

Ispitivanje utjecaja ekspresije humanog proteina Tau na vijabilnost stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* s delecijom gena SSD1

Kruljac, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:310872>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija**

Petra Kruljac
0058218037

**Ispitivanje utjecaja ekspresije humanog proteina Tau na
vijabilnost stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* s delecijom
gena *SSD1***

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija

Mentor: izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Ispitivanje utjecaja ekspresije humanog proteina Tau na vijabilnost stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* s delecijom gena *SSD1*

Petra Kruljac, 0058218037

Sažetak: Agregacija proteina Tau povezana je s odumiranjem neurona i nastankom bolesti, no uzroci toksičnosti nedovoljno su poznati. U svrhu boljeg razumijevanja uzroka toksičnosti, cilj rada bio je ispitati je li Tau protein čovjeka toksičan kada se eksprimira u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* kojemu nedostaje Ssd1, protein važan u odgovoru na temperaturni stres. Tehnikama rekombinantne DNA konstruiran je plazmid s genom za Tau pod kontrolom Z-promotora koji se inducira progesteronom. Plazmid je transformiran u delecijски mutant kvasca *ssd1Δ*, u čiji genom je prethodno integriran konstrukt za ekspresiju transkripcijskog faktora potrebnog za aktivaciju Z-promotora, te je ekspresija proteina Tau provjerena western blotom. Toksičnost proteina Tau određena je ispitivanjem utjecaja ekspresije Tau na vijabilnost stanica, metodom testa rasta. Rezultati pokazuju da ekspresija proteina Tau ne utječe na vijabilnost mutanta *ssd1Δ* uzgojenog na optimalnoj i povišenoj temperaturi, što ukazuje na to da navedeni uvjeti ne dovode do toksičnosti proteina Tau.

Ključne riječi: protein Tau, *SSD1*, kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, temperaturni stres

Rad sadrži: 34 stranice, 14 slika, 4 tablice, 49 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević

Pomoć pri izradi: dr. sc. Mirta Boban, Hrvatski institut za istraživanje mozga

Datum obrane: 19. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Influence of human Tau protein expression on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells with deletion of the *SSD1* gene

Petra Kruljac, 0058218037

Abstract: Tau protein aggregation has been associated with neuronal death and disease, but the underlying mechanisms of toxicity are unclear. To elucidate the causes of Tau toxicity, the aim of this study was to test whether human Tau protein is toxic when expressed in yeast *Saccharomyces cerevisiae* lacking Ssd1, a protein involved in heat-stress response. Using recombinant DNA techniques, Tau-gene was placed on a plasmid under the control of the progesterone-inducible Z-promoter and transformed into *ssd1Δ* deletion mutant yeast, which had been modified by a construct expressing a progesterone-inducible transcription factor. Tau protein expression was verified by Western blot. Tau-mediated toxicity was investigated by examining the effect of Tau expression on cell viability using a growth test. The results show that Tau does not affect viability of *ssd1Δ* mutant grown at a normal and elevated temperature, indicating that heat-shock in the absence of functional Ssd1 does not lead to Tau toxicity.

Keywords: Tau protein, *SSD1*, yeast *Saccharomyces cerevisiae*, temperature stress

Thesis contains: 34 pages, 14 figures, 4 tables, 49 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Igor Stuparević, Associate Professor

Technical support and assistance: Mirta Boban, PhD (Croatian Institute for Brain Research, School of Medicine University of Zagreb)

Thesis defended: September 19, 2022

Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Igoru Stupareviću te djelatnicima Hrvatskog instituta za istraživanje mozga u Zagrebu, a posebno dr. sc. Mirti Boban i mag. biol. mol. Klari Zubčić na novostečenom znanju, nesebičnim savjetima, izdvojenom vremenu i strpljenju.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2

2.1. KVASAC *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*2

2.1.1. KORIŠTENJE KVASCA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* U ISTRAŽIVANJU NEURODEGENERATIVNIH BOLESTI 3

2.2. TAU PROTEIN 5

2.2.1. BIOLOGIJA I PATOLOGIJA 5

2.2.2. ALZHEIMEROVA BOLEST – NAJČEŠĆA TAUOPATIJA 7

2.2.3. ULOGA U ZDRAVIM NEURONIMA 7

2.2.4. ULOGA U NEURODEGENERATIVNIM BOLESTIMA (ALZHEIMEROVA BOLEST 8

2.3. SSD1 PROTEIN U KVASCU *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* 10

2.3.1. ULOGA PROTEINA SSD1 U AGREGACIJI PROTEINA..... 11

2.4. WESTERN BLOT ANALIZA 11

3. EKSPERIMENTALNI DIO 12

3.1. MATERIJALI 12

3.1.1. KEMIKALIJE I ENZIMI 12

3.1.2. OTOPINE..... 12

3.1.3. SOJ KVASCA, PLAZMIDI, OLIGONUKLEOTIDI..... 12

3.1.3.1. Sojevi bakterija i kvasca 12

3.1.3.2. Plazmidi 13

3.1.3.3. Oligonukleotidi 13

3.1.4. HRANJIVE PODLOGE ZA UZGOJ KVASCA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*..... 13

3.1.5. HRANJIVE PODLOGE ZA UZGOJ BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI*..... 14

3.2. METODE 14

3.2.1. TRANSFORMACIJA KVASCA 14

3.2.2. IZOLACIJA GENOMSKE DNA IZ STANICA KVASCA 14

3.2.3. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (PCR) 15

3.2.4. LIGACIJA 16

3.2.5. TRANSFORMACIJA U BAKTERIJI 16

3.2.6. IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA IZ STANICA BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI*..... 17

3.2.7. CIJEPANJE DNA RESTRIKCIJSKIM ENZIMIMA I AGARozNA GEL ELEKTROFOREZA 17

3.2.8. INDUKCIJA I PROVJERA EKSPRESIJE GENA S INDUCIBILNOG PROMOTORA PZ – NACJEPLJIVANJE U TEKUĆI MEDIJ S 10 mM PROGESTERONOM I IZOLACIJA UKUPNIH PROTEINA 17

3.2.9.	SDS ELEKTROFOREZA	18
3.2.10.	WESTERN BLOT	18
3.2.11.	TEST RASTA – UTJECAJ EKSPRESIJE TAU PROTEINA NA VIJABILNOST STANICA MUTANATA <i>SSDI</i>	19

4. REZULTATI I RASPRAVA 20

4.1.	KONSTRUKCIJA PLAZMIDA ZA INDUCIBILNU EKSPRESIJU HUMANOG PROTEINA TAU U KVASCU <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	20
------	--	----

4.2.	KONSTRUKCIJA SOJA KVASCA <i>SSDI</i> Δ KOJI EKSPRIMIRA SYNTHTA (SYNTHTA-ZIF268 DBD)	21
------	--	----

4.3.	PROVJERA INDUCIBILNE EKSPRESIJE GENA ZA TAU PROTEIN ČOVJEKA S PROMOTORA PZ	24
------	--	----

4.4.	PROVJERA UTJECAJA EKSPRESIJE PROTEINA TAU NA VIJABILNOST STANICA KVASCA S DELECIJOM GENA <i>SSDI</i>	27
------	---	----

5. ZAKLJUČCI 29

6. POPIS LITERATURE 30

1. UVOD

Nakupljanje agregata proteina Tau čovjeka u stanicama mozga povezano je s odumiranjem neurona i nastankom mnogih neurodegenerativnih bolesti, tauopatija. Unatoč brojnim istraživanjima, uzroci agregacije proteina Tau i molekularni putevi koji dovode do njegove toksičnosti, tj. odumiranja neurona, nedovoljno su poznati. U svrhu boljeg razumijevanja uzroka toksičnosti proteina Tau, cilj ovog rada bio je pomoću jednostaničnog eukariota kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ispitati je li Tau protein čovjeka toksičan u uvjetima narušenog odgovora stanice na temperaturni stres.

Različite vrste stresa, uključujući temperaturni stres, te starenje, mutacije, ili pogreške tijekom biogeneze proteina, mogu dovesti do pogrešnog smatanja polipeptidnih lanaca i agregacije proteina (Haass i Selkoe, 2007). Stanica posjeduje sustav za kontrolu kvalitete proteina koji sprečava nakupljanje pogrešno smotanih proteina i proteinskih agregata. *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je eukariot koji se zbog jednostavnosti uzgoja i genetičkih manipulacija, te evolucijske konzerviranosti mnogih molekularnih puteva često koristi kao modelni organizam za proučavanje staničnih procesa eukariota, uključujući i stanični odgovor na stres i temeljne stanične procese uključene u kontrolu agregacije proteina. Jedna od važnih komponenti sustava za kontrolu kvalitete proteina je disagregaza Hsp104, koja uslijed temperaturnog stresa uz pomoć proteina Ssd1 djeluje na uklanjanje proteinskih agregata.

Specifični ciljevi ovog rada bili su inducirati ekspresiju humanog proteina Tau u kvascu *S. cerevisiae* te ispitati utjecaj delecije gena *SSD1* na vijabilnost i reproduktivni kapacitet stanica kvasca koje ekspimiraju humani protein Tau u uvjetima temperaturnog stresa. U radu je prikazana konstrukcija soja kvasca *ssd1Δ* koji ekspimirira gen za humani protein Tau pod kontrolom inducibilnog promotora, te ispitivanje utjecaja ekspresije proteina Tau na rast stanica kvasca pri različitim temperaturnim uvjetima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae, poznat i kao pekarski i pivski kvasac, u svijetu genetike i genetičkog inženjerstva jednostanični je predstavnik eukariota koji pripada carstvu gljiva (*Fungi*). Poput drugih organizama pripadnika carstva gljiva, ima čvrstu staničnu stijenku, relativno je nepokretan te posjeduje mitohondrije s jedinstvenim genomom. Zbog svoje jednostavne i izdržljive strukture, lako se uzgaja u jednostavnim hranjivim podlogama. *S. cerevisiae* može se razmnožavati vegetativno (jednostavnom diobom stanica) ili spolno (dvije haploidne stanice, koje posjeduju po jednu kopiju genoma, spajaju se i tvore diploidnu stanicu kvasca koja može ući u redukcijску diobu – mejozu). Za razliku od viših biljaka i životinja, kvasac se može neograničeno dijeliti u haploidnom i diploidnom obliku, a proces koji vodi iz jednog stanja u drugo po potrebi se može inducirati promjenom uvjeta rasta. Uz vrlo mali genom, pogodnim za istraživanja čini ga i vrlo kratko generacijsko vrijeme u trajanju od 90 minuta (Alberts i sur., 2008).

Cijeli je genom kvasca *S. cerevisiae* sekvencioniran 1996. godine, čime je postao prvi potpuno sekvencionirani eukariotski genom, a sastoji se od oko 12 milijuna parova baza koji sadrže gene raspoređene u 16 kromosoma, a kodiraju za više od 6000 različitih proteina. Kao modelni organizam, kvasac povezuje najbolje iz oba svijeta – svijeta bakterija i eukariota. Poput bakterija, kvasac se može uzgajati u velikim šaržama tekućeg medija uz kontinuirano protresanje, a može stvarati i vidljive kolonije na krutoj hranjivoj podlozi s agarom. Uz ostale eukariote, podilazi posttranslacijskim modifikacijama proteina važnim za njegovu funkciju i ekspresiju, a koje istovremeno osiguravaju pravilno sklapanje proteina. Takve ga funkcije čine pogodnim za znanstvena istraživanja različitih procesa karakterističnih za eukariotske stanice, što se može primijeniti na stanice drugih viših eukariota i ljudi (Griffiths i sur., 2008).

U prirodi se kvasac nalazi u toplim i vlažnim područjima u blizini izvora šećera. Haploidne stanice kvasca postoje u dva tipa parenja, **a** i **α**, a diploidne u **a/α**. Tip parenja kod kvasca određen je informacijom kodiranim lokusom MAT na III. kromosomu – ako je u tom lokusu sekvenca MATa, kvasac je **a** tipa parenja, a ako je to sekvenca MATα, kvasac je **α** tipa parenja (Tamarin, 1999).

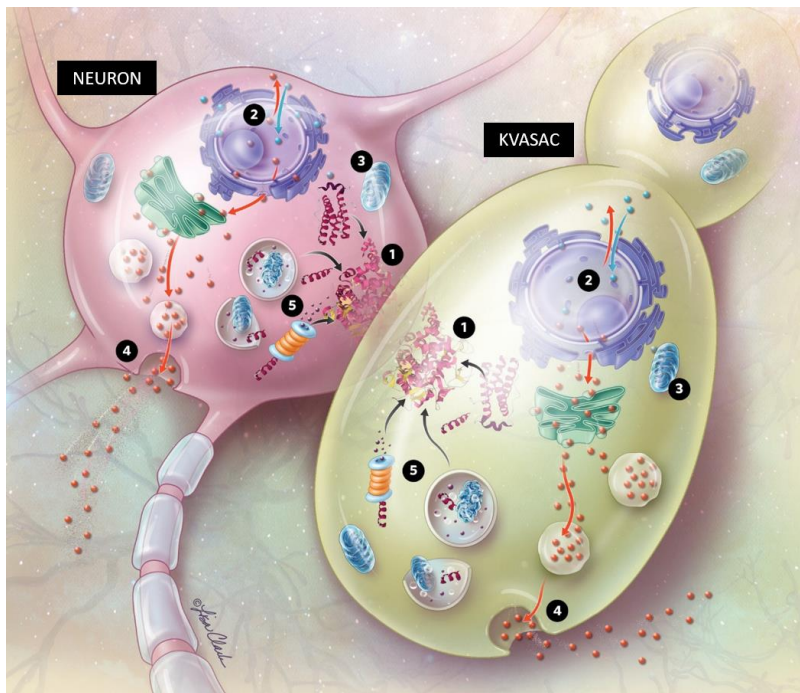
2.1.1. Korištenje kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u istraživanju neurodegenerativnih bolesti

Mnogi molekularni procesi i stanični mehanizmi kvasca *S. cerevisiae* slični su ostalim eukariotskim vrstama, uključujući i ljudske stanice. Budući da mnogi geni kvasca imaju funkcionalne ortologe i homologe u organizmima sisavaca, kvasac je učinkoviti model sustava za proučavanje mnogih staničnih procesa. Uz to, konstruirani su i „humanizirani“ sustavi kvasca za proučavanje proteina koji nemaju svog funkcionalnog ortologa u kvascu, a vezani su za neke bolesti; među takve proteine spada i ljudski protein Tau. Ukoliko se željeni gen ne nalazi u kvascu, modelira se heterolognom ekspresijom ljudskog gena u stanicama kvasca (Smith i Snyder, 2006). Takvi sustavi pokazuju veliki značaj kod otkrivanja molekularnih procesa povezanih s bolestima, a i za prepoznavanje novih medicinskih spojeva. Olakotna okolnost praćenja željenih mehanizama jesu i jednostavan put parenja haploidnih sojeva te sporulacija diploidnih, dok je molekularna genetika potpomognuta visokom učinkovitošću transformacije ovih stanica i prisutnošću učinkovitog puta homologne rekombinacije što čini te postupke jednostavnim za inserciju, deleciju ili uvođenje mutacije u bilo koje genomske sekvence na razini kromosoma. Stanice kvasca posebno su vrijedan sustav, budući da brzo rastu, jednostavne su za održavanje i mogu se jednostavno genetski modificirati (Collins, 2021).

Zajedničko obilježje neurodegenerativnih bolesti, kao što su Parkinsonova, Huntingtonova i Alzheimerova bolest, jest agregacija pojedinih proteina u stanicama mozga koja dovodi do odumiranja neurona. Agregacijom nepravilno smotanih proteina gubi se njihova normalna funkcija, dok sami agregati mogu djelovati toksično (tzv. „*toxic gain of function*“), no molekularni putevi i uzroci koji dovode do agregacije proteina i toksičnosti, te smanjenja funkcije i odumiranja neurona kod Alzheimerove i drugih bolesti, uvelike su nepoznati (Tenreiro i Outeiro, 2010). Pojedini mehanizmi i putevi koji leže u pozadini neurodegenerativnih bolesti (disfunkcija mitohondrija, poremećaji u regulaciji transkripcije itd.) očuvani su između kvašćevih i ljudskih stanica pa se neki molekularni događaji uključeni u patološke procese mogu proučavati u jednostavnim organizmima poput kvasca (Chai i Gitler, 2018; Gitler, 2008).

Glavna prednost korištenja kvasca je njegova manja složenost u usporedbi s modelima sisavaca. Iako su kvasci jednostanični organizmi, mnogi molekularni putevi uključeni u održavanje kontrole kvalitete proteina i sprečavanje nakupljanja proteinskih agregata evolucijski su

konzervirani (Foury, 1997; Bassett i sur., 1996). Međutim, prilikom interpretacije rezultata istraživanja, potrebno je uzeti u obzir da je kvasac jednostanični organizam jednostavne morfologije. Unatoč tome, ostaje vrlo vrijedan alat u istraživanju staničnih mehanizama Alzheimerove bolesti (slika 1).



Slika 1. Usporedba mehanizama u kvascu i neuronu (1: agregacija proteina, 2: nukleocitoplazmatski transport, 3: funkcija mitohondrija, 4: transportni vezikuli, 5: putevi kontrole kvalitete proteina (prema Collins, 2021)

Manji broj istraživanja posvećen je praćenju ekspresije ljudskog Tau proteina u kvascu, čiji se agregati u neuronima povezuju uz pojavu Alzheimerove bolesti. Proteinske kinaze Mds1 i Pho85 (ortolozi Tau kinaza sisavaca u neuronima, tj. GSK-3b i Cdk5, redom) moduliraju fosforilaciju i agregaciju Tau proteina u kvascu. Vežanje Tau na mikrotubule (MT) kvasca nije još u potpunosti razjašnjeno zbog razlika MT kvasca i sisavaca. Uz hiperfosforilaciju, kod kvasca, oksidativni stres i mitohondrijska disfunkcija također pojačavaju agregaciju Tau proteina neovisno o fosforilaciji (De Vos i sur., 2011). Ekspresijom humanog Tau proteina u kvascu divljeg tipa ne dolazi do značajnog učinka na rast stanica, no moguće je da ekspresija Tau proteina dovodi do toksičnosti u kombinaciji s drugim mutacijama ili u uvjetima stresa. Optimalna temperatura za uzgoj laboratorijskih sojeva kvasca divljeg tipa je 28 - 30 °C. Stanice toleriraju umjerene varijacije temperature, ali uzgoj pri visokim temperaturama može utjecati na stabilnost i strukturu proteina (Munna i sur., 2015). Temperaturni šok dovodi do pogrešnog smatanja i agregacije

mnogih proteina, uključujući i one zaslužne za temeljne biološke procese, kao što su translacija, transkripcija, replikacija DNA, itd. Izlaganje kvasca temperaturnom stresu aktivira ekspresiju niza gena koji kodiraju za proteine odgovora na temperaturni šok (Morano i sur., 2012).

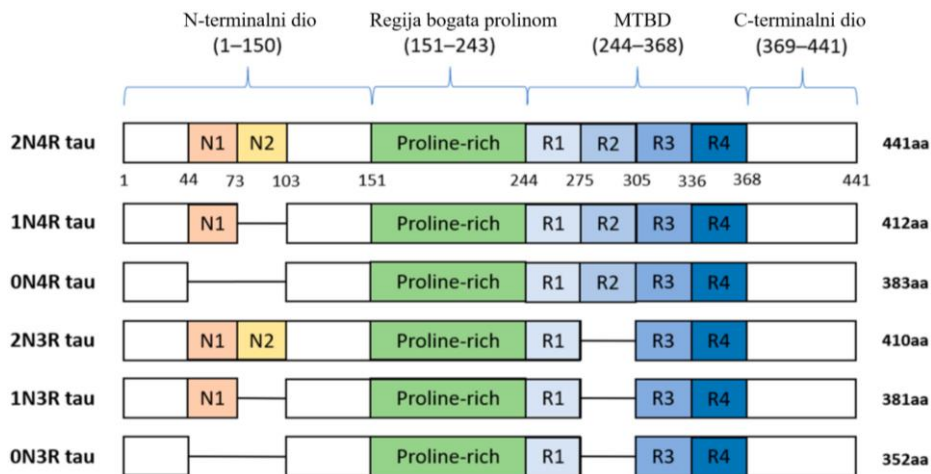
2.2. Tau protein

2.2.1. Biologija i patologija

Protein Tau kod čovjeka najviše je eksprimiran u neuronima središnjeg živčanog sustava, gdje se većinski nalazi u aksonima (Jameson i sur., 1980), a može se naći i u dendritima. Najvažnija uloga tog visoko topivog proteina promicanje je sastavljanja i stabilnosti mikrotubula (MT), zbog čega i nosi ime Tau (jedinica povezana s tubulinom, engl. Tubulin Associated Unit).

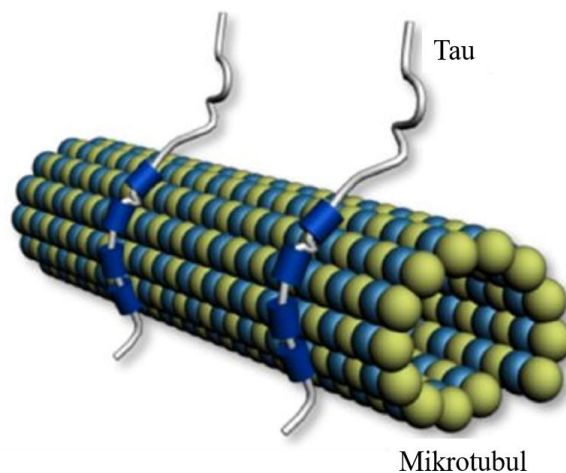
Tau može biti fosforiliran na više aminokiselinskih ostataka različitim protein kinazama, a fosforilacija uzrokuje promjenu konformacije Tau proteina i regulira njegovu biološku aktivnost. Afinitet vezanja Tau na MT posttranslacijski je također reguliran fosforilacijom (Gendron i Petrucelli, 2009), a prekomjerna fosforilacija negativno regulira njegovu sposobnost stimulacije sklapanja MT jer promjenom konformacije dolazi do njegove disocijacije s MT i posljedične nestabilnosti MT (Jameson i sur., 1980). Osim fosforilacije, proteoliza Tau je još jedna posttranslacijska modifikacija koja može utjecati na agregaciju proteina u pojavi tauopatija (Wang i sur., 2010).

Protein Tau u ljudskom se mozgu pojavljuje u šest izoformi izvedenih iz jednog gena alternativnim izrezivanjem (engl. alternative splicing) mRNA, a njihova je ključna razlika u prisutnosti jednog ili dva N-terminalna inserta, te u broju mikrotubul-vezujućih regija u C-terminalnom dijelu proteina (slika 2). Najizraženija ekspresija proteina Tau uočena je tijekom fetalnog razdoblja kad se eksprimira samo najkraća izoforma, dok su kod odraslog čovjeka prisutne sve izoforme proteina (Goedert i Jakes, 1990).



Slika 2. Izoforme Tau proteina (*prema* Goedert i Jakes, 1990)

Protein Tau može se podijeliti u dvije glavne funkcionalne domene (slika 3) – na C-kraju nalazi se bazična domena kojom se veže na MT i regulira njihovu polimerizaciju, a na N-kraju kisela projekcijska domena (Braak i Braak, 1991). Budući da mikrotubuli čine ključnu mrežu za transport molekula i organela (npr. mitohondriji) duž aksona, Tau može utjecati na aksonski transport i time na funkciju i održivost neurona.



Slika 3. Domene Tau proteina (*prema* Braak i Braak, 1991)

Tau proteini utječu i na polimerizaciju aktina te interakciju aktinskih filamenata s mikrotubulima (Wishik i sur., 1988), a stupaju u interakciju i s nekoliko proteina uključenih u prijenos signala. Oštećenje navedenih staničnih funkcija inicira sinaptičko oštećenje koje je opaženo kod mnogih tauopatija, te u konačnici vodi do neurodegeneracije i stanične smrti.

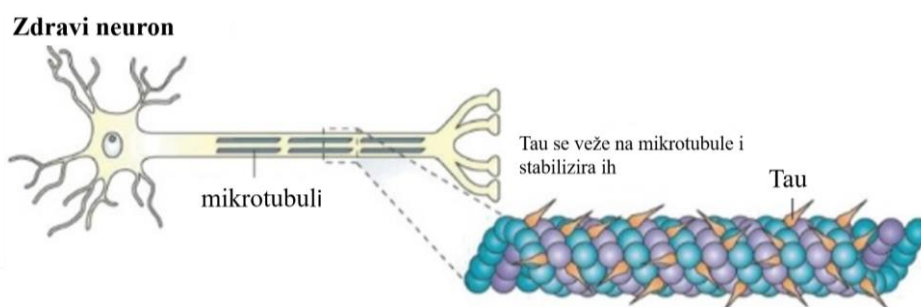
2.2.2. Alzheimerova bolest – najčešća tauopatija

Alzheimerova bolest (engl. Alzheimer's disease, AD) neurodegenerativna je bolest koju karakterizira nakupljanje agregata proteina Tau u stanicama zahvaćenih dijelova mozga te posljedično odumiranje neurona. To je progresivni neurodegenerativni poremećaj obilježen akutnim kognitivnim padom, a kao takav, jedan je od najčešćih neurodegenerativnih poremećaja u starijoj dobi. Za nastanak Alzheimerove bolesti najrizičniji je čimbenik starenje, no unatoč provedbi brojnih istraživanja, stvarni uzroci agregacije, toksičnosti i molekularnih mehanizama patologije proteina Tau i dalje su nerazjašnjeni. Sve bolesti obilježene Tau patologijom nazvane su tauopatije i upućuju na Tau kao glavni pozadinski čimbenik neurodegeneracije kod svih takvih bolesti (Bharadwaj i sur., 2010).

2.2.3. Uloga u zdravim neuronima

Cijeli je živčani sustav sastavljen od 6 milijardi međusobno povezanih živčanih stanica (neurona) koje su najzastupljenija vrsta stanica u mozgu. Glavni dijelovi neurona su dendriti (kratki produžeci koji do tijela stanice dovode živčane podražaje s osjetnih organa ili drugih neurona), tijelo stanice i akson (produžetak neurona koji prenosi živčane impulse s tijela stanice na druge neurone ili izvršne organe) (Kandel i sur., 2000).

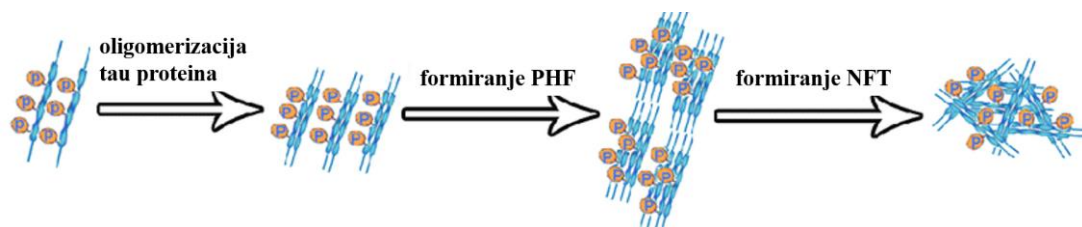
Među višestrukim funkcijama proteina Tau u zdravim moždanim stanicama, najvažnija uloga je spajanje, formiranje, stabilizacija i modulacija unutarnjih mikrotubula (slika 4). Uz to može utjecati na aksonski transport čime osigurava pravilnu funkciju i održivost neurona. Tau proteini igraju ulogu u polimerizaciji aktina, omogućuju interakciju aktinskih filamenata s mikrotubulima (Wischik i sur., 1988), a interakcijom s proteinima zaslužnim za sinaptički prijenos signala pospješuju njihov siguran transport.



Slika 4. Stabilizacija mikrotubula vezanjem Tau proteina (prema Brunden i sur., 2009)

2.2.4. Uloga u neurodegenerativnim bolestima (Alzheimerova bolest)

Dva karakteristična ključna obilježja Alzheimerove bolesti su senilni plakovi (SP), koji se sastoje od izvanstaničnih naslaga amiloidnih β ($A\beta$) peptida na neuronima, i unutarstanični neurofibrilarni čvorovi (engl. neurofibrillary tangles, NFT), formirani nakupljanjem abnormalnih sparenih spiralnih filamenata (engl. paired helical filaments, PHF) proteina Tau (slika 5). U toj se formi protein Tau pojavljuje u hiperfosforiliranom obliku (Šimić i sur., 2016).



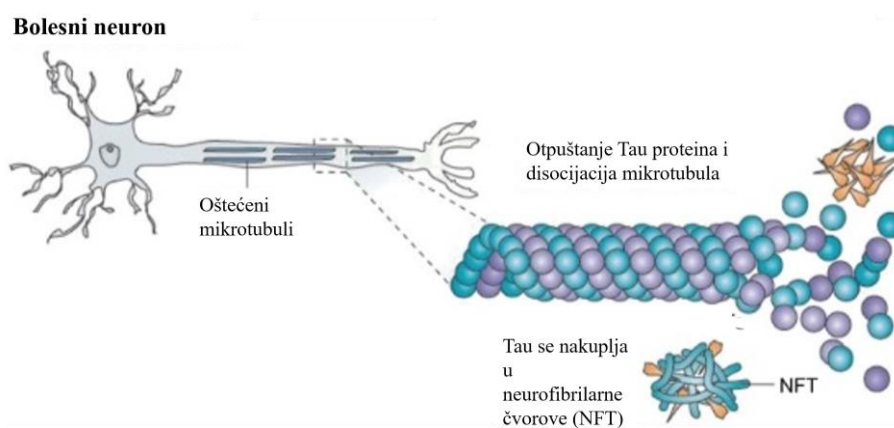
Slika 5. Postupak formiranja neurofibrilarnih čvorova (prema Šimić i sur., 2016)

U mozgu oboljelih dolazi i do opsežnog gubitka neuronskih stanica u specifičnim regijama mozga povezanim s pamćenjem, a još su neke od bolesti mozga povezane s abnormalnim Tau proteinom, uz Alzheimerovu bolest, kronična traumatska encefalopatija, Pickova bolest, frontotemporalna demencija s parkinsonizmom-17 (FTDP-17), progresivna supranuklearna paraliza (PSP) i kortikobazalna degeneracija (CBD) (Ellison, 2021).

Mnoga istraživanja AD ukazuju na blisku vezu između $A\beta$ i Tau patologije, pri čemu nakupljanje $A\beta$ predstavlja događaj koji pokreće Tau patologiju i neurodegeneraciju (Oddo i sur., 2004; Hardy i Selkoe, 2002). Iako nakupljanje $A\beta$ može biti glavni okidač u nastanku AD, Tau predstavlja ključni faktor neurodegeneracije, a nepoznanica i dalje ostaju pojava toksičnosti proteina Tau i molekularni mehanizmi koji dovode do neurodegeneracije (Ellison, 2021).

Neurofibrilarni čvorovi (NFT) uobičajena su značajka u nekoliko neurodegenerativnih poremećaja karakteriziranih demencijom. U AD mozgu, unutarstanični NFT sastoji se od proteina Tau okupljenog u sparene spiralne filamente, upletene vrpce ili ravne filamente. Protein Tau povezan je s mikrotubulima koje stabilizira i regulira transport aksona u mozgu. Fosforilacija proteina Tau regulira njegovo vezanje na mikrotubule (Buée i sur., 2000; Goedert, 1990), a abnormalna fosforilacija pridonosi patogenezi bolesti (Gong i sur., 1995; Braak i Braak, 1991). Hiperfosforilacija je ključni korak koji vodi do stvaranja topivih i netopivih Tau filamenata i neurofibrilarnih čvorova u obliku kojih stvara agregate u stanici (Braak i Braak, 1994).

Tau protein je u samostalnom ili oligomernom obliku topiv protein, ali se stvaranjem PHF-a prevodi u netopljive agregate proteina. Progresija demencije i smanjenja kognitivnih sposobnosti u AD-u proporcionalno rastu s povećanjem nakupljanja agregata hiperfosforiliranih Tau proteina, dok je nakupljanje A β u mozgu osobe s AD-om uglavnom dovršeno u ranoj kliničkoj fazi. Protein Tau nakon određenih posttranslacijskih modifikacija nije više sposoban za obavljanje svojih uobičajenih funkcija i poprima karakteristike koje su potencijalno vrlo štetne i toksične za stanicu. Odvajanje Tau proteina od mikrotubula dovodi do disocijacije mikrotubula (slika 6), stvaranja agregata Tau proteina i postupnog odumiranja živčanih stanica. Abnormalna fosforilacija, proteoliza i agregacija proteina Tau u fazi neurofibrilarne degeneracije neuropatološki je dokumentirana kao rani i ključni događaj u patogenezi AD (Šimić i sur., 2016). Abnormalno hiperfosforilirani protein nalazi se i u nefibriliranom obliku, u kojemu ne stupa u interakciju s MT, već mijenja konformaciju normalnih Tau proteina uzrokujući njihovo odvajanje od mikrotubula (Alonso i sur., 1994) (slika 6).



Slika 6. Oligomerizacija Tau proteina, otpuštanje s mikrotubula i nakupljanje u neurofibrilarne čvorove, disocijacija mikrotubula (prema Brunden i sur., 2009)

Uz pojavu agregata hiperfosforiliranih Tau proteina, oksidativni stres i disfunkcija mitohondrija također su obilježja mnogih neurodegenerativnih bolesti (De Vos, 2011). Iako, većina terapijskih strategija protiv neurodegeneracije temeljenih na Tau usredotočena je na moduliranje njegove fosforilacije, s obzirom na to da su vrste Tau proteina prisutne u NFT kod AD hiperfosforilirane. Nedavno otkriće da se Tau također modificira acetilacijom zahtijeva dodatna istraživanja kako bi se dobio bolji uvid u fiziološke i patološke posljedice Tau acetilacije (Kingwell, 2015).

Zašto su za početak bolesti potrebna desetljeća prije nego što se pojave simptomi ostaje nejasno, ali trenutni rezultati ukazuju na smanjenu sposobnost uklanjanja nepravilno smotanih, oligomeriziranih i/ili agregiranih Tau proteina čija se količina povećava s godinama. Kako su se mnogi pokušaji otkrivanja lijekova temeljenih na amiloidnim hipotezama pokazali neuspješnim, a zbog napretka u razumijevanju uloge Tau proteina patogenezi AD (Šimić i sur., 2009.), može se zaključiti da Tau protein postaje ključna terapijska meta za budućnost.

2.3. Ssd1 protein u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*

Ssd1 protein u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* je RNA vezujući protein, a veže se na mRNA (glasnička RNA) te stupa u interakciju s 5' i 3' netranslatiranim regijama čime reprimira translaciju (Bayne i sur., 2022). Uz to regulira i lokalizaciju mRNA unutar stanice, provođenje translacije i organizaciju stanične stijenke. Sam protein lokalizira se na P-tjelešca, citoplazmatske granule, stanični pup i vrat pupa, a pritom je uključen i u polarni rast stanice, autodiploidizaciju te u cjelovitost stanične stijenke vezanjem na mRNA koje kodiraju za proteine stanične stijenke. Inhibiran je fosforilacijom kinazom Cbk1 pri regulaciji translacije kod pupanja te kod lokalizacije specifičnih mRNA u stanici (Jansen i sur., 2009).

Gen *SSD1* neesencijalni je gen u kvascu, premda je „null mutant“ (kvasac kojemu nedostaje gen *SSD1*) osjetljiv na povišenu temperaturu i pokazuje manju stečenu termotoleranciju. Delecija tog gena uzrokuje i defekte stanične stijenke, smanjuje anaerobni rast i povećava osjetljivost na više različitih lijekova poput azola, rapamicina i kamptotecina (Kurischko i sur., 2011; Jansen i sur., 2009; Jorgensen i sur., 2002; Kaeberlein i Guarente, 2002). Protein sadrži dvije *cold shock* domene (CSD1 i CSD2), RNA veznu domenu (engl. RNA-Binding domain, RNB) i S1 domenu na C-terminalnom kraju proteina (slika 7) (Bonneau i sur., 2009).



Slika 7. Struktura Ssd1 proteina – *cold shock* domene (CSD1 i CSD2), RNA vezna domena (engl. RNA-Binding domain, RNB) i S1 domena na C-terminalnom kraju proteina (prema Bayne i sur., 2022.)

2.3.1. Uloga proteina Ssd1 u agregaciji proteina

Stanice su izložene pogrešnom smatanju polipeptidnih lanaca i agregaciji proteina uzrokovanih vanjskim čimbenicima poput visoke temperature, oksidativnog stresa i drugih stresnih uvjeta, ili pak čimbenicima unutar stanice kao što su starenje, mutacija i smanjena dostupnost molekularnih pratioca. Toplinski šok, uz ostale stresne promjene, dovodi do pogrešnog smatanja i agregacije proteina, uključujući i one zaslužne za temeljne biološke procese (translacija, transkripcija, replikacija DNA, itd.). Agregacija proteina povezana je s odumiranjem neurona i pojavom mnogih neurodegenerativnih bolesti (Mir i sur., 2009).

Mehanizmi koji kontroliraju agregaciju i disagregaciju proteina igraju važnu ulogu u preživljavanju stanica nakon njihovog izlaganja stresnim uvjetima. Jedan od mehanizama oporavka stanica od temperaturnog stresa uključuje uklanjanje proteinskih agregata. U kvascu ključnu ulogu u uklanjanju agregata nakon temperaturnog stresa igra protein disagregaza Hsp104 te protein Ssd1 koji pospješuje djelovanje disagregaze Hsp104 tako što omogućuje njegovu heksamerizaciju te vezanje za agregate (Mir i sur., 2009).

2.4. Western blot analiza

Western blot molekularna je tehnika koja se koristi za identifikaciju, kvantifikaciju i određivanje veličine određenog proteina ili odnosa količine proteina koji se nalaze u kompleksnoj proteinskoj smjesi. Prisutnost određenog proteina jasno je prikazana razdvajanjem prema veličini i vezanjem specifičnog protutijela. Koristi se u mnogim područjima znanosti kao što su kemija, biokemija, imunogenetika, molekularna biologija i dr., a služi za detekciju i analizu specifičnih proteina od interesa u uzorcima tkiva ili ekstrakata (Towbin i Staehlin, 1979). Tri glavna koraka metode su razdvajanje proteina po veličini SDS elektroforezom, prijenos proteina iz gela na membranu korištenjem električne struje i obilježavanje željenog proteina odgovarajućim antitijelom koje je moguće vizualizirati (Mahmood i Yang, 2012). Deterdžent SDS (engl. Sodium Dodecyl Sulfate) služi za denaturaciju proteina prije razdvajanja na gelu, a proteinima daje neto negativni naboj zbog čega je proteine moguće razdvojiti isključivo na temelju razlike u njihovoj molekularnoj masi (Towbin i Staehlin, 1979).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i enzimi

U radu su korišteni sljedeći reagensi (proizvođač):

Agar, LB smjesa, pepton, kvasčev ekstrakt, glukoza, aminokiseline, antibiotik karbenicilin: Formedium™ (Norfolk, Ujedinjeno Kraljevstvo)

Agaroz: Promega (Madison, Wisconsin, SAD)

DNA testisa lososa (Deoxyribonucleic acid, single stranded from salmon testes), polietilenglikol (PEG), progesteron: Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, Njemačka)

Proteinski marker Precision Plus Protein™ Dual Color Standard: Bio-Rad Laboratories (Hercules, Kalifornija, SAD)

Tau-5 – mišje monoklonalno protutijelo Invitrogen MA5-12808: Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)

Anti-mouse-HRP sekundarno protutijelo: Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, SAD)

Gel red boja (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain): Biotium (San Francisco, Kalifornija, SAD)

Supstrat za kemiluminiscenciju (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate): Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, SAD)

Sve ostale kemikalije krutog agregatnog stanja korištene u eksperimentalnom radu nabavljene su od proizvođača Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska), kao i kiseline i alkoholi.

3.1.2. Otopine

0,2 M NaOH

Litijev acetat

3.1.3. Soj kvasca, plazmidi, oligonukleotidi

3.1.3.1. Sojevi bakterija i kvasca

Soj bakterije *Escherichia coli* DH5α.

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

SOJ	GENOTIP	IZVOR
Y00000 (BY4741)	izogeničan divljem tipu soja S288C: MATa; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i>	Euroscarf (Oberursel, Njemačka)
Y03652 (<i>ssd1Δ</i>)	BY4741; MATa; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YDR293c::kanMX4</i>	Euroscarf (Oberursel, Njemačka)

3.1.3.2. Plazmidi

Korišteni plazmidi uzeti su iz zbirke dr. sc. Mirte Boban i korišteni kao polazni plazmidni vektori na početku kloniranja.

pMB275 integrativni je plazmid koji sadrži gen PTEF1-ZifDBD-progesteron-induced TA-TCYC1.

pMB152 centomerni je plazmid koji sadrži gen za uracil i višestruko mjesto za kloniranje kloniranje (engl. multiple cloning site, MCS).

pKZ45 centomerni je plazmid koji sadrži otvoreni okvir čitanja Tau-superfolderGFP pod kontrolom promotora pZ (u nastavku pZ-Tau).

3.1.3.3. Oligonukleotidi

Oligonukleotidi (početnice) korišteni u radu za provođenje lančane reakcije polimerazom su prMB764 (slijed nukleotida: TTCGAGCTTGGCGTAATC) i prMB783 (slijed nukleotida: GAATACCACTTGCCACCTATC).

3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Za uzgoj sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* korištene su YPD (engl. Yeast Extract Peptone Dextrose) hranjive podloge sastava: 2 % agar, 2 % pepton, 2 % glukoza, 1 % kvašćev ekstrakt. Korištene su i CSD-Ura podloge koje se pripremaju dodatkom 3,4 g YNB-aa-NH₄ i 10 g (NH₄)₂SO₄ u 700 ml ddH₂O, što je prva otopina, te 1,08 g CSM-6 (engl. Complete Supplement Mixture – kompletna smjesa dodataka za rast stanica kvasca, koja ne sadrži aminokiseline adenin, histidin, leucin, lizin, triptofan, uracil) u 300 ml ddH₂O, što je druga otopina. Druga se otopina zagrijava u mikrovalnoj pećnici do 90 °C, potom se ohladi i pomiješa s prvom. Dodatkom kiseline pH se prilagodi na vrijednost 5,6-5,8, smjesa od 1 l zatim se razdjeli po 500 ml u dvije boce od 1 l. U svaku bocu dodaje se po 20 g agara te se takve podloge autoklaviraju. Nakon toga u obje se boce dodaje 10 ml 100X otopine svih aminokiselina, osim uracila, potom 50 ml 40 % glukoze i do 1 l sterilne ddH₂O.

3.1.5. Hranjive podloge za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

Za uzgoj stanica bakterije *E. coli* korištene su kruta i tekuća **LB** (Luria-Bertani) podloga koja se priprema dodatkom 15 g LB smjese, 10 g NaCl u 1 l H₂O. Kruta podloga priprema se dodatkom 15 g agara u LB tekući medij. Pripremljene podloge steriliziraju se u autoklavu te se nakon sterilizacije dodaje antibiotik karbenicilin u koncentraciji 0,1 mg/ml.

3.2. Metode

3.2.1. Transformacija kvasca

Stanice kvasca *ssd1Δ* uzgojene su preko noći u 1x YPD podlozi, potom su razrijeđene u svježoj podlozi (1/100 – 50 μl u 5 ml) do OD₆₀₀ = 0,15. Stanice kvasca uzgajaju se do logaritamske faze rasta (OD₆₀₀ = 1,0). Za svaku transformaciju divljeg soja kvasca potrebno je 5 ml svježe kulture. Plazmidna DNA testisa lososa pritom je inkubirana 10 minuta na 99 °C u termobloku nakon čega je prenesena u led kako bi ostala u jednolančanom obliku. Stanice kvasca prenesene su u Falcon epruvetu od 15 ml te su centrifugirane 5'/4000 rpm. Talog stanica zatim je ispran istim volumenom 0,1 M otopine litijevog acetata, resuspendiran je i centrifugiran istim postupkom nakon čega je talog resuspendiran u 1 ml 0,1 M otopine litijevog acetata. 1 ml takve suspenzije prenesen je u sterilnu Eppendorf epruvetu od 1,5 ml i centrifugiran 1'/8000 rpm. Talog je resuspendiran u 0,1 M otopini litijevog acetata tako da je konačni volumen 50 μl. Na talog stanica dodano je, redom, 300 μl 39 %-tnog PEG-a 4000 u 0,1 M otopini litijevog acetata, 10 μl plazmidne denaturirane DNA testisa lososa iz leda te 20 μl transformirajuće DNA. Pripremljena smjesa vorteksirana je 1' te inkubirana 40'/42 °C, potom je centrifugirana 1 min/8000 rpm. Talog stanica resuspendiran je u 120 μl sterilne deionizirane vode te nacijepljen na selektivne hranjive podloge pomoću staklenih kuglica. Podloge su potom inkubirane preko noći na 30 °C.

3.2.2. Izolacija genomske DNA iz stanica kvasca

Izolacija genomske DNA iz stanica kvasca provedena je pomoću kita YeaStar Genomic DNA Kit™ (Zymo Research, Irvine, California) prema uputama proizvođača. Protokol je proveden s 1,5 ml suspenzije stanica kvasca uzgojenih preko noći na 30 °C na selektivnoj hranjivoj podlozi.

3.2.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) metoda je za *in vitro* umnožavanje specifičnih sekvencija DNA, a ovdje je korištena za provjeru integracije transformirane DNA u ispravan genski lokus. U ovom radu korišten je soj *ssd1Δ* (Y03652, Euroscarf) i početnice opisane u poglavlju 3.1.3.3. Uspješnost provedene metode i umnažanja provjerena je gel elektroforezom DNA čiji su rezultati prikazani u poglavlju 4.1.

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom korišten je protokol tvrtke New England Biolabs te njihov kit OneTaq 2X Master Mix with Standard Buffer. U sterilnu Eppendorf epruvetu za PCR dodane su komponente reakcijske smjese u navedenim volumenima (tablica 2).

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese

KOMPONENTA	VOLUMEN (μl)
10 μM početnica fwd	0,5
10 μM početnica rev	0,5
DNA kalup	0,5
OneTaq 2X Master Mix sa standardnim puferom	12,5
sterilna H ₂ O bez nukleaza	11

Nakon kratkog centrifugiranja reakcijske smjese, Eppendorf epruvete za PCR stavljene su u uređaj za PCR gdje je proveden određeni program (tablica 3).

Tablica 3. Program za PCR

1. početna denaturacija	94 °C	30 s
2. 30 ciklusa	94 °C	30 s
	56 °C	30 s
	68 °C	30 s/kb
3. završna elongacija	68 °C	5 min
4. zadržavanje	4-10 °C	∞

3.2.4. Ligacija

Kod prvog koraka konstrukcije željenog plazmida – ligacije, korišten je protokol s T4 DNA ligazom tvrtke New England Biolabs. Za konstrukciju potrebnog plazmida koristi se plazmidni vektor pMB152 i insert pKZ45 prethodno porezani restriktivnim enzimima KpnI i SpeI, a vektori su opisani u poglavlju 3.1.3.2. Molarni omjer koncentracija inserta i vektora pritom je 3:1, a potrebni volumeni izračunati su pomoću NEBioCalculatorsa s web stranica tvrtke New England Biolabs za određeni kit. Reakcijska smjesa (tablica 4) priprema se u Eppendorf epruveti u ledu, a T4 DNA ligaza se u smjesu dodaje posljednja.

Tablica 4. Reakcijska smjesa za ligaciju

KOMPONENTA	VOLUMEN
T4 DNA ligaza pufer (10X)	2 µl
DNA vektor (4 kb)	2 µl
DNA insert (1 kb)	6 µl
Sterilna H ₂ O	9 µl
T4 DNA ligaza	1 µl

Reakcijska smjesa lagano je promiješana pipetiranjem, a obzirom da se radi o povezivanju isturenih (ili ljepljivih) krajeva dvolančane DNA, smjesa je inkubirana na sobnoj temperaturi 2 sata nakon čega je enzim T4 DNA ligaza inaktiviran na temperaturi od 65 °C 10 minuta. Smjesa je potom ostavljena u ledu nakon čega se njome transformiraju kompetentne stanice bakterije *Escherichia coli* što je opisano u odjeljku 3.2.5.

3.2.5. Transformacija u bakteriji

50 µl suspenzije kompetentnih stanice bakterije *E. coli* soja DH5α nakon čuvanja na -80 °C stavljeno je u led. U tu suspenziju doda se 10 µl DNA, tj. plazmida – produkta ligacije iz poglavlja 3.2.4. Dobivena smjesa promiješa se laganim udaranjem Eppendorf epruvete u kojoj se provodi reakcija transformacije, nakon čega se inkubira 20 minuta u ledu. Smjesa se potom prebacuje u tubicu od 13 ml u kojoj je 50 sekundi izložena toplinskom šoku („heat shock“) na 42 °C, nakon čega se 2 minute inkubira u ledu. Suspenziji se potom doda 900 µl termostatirane tekuće LB podloge, nakon čega se smjesa inkubira jedan sat u tresilici na 37 °C. Pomoću sterilnih

staklenih kuglica po 200 μ l transformiranih stanica nacijepi se na krute selektivne LB podloge s antibiotikom Carbenicilinom koji služi kao selekcijski marker te se inkubira preko noći na 37 °C.

3.2.6. Izolacija plazmidne DNA iz stanica bakterije *Escherichia coli*

Iz 4 ml suspenzije stanica *E. coli* uzgojenih preko noći na 37 °C u tekućoj selektivnoj LB podlozi s Carbenicilinom izoliran je plazmid pomoću kita NucleoSpin® Plasmid (NoLid) (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) prema uputama proizvođača.

3.2.7. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima i agarozna gel elektroforeza

Provjera konstruiranog plazmida izvršena je cijepanjem restrikcijskim enzimima KpnI-HF i SpeI-HF prema uputama proizvođača tvrtke New England Biolabs. Pripremljena je reakcijska smjesa inkubirana 10 minuta na 37 °C, nakon čega je provedena DNA elektroforeza uzoraka u 1 %-tnom agaroznom gelu i vizualizacija na UV transiluminatoru. U 50 ml TAE pufera otopljeno je 0,5 g agaroze, to je zagrijano u mikrovalnoj pećnici dok se agarozna nije u potpunosti otopila. Kad se gel ohladio na otprilike 70 °C, dodano je 3,5 μ l boje Gel Red te je gel izliven u kadicu za elektroforezu gdje se polimerizira. Nakon polimerizacije uzorci su nanoseni u jažice te je provedena elektroforeza u 1x TAE puferu pri naponu 90 V/60 min. Nakon elektroforeze gel je vizualiziran UV svjetlom u UVIDOC HD6-TOUCH.PLUS uređaju (UVITEC, Cambridge).

3.2.8. Indukcija i provjera ekspresije gena s inducibilnog promotora pZ – nacjepljivanje u tekući medij s 10 μ M progesteronom i izolacija ukupnih proteina

Stanice kvasca uzgojene su do eksponencijalne faze rasta u tekućoj CSD-Ura podlozi do $OD_{600} = 0,8$, a ekspresija s promotora pZ inducirana je dodatkom 10 μ M progesterona. Stanice su inkubirane 1 h na 30 °C uz miješanje te skupljene centrifugiranjem za izolaciju proteina. Centrifugirano je 1,5 ml stanica, talog stanica resuspendiran je u 100 μ l deionizirane vode, potom je dodano 100 μ l 0,2 M NaOH nakon čega je dobivena suspenzija inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ponovnog centrifugiranja 5'/3000 rpm, talog stanica resuspendiran je u 50 μ l

SDS pufera za uzorke (0,06 M Tris-HCl pH 6,8, 5 % glicerol, 2 % SDS, 4 % β -merkaptoetanol, 0,0025 % bromfenol plavo), uzorci su inkubirani na temperaturi vrenja u termobloku 3 minute i potom ponovno centrifugirani 5'/3000 rpm. Supernatant dobivenih uzoraka sakupljen je u nove Eppendorf epruvete u kojima je čuvan na -20 °C do provođenja SDS elektroforeze i western blot analize.

3.2.9. SDS elektroforeza

15 μ l uzoraka nanese se u jažice prethodno pripremljenog poliakrilamidnog gela za što su korišteni Stain-free gelovi (TGX Stain-free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 10 %; BioRad Laboratories, SAD) izliveni u kazetama prema receptu. Poliakrilamidni gel sastojao se od gela za sabijanje (4 % akrilamid) i gela za razdvajanje (10 % akrilamid). SDS elektroforeza provedena je pri 120 V u BioRad mini protean tetra cell kadicama za proteinsku elektroforezu u puferu za SDS elektroforezu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1 % natrij dodecil sulfat, dH₂O) u trajanju od oko 1 sat i 10 min. Uz uzorke dodan je i proteinski marker Precision Plus Protein™ Dual Color Standard u jednu jažicu. Nakon SDS-PAGE elektroforeze, gel je ispran u running puferu (10X Tris/Glycine/SDS; BioRad Laboratories, SAD) te je provedena aktivacija gela pod UV svjetlom pomoću uređaja ChemiDoc (BioRad) i programa ImageLab.

3.2.10. Western blot

Nakon provedene SDS-PAGE elektroforeze, proteini su iz gela preneseni na PVDF (polyvinylidene difluoride) membranu za čiju je aktivaciju korišten metanol, koji se pritom nalazi i u transfer puferu (10X Tris/Glycine pufer za western blot, BioRad). Direktnim kontaktom poliakrilamidnog gela i membrane, pod utjecajem električnog polja, proteini prelaze s gela na površinu membrane gdje se čvrsto vežu. PVDF membrana inkubirana je u metanolu jednu minutu, nakon čega je isprana u dH₂O do skidanja „masnog“ sloja, potom je prebačena u transfer pufer u kojem je inkubirana do početka transfera s gela na membranu (elektrotransfera). Za transfer je korišten Bio-Rad sustav, a prijenos proteina s gela na membranu proveden je prema uputama proizvođača na konstantnoj struji od 60 V/1 h u puferu za prenošenje proteina s gela na membranu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20 % (v/v) metanol). Nakon prijenosa membrana je prebačena u destiliranu vodu i slikana pod UV svjetlom pomoću programa ImageLab. Membrana

je potom inkubirana u puferu za blokiranje 1 h uz treskanje. Nakon toga, pufer za blokiranje zamijenjen je puferom za blot s primarnim protutijelom koje prepoznaje protein od interesa – anti-Tau5 proizvedenom u mišu (1°Ab). U primarnom je protutijelu membrana inkubirana preko noći na 4° C uz rotaciju, a potom je tri puta isprana puferom za blot. Nakon njezina ispiranja, membrana je inkubirana u PBS puferu s mišjim sekundarnim protutijelom s konjugiranom peroksidazom iz hrena te je ponovno ispirana tri puta. Nakon inkubacije u supstratu za kemiluminiscenciju membrana je vizualizirana pomoću skenera ChemiDoc (BioRad).

3.2.11. Test rasta – Utjecaj ekspresije Tau proteina na vijabilnost stanica mutanata *ssd1*

Test rasta (engl. plate assay) je semikvantitativna metoda za određivanje vijabilnosti stanica. U radu je ta metoda korištena za usporedbu rasta transformiranih stanica kvasca mutanata *ssd1Δ* s genom za protein Tau te onih s praznim plazmidom na podlozi s progesteronom pri temperaturi od 30 °C i 34 °C.

Za provođenje testa rasta stanice kvasca uzgojene su na 30 °C do logaritamske faze rasta u tekućoj CSD-Ura hranjivoj podlozi. Kulturi je spektrofotometrijski određena gustoća kulture (OD₆₀₀/ml) koja je zatim prilagođena na 1 OD₆₀₀/ml. Ukoliko je prvotna gustoća veća od 1 OD₆₀₀/ml, suspenziju kvasca potrebno je razrijediti sterilnom vodom, a ukoliko je manja od 1 OD₆₀₀/ml, suspenziju je potrebno centrifugirati pa talog resuspendirati u sterilnoj vodi do postizanja željene gustoće. Pripremljena su 4 decimalna razrjeđenja sukcesivnim miješanjem 100 µl suspenzije stanica kvasca s 900 µl sterilne vode. 10 µl svakog decimalnog razrjeđenja nakapano je na osušenu krutu hranjivu podlogu s ili bez 10 µM progesterona, a potom su podloge inkubirane na 30 °C. Test rasta za provjeru utjecaja ekspresije Tau proteina na vijabilnost stanica mutanata *ssd1Δ* pri povišenoj temperaturi proveden je istim postupkom, a razlika u odrađivanju metode je u zadnjem koraku jer su u ovom slučaju podloge inkubirane na 34 °C.

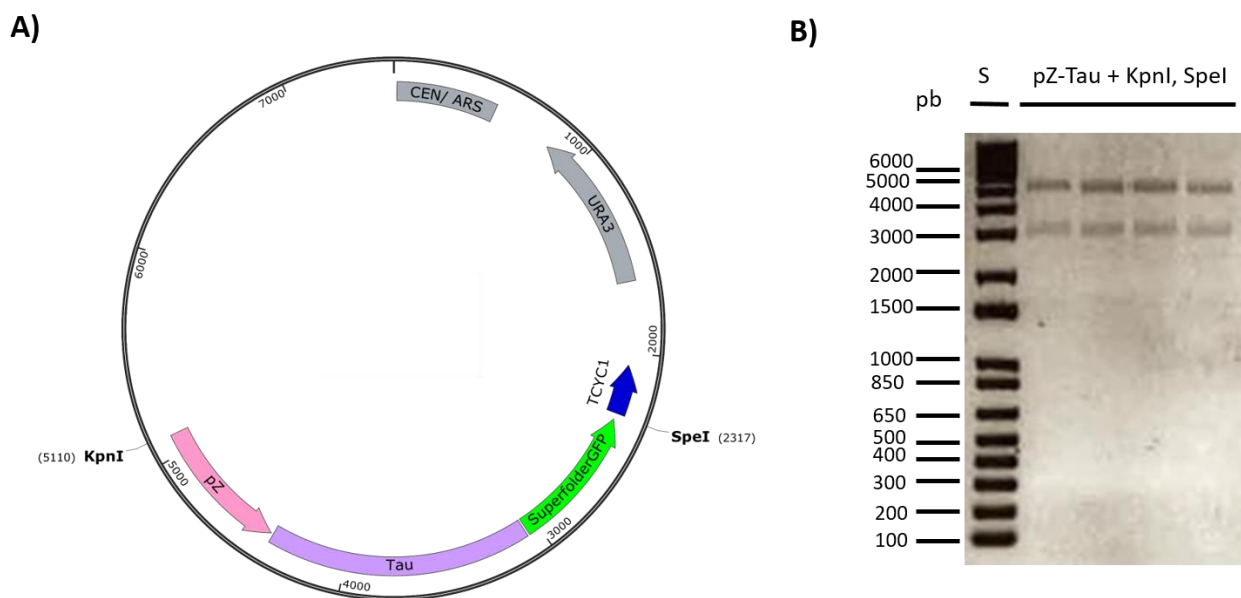
4. REZULTATI I RASPRAVA

U svrhu boljeg razumijevanja molekularnih puteva koji dovode do toksičnosti proteina Tau i odumiranja neurona, cilj ovog rada bio je ispitati je li Tau protein čovjeka toksičan kada se eksprimira u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* kojemu nedostaje Ssd1, protein važan za disagregaciju proteina tijekom odgovora stanice na temperaturni stres. Toksičnost proteina Tau ispitana je mjerenjem utjecaja inducirane ekspresije proteina Tau na vijabilnost stanica. Specifični ciljevi ovog rada bili su (1) uspostava inducirane ekspresije humanog proteina Tau u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* te (2) ispitivanje utjecaja proteina Tau na vijabilnost i reproduktivni kapacitet stanica kvasca s delecijom gena *SSD1*.

4.1. Konstrukcija plazmida za inducibilnu ekspresiju humanog proteina Tau u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*

U svrhu uspostave inducibilne ekspresije humanog proteina Tau u kvascu, odabran je sistem u kojemu se gen za protein Tau nalazi na centromernom plazmidu, pod kontrolom inducibilnog Z-promotora (pZ-Tau) kojega je moguće aktivirati dodatkom progesterona u stanični medij.

Plazmid pZ-Tau (slika 8A) konstruiran je tehnikom rekombinante DNA. U plazmid pZ-Tau u ovom je radu ugrađen gen za humani protein Tau fuzioniran s brzo smatajućim zelenim fluorescentnim proteinom (engl. superfolder green fluorescent protein, sfGFP) ligacijom isturenih komplementarnih jednolančanih krajeva nastalih cijepanjem istim restriktivnim enzimima kojima je pocijepan plazmid, i sam insert. Ligacija se prilikom konstrukcije plazmida odvija pomoću enzima DNA-ligaze koji katalizira stvaranje fosfodieterske veze između 3'-hidroksilne skupine na jednome kraju DNA i 5'-fosfatne skupine na kraju druge DNA za što je potreban izvor energije. Pri izradi rada korištena je T4 DNA ligaza koja potječe iz bakteriofaga T4. Provjera uspješnosti ligacije provedena je cijepanjem DNA restriktivnim enzimima, nakon čega su fragmenti razdvojeni agaroznom gel elektroforezom (slika 8B). Dobiveni produkti bili su očekivanih veličina (slika 8A i 8B), što je pokazalo da je plazmid pZ-Tau uspješno konstruiran.



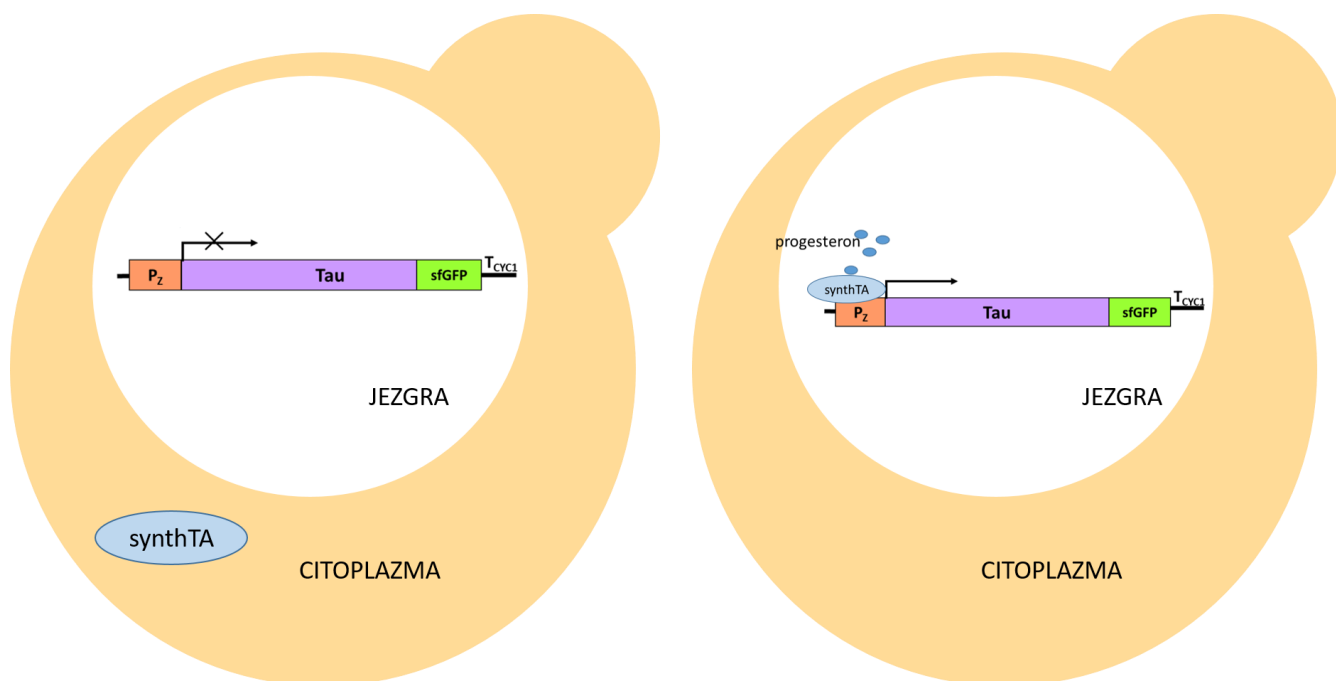
Slika 8. A) Mapa plazmida pZ-Tau s prikazanim restrikcijskim mjestima KpnI i SpeI.

B) Agarozni gel nakon provjere uspješnosti ligacije plazmida pZ-Tau s prikazanim jažicama: S: standardi, 1. klon pZ-Tau a, 2. klon pZ-Tau b, 3. klon pZ-Tau c, 4. klon pZ-Tau d.

Provedena je restrikcijska analiza za koju su korišteni enzimi SpeI i KpnI, a agaroznom gel elektroforezom su razdvojeni i vizualizirani fragmenti određenih veličina. (vlastita fotografija)

4.2. Konstrukcija soja kvasca *ssd1Δ* koji eksprimira synthTA (synthTA-Zif268 DBD)

Za aktivaciju Z-promotora koji kontrolira ekspresiju proteina Tau s plazmida potreban je sintetski transkripcijski faktor synthTA, fuzijski protein koji sadrži tri domene: (a) DNA-vezujuću domenu za Z promotor temeljenu na transkripcijskom faktoru miša Zif268, (b) aktivacijsku domenu virusnog proteina VP16 i (c) domenu progesteronskog receptora čovjeka koja veže progesteron i kontrolira lokalizaciju fuzijskog proteina u citoplazmi, odnosno staničnoj jezgri (Aranda-Díaz i sur., 2017). Prikazan je utjecaj vezanja progesterona na lokalizaciju transkripcijskog faktora synthTA u citoplazmi te indukcija ekspresije vezanjem synthTA na Z promotor (slika 9). Stoga je cilj bio konstruirati soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae ssd1Δ* koji sadrži gen za sintetski transkripcijski aktivator (synthTA) ugrađen u genomsku DNA. U tu svrhu, transformacijom kvasca u genom soja *ssd1Δ* ugrađen je integracijski plazmid koji eksprimira synthTA pod kontrolom konstitutivnog promotora gena *TEF1* (pMB275), te koji kao selekcijski marker sadrži gen *HIS3* potreban za rast kvasca na podlozi bez histidina.

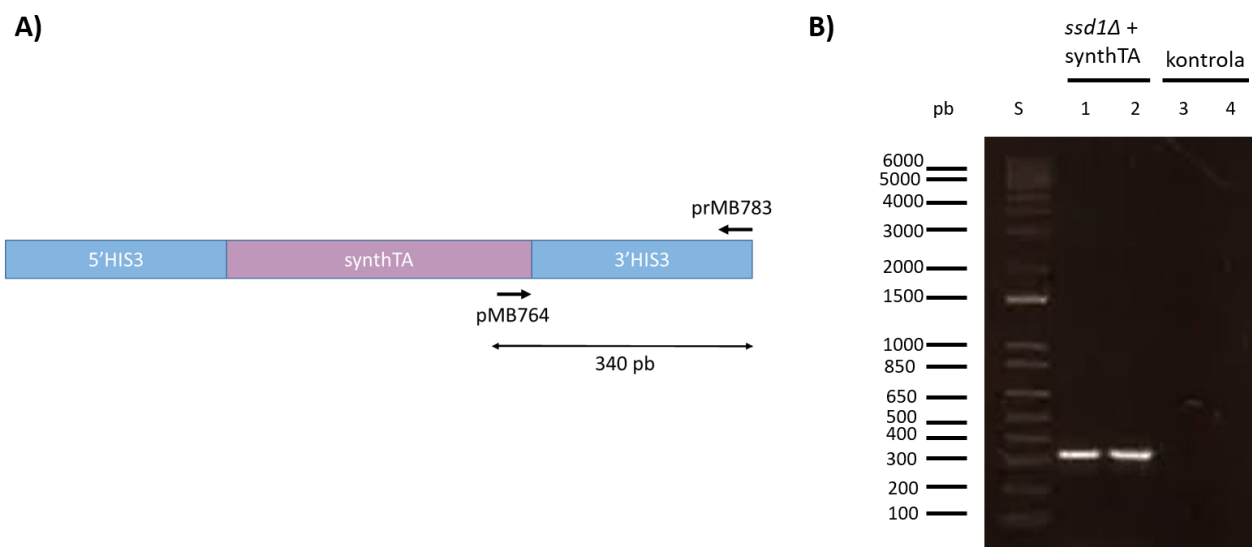


Slika 9. Shema indukcije sintetičkog transkripcijskog aktivatora (synthTA) progesteronom i indukcije ekspresije promotora *Z* vezanjem transkripcijskog aktivatora u stanicama kvasca. Transkripcijski aktivator u odsutnosti progesterona nalazi se u citoplazmi te ne dolazi do ekspresije gena za protein Tau s promotora *Z*. Vezanjem molekula progesterona na transkripcijski aktivator, transkripcijski aktivator ulazi u jezgru i inducira ekspresiju. (vlastita fotografija)

Nakon transformacije kvasca na selektivnu podlogu bez histidina, uspješnost integracije plazmida koji kodira synthTA u lokus gena *HIS3* u genomu kvasca provjerena je reakcijom lančanim polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR), koristeći početnicu koja se veže unutar konstrukta synthTA (prMB764), te početnicu koja se veže nizvodno od gena *HIS3* u genomu kvasca (prMB783, slika 10A). Očekivano je da će se, pri provođenju gel elektroforeze DNA nakon PCR-a, vrpce pojaviti samo kod soja s ugrađenim genom za transkripcijski aktivator, a da vrpce neće biti detektirane kad se radi o kontroli (ishodišnom soju kvasca *ssd1Δ* bez ugrađenog gena). Rezultat provjere integracije konstrukta SynthTA u *HIS3* lokus genomske DNA kvasca prikazan je na slici 10B. Konstruirani soj (*ssd1ΔsynthTA*) sadrži vidljive vrpce očekivane veličine 340 parova baza (slika 10B, jažice 1 i 2), dok kontrolni sojevi ne sadrže vidljive vrpce odgovarajuće veličine (slika 10B, jažice 3 i 4).

Zaključno, konstruiran je kvasac soja *ssd1Δ* (genotip: *MATa*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*; *ssd1::kanMX4*; *his3Δ::synthTA*) koji eksprimira transkripcijski faktor synthTA, potreban za inducibilnu aktivaciju *Z*-promotora progesteronom.

U sljedećem koraku navedeni soj (*ssd1Δ synthTA*) transformiran je s centromernim plazmidom koji kodira za humani protein Tau pod kontrolom Z-promotora (pZ-Tau), te su stanice kvasca kod kojih je došlo do uspješne transformacije selekcionirane su na podlozi bez uracila.



Slika 10. A) Vezanje početnica prilikom PCR-a unutar konstrukta *synthTA* (prMB764), te nizvodno od gena *HIS3* u genomu kvasca (prMB783) u konstruiranom soju gdje je u lokus gena *HIS3* integriran plazmid koji kodira *synthTA*. Provođenjem PCR-a dobivaju se produkti veličine 340 pb.

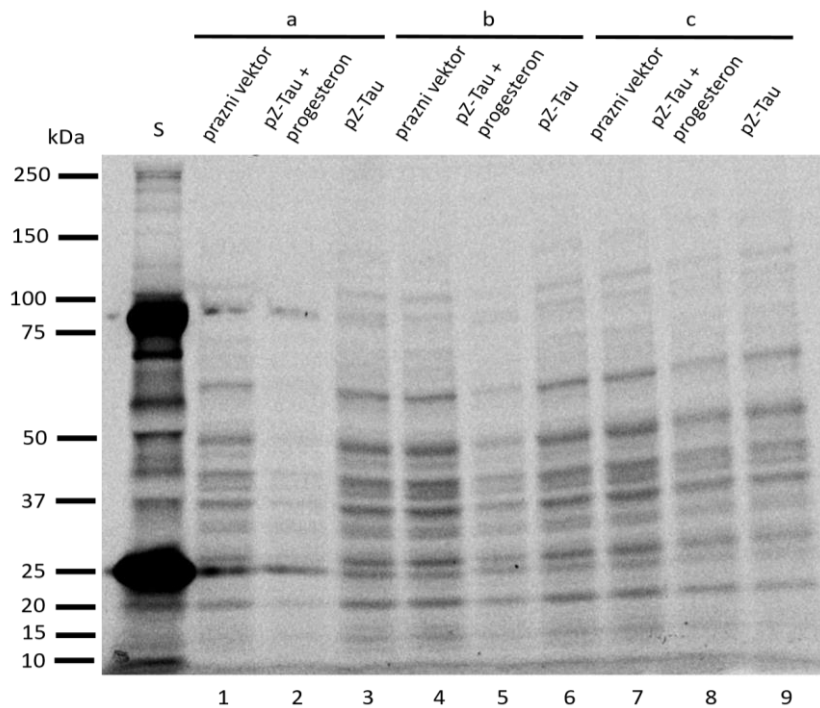
B) Provjera uspješnosti integracije gena za *synthTA* u genom kvasca soja *ssd1Δ*. U genomsku DNA soja kvasca *S. cerevisiae ssd1Δ* ugrađen je integracijski plazmid koji ekspirira sintetski transkripcijski aktivator (*synthTA*). Seleksijski marker integriranog plazmida je gen *HIS3* koji je potreban za porast stanica kvasca na podlozi bez histidina. Reakcijom lančanom polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) provjerena je uspješnost integracije plazmida s genom za *synthTA* u lokus gena *HIS3* u genomu kvasca, nakon čega je provedena agarozna gel elektroforeza DNA na kojoj su vidljive vrpce samo kod soja s ugrađenim genom za *synthTA*, a čiji su rezultati vidljivi na slici. S – standardi (1 Kb Plus DNA Ladder, InvitrogenTM), 1 i 2 – soj transformiran plazmidom s genom za *synthTA* (*ssd1Δ* genotipa *MATa; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ssd1::kanMX4; his3Δ::synthTA*), 3 i 4 – kontrola (*ssd1Δ* genotipa *MATa; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ssd1::kanMX4*). (vlastita fotografija)

4.3. Provjera inducibilne ekspresije gena za Tau protein čovjeka s promotora pZ

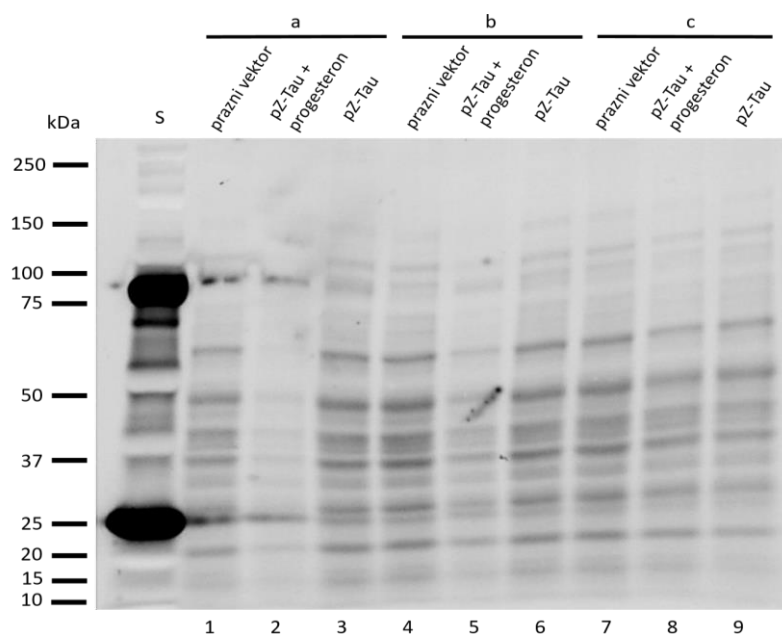
U prethodnom koraku gen za Tau protein čovjeka stavljen je pod kontrolu inducibilnog Z-promotora (pZ-Tau) na centromerni kvašćev plazmid i transformiran u stanice kvasca. Z-promotor se aktivira pomoću sintetskog transkripcijskog faktora (synthTA-P) koji sadrži dio progesteronskog receptora čovjeka, te se vezanjem progesterona lokalizira u staničnu jezgru (Aranda-Díaz, 2017). Kako bi se provjerila ekspresija gena za Tau s inducibilnog promotora pZ, stanice su uzgojene u tekućem mediju do logaritamske faze rasta, zatim je dio stanica inkubiran u prisutnosti 10 μ M progesterona u trajanju od jedan sat, te su izolirani ukupni stanični proteini i provedena western blot analiza.

Ukratko, dobiveni ukupni izolirani proteini analizirani su SDS elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (slika 11), nakon čega su preneseni na PVDF (polivinildien difluorid) membranu (slika 12) koja je nakon blokiranja inkubirana u primarnom anti-Tau antitijelu (slika 13), te u sekundarnom antitijelu koje je konjugirano s enzimom peroksidazom kako bi se na principu kemiluminiscencije omogućila vizualizacija proteina od interesa na membrani. Rezultat provjere inducirane ekspresije proteina Tau western blotom prikazan je na slici 13. U proteinskim ekstraktima sojeva kvasca transformiranih s plazmidom pZ-Tau te inkubiranih s progesteronom detektirana je vrpca veličine oko 100 kDa, što odgovara predviđenoj veličini proteina Tau fuzioniranog s brzo smatajućim zelenim fluorescentnim proteinom (sfGFP) te pokazuje da je protein Tau eksprimiran (slika 13, jažice 2, 5, 8). U uzorcima stanica koje nisu bile inkubirane s progesteronom (slika 13, jažice 3, 6, 9) ili sadrže prazni vektor pMB152 (slika 13, jažice 1, 4, 7) navedena vrpca nije detektirana, što pokazuje kako u ovim uzorcima nije došlo do ekspresije Tau proteina.

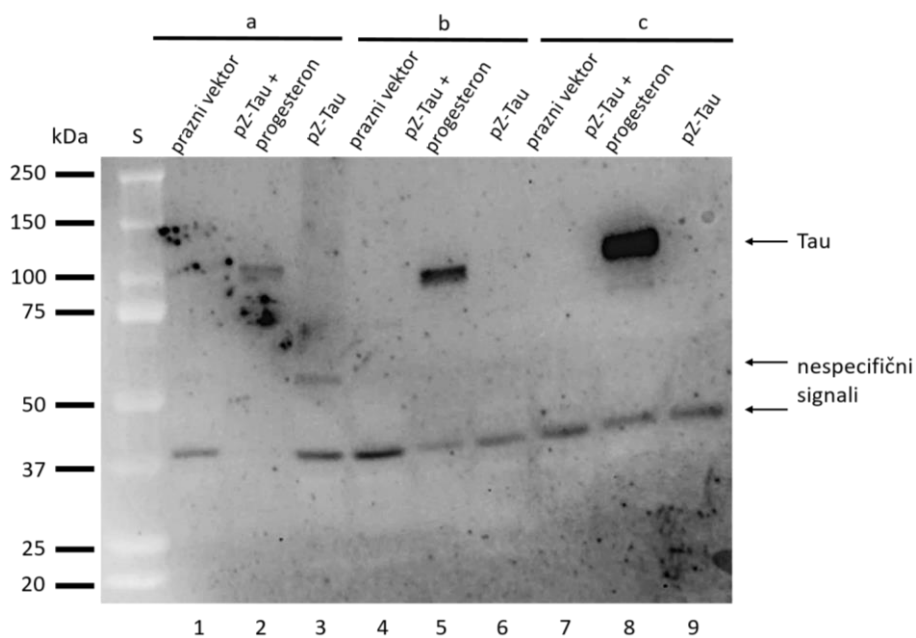
Zaključno, ispitivanjem inducibilne ekspresije gena za Tau protein čovjeka s promotora pZ je pokazano kako se ekspresija proteina Tau specifično inducira ovisno o prisutnosti progesterona u hranjivom mediju.



Slika 11. Vizualizacija ukupnih proteina u poliakrilamidnom gelu. Stanice transformirane s navedenim plazmidima (1.-9.) su inkubirane u prisutnosti ili odsutnosti progesterona kako je naznačeno, te su proteini iz ukupnih staničnih lizata razdvojeni elektroforezom i vizualizirani tehnikom Stain-free (BioRad). Za svaki soj analizirana su tri klona (a, b, c). S – standardi (proteinski marker Precision Plus Protein™ Dual Color Standard), prazni vektor (pMB152). (vlastita fotografija)



Slika 12. Vizualizacija ukupnih proteina na membrani. Nakon elektrotransfera proteina s gela na membranu, ukupni proteini vizualizirani su tehnikom Stain-free (Biorad). Uzorci su opisani na slici 11 (S – standardi, proteinski marker Precision Plus Protein™ Dual Color Standard). (vlastita fotografija)



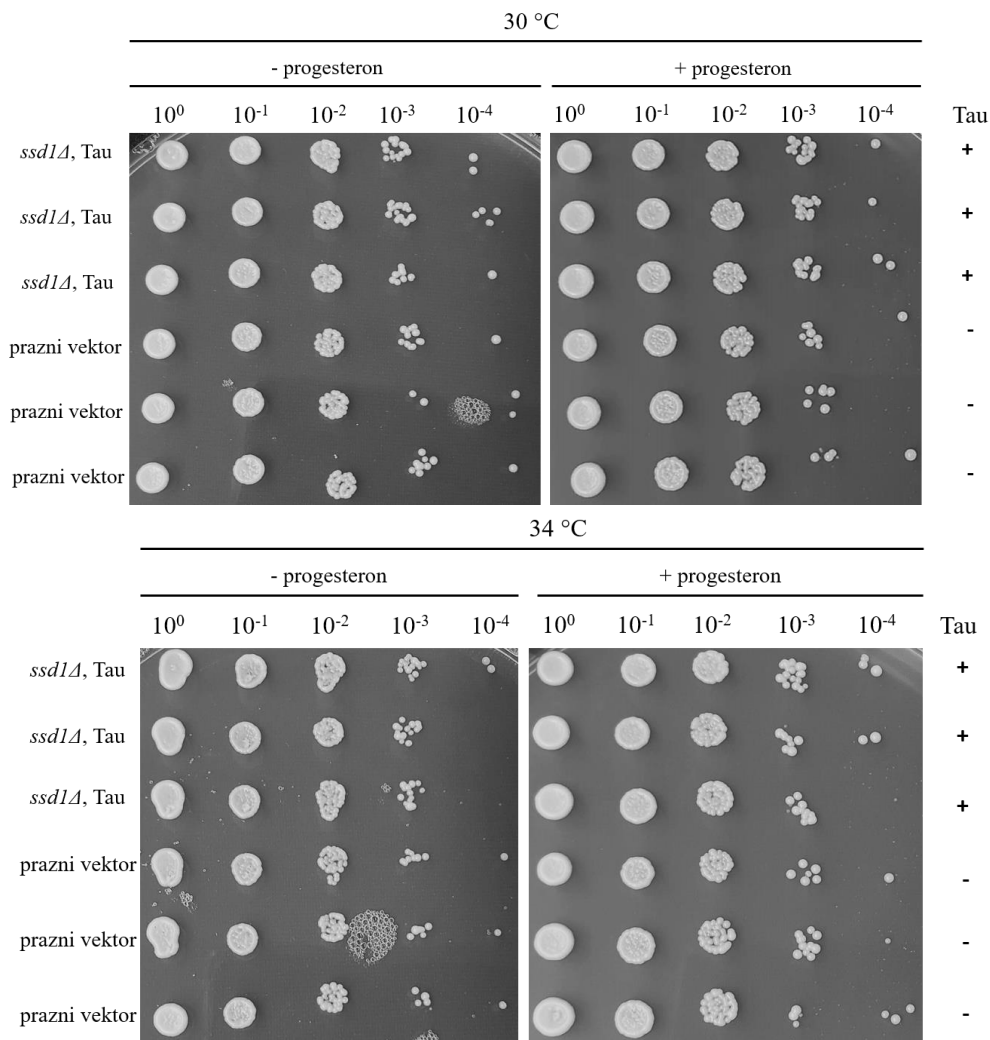
Slika 13. Western blot analiza. Proteini na membrani vizualizirani su metodom Western blot koristeći anti-Tau primarno protutijelo Tau5. Uzorci su opisani na slici 11 (S – standardi, proteinski marker Precision Plus Protein™ Dual Color Standard). (vlastita fotografija)

4.4. Provjera utjecaja ekspresije proteina Tau na vijabilnost stanica kvasca s delecijom gena *SSD1*

Kako bi se ispitalo je li Tau protein čovjeka toksičan kada se eksprimira u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* kojemu nedostaje Ssd1, protein uključen u odgovor stanice na temperaturni stres, u ovom koraku provjeren je utjecaj ekspresije proteina Tau na vijabilnost stanica kvasca *ssd1Δ* uzgojenih na optimalnoj, te na povišenoj temperaturi. Da bi se stvorili uvjeti narušenog odgovora stanice na nakupljanje proteinskih agregata uslijed temperaturnog stresa, u ovom radu korišten je delecijски mutant kvasca *ssd1Δ* uzgojen na povišenoj temperaturi.

U svrhu provjere utjecaja ekspresije proteina Tau na vijabilnost stanica kvasca mutanta *ssd1Δ*, kvasac transformiran s plazmidom pZ-Tau, odnosno s kontrolnim plazmidom (prazni plazmid, pMB152), podvrgnut je semikvantitativnoj metodi za određivanje vijabilnosti stanica, metodi testa rasta na agaroznim hranjivim pločama (engl. plate assay) (Kwolek-Mirek i Zdrag-Tecza, 2014). Ukratko, stanice kvasca prvotno su uzgojene na 30 °C u tekućoj hranjivoj podlozi do logaritamske faze rasta, a potom su u decimalnim razrjeđenjima nacijepljene na krutu hranjivu podlogu s ili bez progesterona (slika 14). Ploče s nacijepljenim stanicama kvasca inkubirane su tri dana na temperaturi od 30 °C, što je optimalna temperatura za rast kvasca, ili na povišenoj temperaturi. Za ispitivanje utjecaja proteina Tau na rast *ssd1Δ* stanica odabrana je temperatura od 34 °C, koja za stanice predstavlja blagi temperaturni stres. Nije uočena razlika u rastu stanica transformiranih s pZ-Tau na podlozi s i bez progesterona, kao niti u rastu stanica transformiranih s pZ-Tau, odnosno s praznim plazmidom (slika 14). Također nije uočena razlika u rastu stanica inkubiranih na optimalnoj temperaturi od 30 °C u odnosu na blago povišenu temperaturu od 34 °C (slika 14).

Zaključno, rezultati su pokazali kako ekspresija Tau proteina u stanicama kvasca s delecijom gena *SSD1* ne utječe na smanjenje tolerancije rasta stanica na povišenoj temperaturi, tj. ekspresija proteina Tau u stanicama kvasca ne dovodi do toksičnosti u uvjetima temperaturnog stresa i narušenog odgovora stanice na stres.



Slika 14. Test rasta stanica kvasca *ssd1Δ* s genom za protein Tau (*ssd1Δ*, Tau) i stanica *ssd1Δ* s integriranim praznim vektorom kao kontrolom (prazni vektor). Stanice kvasca uzgajane su pri 30 °C do logaritamske faze rasta u tekućoj hranjivoj podlozi CSD-Ura nakon čega su decimalna razrjeđenja tih kultura nakapana na osušene krute podloge s ili bez dodatka 10 μM progesterona. Ploče s nacijepljenim stanicama inkubirane su tri dana na 30 °C, što je optimalna temperatura za rast kvasca *S. cerevisiae*, odnosno na povišenoj temperaturi od 34 °C, te su fotografirane. (vlastita fotografija)

5. ZAKLJUČCI

1. Provedena je uspješna konstrukcija plazmida s genom za Tau protein čovjeka pod kontrolom inducibilnog Z-promotora (pMB275).
2. Provedena je uspješna konstrukcija soja kvasca *ssd1Δ* s genom za synthTA (sintetski transkripcijski aktivator koji nakon dodatka progesterona ulazi u staničnu jezgru i veže se na Z-promotor) integriranim u genom kvasca.
3. Provedena je uspješna indukcija ekspresije humanog proteina Tau u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Ekspresija humanog proteina Tau u soju kvasca *Saccharomyces cerevisiae* s mutacijom *ssd1Δ* na temperaturi 34 °C ne uzrokuje smanjenu toleranciju stanica kvasca na temperaturni stres te ne utječe na njihovu vijabilnost i reproduktivni kapacitet.

6. POPIS LITERATURE

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008) *Molecular Biology of the Cell*, 5. izd., Garland Science, New York.

Alonso ADC, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994) Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 5562-5566. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5562>

Aranda-Díaz A, Mace K, Zuleta I, Harrigan P, El-Samad H (2017) Robust Synthetic Circuits for Two-Dimensional Control of Gene Expression in Yeast. *ACS Synth Biol* **6**, 545-554. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00251>

Bassett DE Jr, Boguski MS, Hieter P (1996) Yeast genes and human disease. *Nature* **379**, 589-590. <https://doi.org/10.1038/379589a0>

Bayne RA, Jayachandran U, Kasprowicz A, Bresson S, Tollervey D, Wallace EWJ, i sur. (2022) Yeast Ssd1 is a non-enzymatic member of the RNase II family with an alternative RNA recognition interface. *Nucleic Acids Research* **50**(5), 2923-2937. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab615>

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2013) *Biokemija*, 1. izd., (preveli Weygand Đurašević i sur.), Školska knjiga, Zagreb.

Bharadwaj P, Martins R, Macreadie I (2010) Yeast as a model for studying Alzheimer's disease. *FEMS Yeast Research* **10**(8), 961-969. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00658.x>

Bonneau F, Basquin J, Ebert J, Lorentzen E, Conti E (2009) The Yeast Exosome Functions as a Macromolecular Cage to Channel RNA Substrates for Degradation. *Cell* **139**(3), 547-559. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.042>

Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**, 239-259. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>

Braak H, Braak E, Strothjohann M (1994) Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat.

Neurosci. Lett. **171**, 1-4. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90589-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90589-4)

Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM (2009) Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 783. <https://doi.org/10.1038/nrd2959>

Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* **33**, 95-130. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00019-9)

Chai N, Gitler AD (2018) Yeast screen for modifiers of C9orf72 poly(glycine-arginine) dipeptide repeat toxicity. *FEMS Yeast Res.* **18**(4). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy024>

Collins (2021) Infographic: Modeling Neurodegenerative Diseases with Yeast – The Scientist Magazine. <https://www.the-scientist.com/infographics/infographic-modeling-neurodegenerative-diseases-with-yeast-69206>. Pristupljeno 29. srpnja 2022.

De Vos A, Anandhakumar J, Van den Brande J, Verduyck M, Franssens V, Winderickx J, i sur. (2011) Yeast as a Model System to Study Tau Biology. *International Journal of Alzheimer's Disease* **2011**, 16. <https://doi.org/10.4061/2011/428970>

Ellison JM (2021) Tau Protein and Alzheimer's Disease: What's the Connection? – BrightFocus Foundation. <https://www.brightfocus.org/alzheimers/article/tau-protein-and-alzheimers-disease-whats-connection>. Pristupljeno 25. srpnja 2022.

Foury F (1997) Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene* **195**, 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00140-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00140-6)

Gendron TF, Petrucelli L (2009) The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegeneration* **4**, 13. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-4-13>

Gitler AD (2008) Beer and bread to brains and beyond: can yeast cells teach us about neurodegenerative disease? *Neurosignals* **16**, 52-62. <https://doi.org/10.1159/000109759>

Goedert M, Jakes R (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO Journal* **9**, 4225-4230.

<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07870.x>

Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1995) Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated τ : decrease in Alzheimer disease brain. *Journal of Neurochemistry* **65**, 732-738. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65020732.x>

Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Carroll SB (2008) Introduction to genetic analysis, 9. izd., W.H. Freeman, New York.

Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev.* **8**, 101-112. <https://doi.org/10.1038/nrm2101>

Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**(5580), 353-356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>

Jameson L, Frey T, Zeeberg B, Dalldorf F, Caplow M (1980) Inhibition of microtubule assembly by phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Biochemistry* **19**(11), 2472-2479. <https://doi.org/10.1021/bi00552a027>

Jansen JM, Wanless AG, Seidel CW, Weiss EL (2009) Cbk1 regulation of the RNA-binding protein Ssd1 integrates cell fate with translational control. *Curr Biol.* **19**, 2114-2120. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.10.071>

Jorgensen P, Nelson B, Robinson MD, Chen Y, Andrews B, Tyers M, i sur. (2002) High-resolution genetic mapping with ordered arrays of *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants. *Genetics* **162**(3), 1091-1099. <https://doi.org/10.1093/genetics/162.3.1091>

Kaeberlein M, Guarente L (2002) *Saccharomyces cerevisiae* MPT5 and SSD1 function in parallel pathways to promote cell wall integrity. *Genetics* **160**, 83-95. <https://doi.org/10.1093/genetics/160.1.83>

Kandel E, Jessell T, Schwartz JH (2000) Principles of Neural Science, 4. izd., McGraw-hill, New York, str. 19-36.

Kingwell K (2015) Neurodegenerative disease: Targeting tau acetylation attenuates neurodegeneration. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 748-749. <https://doi.org/10.1038/nrd4768>

Kurischko C, Kim HK, Kuravi VK, Pratzka J, Luca FC (2011) The yeast Cbk1 kinase regulates mRNA localization via the mRNA-binding protein Ssd1. *J Cell Biol* **192**, 583-598. <https://doi.org/10.1083/jcb.201011061>

Kwolek-Mirek M, Zadrag-Tecza R (2014) Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Res.* **14**, 1068-1079. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202>

Leksikografski zavod Miroslav Krleža (2021) Alzheimerova bolest. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=2073>. Pristupljeno 21. 7. 2022.

Mahmood T, Yang PC (2012) Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* **4**(9), 429-434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>

Mir SS, Fiedler D, Cashikar AG (2009) Ssd1 is required for thermotolerance and Hsp104-mediated protein disaggregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **29**(1), 187-200. <https://doi.org/10.1128/MCB.02271-07>

Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS (2012) The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**, 1157-1195. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>

Munna MS, Humayun S, Noor R (2015) Influence of heat shock and osmotic stresses on the growth and viability of *Saccharomyces cerevisiae* SUBSC01 Microbiology. *BMC Res. Notes* **8**, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1355-x>

Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM (2004) A β immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron* **43**(3), 321-332. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.003>

Smith MG, Snyder M (2006) Yeast as a model for human disease. *Curr Protoc Hum Genet supplement* **48**, 15.6.1-15.6.8. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1506s48>

Spillantini MG, Goedert M (1998) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends*

Neurosci **21**, 428-433. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01337-X](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01337-X)

Šimić G, Babić Leko M, Wray S, Harrington C, Delalle I, Jovanov-Milošević N, i sur. (2016) Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules* **6**(1), 6. <https://doi.org/10.3390/biom6010006>

Šimić G, Diana A, Hof PR (2003) Phosphorylation pattern of tau associated with distinct changes of the growth cone cytoskeleton. *Prog Mol Subcell Biol* **32**, 33-48. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55557-2_2

Šimić G, Stanić G, Mladinov M, Jovanov-Milošević N, Kostović I, Hof PR (2009) Does Alzheimer's disease begin in the brainstem? *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **35**, 532-554. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2009.01038.x>

Tamarin HR (1999) Principles of genetics, 6. izd, McGraw-Hill, New York

Tenreiro S, Outeiro TF (2010) Simple is good: yeast models of neurodegeneration. *FEMS Yeast Res* **10**(8), 970-979. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00649.x>

Towbin H, Staehlin T (1979) Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with 30 antibody. *Anal. Biochem* **112**, 195-203.

Wang Y, Garg S, Mandelkow EM, Mandelkow E (2010) Proteolytic processing of tau. *Biochemical Society Transactions* **38**, 955-961. <https://doi.org/10.1042/BST0380955>

Wischik CM, Novak M, Thøgersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, i sur. (1988) Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 4506-4510. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.12.4506>

Xu F, Byström AS, Johansson MJO (2019) SSD1 suppresses phenotypes induced by the lack of Elongator-dependent tRNA modifications. *PLoS Genet* **15**(8), e1008117. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008117>

Izjava o izvornosti

Ja, Petra Kruljac, izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis