

# Identifikacija i bioinformatička analiza Hsp70 gena u genomu alge *Nannochloropsis salina* CCMP1776

---

**Kopić, David**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zadar / Sveučilište u Zadru**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:162:627856>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-30**



**Sveučilište u Zadru**  
Universitas Studiorum  
Jadertina | 1396 | 2002 |

*Repository / Repozitorij:*

[University of Zadar Institutional Repository](#)



Sveučilište u Zadru

Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu  
Diplomski studij Održivo upravljanje vodenim ekosustavima

**David Kopic**

**Identifikacija i bioinformatička analiza Hsp70 gena u genomu  
alge *Nannochloropsis salina* CCMP1776**

**Diplomski rad**

Zadar, 2023.

Sveučilište u Zadru

Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu  
Diplomski studij Održivo upravljanje vodenim ekosustavima

Identifikacija i bioinformatička analiza Hsp70 gena u genomu alge  
*Nannochloropsis salina* CCMP1776

Diplomski rad

Student:  
David Kopic

Mentor:  
Dr.sc. Andrija Finka

Zadar, 2023.



## Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, **David Kopic**, ovime izjavljujem da je moj diplomski rad pod naslovom **Identifikacija i bioinformatička analiza Hsp70 gena u genomu alge *Nannochloropsis salina* CCMP1776** rezultat mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio mojega rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši bilo čija autorska prava.

Izjavljujem da ni jedan dio ovoga rada nije iskorišten u kojem drugom radu pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj, obrazovnoj ili inoj ustanovi.

Sadržaj mojega rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Zadar, **2023.**

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 4  |
| 1.1. <i>Alge kao indikatori globalnog zatopljenja u vodenim ekosustavima</i> .....   | 4  |
| 2. ODGOVOR NA TOPLINSKI ŠOK U BILJKAMA.....  | 6  |
| 2.1. <i>Fotosinteza i slobodni radikali kisika</i> .....                             | 6  |
| 2.2. <i>Molekularni mehanizmi odgovora na toplinski šok</i> .....                    | 6  |
| 3. PODJELA HSP PROTEINA.....   | 8  |
| 3.1. <i>Struktura Hsp70</i> .....  | 9  |
| 3.2. <i>Molekularni mehanizmi djelovanja Hsp70</i> .....                             | 9  |
| 3.3. <i>Funkcije Hsp70</i> .....   | 10 |
| 4. ALGE.....   | 12 |
| 4.1. <i>Filogenetska podjela algi</i> .....  | 13 |
| 4.2. <i>Podjela algi na redove</i> .....   | 14 |
| 4.3. <i>Nannochloropsis sp.</i> .....  | 17 |
| 5. MATERIJALI I METODE.....  | 19 |
| 6. REZULTATI.....  | 20 |
| 6.1. <i>Nannochloropsis salina CCMP1776 posjeduje deset Hsp70/110 sekvenci</i> ..... | 20 |
| 6.2. <i>Hsp70/110 u citosolu</i> .....   | 22 |
| 6.3. <i>Hsp70/110 u endoplazmatskom retikulumu</i> .....                             | 27 |
| 6.4. <i>Mitohondrijski Hsp70</i> .....   | 30 |
| 6.5. <i>Hsp70 u plastidima</i> .....   | 32 |
| 6.6. <i>Poravnavanje proteinskih sekvenci i filogenetska analiza</i> .....           | 36 |
| 7. DISKUSIJA.....  | 39 |
| 8. ZAKLJUČAK.....  | 41 |
| 9. LITERATURA.....   | 42 |

## Identifikacija i bioinformatička analiza Hsp70 gena u genomu alge *Nannochloropsis salina* CCMP1776

### Sažetak

Globalno zagrijavanje kritičan je problem koji utječe na naš planet i uzrokuje značajne promjene u temperaturi i klimi na Zemlji. Budući da su biljke poikilotermni organizmi, najznačajniji utjecaj globalnog zatopljenja na život biljaka jesu sposobnost kratkotrajne aklimatizacije, kad su temperaturni skokovi značajni i dugotrajna adaptacija na novonastale klimatske uvjete uzrokovane povećanjem temperature.

Toplinski stres kritičan je okolišni čimbenik koji može imati ozbiljan utjecaj na rast i razvoj biljaka. Kada su biljke izložene visokim temperaturama tijekom duljeg razdoblja, to može dovesti do širokog spektra fizioloških i biokemijskih promjena, što u konačnici može dovesti do smanjenog rasta i reprodukcije. Jedno od potencijalnih rješenja koja su predložena za ublažavanje utjecaja globalnog zagrijavanja je uporaba algi, posebno vrste mikroalgi *Nannochloropsis sp.*, koje su poznate po svojoj visokoj fotosintetskoj učinkovitosti i stopama rasta. Međutim, globalno zagrijavanje također ima značajne implikacije za alge, uključujući *Nannochloropsis sp.* čiji molekularni mehanizmi odgovora na stres uključuju aktivaciju kaskade proteina koja u konačnici rezultira sintezom proteina toplinskog udara (*Heat shock protein*-Hsp). Hsps su grupni naziv za nekoliko različitih evolucijski konzerviranih obitelji proteina od kojih su neki molekularni šaperoni. Hsp70 predstavlja obitelj šaperona čija se koncentracija povećava u stanicama prilikom toplinskog stresa te isti pridonose pravilnom smatanju i stabilizaciji proteina.

Bioinformatičkom analizom genoma alge *Nannochloropsis sp.* utvrdilo se postojanje deset sekvenci proteina iz Hsp70 obitelji i određena su njihova svojstva na temelju fizikalno-kemijskih svojstava, genomskih lokacija, predviđena je stanična lokalizacija pojedinih proteina te su određeni filogenetski odnosi među njima.

Ključne riječi: Proteini toplinskog šoka (HSP), globalno zatopljenje, biljni svijet, alge, *Nannochloropsis sp.*, odgovor na toplinski udar (HSR).

**Identification and bioinformatic analysis of the Hsp70 genes in the genome of  
*Nannochloropsis salina* CCMP1776**

**Abstract**

Global warming is a critical problem that affects our planet and causes significant changes in temperature and climate on Earth. Since plants are poikilothermic organisms, the most significant impacts of global warming on plant life are the ability to acclimate to short-term temperature changes, and long-term adaptation to new climate conditions caused by increased temperature.

Heat stress is a critical environmental factor that can have a serious impact on plant growth and development. When plants are exposed to high temperatures for an extended period, it can lead to a wide range of physiological and biochemical changes, ultimately resulting in reduced growth and reproduction. One potential solution proposed to mitigate the impact of global warming is the use of algae, especially the microalga species *Nannochloropsis sp.*, known for their high photosynthetic efficiency and growth rates. However, global warming also has significant implications for algae, including *Nannochloropsis sp.*, whose molecular response mechanisms to stress conditions involve the activation of a protein cascade that ultimately results in the synthesis of heat shock protein (Hsp). Hsps are a group name for several evolutionarily conserved families of proteins, some of which are molecular chaperones. Hsp70 represents a family of chaperones whose concentration increases in cells during heat stress, contributing to proper protein folding and stabilization.

Bioinformatic genome analysis of *Nannochloropsis sp.* algae revealed the existence of ten protein sequences from the Hsp70 family, and their properties were determined based on their physicochemical properties, genomic locations, predicted cellular localization of individual proteins, and their phylogenetic relationships.

Keywords: Heat shock proteins (HSP), global warming, , plant life, algae, *Nannochloropsis sp.* , Heat shock response (HSR).

# 1. UVOD

## 1.1. *Alge kao indikatori globalnog zatopljenja u vodenim ekosustavima*

U 2022. godini prosječna globalna temperatura porasla je za  $1,15^{\circ}\text{C}$  u odnosu na predindustrijsko razdoblje 1850-1890 (State of the Global Climate, 2022). Prema istom izvještaju, razdoblje od 2015.-2022. je prikazano kao najtoplije razdoblje u povijesti mjerenja temperature. Promjene temperature u gornjim slojevima Atlantskog oceana na dubinama do 2000 metara ukazuju grijanje cijelog stupca vodenog volumena u razdoblju od 1958.-2022. prilikom čega je povećanje apsorbirane toplinske energije u oceanu poraslo s 5 ZJ ( $\text{ZJ}=10^{21}\text{J}$ ) na gotovo 10 ZJ godišnje (Cheng i sur., 2022), predstavljajući infinitezimalno ali značajno povećanje temperature od prosječno  $0.006^{\circ}\text{C}$  u datom volumenu vode, s naglaskom da se slojevi od 0 do 700 m zagrijevaju oko deset puta brže nego slojevi ispod 2000m. Također, predviđeno je da će se do 2100. godine zagrijavanje ubrzati od 2 do 6 puta. Ovakve promjene imaju drastične učinke na smanjenje pH, podizanje razine mora zbog otapanja ledenjaka, promjene morskih struja i ekosustava i općenito uzevših promjena, poput načina života gospodarskog djelovanja ljudi u maritimnim područjima.

Klimatske promjene imat će značajan utjecaj na rast i opstanak morskih organizama i algi prilikom čega jedan od najvažnijih izazova je predviđanje i točno određivanje odgovora algi na klimatske promjene. Kako se klimatske promjene događaju kao niz događaja, promjene okolišnih faktora kao što su temperatura,  $\text{CO}_2$ , svjetlost i pH rezultiraju u fenotipskim promjenama što uključuju, biokemijske, fiziološke i morfološke promjene ponašanja u različitim algama kroz aklimatizaciju, koje posljedično dovode do genetskih promjen u svrhu adaptacije na nove okolišne uvjete (Walther i sur., 2002; Merilla 2012; Williams i sur., 2015; Poloczanska i sur., 2013). Alternativa evolucijskim prilagodbama na globalno zatopljenje jest migracija vrsta koje u novoostvorenim uvjetima migriraju, s područja koja su više zahvaćena globalnim zatopljenjem te su tako postala ekstremna za život tih vrsta, u područja koja su sada zbog porasta temperature postala pogodna za život istih, istiskujući tako autohtone vrste koje se nisu prilagodile povećanim temperaturama (Miller i sur., 2017). Također, tropifikacija oceana može dovesti do promjena u kvaliteti vode i tla, što može pridonijeti širenju invazivnih vrsta. Navedene promjene mogu izazvati razlog za zabrinutost, jer takvim migracijama dolazi i do promjena u ljudskim djelatnostima kao što su poljoprivreda i ribarstvo, a posljedično i u ekonomiji jer dolazi do smjene lovljenih i uzgojenih vrsta (Ostberg S. i sur., 2018).



Budući da se sve više „stakleničkih plinova“, poput CO<sub>2</sub> i CH<sub>4</sub>, nakuplja u atmosferi, a prirodni ih procesi ne mogu djelotvorno ukloniti, količina stakleničkih plinova uzrokuje sve češće i oštrije toplinske valove (Baniwal i sur., 2004) s razornim učincima na bioraznolikost (Thomas i sur., 2004), produktivnost ekosustava (Ciais i sur., 2005) zemlje i oceana (Asasian i sur., 2018). Za razliku od kopnenih biljaka, vodeni ekosustavi ne pokazuju velike dnevne oscilacije temperature u usporedbi s onima na kopnu. Zagrijavanje vodenih ekosustava posljedično dovodi do značajnih promjene u biogeokemijskim ciklusima, dinamici, bioraznolikosti i strukturi hranidbenog lanca (Harley i sur., 2006; Wrona i sur., 2006). U vodenim ekosustavima alge igraju ključnu ulogu u vezivanju ugljika i pridonose hranidbenim mrežama kao primarni proizvođači (Sayre, 2010; Tsai i sur., 2015). Njihove uloge i distribucija pod utjecajem su promjena u okolišnim varijablama zbog globalnog zatopljenja (Beardall i Gavran, 2004; Bopp i sur., 2005; Pavao, 2008; Olsenz, 2011; Sangma i Sultana, 2022).

S obzirom na promjenjive uvjete okoliša, alge se mogu smatrati kvantitativnim bioindikatorima, a njihovi biološki odgovori mogu klasificirati u dvije vrste: 1) kratkoročni odgovori na toplinski šok koji se izražavaju na fiziološkoj i biokemijskoj razini putem nastanka metabolita i proteina toplinskog šoka (Heat shock protein(s)- Hsp) i traju od nekoliko minuta do nekoliko dana (biomarkeri) i 2) dugoročni odgovori kao što su štetna cvjetanja algi koji su ekstremni biološki događaji s negativnim utjecajem na ribarstvo, obalne ekosustave, javno zdravlje i obalno gospodarstvo (Bellinger i sur., 2010).

Alge i kopnene biljke se moraju prilagoditi i uložiti vrijedne resurse u modifikaciju svog metabolizma, kako bi spriječile nadolazeća oštećenja toplinom, u procesu "pripremanja za toplinu", odnosno, u procesu stjecanja termotolerancije (Finka, A., 2012). Stečena termotolerancija algi i kopnenih biljaka odnosi se na njihovu sposobnost, da nakon što su se pripremile na subletalne povišene temperature, mogu preživjeti izloženost letalnim temperaturama (Mittler i sur., 2012). Primjerice, kod alge *Chlamydomonas* prolazni toplinski šok na 35°C privremeno je zaustavio stanični ciklus nakon čega je uslijedio djelomični oporavak stanica koji je bio karakteriziran pojačanom sintezom proteina uključenih u anabolizam ugljikovih spojeva i poticanjem rasta, dok su na 40°C dioba i rast stanica bili nepovratno poremećeni (Zhang i sur., 2022). Konstantna izloženost povećanim temperaturama u uvjetima globalnog zatopljenja može dovesti do povećanja bazalne termotolerancije putem nakupljanja korisnih genetskih mutacija čija ekspresija u proteinima osigurava odvijanje enzimskih reakcija na višim temperaturama od uobičajenih (Schaum i Collins, 2014; Kumar, M. i sur., 2017; Morgan, 2020).

## **2. ODGOVOR NA TOPLINSKI ŠOK U BILJAKA**

### **2.1. Fotosinteza i slobodni radikali kisika**

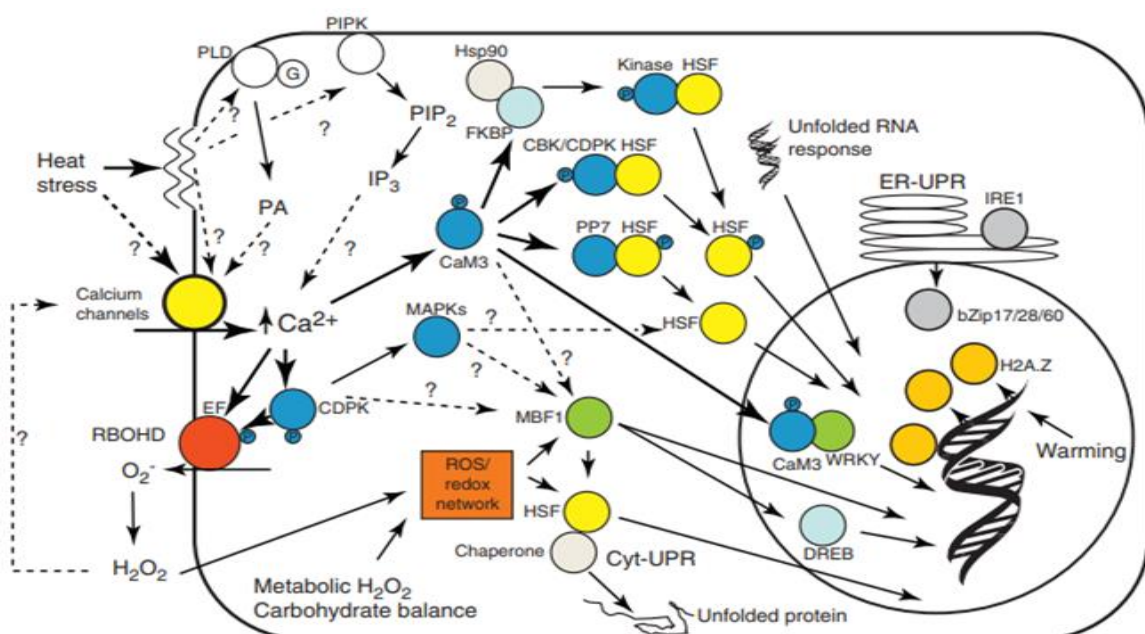
Fotosinteza je proces putem kojeg se u prokariotskim modrozelenim algama i kloroplastima eukariotskih biljaka, uz pomoć energije fotona pristiglih sa Sunca ugljikov dioksid i voda prevode u glukozu i kisik. Kao nusprodukti ovog procesa, razvijaju se slobodni kisikovi radikali (*Reactive oxygen species*-ROS) kao posljedica fotolize vode, poput superoksida ( $O_2^-$ ). ROS u reakcijama s drugim molekulama u stanicama proizvode oksidativni stres koji uzrokuje oštećenja staničnih struktura i time toplinski udar predstavlja paradigmu oksidativnog stresa (Finka, A., Mittler, R., Goloubinof, P. 2012). Biljke imaju ugrađene mehanizme za neutralizaciju ROS. Na primjer, enzimi kao što su superoksid dismutaza i katalaza mogu razgraditi superoksid i vodikov peroksid u manje štetne molekule kisika i vode. Biljke također mogu proizvesti antioksidanse, poput askorbinske kiseline (vitamin C) i tokoferola (vitamin E), koji neutraliziraju reaktivne vrste kisika i štite stanice od oksidativnog stresa (Mittler, R. i sur., 2004).

Budući da različiti metabolički putevi ovise o enzimima koji imaju različitu učinkovitost na različitim temperaturama toplinski stres može aktivirati ili inhibirati određene metaboličke putove i uzrokovati akumulaciju slobodnih kisikovih radikala, koji pokreću molekularne mehanizme odgovora na toplinski stres (Mittler, R. i sur., 2004; Vasseur, F. i sur., 2011).

### **2.2. Molekularni mehanizmi odgovora na toplinski šok**

Odgovor na toplinski šok (*Heat Shock Response*-HSR) je, evolucijski duboko očuvan, skup staničnih mehanizama koji se aktiviraju izlaganjem stanica različitim oblicima stresa, poput topline, oksidativnog stresa i izlaganja toksinima ili zračenju (Morimoto, 2011) s ciljem očuvanja stanične proteostaze (Mittler i sur., 2012). Kod biljaka HSR posredovan je višestrukim signalnim molekularnim putevima, kojima upravlja odabrana grupa regulatornih proteina, a pokreće ga jedan ili više temperaturnih senzora. Primarni događaj osjeta toplinskog stresa kod biljaka događa se na plazma membrani (PM) (Saidi, Y. I sur., 2009; Saidi, Y. i sur., 2010). Kombinacijom elektrofiziologije, analize gena reportera i biokemijskih mjerenja Saidi, Y., (Saidi, Y. i sur., 2009), dokazano je da se blaga povećanja temperature osjete na PM što dovodi do povećanja fluidnosti plazma membrane i otvaranja specifičnih kalcijevih kanala koji pokreću priljev  $Ca^{2+}$  u stanicu i aktiviraju HSR (Saidi, Y. i sur., 2010). Suzbijanje ovog puta blokatorima kalcijevih kanala i kelatorima  $Ca^{2+}$  uzrokuje smanjenje aktivacije odgovora na toplinski udar, ukazujući da lipidna i proteinska komponenta PM, koji pokreće toplinski

inducirani priljev  $\text{Ca}^{2+}$  služi kao jedan od primarnih toplinskih senzora u biljaka (Slika 1.) (Saidi, Y. i sur., 2009; Saidi, Y. i sur., 2010; Finka, A. 2012; Ramot, D. i sur., 2008; Yao, J. i sur., 2011; Xiao, B. i sur., 2011; Sokabe, T. i sur., 2008) Kalmodulin veže  $\text{Ca}^{2+}$  i tako sudjeluje u prijenosu signala toplinskog stresa (Zhang, W. i sur., 2009; Liu, H.T. i sur., 2008) i može biti uključen u aktivaciju različitih transkripcijskih faktora kao što su WRKY39 (Li, S. i sur. 2010) i članovi obitelji HSF proteina (Liu, H.C. i sur., 2011). Osim toga, dotok  $\text{Ca}^{2+}$  prema citosolu aktivira nekoliko protein kinaza ovisnih o  $\text{Ca}^{2+}$  (*Calmodulin dependent protein kinase*-CDPK), koje zauzvrat mogu aktivirati višestruke proteinske kinaze (Sangwan, V. i sur. 2002) ili enzim NADPH oksidazu koji proizvodi slobodne kisikove radikale (Suzuki, N. i sur. 2011). Kalmodulin, također, može aktivirati protein kinazu koja veže  $\text{Ca}^{2+}$ / kalmodulin (CBK), koja fosforilira HSFA1a, člana obitelji HSF (Liu, H.T. i sur. 2008), dok fosfataza PP7 defosforilira HSFA1a (Reddy, A.S. i sur. 2011). Kinaza ovisna o HSP90/FKBP (ROF1, također poznata kao FKBP62, također može posredovati u fosforilaciji HSF koja je rezultat vezanja kalcija na kalmodulin (Meiri, D. i Breiman, A. 2009). Na transkripcijskoj razini faktor toplinskog šoka 1 (Heat shock factor 1-HSF1) glavni je regulator HSR-a (Morimoto, 2011). U uvjetima bez stresa, HSF1 se održava u neaktivnom stanju kroz svoju povezanost s citoplazmatskim kompleksom koji sadrži proteine toplinskog šoka, kao što su Hsp70 i Hsp90 (Anckar i Sistonen, 2011). Međutim, nakon izlaganja stresu, Hsp70/Hsp90 se odvajaju od HSF1, što dovodi do premještanja HSF-1 u jezgru, njegove trimerizacije te vezanja na promotorske elemente (Heat shock elements-HSE) u HSP genima, što dovodi do transkripcijske aktivacije koja rezultira brзом sintezom Hsp-ova u citosolu, uključujući Hsp70, Hsp90 i Hsp27, između ostalih, koji funkcioniraju kao molekularni šaperoni za zaštitu staničnih proteina od denaturacije i agregacije izazvane stresom (Morimoto, 2011).



**Slika 1.** Aktivacija puteva za prijenos signala u odgovoru na toplinski stres; preuzeto od Mittler i sur, 2012.

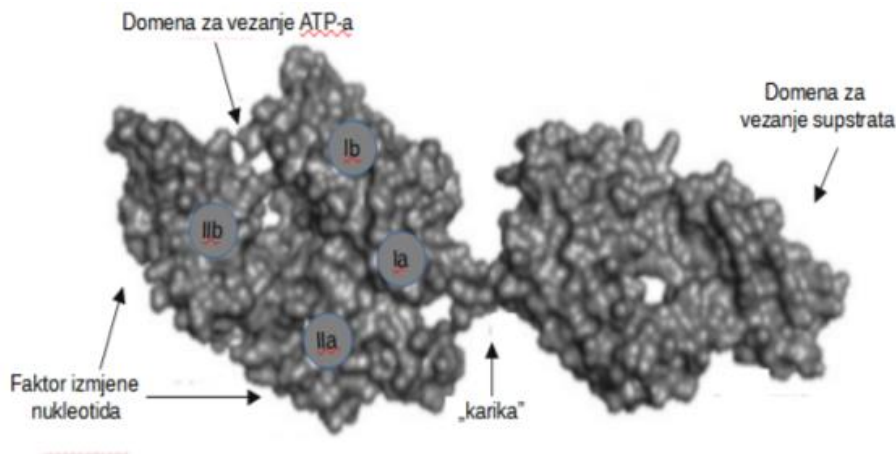
### 3. Podjela Hsp proteina

Istraživanja provedena na žlijezdama slinovnicama vinske mušice *Drosophila melanogaster* pružaju prve dokaze o povećanoj ekspresiji mRNA molekularnih šaperona induciranih toplinom (F. M. Ritossa i S. Spiegelman 1965). Izraz "proteini toplinskog udara" (HSPs) prvi je put korišten za opisivanje proteina *Drosophila melanogaster* koji se masivno nakupljaju tijekom toplinskog stresa (Tissieres i sur. 1974). Kada su podvrgnuti naglom porastu temperature, prokarioti i eukarioti podjednako preraspoređuju svoje opće *proteostatske* mehanizme za sintezu heterogene skupine kanonskih molekularnih šaperona koji su prvobitno nazvani prema njihovoj molekularnoj težini nakon elektroforeze denaturiranih proteina na poliakrilamidnom gelu: Hsp100 (ClpB/A/C), Hsp90 (HtpG), Hsp70 (DnaK), Hsp60 (GroEL), Hsp40 (DnaJ), mali Hsp-ovi (IbpA/B) i Hsp10 (GroES) (prokariotski protein u zagrada); (Daniels i sur. 1984; Tissieres i sur. 1974; Kimpel i Key 1985). Iako većina transkripata koja je pojačano eksprimirana u stanicama kao odgovor na toplinu ne kodira za molekularne šaperone, najveći broj novostvorenih mRNA kao posljedica toplotnog udara upravo pripada molekularnim šaperonima (Finka A., Mattoo R., Goloubinoff P., 2011). Stoga je glavina sinteze proteina u uvjetima toplinskog stresa preusmjerena na sintezu molekularnih šaperona (Mittler R., Finka A., Goloubinoff P., 2012). Molekularni šaperoni kontroliraju smatanje, razmatanje, rastavljanje, ponovno smatanje, translokaciju, aktivaciju, inaktivaciju, dezagregaciju i razgradnju proteina u stanici. S izuzetkom malih HSPa eksperimenti su pokazali da pročišćeni šaperonski sustavi mogu vezivati i spriječiti agregaciju umjetno razmotanih polipeptida i koristiti ATP za njihovo razdvajanje i smatanje u funkcionalne native proteine (Goloubinoff, 1989). Desetljeće kasnije pokazalo se da drugi šaperoni koriste hidrolizu ATP-a za razmatanje i otapanje stabilnih proteinskih agregata, što dovodi do njihovog prirodnog ponovnog smatanja (Goloubinoff, 1999). Šaperoni Hsp70, Hsp104, Hsp 100 i 110, Hsp90, Hsp60 i mali proteini toplinskog udara (small Hsp-s) predstavljaju glavne obitelji proteina koji djeluju kao nanostrojevi sposobni pretvoriti nefunkcionalne pogrešno smotane odnosno toksične polipeptide, ili u bezopasne polipeptide razgradive proteazama, ili u biološki aktivne pravilno smotane proteinske strukture. Kroz proces razmatanja, šaperoni mogu ispravljati krivo smotane trodimenzionalne proteinske strukture uz potrošnju ATP-a i tako kontrolirati kvalitetu proteina u stanicama (Finka i sur., 2016).

### 3.1. *Struktura Hsp70*

Hsp70 proteini dio su evolucijski očuvane superobitelji koja obuhvaća prokariotske DnaK i eukariotske Hsp70 proteine iz kojih su još dodatno evoluirali eukariotski Hsp110 proteini. Klasifikacija multigenских eukariotskih Hsp70 članova počiva na usporedbi životinjskih genoma s glavnim izoformama, koje se nalaze u svim staničnim dijelovima: HSPA1A i HSPA8 u citosolu i jezgri, HSPA5 u endoplazmatskom retikulumu i HSPA9 u mitohondrijima (Kampinga i sur. 2009). U ovoj terminologiji u biljkama ostaju nerazvrstani Hsp70 u kloroplastima koji dijele znakovitu sličnost s HSPA9 ukazujući na njihovo prokariotsko porijeklo (Kampinga i sur. 2009).

Svi članovi obitelji Hsp70 imaju faktor izmjene nukleotida (*Nucleotide binding domain-NBD*) (~40 kDa) i domenu za vezivanja supstrata (*Substrate binding domain-SBD*) (~25 kDa) povezane pomoću kratkog povezača, “karika” (Slika 2.) (Bertelsen, E. B. 2009). NBD se sastoji od dvije poddomene, I i II, koje su dalje podijeljene u regije a i b. Poddomene Ia i IIa stupaju u interakciju s ATP-om putem “kazeta” za vezivanje nukleotida (Flaherty, K. M. i sur. 1990, Bork, P.; Sander, C.; Valencia, A. 1992). SBD se sastoji od 10 kDa pretežito helikalne poddomene i 15 kDa  $\beta$ -sendviča (Zhu, X. i sur. 1996).



**Slika 2.**

Hsp70 se sastoji od domene vezanja nukleotida (NBD) od 45kDa, povezane s domenom vezanja supstrata (SBD) od 30kDa kratkom, hidrofobnom “karikom”. SBD sadrži  $\beta$ -sendvič i helikoidnu domenu “poklopca”. Prikazana reprezentativna struktura je prokariotska DnaK u kompleksu s ADP i peptidnim supstratom (izvor: PDB kod 2KHO).

### 3.2 *Molekularni mehanizmi djelovanja Hsp70*

Ciklus ATP-azne aktivnosti koja je vezana uz vezivanje ATPa u NBD dovodi do konformacijske promjene Hsp70 proteina čime dolazi do povećavanja afiniteta SBD prema

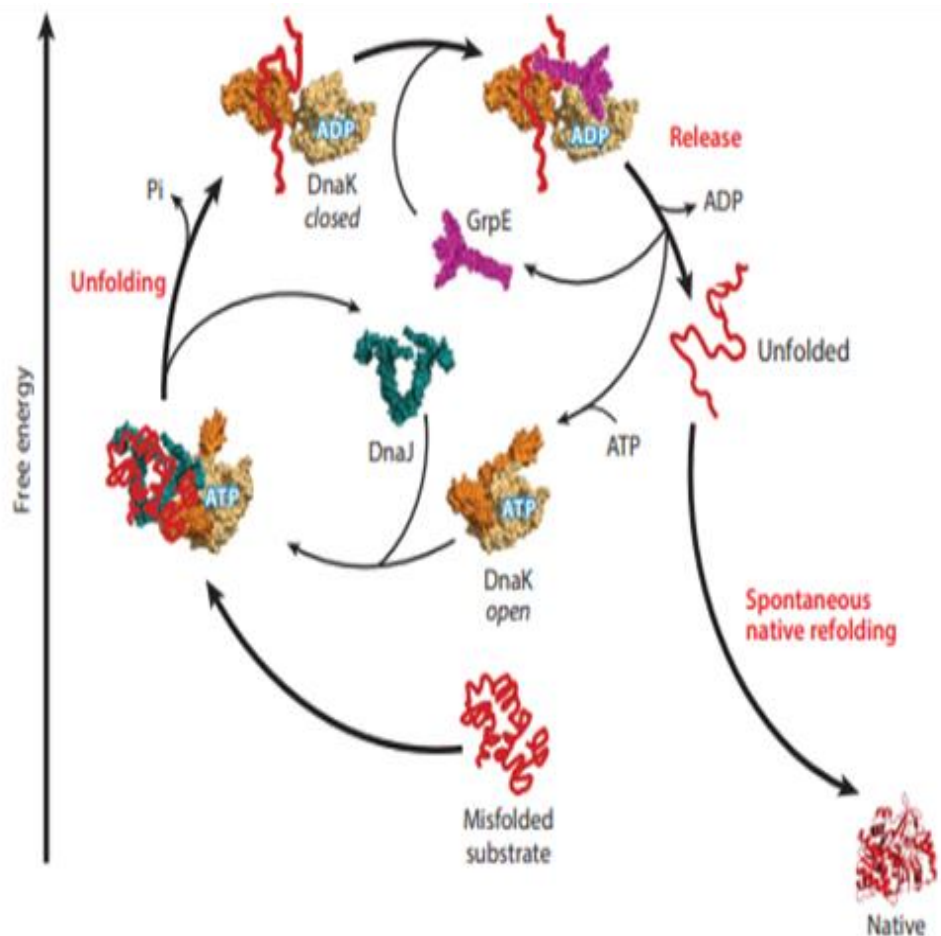
proteinskim supstratima (Mayer i Bukau, 2005). Hidroliza ATP-a dovodi do oslobađanja ADP-a i anorganskog fosfata (Pi), što pokreće drugu konformacijsku promjenu koja smanjuje afinitet SBD prema supstratu (Mayer i Bukau, 2005). Oslobađanje ADP-a omogućuje vezivanje ATP-a i pokretanje novog ciklusa ATP-aze (Mayer i Bukau, 2005). Ovaj ATP-om upravljani alosterički ciklus Hsp70 omogućuje ponovno vezivanje i oslobađanje supstrata, što rezultira sprečavanjem agregacije proteina i poticanjem presavijanja proteina (Mayer i Bukau, 2005).

### **3.3 Funkcije Hsp70**

Hsp70 je molekularni šaperon s višestrukim funkcijama u staničnoj proteostazi. Jedna od njegovih primarnih uloga je u savijanju proteina, gdje pomaže u savijanju novosintetiziranih proteina, kao i ponovnom savijanju denaturiranih ili pogrešno savijenih proteina (Mayer i Bukau, 2005). Tijekom sinteze proteina, Hsp70 stupa u interakciju s novonastalim polipeptidnim lancima, sprječavajući njihovu preuranjenu agregaciju i vodeći ih na ispravan put savijanja (Hartl i sur., 2011). U slučaju krivo presavijenih ili oštećenih proteina, Hsp70 može prepoznati i vezati se za izložena hidrofobna područja, sprječavajući njihovu agregaciju i potičući njihovo ponovno savijanje u njihovu funkcionalnu konformaciju (Mayer i Bukau, 2005). Dodatno, Hsp70 može djelovati zajedno s drugim šaperonima i ko-šaperonima kako bi se olakšalo savijanje proteina u specifičnim staničnim odjeljcima, poput endoplazmatskog retikuluma (ER) i mitohondrija (Hartl i sur., 2011). U ER-u, Hsp70 igra ključnu ulogu u kontroli kvalitete proteina pomažući u savijanju novosintetiziranih proteina i sprječavajući njihovu agregaciju (Mayer M.P. i Bukau B. 2005). U mitohondrijima, Hsp70 igra ključnu ulogu u uvozu i smatanju proteina. Pomaže u translokaciji proteina prekursora kroz mitohondrijske membrane i olakšava njihovo smatanje u njihovu funkcionalnu konformaciju. Hsp70 u mitohondrijima također surađuje s drugim šaperonima, kao što je Hsp60, kako bi se osiguralo ispravno smatanje proteina unutar mitohondrijskog matriksa, gdje se odvijaju mnogi vitalni metabolički procesi (Voisine C. i sur. 1999). Osim savijanja proteina, Hsp70 također igra ključnu ulogu u razgradnji proteina. Može stupiti u interakciju s ubikvitiniranim proteinima, vodeći ih do proteasoma za razgradnju, proces poznat kao ubikvitin-proteasomski sustav (UPS) (Mayer i Bukau, 2005). Štoviše, Hsp70 uključen je i u proces autofagije, koji je odgovoran za razgradnju staničnih komponenti lizosomskom razgradnjom (Hartl i sur., 2011). Hsp70 također je uključen u razne stanične procese izvan savijanja i razgradnje proteina. Pokazalo se da je uključen u stanične odgovore na stres, uključujući toplinski šok, oksidativni stres i oštećenje DNK, štiteći stanice od oštećenja proteina podržavajući preživljavanje stanica

(Mayer i Bukau, 2005). Hsp70 također igra ulogu u staničnom razvoju i diferencijaciji, kao i u putovima prijenosa signala, moduliranjem aktivnosti signalnih proteina i transkripcijskih faktora (Hartl i sur., 2011.). Dodatno, Hsp70 je uključen u imunološki odgovor, budući da može komunicirati s imunogenim peptidima i stabilizirati ih, olakšavajući njihovu prezentaciju imunološkim stanicama za prepoznavanje i aktivaciju imunološkog sustava (Pratt i Toft, 2003). Ove različite funkcije Hsp70 ističu njegovu važnost kao molekularnog šaperona te njegovu ključnu ulogu u raznim staničnim procesima.

Hsp70 proteini igraju ključne uloge u zaštiti stanica biljaka od: stresa (toplina i hladnoća), održavanju kvalitete proteina (uključujući enzime i proteine koji su uključeni u fotosintezu), regulaciji rasta i razvoja te borbi protiv patogena. Ovaj šaperon pridonosi proteostazi, kontroli kvalitete drugih proteina te za transport istih u normalnim i u stresnim uvjetima (Meimaridou, E. i sur. 2009).



**Slika 3.** Razmatanje i ponovno smatanje proteina asistirano putem Hsp70/40 (preuzeto od Finka i sur., 2016).

## 4. ALGE

Pojam alge označava netaksonomski naziv za veliku skupinu jednostavnih fotosintetskih organizama, koja varira od sićušnih jednostaničnih mikroalgi do višestaničnih višemetarskih morskih trava. Alge su polifiletski organizmi, što označava da se njihovo porijeklo ne može pratiti do jednog hipotetskog zajedničkog pretka (Reyes-Prieto, A. i sur. 2007). Cijanobakterije su prvi fotosintetski prokariotski organizmi koji se smatraju precima kloroplasta eukariotskih algi. Svi fotosintetski organizmi imaju klorofil-a koji apsorbira ljubičasto-plave i crvenkasto-narančasto-crvene valne duljine, a reflektira zelene i žuto-zelene valne duljine što je često povezano sa staništem u kojem obitavaju kao i o dubini vode u kojoj žive. Dodatni fotosintetski pigmenti, uključujući klorofil-b i beta-karoten, apsorbiraju energiju koju klorofil-a ne apsorbira kako bi, u procesu fotosinteze, povećale količinu svjetlosti koju mogu apsorbirati te ju koristiti za sintezu organskih molekula u kloroplastima. Klorofil pokreće kemijsku reakciju samo kada je povezan s proteinima ugrađenim u tilakoidnim membranama kloroplasta (Falkowski i Raven, 2007.; Whitmarsh i Govindjee, 1995.; Taiz i Zeiger, 2010).

Primarna endosimbioza je proces u kojemu su se fagotrofski, heterotrofni eukarioti putem endosimbioze spojili s fotosintetskim cijanobakterijama, i time stekli sposobnost fotosinteze. Endosimbiotska teorija upućuje da je kroz nekoliko ciklusa endosimbioza između cijanobakterija i ranih protističnih organizama dovela do nastanka prvog organizma koji sadži plastide prije više od jedne milijarde godina. Takoreći, primarnom endosimbiozom su fotosintetske cijanobakterije postale primarni plastid eukariotskih organizama koji tada imaju sposobnost fotosinteze. (Keeling, 2013). Genom plastida prošao je kroz evoluciju u algama i kopnenim biljkama, što je rezultiralo gubitkom ili prijenosom gena u jezgru domaćina, zadržavajući tako mali broj gena unutar primarnog plastida, uključujući i gene koji su zaslužni za fotosintezu. (Yoon, H.S. i sur. 2004). U procesu primarne endosimbioze nastale su tri skupine algi koje imaju primarne plastide, tvoreći glavnu skupinu autotrofnih eukariota, po imenu Archaeplastida, a to su; zelene alge (Chlorophyta- klorofiti i druge kopnene biljke), crvene alge (Rhodophyta- rodofiti) i Glaucophytes- glaukofiti (Keeling, P.J., 2005).

1.) Red crvenih algi, ili Rhodophyta je velika skupina koja se sastoji od oko 6000 vrsti, uglavnom višestaničnih makroalgi. Sastoji se od dva podroda; Rhodophytina i Cyanidiophytina, sa sedam razreda (Yoon, H.S. i sur. 2006).



Rhodophyta je evoluirala s plastidima koji nemaju pomoćne pigmente klorofila, već sadrže klorofil-a, fikocijanin i fikoeriterin, tako da svjetlost hvataju fikobiliproteini, koji su ujedno i zaslužni za njihovu crvenu boju (Glazer, A.N. 1997).

2.) Zelene alge nazivaju se Chlorophyta, a karakterizirane su prisutnošću kloroplasta s dvije membrane, naslaganih tilakoida i fotosintetskih pigmentata: klorofila-a i b (Tanaka, A. i Tanaka, R. 2019). Kao rezervu polisaharida koriste molekule škroba, koja se nalaze unutar plastida, što je karakteristika slična zelenim biljkama. Mutanti *Chlamydomonas reinhardtii* pokazali su biosintezu škroba sličnu škrobu biosintetiziranom u endospermu kukuruza (Busi, M.V. i sur. 2014). Chlorophyceae sadrži pet rodova: Chlamydomonadales, Chaetopeltidales, Oedogoniales, Sphaeropleales i Chaetophorales (Lemieux, C. i sur. 2015). Pojavili su se prije otprilike 470 milijuna godina, što označava jednu od najvažnijih evolucija, prilagodivši se svim fotičkim zonama planete Zemlje i utvrši put evoluciji za druge oblike života (Domozych, D. i sur. 2012).

3) Glaukofiti su skupina slatkovodnih mikroalgi koje sadrže plavozelene plastide koji se često nazivaju cijanelima. U pet rodova glaukofita opisano je oko trinaest vrsta. Plastidi glaukofita slični su cijanobakterijama, a razlikuju se od plastida drugih algi po tome što imaju tanku stijenku od peptidoglikana i sadrže samo fikobiline i klorofil-a (Jackson, C i sur. 2015). Glaucophyte su slabo proučen rod vjerojatno zbog svoje rijetkosti u prirodi i ograničenog staništa. Genomski podaci i bolje razumijevanje filogenetskog položaja glaukofita pružit će vrijedan uvid u endosimbiotsko podrijetlo i evoluciju plastida u eukariota (Figueroa-Martinez, F. i sur. 2018).

Tijekom evolucije, dogodila se još jedna, sekundarna endosimbioza, kada su drugi heterotrofni eukarioti „progutali“ crvene i zelene alge, što je rezultiralo nastankom mnogih drugih vrsta algi, s tri ili četiri membrane sekundarnog plastida (Keeling, P.J., 2004). To je vidljivo iz prisutnosti četiri membrane koje omeđuju plastide u klorarakniofitima, kriptomonadama, okrofitima i haptofitima, dok su dinoflagelati i euglenoidi vjerojatno izgubili jednu od ovih membrana, jer ih posjeduju tri (Archibald, J. 2007), dok je ostatak jezgre endosimbionta (nucelomorf) prisutan unutar klorarakniofita i kriptofita (Burki, F. i sur. 2016).

Analiza molekularnih sekvenci genoma i transkriptoma sugerira postojanje osam redova eukariotskih algi. Dinophyta (dinoflagelati), Glaucophyta (glaukofiti), Cryptophyta (kriptomonade), Euglenophyta (euglenoidi), Heterokontophyta (heterokonti), Haptophyta (haptofiti), Rhodophyta (crvene alge) te Chlorophyta (zelene alge) (R. E. Lee 2008).

Heterokonti su skupina algi koje uključuju dijatomeje, jednostanične alge koje se uglavnom nalaze u slatkovodnim i morskim okolinama. U heterokonte spadaju i smeđe alge (Phaeophyta), koje se razlikuju po prisutnosti pigmenta fukoksantina, koji je odgovoran za karakterističnu maslinasto-smeđu boju po kojoj je ova skupina i dobila ime (Kadam S.U. i sur. 2013). Smeđe alge su također, jedinstvene među algama jer se nalaze samo u višestaničnom obliku (Cock J.M. 2010.). U svijetu postoji oko 1500-2000 vrsta smeđih algi (Hoek C. i sur. 1995). Neke vrste, kao što je *Macrocystis pyrifera* (divovska alga), igraju važnu ulogu u ekosustavu, narastu do 20, i više, metara i tvore podvodne šume algi, bitna staništa za razne riblje vrste (Foster M.S. i Schiel D.R. 1985), te su često dio tradicionalne prehrane u azijskim zemljama, poput kelpa i wakame. . Dijatomeje su važne u ekosustavima jer proizvode velike količine kisika kroz fotosintezu (Baweja, P. i Sahoo, D. 2015).

Dinoflagelati su jednostanične alge koje imaju dva biča koja se vrte u suprotnim smjerovima, što im daje prepoznatljiv izgled (Sournia 1995). Neke vrste dinoflagelata mogu uzrokovati takozvanu crvenu plimu. Crvene plime ili štetno cvjetanje algi rezultat su brzog rasta i nakupljanja određenih vrsta mikroskopskih algi, posebice dinoflagelata. Uz promjenu boje vode, alge ankupljene na površini smanjuju dostupnu količinu svjetlosti u vodenom tijelu, što vodi ka manjoj fotosintezi što zauzvrat ima posljedicu smanjenje produkcije kisika u tom području. Uz to, kasnije umiranje algi te njihova degradacija od strane bakterija troše preostali kisik te uočeno količina dostupnog kisika nastavlja padati, što na kraju dovodi do pomora organizama. Nadalje, neke vrste proizvode toksine koji mogu naškoditi morskom životu i ljudima. Toksini koje proizvode dinoflagelati mogu se akumulirati u školjkama, što može dovesti do trovanja ljudi školjkašima (Zohdi E. i Abbaspour M., 2019).

Kriptomonade su jednostanične alge koje se uglavnom nalaze u slatkovodnom okolišu. Imaju karakterističan oblik sa dvije vrste flagela, a neke vrste kriptomonada mogu biti heterotrofne (Kim i sur., 2019).

Euglenofiti (Euglenophyta) su jednostanične alge bičarice, koje sadržavaju u stanicama isključivo zelene kloroplaste. Asimilacijom proizvode pored masti i naročitu rezervnu tvar sličnu škrobu, tzv. paramylum. Umnažaju se općenito samo uzdužnom diobom. Obuhvaćaju samo jedan razred: euglenoficeje (Euglenophyceae), koji je rasprostranjen većim dijelom u slatkoj vodi, a samo manji broj vrsta živi u moru (Van der Meer 2012). Neke vrste euglenoida mogu biti heterotrofne.

Haptofiti su skupina algi koje se često nalaze u slatkovodnim i morskim okolinama. Neke vrste haptofita mogu biti heterotrofne, dok druge koriste fotosintezu (Chrétiennot-Dinet 1997). Važni su u ekosustavima jer su osnovna hrana za mnoge organizme, uključujući ribe i plankton.

#### **4.1. Filogenetska podjela algi**

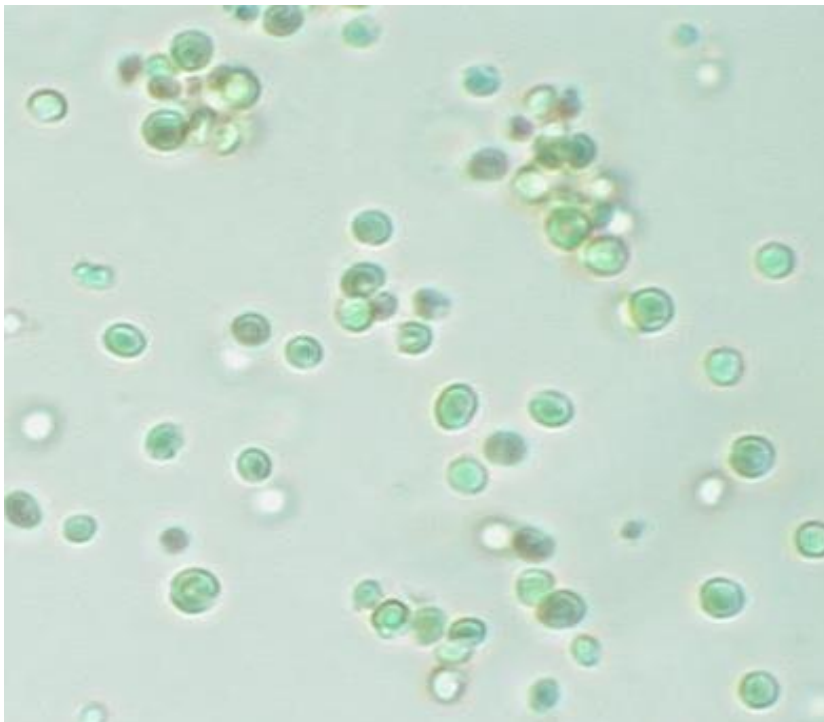
Primarna podjela algi temelji se na njihovoj pigmentaciji i staničnoj strukturi (Ragan 1989.; Yoon i sur., 2006). Prema ovoj podjeli, alge se dijele na tri glavne skupine: crvene alge, smeđe alge i zelene alge. Crvene alge su jedna od najstarijih grupa algi i karakteriziraju se specifičnim pigmentom fikobiliproteinom, koji im daje crvenu boju (Ragan 1989). Smeđe alge su također jedno od najstarijih skupina algi, nastale su vjerojatno tijekom sekundarne endosimbioze crvenih algi, a karakteriziraju se pigmentom fukoksantinom, što im daje smeđu boju (Silberfeld i sur., 2010; Kim i sur., 2011). Zelene alge karakteriziraju se pigmentom klorofilom, što im daje zelenu boju. Zelene alge se dalje dijele na dvije glavne linije: Chlorophyceae (klorofite) i Charophyte ili streptofite (Leliaert i sur., 2012; Lewis i McCourt, 2004). Unutar klade (grupe) klorofita tri su dobro podržane skupine: klorofiti, treboksiofiti i ulvofiti. Grupa harofita (Charophyte) nekad zvana i Streptophyta sastoji se od najmanje pet malih, ali različitih skupina zelenih algi koje dovode do vrlo raznolikog klasa kopnenih biljaka (Fawley et al., 2000).

Sekundarna podjela algi se temelji se na njihovoj ultrastrukturi i molekularnoj filogeniji prema kojoj se alge dijele na šest glavnih skupina: Archaeplastida, Excavata, Stramenopiles, Alveolates, Rhizaria, nazvanih „SAR“, naziv koji se danas koristi za tu supergrupu (Adl i sur. 2007), Amoebozoa i Opisthokonta (Adl i sur., 2012.; Adl i sur. 2007., Adl i sur 2005., Bhattacharya i sur., 2013). Skupina Excavata uključuje najčešće jednostanične organizme koji obavljaju fotosintezu npr. euglenoidi, dok skupina Rhizaria uključuje organizme koji se hrane sitnim česticama iz vode. Skupina Amoebozoa uključuje organizme koji se kreću pomoću pseudopodija, dok skupina Opisthokonta uključuje gljive i neke vrste algi (Adl i sur., 2012). Filogenetska podjela algi također ima važne posljedice za razumijevanje njihove ekologije i fiziologije. Na primjer, crvene alge, koje su najstarija skupina algi, specijalizirane su za život u dubokim vodama, gdje su izložene jakom tlaku i nedostatku svjetla (Fama i sur., 2014). Smeđe alge su prilagođene životu u hladnijim vodama (Müller i sur., 2019), dok su zelene alge najraznolikija skupina algi, koja se prilagodila različitim uvjetima, od slatkovodnih jezera do morskih obala (Trainor i sur., 2020). Istraživanje filogenetskih odnosa između vrsta otkrilo je sestrinski odnos između zelenih algi i crvenih algi s glaukofitima s početnom vrijednošću  $\geq 90\%$  (Price, D.C. 2012).

#### 4.2. *Nannochloropsis sp.*

Mikroalge se mogu pronaći u gotovo svim staništima na Zemlji, od polarnih područja do ekvatora kao slobodno plutajuće ili rasti pričvršćene za supstrate kao što su biljke i makroalge (Smith i sur., 2016). Mikroalge imaju raznolik raspon oblika i veličina, a najmanja je morska zelena alga *Ostreococcus tauri*, s prosječnom veličinom stanica od 0,8  $\mu\text{m}$  (Palenik i sur., 2003).

*Nannochloropsis* je rod jednostaničnih planktonskih organizama koje pripadaju: supergrupi Stramenopiles, redu Heterokontophyta/Ochrophyta, razredu Eustigmatophyceae i obitelji Eustigmataceae. *Nannochloropsis sp.* građene su od eliptoidnih ili cilindričnih stanicama, stanica promjera 1,5–4  $\mu\text{m}$  (Hibbert, 1980, Adl i sur. 2012). Sadrže žutozeleni kloroplast s glavnim pigmentom klorofilom te ksantofilima, violaksantinom i vaucheriaksantinom kao dodatnim pigmentima (Lubián i sur., 2000). Spolno razmnožavanje nije izravno zabilježeno, ali genomski dokazi upućuju na njegovu prisutnost kod nekih vrsta (Pan i sur., 2011). *Nannochloropsis* se javlja i u slatkovodnom i morskom okolišu. Trenutno se prepoznaje 5 vrsta (*Nannochloropsis australis*, *Nannochloropsis granulata*, *Nannochloropsis limnetica*, *Nannochloropsis oceanica*, *Nannochloropsis oculata*) jer su vrste *Nannochloropsis salina* i *Nannochloropsis graditana* nedavno prebačene u rod *Microchloropsis* (Fawley i sur., 2015).



**Slika 4.** *Nannochloropsis salina* CCMP1776, izvor: Sveučilište Wageningen UR, Nizozemska

U smislu rasta i metabolizma, *Nannochloropsis* se smatra "miksotrofnim" organizmom, što znači da može rasti koristeći i fotosintezu i unos organskih tvari. To joj omogućuje napredovanje u uvjetima i okruženjima u kojima bi se druge alge teško opstale, budući da se može prilagoditi promjenjivim uvjetima i preživjeti u područjima sa slabim osvjetljenjem ili niskim razinama hranjivih tvari (Kagan, M.L. i R.A. Matulka 2015).

*Nannochloropsis* se također može uzgajati u velikim količinama. Ovaj proces uključuje uzgoj mikroalgi u velikim, posebno dizajniranim bazenima ili jezercima, gdje se algama osigurava potrebno svjetlo, hranjive tvari i drugi uvjeti za rast i razvoj u industrijskim razmjerima. Također, odlikuje ih visoka produktivnost biomase i nakupljanje velike količine lipida, uključujući višestruko nezasićene masne kiseline, (omega-3 i omega-6), što *Nannochloropsis* čini posebno zanimljivim za potencijalnu komercijalnu primjenu, na primjer zbog: izvora proteina u budućnost ishrane (L. Zanella, F. Vianello 2020), izvora vitamina (A. Ljubić 2020), raznih mogućih upotreba lipida (biogorivo, vitamini itd.), (Boyd CE. 1968), (Xiao-Nian Ma i sur. 2016, T. Cai i sur. 2013), pigmente (L. M. Lubián 2000), tretiranje otpadnih voda (A. Mohseni i sur. 2020., E. S. Sofiyah i W. K. Suryawan 2020), izvor proteina u akvakulturi (M. Ashour i sur. 2018., I. Freire i sur. 2016) i sl.

## 5. MATERIJALI I METODE

Da bi se ustvrdilo postojanje HSP70 gena u *Nannochloropsis salina* CCMP1776, kao polazišni Hsp70 uzeta je proteinska sekvenca DnaK (HSP70) iz *E. coli* iz baze podataka UniProt ([UniProt/](#)).

Uspoređivanjem sekvenci, programom BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) Američkog nacionalnog centra za biotehničke informacije (NCBI), bakterijska DnaK uspoređena je s bionformatički predviđenim proteinskim sekvencama u genomu alge *Nannochloropsis salina* CCMP1776, te je tako ustanovljen broj Hsp70 proteinskih sekvenci, broj aminokiselinskih ostataka (dužina) pojedine sekvence Hsp70 i njihova sličnost.

Programom ExPASy ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) izračunata je izoelektrična točka  $pI$  i molarna masa (mW) svih sekvenci Hsp70 iz *Nannochloropsis salina* CCMP1776.

Programom TargetP (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TargetP-2.0/>) je predviđena lokaliziranost hipotetskih proteina u stanicama *Nannochloropsis salina* CCMP1776.

Programom CLC Genomics® uspoređene su proteinske sekvence Hsp70 alge *Nannochloropsis salina* CCMP1776 sa aminokiselinskim slijedovima *Homo sapiens* te *Arabidopsis thaliana*, napravljeno poravnavanje proteinskih sekvenci te filogenetsko stablo svih Hsp70/110 proteina iz gore navedenih organizama.

Programom ESPript (<https://esprpt.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>) dobiveni su grafički ispisi korišteni u izradi ovog rada.

Programi MS Office korišteni su za potpunu tekstualnu, statističku i grafičku obradu podataka u ovom radu, (Microsoft Office Professional Plus 2010, Version 14.0. 7128.5000).

## 6. REZULTATI

### 6.1 *Nannochloropsis salina* CCMP1776 posjeduje deset Hsp70/110 sekvenci

Genom *Nannochloropsis salina* CCMP1776 ima veličinu genoma od 27,8 Mb (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/SDOX01?display=contigs&page=1>). S ciljem utvrđivanja bioinformatički predviđenih proteinskih sekvenci HSP70/110 gena u *Nannochloropsis salina* CCMP1776, proteinska sekvenca Hsp70 iz *E. coli* (DnaK) je identificirana u bazi UniProt i uspoređena s bioinformatički predviđenim sekvencama *Nannochloropsis* u NCBI bazi podataka putem BLAST bioinformatičkih alata. Deset utvrđenih proteinskih sekvenci koje sadrže prosječno 700 aminokiselinskih ostataka pokazalo je značajnu sličnost s DnaK uz podudaranje od 47% do 94% (Tablica 1.). Usporedbom sekvenci s katalogiziranim ljudskim proteomom, nađeno je da sedam sekvenci pripada Hsp70 obitelji gena, a tri sekvence pripadaju Hsp110 obitelji gena.

Molekularna i biokemijska svojstva deset HSP sekvenci određena su računanjem različitih parametara, putem bioinformatičkih alata: BLASTP, ExPASy, pSORT, Target P (vidi Materijale i metode) i prikazana su u tablici.

Putem ExPASy programa određene su prosječne molekularne težine (Mw) aminokiselina u pojedinim Hsp proteinima koje pokazuju vrlo uzak raspon od 105.6 do 109.9 g/mol, što ukazuje na prilično konzervirane primarne sekvence proteina.

Prosječni pI bio je relativno nizak, s rasponom od 4.51 do 6.57, što ukazuje na različitu raspodjelu pojedinih Hsp70 proteina u endomembranskim odjeljcima stanica. Da bi bolje utvrdili raspodjelu Hsp70 proteina u stanici, bioinformatičkim putem svaka je Hsp70 sekvenca analizirana putem programa (pSORT, BLAST, TargetP) i dobiveni rezultati ukazuju da su dva Hsp70 i jedan Hsp110 protein potcijalno lokalizirani u citosolu/jezgri, dva u mitohondrijima, dva u kloroplastima, te dva Hsp70 i jedan Hsp110 u endoplazmatskom retikulumu.

Posebna usporedba svake Hsp70 sekvence iz *Nannochloropsis* s proteinskim sekvencama iz uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) i čovjeka (*Homo sapiens*) klasificirala je svaku sekvencu. Kako se sličnost primarnih slijedova aminokiselina odražava na sličnosti proteinskih struktura za pretpostaviti je da će slične sekvence u *Nannochloropsis* i u *Arabidopsis*u imati istu funkciju i staničnu lokalizaciju te stoga može biti primjenjena ista nomenklatura za Hsp70 proteine.

| Kod gena (GenBank)         | Kod gena (NS) | Broj amino-kisellna u Hsp70 | Mw     | pI   | Prosječna Mw amino-kiselina u Hsp70 | Predviđena stanična lokalizacija (TargetP) | <i>A. thaliana</i> Ortoloji, geni i stanična lokalizacija | <i>H.sapiens</i> Ortoloji i stanična lokalizacija |
|----------------------------|---------------|-----------------------------|--------|------|-------------------------------------|--|---|---|
| <a href="#">TFJ83334.1</a> | NSK_005398    | 663                         | 72122  | 5.17 | 108.8                               | 99% citosol                                | HSP70-2<br>AT5G02490<br>citosol/jezgra                    | HSPA1A/8<br>citosol                               |
| <a href="#">TFJ87713.1</a> | NSK_001063    | 885                         | 95510  | 5.00 | 107.9                               | 99% citosol                                | HSP70-14<br>AT1G79930<br>citosol/jezgra                   | HSPH3<br>citosol                                  |
| <a href="#">TFJ83145.1</a> | NSK_005565    | 820                         | 86610  | 5.15 | 105.6                               | 80% signalni peptid                        | HSP70-16<br>AT1G11660<br>citosol/jezgra                   | HSPH1<br>citosol                                  |
| <a href="#">TFJ83252.1</a> | NSK_005414    | 476                         | 50912  | 6.10 | 107.0                               | 99% citosol                                | HSC70-1<br>AT5G02500<br>citosol                           | HSPA13<br>citosol, ER                             |
| <a href="#">TFJ83042.1</a> | NSK_005667    | 938                         | 102452 | 5.30 | 109.2                               | 99% signalni peptid                        | HSP70-17<br>AT4G16660<br>ER                               | HYOU1<br>ER                                       |
| <a href="#">TFJ80064.1</a> | NSK_008622    | 664                         | 72974  | 4.80 | 109.9                               | 99% signalni peptid                        | HSP70-12<br>AT5G42020<br>ER                               | HSPA5<br>ER                                       |
| <a href="#">TFJ88644.1</a> | NSK_000213    | 685                         | 73004  | 5.62 | 106.6                               | 80% mitohondrij                            | HSP70-10<br>AT5G09590<br>mitohondrij                      | HSPA9<br>mitohondrij                              |
| <a href="#">TFJ88236.1</a> | NSK_000587    | 539                         | 58114  | 6.57 | 107.8                               | 61% mitohondrij                            | HSP70-9<br>AT4G37910<br>mitohondrij/<br>citosol           | HSPA9<br>mitohondrij                              |
| <a href="#">TFJ88690.1</a> | NSK_000259    | 737                         | 79811  | 5.26 | 108.3                               | 89% signalni peptid                        | HSP70-5<br>AT1G16030<br>plastid                           | -   |
| <a href="#">TFJ84871.1</a> | NSK_003903    | 960                         | 103330 | 4.51 | 107.6                               | 99% signalni peptid                        | HSP70-7<br>AT5G49910<br>plastid                           | -   |

**Tablica 1.** Tablica prikazuje svojstva *Nannochloropsis salina* CCMP1776, *Homo sapiens* te *Arabidopsis thaliana* Hsp70/110 bioinformatički predviđenih proteinskih sekvenci.



## 6.2. Hsp70/110 u citosolu

Prema prije navedenim rezultatima, predviđena je citosolna lokalizacija jednog Hsp70 kojeg smo ovdje zbog sličnosti s proteinom iz *Arabidopsis thaliana* nazvali *Nannochloropsis salina* CCMP1776 Hsp70-2 (NsHsp70-2) te dva Hsp110 proteina koji su po istom principu imenovani NsHsp70-14 i NsHsp70-16 i opisani su u daljem tekstu. Potpuna kodirajuća nukleotidna sekvenca NsHsp70-2 proteina sačinjena je od 1992 nukleotida (pristupni broj: TFJ83334.1) koja odgovara proteinu od 663 aminokiseline (Slika 5.). Protein ima molekularnu masu od 72 kDa i teoretsku izoelektričnu točku (pI), od 5.17, kako predviđaju ExPASy alati (Tablica 1.). Izvedena aminokiselinska sekvenca Hsp70-2 sadrži domenu koja veže na sebe proteinski supstrat (ostaci 9-88) i domenu koja veže ATP (ostaci 140-381, slika 5.). Štoviše, niz jedinstvenih ponovljenih motiva GG[X]P, u ovom slučaju GGMP (619-638), i citosolni motiv specifičan za Hsp70, EEID (ostaci 660-663), pronađeni su na karboksilnom kraju Hsp70. Usporedbom s ljudskim Hsp70 šaperonskim sekvencama, utvrđena je sličnost s HspA1A i HspA8 proteinima što ukazuje na postojanje citosolnog Hsp70.

Drugi predviđeni citosolni *Nannochloropsis salina* CCMP1776 Hsp70-14 (pristupni broj: TFJ87713.1) je član Hsp110 obitelji šaperonskih proteina s kodirajućom nukleotidnom sekvencom od 2658 nukleotida koji odgovaraju proteinu od 885 aminokiselina (Slika 6.). Predviđeni su molarna masa od 96 kDa te pI od 5.15. U slijedu aminokiselina, domena za vezanje supstrata nalazi se od treće do 82. aminokiseline, a nukleotidno vezno mjesto od 135. do 391. aminokiseline. NsHsp70-14 pokazuje izrazitu sličnost s ljudskim ortologom HspH3, ukazujući specijaliziranu funkciju Hsp110 proteina

Treći predviđeni citosolni Hsp70 jest NsHsp70-16 (pristupni broj: TFJ83145.1) član je Hsp110 obitelji šaperonskih proteina s kodirajućom nukleotidnom sekvencom sačinjenom od 2463 nukleotida koji odgovaraju proteinu od 820 aminokiselina (Slika 7.), predviđena molarna masa iznosi 87 kDa i pI od 5.15. U lancu proteina, domena za vezanje supstrata nalazi se od 51. do 153. aminokiseline, a nukleotidno vezno mjesto od 199. do 500. aminokiseline u polipeptidnom lancu. NsHsp70-16 pokazuje izrazitu sličnost s ljudskim ortologom HspH1, ukazujući specijaliziranu funkciju Hsp110 proteina.

Četvrti predviđeni *Nannochloropsis salina* CCMP1776 Hsc70-1 (pristupni broj: TFJ83252.1) smješten u citosolu, član je Hsp70 obitelji šaperonskih proteina s kodirajućom nukleotidnom sekvencom od 1431 nukleotida koji odgovaraju proteinu od 476 aminokiselina (Slika 8.). Predviđeni su molarna masa od 50.9 kDa te pI od 6.10. Predviđeni su molarna masa koja iznosi

73kDa i pI od 4.80. U lancu proteina, domena za vezanje supstrata nalazi se od 12. do 161. aminokiseline, a nukleotidno vezno mjesto od 187. do 476. aminokiseline. Promatranjem ove anomalije utvrđeno je da sekvencirana genomska DNA iz koje su navedene aminokiseline je nakon toga prekinuta i ne može se dalje utvrditi koliko nedostaje nukleotida (podatci nisu prikazani).

```

atggcatccgcagtggaaggcgaatccgtgggcatcgacctgggcaccacactactcctgc
M A S A V E G E S V G I D L G T T Y S C
gtaggagtctggcagaacgaccgctggaattatcgccaatgatcagggaaatcgcaca
V G V W Q N D R V E I I A N D Q G N R T
accocctctacgtggctttcaaggagtcgagcgcctgatcggcgacgctgccaagaat
T P S Y V A F T E S E R L I G D A A K N
cagggtgcaatgaacgcctccaacactgtcttcgacgccaagcgcctgatcgggcccgg
Q V A M N A S N T V F D A K R L I G R R
ttctcggaccocggtggctcaggggacatgaagcactggcccttcacggtcgtgcagggc
F S D P V V Q A D M K H W P F T V V Q G
ccgggggcaagccgctcatccaggtcaactcaaggggaaaccaagaccttcgcgccc
P G G K P L I Q V N F K G E T K T F A P
gaagagatctcctccatggtcctgatcaagatgctgagatcgcgagggcctatctagc
E E I S S M V L I K M R E I A E A Y L G
aaggagtggaagaacccgctcattaccgtgcccgcctacttcaacgactcgcagcgacag
K E V K N A V I T V P A Y F N D S Q R Q
gccaccaaggacccggcgcgattgcccgactgaacgtgctccgcatcaatgagccc
A T K D A G A I A G L N V L R I I N E P
accgcccgccttgcctacggcctggacaagaagggcgcgagaagacggtcctcatt
T A A A I A Y G L D K K G A E K T V L I
ttcgacttgggaggaggacacttcgacgtgtccctcctgacgatcagggagggcatcttc
F D L G G G T F D V S L L T I E E G I F
gaggtgaagcccacggcgggcagacgcacctgggtggggaggacttcgacaaccggatg
E V K A T A G D T H L G G E D F D N R M
gtggagtactgcacggccgagttcaagaagaagcaccgaaaggcatcaccagcaaccag
V E Y C T A E F K K K H R K D I T S N Q
cgcgccctccgctctcgcgacggcctgcgaacgcgccaagcgcacctgtcctcctcc
R A L R R L R T A C E R A K R T L S S S
accaggtccacatcgagattgactctttgttcgagggcatcgacttcaaccaccatc
T Q A H I E I D S L F E G I D F N T T I
acggggctcgtctcgagatctgaacatggactactccggaagtgcattggagcccgtg
T R A R F E D L N M D Y F R K C M E P V
gagaaggttttcgcgacgccaagatcgccaaaagccaggtggacgaggtggtgtagtg
E K V L R D A K I A K S Q V D E V V L V
ggcgggtccacgcatcccccaaggtgcagacgatgctcatcgacttcttcaacgggaag
G G S T R I P K V Q T M L I D F F N G K
gagccctgcaagagcatcaaccccgacgagggcctgcctacggggccacgggtgcagggc
E P C K S I N P D E A V A Y G A T V Q A
gccatcctctcggggcacaacaagagcggagaagctctcggacctcctgctcctggacgtg
A I L S G H N K S E K L S D L L L L D V
acgcccctctcctcggcctggagacggcgggcggtcatgaccacgctcatcaagcgc
T P L S L G L E T A G G V M T T L I K R
aacaccaccggtgcccgcaagaagagccagaccttctccacatacggcgaacaaccagccc
N T T V P A K K S Q T F S T Y A D N Q P
ggtgtgctcatccaggtgtacgagggcgagcgcgcatgaccaaggataacaacctgctg
G V L I Q V Y E G E R A M T K D N N L L
ggcaagtttaacctggacgggatccccccatgccccggggcagccccagatcgacgtg
G K F N L D G I P P M P R G Q P Q I D V
actttcgacatcgacgccaacggcattttgaacgtgcacgcggtggagaagggcaacgggg

```

T F D I D A N G I L N V H A V E K G T G  
aaggagaacaagatcacccatcaccaacgacaagggcgctctctcgcgacgagatcgag  
K E N K I T I T N D K G R L S A D E I E  
cgcatggtccaggagggcgagcgtacaagcacgaggacgaggtgaaccggaccggatc  
R M V Q E A E R Y K H E D E V N R T R I  
gaggccaagaacggtctggagaactacgcttctccatccgcaacaccatcagcgaacc  
E A K N G L E N Y A F S I R N T I S E P  
cagatggcggagaagatgtcggcctcggacaaggagaccgtggagaacaagatcaaggag  
Q M A E K M S A S D K E T V E N K I K E  
gtgaccgaatggctggacacgaccagtcggccgagaaggaggagttcgaggccaagcag  
V T E W L D T H Q S A E K E E F E A K Q  
aaggagctcgaggggtgtagtgctaccatcctgcagtcgctctcagggggcgccggtgg  
K E L E G V V L P I L Q S L S G G A G G  
atgcccggggggatgcccggggggatgcccggggggatgcccggggggatgcctgacatg  
M P G G M P G G M P G G M P G G M P D M  
ggagcgggaggagcaggtgcagggccttcaccggcggcggagcagggggccaagatcgag  
G A G G A G A G P S P A A D E G P K I E  
gaaattgattaa  
E I D -

**Slika 5.** Prikaz kodirajuće i aminokiselinske sekvence Hsp70-2 proteina iz alge *Nannochloropsis salina* CCMP1776; TFJ83334.1. Ljubičasta boja prikazuje SBD, tirkiznoplava NBD, sivo su označeni specifični motivi koji su uključeni za interakciju s drugim citosolnim proteinima.

atggcgggtgtaggaatcgacctggggaatctcaacatcgtaattgcccaggtcaacgt  
M A V V G I D L G N L N I V I A Q A Q R  
ggcgggtgtagcgttaattcttaataaaaactccaaccgacagaacccaaacttggctctc  
G G V D V I L N E N S N R Q N P N L V S  
atttcggacaagcagcgtttcgttggtagaacaggeccctgacgctggccaggtcgaattac  
I S D K Q R F V G E Q A L T L A R S N Y  
aagaacaccatctagccacaagcgttttatcggaaaacagtagcatgaaccagacgta  
K N T I Y A T K R F I G K Q Y D E P D V  
cagaagaagagattcagtcactgcatgtaaggtgggtaaaactgccctcggggggggtcggg  
Q K E I Q S L P C K V V K L P S G G V G  
tatgaggtgacatacggcggggaggtcactgtgctgtcaccggagcaggttagtggccatg  
Y E V T Y G G E V T V L S P E Q V V A M  
ctcttcgccaaagtcaatgacatcgtaaggccgcaaacacaacgtggctatcgccgag  
L F A K V N D I V K A A N N N V A I A E  
gctgtagtagcattcctgggtggtttacagacgcgcaacogtgcgctttttggatgag  
A V V A I P G W F T D A Q R R A V L D A  
gcggacatcgcaaggttgaacgtgttgcgtctcatgcacgagtcaccgctgtagcgtt  
A D I A G L N V L R L M H E S T A V A L  
tcgtatggcatctacaagtcgtccgcaactgttccacgaaagcgaccacaacatgac  
S Y G I Y K S V R N L F H E S D P Q H V  
ctcttggttgatttgggtcattcgaattttgtgcgtccggtggcgttcatccagggg  
L F V D L G H S N F C A S V V A F I Q G  
aagttgattgtcaagtcagctgtttacgacaggagtctgggagggcgggacttcgaccag  
K L I V K S A V Y D R S L G G R D F D Q  
cagatcgtgattcatgagcagagcaggttcgttctaaagtacaaacaagacccccgagag  
Q I V D F M A E Q F V S K Y K Q D P R E  
caccccaagcattgctgaaatgcaggcggcagcagaaaaggcgaagaagactctgtcc  
H P K A L L K L Q A A A E K A K K T L S  
ccagcggcgtgtcggaggcatccatttcgggtggagtgctgttggaggacacggacttg  
P A G V S E A S I S V E C V L E D T D L  
aacacggccttgcattggaggaattcgagaagcgcgcacagccccttctcgtcgttta  
N T A L S L E E F E K R A Q P L L A R L  
gacggtcccatcagcaggcaatggctgagggggagattgcccgaacagctcgctaac  
D G P I M Q A M A E A G V L P E Q L A N  
gtcaggttagtggcgggtggcagcggcgtgaactctgtcaaattgcacatcgccgcttg  
V E V V G G G T R V N S V K L H I A A L  
ctgaagctggacaagaataagctgaactatggcttgagcaccagtttaaatgcagacgag  
L K L D K N K L N Y G L S T T L N A D E  
gccgtatcccagcgtgtcgtttgcaagcagccattctctcgtcgcgcttccaggtcaaa  
A V S R G C A L Q A A I L S S R F Q V K  
ccctcagaggttctcagggcagtcctatccgatcaagotgagttgggagggaagagggc  
P F E V L E A C P Y P I K L S W E E E A  
tcgaccaacctatggcagggagcgaacagggagcggggggcgaggggtgatgatggagcc  
S T T P M D E D E T G A G G E G D D G A

gttaagcgaggagataattcgggtgctactcttcaagcgcaacgacaggggtgcccaatcag  
V K A G D N S V L L F K R N D R V P N Q  
cgccggatcaccttccggaggacgcccacttcaccgtcacggcggcgtacgaggactcc  
R R I T F R R D A D F T V T A A Y E D S  
ggcgtgtcccttctgccccagggcacgaagacggagatcgcatccttccgagtgggcatt  
G V S L L P P G T K T E I A S F R V A I  
ccgaaagacaccaagggtcggggcgaagacgaaggtccgtctgagctcgtgtacaac  
P K E H Q G L G A K T K V R L S L V Y N  
ttgcaggtgtcctagtgatgacgcagggccaactcatggaggaggttcagacggtgcca  
L H G V L V M T Q A Q L M E E V Q T V P  
ccagccagcgcaggagcggagactgggaaggcggagcccggcgaagagggtatgaaggcc  
P A S A G A E T G K A E P G E E G M K A  
gcagaggctgcccgggagcggagtggggggggtgacacagctgcccgaagctgcttcggcc  
A E A A G D G V G G G D T A A E A A S A  
atggaagagaaagaaagaggaccagcctgcgaagccggaacgggttcggcgacagcg  
M E E E K K E D Q P A K P E T V A A T A  
acaaacgagggcggcaaacagaagaagaagtataagactcattctcgggtgtggtgacg  
T N E A A K Q K K K Y K T H S L G V V T  
aaggcggcggccttgtcaaatcgggagaaggacgcggtttgtagaaatagaggcccagatg  
K A P G L V K S E K D A F V E I E A Q M  
gagcaacagacccgatcattcgtgagactgcccacacgcacacgcctcggagctctac  
E Q Q D R I I R E T A D T R N A L E S Y  
atztatgatctgaaggccaagtgggggacagcctcaagccgtacgtgcaagacgagggcc  
I Y D L K A K L G D S L K P Y V Q D E A  
gccacggccttcaagcggcagctggaggaggtggaggagtggtgtacggcagatgaggcc  
A T A F A N A Q L E E V E E W L Y G D E G  
ttcgactcgaccacagctccatctacgggggaagctcgccaccctcggagcactcggcgat  
F D S T K S I Y A G K L A T L R A L G D  
cccattcaagtgccgatggacgagccagcaagcggggagccggctcgattgaattctgc  
P I Q V R M D E A S K R E P A R I E F C  
cggcaggttgaggagtacaagacgcttcaagtcgacagaggagaagtacagccacatc  
R Q V E E Y K T L V K S T E E K Y S H I  
acggatgaggaacgcaataaagtccgtgaggaggtgaatggagcggagctcctggctcttc  
T D E E R N K V R E E V N G A E S W L F  
gacctacttgccaagcagaacgagctaccgtcccacgtggatccagttttgacggtggt  
D L L A K Q N E L P S H V D P V L T V G  
gccatcaaggagcgcagcaaatgcttagcacacgcgcttttgccagtaatgaaccgcca  
A I K E R Q N A L A H A V L P V M N R P  
aaaccgcccggccccggcccagcgcagctcctcaccctcgcacagagtggtgtgaa  
K P P A P A P A P A P A P S P S A T S G V E  
gacaaaaacggccggcaaacgagggcgatggtgtcgaggcaacaaccaaggaggagcg  
D K T G P E S K G D G V E A T T K E G A  
acggaaccaaccgcatggtgaagtggtgcaaccgctgcagagaatgaacagacttcc  
T E P T A M D E G G A T A A E N E Q T S  
atggacaccgctcttga  
M D T A S -

**Slika 6.** Prikaz kodirajuće i aminokiselinske sekvence Hsp70-14 proteina iz alge *Nannochloropsis salina* CCMP1776; TFJ87713.1. Ljubičasta boja prikazuje SBD, tirkiznoplava NBD.

atgtggctctggctactctgcaacagggaggaccgcccattacgctttcaaaaagcagccc  
M W L W S S A T G R T A H Y A F K K Q P  
caagcgcggcgtcctccgtatccctccttcccttactcctcctcacttcccttctgctt  
Q A P A S S V S L L P L L L L T S L L L  
cagcggatgcccagcctgctgactcccatctccatgggcatcgacctcggcaatcacaaa  
H A D A S L L T P I S M G I D L G N H K  
agcgtggttgccctggcgcagggacacggcatcgatgtccacgtcaatgagatggggcgc  
S V V A L A Q G H G I D V H V N E M G R  
cgcgagactccctcgggtaacttttgggggtcgcagcggcatttcggggatttggcc  
R E T P S A V L L R G R R R H F G D L A  
ctggcgggtgcaggcggcggcggcaagcggcgtgagtgagttgcggcctcctggct  
L A G A G A A P A S A V S E L R R L L A  
ctgggtctgcccgtcgacgagggagcgggtggccgaggagatgggggagacgagggtaag  
L G L P V D E E D G G R G D G G D E G K  
gacgtggggaggtcttggggcagcgggttggggcagggcggggcggagacccttgc  
D V A E V F G A A V V G T G G A E D P C  
cagtggggcccacgctgctgagtcgagcagcagcggcggcggcctgacgctgagcgcggy  
H V G P R V R V E H D G R A L T L S A R  
caagtgtcgcgatgttctgttcccacctcggcaaaaggcgtggaggccccaacggggag  
Q V L A M F V A H L R K G V E A A N G E  
gacaacgtcctgaacacggctcctgagcgtccccgcctggttcgggagggggcagcggggc  
D N V L N T V L S V P A W F G R G Q R A  
ttggctcgtgagcagcagggatcggcgggtgtgcccagccccgcctgctgacggacggg  
L V V D A A R I A G C A S P A C V T D G  
accgcttggccctgggtatggcttgcctgaaactgcccggaggcggagccggccaaggt  
T A L A L G Y G L L N V R E G E P A K V  
gtgatgttcgtgtagggcagcagcggcggcaaatcagcagcggcgggtctcgggg  
V M F V D V G H A S A Q I T I A R V S G

gaagcctgcgagattctggccatgcctgggatcgcgactcggctgtgggagcttggat  
 E A C E I L A H A W D R R L G C G S L D  
 cgatgtctgtacgaatccttggctgcagaaaccatgcttccgggagggcgggtcgaagg  
 R C L Y E S I L Q K P C F R E G G V E G  
 agggagggagggagggagggagggagggaaaagcaggaggaagatggcgggaaggcgcg  
 R E G G R E G G R E K Q E E D G G K A R  
 ggttttctgggttgggaaaggggtaaagagggagccaccagagaggggctgctg  
 G F L G L G K G V K R E A P R E G A S L  
 tcgcagcggcccgctaggctcttggccgctgtggaagcgcgaagaagacgttgagc  
 S Q R A R G R L L A A C G R A K K T L S  
 gcgaacaagagcccttcgtgagcttggagagcctcttggagggggcagggacgtgacg  
 A N K E A F V S L E S L L E G G R D V T  
 tgtcagtggtccagggagggaggtgaggtgcatgggccccaggtgagaatttgcgg  
 C R V S R E E A E A A W A P Q V K N L R  
 caactttccggcggcagtggaagagggcgaaagggagggggggggagggcggg  
 Q L C R R A V E E A A K R E G G G E G G  
 ggggagggcggaatcgggtcgacaccatagagctcgtgggccccgttcgcatatccc  
 G E G G I R V D T I E L V G G G S H I P  
 tgctacgtggcccgtagagggcagaaatgctgaccatggcccttcgcccccccgtc  
 C Y V A A V E A E M L T M A P S P P P V  
 ctccggcgaccctgaacccgctgaagcgttgcggcggtgccccttgacggcagcc  
 L R R T L N A A E A V A R G C A L T A A  
 ctgcactcggagccctccgactggcgagacccttccgggtgtgggacgcccctccctcgc  
 L H S E A F R L A R P F R V W D A L P R  
 tcccttggagtgaggagtggaagggcgactgctcttcccgcgctagagcgggaatg  
 S L E V R S G K G R L L L P R L E R G M  
 cctctacgccaccacccccaggggtgggtatgagggcggaggtggagatggacggggagg  
 P L R H H P Q G G Y E A E V E M D G E D  
 gaggagggagaggtggagggggcggggcttggaggtccgcgctcagaggaaggg  
 E E E G E V E G G G G L E V R V E E E G  
 agcggcttgggtgctgcggggattttcgcgctctttcaaacagcgtggagggcggcc  
 S G L V A A R G F S R L F S N S V E A A  
 gggcgggggagggggagggaggttggagcgtggttgaagctggacgtgtgggt  
 G R G A G G G E R L R T W L K L D V W G  
 cgccccctcctggcccgctacgcatcgcgctgggctgagggagagacggagggaggg  
 R P S L G P L R I A R W A E G E T E G G  
 aagggacagggagggagggaaagcggcggagggagggaggtgcttggggcggagtg  
 K G Q E G G G K A A E E E E V L G A E W  
 gaggcggagcttccgagcaaggaggtgagggcagggcggcggctcagagggcc  
 E A G A L P S K E E L E A G T A V E E A  
 atggcggggtgacgggaggtggaggaatgcttggaggcaagaacgcgctcagagac  
 M A A V D R E V E E C L E A K N A L E S  
 ctgctgaccggtgtaagggagggaggaagcggggcggttccgagggcccgtgcgtt  
 L V Y R C K G G E E A G A G S E A R A L  
 gcggagggcgtcgagacatggctggaggagcagagggggagggcagcagcagggggcg  
 A E A V E T W L E E R E G E A E H E G A  
 gtgggggagtagcagggagaagcgggaggttgggtgctgacttgcgcgatgtgcgg  
 V G E Y E E K R E G L L A A L A R D V R  
 gctgcccaggtgaggtggcggggggtgggggagaagcgggatgggaaagggcggga  
 A A R V E V A A G V G E K A G W E R A G  
 aagtacagacaccacgaccgacagagaagggaaagggagggagggagcgtgctcaggt  
 K S Q T P T T D R E R E E E E D G V E V  
 gtattcgatttggaaaggggtgaaagcagcagggaggggggtgcccgagtgggaaa  
 V F D L E G E G E S S E E G G A R S G K  
 tga  
 -

**Slika 7.** Prikaz kodirajuće i aminokiselinske sekvence Hsp70-16 proteina iz alge *Nannochloropsis salina* CCMP1776; TFJ8145.1. Ljubičasta boja prikazuje SBD, tirkiznoplava NBD.

atggcagcagttgggttcaaaggacggatcaacgtcgttggcgtcgatctaggcagcagc  
 M A A V G F K G R I N V V G V D L G T T  
 ttttccgtggcccgctcaacgagcatgggagtggtgcccgtgatcaaaagacaagtggggg  
 F S V A A V N E H G S V R V I K D K W G  
 aacccctgggtccctccatcgtctccttggccccctgacgggggggtgtgggtgggaaag  
 N P L V P S I V S L A P D G G V W V G K  
 gaggcccgcgaacgccttgcaccgctcccgcactgtctacgacgccaacgcttcc  
 E A R E R L A L H P S R T V Y D A K R F  
 atcggccgagagtagcagtagggttggatagcgtgggggggtaaggacgaggggcaa  
 I G R E Y V G G L Y A V G G V K D A G Q  
 tatggggaggttgggggaggaagctctgggctgtggaagcagcagcagatattcttcc  
 Y G E V G G R K L W A C G R T A R Y S F  
 catgcttccgaatggcaattatcaacacttttccctccttctctgctcccgtcccat  
 H A F E W Q L Y Q H F S L L P S S P S H  
 tccaatgcaaccatcctcggcgctccccccctcagtttccgaagactcaaccgtgagg  
 S N A P I L R A L P P L S F E D S T V R  
 gaggagggcgggcgcacatccttccgctggctcagcagcagcagccttctcaggcgtc

**E** E A G R H P F A V V E H A S P F S G V  
 ggttccaagtggccctggccaggtcaacaagcggtcatcgagttcctgccaattc  
 G F Q V A P G Q V N K A V I A V P A K F  
 acccctcggaacacagccacagcgcaagcatttaagcgcgggacttaaggatg  
 T P R Q K Q A T G E A F K R A G L K V M  
 cgctgctggaagaacccacagcgccatcgctacggcctccaccagaacccgac  
 R V L E E P T A A A I A Y G L H Q K P D  
 gttcaccacatcctggctctatgactttgggggggacattggatggtccttgcctat  
 V H H I L V Y D F G G G T L D V S L L Y  
 gtgcacgagggcttcgtgacggtggaaggggtggatgggacgaccatttggcgcgcc  
 V H E G F V T V E G V D G D D H L G G A  
 gactttgattactgcctggcaaacatcttttggcaacatatggcgatacttctctcc  
 D F D Y C L A N H L L A T Y G D I T S S  
 gcctcgtcctcctcctcctcctcctcctcagcctctaccttcaccacttctccaacaat  
 A S S S S S S S S S S A S T F T T S S N N  
 ataaaaggaacgaaggaggtgatggcattcgaagacgaggagatgagcagccatctca  
 I K G T K E V M A F E D E E D E Q P S S  
 ccctcgagttcttcgctctccatagctgctcctcgtacacccctcctatccatcgagag  
 P S S S S P L H S C S S Y T L L S I A E  
 cacttaaaaaaacgcctttcaacagcggttctcctccttttctcgtgcttcgcaaggc  
 H L K K R L S T A A S S S F S C R S Q G  
 ggcaccgatccagagcgatttctttgtacaaaacataagcgtgagccgagatggcttt  
 G T G S Q S D F F V Q N I S V S R D G F  
 gaaaaggcatgcaaaagcgtgtttgccccgagcccttttcccggttgaccggttgcctggaa  
 E K A C K D V F A R A L S P V D R C L E  
 agcaatggaatgggacgggacgaaatagacgaagtggatggtaggggggacgaccaga  
 S N G M G R D E I D E V V M V G G T T R  
 ataccacaaataagagaaatgctgagcgcacttgaacgtggagagtttgaacacacac  
 I P K I R E M L R A H L N V E S L N T H  
 atagatccagacgtgacggtggcggtggggcagcctgcgtagtcgattaa  
 I D P D V T V A V G A A C V V D -

**Slika 8.** Prikaz kodirajuće i aminokiselinske sekvence Hsp70-1 proteina iz alge *Nannochloropsis salina* CCMP1776; TFJ83252.1. Ljubičasta boja prikazuje SBD, a tirkiznoplava NBD.

### 6.3 Hsp70/110 u endoplazmatskom retikulumu

Prvi predviđeni *Nannochloropsis salina* CCMP1776 Hsp70-17 (pristupni broj: TFJ83042.1) smješten u endoplazmatskom retikulumu član je Hsp110 obitelji šaperonskih proteina s kodirajućom nukleotidnom sekvencom sačinjenom od 2817 nukleotida koji odgovaraju proteinu od 938 aminokiselina (Slika 9.). Predviđeni su molarna masa koja iznosi 102kDa i pI od 5.30. U lancu proteina, domena za vezanje supstrata nalazi se od 34. do 114. aminokiseline, a nukleotidno vezno mjesto od 165. do 427. aminokiseline, također je utvrđen i specifičan motiv EDEL.

Drugi predviđeni *Nannochloropsis salina* CCMP1776 Hsp70-12 (pristupni broj: TFJ80064.1) smješten u endoplazmatskom retikulumu član je Hsp70 obitelji šaperonskih proteina s kodirajućom nukleotidnom sekvencom sačinjenom od 2817 nukleotida koji odgovaraju proteinu od 664 aminokiseline (Slika 10.). Predviđeni su molarna masa koja iznosi 73kDa i pI od 4.80. U lancu proteina, domena za vezanje supstrata nalazi se od 36. do 117. aminokiseline, a nukleotidno vezno mjesto od 199. do 500. aminokiseline, na kraju lanca je specifičan motiv DEEL.

atggggcggtgctgatcgggggcggtagaagaacttacgggtgaccttcactttg  
M G A V A M I G G G R R N L R V T F T L  
ctcctgctaagcttcccttgcctctgcagccctagctggagtgattggtgtgacttgggc  
L L L S F L A S A A L A G V I G V D L G  
agcgagttcatgaaggtgtcaetgggtgaagcctgggtaccatgatggacatcgtcactaac  
S E F M K V S L V K P G T M M D I V T N  
atccacagcaagcgcaagaccgagaccatgatttctttctaccaagggagcgttccctat  
I H S K R K T E T M I S F Y Q G E R S Y  
ggcgcgcatgaccttccctcttgaccggcgccggacgtgacgtatgcacgcctcccc  
G A D A Y S L L T R R P D V T Y A R L P  
accctgctggggcgcatgacgaccatccctccgtcactctcttgggagaggcctacttt  
T L L G R H D D H P S V T L L G E A Y F  
cccaccagggtctcgtacaacgagagtgccggtggactggccatccaccatgacaaga  
P T R V S Y N E S A G G L A I H H D K E  
gcctccttctcctcggaggagcttggcaatgatcttgaccacgctaaaggacattacc  
A S F S S E E L V A M I L T H A K D I T  
aaggcctacggaggcattcctgtccgggacgcagtgctggtggtgcctccttctacacc  
K A Y G G I P V R D A V L V V P S F Y T  
cagccagagcgacaagcgttggcggcggcggagatcgccgacatgaagatccttggc  
Q P E R Q A L L D A A E I A D M K I L G  
ttgatcgacgagacaccgcccgcctcctcttgcgctcgacaatgtgtacgagcag  
L I D E N T A A A L L F A V D N V Y E Q  
cccaccaacatcatcttctacaatctgggagcctcttccctccaagtttccctggggag  
P T N I I F Y N L G A S S L Q V S L V E  
atgtcctctacgtgaccggcaggggagcaatgagaagcgtttcgcgacttccactgtt  
M S S Y V T G R G S N E K R F A H F T V  
cgggccaagcctgggacaccagcctggcgggttccagtttgacctgcgctggcggc  
R A K A W D T T L G G F Q F D L R V A E  
gtcctggctgaccgcttcaacgagaagtgagggaaggggaaggggaagggagcgt  
V L A D R F N E K W R K G K G K G K D V  
gacgtgcctgcaccgccagggcagtgcccaagctccgctcaggcgaagaagtgaa  
D V R R H P K A M A K L R A Q A K K V K  
gaggtgctctccgcaacacgaacatccctgtgcacatcgaaggcgtgcacgacgacatc  
E V L S A N T N I P V H I E G V H D D I  
gatctctccacgcatctgtccggcccaactcgaagagctgtgcgcccactttttgag  
D L S T H L S R P Q L E E L C A D L F E  
cgagccgttccagcccttgacaatgtcctccagcaggcgaacctgacactcaaggacatc  
R A V Q P L D N V L Q Q A N L T L K D I  
gcggccgtcgaggtcattggcggggcgtccgctcccgaagtacaacaggttgtcaag  
A A V E V I G G G V R V P K V Q Q V V K  
gaccgcctgggtcgtggagctctccatgcatctgaacggagacgaagccatggcaca  
D R L G S L E L S M H L N G D E A M A Q  
ggcgcgctttctacggcccaacatctccaccagcttcaaggttcggcccattggcgt  
G A A F Y A A N I S T S F K V R P I G V  
acggatattttgccctttggcgtcggcggccgcctcgaggaggcagtgctgaggaggag  
T D I L P F G V G A R L E E A V P E E E  
aaaggagggggaggggtcctggggcactagggttgaagaagaagaaggaggaagagaag  
K G G G F L G A L G L K K K E E E K  
gaagaggtcacggagaagtgccagcggcggcactatcttgcgcccggcacaagctt  
E E V T E K W Q R R A T I F A P G H K L  
cgtagcaatcgacaatctccttcaacagctcaaaggacatcgccctcaacctgacatc  
R S N R T I S F N T S K D I A L N L T Y  
gaagcctcggcgtctttccccagggagcccagccaccatcgctctcttcgacattcga  
E A S A L F P P G A Q P T I A L F D I R  
ggcgtctcggagcttgtgaggagcacggagccaagacgtcctaccctccaaggtcttc  
G V S E L V R E H G A K T S Y P P K V F  
ctcaccttcgagctggatgcgtcggcgtggtccacttgggaaggcggaggctcgtctc  
L T F E L D A S A L V H L V K A E A R L  
caggaggacccccctagccggaggcaggcgggaagacggaggctccgtctgaagag  
Q E D A P P S R E A G G K T E A P S E E  
gaagacggcagggcgaggtcagaaggaggcggaggtgggaagagaaggaggcggag  
E D G E G E G Q K E A E V E E E K E A E  
gaggtgaaaaggtggatgggcagacgcagcagggaaacagtactagcagcaacacc  
E V K K V D G Q N A T A G N S T S S N T  
acagctccggcggcaccgaaacccatcgtccaccgaaaaatcctccgtgtgaccagccat  
T A P A P P K P I V H R K I L R V T S H  
tacgaagccttgcgtctcggccgggaacggaggaggaagggagcagcaagcagaag  
Y E G L R L R P G T E E E K E S S K Q K  
ctcggcggcgtcgggcaaacgaccagctaaagagggaaaaagcgcagcagcgaatagc  
L A A L R A N D Q L K R E K A D A R N S  
ctggaggcgtacctctacgaggtcaagaacaagatgatggagcagcaggaggagctctcc  
L E A Y L Y E V K N K M M E H E E E L S  
ctggtctcaaccgatgagcaacgcagcggctcctggcccaagtgaggccaccgacgac  
L V S T D E Q R S A V L A Q V E A T D D  
tggatgtatgacgaagggcgggacgtggaggcctcagtgtaacaggagaggaaccaccaa  
W M Y D E G R D V E A S V Y K E R T T Q  
gtccgtgccttggcgtgcccatttcttgcgccaagcgaagggccaggtggagcccgt  
V R A L A V P I F L R Q A E G P G G A R  
gctcggcacttgaggcggcgtcaagaatgtggcagaggtccggccctggcgaagcgc  
A A A L E A A V K N V A E V R A L V K R  
tggaacgtgaccatgccctggttgacggaggaaggaaggaatccctcctcctcgaagcc

W N V T M P W L T E E E K E S L L S E A  
 acggtggtcgagacctggtccaagagaagaggcggtcaggctgccaaggaggacac  
 T V V E T W L Q E K E A A Q A A K E G H  
 gaggaaccgcttctctgtctattgacgtggccccccagctcaagaagatgaaagacatt  
 E E P A F L S I D V A P Q L K K M K D I  
 gcacggcgctggccgtaagccggccccctccccctccccctccaagccttcgagc  
 A R R L G R K P A P P P P P P P K P S S  
 aacaagcggagcagaaaccaccgcccagcaacagcaccatgggggaggagggaaggag  
 N K T D E N A T A T N S T M G E G G K E  
 ggagaggtcgaggaaggattggagacggtaaacattaatgtagaagaggcgaggagca  
 G E V E E G L E T V N I N V E E G E G A  
 ggcggggaggaagcggagtagaggggcgcggaagcaggggagatgagctgtaa  
 G G E E D G V E E A A K A G E D E L -

**Slika 9.** Prikaz kodirajuće i aminokiselinske sekvence Hsp70-17 proteina iz alge *Nannochloropsis salina* CCMP1776; TFJ83042.1. Ljubičasta boja prikazuje SBD, tirkiznoplava NBD te žuta boja prikazuje specifičan motiv za uvoz proteina u endoplazmatski retikulum

atgcagagagtagcaagctgggtcgcaggtgcccctcgttaccgtaggcctcatgatggcc  
 M Q R V R S W V A G A L V T V G L M M A  
 tctgctctgggactctgcaagcggaggacgagccccgggtaccgtgatggatcgat  
 S S L G S V K A E D E P L G T V I G I D  
 ctggggaccacatattcttctgttaggtgtcttcaagaacggcggcggagattatccaa  
 L G T T Y S C V G V F K N G R V E I I Q  
 aacgatcaaggcaatcgattactccttctacgtggcgtgggacccctgagctggcgag  
 N D Q G N R I T P S Y V A W D P E S G E  
 cgcctgattggtgacgtgtaagaaccaggccaggtaaatcccgagaacaccgtctt  
 R L I G D A A K N Q A T V N P E N T V F  
 gacatcaaacgtttgatcggcggcaaatcattggacaagcggccagtcggacatcaag  
 D I K R L I G R K F M D K T V Q S D I K  
 ctgctgccctacgcggtggaacaagaatgacaagccccagggtggaggtggaagtgtcg  
 L L P Y A A V V N K N D K P Q V E V E V S  
 ccaggtgatcgcaagcagttttctcctgaggaagtgtctgcatgatacttcagaagatg  
 P G D R K Q F S P E E V S A M I L Q K M  
 cgctccatcgccgagacctatctcggcggagcgtgaagcagccggtgagcggcccc  
 R S I A E T Y L G E D V K H A V V T V P  
 gctatttcaacgacgcccagcggccaggccaccaagcagctggaaccatttcgggcatg  
 A Y F N D A Q R Q A T K D A G T I S G M  
 acggtgcaagcgcattatcaacgagcctactgcccggcattgcttacgggtcttgacaag  
 T V Q R I I N E P T A A A I A Y G L D K  
 aagggaagggagcagaacatcctcgtcttctgatcttgggtgggggtaccttcgatgtgacc  
 K G K E Q N I L V F D L G G G T F D V T  
 ttactgacgatcgacaacggtgtatcgaggtcttggccacgaacggagacacgcatctg  
 L L T I D N G V F E V L A T N G D T H L  
 ggtggtgaggaactcgaccaacgggtcatgacgtacttcatcaagatgattagaagaag  
 G G E D F D Q R V M Q Y F I K M I K K K  
 aacaacgtggacatctcctctgataagcgcgcgctccaaaagcttcgcccagaggtggaa  
 N N V D I S S D K R A V Q K L R R E V E  
 cgtgtcaagcgtgctctcaccgagccccaggcagctgctgaaatcgaggccctctac  
 R V K R A L S T Q P Q A R V E I E A L Y  
 gagggcctcgacctgctggagacattgactcgcgcccgttcgaggagctgaacgtggat  
 E G I D L S E T L T R A R F E E L N V D  
 ctcttcaagaagaccttggggcctgtgcaaaaagtgttgacgacggcgacatggccaag  
 L F K K T L G P V Q K V L D D G D M A K  
 accgacatcgacaggtggttctggtggcggttcacgagcattcccaagtgacagcag  
 T D I D E V V L V G G S T R I P K V Q Q  
 ctctcaaggacttttctgggtgaaaggaaccctccaagggcgtcaacccccgatgaggcc  
 L L K D F F G G K E P S K G V N P D E A  
 gtggcggttggcggctgagcaggagcattcctcctcgggtgatacgtctggcttccac  
 V A F G A A V Q G G I L S G D T S G F T  
 caggacctgttctgctagatgtgactcctctgtctcaaggaatcgaaactgtggcgga  
 Q D L L L L D V T P L S Q G I E T V G G  
 gtcatgaccaagctgatcacgcaaacactgtcatccccaccaagaagtcaccagaccttc  
 V M T K L I T R N T V I P T K K S Q T F  
 tccacctaccaggcaaccagcccgccgtcctcatccaagtgttcgagggcgagcgcctcc  
 S T Y Q D N Q P A V L I Q V F E G E R S  
 atgaccaaggaaccacctcctgggcaagttcgagctgactggcatccctccccctcct  
 M T K D N H L L G K F E L T G I P P A P  
 cgggcgcttctcagattgaagtgacgtttgaaattgatgccaacggcattcctgcaagtg  
 R G V P Q I E V T F E I D A N G I L Q V  
 tcggcggaggaccagggcaccggcaagagcagagaagatcaccattacggcagagaagggc  
 S A E D R G T G K S E K I T I T A E K G  
 cgcctgtctcaggacagagattgagcgcattggtccgagaagcggaggaatttcgacagcag  
 R L S Q D E I E R M V R E A E E F A D E  
 gacaagaaggtgaaggaaaagatcgacgagagaaatggtttggatcttatctctacaac  
 D K K V K E K I D A R N G L E S Y L Y N  
 ttgaaaaatactctggaagatgaagagaagacttggcagaagcctctctgctccgac  
 L K N T L E D E E K G L A D K L S A S D  
 aagaaggaagtgaagcagcaccatcaatgagggcattggagtgctggaagacaatcgggac  
 K K E V E A T I N E A M E W L E D N A D  
 gccgacacagaggtagcacgaagaacagaagaggttgagacgatcgtgaacccccatc



```

A D T E E Y T K K Q K E V E T I V N P I
ctgaaaggaggtataccagctctgcgggcgggcctcaagcgcgccgacgacagctcgtat
L K E V Y Q S A G G P Q G G A D D S S Y
gacgaggagctgtaa
D E E L -

```

**Slika 10.** Prikaz kodirajuće i aminokiselinske sekvence Hsp70-12 proteina iz alge *Nannochloropsis salina* CCMP1776; TFJ80064.1. Ljubičasta boja prikazuje SBD, tirkiznoplava NBD te žuta boja prikazuje specifičan motiv za interakciju s drugim proteinima

## 6.4 Mitohondrijski Hsp70

Prvi predviđeni mitohondrijski *Nannochloropsis salina* CCMP1776 Hsp70-10 (pristupni broj: TFJ88644.1) član je Hsp70 obitelji šaperonskih proteina s kodirajućom nukleotidnom sekvencom sačinjenom od 2058 nukleotida koji odgovaraju proteinu od 685 aminokiselina (Slika 11.). Predviđeni su molarna masa koja iznosi 73kDa i pI od 5.62. Proteinska sekvenc, također, sadrži tri karakteristična HSP70 motiva : IIGIDLGTN (aminokiselinski ostatci između 46.-55.), VFDLGGGTFDVSIL (234.-247.), te ostatci VLLVGGMTRMPKVQ , (između ostataka 375. i 388), predviđena programom ExpASy. U lancu proteina, domena za vezanje supstrata nalazi se od 46. do 126. aminokiseline, a nukleotidno vezno mjesto od 175. do 418. aminokiseline.

Drugi predviđeni mitohondrijski *Nannochloropsis salina* CCMP1776 Hsp70-9 (pristupni broj: TFJ88236.1) član je Hsp70 obitelji šaperonskih proteina s kodirajućom nukleotidnom sekvencom sačinjenom od 1620 nukleotida koji odgovaraju proteinu od 539 aminokiselina (Slika 12.) Predviđeni su molarna masa koja iznosi 58kDa i pI od 6.57. U lancu proteina, domena za vezanje supstrata nalazi se od 135. do 217. aminokiseline, a nukleotidno vezno mjesto od 269. do 535. aminokiseline. Presekvenca se nalazi od 46. do 61. aminokiseline.

```

atggtgtctcgttttacctcgtcgccaagggcctttcgccctcgccaatggttcggaatc
M L S R F T S S A K G L S P S A M F R
ggcagccagggcgggagctgttcgcaacctgacacgaactggcgctgcgcaaaaggcacag
S S Q A G A V R N L T R T G A A Q K A Q
aaggatttaggtgatattatcgccattgatttagcagcacaattcctgtgttgccatc
K D L G D I I G I D L G T T N S C V A I
atggaagggcgtacacctcgtgtcattgaaaatgctgagggcgcgcaacgacgcctctc
M E G R T P R V I E N A E G A R T T P S
gtagtggcatttgcgaatgacggccagcgcttggtgggattacctgcaagcgtcaggct
V V A F A N D G Q R L V G L P A K R Q A
gtcaccacccccgagaacacctgtacgcccgtgaagcgtctgatcggcaggaattcaag
V T N P E N T L Y A V K R L I G R K F T
gacaaggaagtgcagacgtgaaaaagctagtaccgtacaagattatcaaggccgacagc
D K E V Q N V K K L V P Y K I I K A D S
tcagaggacgctgggtggaggcgggagggaagcgcctctccccgtcgcaggtgggctcg
S E D A W V E A G G K R L S P S Q V G S
atggtgttggcgaagatgaaggagacggcgggaagattctagggcgccattaccaag
M V L G K M K E T A E G F L G R P I T K
gcggtagtcactgtgccagcgtatttcaacgactctcagcagacaagcagccaaggatgcc
A V V T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A
ggacgcatagctgggctggacgtgcagaggatcatcaacgagcccacggcggcgccatta

```

G R I A G L D V Q R I I N E P T A A A L  
 gctacggctctggacaagaagcgaaggaaagctgatctcgggttgcgatttggggggagggc  
 A Y G L D K A E G K L I S V F D L G G G  
 accttcgacgctgctgatattggagatctccggcggcgtgttgaagtgaaggcgcaaaat  
 T F D V S I L E I S G G V F E V K A T N  
 ggggacaccatctggggggggaggatttcgacgaggagcttttgaagcaccctggcggcg  
 G D T M L G G E D F D E E L L K H L A A  
 gagttccgcaaggactcggggatcgacctttccaagacaggtcgccatgcagcgcttg  
 E F R K D S G I D L S K D R L A M Q R L  
 cgggaggcggcagagaaggcaaaagcgggagctggacggcctggctcagacggaagtgtcg  
 R E A A E K A K R E L D G L A Q T E V S  
 cttcctttatcacggcggcaccacaggtcccaagcacttgaatgtgaaggtgtcgcg  
 L P F I T A D Q T G P K H L N V K V S R  
 gcgcaatttgagaaacttgggattccttggccagcgaccatccaaccctgcaagaac  
 A Q F E K L V D S L V Q R T I Q P C K N  
 tgctgaaggacgctccgctgggataagaaggacatcaacgaggtcctcctgggtggggggc  
 C L K D A S V D K K D I N E V L L V G G  
 atgaccgggatgccaaggtgcagagtgttagtggaggacttcttcggacgcaagcccagc  
 M T R M P K V Q S V V E D F F G R K P S  
 aaggcggtgaatccggacgaggtggggccatgggcgcgccatccaaggaggcgtcctc  
 K G V N P D E V V A M G A A I Q G G V L  
 cgggggacgtaaggacgtgctgctcctggacgtgaccccgtctccctgggcatcgag  
 R G D V K D V L L L D V T P L S L G I E  
 acattggcgggatgttcacgcggtgatcaatcgaacacgacaattccgacccaaaag  
 T L G G M F T R L I N R N T T I P T K K  
 gggcaggtcttttctacggcggcagacaatcagtcaccaggtgcaaatcaaggtgtgcaa  
 G Q V F S T A A D N Q S Q V Q I K V L Q  
 ggagagcggaaactggcgggacaacaagtgtggttctttgacttggcggcatt  
 G E R E L A A D N K L L G S F D L V G I  
 cctcccgccctcgggccttcccaaatcgacgtgaccttcgacatcgatgcagacgga  
 P P A P R G L P Q I D V T F D I D A D G  
 atcatgcacgtctcggcgaaggacaagggcacagggaaaggaacagggccattgtcatccag  
 I M H V S A K D K G T G K E Q A I V I Q  
 tcgagtgtgctggaacgaggtgagatccagaacatggggaaggacgggagggcgac  
 S S G G L N E D E I Q N M V K D A E A H  
 aaggcggcggacgagggaggaagaagctgatagagggccgaaatgagccgattcgta  
 K A A D E E R K K L I E A R N E A D S L  
 gtctacagcaccgaaaaatctttgaccgaacatggcggcgaagctgagcgcaagtaag  
 V Y S T E K S L T E H G A K L S D E V K  
 gatgagattcaaacaccattgcagaagcaaagaagcattggaagggaggacgcccga  
 D E I Q N T I A E A K K A L E G E D A E  
 ttgttcagagagaaggtcaaggcttgcacaagccgcttgaagatcggagaggccatc  
 L L Q E K V K A L Q Q A A L K I G E A I  
 tatggaaagggagggcgggagcagggggcggcagggggaaggtggcgaaggggcca  
 Y G K G G A G A G G P T G E G G E G A T  
 ggggagagacaagagagaatgtgcaggacgcagagttcaagagaaagacgagggggcg  
 G A G D K E N V Q D A E F K E K D E G A  
 ggagcagggagaagaatga  
 G A G K K -

**Slika 11.** Prikaz kodirajuće i aminokiselinske sekvence Hsp70-10 proteina iz alge *Nannochloropsis salina* CCMP1776; TFJ88644.1. Ljubičasta boja prikazuje SBD, tirkiznoplava NBD, a crvena boja prikazuje presekvenu za mitohondrijski unos proteina.

atcgggcagcgcttttttgtcccaaaaattgcgtcatgctcgctccactccgttgct  
 M R A A L D F L S Q K L R H A R L H S V A  
 ctctccaccgctccgtaactatcgctcttgcctatgcccagacacttgcggcggc  
 L S T A P S A T I A F A Y A R D T S P E  
 agccgccccttgcctgatgaggcggcctcctcgacccggcaagatgcgcgacggtgcttc  
 S R P C C M R R P P R T R Q D A R R C E  
 cgtgcaacgtgcggaaggagaaatcctgtgctcatcggtattggtatactttagggggc  
 R A T C R K E N P V L I G I G I L V G A  
 acacttgcccattacctagtgcggcggcgaacggatagccaaggcagacaagaagaag  
 T L A H Y L V R A A Q R I A K A D K K K  
 agagaaggcaaaaggtcactgacgacgaggaggagagggatcacgaagaaagtga  
 R E G K E V T D D E E E E R D H E E S E  
 gggcagaggaagggcggcgaacgtcagggcgtgaatttccggtcctgggactagacctg  
 G R E E A G A N V R R E F P V L G L D L  
 ggatcttcgacggcatgctggcttctcgtggctgcgaaagaacgagcgcagagggtggtg  
 G S S Q A C V A F V A A K E R A P E V V  
 gagaatcatgaaggcagcggctcactcctgcttcatagcctatgaagatgatcacctg  
 E N H E G R R S T P A F I A Y E D D H L  
 gtggtaggacagttggcagccgagcagatggagggagcccgcaaggtgggcttcaac  
 V V G Q L A R R A R W R E P A K V G F N  
 atccagcgttctgggctggcgtttagcaggacaagaatccggccttcttcccttc  
 I Q R L L G L A A Y E D K V R P I F P F  
 gccgtcgacccagggagggtctgtggacgggacctctcctcgttggctatgaggctc  
 A V D A R E G G S V D G D L S P L V M R L

```

aagggggggcgagcactgacgcccctggaagcgagcgcggggttcttgaggagctcgtg
K G G R A L T P L E A S A R V L E E L V
cagtcgaggagcacaactgcacaccacccaggtttcgccatcctcgcagtcctccctcc
Q S A E H K L H T T P G F A I L A V P S
tacttcggggagggggcgaacgtcagggcgtgaaggcggcccgatgacgagggctctg
Y F G E G A K R Q A L K A A A D A T G L
agcgttgggacggaggagggggcagggcggggcctggcgggtggaggatgagggggca
S V G T E E G Q G G G L A V V E D A V A
accctggctctgcccactactcggggcgtctcggacgaagaggccttcttcgggaag
T L V C A H Y S G A V S D E E A F F G K
ccctggctgggtgctggatgtggggggcctgaacggcagggcctcgggtggccatggac
P W L V L D V G G L N A Q A S V V A M D
cccgagcaggggctgggctgcgggccaacaggacgacgtgggcggtggcgggggagcag
P E Q G L G V R A N R T T W A V G G E Q
ctagacgggggtgctgggtcagcacctgatctcggactcaaggagaagcagggcgccctg
L D G V L V Q H L I S D F K E K H G G L
gacttaggcacggactatctggcgtcagcgccttgcatgaggcggcgaggcgagcaag
D L G T D Y L A L E R L H E A A E A S K
caggagctgagctgagtcggtcagccctgctcctccctcatcaccgcccaccac
Q E L S L S P S S T L R L P F I T A D H
cggggggcgaagcacctggacggacggtatccagagcggcctggagcactagcgtc
R G P K H L D A T V S R A A L E R L A L
cctgtcttgaccagcttgaagcggcgggtgggagcattgcgggcgtcgggggtgggt
P V L D Q L K A P V V E A L R A S G V G
ctggaggccttcaaggcgtgctgctggcggggggcagcaccgcttgccttctcgggg
L E G L Q G V L L A G G S T R L P F L G
gaatcgtgaggcggcggcctcacactggggaaggtgaggggtcctgagcgtggaggatgta
E F V R S R L T L G K V R V L S V E D V
ccgctgaggaggtggcggcgggtggcgcggttattacgggcgacagctcgtcagagtaa
P P E E V A A V G A A Y Y G R Q L V E -

```

## 6.5. Hsp70 u plastidima

Prvi predviđeni *Nannochloropsis salina* CCMP1776 Hsp70-7 (pristupni broj: TFJ84871.1), koji sadrži signalnu presekvenu (12.- 31.) potrebnu za uvoz proteina u plastide (Slika 13.) je član Hsp70 obitelji šaperonskih proteina s kodirajućom nukleotidnom sekvencom od 2214 nukleotida koji odgovaraju proteinu od 737 aminokiselina.

Predviđeni su molarna masa od 80 kDa te pI od 5.26. U lancu proteina, domena za vezanje supstrata nalazi se od 95. do 175. aminokiseline, a nukleotidno vezno mjesto od 226. do 469. aminokiseline.

Drugi predviđeni polipeptid sa s plastidnom signalom sekvencom u *Nannochloropsis salina* CCMP1776 Hsp70-7 (pristupni broj: TFJ84871.1 ) je član Hsp110 obitelji šaperonskih proteina s kodirajućom nukleotidnom sekvencom od 2883 nukleotida koji odgovaraju proteinu od 960 aminokiselina (Slika 14). Predviđeni su molarna masa od 103 kDa te pI od 4.51. U lancu proteina, domena za vezanje supstrata nalazi se od 438. do 538. aminokiseline, a nukleotidno vezno mjesto od 579. do 916. aminokiseline.

atgcagagccttcgatccaacaatgcctggaagcgattggcctttttctcacatca  
M Q S L R S K Q C L E R R L A F F F T S  
ttgtgtgtgctgccagcgtctgtgtggctgtgtagtggtggtgacaatgattctgg  
L L L L P A V C V A G V V G G D N G F W  
ggccttcccactcgaagagcctccaagccgcccgtacatctgctcaggtgcccgtcac  
G L P T R R A S Q A A R T S A Q V P A H  
aaacaagcgacctgccgagcgaccacagtgcagcgactgcttcccgtaccgcccgggt  
K Q A T C R A T T V Q R L L A R T R G G  
gccagcaatgataaggggaaagggaaaatccaagaccgtgcacggtgcatgacctg  
A S N D K G K E G K I Q G P C I G I D I  
ggcacgacctattcttggctggcgtttggcaaacgggcccgtcgaatttgcocgaac  
G T T Y S C V A V W Q N G R V E I C P N  
gaccagggcaatcgcatcacaccctcctacgcctcgtttacggaggatgaacaagcctg  
D Q G N R I T P S Y A S F T E D E Q R L  
atcggggaggcggcaaaaatcaagcggcccagaacccagcaacaggtgtacgacgq  
I G E A A K N Q A A Q N P S N T V Y D A  
aagcgtttgatcggcgaagtttgaggaccaccgctccagcgcgatttgaagctggg  
K R L I G R K F E D P T V Q R D L K L V  
tcgtacaaggtgacgaacaagggaggaaagcccagtcagtgagggtgcaatgaagggcgt  
S Y K V T N K G G K P A V E V R M K G G  
cccaaggtgttcaccccgaagaaatctcggccatggtcctgagcaagatgaaggagacc  
P K V F T T P E E I S A M V L S K M K E T  
gccagggcctacttggaaaggaagtcaagcatgctgtcatcactgtcctgcctacttc  
A E A Y L G K E V K H A V I T V P A Y F  
aatgacgcacagcgtcaagccacaaggatgcagcgacgatcgagggttaaaagtggaa  
N D A Q R Q A T K D A G T I A G L K V E  
cgggtcattcaacgagcggcggcctgcctacggcctcgggctggataaaggggacaag  
R V I N E P T A A A I A Y G L D K G D K  
gcggggaggagaatattctgttttgcatttggcgggggactttcgacgtgaccctc  
A R E E N I L V F D L G G G T F D V T L  
ttgaccatcgacagcggcgtcttgaagtgaaggcaacgaacgggacacgcatttggga  
L T I D S G V F E V K A T N G D T H L G  
ggagaggatttcgaccagcgttggatggactatgtcattactacctcaagcgaacaac  
G E D F D Q R L M D Y V I T T F K R K H  
aaagtgagcgtgcgaggacaagcgggctttgcagcgcgtgcggcgggagtgcgagaag  
K V D V S Q D K R A L Q R V R R E C E K  
gcaaacggcgtcttgcgtgcagacgcagacgaacattgagatcgaggcgtttctcaa  
A K R A L S V Q T Q T N I E I E A L S Q  
ggcattgacttgcctgccatttgcgggtaagtttgaggaattgaacctggatctc  
G I D L S L P I S R A K F E E L N L D L  
ttcaaaagaccttggctcccgtggcgcaggtgttgaagacggcggcagcgaagag  
F K R T L A P V A Q V L K D A G M S K E  
gagtgatcaggtggtgttggtaggggatccaccgcattcccaaggttcaagcctc  
E V D Q V V L V G G S T R I P K V Q A L  
ctctcggacttttcaacgggaagagttaaacaagggcatcaaccagacgaggcgtt  
L S D F F N G K E L N K G I N P D E A V  
gcctacggagcggcgtccaagcggcatttctgcccggcggcggcggcggcggcggcggc  
A Y G A A V Q A A I L S G A A A D A T K  
gacatcgtctctgacgtggcgccttctgcttagggattgaaaccgtcgggggggtc  
D I V L L D V A P L S L G I E T V G G V  
atgacgaagctggtgaacgtgggacgaccattccggcttgaagaagcagattttcacc  
M T K L V E R G T T I P A C K K Q I F T  
acctacagcgaacaaccagacaggtcctgattcaggtttatgaaggagagcgtacgatg  
T Y S D N C Q N S V L I Q V Y E G E R T M  
acgaaggacaacggcttttgggcaagtttgagctcagcggattcctcggggggcgcga  
T K D N R L L G K F E L S G I P G G P R  
ggcggacctcagatcgaagtcgctttagcgtggatgcgagcggcattctcaggtctca  
G G P Q I E V A F D V D A S G I L Q V S  
cgggttgagaagaatagtggaagacacagagcatcacgatcacgagtgagaaggtcga  
A V E K N S G K T Q S I T I T S E K G R  
ctgagcgaagacgatcgaacgatggtgaaggagcggcgggaattcggggaacaggac  
L S E D E I E R M V K E A E E F A E Q D  
aaaaaggagaaagacgcgtggacgcaagaaatcatctggaggggctcatgttccaagt  
K K E K E R V D A R N H L E G L M F Q V  
aagcacgacatggaggaagcgggtcgaaggggaaattgccgcaagaaggaaggaaggca  
K H D M E E G G L K G K L P Q E E E E A  
ttaaagaaagtgtggaagacacgaagaatggtttgattcgaatgtagcccgggataag  
L K K V L E D T Q E W F D S N V A A D K  
gatgaggtcatgaaaaagccggggagctgggaaagctttcattggcgcgggagaaa  
D E V M E K A G E L E K A F I G A R E K  
gtacctgcctcgggtggagaggtgggggggaggggagggcctgaggggaggggaagatggg  
V P A S G E D G G E G G P E G E D G  
gcagggccagcggatgggggtggggaagaaccacaggtagaagaatggagtaa  
A G P A D G G G E E P Q V E E M E -

**Slika 13.** Prikaz kodirajuće i aminokiselinske sekvence Hsp70-5 proteina iz alge *Nannochloropsis salina* CCMP1776; TFJ88690.1. Ljubičasta boja prikazuje SBD, tirkiznoplava NBD te jarko zelena boja, koja predstavlja presekvencu za plastidni unos proteina.

atgcctggccatttgggggggagtggtgactgatcatgctgctgggggtgctgttctg  
M P G H L G A E C G L I M L L G V L L L I  
ctggcgggttgcgaagctgggttggccctgctgctcctgcgcgctgccaagcgatgggt  
L A G C E A W V G P V V L R A A K R W G  
ggatgctgcaaaaaattgagaacgacgacgagcgatgaaaagaaacgtactactcagtcg  
S M R K K I E N D D G D E K K R T T Q S  
aattcaaaaggagctaaaccatttgttcccaagggggggaagaggctgaggagtcagaa  
N S K G A K P F V P K A G E E A A E S E  
gaggaggaggtggtgatccattggccattagcagcgcgagatgaggaagtcacagggc  
E E E D V D P L A I S D A M I E E V T G  
cgggtgcatggaagaaagtgtcgcgctccgaggcttcaggaaaagcggcgtcggacgaa  
R V H G R K L S R S E A S G K A A S D E  
aggttaaggaatgaggagggcgaaggcgaaggggggcactgagtcgggaggggtgaa  
R L R N E E G E G E G R G T E S G G V E  
agggagccccctgctggtccatgctgctggctggaaccctctcggaggaggagatgctg  
R E P P A W S M R W L E T L S E E E M L  
gccttggacaagaagagactgatgacttgccttgaaggacattgagagcgataaagag  
A L D K K R L M D L L L K D I E S D K E  
tggacgggtgctccctgtccagccctgtttgatcctgacgaggaggtggacccaagagc  
W T G V P V Q A L F D P D E E V D P K T  
gacttctacgcaagggcatgaccgaggaattttcgaaaagatgctgaggagaggac  
D F Y D E G M T E E I F G K M P E G E D  
gaggacgaggagagatgatttggacgatatttggggccctagagagcggaggggag  
E D E E E M D L D D I L G P L G D G G E  
gaggaggaggagggaaggagaggagaatttgcctcctcagcgggtctcaagag  
E E E E E E G E E N L L R F L S G S Q E  
gggaggaggttagcccgagatcttttaaacgacgacacggtcagggatgatgaggaggac  
G R R L A R D L L N D D T V R D D E E  
gaggacgtgttgacgtggcgggcacctgagcggcggagagatgagctcggaggaggtg  
E D V F D V G G H L R A E E M S S E E V  
gaggatggtttaaagcacctgtggcggaaacttgaagaaggccatggggaagacacgggg  
E D G L R H L W R N L K K G H G E D T G  
ggcggggatgagggcgaggaggagcggccgagacggaaggaagactgaggacgaggtg  
G G D E G E E E A A E T E G R L R D E L  
gcagaccggccaccatcctgacggccctgaaagcagcgtggaaggcggggatctggcg  
A D P A T I L T A L K A S V E G G D L A  
gctgctcggagttgctcagcgaatggaggagatgggtctggagggtggggacctggag  
A A S E L L Q R M E E M G L E V G D L E  
gaggaggtcagaggcctggacagctaccgggccccttggggaacaagagagccgtggcg  
E E V E A L D S Y R A P L G N K R A V A  
caggtgccgctcgtggaggggcggaggaggacggggagggttgcaggtgcctctgctg  
Q V P L V E E A E E D G G G L Q V P L S  
gtgggacgtttgagcgggaagaggtggcggcgtgaagtgcgtagggcggtgtgtggc  
V G R L L S E E E V A A M K S V G A C V G  
atcgacctgggacgcaactctgcccctcctccttgcctcaaggacggggaaggccttgatc  
I D L G T T N S A L S L V K D G K A L I  
ttgcgctccagagccacggaggccgctcaccccctcgggtgctcaggtccggggcaag  
L P S R A T E A A L T P S V V R F R G K  
gagggtggtggggaggcggcggggcggcggcagtgagcagactcggacaacagttc  
E V V V G E A A R A V A V A D S D N T F  
tcgtcggtagaagcggctcatggcggggcctggaggagatgctcaggagaaggagatc  
S S V K R L M G R G L E E M L Q E K E I  
ttggggctgctgaacctggtgcgacggcggtagggaggccgaggggaggccgagggg  
L G S L N L V R R T V E E A E G E A E G  
ggcgccagccctgtgtggccatgctgctcggccctgggtaggagggtgaccctgag  
G G Q A C V A M R C P A L G R E V T P E  
gaggtgctggccgagatttgaagaccctccttgaagacggcgtgcctacttggaaaa  
E V S A E I L K T L L E D A A A Y L E K  
cccgtgaacaggggcgttatcaccgtgcccgcatacttcacaccggctcaatgcccgggg  
P V N R A V I T V P A Y F T P A Q C A A  
acggagcggggggcactggcgggcttgaacggatcaaattgttgcgggagcgggag  
T E R A G A L A G L Q R I K L L R E P E  
gcggccgcccctggcctacgggctggaccgcatggtgggggaggacgaactgatcaggtg  
A A A L A Y G L D R M L G E D E L I M V  
tttgacctggggggaggcacttcgacgtgagcgtattggaagtgggggacgggggtggtg  
F D L G G G T F D V S V L E V G D G V V  
gaggtcctcagcaccttggggacggaccttgggtgggaacgacttcgataagcgcgtc  
E V L S T T F G D A T L G G N D F D K R V  
gcggactggtggtggggagtacaggaagcagcagggggccaagcccgagtcggac  
A D W L V G E Y R K Q H G G Q G P Q S D  
aggacgagccaggaagctgatggaggcggctgaaggcggagggtgctgctgctgag  
R T S Q R K L M E A A E G A R V R L S Q  
gcctcggaaaaccgaggttcgaatcccggcgtggggggcgaagggaaggttggggccc  
A S E T E V R I P A L G G E G K D L G P  
ttgacgctgacgaggggggaatggagaagctgtgaggagatctgtacgatcggctgctg  
L T L T R A G M E K L C G D L Y D R L L  
gagccatgctcagggccttggcagggggcactccttgggtggggaagtgccgccc  
E P M R Q A A L M A G A T L G G E V A P

```

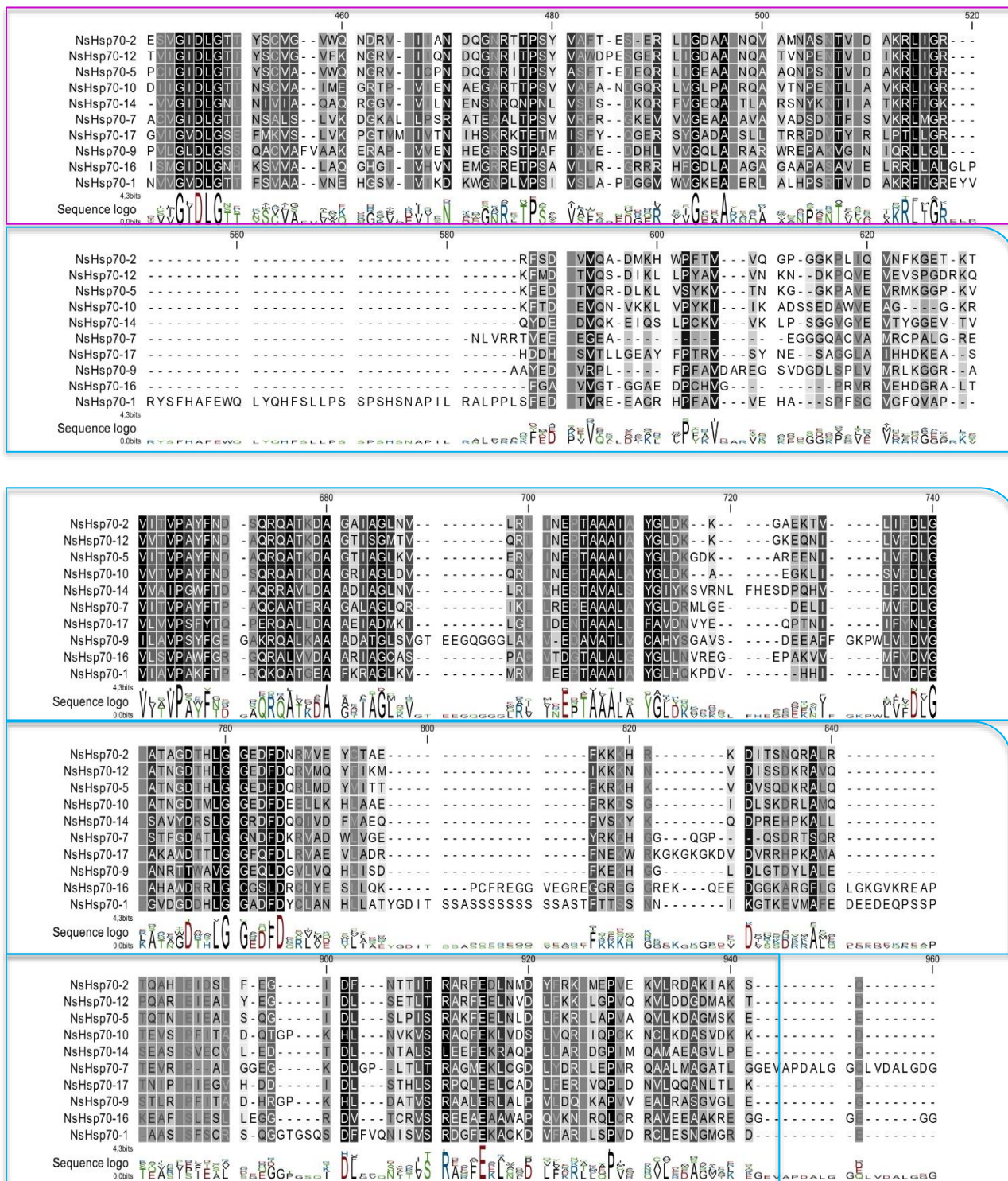
gatgcgctgggagggcaactggtggatgccctggggacggggggagaaaagcagccatg
D A L G G Q L V D A L G D G G E K A A M
gaagtcttgatgcgggaccaggaattggcagcggcagacgcggaggggatggaatcggag
E V L M R D Q E L A A A D A E G M E S E
aaagaaaaactggcgacgttgatgcgggaaacgcgccatgaccggccgcaaggtgagcaaa
K E K L A T L M R E R A M T G R K V S K
gcccggagcatgtacagtaagaattgaacgccgtacggaaaacgcaaccctggcctgaaa
A R S M Y S K N L N A V R K R N P G L K
atccgtgaattccacaaggacgaagtattcaagagtggtgatggtgggcccggggcgacc
I R E F P Q G R S I Q E V V M V G G A T
aggatgccatcgatccgacgcctggtggcagccgtcactggcatcacgccgaggacaacc
R M P S I R R L V A A V T G I T P R T T
gtcgatccagacgaagcagtcgccctggggcgggcattcatgccggtgtcttggacggg
V D P D E A V A L G A G I H A G V L D G
atcattgaagacatggacatgctgacgccgatgcaaggcggcgatgccagaggtcttttg
I I E D M D M L T P M Q A A I A R G L L
gactacgagggccgggggacaagcggagccacgctcgagaagcaacggaaggggttc
D Y E A R A G Q A E P R S Q K Q R K G F
tag
-

```

**Slika 14.** Prikaz kodirajuće i aminokiselinske sekvence Hsp70-7 proteina iz alge *Nannochloropsis salina* CCMP1776; TFJ84871.1. Ljubičasta boja prikazuje SBD, a tirkiznoplava predstavlja NBD te jarko zelena boja, koja predstavlja presekvencu za plastidni unos proteina.

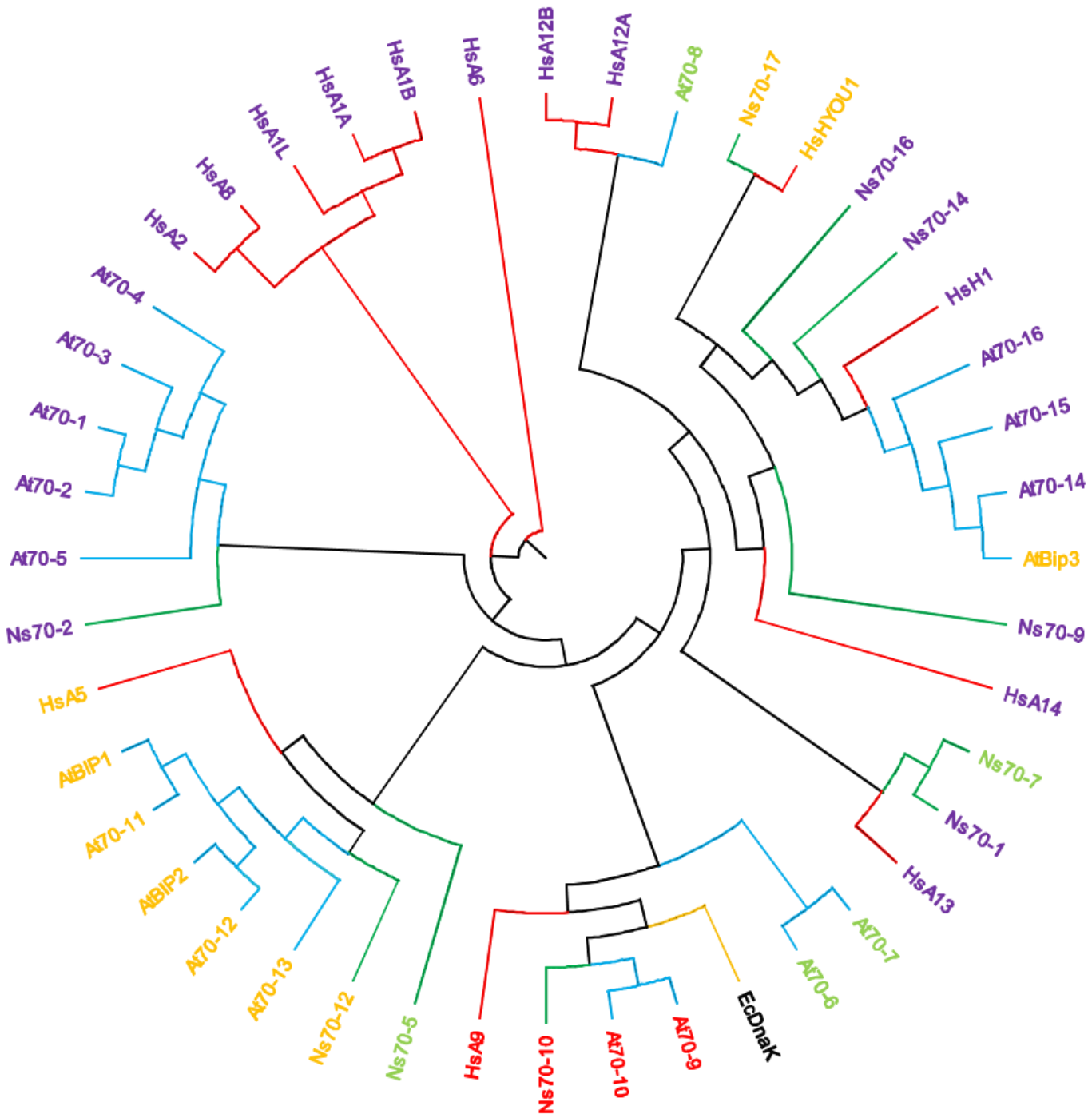
## 6.6 Poravnanje Hsp70 proteinskih sekvenci i filogenetska analiza

Analize sastava domena otkrile su da Hsp70 proteini sadrže dvije glavne domene, NBD i SBD (Slika 15.). Poravnanje 10 slijedova NsHsp70 pokazalo je da su upravo to dvije najkonzerviranije regije unutar NsHsp70 aminokiselinskih nizova. Ovakvi konzervirani slijedovi mogu poslužiti za identifikaciju proteina algi iz drugih vrsta koji sadrže sličan stupanj evolucijske konzervacije aminokiselina. Tako je, daljnjom usporedbom Hsp70 sekvenci iz *N. salina*, *A. thaliana* i *H. sapiens*, ustanovljeno da postoji određena evolucijska raznolikost (podatci nisu prikazani) koja je iskorištena za stvaranje filogenetskog stabla pri čemu se vidjelo određeno grupiranje Hsp70 sekvenci (Slika 16). Hsp70 sekvence su raščlanjene po raspodjeli u staničnim endomembranskim sustavima kao što su mitohondriji, kloroplast, ER i citosol. Ovim je utvrđeno da je evolucija NsHsp70 u ER i mitohondrijima vrlo konzervirana s obzirom da su NsHsp70-12 NsHsp70-17 grupirane s ljudskim genima i onima iz *A. thaliana* u ER. Na sličan način NsHsp70-10 je grupiran s mitohondrijskim Hsp70 iz drugih organizama uključujući i DnaK iz *E. Coli*, dok je drugi predviđeni mitohondrijski protein NsHsp70-9 pokazivao određenu sličnost s ljudskim HspA14 što bi moglo ukazivati i na povezanost s drugim sustavima kao što su citosolni ribosomi. Nadalje od plastidnih sekvenci, NsHsp70-5 je više grupiran s ER sekvencama, a NsHsp70-7 je evolucijski povezaniji s citosolnim NsHsp70-1, nego HsHspA13 ukazujući na direktnu duplikaciju gena i eventualnu specijalizaciju u stanici oba proteina. Od predviđenih citosolnih NsHsp70 sekvenci. NsHsp70-2 je karakterističan za biljni svijet s obzirom na grupiranje s sekvencama *A. thaliana*, dok su Ns Hsp110, NsHsp70-14 i NsHsp70-16, grupirani s citosolnim sekvencama iz drugih organizama ukazujući na zajedničko evolucijsko podrijetlo.



**Slika15. Poravnanje slijeda aminokiselina u proteinskim lancima 10 NsHsp70/110 obitelji gena.**





|                               |                          |   |   |
|-------------------------------|--------------------------|---|---|
| <u>Homo sapiens</u>           | } boja linija<br>(vrsta) | } boja slova<br>imena HSP<br>(organeli) | <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: purple; border: 1px solid black;"></span> citosol  |
| <u>Nannochloropsis salina</u> |                          |   | <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: red; border: 1px solid black;"></span> mitohondrij |
| <u>Arabidopsis thaliana</u>   |                          |   | <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: yellow; border: 1px solid black;"></span> ER       |
| <u>E. coli</u>                |                          |   | <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: green; border: 1px solid black;"></span> plastid   |

**Slika 16.** Kružni kladogram Hsp70/110 obitelji gena iz *Nannochloropsis salina*, *A. thaliana* te *Homo sapiens*.

## 7. RASPRAVA

Alge su, zbog svog brzog rasta, mogućnosti recikliranja i ponovnog korištenja iste vode u uzgoju, zauzimanja male površine te velikog omjera proteina, cijene i kvalitete; usporedno s drugim usjevima i izvorima proteina u budućnosti. ishrane (L. Zanella, F. Vianello 2020.), izvora vitamina (A. Ljubić 2020.), raznih mogućih upotreba lipida (biogorivo, vitamini itd.) (Xiao-Nian Ma i sur. 2016., T. Cai i sur. 2013.), pigmenata (L. M. Lubián 2000.), tretiranje otpadnih voda (A. Mohseni i sur. 2020., E. S. Sofiyah i W. K. Suryawan 2020.), te izvor proteina u akvakulturi (M. Ashour i sur. 2018., I. Freire i sur. 2016.). Kolokvijalno nazvane fitoplankton predstavljajući oko 1% fotosintetske biomase na Zemlji, mikroalge su odgovorne za proizvodnju preko 45% godišnje primarne proizvodnje organske tvari i stoga analiza njihovog genoma je od presudne važnosti za shvaćanje njihove prilagodbe na promjene okolišnih uvjeta u slanim i slatkim vodenim ekosustavima (Falkowski i sur., 2004).

Veličina genoma *Nannochloropsis salina* CCMP1776 od 27,8 Mb je usporediva s genomom iz *Nannochloropsis salina* CCMP537 od 26,9 Mb (Wang i sur., 2014). Naime *Nannochloropsis salina* CCMP1776 ima puno manji i kompaktniji genom od modelne alge *Chlamydomonas* koji je veličine 121 Mb koji sadrži devet Hsp70 gena (Merchant i sur., 2007). Uzevši u obzir da svi genomi sekvenciranih vrsta *Nannochloropsis* sadrže ukupno oko 38000 gena, razlike u veličini genoma u rasponu od 26,9 do 31.5 Mb otkrivaju posebne prilagodbe na okolišne uvjete određene vrste (Wang i sur., 2014)

U ovom radu, detektirano je, klasificirano i analizirano putem bioinformatičkih alata deset proteinskih sekvenci superobitelji Hsp70/110 u *Nannochloropsis salina* CCMP1776 od čega šest pripada eukariotskim Hsp70 ondoso prokariotskim DnaK podobiteljima proteina te četiri sekvence pripadaju Hsp110 podobiteljima proteina. Evolucijska analiza Hsp70 proteina iz crvene alge *Pyropia yezoensis* (nori alga) pokazala je prisustvo 15 Hsp70/110 proteinskih sekvenci u genomu veličine 108 Mb i ne postoji korelacija između broja Hsp70/110 sekvenci u ovom rodu algi s veličinom genoma (Yu i sur., 2021). Kako je u *Arabidopsisu* 18 Hsp70/110 gena raspoređeno unutar 150 Mb genomske DNA, to ukazuje da je strategija evolucije Hsp70 superobitelji gena različita kod različitih organizama te da je duplikacija Hsp70 gena bila učestalija kod evolucijski naprednijih organizama (Bai-Ling Lin i sur., 2001.).

Po uzoru na nomenklaturu u *Arabidopsis thaliana*, na temelju sličnosti proteinskih sekvenci Hsp70/100, imenovani su Hsp70 geni u *Nannochloropsis salina* (Berka i sur., 2022). Citosol; TFJ83334.1 je zbog sličnosti s ortolognim *AtHsp70-2* (AT5G02490) imenovan u *NsHsp70-2*,

TFJ87713.1 je zbog sličnosti s ortolognim *AtHsp70-14* (AT1G79930) imenovan u *NsHsp70-14*, TFJ83145.1 je zbog iste nomenklature imenovan u *NsHsp70-16*, te je TFJ83252.1 zbog sličnosti s *AtHsc70-1* nazvao *NsHsp70-1*. Po istom principu, proteinske sekvence iz endoplazmatskog retikuluma; TFJ83042.1 i TFJ80064.1 nazvane su *NsHsp70-17*, te *NsHsp70-12*, mitohondrijski TFJ88644.1 nazvan je *NsHsp70-10*, a TFJ88236.1 je nazvan *NsHsp70-9*. Također, plastidni TFJ88690.1 i TFJ84871.1, prema istoj nomenklaturi, nazvani su *NsHsp70-5* i *NsHsp70-7*. Poravnavanjem svih deset sljedova sekvenci pokazalo se kako su upravo SBD i NBD najkonzerviranije regije unutar *NsHsp70/110* aminokiselinskih nizova. Ovakvi konzervirani slijedovi mogu poslužiti za identifikaciju proteina algi iz drugih vrsta koji sadrže sličan stupanj evolucijske konzervacije aminokiselina. Naposljetku, filogenetskom analizom i uspostavom filogenetskog stabla između *Nannochloropsis salina*, *Arabidopsis thaliana* te *Homo sapiens*, pokazalo se da su proteini endoplazmatskog retikuluma i mitohondrija sustava grupirani te evolucijski konzervirani.

## 8. ZAKLJUČAK

Otkriće novih sekvenci proteina Hsp70 iz *Nannochloropsis salina* CCMP1776 pruža važne uvide u evoluciju i prilagodbu ove jednostanične vrste algi različitim uvjetima okoliša. Proteini toplinskog šoka (Hsp) igraju ključnu ulogu u zaštiti stanica od toplinskog šoka, a Hsp70 je jedan od najvažnijih i najkonzervativnijih članova ove proteinske obitelji.

Identifikacija novih sekvenci Hsp70 u *NsCCMP1776* sugerira da je ova vrsta algi evoluirala jedinstvene mehanizme za suočavanje s toplinskim stresom. To je posebno zanimljivo s obzirom na to da *NsCCMP1776* uspijeva u ekstremnim uvjetima, uključujući visok salinitet i temperaturne uvjete. Identifikacija novih sekvenci Hsp70 u *N. salini* može pružiti uvide u to kako se ova vrsta algi prilagodila tim ekstremnim uvjetima te pomoći istraživanjima da identificiraju nove strategije za poboljšanje otpornosti biljaka na toplinski stres.

Budući da je obitelj proteina Hsp70 visoko konzervirana u različitim organizmima, identifikacija novih sekvenci Hsp70 u *NsCCMP1776* može baciti novo svjetlo na evoluciju proteina Hsp70 u različitim vrstama. U daljnjim istraživanjima potrebno je eksperimentalno potvrditi koje su stvarne stanične lokalizacije predviđenih Hsp70 sekvenci i koja je njihova stanična ekspresija u stresnim uvjetima kako bi se u potpunosti karakterizirale funkcije i mehanizmi Hsp70 proteina u *NsCCMP1776* te kako bi se odredio njihov potencijal u primjeni u biotehnologiji i poljoprivredi.

## 9. LITERATURA

Adl, S., Simpson, A., Lane, C., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S., Brown, M., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L., Lynn, D., Mcmanus, H., Mitchell, E., Mozley-Stanridge, S., Wegener P. L., Spiegel, F. (2012.) The Revised Classification of Eukaryotes. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 59. 429-514. 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x.

Anckar, J., Sistonen, L. (2011.) Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annual review of biochemistry*, 80, 1089-1115.

Archibald, J. (2007.) Nucleomorph genomes: Structure, function, origin and evolution. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 29. 392-402. 10.1002/bies.20551. doi.org/10.1002/bies.20551

Asadian M., Barat A. Fakheri, N. Mahdinezhad, S. Gharanjik, J. Beardal : *Algae as Indicators of Climate Change*

Asadian M., Barat A. Fakheri, N.Mahdinezhad, S. Gharanjik, J. Beardal, Ahmad F. Talebi 2018: *Algal Communities: An Answer to Global Climate Changex*

Ashour M., Mostafa E. Elshobary , R. El-Shenody , Abdel-Wahab Kamil , A. El-Fatah Abomohra (2018.): Evaluation of a native oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* for dual use in biodiesel production and aquaculture feed. doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.12.009

Bhattacharya, D., J. M. Archibald, A. P.M. Weber, A. Reyes-Prieto<sup>1</sup> (2007): How do endosymbionts become organelles? Understanding early events in plastid evolution. <https://doi.org/10.1002/bies.20671>

Baweja, P., Sahoo, D. (2015.) Classification of algae. In *The Algae World*; Dinabandhu, S., Seckbach, J., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2015; pp. 31–55.

Bercovich, B., Stancovski, I., Mayer, A., Blumenfeld, N., Laszlo, A., Schwartz, A. L., Ciechanover, A. (1997.) Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates in vitro requires the molecular chaperone Hsc70. *J. Biol. Chem.* , 272, 9002–9010. doi.org/10.1074/jbc.272.14.9002

Berka M., R. Kopecká, V. Berková, B. Brzobohatý, M. Černý (2022): Regulation of heat shock proteins 70 and their role in plant immunity

Bertelsen, E. B., Chang, L., Gestwicki, J. E., Zuiderweg, E. R. (2009.) Solution conformation of wild-type *E. coli* Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* , 106, 8471–8476. doi.org/10.1073/pnas.0903503106

Bhattacharya D., Dana C. Price, Cheong Xin Chan, Huan Qiu, Nicholas Rose, Steven Ball, Andreas P. M. Weber, Maria Cecilia Arias, Bernard Henrissat, Pedro M. Coutinho, Anagha Krishnan, Simone Zäuner, Shannon Morath, Frédérique Hilliou, Andrea Egizi, Marie-Mathilde Perrineau & Hwan Su Yoon (2013.): Genome of the red alga *Porphyridium purpureum*

Bolhassani i E. Agi (2019.), Heat shock proteins in infection. Doi.org/10.1016/j.cca.2019.08.015

Bork, P., Sander, C., Valencia, A. (1992.) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 7290– 7294. doi.org/10.1073/pnas.89.16.7290

Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otilar, R. P. (2008.) The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. Nature, 456, 239.

Burki, F., Kaplan, M., Tikhonenkov, D. V., Zlatogursky, V., Minh, B. Q., Radaykina, L. V., Smirnov, A., Mylnikov, A. P., Keeling, P. J. (2016.) Untangling the early diversification of eukaryotes: A phylogenomic study of the evolutionary origins of Centrohelida, Haptophyta and Cryptista. Proc. R. Soc. B Biol. Sci., 283, 20152802. doi.org/10.1098/rspb.2015.2802

Busi, M. V., Barchiesi, J., Martín, M., Gomez-Casati, D. F. (2014.) Starch metabolism in green algae. Starch, 66, 28–40. doi.org/10.1002/star.201200211

Cai T., S. Y. Park, R. Racharaks, Y. Li (2013.): Cultivation of *Nannochloropsis salina* using anaerobic digestion effluent as a nutrient source for biofuel production. doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.03.056

Carratù, L., Franceschelli, S., Pardini, C., Kobayashi, G., Horvath, I., Vigh, L., Maresca, B. (1996.) Membrane Lipid Perturbation Modifies the Set Point of the Temperature of Heat Shock Response in Yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 93. 3870-5. 10.1073/pnas.93.9.3870. doi.org/10.1073/pnas.93.9.3870

Cheng, L., von Schuckmann, K., Abraham, J.P. et al. Past and future ocean warming. Nat Rev Earth EnG. R. Walther, E. Post, P. Convey, A. Menzel, C. Parmesan, T. J. Beebee, J. M. Fromentin, O. Hoegh-Guldberg, F. Bairlein, Nature 2002, 416, 389.

Chiang, H. L., Terlecky, S. R., Plant, C. P., Dice, J. F. (1989) A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. Science, 246, 382–385. DOI: 10.1126/science.2799391

Climate Change and Microbes 2022: Imprint Apple Academic Press

Chionh Yok Teng, Jie Cui, Javier Koh, Ian H. Mendenhall, Justin H. J. Ng, Dolyce Low, Koji Itahana, Aaron T. Irving & Lin-Fa Wang (2019.): High basal heat-shock protein expression in bats confers resistance to cellular heat/oxidative stress.

Chrétiennot-Dinet, M. J. (1997.) Haptophytes. In Encyclopedia of ocean sciences (pp. 1224-1231). Academic Press.

Cock J. M., Sterck L., Rouzé P., Scornet D., Allen A. E., Amoutzias G., Anthouard V., Artiguenave F., Aury J.-M., Badger J.H. (2010.) The ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. Nature. 465:617–621. doi: 10.1038/nature09016.

- Graff van Creveld, S., Rosenwasser, S., Schatz, D., Koren, I., Vardi, A. (2014.) Early perturbation in mitochondria redox homeostasis in response to environmental stress predicts cell fate in diatoms. *The ISME journal*. 9. 10.1038/ismej.2014.136.
- Domozych, D., Ciancia, M., Fangel, J., Mikkelsen, M., Ulvskov, P., Willats, W. (2012.) The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. *Front. Plant Sci.*, 3, 1–7. doi.org/10.3389/fpls.2012.00082
- Dana D. Miller, Yoshitaka Ota, Ussif Rashid Sumaila, Andrés M. Cisneros-Montemayor, William W. L. Cheung (2017): Adaptation strategies to climate change in marine systems
- Fawley, M. W., Y. Yun and M. Qin. 2000. Phylogenetic analyses of 18s rDNA sequences reveal a new coccoid lineage of the Prasinophyceae (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 36: 387–393.
- Figueroa-Martinez, F., Jackson, C., Reyes-Prieto, A. (2018.) Plastid Genomes from Diverse Glaucophyte Genera Reveal a Largely Conserved Gene Content and Limited Architectural Diversity. *Genome Biol. Evol.*, 11, 174–188. doi.org/10.1093/gbe/evy268
- Finka, A., Mattoo, R., Goloubinoff, P. (2011.) Meta-analysis of heat- and chemically upregulated chaperone genes in plant and human cells. *Cell stress & chaperones*. 16. 15-31. 10.1007/s12192-010-0216-8.
- Flaherty, K. M., DeLuca-Flaherty, C., McKay, D. B. (1990.) Threedimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heatshock cognate protein. *Nature*, 346, 623–628.
- Foster M.S., Schiel D.R. (1985.) Ecology of Giant Kelp Forests in California: A Community Profile. San Jose State University, Moss Landing Marine Labs.; Moss Landing, CA, USA.
- Freire I., A. Cortina-Burgueño , P. Grille, M. Arizcun, E. Abellán , M. Segura , F. W. Sousa, A. Otero (2016.): *Nannochloropsis limnetica*: A freshwater microalga for marine aquaculture. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.015
- Frydman, J. (2001.) Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 603–647. doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.603
- Glassgen, A., S. Jonmarker, A. Lindberg, B. Nilsson, R. Lewensohn, P. Ekman, A. Valdman, L. Egrvad 2008. : Heat shock proteins 27, 60 and 70 as prognostic markers of prostate cancer
- Glazer, A.N. (1977.) Structure and molecular organization of the photosynthetic accessory pigments of cyanobacteria and red algae. *Mol. Cell. Biochem.*, 18, 125–140.
- Goltsev, V., Zaharieva, I., Chernev, P., Kouzmanova, M., Kalaji, H. M. (2016.) Effects of high temperature stress on photosystem II efficiency and antioxidant responses in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 109-117.
- Manuel F. Gonzalez, Kazuya Shiraishi, Kinya Hisanaga, Stephen M. Sagar, Mark Mandabach, Frank R. Sharp: Heat shock proteins as markers of neural injury (1989.). doi.org/10.1016/0169-328X(89)90033-8

Hartl, F. U., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. (2011.) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324-332.

Hoek C., Mann D., Jahns H. M. (1995.) *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press; Cambridge, UK.

Horvath, I., Glatz, A., Varvasovszki, V., Torok, Z., Pali, T., Balogh, G., Kovács, E., Nádásdi, L., Benkő, S., Joó, F., Vigh, L. (1998.) Membrane Physical State Controls the Signaling Mechanism of the Heat Shock Response in *Synechocystis* PCC 6803: Identification of hsp17 as a "Fluidity Gene". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95. 3513-8. 10.1073/pnas.95.7.3513. doi.org/10.1073/pnas.95.7.3513

Jackson, C., Clayden, S., Reyes-Prieto, A. (2015.) The Glaucophyta: The blue-green plants in a nutshell. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 84, 149–165.

Jauzein, C., Erdner, D. (2013.) Stress-related Responses in *Alexandrium tamarense* Cells Exposed to Environmental Changes. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 60. 10.1111/jeu.12065. doi.org/10.1111/jeu.12065

Kadam S. U., Tiwari B. K., O'Donnell C. P. (2013.) Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *J. Agric. Food Chem.* 2013;61:4667–4675. doi: 10.1021/jf400819p. doi.org/10.1021/jf400819p

Kampinga, H. H., Craig, E. A., Kirschner, B. A., Morimoto, M. H., Nawrocki, P. P. (2009.) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*, 14(1), 105-111.

Kaigorodova, V., Evgeniya; V. Bogatyuk, Mariya 2014. : Heat Shock Proteins as Prognostic Markers of Cancer.

Keeling, P. J. (2004.) Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *Am. J. Bot.*, 91, 1481–1493. doi.org/10.3732/ajb.91.10.1481

Keeling, P. J. Burger, G., Durnford, D. G., Lang, B. F., Lee, R. W., Pearlman, R. E., Roger, A. J., Gray, M. W. (2005.) The tree of eukaryotes. *Trends Ecol. Evol.*, 20, 670–676. doi.org/10.1016/j.tree.2005.09.005

Kelly M.: Adaptation to climate change through genetic accommodation and assimilation of plastic phenotypes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2019 Mar 18;374(1768):20180176. doi: 10.1098/rstb.2018.0176. PMID: 30966963; PMCID: PMC6365860

Kim, B., Kim, K., Park, M., Lee, W. (2019.) Diversity and distribution of cryptomonads in Korea. *Algae*, 34(1), 29-38.

Kim, K.Y. (2011). "Brown algae as a potential source of phlorotannins: Possible therapeutic and pharmaceutical effects". *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 701: 245–259.



- Kumar, M., Choi, J., An, G., Kim, S. R. (2017.) Evidences for a systemic phenomenon for acclimation of primary photosynthetic processes of rice plants in response to high temperature stress. *Plant, Cell & Environment*, 40(10), 2082-2094.
- Klähn, S., Hagemann, M. (2010.) Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental microbiology*. 13. 551-62. 10.1111/j.1462-2920.2010.02366.x.
- Leliaert, F., Smith, D., Moreau, H., Herron, M., Verbruggen, H., Delwiche, C., Clerck, O. (2012.) Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 30. 1-46. 10.1080/07352689.2011.615705. doi.org/10.1080/07352689.2011.615705
- Lemieux, C., Vincent, A.T., Labarre, A., Otis, C., Turmel, M. (2015.) Chloroplast phylogenomic analysis of chlorophyte green algae identifies a novel lineage sister to the Sphaeropleales (Chlorophyceae). *BMC Evol. Biol.*, 15, 264.
- Lewis, L. A., McCourt, R. M. (2004.) Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany*. 91 (10): 1535–1556. doi.org/10.3732/ajb.91.10.1535
- Li, S., Zhou, X., Chen, L., Huang, W., Yu, D. (2010.) Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* WRKY39 in heat stress. *Mol Cells*;29(5):475-83. doi: 10.1007/s10059-010-0059-2. Epub 2010 Apr 12. PMID: 20396965.
- Liu, H. C., Liao, H. T., Charng, Y. Y. (2011.) The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.*;34(5):738-51. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02278.x. Epub. PMID: 21241330. doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02278.x
- Liu, H., Gao, F., Li, G.-L., Han, J.-L., Liu, D.-L., Sun, D., Zhou, R.-G. (2008.) The calmodulin-binding protein kinase 3 is part of heat-shock signal transduction in *Arabidopsis thaliana*.
- Los, D., Mironov, K., Allakhverdiev, S. (2013.) Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynthesis research*. 116. 10.1007/s11120-013-9823-4.
- Lu, Wen J.; Lee, Nikki P.; Fatima, Sarwat; Luk, John M. (2009.): Heat Shock Proteins in Cancer: Signaling Pathways, Tumor Markers and Molecular Targets in Liver Malignancy
- Lubián, L. M., O. Montero, I. Moreno-Garrido, I. E. Huertas, C. Sobrino, M. González-del Valle, G. Parés (2000): Nannochloropsis (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments
- Ljubic, A., C. Jacobsen, S. L. Holdt, J. Jakobsen (2020.): Microalgae *Nannochloropsis oceanica* as a future new natural source of vitamin D3. doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126627
- Mackiewicz, P., Gagat, P. (2014.) Monophyly of Archaeplastida supergroup and relationships among its lineages in the light of phylogenetic and phylogenomic studies. Are we close to a consensus? *Acta Soc. Bot. Pol.* 2014, 83, 263–280.
- Maksimov, E., Mironov, K., Trofimova, M., Nechaeva, N., Todorenko, D., Klementyev, K., Tsoraev, G., Tyutyaev, E., Zorina, A., Feduraev, P., Allakhverdiev, S., Paschenko, V., Los, D. (2017.) Membrane fluidity controls redox-regulated cold stress responses in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*. 133. 10.1007/s11120-017-0337-3.

Mayer M. P., Bukau B. (2005.) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*;62(6):670-84. doi: 10.1007/s00018-004-4464-6.

McFadden, G. I. (2001.) Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *J. Phycol.* , 37, 951–959. doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01126.x

Meimaridou, E., Gooljar, S. B., Chapple, J. P. (2009.) From hatching to dispatching: the multiple cellular roles of the Hsp70 molecular chaperone machinery. *J. Mol. Endocrinol.*, 42, 1–9.

Meiri, D., Breiman, A. (2009.) Arabidopsis ROF1 (FKBP62) modulates thermotolerance by interacting with HSP90.1 and affecting the accumulation of HsfA2-regulated sHSPs. *Plant J.* 59, 387–399. doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03878.x

Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O., Harris E.H., Karpowicz S.J., Witman G.B., Terry A., Salamov A., Fritz-Laylin L.K., Maréchal-Drouard L., Marshall W.F., Qu L.H., Nelson D.R., Sanderfoot A.A., Spalding M.H., Kapitonov V.V., Ren Q., Ferris P., Lindquist E., Shapiro H., Lucas S.M., Grimwood J., Schmutz J., Cardol P., Cerutti H., Chanfreau G., Chen C.L., Cognat V., Croft M.T., Dent R., Dutcher S., Fernández E., Fukuzawa H, González-Ballester D, González-Halphen D, Hallmann A, Hanikenne M, Hippler M, Inwood W, Jabbari K, Kalanon M, Kuras R, Lefebvre PA, Lemaire SD, Lobanov AV, Lohr M, Manuell A, Meier I, Mets L, Mittag M, Mittelmeier T, Moroney JV, Moseley J, Napoli C, Nedelcu AM, Niyogi K, Novoselov SV, Paulsen IT, Pazour G, Purton S, Ral JP, Riaño-Pachón DM, Riekhof W, Rymarquis L, Schroda M, Stern D, Umen J, Willows R, Wilson N, Zimmer SL, Allmer J, Balk J, Bisova K, Chen CJ, Elias M, Gendler K, Hauser C, Lamb MR, Ledford H, Long JC, Minagawa J, Page MD, Pan J, Pootakham W, Roje S, Rose A, Stahlberg E, Terauchi AM, Yang P, Ball S, Bowler C, Dieckmann CL, Gladyshev VN, Green P, Jorgensen R, Mayfield S, Mueller-Roeber B, Rajamani S, Sayre RT, Brokstein P, Dubchak I, Goodstein D, Hornick L, Huang YW, Jhaveri J, Luo Y, Martínez D, Ngau WC, Otilar B, Poliakov A, Porter A, Szajkowski L, Werner G, Zhou K, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Grossman AR. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*. 2007 Oct 12;318(5848):245-50. doi: 10.1126/science.1143609. PMID: 17932292; PMCID: PMC2875087.

Merilä J., *Bio Essays* 2012, 34, 811.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004.) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9:490-498. *Trends in plant science*. 9. 490-8. 10.1016/j.tplants.2004.08.009.

Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y. (2010.) The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 107-132.

Mohseni A., M. Kube, L. F. Felicity A. Roddick (2020.): Potential of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis salina* for nutrient and organic matter removal from municipal wastewater reverse osmosis concentrate

Moreira, D., López-García, P. (2017.) Evolution: King-Size Plastid Genomes in a New Red Algal Clade. *Curr. Biol.*, 27, R651–R653. doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.038

- Morimoto, R. I. (2011.) The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), a004505.
- Murata, N., Los, D. A. (1997.) Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiol.* 115, 875–879. 10.1104/pp.115.3.875.
- Mittler, R., Finka, A., Goloubinoff, P. (2012.) How do plants feel the heat?; *Trends in Biochemical Sciences*, Volume 37, Issue 3, Pages 118-125, ISSN 0968-0004, 10.1016/j.tibs.2011.11.007.
- Ostberg, S., Schewe, J., Childers, K., and Frieler, K.: Changes in crop yields and their variability at different levels of global warming, *Earth Syst. Dynam.*, 9, 479–496, doi.org/10.5194/esd-9-479-2018, 2018.
- Plant journal : for cell and molecular biology.* 55. 760-73. 10.1111/j.1365-313X.2008.03544.x. doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03544.x
- Pratt, W., Toft, D. (2003.) Regulation of Signaling Protein Function and Trafficking by the hsp90/hsp70-Based Chaperone Machinery. *Experimental Biology and Medicine.* 228. 111-133. doi.org/10.1177/153537020322800201.
- Poloczanska E. S., C. J. Brown, W. J. Sydeman, W. Kiessling, D. S. Schoeman, P. J. Moore, K. Brander, J. F. Bruno, L. B. Buckley, M. T. Burrows, C. M. Duarte, *Nat. Clim. Chang.* 2013, 3, 919. viron 3, 776–794 (2022). <https://doi.org/10.1038/s43017-022-00345-1>
- Price, D., Chan, C. X., Yoon, H. S., Yang, E., Qiu, H., Weber, A., Schwacke, R., Gross, J., Blouin, N., Lane, C., Reyes-Prieto, A., Durnford, D., Neilson, J., Lang, B., Burger, G., Steiner, J., Löffelhardt, W., Meuser, J., Posewitz, M., Bhattacharya, D. (2012.) *Cyanophora paradoxa* Genome Elucidates Origin of Photosynthesis in Algae and Plants. *Science (New York, N.Y.)*. 335. 843-7. 10.1126/science.1213561.
- Ragan, M. A. (1989.) Phylogenetic inference and the phylogeny of the "Ahnfeltiales". *Plant Systematics and Evolution.* 162 (3–4): 213–227.
- Ramot, D., MacInnis, B., Goodman, M. (2008.) Bidirectional temperature-sensing by a single thermosensory neuron in *C. elegans*. *Nature neuroscience.* 11. 908-15. 10.1038/nn.2157.
- Ras, M., Steyer, J.-P., Bernard, O. (2013.) Temperature effect on microalgae: A crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology.* 12. 10.1007/s11157-013-9310-6.
- Reddy, G. S., Anireddy, S. N., Ali, H., Celesnik, I. S. (2011.) Coping with Stresses: Roles of Calcium- and Calcium/Calmodulin-Regulated Gene Expression, *The Plant Cell*, Volume 23, Issue 6, June 2011, Pages 2010–2032, 10.1105/tpc.111.084988
- Reyes-Prieto, A., Weber, A. P., Bhattacharya, D. (2007.) The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annu. Rev. Genet.*, 41, 147–168.
- Ritossa, F. M., Spiegelman, S. (1965.) Localization of Dna complementary to ribosomal Rna in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster*. doi.org/10.1073/pnas.53.4.737

Rodríguez-Iturbe B. i RJ Johnson: Heat shock proteins and cardiovascular disease (2018.). doi.org/10.1556/2060.105.2018.1.4

Russell, R., Jordan, R., McMacken, R. (1998.) Kinetic characterization of the ATPase cycle of the DnaK molecular chaperone. *Biochemistry*, 37, 596–607. doi.org/10.1021/bi972025p

Sangma C. i Sultana S., 2022: Algae as Indicators of Climate Change

Saidi, Y., Finka, A., Muriset, M., Bromberg, Z., Weiss, Y., Maathuis, F., Goloubinoff, P. (2009.) The Heat Shock Response in Moss Plants Is Regulated by Specific Calcium-Permeable Channels in the Plasma Membrane. *The Plant cell*. 21. 2829-43. 10.1105/tpc.108.065318.

Saidi, Y., Peter, M., Finka, A., Cicekli, C., Vigh, L., Goloubinoff, P. (2010.) Membrane lipid composition affects plant heat sensing and modulates Ca<sup>2+</sup>-dependent heat shock response. *Plant signaling & behavior*. 5. 1530-3. 10.4161/psb.5.12.13163.

Sangwan, V., Orvar, B., Beyerly, J., Hirt, H., Dhindsa, R. (2002.) Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant J. The Plant journal : for cell and molecular biology*. 31. 629-38. 10.1046/j.1365-313X.2002.01384.x.

Schaffitzel, E., Rudiger, S., Bukau, B., Deuerling, E. (2001.) Functional dissection of trigger factor and DnaK: interactions with nascent polypeptides and thermally denatured proteins. *Biol. Chem.*, 382, 1235–1243. doi.org/10.1515/BC.2001.154

Schaum CE, Collins S. Plasticity predicts evolution in a marine alga. *Proc Biol Sci*. 2014 Oct 22;281(1793):20141486. doi: 10.1098/rspb.2014.1486. Epub 2014 Sep 10. PMID: 25209938; PMCID: PMC4173685.

Schroda, M., Hemme, D., Mühlhaus, T. (2015.) The *Chlamydomonas* heat stress response. *The Plant Journal*. 82. 10.1111/tpj.12816.

Silberfeld, T., et al. (2010). "Brown algae as model organisms for the study of secondary endosymbiosis". *Advances in Botanical Research*. 64: 1–39.

Sokabe, T., Tsujiuchi, S., Kadowaki, T., Tominaga, M. (2008.) *Drosophila Painless* Is a Ca<sup>2+</sup>-Requiring Channel Activated by Noxious Heat. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 28. 9929-38. 10.1523/JNEUROSCI.2757-08.2008.

Sonam Mittal i Maitreyi S. Rajala: Heat shock proteins as biomarkers of lung cancer 2020. doi.org/10.1080/15384047.2020.1736482

Sournia, A. (1995) Red-tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: An inquiry into biodiversity. In *Harmful Marine Algal Blooms. Proceedings 6th International Conference on Toxic Marine Phytoplankton*, Lavosier, pp. 103–112.

Sofiyah E. S. i W. K. Suryawan (2021.): Cultivation of *Spirulina platensis* and *Nannochloropsis oculata* for nutrient removal from municipal wastewater.

Sulmon, C., van Baaren, J., Cabello-Hurtado, F., Gouesbet, G., Hennion, F., Mony, C., Renault, D., Bormans, M., EL Amrani, A., Wiegand, C., Claudia, G. (2015.) Abiotic stressors and stress responses: What commonalities appear between species across biological organization levels?. *Environmental Pollution*. 202. 10.1016/j.envpol.2015.03.013.

Suzuki, N., Miller, G., Morales Bello, J., Shulaev, V., Torres, M. A., Mittler, R. (2011.) Respiratory burst oxidases: The engines of ROS signaling. *Current opinion in plant biology*. 14. 691-9. 10.1016/j.pbi.2011.07.014.

State of the Global Climate 2022 WMO-No. 1316 (World Meteorological Organization, 2023); <https://go.nature.com/427Rmmq>

Tanaka, A., Tanaka, R. (2019.) Chapter Six-The biochemistry, physiology, and evolution of the chlorophyll cycle. In *Advances in Botanical Research*; Grimm, B., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA; Volume 90, pp. 183–212. doi.org/10.1016/bs.abr.2019.03.005

Van der Meer, J. P. (2012.) The biology of Euglena. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 293, 1-68.

Varma, V., M. Varma , A. Varma , R. Kumar , A. Bharosay , S. Vyas 2016. : Serum Total Sialic Acid and Highly Sensitive C-reactive Protein: Prognostic Markers for the Diabetic Nephropathy. Doi: 10.4103/0974-2727.176230

Vasseur, F., Pantin, F., Vile, D. (2011.) Changes in light intensity reveal a major role for carbon balance in Arabidopsis responses to high temperature. *Plant, cell & environment*. 34. 1563-76. 10.1111/j.1365-3040.2011.02353.x.

Vígh, L., Nakamoto, H., Landry, J., Gomez-Munoz, A., Harwood, J., Horvath, I. (2007.) Membrane Regulation of the Stress Response from Prokaryotic Models to Mammalian Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1113. 40-51. 10.1196/annals.1391.027.

Vihervaara, A., Sistonen, L. (2014.) HSF1 at a glance. *Journal of cell science*, 127(2), 261-266. doi.org/10.1242/jcs.132605

Voisine, C., Craig, E. A., Zufall, N., von Ahsen, O., Pfanner, N., Voos, W. (1999.) The protein import motor of mitochondria: Unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell*. 1999 Oct 29;97(5):565-74. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80767-8.

Vojtech K., Brett K. Sandercock, Székely T. Robert P. Freckleton: (2022.) Animal migration to northern latitudes: environmental changes and increasing threats. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.08.010>

Walther G. R., E. Post, P. Convey, A. Menzel, C. Parmesan, T. J. Beebee, J. M. Fromentin, O. Hoegh-Guldberg, F. Bairlein, *Nature* 2002, 416, 389.

Wang D, Ning K, Li J, Hu J, Han D, Wang H, Zeng X, Jing X, Zhou Q, Su X, Chang X, Wang A, Wang W, Jia J, Wei L, Xin Y, Qiao Y, Huang R, Chen J, Han B, Yoon K, Hill RT, Zohar Y, Chen F, Hu Q, Xu J. Nannochloropsis genomes reveal evolution of microalgal oleaginous

traits. *PLoS Genet.* 2014 Jan;10(1):e1004094. doi: 10.1371/journal.pgen.1004094. Epub 2014 Jan 9.

Wang D., Xinzi Yu, Kuipeng Xu, Guiqi Bi, Min Cao, Peipei Sun, Yang Liu, Fanna Kong, Guoying Du, Xianghai Tang, Junhao Wang, Lei Tang, Lu Wang, Yingjun Zhao, Yuan Ge, Yu Chen, Tian Gao, Xiaowei Guan, Rui Chen, Weihua Qu, Bin Sun & Yunxiang Mao. *Nature Communications* volume 11, Article number: 4028 (2020): *Pyropia yezoensis* genome reveals diverse mechanisms of carbon acquisition in the intertidal environment. Doi:<https://doi.org/10.1038/s41467-020-17689-1>

Williams M., H. A. Henry, B. J. Sinclair, *Bio. Rev.* 2015, 90, 214.

Xiao, B., Coste, B., Mathur, J., Patapoutian, A. (2011.) Temperature-dependent STIM1 activation induces Ca influx and modulates gene expression. *Nature chemical biology.* 7. 351-8. 10.1038/nchembio.558.

Xiao-Nian Ma, Tian-Peng Chen, Bo Yang, Jin Liu, Feng Chen (2016.): Lipid Production from *Nannochloropsis*

Yao, J., Liu, B., Qin, F. (2011.) Modular thermal sensors in temperature-gated transient receptor potential (TRP) channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 108. 11109-14. 10.1073/pnas.1105196108.

Yoon, H. S., Hackett, J., Ciniglia, C., Pinto, G., Bhattacharya, D. (2004.) A Molecular Timeline for the Origin of Photosynthetic Eukaryotes. *Molecular biology and evolution.* 21. 809-18. 10.1093/molbev/msh075.

Yoon, H. S., Hackett, J. D., Ciniglia, C., Pinto, G., Bhattacharya, D. (2004.) A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.*, 21, 809–818. doi.org/10.1093/molbev/msh075

Yoon, H. S., Müller, K., Sheath, R., Ott, F., Bhattacharya, D. (2006.) Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta). *J. Phycol.*, 42, 482–492. doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00210.x

Yoon, H. S., Nelson, W., Lindstrom, S. C., Boo, S. M., Poeschel, C., Qiu, H., Bhattacharya, D. (2017.) Rhodophyta. In *Handbook of the Protists*; Archibald, J. M., Simpson, A.G.B., Slamovits, C.H., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland; pp. 89–133.

Young, J. C., Barral, J. M., Ulrich Hartl, F. (2003.) More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem. Sci.*, 28, 541–547. doi.org/10.1016/j.tibs.2003.08.009

Xinzi Yu, Zhaolan Mo, Xianghai Tang, Tian Gao & Yunxiang Mao: Genome-wide analysis of HSP70 gene superfamily in *Pyropia yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) 2021. : Identification, characterization and expression profiles in response to dehydration stress

Zanella L., F. Vianello (2020.) : Microalgae of the genus *Nannochloropsis*: Chemical composition and functional implications for human nutrition. doi.org/10.1016/j.jff.2020.103919

Zhang, N., Mattoon, E.M., McHargue, W. *et al.* Systems-wide analysis revealed shared and unique responses to moderate and acute high temperatures in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Commun Biol* **5**, 460 (2022). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03359-z>

Zhang, W., Zhou, R.-G., Gao, Y.-J., Zheng, S.-Z., Xu, P., Zhang, S.-Q., Sun, D. (2009.) Molecular and Genetic Evidence for the Key Role of AtCaM3 in Heat-Shock Signal Transduction in Arabidopsis. *Plant physiology*. 149. 1773-84. 10.1104/pp.108.133744. [doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01365.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01365.x)

Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W. F., Gragerov, A., Ogata, C. M., Gottesman, M. E., Hendrickson, W. A. (1996.) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 1996, 272, 1606–1614. doi: 10.1126/science.272.5268.1606

Zohdi, E., M. Abbaspour (2019): Harmful algal blooms (red tide): a review of causes, impacts and approaches to monitoring and prediction.

Zuppini, A., Andreoli, C., Baldan, B. (2007.) Heat Stress: an Inducer of Programmed Cell Death in *Chlorella saccharophila*. *Plant & cell physiology*. 48. 1000-9. 10.1093/pcp/pcm070. [doi.org/10.1093/pcp/pcm070](https://doi.org/10.1093/pcp/pcm070)