (slika 12.B), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (Tdh3) (slika 12.C) i epitop 13 myc (slika 12.D). Za svaki konstrukt, provjerili smo ekspresiju i prikazali kvantifikaciju.

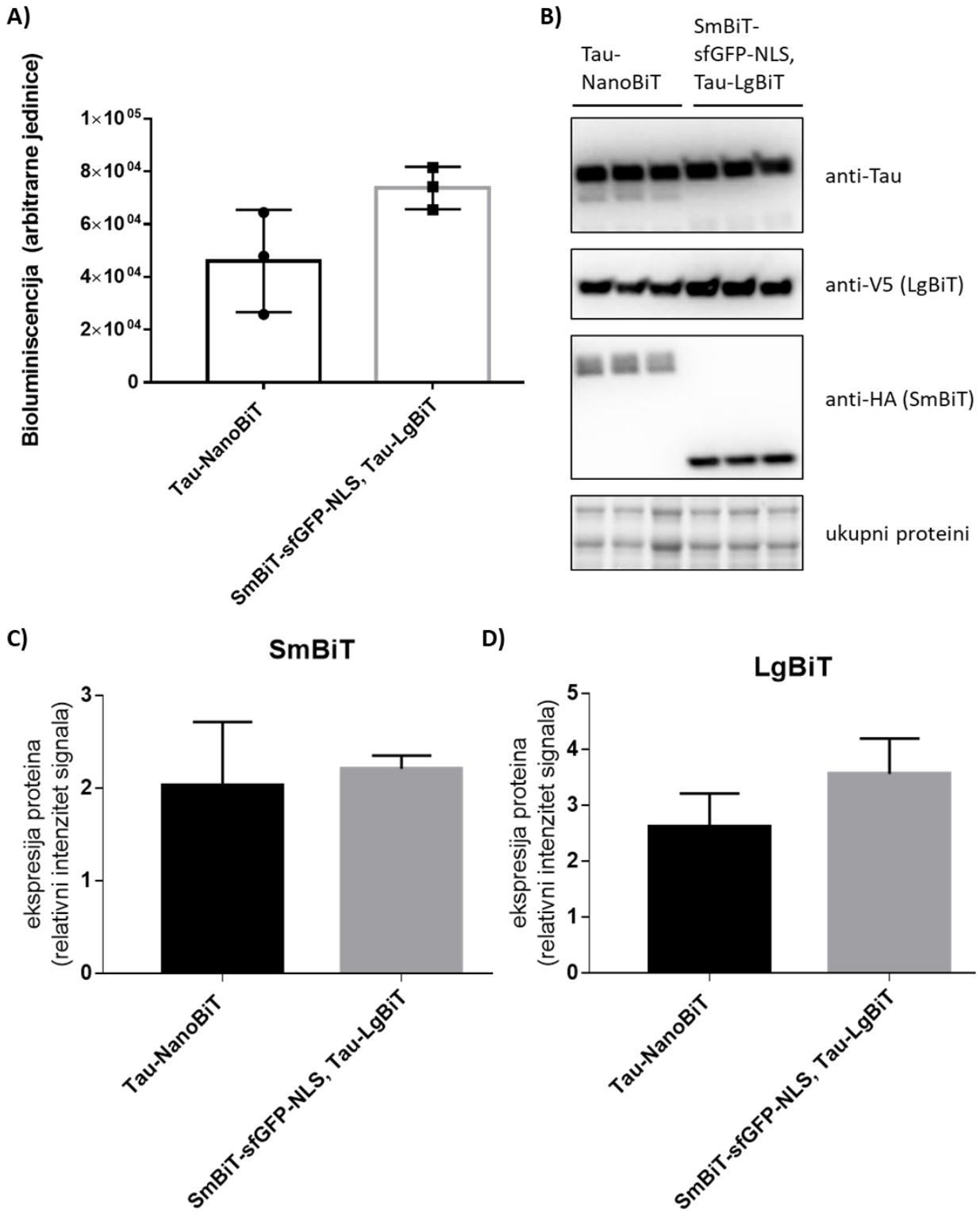


Slika 12. Sheme konstrukata fuzijskih proteina za ispitivanje specifičnosti reportera tau-NanoBiT *(A) Velika podjedinica NanoLuc (lgBiT) obilježena epitopom V5. (B) Mala podjedinica NanoLuc obilježena epitopom HA i sfGFP-NLS – plazmid dobiven ljubaznošću prof. Andréassona (C) Velika podjedinica fuzionirana na Tdh3 i obilježena epitopom V5. (D) 13 ponavljanja epitopa myc fuzionirani na veliku podjedinicu i obilježeni epitopom V5. Genski inserti su pod kontrolom umjerenog konstitutivnog promotora PTDH3.*

Kada su u istoj stanici eksprimirani tau-LgBiT i SmBiT-sfGFP-NLS, razina aktivacije luminiscentnog reportera slična je razini aktivacije u stanicama koje eksprimiraju oba konstrukta podjedinica fuzioniranih s tau proteinom, odnosno tau-NanoBiT (slika 13). Kad su u istoj stanici eksprimirani tau-SmBiT i Tdh3-LgBiT, razina aktivacije luminiscentnog reportera slična je razini aktivacije u stanicama koje eksprimiraju tau-NanoBiT (slika 14). Neočekivano, aktivacija luciferaznog reportera 18 puta je viša u stanicama koje eksprimiraju 13myc-LgBiT i tau-SmBiT u odnosu na stanice koje eksprimiraju tau-NanoBiT (slika 15.), moguće uslijed elektrostatskih interakcija između središnje regije tau s velikim brojem pozitivno nabijenih aminokiselinskih ostataka i negativnog nabijenog proteina 13myc (Slika 15.C).

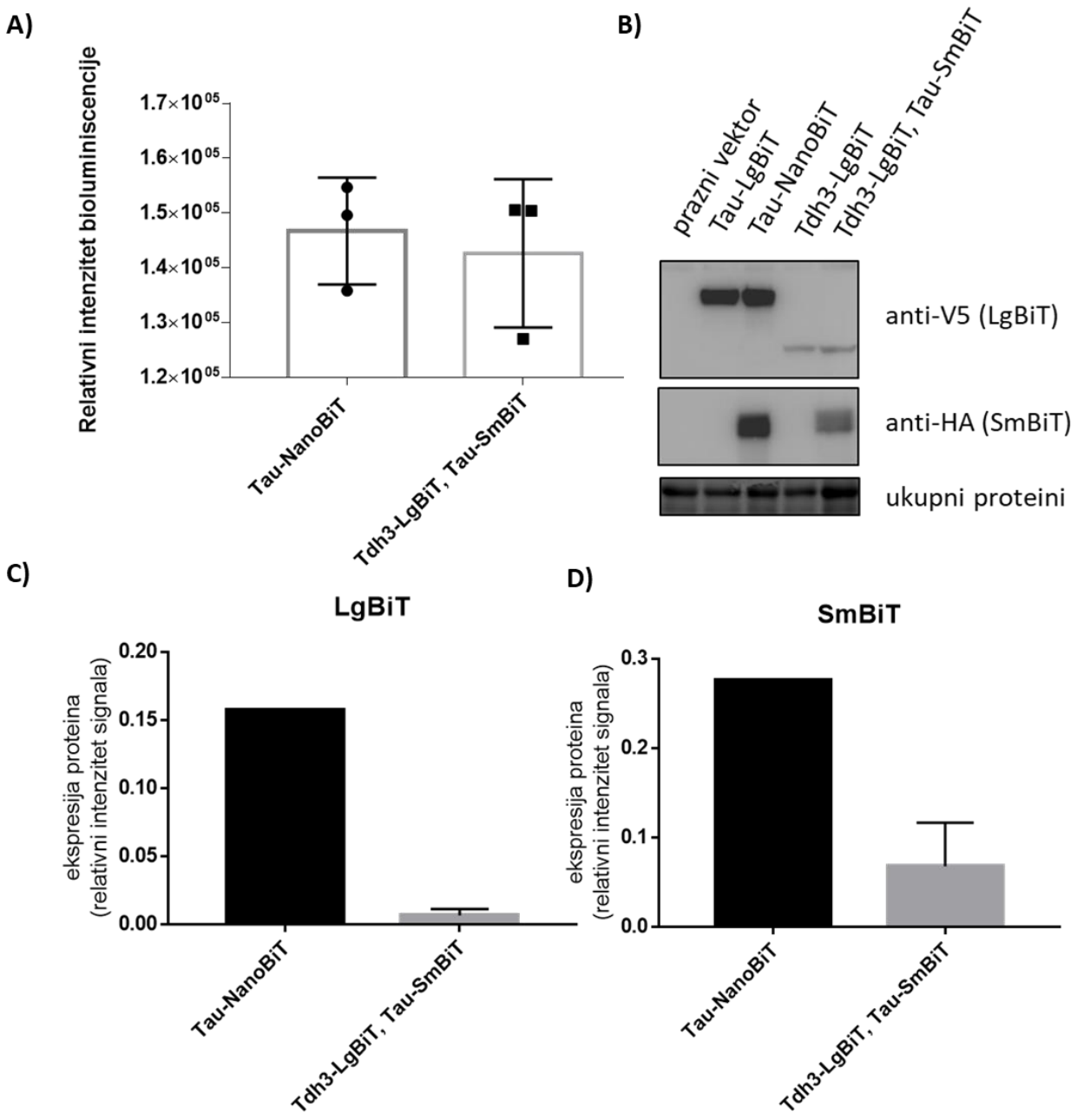
Zaključno, rezultati ukazuju na to da aktivacija reportera tau-NanoBiT u stanicama divljeg tipa kvasca predstavlja bazalnu razinu aktivacije reportera NanoBiT uslijed ko-

ekspresije i ko-lokalizacije fuzijskih proteina, tj. u stanicama divljeg tipa kvasca tau ne tvori oligomere ili je njihova razina vrlo niska. U sljedećim koracima ispitali smo aktivaciju reportera tau-NanoBiT u sojevima mutiranim za određene signalne puteve ili u stanicama izloženim proteotoksičnom stresu.



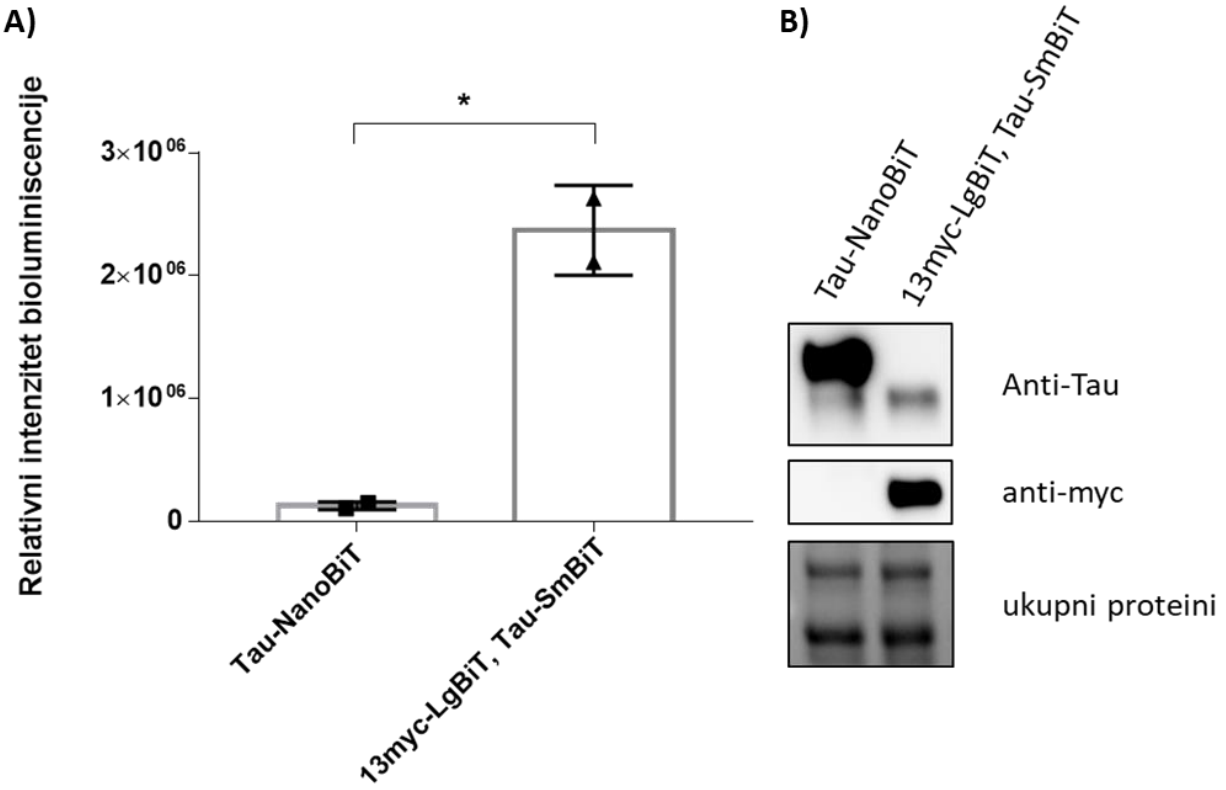
Slika 13. Ispitivanje aktivacije reportera NanoBiT s konstruktom SmBiT-sfGFP-NLS. *(A) Kvantifikacija bioluminiscencije u stanicama divljeg tipa BY4741 transformiranim plazmidima pKZ35 (tau-NanoBiT) i stanicama transformiranim plazmidima pKZ06 (tau-LgBIT) i pCA1016*

(SmBiT-SfGFP-NLS), uzgajanim do logaritamske faze rasta. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost ± SD relativnog intenziteta signala u 1 ml stanične suspenzije iz 3 neovisne kulture. Pojedinačne točke na stupcima predstavljaju vrijednost relativnog intenziteta signala pojedinog uzorka. Podaci su obrađeni dvostranim Mann-Whintey testom. P = 0.1 (B) Nakon transformacije divljeg tipa stanica s NanoBit-om označenim tau ili kontrolnim konstruktom SmBiT-sfGFP-NLS i tau-LgBiT, stanice su uzgajane do logaritamske faze rasta te su ukupni proteini analizirani Western blotom. Razine ekspresije tau-NanoBiTa u staničnom lizatu detektirane su pomoću protutijela protiv tau (tau5) i oznake epitopa (HA i V5). Prikazane su 3 neovisne replike za svaki uzorak. (C) Graf prikazuje ekspresiju fuzija V5-LgBiT u stanicam koje eksprimiraju tau-NanoBiT ili tau-LgBiT, SmBiT-sfGFP-NLS detektiranu pomoću anti-V5 protutijela. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost ± SD relativnog intenziteta signala na Western blotu normaliziranog prema ukupnom sadržaju proteina. Podaci su obrađeni dvostranim t testom. (D) Graf prikazuje ekspresiju fuzija HA-SmBiT u stanicam koje eksprimiraju tau-NanoBiT ili tau-LgBiT, SmBiT-sfGFP-NLS, detektiranu pomoću anti-HA protutijela. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost ± SD relativnog intenziteta signala na Western blotu normaliziranog prema ukupnom sadržaju proteina. Podaci su obrađeni dvostranim t testom.



Slika 14. Ispitivanje aktivacije reportera NanoBiT s konstruktom Tdh3-LgBiT. *(A) Kvantifikacija bioluminiscencije u stanicama divljeg tipa BY4741 transformiranim plazmidom pKZ35 (tau-NanoBiT) i plazmidima pKZ05 (tau-SmBiT) i pKZ15 (Tdh3-LgBiT). Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost ± SD relativnog intenziteta signala u 1 ml stanične suspenzije iz 3 neovisne kulture. Pojedinačne točke na stupcima predstavljaju vrijednost relativnog intenziteta signala pojedinog uzorka. Podaci su obrađeni Mann-Whitney testom. P >0,9999. (B) Nakon transformacije stanica s NanoBit-om označenim tau ili kontrolnog konstrukta TDH3-LgBiT, stanice su uzgajane do logaritamske faze rasta te su ukupni proteini analizirani Western blotom. Razine ekspresije tau-NanoBiTa u staničnom lizatu detektirane su pomoću protutijela protiv tau (tau5) i oznake epitopa (HA i V5). (C) Graf prikazuje ekspresiju fuzija V5-LgBiT u stanicam koje*

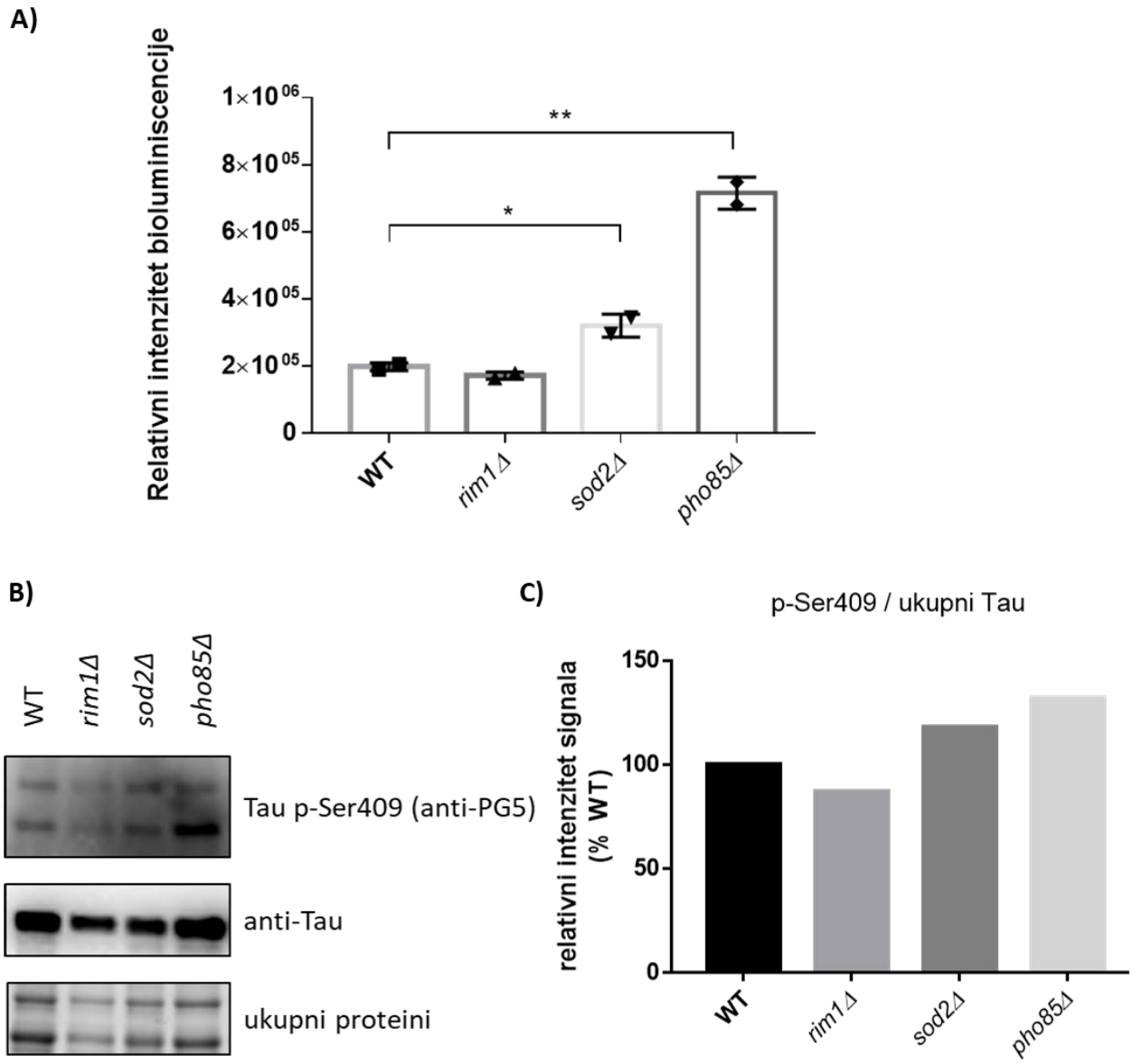
eksprimiraju tau-NanoBiT ili Tdh3-LgBiT i tau-SmBiT, detektiranu pomoću anti-V5 protutijela. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost ± SD relativnog intenziteta signala na Western blotu normaliziranog prema ukupnom sadržaju proteina. (D) Graf prikazuje ekspresiju fuzija HA-SmBiT u stanicam koje eksprimiraju tau-NanoBiT ili Tdh3-LgBiT i tau-SmBiT detektirane pomoću anti-HA protutijela. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost ± SD relativnog intenziteta signala na Western blotu normaliziranog prema ukupnom sadržaju proteina.



Slika 15. Ispitivanje aktivacije reportera NanoBiT s konstruktom 13myc-LgBiT. *(A) Kvantifikacija bioluminiscencije u stanicama divljeg tipa BY4741 transformiranim plazmidom pKZ35 (tau-NanoBiT) i plazmidima pKZ05 (tau-SmBiT) i pKZ20 (13myc-LgBiT). Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost ± SD relativnog intenziteta signala u 1 ml stanične suspenzije iz 2 neovisne kulture. Pojedinačne točke na stupcima predstavljaju vrijednost relativnog intenziteta signala pojedinog uzorka. Podaci su obrađeni dvostranim t testom. P= 0,0132, t=8,623, df=2. (B) Nakon transformacije stanica, stanice su uzgajane do logaritamske faze rasta te su ukupni proteini analizirani Western blotom. Razine ekspresije tau-NanoBiTa u staničnom lizatu detektirane su pomoću protutijela protiv tau (tau5) i protiv myc.*

5.3.4. Aktivacija reporterskog sustava tau-NanoBiT u mutantima s povišenom razinom agregata tau proteina netopljivih u sarkozilu

Ranija studija je pokazala da sojevi kvasca s delecijama gena *RIM1* i *SOD2,* u kojima dolazi do oksidacijskog stresa te s delecijom gena za kinazu Pho85, kod koje na indirektan način, dolazi do fosforilacije proteina tau (55), sadrže povišenu razinu agregata tau netopljivih u sarkozilu u odnosu na divlji tip stanica kvasca (56). U navedenoj studiji (56) razina sarkozil-netopljivog tau u odnosu na ukupni tau određena je semi-kvantitativnim Western blotom te je bila vrlo niska (0.02 % ukupnog proteina tau u stanicama divljeg tipa, 0.4 % u *pho85*Δ i *sod2*Δ mutantu te 0.2 % u *rim1*Δ mutantu (56). U ovom radu željeli smo ispitati može li se u navedenim mutantima detektirati povišena aktivacija reportera tau-NanoBiT u odnosu na divlji tip stanica. U tu svrhu, transformirali smo sojeve *pho85*Δ*, sod2*Δ i *rim1*Δ s plazmidima za tau-NanoBiT i izmjerili luminiscenciju. Western blotom s protutijelom koje specifično detektira tau fosforilian na serinu 409 provjerili smo fosforilaciju tau te, u skladu s ranije objavljenim nalazima (55), primijetili da je fosforilacija tau u stanicama mutanta *pho85*Δ povećana u odnosu na divlji tip stanica (slika 16.C). Nadalje, u navedenim stanicama ispitali smo aktivaciju reportera tau-NanoBiT-a te uočili kako je u mutantu *pho85*Δ luminiscencija bila oko četiri puta veća u odnosu na divlji tip stanica (WT) (slika 16.A). U mutantu *sod2*Δ povećanje luminiscencije u odnosu na stanice divljeg tipa bilo je nešto umjerenije (slika 16.A), dok u mutantu *rim1*Δ nije utvrđena statistički značajna razlika u aktivaciji tau-NanoBiTa u odnosu na divlji tip stanica (slika 16.A). Uočena aktivacija reportera tau-NanoBiT (slika 16.A) u korelaciji je s razinom sarkozil-netopljivog tau u mutantima *pho85*Δ*, sod2*Δ i *rim1*Δ (56) te ukazuje na to da aktivacija reportera tau-NanoBiT odražava prisutnost agregata proteina tau, ili tau oligomera kao ranih stadija u nastanku agregata.

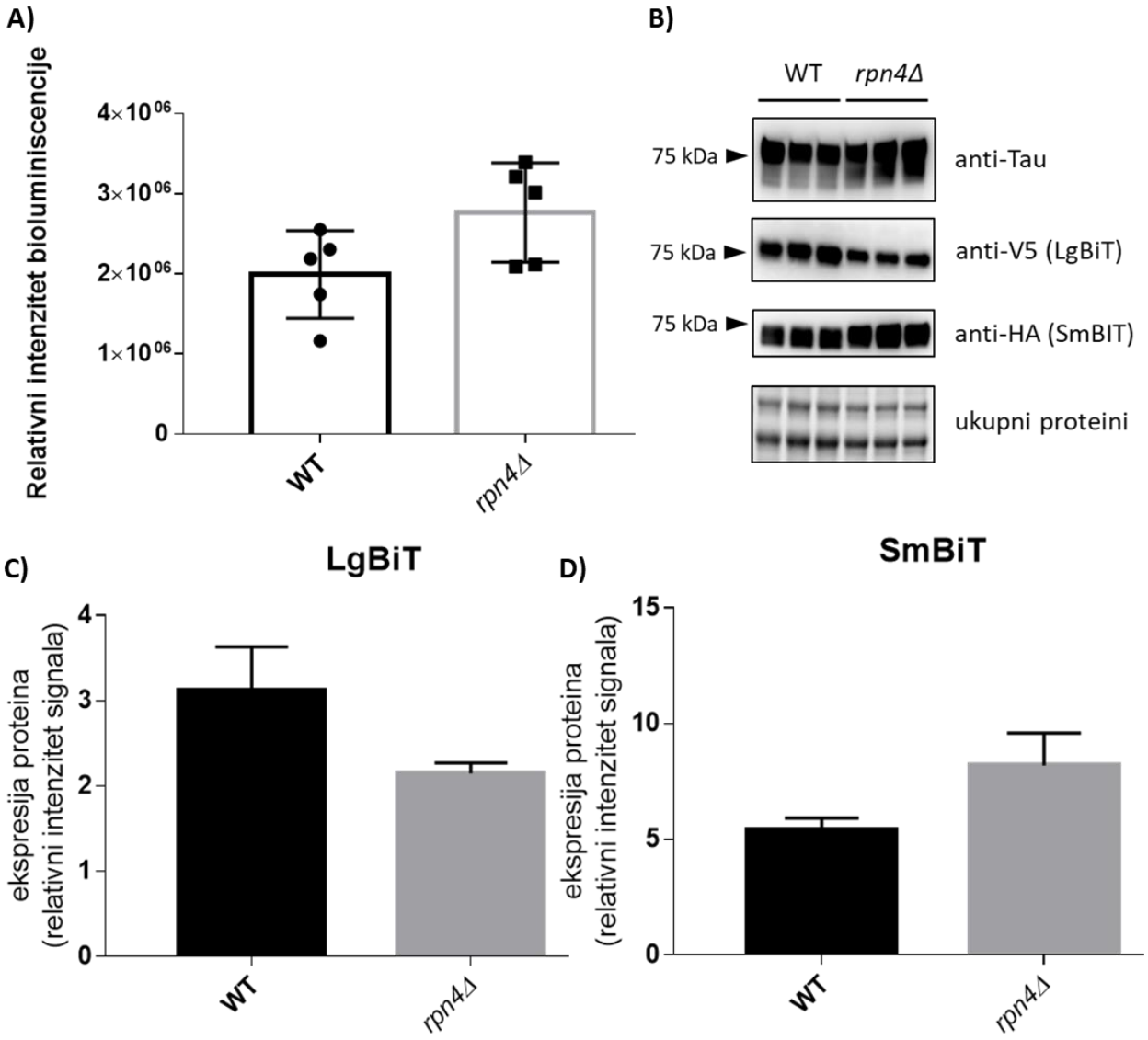


Slika 16. Ispitivanje aktivacije reportera tau-Nanobit u stanicama mutanata rim1∆, sod2∆ i pho85∆. *(A) Kvantifikacija bioluminiscencije u stanicama divljeg tipa BY4741 i mutanata rim1∆, pho85∆ sod2∆ transformiranima plazmidom pKZ35 (tau-NanoBiT). Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost ± SD relativnog intenziteta signala u 1 ml stanične suspenzije iz 2 neovisne kulture. Pojedinačne točke na stupcima predstavljaju vrijednost relativnog intenziteta signala pojedinog uzorka. Podaci su obrađeni dvostranim t testom *P=0,0414, t=4,759, ** P=0,0045, t=14,86 (B) Stanice su uzgajane do logaritamske faze rasta te su ukupni proteini analizirani Western blotom. Razine ekspresije tau-NanoBiTa u staničnom lizatu detektirane su pomoću protutijela protiv tau (protutijelo tau5) i protiv tau fosforiliranog na ser409 (PG5). (C) Graf prikazuje razinu fosforiliranog tau (PG5) normaliziranog prema sadržaju ukupnog tau u uzorcima u odnosu na WT.*

5.3.5. Aktivacija tau-NanoBiT reportera u uvjetima proteotoksičnoga stresa

S obzirom na to da se narušena homeostaza proteina i posljedični proteotoksični stres smatra mogućim uzrokom neurodegenerativnih bolesti (80), kako bismo ispitali utjecaj proteotoksičnog stresa na oligomerizaciju proteina tau, podvrgnuli smo stanice različitim uvjetima koji dovode do proteotoksičnog stresa te ispitali aktivaciju reportera tau-NanoBiT.

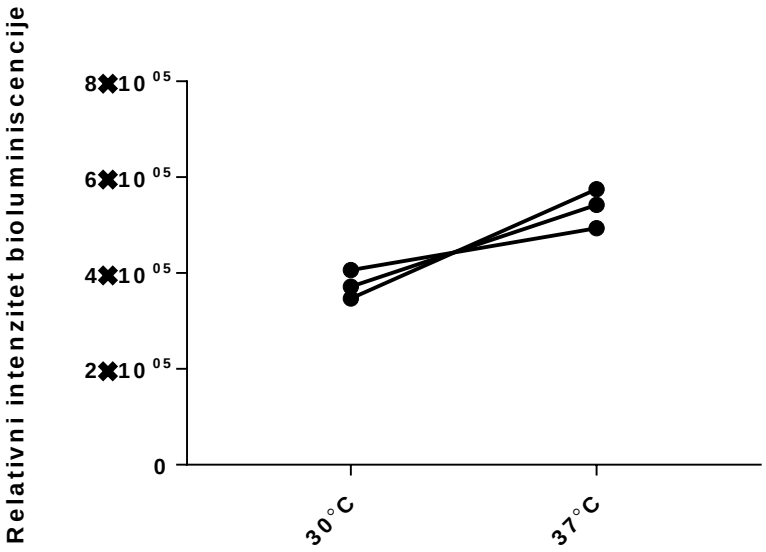
U svrhu narušavanja homeostaze proteina u stanici, reporter tau-NanoBiT eksprimiran je u stanicama s deletiranim genom *RPN4* (slika 17.) u kojemu zbog smanjene biogeneze proteasoma dolazi do proteotoksičnog stresa. U mutantima *rpn4*Δ nismo zabilježili statistički značajan porast bioluminiscencije u odnosu na divlji tip stanica (slika 17.A), što ukazuje na to da smanjeni kapacitet proteasoma u stanicama ne dovodi do agregacije proteina tau.



Slika 17. Ispitivanje aktivacije tau-Nanobit sustava u stanicama s nižom razinom proteasoma. *(A) Kvantifikacija bioluminiscencije u stanicama rpn4Δ u odnosu na WT. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost ± SD relativnog intenziteta signala u 1 ml stanične suspenzije iz 5 neovisnih kultura. Pojedinačne točke na stupcima predstavljaju vrijednost relativnog intenziteta signala pojedinog uzorka. Podaci su obrađeni dvostranim t testom. P =0,0696, t=2,094 (B) Ekspresije konstrukata u staničnom lizatu detektirane su pomoću antitijela protiv tau i epitopskih oznaka. Prikazane su 3 neovisne replike za svaki uzorak. (C) Graf prikazuje ekspresiju fuzija V5-LgBiT u stanicama koje eksprimiraju tau-NanoBiT, detektiranu pomoću anti-V5 protutijela. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost ± SD relativnog intenziteta signala na Western blotu normaliziranog prema ukupnom sadržaju proteina. Podaci su obrađeni dvostranim t testom. Ekspresija tau-LgBIT u prosjeku je 1,5 puta veća u divljem tipu nego u rpn4Δ mutantu (P= 0,0234, t=3,569). (D) Graf prikazuje ekspresiju fuzija HA-SmBiT u stanicama koje eksprimiraju tau-NanoBiT, detektiranu pomoću anti-HA protutijela. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost ± SD relativnog intenziteta signala na Western blotu normaliziranog prema*

ukupnom sadržaju proteina. Podaci su obrađeni dvostranim t testom. Ekspresija tau-SmBiT u prosjeku je 1,2 puta veća u rpn4∆ stanicama nego u divljem tipu (P=0.0325, t=3,214).

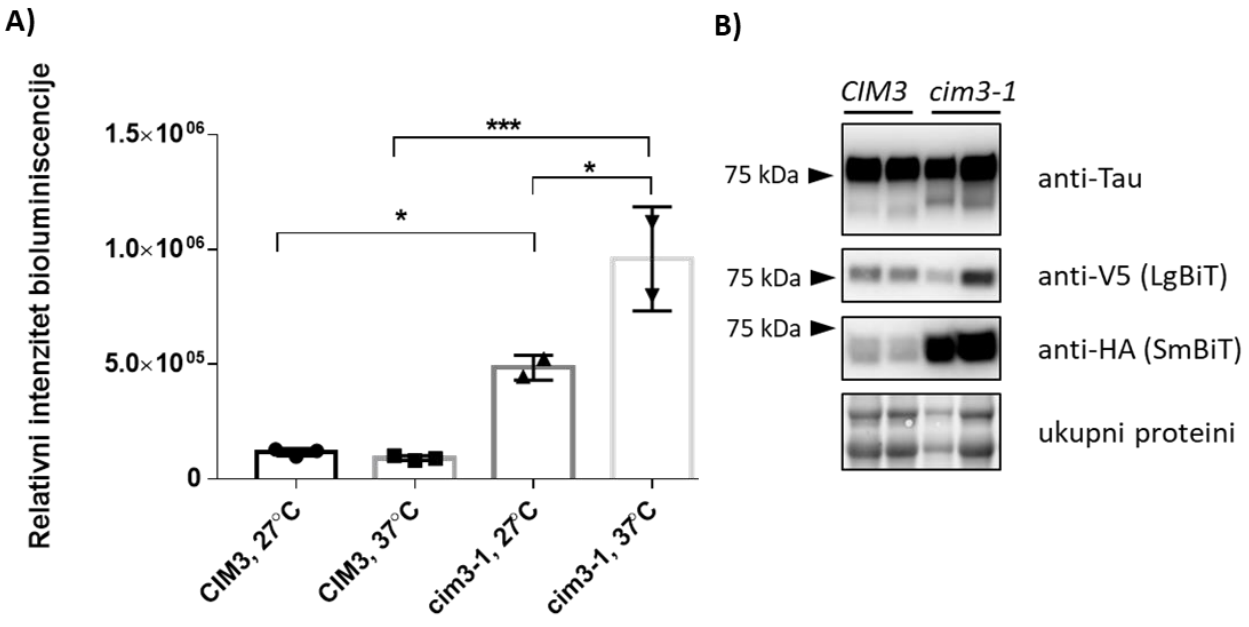
U sljedećem koraku, proteotoksični stres izazvali smo inkubacijom stanica divljeg tipa na povišenoj temperaturi od 37 ˚C. Nakon inkubacije stanica divljeg tipa koje eksprimiraju tau-NanoBiT na temperaturi od 37 ˚C u trajanju od 30 minuta, nije došlo do statistički značajnog povećanja aktivacije reportera tau-NanoBiT (slika 18).



Slika 18. Ispitivanje aktivacije tau-Nanobit sustava u stanicama divljeg tipa pri povišenoj temperaturi. *Inkubacijom stanica 30 min pri 37˚C razina aktivacije tau-NanoBiT reportera u prosjeku je povećana za 43%, na granici statističke značajnosti (P=0,0580). Točke predstavljaju vrijednost relativnog intenziteta signala pojedinog uzorka u 1 ml stanične suspenzije. Podaci su obrađeni dvostranim t testom za uparene uzorke (P=0,0580, t=3,971).*

Kako bismo na dodatni način inducirali proteotoksični stres, unijeli smo reporter tau-NanoBiT u stanice mutanta *cim3-1* s temperaturno osjetljivom mutacijom u genu *RPT6* (*CIM3*). Rpt6/ Cim3 je jedna od ATPaza regulatorne podjedinice proteasoma, nužna za razgradnju ubikvitiliranih proteina (79). U skladu s ranijim rezultatom (slika 18), razina bioluminiscencije nije se značajno promijenila uslijed povišenja temperature s 27 ˚C na 37 ˚C u odgovarajućem divljem soju *CIM3* (Slika 19.A). Za razliku od toga, u *cim3-1* mutantu inkubiranom na restriktivnoj temperaturi od 37 ˚C kod koje dolazi do značajnije aktivacije fenotipa mutanta *cim3-1* (79), razina bioluminiscencije je povećana dva puta u odnosu na stanice uzgojene pri permisivnoj temperaturi od 27 ˚C (Slika 19. A).

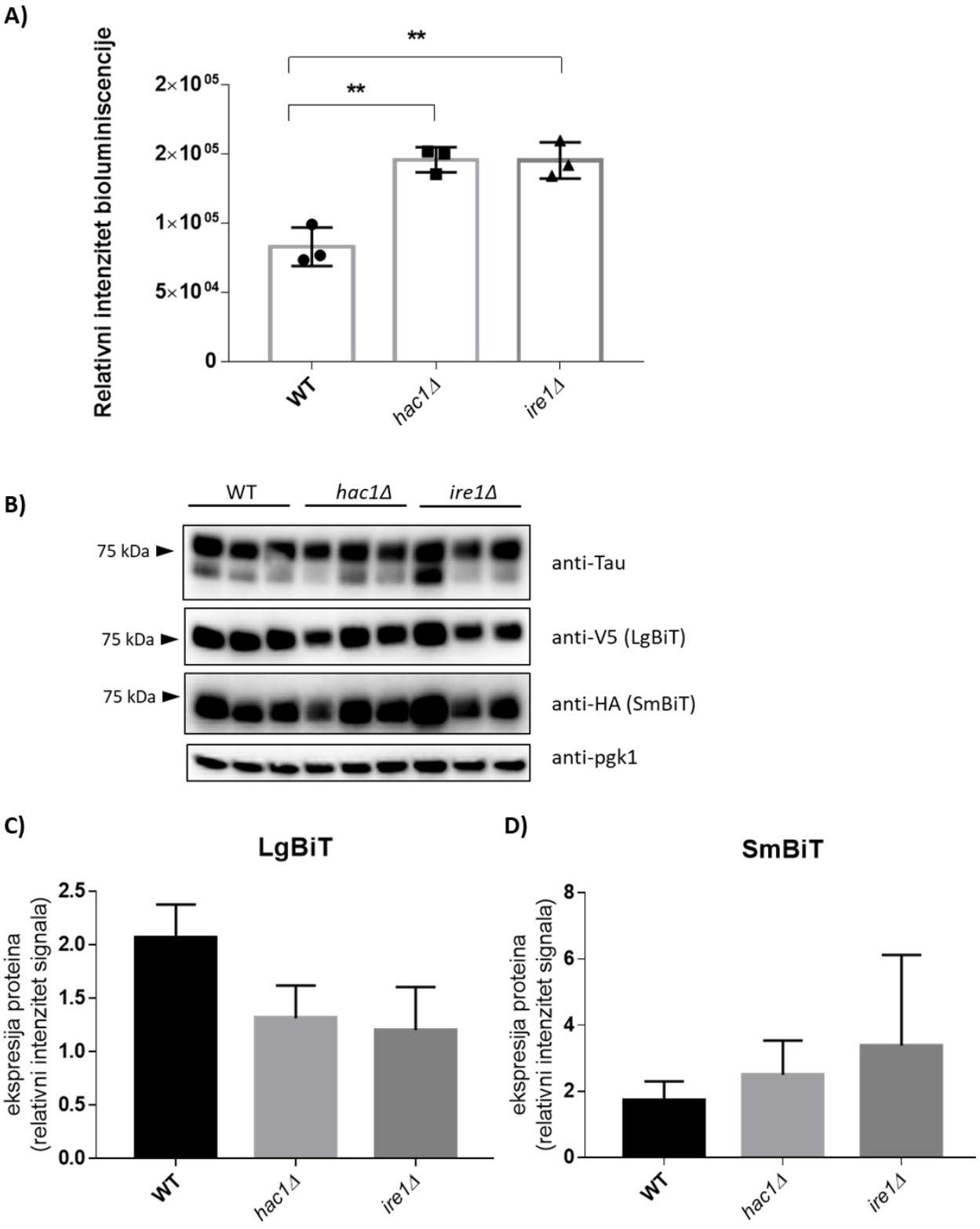
No, analizom ekspresije konstrukata (slika 19.B) utvrđeno je kako je već pri permisivnoj temperaturi za rast mutanta *cim3-1* (27 ˚C) ekspresija podjedinice tau-SmBiT u soju *cim3-1* gotovo šest puta veća nego u stanicama divljeg tipa (P= 0,0328). Ovaj nalaz ukazuje na to da je povišena razina aktivacije reportera tau-NanoBiT u mutantu *cim3-1* vjerojatno odraz povišene ekspresije podjedinica, a ne oligomerizacije proteina tau.



Slika 19. Ispitivanje aktivacije tau-Nanobit sustava u stanicama s narušenom funkcijom proteasoma. *(A) Kvantifikacija bioluminiscencije u stanicama cim3-1 uzgajanim pri restriktivnoj temperaturi (37˚C) u odnosu na stanice pri permisivnoj temperaturi (27 ˚C) (P= 0,0102). Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost ± SD relativnog intenziteta signala u 1 ml stanične suspenzije iz 3 (CIM3) ili 2 (cim3-1) neovisne kulture. Pojedinačne točke na stupcima*

*predstavljaju vrijednost relativnog intenziteta signala pojedinog uzorka. Podaci su obrađeni jednostrukim ANOVA testom s Tukeyjevim post-hoc testom višestruke usporedbe. (*P<0.05, ***P <0.001). (B) Ekspresije konstrukata u staničnom lizatu detektirane su pomoću antitijela protiv tau i epitopskih oznaka metodom Western blot.*

Kako bismo ispitali dolazi li do oligomerizacije proteina tau u uvjetima nefunkcionalnog odgovora stanice na pogrešno smotane proteine, reporter tau-NanoBiT smo eksprimirali u sojevima kvasca *ire1*∆ i *hac1*∆. Aktivacija tau-NanoBiT u stanicama sojeva *ire1*∆ (P=0.0018) i *hac1*∆ (P=0.0019) bila je u prosjeku veća 1,75 puta u odnosu na divlji tip (Slika 20. A), no budući da je povećanje luminiscencije pratio sličan trend povećanja ekspresije fuzijskog proteina tau-SmBiT u mutiranim sojevima (Slika 20. B, D), rezultat ukazuje na to da u uvjetima nefunkcionalnog odgovora stanice na pogrešno smotane proteine ne dolazi li do značajne oligomerizacije proteina tau.



Slika 5.20. Ispitivanje utjecaja ER stresa na aktivaciju NanoBiT reporterskog sustava *(A) Aktivnost luciferaze povećana je 1,75 puta u mutantnim sojevima ire1Δ (P=0.0018) i hac1Δ (P=0.0019) u odnosu na divlji tip. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost ± SD relativnog*

*intenziteta signala u 1 ml stanične suspenzije iz 3 neovisne kulture. Pojedinačne točke na stupcima predstavljaju vrijednost relativnog intenziteta signala pojedinog uzorka. Podaci su analizirani jednostrukim ANOVA testom s Tukeyjevim post-hoc testom višestruke usporedbe. **P<0,01. (B) Ekspresije konstrukata u staničnom lizatu detektirane su pomoću antitijela protiv tau i epitopskih oznaka. (C) Graf prikazuje ekspresiju fuzija V5-LgBiT u stanicama koje eksprimiraju tau-NanoBiT, detektiranu pomoću anti-V5 protutijela. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost ± SD relativnog intenziteta signala na Western blotu normaliziranog prema ukupnom sadržaju proteina proteina Pgk1. Podaci su obrađeni dvostranim ANOVA testom uz Tukey post-hoc test za međusobnu analizu sojeva. Nema statistički značajne razlike u ekspresiji između sojeva. (D) Graf prikazuje ekspresiju fuzija HA-SmBiT u stanicama koje eksprimiraju tau-NanoBiT, detektiranu pomoću anti-HA protutijela. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost ± SD relativnog intenziteta signala na Western blotu normaliziranog prema ukupnom sadržaju proteina proteina Pgk1. Podaci su obrađeni dvostranim ANOVA testom uz Tukey post-hoc test za međusobnu analizu sojeva. Nema statistički značajne razlike u ekspresiji između sojeva.*

Zaključno, rezultati mjerenja aktivacije reportera tau-NanoBiT u stanicama pod uvjetima proteotoksičnog stresa ukazuju na to da proteotoksični stres nije čimbenik oligomerizacije proteina tau u stanicama kvasca.

6. RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitali smo čimbenike koji dovode do agregacije i toksičnosti proteina tau, a kao stanični model za proučavanje agregacije i toksičnosti proteina tau odabran je jednostanični eukariotski organizam, kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. S obzirom na to da patologija proteina tau kod najčešćeg, sporadičnog (engl. *late onset*), oblika Alzheimerove bolesti nije povezana s mutacijama gena MAPT koje povećavaju sklonost agregiranju (13), istraživanje smo proveli na divljem tipu proteina tau. Nadalje, dok u nekim tauopatijama agregate tvore samo određene izoforme proteina tau, neurofibrilarni snopići u Alzheimerovoj bolesti sadrže sve izoforme (82), stoga smo za istraživanje odabrali najdužu izoformu 2N4R koja se najčešće koristi u staničnim kulturama (83,84).

6.1. Utjecaj ekspresije proteina tau na rast stanica kvasca

Koristeći prednosti kvasca kao organizma pogodnog za genetička istraživanja, ranije studije su ispitale utjecaj heterologne ekspresije proteina čovjeka povezanih s nastankom neurodegenerativnih bolesti (poput amiloida-β (58,85), α-sinukleina (86,87), huntigtina (88) i proteina c9orf72 (89,90)) na rast stanica kvasca te su identificirani čimbenici koji doprinose toksičnosti ovih proteina u stanicama kvasca. Za razliku od navedenih proteina, tau nije do sada bio ispitan sličnim pristupom te je prvi cilj ovog rada bio uspostaviti stanični model za ispitivanje utjecaja proteina tau na vijabilnost stanica kvasca. Razlozi toksičnosti tau proteina u neuronima mogu biti različiti - jedan je zbog narušavanja fiziološke funkcije proteina (engl. *loss-of-function*), a drugi zbog stjecanja toksične funkcije (engl. *toxic gain-of-function*). Budući da u kvascu ne postoji ortolog tau proteina te da tau protein čovjeka izražen u kvascu ne veže mikrotubule (73), kvasac je pogodan kao model za ispitivanje stjecanja toksične funkcije.

U našem istraživanju, toksičnost smo ispitali koristeći standardnu metodu testa rasta stanica, što je semikvantitativna metoda za ispitivanje reproduktivnog kapaciteta stanica kojom se posredno zaključuje o vijabilnosti stanica. Naime, stanice mogu biti

vijabilne, a ne dijeliti se, no ne i obrnuto (92). Ekspresija proteina tau nije utjecala na reproduktivni kapacitet stanica i možemo zaključiti da su stanice bile vijabilne, odnosno da tau nije doveo do toksičnosti. U suprotnom bi bili potrebni dodatni testovi (93).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da indukcija ekspresije tau ne dovodi do toksičnosti u stanicama divljeg tipa kvasca, što je u skladu s ranije objavljenim rezultatima s tau eksprimiranim s konstitutivno aktivnog promotora (73,91). U ranijim istraživanjima toksičnost proteina tau u stanicama kvasca pokazana je samo u dva slučaja. U prvom slučaju radi se o soju kvasca s mutacijom u *ESS1*, genu koji kodira za Ess1, peptidil-prolil cis-trans izomerazu koja je homologna enzimu Pin1 u stanicama sisavaca (74). U drugom slučaju, radi se o učinku sintetske letalnosti uslijed koekspresije α-sinukleina i proteina tau (91).

S obzirom na to da tau nije utjecao na vijabilnost stanica divljeg tipa kvasca, zanimalo nas je je li tau toksičan u kombinaciji s drugim čimbenicima, tj. dolazi li uslijed ekspresije tau u kombinaciji s dodatnim čimbenicima do tzv. sintetskog učinka na vijabilnost stanica. Budući da se narušena homeostaza proteina i posljedični proteotoksični stres smatra mogućim uzrokom neurodegenerativnih bolesti (80), ispitali smo može li proteotoksični stres, izazvan na različite načine (delecijom Rpn4, transkripcijskog čimbenika za gene 26S proteasoma, povišenom temperaturom koja dovodi do povećane količine pogrešno smotanih proteina, ili narušenim odgovorom stanice na pogrešno smotane proteine) dovesti do toksičnosti tau proteina u stanicama kvasca. Niti jedan od navedenih uvjeta proteotoksičnog stresa nije imao učinak na rast stanica koje eksprimiraju tau, moguće zbog toga što tau ne predstavlja opterećenje za sustav za kontrolu kvalitete proteina, odnosno da ga stanica ne prepoznaje kao aberantan protein. Također je moguće da nije došlo do sintetskog učinka proteotoksičnog stresa i ekspresije proteina tau zbog toga što ispitani uvjeti za stanicu predstavljaju umjeren stres, stoga stanica uspješno kompenzira stres ili zaobilazi narušene puteve alternativnim mehanizmima. U tom slučaju, toksičan fenotip uslijed ekspresije proteina tau bi se mogao očitovati u dvostrukim mutantima za navedene signalizacijske puteve, kao i u uvjetima ekstremnijeg temperaturnog šoka, što je u skladu s mnogobrojnošću promjena koje se događaju u stanici i povezane su s patologijom tau proteina (97). Zaključno, ekspresija

tau u stanicama kvasca ne dovodi do toksičnosti u ispitanim uvjetima proteotoksičnog stresa. Daljnja istraživanja će pokazati dovodi li značajniji proteotoksični stres do toksičnosti proteina tau u stanicama kvasca.

6.2. Ispitivanje agregata tau proteina u stanicama kvasca

U zdravim neuronima tau veže mikrotubule i pretežito je lokaliziran u aksonima (98), dok se u neuronima u mozgu oboljelih od Alzheimerove bolesti nalazi u somi i dendritima neurona gdje formira neurofibrilarne snopiće. tau je protein pretežno hidrofilnog aminokiselinskog sastava, sadrži repetitivne regije i visoko je intrinzično neuređene strukture te se ne sklapa u stabilnu strukturu već fluktuira između različitih konformacija dok nije vezan uz interakcijskog partnera (99). Inače, takvi proteini skloni su separaciji faza tekućina-tekućina u otopini, odnosno stvaranju substaničnih odjeljaka neomeđenih membranom od citoplazme ili nukleoplazme, ali s većom koncentracijom proteina i drugih biomolekula u odnosu na okolnu citoplazmu (100). Ranije je pokazano da tau *in vitro* podliježe separaciji faza u tekućini te tvori tekuće kondenzate (engl. *liquid droplets*) (101-104). Ti kondenzati podložni su "sazrijevanju", odnosno konformacija tau proteina u kondenzatima mijenja se s vremenom prema stanju koje nalikuje agregatima s β-pločama, a oni dalje mogu djelovati kao klice i pokrenuti intracelularnu agregaciju tau (103).

U skladu s ranije objavljenim nalazima u stanicama kvasca (74), kao i u stanicama sisavaca (105), naši rezultati pokazali su difuznu lokalizaciju tau-sfGFP u citoplazmi stanica logaritamski rastuće kulture divljeg tipa kvasca (slika 4.), što pokazuje da tau u stanicama kvasca ne tvori vidljive agregate. Tijekom kronološkog starenja stanice prolaze kroz stanične i metaboličke promjene te kako bi sačuvale homeostazu proteina, sekvestriraju brojne proteine u stanične odjeljke (106). Agregacija proteina ovisna o dobi evolucijski je očuvan fenomen koji je povezan s mnogim neurodegenerativnim bolestima (107,108). Stoga, kako bismo ispitali utjecaj staničnog starenja na agregaciju proteina tau, fluorescentno obilježeni tau eksprimirali smo u dva modela staničnog starenja kvasca, replikativno i kronološko starenje. Replikativno starenje označava broj dioba

stanica majki prije nego što se prestanu dijeliti, dok kronološko starenje označava vremenski raspon nakon ulaska stanice u mirovanje u kojem stanica zadržava reproduktivni kapacitet, odnosno sposobnost ponovne diobe. Kronološko starenje kao proces u stanicama koje se ne dijele u pojedinim apsektima predstavlja bolji model za proučavanje postmitotičkih stanica kao što su neuroni (60). S druge strane, uzimajući u obzir aktivan metabolizam stanica koje se dijele u odnosu na smanjeni metabolizam stanica u mirovanju, replikativno starenje također predstavlja dobar model pojedinih procesa u starenju neurona. Kultura stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ulazi u stacionarnu fazu drugog dana uzgoja na sintetskom mediju (109). U našim eksperimentima, lokalizacija proteina tau ispitana je trećeg dana kulture stanica, tj. u ranoj fazi kronološkog starenja kvasca. U stanicama koje su eksprimirale fuziju tau-sfGFP, oko 10 % stanica trećeg dana kulture imalo je inkluzije, za razliku od stanica iz tri dana stare kulture stanica koje su eksprimirale fuzije tau s NeonGreen fluorescentnim proteinom, koje nisu pokazivale inkluzije. Navedeni rezultat ukazuje na to da su agregati fuzijskog proteina tau-sfGFP koji su bili primijećeni u 10 % kronološki starih stanica vjerojatno posljedica agregacije proteina sfGFP, a ne agregacije proteina tau uslijed starvacije za glukozu ili kronološkog starenja. Zaključno, tijekom početnih faza kronološkog starenja ne dolazi do stvaranja vidljivih agregata proteina tau.

6.3. Uspostava luminiscentnog reportera tau-NanoBiT

U drugom dijelu istraživanja cilj je bio uspostaviti reporter za oligomerizaciju proteina tau temeljen na luciferazi. Reporterom NanoBiT se u živim stanicama, na jednostavan način i bez biokemijskih analiza staničnih lizata može detektirati interakcija proteina. Reporter za oligomerizaciju tau proteina u živim stanicama temelji se na testu NanoBiT (63) te je dizajniran tako da otkrije interakciju dviju molekula proteina tau primjenom komplementacije fragmenata luciferaze NanoLuc, koju je moguće mjeriti u živim stanicama. Budući da je u ranije objavljenoj studiji na HEK-293 stanicama C-terminalno *Gaussia* luciferazom označeni tau pokazao oligomerizaciju (64), reporterski sustav tau-NanoBiT dizajnirali smo koristeći C-terminalne fuzije podjedinica NanoBiT-a s

proteinom tau (tau-SmBiT i tau-LgBiT) (slika 8.B). Studija Wegman i sur. (64) je pokazala da je tau formirao bazalnu razinu oligomera uslijed ekspresije u HEK-293 stanicama te da je dodatak poznatih katalizatora agregacije tau stanicama doveo do nešto brže oligomerizacije.

Kad smo u stanicama kvasca eksprimirali obje fuzije, ekspresija na razini proteina tau-LgBiT i tau-SmBiT je bila neujednačena (slika 9), no neujednačenost u ekspresiji dvaju heterolognih proteina nije specifičan fenomen samo za tau-NanoBiT. Primjerice, ranije je zabilježeno da ko-ekspresija tau s drugim proteinima u stanicama kvasca dovodi do niže ekspresije tau (91). Nadalje, Oh-hashi i suradnici (78) zabilježili su nejednaku razinu ekspresije konstrukata pri korištenju NanoBiTa u proučavanju homodimerizacije proteina Sod1 u neuronima, unatoč korištenju istih promotora u fuzijama Sod1-LgBIT i Sod1-SmBiT. Neujednačenost u ekspresiji dvaju heterolognih proteina je čest problem pri korištenju reporterskih proteina ne samo sustava temeljenih na luciferazi nego i kod fluorescentnih reportera (110). Na temelju navedenih informacija i ranijih publikacija, u našim eksperimentima smo nakon početne optimizacije reportera nastavili koristiti plazmid s povećanim razmakom DNA slijeda između podjedinica, koji je pokazao veću razinu aktivacije luciferaze, iako je ekspresija tau-LgBiT i tau-SmBiT na razini proteina ostala neujednačena (slika 10.D).

Rezultati ispitivanja aktivacije tau-NanoBiT reporterskog sustava pokazali su da kada su u stanici eksprimirane obje fuzije podjedinica s tau, dolazi do aktivnosti luciferaze, odnosno do uspješne rekonstitucije enzima. Uzimajući u obzir da intenzitet luminiscentnog signala ovisi o količini rekonstituiranog enzima luciferaze te da u prisutnosti obje podjedinice u stanici dolazi do bazalne razine aktivacije reportera, prilikom interpretacije rezultata u obzir treba uzeti razinu ekspresije fuzijskih proteina u uzorcima koji se međusobno uspoređuju. Nadalje, budući da aktivnost luciferaze može biti produkt nespecifičnih interakcija samih podjedinica luciferaze, konstruirali smo kontrolni plazmid s konstruktom V5-LgBiT, no njegova ekspresija nije detektirana Western blotu metodom, najvjerojatnije zbog nestabilnosti proteina. Zato su konstruirane fuzije podjedinica luciferaze s proteinima različitih substaničnih lokalizacija, za koje se ne predviđa interakcija s tau proteinom. Tdh3 je protein uključen u procese glikolize i glukoneogeneze (111), ali i u nekoliko procesa u staničnoj jezgri uključujući apoptozu

(112,113) te je homolog ljudskom proteinu GAPDH. Kombinacije SmBiT-sfGFP-NLS, tau-LgBiT (slika 13), odnosno Tdh3-LgBiT, tau-SmBiT (slika 14.) pokazale sličnu aktivnost luciferaze u usporedbi s tau-NanoBiT. Slična razina luminiscencije tau-NanoBiTa i tau-SmBiT/Tdh3-LgBIT, unatoč različitoj razini ekspresije konstrukata, mogla bi biti posljedica dostupnosti supstrata. Naime, ranije je pokazano da se razina luminiscencije progresivno smanjuje što je veća razina enzima u uzorku zbog potrošnje supstrata (114).

Aktivacija reportera prilikom ekspresije podjedinica Tdh3-SmBiT i tau-LgBiT, odnosno SmBiT-sfGFP-NLS i tau-LgBiT u istoj stanici mogući je rezultat nespecifičnih interakcija zbog blizine ovih proteina prilikom translacije na ribosomu (115). Naime, na uzorcima ljudskog tkiva pokazano je da tau ulazi u interakcije s ribosomima, a u uzorcima tkiva mozga s Alzheimerovom bolešću tau pokazuje još snažnije veze s ribosomima i ribosom-vezujućim proteinima (116). Zajedno opisani rezultati ukazuju na to da zamijećena razina aktivacije reportera tau-NanoBiT u stanicama divljeg tipa kvasca predstavlja bazalnu razinu aktivacije reportera do koje dolazi u prisutnosti obje podjedinice luciferaze.

Aktivacija luciferaze bila je značajno povećana u stanicama koje eksprimiraju konstrukte 13-myc-LgBiT i tau-SmBiT (slika 15), što bi mogao biti rezultat specifičnih interakcija između tau i myc. Naime, epitopska oznaka myc izvedena je iz ljudskog c-myc onkogena i odgovara aminokiselinskim ostacima 410 - 419 njegova C-terminalnog dijela. Ranije je pokazano kako inhibicijom proteina c-myc dolazi do povećanja vijabilnosti kulture neurona mišjeg hipokampusa s pojačanom ekspresijom patološkog oblika proteina tau (108). Nadalje, povećana aktivacija reportera prilikom ekspresije 13-myc-LgBiT i tau-SmBiT u istoj stanici može se objasniti i interakcijama između tau i myc koji su rezultat različitih naboja proteina, naime, protein tau visoko je pozitivno nabijen, dok myc sadrži regiju bogatu asparginskom kiselinom koja je aminokiselina negativnog naboja (117).

Kako bismo ispitali aktivaciju reportera u uvjetima povišene razine agregata tau proteina netopljivih u deterdžentu sarkozilu, koristili smo sojeve s deletiranim genima za fosfokinazu Pho85, superoksid dismutazu Sod2 i deletiranim mitohondrijskim genom *RIM1*, u kojima je ranije pokazana povišena razina proteina tau netopljivog u detergentu sarkozilu (55,56). Sarkozil-netopljiva frakcija tau predstavlja agregate proteina tau te je

prisutna u mozgu pacijenata s Alzheimerovom bolesti (118). Pho85 je kvaščeva ciklin-ovisna kinaza, koja je ortolog kinaze čovjeka Cdk5 koja fosforilira tau u neuronima. No, Pho85 u kvascu ima neizravnu regulaciju fosforilacije tau te mutanti kojima nedostaje gen za ovu kinazu pokazuju više razine fosforilacije tau proteina na serinima 409 (55), što potvrđuju i rezultati našeg istraživanja. Fosforilacija je jedna od brojnih postranslacijskih modifikacija proteina tau, a fosforilirano može biti 85 aminokiselinskih ostataka. Ove modifikacije negativno utječu na sposobnost vezanja mikrotubula, a posebice fosforilacije određenih aminokiselinskih ostataka, koje su nađene u mozgu oboljelih od Alzheimerove bolesti, među kojima je i serin na poziciji 409 (3). Sod2 homolog je ljudskog proteina SOD2 i katalizira redoks reakcije u mitohondrijima te je jedan od ključnih antioksidacijskih enzima (119). Istraživanje na *knock-out* miševima za *Sod2* pokazalo je tau hiperfosforiliran u uvjetima oksidacijskog stresa zbog nedostatka SOD2 (120). Rim1 je protein koji veže jednolančanu DNA, važan u održavanju stabilnosti genoma i biogenezi mitohondrija (121). Iako je oksidacijski stres jedno od ranih obilježja Alzheimerove bolesti (122), još uvijek nije sasvim jasna veza patolologije tau proteina i oksidacijskog stresa, odnosno što je uzrok, a što posljedica (122,123). Rezultati nisu pokazali povezanost agregacije tau i oksidacijskog stresa uzrokovanog nedostatkom proteina Rim1, no nedavna analiza proteoma neurofibrilarnih snopića te interaktoma forforiliranog tau s proteinima prisutnim u snopićima iz tkiva pacijenata sa sporadičnom Alzheimerovom bolešću, detektirala je ljudski ortolog kvaščevog proteina Rim1 - SSBP1, kao jedan od proteina čija interakcija s fosforiliranim tau dosad nije bila poznata (124).

Blago povišena aktivacija reportera tau-NanoBiT u mutantima *pho85*Δ i *sod2*Δ izmjerena u našim eksperimentima ukazuje na blago povišenu razinu tau-oligomera, što je u korelaciji s ranije pokazanom povišenom razinom sarkozil-netopljivih agregata tau u ovim sojevima. Moguće je da je povišenje luminiscentnog signala u mutantima u odnosu na divlji tip stanica malo zbog visoke bazalne razine aktivacije reportera. Nadalje, i u prethodnim studijama (55,56) pokazano je da je frakcija tau netopljivog u sarkozilu iznimno malena u odnosu na ukupni sadržaj proteina tau (0,02% za divlji tip i 0,4% u *pho85*Δ, 0,3-0,4% u *sod2*Δ i 0,2% u *rim1*Δ), što bi bilo u skladu s malom razlikom u povećanju razine aktivacije tau-NanoBiT-a.

S obzirom na povezanost agregacije tau i starenja bilo bi zanimljivo ispitati dolazi li do aktivacije reportera tau-NanoBiT prilikom kronološkog i replikativnog staničnog starenja. No, u našim eksperimentima tau-NanoBiT nije bio eksprimiran u stanicama stacionarne kulture kvasca, stoga nije bilo moguće ispitati aktivaciju reportera u kronološki starim stanicama. U svrhu ekspresije proteina tau u kronološki starim stanicama, u budućim istraživanjima konstrukte tau-NanoBiT stavit ćemo pod kontrolu promotora gena *PIR3* koji je aktivan u starim stanicama (neobjavljeni podaci grupe prof. Igora Stuparevića i naši neobjavljeni podaci). Također bi bilo zanimljivo ispitati dolazi li u replikativno starim stanicama do povećane aktivacije reportera te će se navedeno ispitati u budućim istraživanjima koristeći protokol obogaćivanja kulture replikativno starim stanicama majkama.

6.4. Utjecaj proteotoksičnog stresa na agregaciju proteina tau u stanicama kvasca

U ovom radu istražili smo dovodi li proteotoksični stres do oligomerizacije i agregacije proteina tau. Naime, narušena homeostaza proteina smatra se jednim od mogućih uzroka nastanka neurodegenerativnih bolesti koje karakteriziraju proteinski agregati (107).

6.4.1. Povezanost agregacije proteina tau s narušenom funkcijom proteasoma.

Budući da nakupljanje pogrešno smotanih proteina za stanicu predstavlja proteotoksični stres, u prvom pristupu proteotoksični stres smo postigli mutacijama koje dovode do nefunkcionalnog sustava ubikvitin-proteasoma (UPS-a). Glavni stanični put razgradnje pogrešno smotanih i aberantnih proteina je sustav ubikvitin - proteasom (UPS). Više studija povezuje patologiju proteina tau sa sustavom ubikvitin-proteasoma, iako ostaje nejasno jesu li nakupljanje i oligomerizacija/ agregacija proteina tau uzrok ili posljedica narušenog sustava UPS. Primjerice, masenom spektrometrijom sparenih uzvojitih filamenata iz mozga oboljelih od Alzheimerove bolesti utvrđeno je da je tau u

ovim nakupinama poliubikvitiliran lancima ubikvitina povezanih lizinima 48 (125), što je uobičajeni signal za razgradnju proteasomom (126) te je stoga moguće da je patološko nakupljanje proteina tau u oligomere i veće agregate barem dijelom posljedica narušenog sustava ubikvitin-proteasoma za razgradnju proteina. U skladu s ovom mogućnosti, jedna novija studija koja je istraživala funkciju proteasoma u hipokampusu u različitim stadijima Alzheimerove bolesti, pokazala je da je aktivnost proteasoma smanjena i u ranim i u kasnim stadijima bolesti te da smanjena aktivnost proteasoma prethodi pojavi povišenih razina fosforiliranog tau (127). S druge strane, u sinapsama neurona iz mozga s Alzheimerovom bolešću pronađeno je da su oligomeri fosforiliranog tau ubikvitinirani i u izravnoj interakciji s proteasomom (128) te se pretpostavlja da na taj način oligomeri djeluju kao loši supstrati koji ometaju procesiranje drugih supstrata razgradnje u stanici, odnosno da sami tau oligomeri dovode do smanjenja funkcije proteasoma. U skladu s ovim nalazima, i jedno ranije istraživanje pokazalo je da tau filamenti koimunoprecipitiraju s proteasomima iz mozga s Alzheimerovom bolešću te su *in vitro* eksperimenti pokazali da tau filamenti snažno inhibiraju aktivnost proteasoma, što može dovesti do odumiranja neurona (129).

Kako bismo istražili utjecaj proteotoksičnog stresa uzrokovanog narušenim sustavom ubikvitin proteasoma na oligomerizaciju proteina tau, tau-NanoBiT konstrukte eksprimirali smo u soju koji sadrži termoosjetljivi alel gena *RPT6*/*CIM3*, *cim3-1* (Slika 19.A). *CIM3* kodira jednu od šest ATPaza poklopca regulatorne podjedinice 19S proteasoma te je važan za selektivnu razgradnju proteina proteasomom (76). Nadalje, tau-NanoBiT konstrukte eksprimirali smo u delecijskom mutantu za Rpn4, transkripcijski čimbenik koji dodatno aktivira ekspresiju gena proteasoma te je stoga u njegovu odsustvu razina proteasoma smanjena (130). Naši rezultati su pokazali da u uvjetima narušene funkcije proteasoma (mutanti *cim3-1* i *rpn4*) nije došlo do povećane aktivacije reportera tau-NanoBiT, što ukazuje na to da proteotoksični stres izazvan inhibicijom proteasoma ne dovodi po povećane oligomerizacije proteina tau.

6.4.2. Povezanost agregacije proteina tau s narušenom odgovorom stanice na pogrešno smotane proteine.

Ranije istraživanje je pokazalo kako u stanicama sisavaca ekspresija topive tau izoforme 0N/4R dovodi do ER-stresa na način da narušava razgradnju proteina molekulskim putem ERAD (engl. *ER-associated degradation*), putem interakcija s dijelovima membranskog kompleksa koji translocira supstrate ERAD-a kroz membranu ER-a do proteasoma (47). U svrhu proučavanja utjecaja stresa endoplazmatskog retikuluma (ER stres) na agregaciju tau proteina, sustav tau-NanoBiT eksprimirali smo u sojevima kvasca s mutacijama u genima *IRE1* i *HAC1* koji imaju narušeni put odgovora stanice na pogrešno smotane proteine (UPR), posljedica čega je ER stres. Ire1 je inozitol ovisna kinaza, transmembranski protein čija je zadaća registrirati ER-stres i aktivirati nizvodni odgovor. Signalna molekula tog puta nizvodno od Ire1 je Hac1 protein kojeg aktivira Ire1 i čija je zadaća transkripcijska aktivacija elemenata odgovora na pogrešno smotane proteine (engl. *unfolded protein response elements*, UPRE). Homolog signalnom putu Ire1-Hac1 u stanicama sisavaca je put IRE1-XBP1 (131). Aktivacija IRE1 u pozitivnoj je korelaciji s Braakovim stadijem Alzheimerove bolesti.

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da indukcija ekspresije tau u stanicama kvasca ne dovodi do slabijeg rasta stanica s narušenim odgovorom stanice na pogrešno smotane proteine izazvanim mutacijama u genima *IRE1* i HAC1 (Slika.3.), što ukazuje na to da stanice kvasca ne prepoznaju divlji tip proteina tau kao pogrešno smotani ili na drugi način aberantni protein.

Jedna od brojnih posttranslacijskih modifikacija tau koja može utjecati na agregaciju proteina je i N-vezana glikozilacija, proces vezanja oligosaharida na bočni lanac asparagina preko amida u proteinu, koji se odvija u ER-u i Golgijevom aparatu. Iako je tau citosolni protein i nije lokaliziran u ER-u gdje glikozilacija započinje, u pokazano je da za razliku od kontrola, u mozgu oboljenih od Alzheimerove bolesti tau protein je N-glikoliziran (136). Glikozilacija mijenja fizikalno-kemijska svojstva proteina te mijenjajući njihovu konformaciju može utjecati na njihovu smanjenu ili povećanu topivost (134). Tako je jedna nedavna studija na modelu stanica sisavaca pokazala je da N-glikozilacija tau proteina povećava njegovu topivost (135). U kontekstu našeg istraživanja, zanimljivo je

da je mjesto na kojem tau može biti glikoziliran asparagin na poziciji 410, odmah nakon serina 409 (137) čija je fosforilacija u pozitivnoj korelaciji s agregacijom tau proteina u kvascu u delecijskom mutantu *pho85* (15), stoga je jedno moguće objašnjenje načina na koji glikozilacija tau na aminokiselinskom ostatku Asn410 povećava topljivost proteina tau (135) to da glikozilacija sterički onemogućava fosforilaciju tau na aminokiselinskom ostatku Ser409.

Uzimajući u obzir moguću povezanost tau proteina i odgovora stanice na pogrešno smotane proteine nadalje smo u našem istraživanju ispitali dolazi li u stanicama kvasca s narušenim odgovor stanice na pogrešno smotane proteine izazvanim mutacijama u genima *IRE1* i *HAC1* do oligomerizacije proteina tau (Slika 20). No, reporter tau-NanoBiT nije pokazao značajnu aktivaciju, što je ukazalo na to da u navedenim uvjetima ne dolazi do povećane oligomerizacije proteina tau.

Zaključno, na temelju utjecaja ekspresije proteina tau na vijabilnost stanica izloženih proteotoksičnom stresu (Slika 3.), nedostatku aktivacije staničnog odgovora na pogrešno smotane proteine uslijed ekspresije proteina tau (Slika 4.), navedeni rezultati zajedno ukazuju na to da protein tau čovjeka eksprimiran u stanicama kvasca ne predstavlja supstrat sustava za kontrolu kvalitete proteina, tj. da stanica kvasca ne prepoznaje divlji tip proteina tau kao aberantan protein.

Nadalje, u ovom radu ispitali smo dolazi li u stanicama kvasca do oligomerizacije i agregacije proteina tau u uvjetima proteotoksičnog stresa. Difuzna lokalizacija proteina tau u stanici, tj. nedostatak vidljivih agregata ili inkluzija (Slika 6.) te nedostatak aktivacije tau-NanoBiT reportera (Slike 17., 18., 19. i 20) ukazuju na to da proteotoksični stres ne dovodi do oligomerizacije i agregacije proteina tau.

Izostanak učinka proteotoksičnog stresa na agregaciju kao i na toksičnost tau proteina čovjeka izraženog u kvascu navodi na pitanje je li kvasac adekvatan model za istraživanje ovih procesa. Homeostaza proteina u stanici održava se opsežnom mrežom mnoštva različitih komponenti koje zajedno osiguravaju ispravnu koncentraciju, konformaciju i unutarstaničnu lokalizaciju proteina, te se u mnogo slučajeva funkcije različitih

molekulskih puteva preklapaju ili nadopunjuju (engl. *redundancy*). U ovom istraživanju ispitan je samo mali dio te mreže. U budućim istraživanjima reporter tau-NanoBiT, kao i fluorescentno obilježeni tau moći će se koristiti u nepristranom genetičkom probiru na širokom setu mutanata za različite komponente mreže za održavanje homeostaze proteina.

Također, rezultati ovog rada pokazuju da tau ne stvara vidljive agregate tijekom staničnog starenja (Slika 7.). Buduća istraživanja na izoliranim replikativno starim stanicama majkama će pokazati dolazi li u starim stanicama do stvaranja oligomera tau, te utječe li dodatno opterećenje stanice pogrešno smotanim proteinima ili drugom vrstom stresa na ovaj proces, te kako na oligomerizaciju proteina tau utječu mutacije koje uzrokuju prerano starenje stanica (primjerice delecija gena *SIR2*).

7. ZAKLJUČAK

1. U skladu s ranijim nalazima, protein tau čovjeka, izoforma 2N4R, nije doveo do toksičnosti kada je eksprimiran u stanicama kvasca divljeg tipa, kao niti u mutantu *pho85* u kojem je tau hiperfosforiliran na aminokiselinskom ostatku Ser409. Sukladno ovim nalazima, ekspresija proteina tau čovjeka u stanicama kvasca nije dovela do aktivacije odgovora stanice na pogrešno smotane proteine, što ukazuje na to da protein tau čovjeka stanicama kvasca ne predstavlja supstrat sustava za kontrolu kvalitete proteina, tj. da stanica kvasca ne prepoznaje divlji tip proteina tau kao aberantan protein.

2. Uspostavili smo reporter tau-NanoBiT za detekciju oligomerizacije proteina tau u stanicama kvasca, te rezultati ukazuju na to da u stanicama divljeg tipa kvasca tau ne tvori oligomere, ili se radi o niskoj, bazalnoj razini oligomera. Za razliku od divljeg tipa, stanice delecijskih mutanata *pho85* i *sod2* za koje je ranije nađeno da imaju povišenu razinu sarkozil-netopljivih agregata tau, pokazale su povišenu razinu aktivacije reportera tau-NanoBiT, što ukazuje na korelaciju aktivacije reportera tau-NanoBiT i razine sarkozil-netopljivih agregata tau.

3. Opterećenje stanica koje eksprimiraju tau proteotoksičnim stresom, tj. visokom razinom pogrešno smotanih proteina, nije dovelo do toksičnosti tau, do formiranja vidljivih agregata tau, niti do oligomerizacije tau. Također mutacije u genima *IRE1* i *HAC1* koje narušavaju odgovor stanice na pogrešno smotane proteine (eng. *unfolded protein response*, UPR) nisu dovele do oligomerizacije proteina tau. U skladu s ovim nalazima, pronašli smo da tau ne stvara vidljive agregate u replikativno starim stanicama kvasca, za koje je od ranije poznato da imaju smanjeni kapacitet razgradnje proteina proteasomom, te povišenu razinu proteinskih agregata. Iz navedenih rezultata možemo zaključiti da opterećenje stanica pogrešno smotanim proteinima ne predstavlja okidač za proces oligomerizacije i agregacije tau u stanicama kvasca, odnosno nije presudan čimbenik toksičnosti tau. Također je moguće kako stanice putem alternativnih

molekularnih mehanizama uspješno sprečavaju nastanak tau-agregata, te moderiraju potencijalno toksičan učinak ekspresije proteina tau.

8. SAŽETAK

Nakupljanje agregata proteina tau u neurofibrilarne snopiće najistaknutije je histopatološko obilježje Alzheimerove bolesti. U zdravim neuronima tau ima karakteristike topljivog proteina te je uglavnom vezan za mikrotubule aksona, dok u neuronima zahvaćenim patologijom tvori agregate i akumulira se u somi i dendritima. Količina agregata i širenje neurofibrilarnih promjena u mozgu u izravnoj su korelaciji s napredovanjem bolesti i stupnjem kognitivnog oštećenja. Glavni rizični čimbenik za nastanak Alzheimerove bolesti je starenje, no točni uzroci agregacije tau još nisu potpuno razjašnjeni. Budući da su putevi agregacije proteina evolucijski konzervirani, radi genetičkog pristupa otkrivanju čimbenika agregacije i toksičnosti proteina tau, u ovom smo radu kao stanični model odabrali kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Kako bismo bolje razumjeli rane korake u tau patologiji, uspostavili smo i upotrijebili molekularni alat za proučavanje oligomerizacije tau u živim stanicama, temeljen na luminiscenciji, u kojem interakcija dvaju tau proteina rezultira komplementacijom luciferaze NanoLuc i luminiscencijom. Istražili smo dovode li različiti čimbenici, napose proteotoksični stres, do agregacije tau te smo ispitali toksičnost proteina tau u stanicama kvasca u uvjetima stresa. Pokazali smo da proteotoksični stres ne doprinosi oligomerizaciji i toksičnosti tau u stanicama kvasca. Uspostavljeni reporter tau-NanoBiT omogućit će genetički probir čimbenika agregacije i toksičnosti tau proteina u daljnjim istraživanjima.

9. SUMMARY

The effect of proteotoxic stress on human tau protein aggregation and toxicity expressed in yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Klara Zubčić, mag. biol. mol., 2022

The main histopathological hallmark of Alzheimer's disease are neurofibrillary tangles - large aggregates of protein tau. In healthy neurons, tau is a soluble protein mostly bound to the microtubules in axons, however in the affected neurons, tau accumulates in the soma and dendrites and forms aggregates. The number of tangles and the spread of neurofibrillary changes in the brain are directly correlated with the progression of the disease. The causes of tau aggregation are not completely clear. Since many molecular pathways of protein aggregation are evolutionarily conserved, we have chosen yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a cell model to study the factors of tau aggregation. To better understand the early steps in tau pathology, we used a molecular tool for studying tau oligomerization in living cells, based on the luminescent reporter NanoBiT, in which tau protein interaction results in complementation of NanoLuc luciferase. We investigated how different factors, especially proteotoxic stress, affect tau aggregation and examined the toxicity of tau in yeast cells under stress conditions. We have shown that proteotoxic stress does not contribute to tau oligomerization and toxicity in yeast cells. The established tau-NanoBiT reporter will enable genetic screens for the aggregation factors and tau protein toxicity in future research.

10. LITERATURA

1. Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. F1000Res. 2018 Jul 31;7. pii: F1000 Faculty Rev-1161.

2. Hamos JE, DeGennaro LJ, Drachman DA. Synaptic loss in Alzheimer’s disease and other dementias. Neurology. 1989;39(3):355–61.

3. Simic G, Babic Leko M, Wray S, Harrington C, Delalle I, Jovanov-Milošević N, i sur. Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in Alzheimer’s disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies. Biomolecules. 2016;6(1):6.

4. Kaufman SK, Del Tredici K, Thomas TL, Braak H, Diamond MI. Tau seeding activity begins in the transentorhinal/entorhinal regions and anticipates phospho-tau pathology in Alzheimer's disease and PART. Acta Neuropathol. 2018 Jul;136(1):57-67.

5. Roussarie JP, Yao V, Rodriguez-Rodriguez P, Oughtred R, Rust J, Plautz Z, i sur. Selective neuronal vulnerability in Alzheimer's disease: A network-based analysis. Neuron. 2020 Sep 9;107(5):821-835.e12.

6. Wegmann S, Maury EA, Kirk MJ, Saqran L, Roe A, DeVos SL, i sur. Removing endogenous tau does not prevent tau propagation yet reduces its neurotoxicity. EMBO J. 2015 Dec 14;34(24):3028-41.

7. Congdon EE, Duff KE. Is tau aggregation toxic or protective? J Alzheimers Dis. 2008 Aug;14(4):453-7.

8. Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol. 1991;82(4):239-59.

9. Kent SA, Spires-Jones TL, Durrant CS. The physiological roles of tau and Aβ: implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. Acta Neuropathol. 2020 Oct;140(4):417-447.

10. Barbier P, Zejneli O, Martinho M, Lasorsa A, Belle V, Smet-Nocca C, i sur. Role of tau as a microtubule-associated protein: structural and functional aspects. Front Aging Neurosci. 2019 Aug 7;11:204.

11. Tan R, Lam AJ, Tan T, Han J, Nowakowski DW, Vershinin M, i sur. Microtubules gate tau condensation to spatially regulate microtubule functions. Nat Cell Biol. 2019 Sep;21(9):1078-1085.

12. Siahaan V, Krattenmacher J, Hyman AA, Diez S, Hernández-Vega A, Lansky Z, i sur. Kinetically distinct phases of tau on microtubules regulate kinesin motors and severing enzymes. Nat Cell Biol. 2019 Sep;21(9):1086-1092.

13. Šimić G, Babić Leko M, Wray S, Harrington CR, Delalle I, Jovanov-Milošević N, i sur. Monoaminergic neuropathology in Alzheimer's disease. Prog Neurobiol. 2017 Apr;151:101-138.

14. Regan P, Whitcomb DJ, Cho K. Physiological and pathophysiological implications of synaptic tau. Neuroscientist. 2017 Apr;23(2):137-151.

15. Sinsky J, Pichlerova K, Hanes J. Tau protein interaction partners and their roles in Alzheimer's disease and other tauopathies. Int J Mol Sci. 2021 Aug 26;22(17):9207.

16. Diner I, Nguyen T, Seyfried NT. Enrichment of detergent-insoluble protein aggregates from human postmortem brain. J Vis Exp. 2017;2017(128).

17. Andorfer C, Acker CM, Kress Y, Hof PR, Duff K, Davies P. Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. J Neurosci. 2005;25(22):5446–54.

18. Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, i sur. Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. Science. 2001;293(5530):711–4.

19. Berger Z, Roder H, Hanna A, Carlson A, Rangachari V, Yue M, i sur. Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. J Neurosci. 2007;27(14):3650–62.

20. Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Sarmiento J, Troncoso J, Jackson GR, i sur. Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. FASEB J. 2012;26(5):1946–59.

21. Rizzu P, Joosse M, Ravid R, Hoogeveen A, Kamphorst W, van Swieten JC, i sur. Mutation-dependent aggregation of tau protein and its selective depletion from the soluble fraction in brain of P301L FTDP-17 patients. Hum Mol Genet. 2000 Dec 12;9(20):3075-82.

22. Musiek ES, Holtzman DM. Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and 'wingmen'. Nat Neurosci. 2015 Jun;18(6):800-6.

23. Nunomura A, Honda K, Takeda A, Hirai K, Zhu X, Smith MA, i sur. Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases. J Biomed Biotechnol. 2006;2006(3):82323.

24. Eftekharzadeh B, Daigle JG, Kapinos LE, Coyne A, Schiantarelli J, Carlomagno Y, i sur. tau protein disrupts nucleocytoplasmic transport in Alzheimer's disease.

Neuron. 2018 Sep 5;99(5):925-940.e7. Erratum u: Neuron. 2019 Jan 16;101(2):349.

25. Kaganovich D, Kopito R, Frydman J. Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. Nature. 2008 Aug 28;454(7208):1088-95.

26. Sala AJ, Bott LC, Morimoto RI. Shaping proteostasis at the cellular, tissue, and organismal level. J Cell Biol. 2017 May 1;216(5):1231-1241.

27. Minton K. Sensing proteotoxic stress. Nat Rev Immunol. 2022 Apr;22(4):205.

28. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiol Rev. 2002 Apr;82(2):373-428.

29. Smith DM. Could a common mechanism of protein degradation impairment underlie many neurodegenerative diseases? J Exp Neurosci. 2018 Aug 19;12:1179069518794675.

30. Labbadia J, Morimoto RI. The biology of proteostasis in aging and disease. Annu Rev Biochem. 2015;84:435-64.

31. Klaips CL, Jayaraj GG, Hartl FU. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. J Cell Biol. 2018 Jan 2;217(1):51-63.

32. Bocai NI, Marcora MS, Belfiori-Carrasco LF, Morelli L, Castaño EM. Endoplasmic reticulum stress in tauopathies: Contrasting human brain pathology with cellular and animal models. J Alzheimers Dis. 2019;68(2):439-458.

33. Gerakis Y i Hetz C. Emerging roles of ER stress in the etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease. The FEBS J. 2018. 285 (6): 995–1011.

34. Duran-Aniotz C, Cornejo VH, Espinoza S, Ardiles AO, Medinas DB, Salazar C, i sur. IRE1 signaling exacerbates Alzheimer's disease pathogenesis. Acta Neuropathol. 2017. 134 (3): 489–506.

35. Hoozemans JJ, van Haastert ES, Nijholt DA, Rozemuller AJ, Scheper W. Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease. Neurodegener Dis. 2012;10(1-4):212-5.

36. Karagoz GE, Acosta-Alvear D, Walter P. The unfolded protein response: detecting and responding to fluctuations in the protein-folding capacity of the endoplasmic reticulum. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2019 Sep 3;11(9):a033886.

37. Preissler S, Ron D. Early events in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2019 Apr 1;11(4):a033894.

38. Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, Gallagher CM, Walter P. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013 Mar 1;5(3):a013169.

39. Wu H, Ng BSH, Thibault G. Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans. Biosci Rep. 2014 Jul 1;34(4):e00118.

40. Hoozemans JJ M, van Haastert ES, Nijholt DAT, Rozemuller AJM, Eikelenboom P, Scheper W. The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. Am. J. Pathol. 2009. 174 (4): 1241–51.

41. Lee JH, Won SM, Suh J, Son SJ, Moon GJ, Park UJ, i sur. Induction of the unfolded protein response and cell death pathway in Alzheimer's disease, but not in aged Tg2576 mice. Exp. Mol. Med. 2010. 42 (5): 386–94.

42. Pitera AP, Asuni AA, O'Connor V, Deinhardt K. Pathogenic tau does not drive activation of the unfolded protein response. J Biol Chem. 2019 Jun 21;294(25):9679-9688.

43. Liu SY, Wang W, Cai ZY, Yao LF, Chen ZW, Wang CY, i sur. Polymorphism -116C/G of human X-box-binding protein 1 promoter is associated with risk of Alzheimer's disease. CNS Neurosci Ther. 2013 Apr;19(4):229-34.

44. Hoglinger GU, Melhem NM, Dickson DW, Sleiman PMA, Wang LS, Klei L, i sur. Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy. Nat Genet. 2011 Jun 19;43(7):699-705.

45. Ho YS, Yang X, Lau JC, Hung CH, Wuwongse S, Zhang Q, i sur. Endoplasmic reticulum stress induces tau pathology and forms a vicious cycle: implication in Alzheimer's disease pathogenesis. J Alzheimers Dis. 2012;28(4):839-54.

46. van der Harg J., Nölle A., Zwart R. The unfolded protein response mediates reversible tau phosphorylation induced by metabolic stress. Cell Death Dis. 2014. 5, e1393

47. Abisambra JF, Jinwal UK, Blair LJ, O'Leary JC 3rd, Li Q, Brady S, i sur. tau accumulation activates the unfolded protein response by impairing endoplasmic reticulum-associated degradation. J Neurosci. 2013 May 29;33(22):9498-507.

48. Salminen A, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K, Ojala J. ER stress in Alzheimer's disease: a novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology. J Neuroinflammation. 2009 Dec 26;6:41.

49. Seynnaeve D, Vecchio MD, Fruhmann G, Verelst J, Cools M, Beckers J, i sur. Recent Insights on Alzheimer's Disease Originating from Yeast Models. Int J Mol Sci. 2018 Jul 3;19(7):1947.

50. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, i sur. Life with 6000 genes. Science. 1996 Oct 25;274(5287):546, 563-7.

51. Tenreiro S, Munder MC, Alberti S, Outeiro TF. Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration. J Neurochem. 2013 Nov;127(4):438-52.

52. Narayan P, Ehsani S, Lindquist S. Combating neurodegenerative disease with chemical probes and model systems. Nat Chem Biol. 2014 Nov;10(11):911-20. Epub 2014 Oct 17. Erratum in: Nat Chem Biol. 2015 Feb;11(2):172.

53. Verduyckt M, Vignaud H, Bynens T, Van den Brande J, Franssens V, Cullin C, i sur. Yeast as a model for Alzheimer's disease: latest studies and advanced strategies. Methods Mol Biol. 2016;1303:197-215.

54. Heinisch JJ, Brandt R. Signaling pathways and posttranslational modifications of tau in Alzheimer's disease: the humanization of yeast cells. Microb Cell. 2016 Mar 25;3(4):135-146.

55. Vandebroek T, Vanhelmont T, Terwel D, Borghgraef P, Lemaire K, Snauwaert J, i sur. Identification and isolation of a hyperphosphorylated, conformationally changed intermediate of human protein tau expressed in yeast. Biochemistry. 2005;44(34):11466–75.

56. Vanhelmont T, Vandebroek T, De Vos A, Terwel D, Lemaire K, Anandhakumar J, i sur. Serine-409 phosphorylation and oxidative damage define aggregation of human protein tau in yeast. FEMS Yeast Res. 2010;10(8):992–1005.

57. Willingham S, Outeiro TF, DeVit MJ, Lindquist SL, Muchowski PJ. Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or alpha-synuclein. Science. 2003;302(5651):1769–72.

58. Treusch S, Hamamichi S, Goodman JL, Matlack KE, Chung CY, Baru V, i sur. Functional links between Aβ toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. Science. 2011 Dec 2;334(6060):1241-5.

59. Jovičić A, Mertens J, Boeynaems S, Bogaert E, Chai N, Yamada SB, i sur. Modifiers of C9orf72 dipeptide repeat toxicity connect nucleocytoplasmic transport defects to FTD/ALS. Nat Neurosci. 2015 Sep;18(9):1226-9.

60. Di Gregorio SE, Duennwald ML. Yeast as a model to study protein misfolding in aged cells, FEMS Yeast Research, Volume 18, Issue 6, September 2018, foy054

61. Sampaio-Marques B, Burhans WC, Ludovico P. Yeast at the Forefront of Research on Ageing and Age-Related Diseases. Prog Mol Subcell Biol. 2019;58:217-242.

62. Tissenbaum HA, Guarente L. Model organisms as a guide to mammalian aging. Dev Cell. 2002 Jan;2(1):9-19.

63. Dixon AS, Schwinn MK, Hall MP, Zimmerman K, Otto P, Lubben TH, i sur. NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. ACS Chem Biol. 2016 Feb 19;11(2):400-8.

64. Wegmann S, Nicholls S, Takeda S, Fan Z, Hyman BT. Formation, release, and internalization of stable tau oligomers in cells. J Neurochem. 2016;139(6):1163–74.

65. Wegmann S, Jung YJ, Chinnathambi S, Mandelkow EM, Mandelkow E, Muller DJ. Human tau isoforms assemble into ribbon-like fibrils that display polymorphic structure and stability. J Biol Chem. 2010 Aug 27;285(35):27302-27313.

66. Shen MW, Fang F, Sandmeyer S, Da Silva NA. Development and characterization of a vector set with regulated promoters for systematic metabolic engineering in Saccharomyces cerevisiae. Yeast. 2012 Dec;29(12):495-503.

67. Botman D, de Groot DH, Schmidt P, Goedhart J, Teusink B. In vivo characterisation of fluorescent proteins in budding yeast. Sci Rep. 2019 Feb 19;9(1):2234.

68. Gietz RD, Schiestl RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nat Protoc. 2007;2(1):31–4.

69. Silve S, Volland C, Garnier C, Jund R, Chevallier MR, Haguenauer-Tsapisl AR. Membrane insertion of uracil permease, a polytopic yeast plasma membrane protein. Mol Cell Biol. 1991; 11(2): 1114–1124.

70. Randez-Gil F, Bojunga L, Estruch F, Winderickx J, Del Poeta M, Prieto JA. Sphingolipids and Inositol Phosphates Regulate the tau Protein Phosphorylation Status in Humanized Yeast. Front Cell Dev Biol. 2020 Nov 17;8:592159.

71. Lu K, den Brave F, Jentsch S. Receptor oligomerization guides pathway choice between proteasomal and autophagic degradation . Nat Cell Biol. 2017; 19, 732–739.

72. Spear ED, Ng DT. Stress tolerance of misfolded carboxypeptidase Y requires maintenance of protein trafficking and degradative pathways. Mol Biol Cell. 2003 Jul;14(7):2756-67.

73. De Vos A, Anandhakumar J, Van den Brande J, Verduyckt M, Franssens V, Winderickx J, Swinnen E. Yeast as a model system to study tau biology. Int J Alzheimers Dis. 2011 Apr 6;2011:428970.

74. De Vos A, Bynens T, Rosseels J, Coun C, Ring J, Madeo F, i sur. The peptidyl prolyl cis/trans isomerase Pin1/Ess1 inhibits phosphorylation and toxicity of tau in a yeast model for Alzheimer's disease[J]. AIMS Molecular Science, 2015, 2(2): 144-160.

75. Vilchez D, Saez I, Dillin A. The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. Nat Commun. 2014 Dec 8;5:5659.

76. Lindstrom DL, Gottschling DE. The mother enrichment program: a genetic system for facile replicative life span analysis in Saccharomyces cerevisiae. Genetics. 2009 Oct;183(2):413-22, 1SI-13SI.

77. Camblong J, Beyrouthy N, Guffanti E, Schlaepfer G, Steinmetz LM, Stutz F. Trans-acting antisense RNAs mediate transcriptional gene cosuppression in S. cerevisiae. Genes Dev. 2009 Jul 1;23(13):1534-45.

78. Oh-Hashi K, Hirata Y, Kiuchi K. SOD1 dimerization monitoring using a novel split NanoLuc, NanoBit. Cell Biochem Funct. 2016;34(7):497–504.

79. Hashimoto T, Adams KW, Fan Z, McLean PJ, Hyman BT. Characterization of oligomer formation of amyloid-beta peptide using a split-luciferase complementation assay. J Biol Chem. 2011 Aug 5;286(31):27081-91.

80. Morimoto RI, Cuervo AM. Proteostasis and the aging proteome in health and disease. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2014 Jun;69 Suppl 1(Suppl 1):S33-8.

81. Ghislain M, Udvardy A, Mann C. S. cerevisiae 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase. Nature. 1993 Nov 25;366(6453):358-62.

82. Bachmann S, Bell M, Klimek J, Zempel H. Differential effects of the six human TAU isoforms: somatic retention of 2N-TAU and increased microtubule number induced by 4R-TAU. Front Neurosci. 2021 May 25;15:643115.

83. Bandyopadhyay B, Li G, Yin H, Kuret J. tau aggregation and toxicity in a cell culture model of tauopathy. J Biol Chem. 2007 Jun 1;282(22):16454-64.

84. Matsumoto G, Matsumoto K, Kimura T, Suhara T, Higuchi M, Sahara N, Mori N. tau fibril formation in cultured cells compatible with a mouse model of tauopathy. Int J Mol Sci. 2018 May 17;19(5):1497.

85. Chen X, Petranovic D. Amyloid-β peptide-induced cytotoxicity and mitochondrial dysfunction in yeast, FEMS Yeast Research, 2015.15 (6);1–21.

86. Outeiro TF, Lindquist S. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. Science. 2003;302(5651):1772–5.

87. Willingham S, Outeiro TF, DeVit MJ, Lindquist SL, Muchowski PJ. Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or alpha-synuclein. Science. 2003;302(5651):1769–72.

88. Meriin AB, Zhang X, He X, Newnam GP, Chernoff YO, Sherman MY. Huntington toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1. J Cell Biol. 2002 Jun 10;157(6):997-1004. Erratum in: J Cell Biol 2002 Aug 5;158(3):591.

89. Kramer NJ, Carlomagno Y, Zhang YJ, Almeida S, Cook CN, Gendron TF, i sur. Spt4 selectively regulates the expression of C9orf72 sense and antisense mutant transcripts. Science. 2016 Aug 12;353(6300):708-12.

90. Chai N, Gitler AD. Yeast screen for modifiers of C9orf72 poly(glycine-arginine) dipeptide repeat toxicity. FEMS Yeast Res. 2018 Jun 1;18(4):foy024.

91. Ciaccioli G, Martins A, Rodrigues C, Vieira H, Calado P. A powerful yeast model to investigate the synergistic interaction of α-synuclein and tau in neurodegeneration. PLoS One. 2013;8(2):e55848.

92. Werner-Washburne M, Roy S, Davidson GS. Aging and the survival of quiescent and non-quiescent cells in yeast stationary-phase cultures. Subcell Biochem. 2012;57:123-43.

93. Gray JV, Petsko GA, Johnston GC, Ringe D, Singer RA, Werner-Washburne M. "Sleeping beauty": quiescence in Saccharomyces cerevisiae. Microbiol Mol Biol Rev. 2004 Jun;68(2):187-206.

94. Khatoon S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. FEBS Lett. 1994 Aug 29;351(1):80-4.

95. Chambraud B, Daguinot C, Guillemeau K, Genet M, Dounane O, Meduri G, i sur. Decrease of neuronal FKBP4/FKBP52 modulates perinuclear lysosomal positioning and MAPT/tau behavior during MAPT/tau-induced proteotoxic stress. Autophagy. 2021 Nov;17(11):3491-3510.

96. Kim JH, Kim E, Choi WH, Lee J, Lee JH, Lee H, i sur. Inhibitory RNA aptamers of tau oligomerization and their neuroprotective roles against proteotoxic stress. Mol Pharm. 2016 Jun 6;13(6):2039-48.

97. Carroll T, Guha S, Nehrke K, Johnson GVW. tau Post-Translational Modifications: Potentiators of Selective Vulnerability in Sporadic Alzheimer's Disease. Biology (Basel). 2021 Oct 15;10(10):1047.

98. Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. J Cell Biol. 1985 Oct;101(4):1371-8.

99. Ukmar-Godec T, Wegmann S, Zweckstetter M. Biomolecular condensation of the microtubule-associated protein tau. Semin Cell Dev Biol. 2020 Mar;99:202-214.

100. Ambadipudi S, Biernat J, Riedel D, Mandelkow E, Zweckstetter M. Liquid-liquid phase separation of the microtubule-binding repeats of the Alzheimer-related protein tau. Nat Commun. 2017 Aug 17;8(1):275.

101. Hernández-Vega A, Braun M, Scharrel L, Jahnel M, Wegmann S, Hyman BT, i sur. Local nucleation of microtubule bundles through tubulin concentration into a condensed tau phase. Cell Rep. 2017 Sep 5;20(10):2304-2312.

102. Zhang X, Lin Y, Eschmann NA, Zhou H, Rauch JN, Hernandez I, i sur. RNA stores tau reversibly in complex coacervates. PLoS Biol. 2017 Jul 6;15(7):e2002183.

103. Wegmann S, Eftekharzadeh B, Tepper K, Zoltowska KM, Bennett RE, Dujardin S, i sur. tau protein liquid-liquid phase separation can initiate tau aggregation. EMBO J. 2018 Apr 3;37(7):e98049.

104. Kanaan NM, Hamel C, Grabinski T, Combs B. Liquid-liquid phase separation induces pathogenic tau conformations in vitro. Nat Commun. 2020 Jun 4;11(1):2809.

105. Yu A, Fox SG, Cavallini A, Kerridge C, O'Neill MJ, Wolak J, Bose S, Morimoto RI. tau protein aggregates inhibit the protein-folding and vesicular trafficking arms of the cellular proteostasis network. J Biol Chem. 2019 May 10;294(19):7917-7930.

106. Lee HY, Chao JC, Cheng KY, Leu JY. Misfolding-prone proteins are reversibly sequestered to an Hsp42-associated granule upon chronological aging. J Cell Sci. 2018 Aug 20;131(16):jcs220202.

107. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. Nat Med. 2004;10(S7):10–7.

108. Apicco DJ, Zhang C, Maziuk B, Jiang L, Ballance HI, Boudeau S, i sur. Dysregulation of RNA splicing in tauopathies. Cell Rep. 2019 Dec 24;29(13):4377-4388.e4.

109. Vasicova P, Lejskova R, Malcova I, Hasek J. The Stationary-Phase Cells of Saccharomyces cerevisiae display dynamic actin filaments required for processes extending chronological life span. Mol Cell Biol. 2015 Nov;35(22):3892-908.

110. Torres-Garcia L, P Domingues JM, Brandi E, Haikal C, Mudannayake JM, Brás IC, i sur. Monitoring the interactions between alpha-synuclein and tau in vitro and in vivo using bimolecular fluorescence complementation. Sci Rep. 2022 Feb 22;12(1):2987.

111. Matecic M, Stuart S, Holmes SG. SIR2-induced inviability is suppressed by histone H4 overexpression. Genetics. 2002 Oct;162(2):973-6.

112. Silva A, Almeida B, Sampaio-Marques B, Reis MI, Ohlmeier S, Rodrigues F, i sur. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a specific

substrate of yeast metacaspase. Biochim Biophys Acta. 2011 Dec;1813(12):2044-9.

113. Sirover MA. New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. J Cell Biochem. 2005 May 1;95(1):45-52.

114. de Vries, RMJM. Structural elucidation of novel allosteric regulatory mechanisms in nuclear receptors. [disertacija]. Eindhoven, Nizozemska: Tehnološko sveučilište Eindhoven; 2020.

115. Koren SA, Hamm MJ, Meier SE, Weiss BE, Nation GK, Chishti EA, i sur. tau drives translational selectivity by interacting with ribosomal proteins. Acta Neuropathol. 2019 Apr;137(4):571-583.

116. Meier S, Bell M, Lyons DN, Rodriguez-Rivera J, Ingram A, Fontaine SN, i sur. Pathological tau promotes neuronal damage by impairing ribosomal function and decreasing protein synthesis. J Neurosci. 2016 Jan 20;36(3):1001-7.

117. PepCalc.com—Innovagen peptide property calculator. http://pepcalc.com/. pristupljeno 23. srpnja 2020.

118. Greenberg SG, Davies P. A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Aug;87(15):5827-31.

119. Flynn JM, Melov S. SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. Free Radic Biol Med. 2013 Sep;62:4-12.

120. Melov S, Adlard PA, Morten K, Johnson F, Golden TR, Hinerfeld D, i sur. Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. PLoS One. 2007 Jun 20;2(6):e536.

121. Managbanag JR, Witten TM, Bonchev D, i sur. Shortest-path network analysis is a useful approach toward identifying genetic determinants of longevity. PLoS One. 2008;3(11):e3802.

122. Bartolome F, Carro E, Alquezar C. Oxidative stress in tauopathies: From cause to therapy. Antioxidants. 2022 Jul 22;11(8):1421.

123. Haque MM, Murale DP, Kim YK, Lee JS. Crosstalk between oxidative stress and tauopathy. Int J Mol Sci. 2019 Apr 22;20(8):1959.

124. Drummond E, Pires G, MacMurray C, Askenazi M, Nayak S, Bourdon M, i sur. Phosphorylated tau interactome in the human Alzheimer's disease brain. Brain. 2020 Sep 1;143(9):2803-2817.

125. Cripps D, Thomas SN, Jeng Y, Yang F, Davies P, Yang AJ. Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. J Biol Chem. 2006 Apr 21;281(16):10825-38.

126. Middleton AJ, Day CL. The molecular basis of lysine 48 ubiquitin chain synthesis by Ube2K. Sci Rep. 2015 Nov 23;5:16793.

127. Chocron ES, Munkácsy E, Kim HS, Karpowicz P, Jiang N, Van Skike CE, i sur. Genetic and pharmacologic proteasome augmentation ameliorates Alzheimer's-like pathology in mouse and fly APP overexpression models. Sci Adv. 2022 Jun 10;8(23):eabk2252.

128. Tai HC, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Frosch MP, Spires-Jones TL, Hyman BT. The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. Am J Pathol. 2012 Oct;181(4):1426-35. Erratum in: Am J Pathol. 2012 Nov;181(5):1889-90.

129. Keck S, Nitsch R, Grune T, Ullrich O. Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. J Neurochem. 2003 Apr;85(1):115-22.

130. Tkach JM, Yimit A, Lee AY, Riffle M, Costanzo M, Jaschob D, i sur. Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. Nat Cell Biol. 2012 Sep;14(9):966-76.

131. Back SH, Schröder M, Lee K, Zhang K, Kaufman RJ. ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. Methods. 2005 Apr;35(4):395-416.

132. Wang W, Gopal S, Pocock R, Xiao Z. Glycan Mimetics from Natural Products: New therapeutic opportunities for neurodegenerative disease. Molecules. 2019 Dec 16;24(24):4604.

133. Mitra N, Sinha S, Ramya TN, Surolia A. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. Trends Biochem Sci. 2006 Mar;31(3):156-63. Erratum in: Trends Biochem Sci. 2006 May;31(5):251.

134. Losev, Y., Paul, A., Frenkel-Pinter, M. Novel model of secreted human tau protein reveals the impact of the abnormal N-glycosylation of tau on its aggregation propensity. Sci Rep. 2019; 9, 2254.

135. Kolarova M, García-Sierra F, Bartos A, Ricny J, Ripova D. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. Int J Alzheimers Dis. 2012;2012:731526.

11. ŽIVOTOPIS

Klara Zubčić rođena je 25. lipnja 1993. godine u Zadru gdje je završila prirodoslovno-matematički smjer Gimnazije Jurja Barakovića 2012. godine. Diplomirala je 2018. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te stekla naziv magistre molekularne biologije. Poslijediplomski doktorski studij Neuroznanost upisuje 2018. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te počinje s izradom disertacije pod mentorstvom dr. sc. Mirte Boban i prof. dr. sc. Gorana Šimića. Od iste godine zaposlena je na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu temeljem projekta HRZZ-a "Razvoj karijera mladih istraživača".
2019. godine sudjelovala je na ljetnoj školi LiCEND “Experimental Models for Neurodegenerative Disorders: From Cells to Model Organisms” Lille, Francuska. Članica je Hrvatskog društva za neuroznanost, Federation of European Neuroscience Societies (FENS) i Mediterranean Neuroscience Society. Do sada je objavila jedan znanstveni rad u časopisu svrstanom u kvartilu Q1, dva znanstvena rada u časopisima svrstanim u kvartilu Q2 i devet kongresnih priopćenja. Završila je dva stupnja Hrvatskog znakovnog jezika.