

# Izolacija i karakterizacija primarnih fibroblasta iz kože i pluća miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa

---

Tomljanović, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:386931>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-18**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
„Biotehnologija u medicini“

Tea Tomljanović

**Izolacija i karakterizacija primarnih fibroblasta iz kože i pluća  
miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa**

Diplomski rad

Rijeka, 2022. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
„Biotehnologija u medicini“

Tea Tomljanović

**Izolacija i karakterizacija primarnih fibroblasta iz kože i pluća  
miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa**

Diplomski rad

Rijeka, 2022. godina

Mentorica rada: doc.dr.sc. Slađana Bursać

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
Graduate programme  
„Biotechnology in medicine“

Tea Tomljanović

**Isolation and characterization of primary fibroblasts from skin and  
lung of wild-type mice and Sti-heterozygous mice**

Graduate thesis

Rijeka, year 2022

## Zahvale

*Veliko hvala mojoj mentorici, doc. dr. sc. Slađani Bursać, na ogromnoj pomoći i podršci prilikom pisanja ovog diplomskog rada. Hvala Vam na prilici, trudu, strpljenju i prenesenom znanju.*

*Hvala mojim roditeljima na bezuvjetnoj ljubavi i podršci u svakom trenutku mog života.*

*„Dobri roditelji daju svojoj djeci korijen i krila. Korijen da znaju gdje im je kuća, a krila da odlete i pokažu što su ih naučili“. Hvala vam što ste mi dali čvrsto korijenje i snažna krila. Ovaj rad posvećujem vama.*

Diplomski rad obranjen je dana **27. srpnja 2022. godine**, pred povjerenstvom:

1. doc.dr.sc. Slađana Bursać
2. izv. prof. dr. sc. Antonija Jurak Begonja
3. doc. dr. sc. Željka Maglica

Rad ima 38 stranica, 11 slika i 28 literaturnih navoda.

## **SAŽETAK**

Tijekom životnog vijeka organizma sisavaca postepeno se narušava homeostaza proteina koja uzrokuje slabljenje većine staničnih funkcija, što rezultira bolestima koje su povezane sa starenjem i smrću. Međutim, vrlo malo se zna o izvanstaničnim i staničnim čimbenicima koji dodatno ubrzavaju poremećaj homeostaze proteina tijekom procesa starenja. U ovom radu karakterizirani su poremećaji homeostaze proteina u primarnim stanicama izoliranim iz divljeg tipa miševa C57BL/6 na specifičnim stadijima njihovog postnatalnog životnog ciklusa te su uspoređeni s poremećajima homeostaze proteina u istim staničnim vrstama izoliranim iz Sti-heterozigotnih miševa, koji uslijed mutacije enzima alanil-tRNA sintetaze ugrađuju aminokiselinu serin umjesto alanina u svoje proteine. Izolirani su fibroblasti iz tkiva kože i pluća miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa starosti 3 i 6 mjeseci. Poremećaj homeostaze proteina očituje se nakupljanjem slobodnih kisikovih radikala, ROS-a, koji može oštetiti brojne makromolekule i uzrokovati poremećaj njihove funkcije. U izoliranim fibroblastima određena je količina ROS-a. U fibroblastima Sti-heterozigotnih miševa starosti 6 mjeseci nakuplja se veća količina ROS-a u odnosu na fibroblaste miševa divljeg tipa iste starosti. Dobiveni rezultati upućuju da uslijed pogrešaka u sintezi proteina dolazi do narušavanja homeostaze proteina.

**Ključne riječi:** homeostaza proteina, Sti-heterozigotni miševi, primarni fibroblasti iz kože i pluća, reaktivni kisikovi radikali

## SUMMARY

During the lifetime of the mammalian organism, protein homeostasis is gradually disrupted, causing the weakening of most cellular functions, resulting in diseases associated with aging and death. However, not much is known about extracellular and cellular factors that further accelerate the disruption of protein homeostasis during the aging process. This work describes protein homeostasis disorders in primary cells isolated from wild-type C57BL/6 mice and Sti-heterozygous mice at specific stages of their postnatal life. Sti-heterozygous mice are carrying the mutation of the enzyme alanyl-tRNA synthetase which caused incorporation of amino acid serine instead of alanine in its protein. Primary fibroblasts were isolated from the skin and lung of wild-type mice and Sti-heterozygous mice that are 3 and 6 months old. Protein homeostasis disorders is reflected by the accumulation of reactive oxygen species, ROS, which can damage a number of macromolecules and cause disruption of their function. The amount of ROS was determined in isolated fibroblasts. Fibroblasts isolated from the Sti-heterozygous mice in age 6 months accumulate a higher amount of ROS compared to fibroblasts from wild-type mice of the same age. The obtained results indicate that errors in protein synthesis lead to disrupted homeostasis of proteins.

**Key words:** protein homeostasis, Sti-heterozygous mice, primary fibroblasts from skin and lung, reactive oxygen species

## Sadržaj

|                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD .....                                                                                                                                                    | 1  |
| 1.1 Proteini – uloga i građa .....                                                                                                                               | 1  |
| 1.1.1 Sinteza proteina .....                                                                                                                                     | 2  |
| 1.1.2 Aminoacil-tRNA sintetaze .....                                                                                                                             | 4  |
| 1.1.3 Šaperoni .....                                                                                                                                             | 7  |
| 1.1.4 Pogrešna translacija serina umjesto alanina kod miševa .....                                                                                               | 10 |
| 1.1.5 Pogrešno svijanje proteina u neurodegenerativnim bolestima .....                                                                                           | 12 |
| 2. CILJ RADA .....                                                                                                                                               | 15 |
| 3. MATERIJALI I METODE .....                                                                                                                                     | 17 |
| 3.1. Miševi .....                                                                                                                                                | 17 |
| 3.1.1. Etički aspekt istraživanja na životinjama .....                                                                                                           | 17 |
| 3.2. Stanične linije .....                                                                                                                                       | 18 |
| 3.3. Izolacija primarnih fibroblasta iz tkiva kože i pluća miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa .....                                                 | 18 |
| 3.4. Analiza prisutnosti reaktivnih kisikovih radikala (ROS) u fibroblastima tkiva kože i pluća wt i Sti-heterozigotnih miševa starosti tri i šest mjeseci ..... | 20 |
| 3.5. Statistička analiza .....                                                                                                                                   | 20 |
| 4. REZULTATI .....                                                                                                                                               | 22 |
| 5. RASPRAVA .....                                                                                                                                                | 28 |
| 6. ZAKLJUČAK .....                                                                                                                                               | 30 |
| 7. LITERATURA .....                                                                                                                                              | 31 |
| 8. ŽIVOTOPIS .....                                                                                                                                               | 34 |

# 1. UVOD

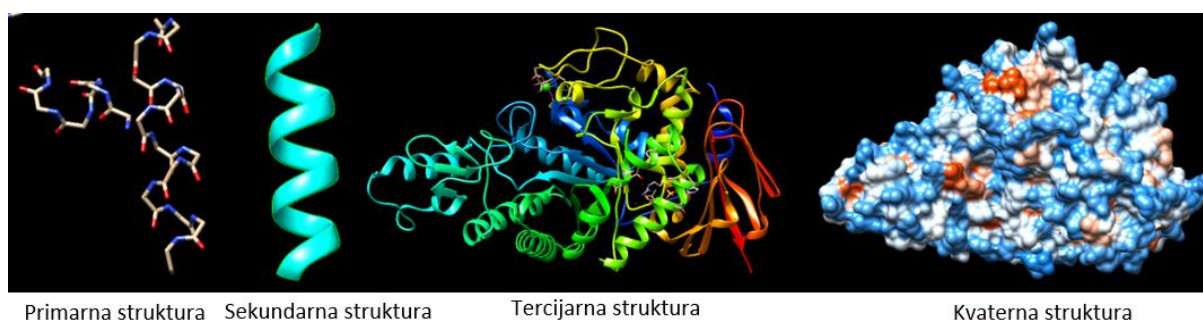
## 1.1 Proteini – uloga i građa

Proteini su velike i složene makromolekule, koje imaju ključnu ulogu u velikom broju bioloških procesa. Oni u tijelu imaju brojne uloge: gradivna uloga, regulacija brojnih staničnih procesa, rast i održavanje homeostaze stanice, zaštitna uloga, transportna uloga, ubrzavanje kemijskih reakcija u organizmu i slično (1).

Proteini se sastoje od jednog ili više polipeptidnih lanaca, a svaki polipeptidni lanac sastoji se od lanaca aminokiselina, koji su međusobno povezani peptidnim vezama (2). Redoslijed, odnosno sekvenca aminokiselina određuje kemijska i fizikalna svojstva proteina, njegove odnose s drugim proteinima te mehanizam djelovanja u organizmu. U prirodi se pojavljuje više od 100 aminokiselina, no većina proteina izgrađena je od njih 20: glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, metionin, prolin, fenilalanin, triptofan, serin, treonin, asparagin, glutamin, tirozin, cistein, lizin, arginin, histidin, asparaginska kiselina i glutaminska kiselina (1).

Slijed aminokiselina određen je genom kodirajućim za određeni protein. Nakon sinteze, polipeptidni lanac se presavija te poprima trodimenzionalni oblik, jedinstven svakom proteinu. Konformacija proteina ovisi o slijedu aminokiselina, a stabilizirana je brojnim slabim interakcijama (2). Postoje četiri razine u organizaciji strukture proteina: primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura (Slika 1.). Primarna struktura podrazumijeva linearni slijed aminokiselina. Vodikove veze između amino i karboksilnih skupina u susjednim regijama dovode do karakterističnih svijanja lanaca, poznatih kao alfa heliks ( $\alpha$ -heliks) i beta nabrana ploča ( $\beta$ -nabrana ploča).  $\alpha$ -heliks i  $\beta$ -nabrana ploča čine sekundarnu strukturu proteina. Građa bočnih lanaca aminokiselina je ključna za strukturu

proteina jer se bočni lanci međusobno vezuju i time utječu na duljinu i konformaciju proteina, čime nastaje trodimenzionalna struktura. Takva trodimenzionalna struktura naziva se tercijarna struktura proteina. Kvaterni struktura nastaje međusobnim vezanjem i polimerizacijom tercijarnih struktura (3). Primarna, sekundarna i tercijarna struktura prisutne su kod svih proteina, a kvaterni samo kod onih s dva ili više polipeptidnih lanaca (2).



**Slika 1. Primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterni struktura proteina.** Slijed aminokiselina u proteinima čini primarnu strukturu. Prostorna građa proteinskog lanca je sekundarna struktura ( $\alpha$ -uzvojnica,  $\beta$ -nabrana ploča). Prostorni razmještaj atoma u proteinskoj molekuli je tercijarna struktura. Kvaterni struktura nastaje polimerizacijom i međusobnim udruživanjem proteina tercijarne strukture (slika izrađena upotrebom programa Chimera).

### 1.1.1 Sintaza proteina

Proces sinteze proteina je energetski najzahtjevniji stanični proces, a odvija se na ribosomima, staničnim strojevima za sintezu proteina. Sastoji se od dva procesa: prepisivanja (*engl. transcription*) i sinteze proteina (*engl. translation*). U eukariotskim stanicama, prepisivanje DNA u RNA molekule odvija se u jezgri (4). Za transkripciju gena zaslužne su RNA polimeraze I, II i III (Pol I, Pol II i Pol III). Svaka od ovih polimeraza zaslužna je za transkripciju različite skupine gena. RNA Pol II proizvodi glasničku RNA, gRNA (*engl. messenger RNA; mRNA*), koja kodira za stanične proteine i mnogo malih jezgrenih RNA, snRNA (*engl. small*

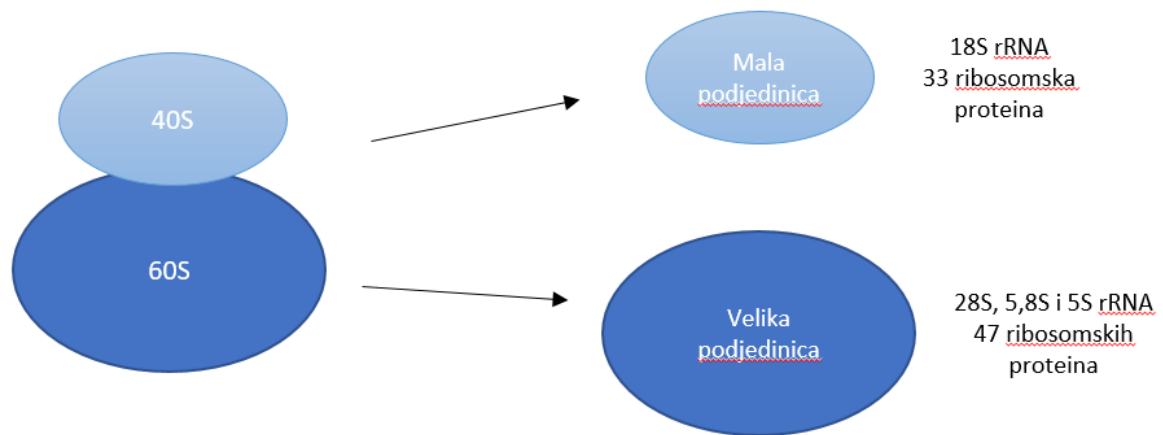
*nuclear RNA*), uključenih u modificiranje gRNA. RNA Pol III sintetizira transportne RNA, tRNA (engl. *transfer RNA*), 5S rRNA (engl. *ribosomal RNA*) i ostale male, netranslantirane RNA koje imaju ključne uloge u metabolizmu. RNA Pol I ključna je za sintezu rRNA, što čini do 60% transkripcijske aktivnosti u eukariotskim stanicama. Kod sisavaca, 47S pre-rRNA, koju stvara RNA Pol I, prerađuje se u zrele 18S, 5.8S i 28S rRNA, koje čine ključne strukturne i katalitičke komponente ribosoma. Sinteza rRNA pomoću Pol I odvija se u jezgri. Jezgra je i mjesto sastavljanja ribosoma, što uključuje inkorporiranje rRNA, koje je proizvela Pol I, i 5S rRNA te mnogih ribosomskih proteina, koje je proizvela Pol II (5).

Prilikom prepisivanja, DNA služi kao kalup za stvaranje molekule glasničke RNA, gRNA. Nastala gRNA je komplementarna s DNA. Prepisivanje se odvija u tri koraka: inicijacija, elongacija i terminacija. Inicijacija je početak prepisivanja i započinje vezanjem enzima RNA polimeraze II za promotor gena. To signalizira DNA da se počne odmatati kako bi enzim mogao „pročitati“ baze na jednom od lanaca DNA (4,6). Elongacija je dodavanje nukleotida na lanac gRNA. Terminacija označava kraj prepisivanja – sinteza gRNA je dovršena i odvaja se od DNA (4).

Nakon transkripcije, gRNA još uvijek nije spremna za translaciju, te mora proći kroz nekoliko procesa prije nego napusti jezgru kao zrela gRNA. Takva „nezrela“ gRNA naziva se pre-gRNA. Izrezivanje (engl. *splicing*) podrazumijeva uklanjanje introna iz gRNA, čime ostaju samo egzoni, koji kodiraju za protein. Uređivanje (engl. *editing*) podrazumijeva izmjenu nekih nukleotida u gRNA. Poliadenilacija dodaje „rep“, koji signalizira kraj gRNA te pomaže pri izlasku gRNA iz jezgre (4,7).

Zrela gRNA se transportira iz jezgre u citoplazmu, do ribosoma, gdje se odvija proces sinteze proteina. Na ribosomu započinje sinteza proteina. Zreli 80S ribosom se sastoji od dvije različite podjedinice, obje potrebne za translaciju. Mala podjedinica, 40S, dekodira genetsku poruku i izgrađena je od 18S rRNA i 33 ribosomska proteina, a velika podjedinica

(60S) katalizira stvaranje peptidne veze i izgrađena je od 5S, 5.8S i 28S rRNA i 47 ribosomskih proteina (8) (Slika 2.).



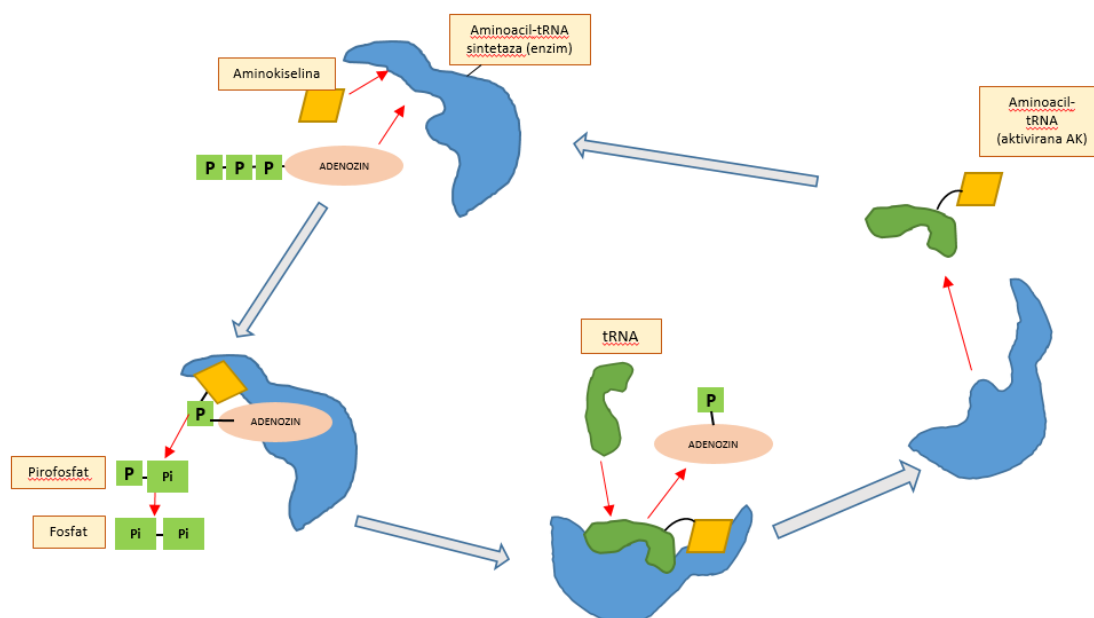
**Slika 2. Građa 80S ribosoma.** Mala podjedinica (40S) sastoji se od 18S rRNA i 33 ribosomska proteina, a velika podjedinica (60S) od 28S, 5.8S i 5S rRNA te 47 ribosomskih proteina.

Niz od tri baze (triplet) naziva se kodon, a jedan kodon sadrži informacije za određenu aminokiselinu. Prolaskom gRNA kroz ribosom, svaki kodon stupa u interakciju s komplementarnim antikodonom transportne RNA, tRNA. Enzim aminoacil-tRNA sintetaza omogućuje vezanje aminokiselina na tRNA. Lanac aminokiselina nastavlja rasti dok ne dođe do stop kodona, čime je polipeptidni lanac formiran (7).

### 1.1.2 Aminoacil-tRNA sintetaze

Preciznost sinteze proteina temelji se na specifičnim interakcijama u dva ključna procesa: aminoacilaciji tRNA i prepoznavanju između kodona gRNA i antikodona tRNA. Aminoacilacijom molekula tRNA stvara se jedinstveni genetski kod. Aminoacil-tRNA sintetaze (engl. *aminoacyl-tRNA synthetase*, AARS) su ključne komponente u biosintezi proteina i odgovorne su za točnost prijenosa genetskih informacija iz DNA u protein. AARS su ujedno i

jedine komponente u procesu ekspresije gena koje imaju važnu ulogu između nukleinskih kiselina i proteina (9). Odgovorne su za vezanje ostataka aminokiselina za srodne tRNA molekule, što je prvi korak u sintezi proteina. Većina stanica posjeduje 20 AARS, od kojih svaka djeluje na svoju srodnu tRNA. Prepoznavanje specifične tRNA od strane odgovarajuće AARS ovisi o strukturama obje molekule. Stvaranje AARS kompleksa posredovano je proteinom toplinskog šoka 90 (engl. *heat shock protein 90*, Hsp 90), koji se veže za ljudsku glutamilprolil-tRNA sintetazu (GluProRS) (10). Reakcija aminoacilacije odvija se u dva koraka. U prvom koraku, aminokiselina se aktivira vezanjem na  $\alpha$ -fosfatu u molekuli ATP-a, što dovodi do miješanja središnjeg anhidrida aminoacil adenilata (aaAMP) i anorganskog pirofosfata PPi. U drugom koraku aminokiselinski dio s aminoacil-adenilata prenosi se na 2'- ili 3'-hidroksilnu skupinu šećera adenoza 3'-kraja tRNA pri čemu nastaje aminoacil-tRNA i molekula adenozin-monofosfata (AMP) koje zatim disociraju s enzima. Nukleofil je 2'- ili 3'-hidroksilna skupina 3'- kraja tRNA koja napada  $\alpha$ -karbonilni ugljik aminokiselinskog dijela aaAMP-a. (Slika 3.).



**Slika 3. Reakcija aminoacilacije.** U prvom koraku, aminokiselina se aktivira vezanjem na  $\alpha$ -fosfatu u molekuli ATP-a, što dovodi do miješanja središnjeg anhidrida aminoacil

adenilata i anorganskog pirofosfata. U drugom koraku aminokiselinski dio s aminoacil-adenilata prenosi se na 2'- ili 3'-hidroksilnu skupinu šećera adenoza 3'-kraja tRNA pri čemu nastaje aminoacil-tRNA i molekula adenozin-monofosfata (AMP) koje zatim disociraju s enzima.

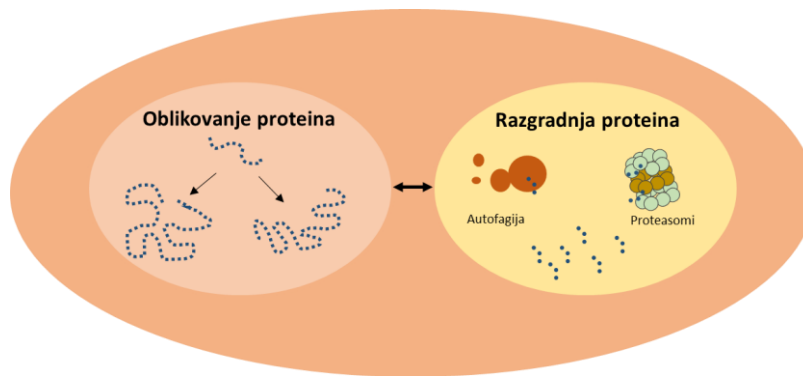
Točnost aminoacilacije kontrolira se pozitivnim i negativnim regulatornim elementima u tRNA i AARS, koji dopuštaju prepoznavanje i uspješno vezanje srodnih parova, te sprečavaju vezanje nesrodnih parova. Osiguravanje točnog protoka genetskih informacija u procesima DNA replikacije i biosinteze proteina je od ključne važnosti, zbog čega zahtjeva dodatne mehanizme provjere. Ti mehanizmi provjeravaju točnost DNA i RNA sinteze te reakcije aminoacilacije. Mehanizam provjere je posebno važan kod onih AARS koje imaju izosterične ili manje kompetitivne supstrate jer manji supstrati lakše mogu ući u veliku šupljinu. Aktivno mjesto AARS dopušta aktivaciju jedino aminokiselina koje su jednake veličine ili manje od željene. Unatoč jednakim katalitičkim funkcijama, AARS se razlikuju u veličini, slijedu aminokiselina i podjedinicama strukture. Kvaterne strukture sintetaza uključuju monomere, homodimere, tetramere i heterotetramere. Iako AARS kataliziraju istu reakciju te dijele zajednički supstrat (ATP) i kofaktor (magnezij), oni tvore različite grupe enzima. Postoje dvije skupine AARS, koje se razlikuju u načinu vezanju ATP-a i tRNA. U skupini I enzimi tvore takozvani Rossmannov nabor (element koji vezuje nukleotide), a u skupini II enzimi tvore antiparalelni nabor. Osim reakcije aminoacilacije, neke AARS sudjeluju i u drugim staničnim procesima (9).

Prilikom translacije, AARS uspostavljaju pravila prema kojima se svaka aminokiselina veže za srodnu tRNA molekulu. Do pogreške u translaciji dolazi ukoliko se aminokiselina veže za pogrešnu tRNA, uslijed čega bude pogrešno ugrađena u protein koji se sintetizira. Pogreške u translaciji mogu biti vrlo štetne za bakterijske stanice i stanice sisavaca te mogu dovesti do nasljednih mutacija. Jedna od najznačajnijih pogreški u

translaciji jest ugradnja serina na mjesta u proteinu namijenjena vezanju alanina, gdje i najmanja greška može uzrokovati teške neuropatologije u miševa. Neke AARS same po sebi ne mogu razlikovati slične aminokiseline, pa zbog toga dolazi do pogrešaka (primjerice izoleucin-tRNA sintetaza, IleRS i valil-tRNA sintetaza, ValRS) (11).

### **1.1.3 Šaperoni**

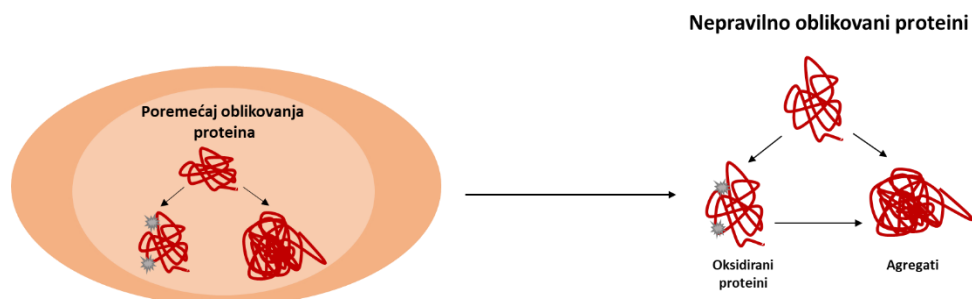
U normalnim stanicama, sinteza proteina je ključan proces koji osigurava očuvanje pravilno smotanog proteina (12). Svijanje proteina je spontani proces, međutim, pod određenim fiziološkim uvjetima, proteini mogu postati nestabilni, uslijed čega dolazi do njihovog odmatanja, agregacije i denaturacije (13). Polipeptidi se sintetiziraju i dostavljaju do određenih položaja u stanici, gdje poprimaju svoje izvorne strukture. Greške u tom procesu mogu imati teške posljedice. Nakupljanje veće količine krivo svijenih polipeptida rezultira raznim patogenim procesima kao što su mutacije i pogreške u sintezi te mogu biti vrlo štetne za stanicu. Šaperoni su skupina proteina koji osiguravaju da se svijanje proteina i njihova agregacija odvijaju pravilno te pomažu u održavanju proteinske homeostaze (12). Pomažu drugim proteinima u poprimanju i održavanju njihovih struktura, podržavaju stanične procese te prate aktivnost proteina u odnosu na stresne situacije u stanici (13). Potpomažu svijanje proteina tako što nakratko vezuju svoje supstrate s presavijenim proteinom, čime omogućavaju kretanje proteina i sprječavaju njihovu agregaciju te na taj način imaju zaštitnu ulogu u stanici. Istovremeno štite protein od staničnog stresa uzrokovanog slobodnim radikalima, visokom temperaturom, teškim metalima i slično te potiču ponovno presavijanje. Proteini koji ne mogu biti ponovno svijeni, mogu se razgraditi različitim mehanizmima, kao primjerice ubikvitin-proteasom sustavom (UPS) i autofagijom (Slika 4.).



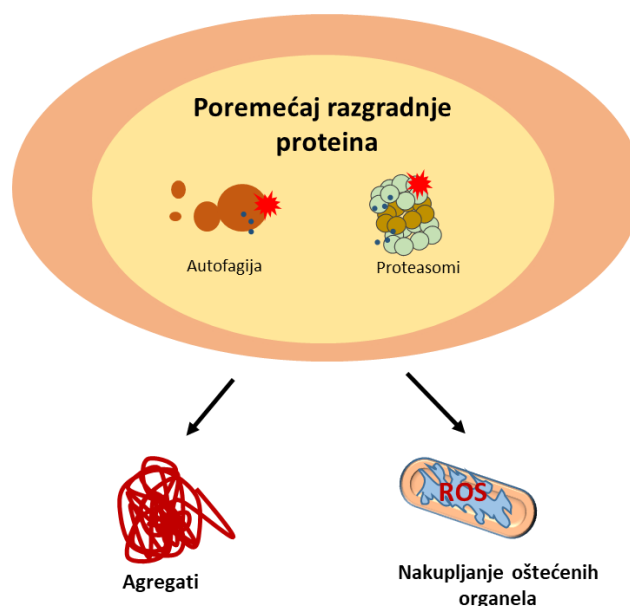
**Slika 4. Normalna funkcija stanica i organizma.** Sinteza proteina je proces koji se neprestano odvija u stanicama, no može doći do pogrešaka prilikom sinteze. U normalnim uvjetima, pogrešno svijeni proteini se razgrađuju procesom autofagije ili pomoću proteasoma.

Smanjenje aktivnosti proteasoma uzrokovano starenjem te smanjena funkcionalnost šaperona doprinose nakupljanju nepravilno oblikovanih proteina u neuronima i drugim stanicama, koji se agregiraju, što posljedično dovodi do neuroloških bolesti povezanih s agregacijom proteina i pogrešnim svijanjem (12).

Osim toga, poremećaj homeostaze proteina uzrokovan poremećajem oblikovanja proteina (Slika 5.) i poremećajem razgradnje proteina (Slika 6.) udružen je s povećanom proizvodnjom reaktivnih kisikovih radikala (engl. *reactive oxygen species*, ROS), koji mogu oštetiti brojne makromolekule i uzrokovati poremećaj njihovih funkcija.



**Slika 5. Poremećaj oblikovanja proteina.** Poremećaj homeostaze proteina očituje se nakupljanjem agregata nenormalnih proteina i oksidiranih proteina.



**Slika 6. Poremećaj razgradnje proteina.** Kao posljedica poremećaja u razgradnji proteina dolazi do nakupljanja agregata i stvaranja ROS-a koji oštećuje brojne organele.

### 1.1.3.1 Proteini toplinskog šoka

Proteini toplinskog šoka (engl. Heat shock protein, Hsp), su specifični proteini koji se stvaraju kada su stanice kratko izložene temperaturama iznad temperature uobičajene za njihov rast. Hsp-ovi se sintetiziraju u svim biljnim i životinjskim vrstama, prokariotskim organizmima te kod ljudi. Budući da sintezu Hsp-a mogu potaknuti i razni oksidansi, toksini, teški metali, slobodni radikali, virusi te brojni drugi stresovi, često ih se naziva „proteinima stresa“. Većina Hsp-ova su molekularni šaperoni koji potiču smotavanje novosintetiziranih polipeptidnih lanaca proteina u njihovu izvornu strukturu, stvaranje proteinskih kompleksa, prijenos kroz membrane te sudjelovanje u prijenosu signala. Nesmrtonosno povišenje temperature iznad normalne zaustavlja sintezu proteina u stanici i aktivira faktor toplinskog šoka (engl. *heat shock factor*, HSF). Izlaganje smrtonosnim temperaturama inducira apoptozu i smrt stanice. Hsp-ovi inhibiraju apoptozu i pružaju temperaturnu stabilnost stanicama u slučaju ponovljenog stresa. Na taj način šaperoni sprečavaju ireverzibilnu

agregaciju nesavijenih proteina i pomažu u vraćanju njihove izvorne strukture te potiču razgradnju denaturiranih proteina. Odgovor na toplinski šok se smanjuje kako se stanica vraća u normalu nakon uklanjanja stresa. Polimorfizmi Hsp gena su povezani s inflamatornim, autoimunim, kardiovaskularnim i neurodegenerativnim bolestima te starenjem (14). Jedna od ključnih zadaća Hsp-ova pod normalnim uvjetima je omogućavanje normalnog embrionalnog i postnatalnog razvoja različitih organskih sustava, posebice živčanog (15).

Jedan od najsvestranijih molekularnih šaperona je protein toplinskog šoka 70 (Hsp70). Ovaj protein ima razne uloge u eukariotskim stanicama, od *de novo* smatanja na ribosomima i translokacije proteina kroz membrane, do suradnje s drugim šaperonskim sustavima, a najpoznatiji je po svojoj ulozi u zaštiti stanice (13). Također regulira rast stanice regulirajući specifične signalne puteve. Hsp70 je šaperon ovisan o ATP-u i ima dvije različite domene vezanja: funkcionalna supstrat-vezujuća domena i regulatorna nukleotid-vezujuća domena (15). Hsp70 surađuje s Hsp90, kao i s drugim, manjim Hsp-ovima (sHSP, od engl. *small heat shock proteins*) (13). Izražaj Hsp70 i Hsp90 je ovisan o fazama staničnog ciklusa. HSP90 je značajno izražen između G0 i G1 faze, a Hsp70 između G2 i M faze. Kao i Hsp70, Hsp90 je također ovisan o ATP-u. Hsp90 je ključan za spermatogenezu i razvoj embrija, a zbog ubikvitarne ekspresije u središnjem živčanom sustavu (CNS, od engl. *central nervous system*), ima važnu ulogu i u neurološkom razvoju te je povezan s diferencijacijom neurona (15).

#### **1.1.4 Pogrešna translacija serina umjesto alanina kod miševa**

Spontana Sti mutacija (od engl. *sticky*=ljepljiv) kod miševa uzrokuje neurološke bolesti karakterizirane ataksijom i progresivnom degeneracijom Purkinjeovih stanica u malom mozgu. Sti-heterozigotni

miševi heterozigotni su za gen koji kodira enzim alanil-tRNA sintetazu, koja uslijed te mutacije ugrađuje aminokiselinu serin umjesto alanina u svoje proteine. „Sticky“ mutacija je takav naziv dobila zbog „ljepljivog“ krzna miševa s tom mutacijom (11). Kako miševi stare, na krznu se pojavljuje folikularna distrofija i mjestimični gubitak dlake (16). Sti-heterozigotni miševi su osjetljivi na translaciju serina umjesto alanina, što se može dokazati promatranjem toksičnog djelovanja serina kada se doda primarnim stanicama izoliranim iz Sti-heterozigotnih miševa. Alanil-tRNA sintetaza (AlaRS) je najočuvanija tRNA sintetaza kroz evoluciju. Protein se sastoji od tri linearno postavljene domene polipeptidne sekvence. Počevši s N-terminalnog kraja, slijede domena za aminoacilaciju (engl. *aminoacylation domain*, AD), domena za uređivanje (engl. *editing domain*, ED) te domena na C-terminalnom kraju, nazvana C-Ala. Sti mutacija je zamjena jednog alanina serinom u ED domeni. Radi se o blagoj mutaciji, dvostruko je smanjena aktivnost deacilacije Ser-tRNA. Iako je ova mutacija recesivna, snažnija mutacija bi vjerojatno bila dominantna i smrtonosna (11). Dvije su „kontrolne točke“ uređivanja koje sprečavaju pogrešnu translaciju glicina ili serina umjesto alanina u aktivno mjesto AlaRS. Prva kontrolna točka je AlaRS centar za uređivanje, a druga je AlaXp, široko rasprostranjen homolog kodiranja genoma u ED domeni alanil-tRNA sintetaze. Mehanizmi uređivanja tRNA sintetaza pružaju zaštitu protiv pogrešne translacije, odnosno umetanja krive aminokiseline na određeni kodon. Pogrešno umetanje posljedica je pogrešnog naboja tRNA, što rezultira nemogućnošću enzima da razaznaje slične lance aminokiselina. U normalnim uvjetima, takve pogrešno nabijene tRNA se ispravljaju pomoću mehanizma uređivanja, koji je specifičan za svaku sintetazu (17).

Na 6 tjedana starosti, kod Sti miševa počinju se javljati blagi tremori, što s vremenom napreduje u očitu ataksiju. Histološkom analizom utvrđeno je da gubitak Purkinjeovih stanica započinje s tri tjedna starosti te se povećava sa starenjem, posebice u rostralnom dijelu malog mozga.

Tijekom godine, većina Purkinjeovih stanica propada, izuzev većine neurona u kaudalnom lobusu X. Skeniranje genoma pomoću polimorfnih mikrosatelitskih markera pokazalo je da je Sti mutacija lokalizirana na kromosomu 8. Analiza ekspresije gena u Sti kritičnoj regiji nije pokazala razlike između miševa divljeg tipa i Sti miševa. Ipak, sekvenciranjem komplementarne DNA otkrivena je promjena C u A na nukleotidu alanil-tRNA sintetaze. Smatra se da ta promjena uzrokuje zamjenu alanina s glutaminskom kiselinom ili serinom na aminokiselini 734 (16).

### **1.1.5 Pogrešno svijanje proteina u neurodegenerativnim bolestima**

Svijanje proteina je kompleksan, multisistemski proces. Šaperonska mašinerija omogućava pravilno svijanje proteina i nastajanje stabilnih konformacija. Drugi procesi vezani uz svijanje proteina su transkripcija, translacija, post-translacijske modifikacije, razgradnja kroz ubikvitin-proteasomalni sustav i proces autofagije. Uzrok patogeneze iza većine neurodegenerativnih bolesti je narušavanje proteinske homeostaze, što dovodi do pogrešnog svijanja proteina. Pogrešno svijeni proteini često agregiraju i akumuliraju se, što dovodi do neurotoksičnosti i uzrokuje neurodegenerativne bolesti. Manifestacija bolesti ovisi o zahvaćenoj regiji mozga (22).

Neurodegenerativne bolesti poput Alzheimerove bolesti (engl. *Alzheimer's disease*, AD), Parkinsonove bolesti (engl. *Parkinson's disease*, PD), amiotrofične lateralne skleroze (ALS), Huntingtonove bolesti (engl. *Huntington's disease*, HD) i frontotemporalne lobarne demencije (FTLD) predstavljaju veliki problem kod starije populacije u razvijenim društvima. Neuroni imaju ključne uloge u središnjem živčanom sustavu, poput stvaranja komunikacijske mreže i prijenosa signala diljem CNS-a, te su glavne „mete“ neurodegenerativnih bolesti. Neuroni se spajaju sa sinapsama, gdje dolazi do oslobađanja neurotransmitera kako bi se

dostavili ekscitatorni ili inhibitorni signali do ciljnog neurona. Aksoni su stanični izdanci koji dostavljaju signale, a dendriti primaju sinaptičke informacije. Neurodegeneracija utječe na funkciju neurona, njihovu strukturu i preživljavanje. Za razliku od primarnih stanica kože, jetre ili mišića, neuroni nemaju mogućnost regeneracije nakon oštećenja uzrokovanih bolestima, ishemijom ili fizičkom traumom. Istraživanja su pokazala da su u različitim neurodegenerativnim bolestima zahvaćene različite populacije neurona te se stvaraju karakteristični proteinski agregati unutar neurona. Za svaki poremećaj i karakteristične proteinske agregate postoji kauzalna povezanost između mutacije kodirajućeg gena i bolesti (18).

Obilježje neurodegenerativnih proteinopatija je formiranje agregata pogrešno svijenih proteina koji uzrokuju toksičnost stanice i dovode do kolapsa stanice. Pogrešno svijeni proteini koegzistiraju unutar stanice skupa s nesvijenim, djelomično svijenim i potpuno svijenim proteinima. U zdravim stanicama, pogrešno svijeni proteini se razgrađuju ili presavijaju u pravilne strukture pomoću šaperona. Smatra se da većina proteina može tvoriti amiloidne fibrile pod određenim biokemijskim uvjetima. Ipak, mnogi amiloidogeni proteini povezani s bolestima posjeduju područja intrinzičnog poremećaja u topivim oblicima te imaju specifične, često kratke, unutarnje aminokiselinske sekvence koje su potrebne za agregaciju. Slične pojave mogu se pronaći i u drugim proteinima koji nisu povezani s bolestima, a odvajanjem tih fragmenata od proteina, oni agregiraju te tvore citotoksične amiloidne fibrile. Jednom kada su amiloidni agregati formirani, postaju vrlo otporni na degradaciju. Proteasomi mogu razgraditi samo jednolančane polipeptide i djelomično ili potpuno nesvijene proteine. Amiloidni agregati su termodinamički vrlo stabilni zbog mnoštva kontakata među lancima proteina u polimeru. Termodinamička stabilnost amiloidnih agregata doprinosi tome da nativni proteini tvore amiloidne oblike. Pod utjecajem proteotoksičnog stresa, starenja stanice i prisutnosti mutacija uzrokovanih bolestima, proteini

moгу izbjeći staničnu kontrolu te početi agregirati u nenativne strukture, koje mogu varirati od oligomera i amorfnih struktura do visoko organiziranih amiloidnih fibrila i plakova. Stanice se stalno susreću s pogrešno svijenim proteinima nastalim greškama u biogenezi, mutacijama i fiziološkim stresorima te ih ponovo presavijaju, razgrađuju ili sekvestiraju u agosome i druge vrste inkluzijskih tjelešaca. Šaperoni se vezuju za polipeptide u nastajanju i pomažu u njihovom presavijanju te nadgledaju i sudjeluju u svakom koraku zbrinjavanja pogrešno svijenih proteina. Osim toga, šaperoni ciljaju pogrešno svijene proteine za razgradnju pomoću ubikvitin-proteasom sustava ili autofagije.

Homeostaza proteina u stanici održava se pravilnom sintezom proteina, preciznim oblikovanjem proteina te njihovom razgradnjom (1). Poremećaj homeostaze proteina očituje se nakupljanjem agregata nenormalnih proteina i nakupljanjem ROS-a te poremećajem funkcije mitohondrija (2,3). Proteini u agregatima ne mogu obavljati svoje biološke funkcije, a ROS može oštetiti proteine i lipide te poremetiti njihovu funkciju. Tako npr. agregacija i oksidacija mitohondrijskih proteina mogu poremetiti funkcije mitohondrija u proizvodnji energije, ali i u drugim procesima (6,7). Nadalje, ROS može uzrokovati mutacije DNA (4,5). Prethodna istraživanja pokazala su da se homeostaza proteina pogoršava tijekom starenja, što rezultira nastankom bolesti povezanih sa starenjem, uključujući neurodegenerativne i metaboličke bolesti te zloćudne tumore. Dosadašnja istraživanja na wt miševima pokazala su da se s povećanjem kronološke dobi narušava homeostaza proteina koja uzrokuje slabljenje većine staničnih funkcija, što rezultira nastankom bolesti povezanih sa starenjem. U ovom radu odredit će se doprinose li pogreške u funkciji ribosoma, koje rezultiraju sintezom proteina sa pogreškama, nakupljanju ROS-a i rezultiraju li oštećenjem DNA. Osim toga, izolirani fibroblasti mogu služiti kao izvrstan model za daljnja istraživanja procesa starenja, za testiranje lijekova koji spriječavaju starenje ili za pronalazak novih lijekova koji mogu normalizirati promjene uzrokovane starenjem.

## 2. CILJ RADA

Homeostaza proteina u stanici održava se pravilnom sintezom proteina, preciznim oblikovanjem proteina te njihovom razgradnjom. Tijekom životnog vijeka organizma sisavaca postepeno se narušava homeostaza proteina koja uzrokuje slabljenje većine staničnih funkcija, što rezultira bolestima koje su povezane sa starenjem i smrću. Poremećaj homeostaze proteina očituje se nakupljanjem agregata nenormalnih proteina i nakupljanjem ROS-a te poremećajem funkcije mitohondrija. ROS može oštetiti brojne makromolekule i uzrokovati poremećaj njihovih funkcija. Tako npr. ROS oštećuje DNA i posljedično uzrokuje mutacije gena koje mogu uzrokovati patološke procese. Međutim, vrlo malo se zna o izvanstaničnim i staničnim čimbenicima koji dodatno ubrzavaju poremećaj homeostaze proteina tijekom procesa starenja. Razlozi tome manjak su sistematskih istraživanja poremećaja homeostaze proteina tijekom normalnog starenja organizma te relativni nedostatak genetičkih *in vivo* modela u kojima su manipulirani specifični molekularni mehanizmi koji održavaju normalnu homeostazu proteina. Stoga je u ovom radu karakteriziran poremećaj homeostaze proteina u stanicama izoliranim iz divljeg tipa miševa (wt) na specifičnim stadijima njihovog postnatalnog životnog ciklusa te su uspoređene s poremećajima homeostaze proteina u istim staničnim vrstama iz Sti-heterozigotnih miševa u koje su genetički uvedene minimalne pogreške u sintezi proteina. Sti-heterozigotni miševi uslijed mutacije enzima alanil-tRNA sintetaze ugrađuju aminokiselinu serin umjesto alanina u svoje proteine. Zbog složenosti istraživanja molekularnih mehanizama *in vivo* ovo istraživanje provedeno je u primarnim stanicama izoliranim na različitim fazama postnatalnog životnog ciklusa miševa.

U predloženom istraživanju postavljena je hipoteza da će mutacija gena koja rezultira nepravilnom funkcijom ribosoma pogoršati homeostazu

proteina u odnosu na miševe divljeg tipa. Ova hipoteza bit će testirana u sljedećim ciljevima istraživanja:

Cilj 1. Izolacija fibroblasta iz kože i pluća miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa starosti 3 i 6 mjeseci

Cilj 2. Analiza prisutnosti ROS-a u fibroblastima kože i pluća miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa starosti 3 i 6 mjeseci

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Miševi**

Pokusni miševi uzgajani su u Centru za uzgoj i inženjering laboratorijskih miševa (LAMRI) Medicinskog fakulteta u Rijeci u režimu 12 sati svijetla i 12 sati mraka. Svi transgenični miševi najmanje 10 generacija križani su s miševima visokosrodnog soja C57BL/6. Životinje su hranjene standardnim keksima za laboratorijske miševe (Mucedola, Italija) i vodovodnom vodom *ad libitum*. U svrhu ostvarivanja Cilja 1. i izolacije fibroblasta iz tkiva kože i pluća miša križani su laboratorijski miševi sljedećih genotipova:

- wt (engl. *wild type*) miševi, soj C57BL/6 (LAMRI, Medicinski fakultet, Rijeka, Hrvatska)
- Sti (engl. *the sticky mutation*) miševi, (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, SAD)

##### **3.1.1. Etički aspekt istraživanja na životinjama**

U ovom istraživanju laboratorijski miševi korišteni su isključivo s ciljem izolacije fibroblasta iz tkiva kože i pluća miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa te proizvodnje staničnih modela na kojima će se provesti istraživanje (opisano u odjeljku Izolacija primarnih fibroblasta iz tkiva kože i pluća miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa, 3.3.). Svi postupci provedeni na eksperimentalnim životinjama u skladu su s važećim zakonskim propisima i bioetičkim standardima temeljenima na 3R pristupu (nadmještanje životinja, smanjenje broja životinja i oplemenjivanje postupaka prema životinjama), uz Odobrenje za rad sa životinjama Ministarstva poljoprivrede i Uprave za veterinarstvo i

sigurnost hrane (broj odobrenja HR-POK-004). Korištenje navedenog staničnog modela zamjenjuje mišji model, smanjuje broj životinja korištenih u pokusima i poboljšava dobrobit životinja. Ovo istraživanje provedeno je u sklopu projekta „Učinak genetskih pogrešaka u sintezi proteina na procese starenja sisavaca“. Projekt ima pozitivno mišljenje Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci te pozitivno mišljenje Povjerenstva za dobrobit životinja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

### **3.2. Stanične linije**

Korišteni su primarni fibroblasti izolirani iz tkiva kože i pluća miševa divljeg tipa (wt) te primarni fibroblasti iz tkiva kože i pluća Sti-heterozigotnih miševa. Primarni fibroblasti iz tkiva kože i pluća izolirani su prema standardnom protokolu (27). Stanice fibroblasta uzgajane su na 37°C i atmosferi od 5% CO<sub>2</sub> u MEM mediju (Gibco) uz dodatak 10% fetalnog telećeg seruma (FCS, od engl. *fetal calf serum*) (PAN Biotech), 2 mM L-glutamina, 50 µM 2-merkaptetanola, 105 U/L penicilina, 0,1 g/L streptomicina i 0,035 g/L gentamicina.

### **3.3. Izolacija primarnih fibroblasta iz tkiva kože i pluća miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa**

Za izolaciju primarnih fibroblasta iz tkiva kože i pluća miševa uzeta su tri miša divljeg tipa i tri Sti-heterozigotna miša u dobi od tri i šest mjeseci. Postupak izolacije stanica proveden je po standardnom protokolu (27). Nakon žrtvovanja miševa, isprana je podpazušna regija 70%-tnim etanolom (Kemika), obrijana oštrim skalpelom, dezinficirana 70%-tnim etanolom te je ostavljeno da se posuši. Za uzimanje uzoraka kože

najpogodnija je podpazušna regija jer je ondje koža tanka, sadrži manje masti i ima manje dlake. Pri uzimanju uzoraka kože, koža je podignuta pincetom te je škarama odrezano područje veličine otprilike 1 cm<sup>2</sup>. Za uzimanje uzoraka pluća, sterilno je uklonjena koža, isprana 70%-tnim etanolom, posušena te je potom otvoren prsni koš. Škarama je sterilno odrezano područje pluća veličine otprilike 1 cm<sup>2</sup>. Uzorci kože i pluća stavljeni su u bunarčice sa sterilnim PBS-om (fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) na ledu kako bi se izbjeglo isušivanje. U sljedećem koraku, uzorci su usitnjeni u što manje komadiće te stavljeni u Falcon epruvetu u 10 mL DMEM/F12medija (Gibco) za uzgoj stanica uz dodatak 15% FCS-a (PAN Biotech), 2 mM L-glutamina, 50 µM 2-merkaptetanola, 105 U/L penicilina, 0,1 g/L streptomycina i 0,035 g/L gentamicina te je dodana kolagenaza (Liberase TM Research Grade, Roche). Uzorci su inkubirani 30 do 90 minuta na 37°C uz laganu trešnju. Tkivo kože zahtjeva dužu digestiju od tkiva pluća, zbog čega je digestija prvotno kontrolirana nakon 30 minuta, a potom svakih 10 minuta. Digestija pluća zaustavljena je kada su komadići tkiva promijenili boju iz crvene u bijelu i počeli formirati ljepljiva vlakna. Digestija kože završena je kada je medij postao mutan, komadići kože postali odvojeni jedni od drugih, a rubovi komadića postali nejasni. Otopina s komadićima tkiva je potom resuspendirana nekoliko puta dok se nisu razbile grudice. Dodano je 30 mL toplog DMEM/F12 medija obogaćenog 15%-tnim fetalnim telećim serumom. Tuba je zatvorena, a sadržaj je promiješan invertiranjem tube nekoliko puta. U sljedećem koraku, uzorci su centrifugirani 5 minuta na 1500 rpm. Supernatant je uklonjen, a pelet resuspendiran u 10 mL toplog DMEM/F12 medija. Dodano je 30 mL medija i ponovno je centrifugirano 5 minuta na 1500 rpm te je ponovljen prethodni postupak kako bi se uklonili mogući ostatci kolagenaze. Nakon trećeg centrifugiranja, pelet je resuspendiran u 10 mL medija, premješten na ploče za uzgoj u staničnoj kulturi i stavljen u inkubator (Jouan) na 37°C i 5% CO<sub>2</sub> tijekom 14 dana. Fibroblasti i boja medija su svakodnevno provjeravani. Nakon 7 dana,

promijenjen je medij, a fragmenti tkiva premješteni na novu ploču s novim medijem te inkubirani još 7 dana. Nakon 14 dana od izolacije stanica, uklonjen je stari medij i fragmenti tkiva, sakupljene su stanice te su prenesene na novu ploču u broju  $5 \times 10^5$  stanica po ploči te su uzgajane u MEM mediju uz dodatak 15%-tnog FCS-a i antibiotika penicilina i streptamicina. MEM medij podržava jedino rast fibroblasta dok drugi tipovi stanica odumiru ili prestaju proliferirati. Nakon što su stanice dosegle 80-90% konfluentnosti, sakupljene su, zamrznute u alikvote i pohranjene na  $-140^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4. Analiza prisutnosti reaktivnih kisikovih radikala (ROS) u fibroblastima tkiva kože i pluća wt i Sti-heterozigotnih miševa starosti tri i šest mjeseci**

Za analizu prisutnosti ROS-a u fibroblastima tkiva kože i pluća korišten je kit *CM-H2DCFDA* (#6827, Invitrogen). Postupak je proveden prema uputama proizvođača. Nakon tripsinizacije i pranja s PBS-om, stanice su inkubirane u  $5 \mu\text{M}$  otopini H2DCFDA, u bezbojnom DMEM mediju (Gibco) na  $37^{\circ}\text{C}$  tijekom 30 minuta. Nakon toga, stanice su ponovo oprane PBS-om te resuspendirane u puferu za protočnu citometriju (0,5% BSA, 0,05%  $\text{NaN}_3$  u PBS-u). Fluorescentni signal određen je protočnim citometrom (Becton Dickinson), a signal je kvantificiran u programu WinMDI (verzija 2.8).

### **3.5. Statistička analiza**

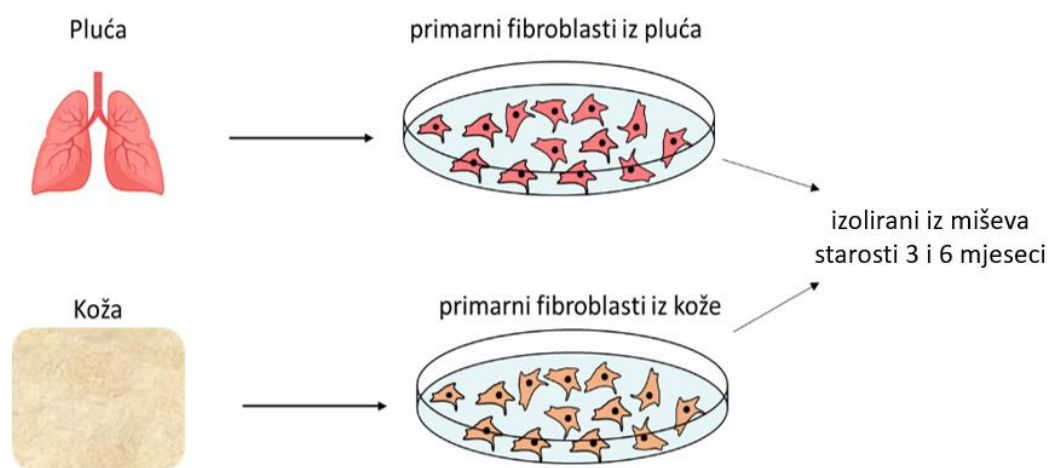
Korištena statistika je trosmjerna ANOVA kojom se gledao utjecaj 3 faktora na ukupni ROS. Prvi faktor je dob, drugi je genotip i treći je tkivo. ANOVA testu je prethodila provjera normalnosti distribucije podataka

Shapiro-Willk testom i homogenost varijanci Bartlettovim - F testom. Tek nakon što je utvrđena normalna distribucija i homogena varijanca, podatci su statistički obrađeni trosmjernom ANOVA-om. U slučaju statistički značajne ANOVA-e, razlike između grupa su utvrđene Tukey-Hsd post hoc testom. Za sve korištene testove značajnost je namještena na  $\alpha=0,05$ .

## 4. REZULTATI

Molekularni procesi koji reguliraju obim i kvalitetu novosintetiziranih proteina te njihovu razgradnju ključni su za normalno funkcioniranje svih stanica sisavaca. Tijekom starenja organizma sisavaca postepeno se narušava homeostaza proteina. Pretpostavlja se da upravo ovi poremećaji imaju ključnu ulogu u starenju organizma i razvoju bolesti koje su povezane sa starenjem, kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, zloćudne bolesti, dijabetes tipa 2, katarakta i progresivni gubitak tkiva mišića. Međutim, vrlo malo se zna o izvanstaničnim i staničnim čimbenicima koji ubrzavaju procese starenja u sisavaca, ali i o kinetici poremećaja homeostaze proteina tijekom starenja i bolesti povezanih sa starenjem. Razlozi tome manjak su sistematskih istraživanja poremećaja homeostaze proteina tijekom normalnog starenja organizma te relativni nedostatak genetičkih *in vivo* modela u kojima su manipulirani specifični molekularni mehanizmi koji održavaju normalnu homeostazu proteina. Stoga je, zbog složenosti istraživanja molekularnih mehanizama *in vivo*, ovo istraživanje provedeno u primarnim stanicama izoliranim na različitim fazama postnatalnog životnog ciklusa miševa. Kako bi se karakterizirale posljedice poremećaja homeostaze proteina, najprije su izolirani primarni fibroblasti iz divljeg tipa miševa C57BL/6 na specifičnim stadijima njihovog postnatalnog životnog ciklusa te su uspoređeni s poremećajima homeostaze proteina u istim staničnim vrstama iz miševa u koji su genetički uvedene minimalne pogreške u sintezi proteina. Taj model su miševi heterozigotni za gen koji kodira enzim alanil-tRNA sintetazu (engl. *sticky mutation, Sti*), koji uslijed te mutacije ugrađuju aminokiselinu serin umjesto alanina u svoje proteine. Sti-heterozigotni miševi, uslijed mutacije enzima alanil-tRNA sintetaze, razvijaju slijedeće patološke fenotipove: ataksija, tremor, gubitak dlake (16). Kao stanični model za istraživanje korišteni su primarni fibroblasti izolirani iz tkiva kože i pluća

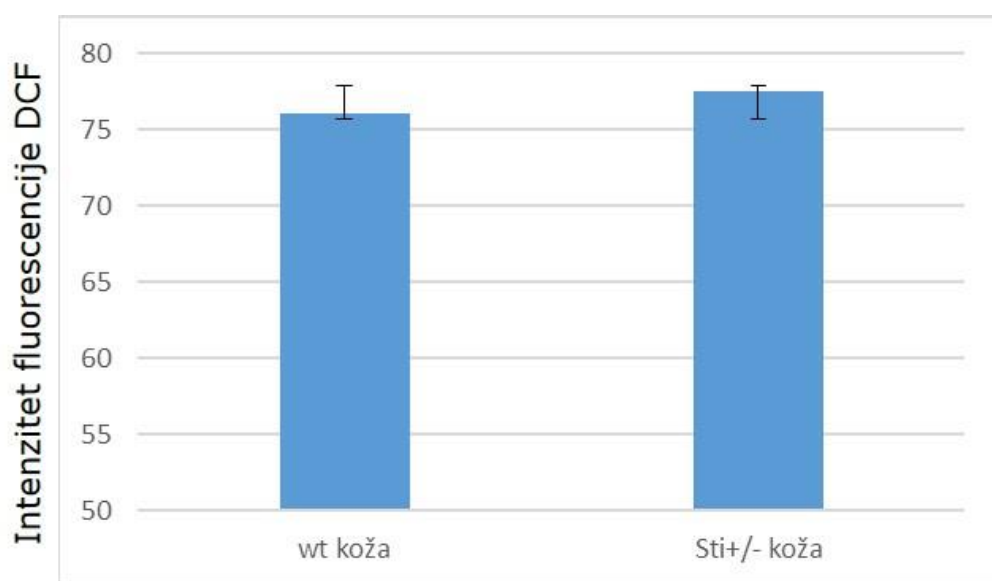
miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa u dobi od 3 i 6 mjeseci (Slika 7.). Postupak izolacije fibroblasta iz tkiva pluća i kože opisan je u poglavlju Materijali i metode 3.3. Izolirani fibroblasti iz kože i pluća na određenim stadijima njihovog postnatalnog životnog ciklusa pohranjeni su u ranim pasažama (2. pasaža), da se smanji učinak dugotrajne kultivacije u *in vitro* uvjetima i izbjegnu sekundarne promjene tijekom kultivacije. Dio izoliranih stanica fibroblasta iz kože i pluća korišten je za karakterizaciju u Cilju 2. ovoga rada, a ostatak će se koristiti u okviru budućih istraživanja za detaljniju karakterizaciju procesa koji nastaju tijekom starenja u ova dva modela.



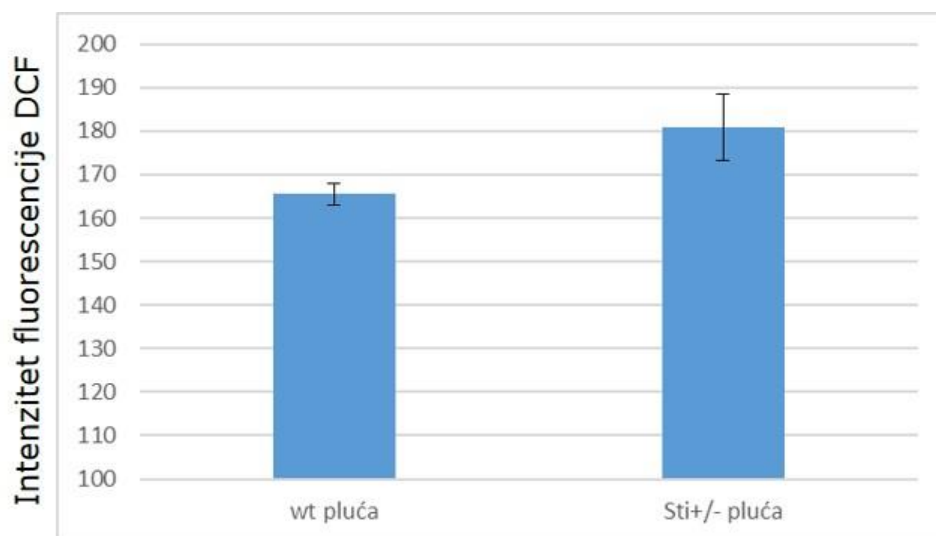
**Slika 7. Stanični model za istraživanje poremećaja homeostaze proteina.** Izolirani su primarni fibroblasti iz tkiva kože i pluća miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa na specifičnim stadijima njihovog postnatalnog životnog ciklusa, 3 i 6 mjeseci njihove starosti.

Homeostaza proteina u stanici održava se pravilnom sintezom proteina, preciznim oblikovanjem proteina te njihovom razgradnjom. Poremećaj homeostaze proteina očituje se nakupljanjem agregata nenormalnih proteina i nakupljanjem ROS-a te poremećajem funkcije mitohondrija. Proteini u agregatima ne mogu obavljati svoje biološke funkcije, a ROS može oštetiti proteine i lipide te poremetiti njihovu funkciju. Tako npr.

agregacija i oksidacija mitohondrijskih proteina mogu poremetiti funkcije mitohondrija u proizvodnji energije, ali i u drugim procesima. Nadalje, ROS može uzrokovati mutacije DNA. U primarnim fibroblastima izoliranim iz kože i pluća miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa starosti 3 i 6 mjeseci određeno je dolazi li do nakupljanja ROS-a tijekom starenja uslijed poremećaja homeostaze proteina uzrokovane nepravilnom funkcijom ribosoma. Uspoređena je količina ROS-a u fibroblastima izoliranim iz kože (Slika 8.) i pluća (Slika 9.) miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa starosti 3 mjeseca.

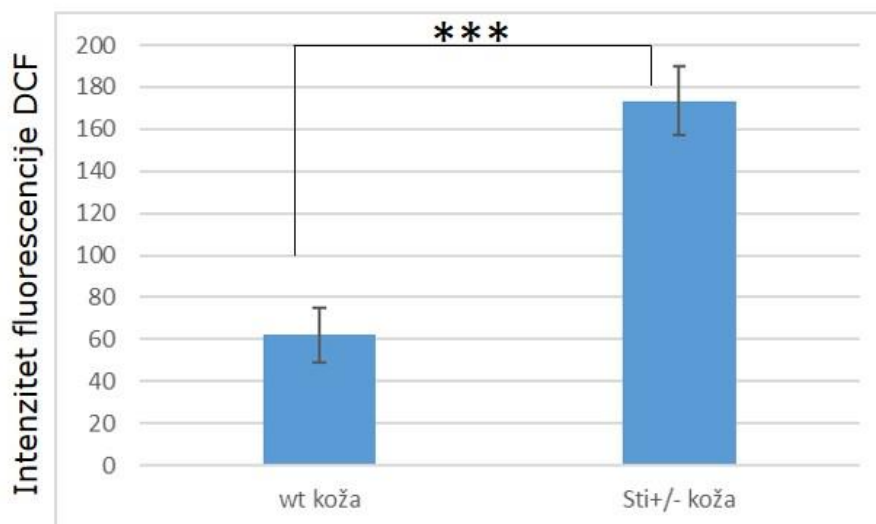


**Slika 8. Količina ROS-a u fibroblastima iz tkiva kože miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa (Sti+/-) starosti 3 mjeseca.** Fibroblasti iz tkiva kože miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa inkubirani su sa DCFDA. Fluorescentni signal analiziran je protočnom citometrijom. Pokusi su ponovljeni tri puta. Prikazane su srednje vrijednosti jednog reprezentativnog pokusa. Standardne devijacije označavaju razlike u mjerenju između triplikata uzorka.

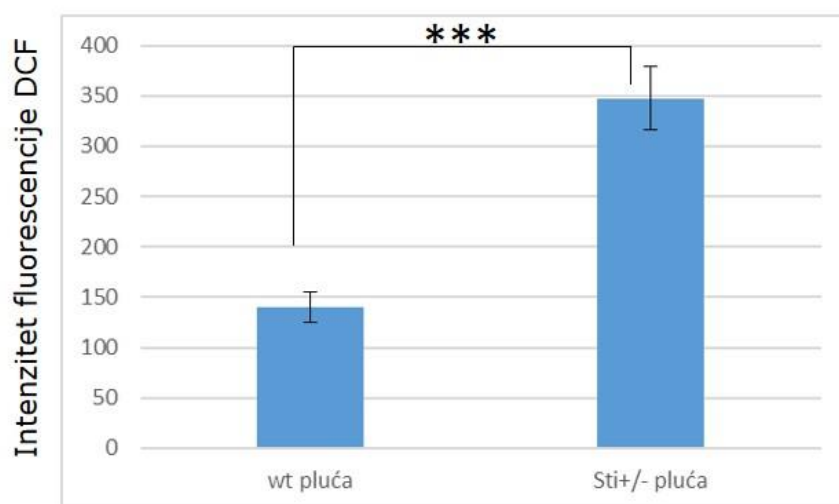


**Slika 9. Količina ROS-a u fibroblastima iz tkiva pluća miševa divljeg tipa i Stt-heterozigotnih miševa (Stt+/-) starosti 3 mjeseca.** Fibroblasti iz tkiva pluća miševa divljeg tipa i Stt-heterozigotnih miševa inkubirani su sa DCFDA. Fluorescentni signal analiziran je protočnom citometrijom. Pokusi su ponovljeni tri puta. Prikazane su srednje vrijednosti jednog reprezentativnog pokusa. Standardne devijacije označavaju razlike u mjerenju između triplikata uzorka.

Iz rezultata prikazanih na Slici 8. i Slici 9. vidljivo je da nema razlike u količini nakupljenog ROS-a između fibroblasta izoliranih iz tkiva kože i pluća miševa divljeg tipa i Stt-heterozigotnih miševa starosti 3 mjeseca. Nadalje, određeno je povećava li se količina ROS-a tijekom starenja te je određena količina ROS-a u fibroblastima izoliranim iz tkiva kože i pluća miševa divljeg tipa i Stt-heterozigotnih miševa starosti 6 mjeseci (Slika 10. i Slika 11.).



**Slika 10. Količina ROS-a u fibroblastima iz tkiva kože miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa (Sti+/-) starosti 6 mjeseci.** Fibroblasti iz tkiva kože miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa inkubirani su sa DCFDA. Fluorescentni signal analiziran je protočnom citometrijom. Pokusi su ponovljeni tri puta. Prikazane su srednje vrijednosti jednog reprezentativnog pokusa. Standardne devijacije označavaju razlike u mjerenju između tripplikata uzorka. \*\*\* $p < 0,001$  statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu.



**Slika 11. Količina ROS-a u fibroblastima iz tkiva pluća miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa (Sti+/-) starosti 6 mjeseci.** Fibroblasti iz tkiva pluća miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa inkubirani su sa DCFDA. Fluorescentni signal analiziran je protočnom citometrijom. Pokusi su ponovljeni tri puta. Prikazane su srednje vrijednosti jednog reprezentativnog pokusa.

Standardne devijacije označavaju razlike u mjerenju između triplikata uzorka.\*\*\* $p < 0,001$  statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu.

Iz rezultata prikazanih na slikama 10. i 11. vidljivo je da se u fibroblastima izoliranim iz tkiva kože i pluća Sti-heterozigotnih miševa starosti 6 mjeseci nakuplja veća količina ROS-a u odnosu na miševe divljeg tipa iste starosti i ta razlika predstavlja statistički značajnu razliku od  $p < 0,001$ . Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da u kasnijim stadijima životnog ciklusa dolazi do nakupljanja veće količine ROS-a, što je posljedica poremećaja homeostaze proteina Sti-heterozigotnih miševa.

## 5. RASPRAVA

S povećanjem kronološke dobi organizma sisavaca postepeno se narušava homeostaza proteina koja uzrokuje slabljenje većine staničnih funkcija, što rezultira nastankom bolesti povezanih sa starenjem i smrću. Međutim, vrlo malo se zna o kinetici poremećaja homeostaze proteina tijekom starenja organizma i o genetičkim čimbenicima koji ubrzavaju te promjene u sisavaca. Razlozi tome manjak su sistematskih istraživanja poremećaja homeostaze proteina tijekom normalnog starenja organizma te relativni nedostatak genetičkih *in vivo* modela u kojima su manipulirani specifični molekularni mehanizmi koji održavaju normalnu homeostazu proteina. U ovom radu karakterizirani su poremećaji homeostaze proteina u primarnim stanicama izoliranim iz divljeg tipa miševa C57BL/6 na specifičnim stadijima njihovog postnatalnog životnog ciklusa te su uspoređeni s poremećajima homeostaze proteina u istim staničnim vrstama izoliranim iz miševa u kojima se, uslijed mutacije enzima alanil-tRNA sintetaze, ugrađuje aminokiselina serin umjesto alanina u vlastite proteine, što uzrokuje pogreške u sintezi proteina. Ranija istraživanja dokazala su da se u neuronima Sti-heterozigotnih miševa nakupljaju pogrešno savijeni proteini u obliku agregata i uzrokuju neurodegenerativne promjene u tim miševima (28). Osim toga, postoje dokazi da se šaperoni kolokaliziraju s agregiranim proteinima. Nakupljanje agregata štetno je za stanicu stoga je od velike važnosti pratiti molekularne promjene koje se događaju tijekom narušavanja homeostaze proteina u tim uvjetima. U ovom radu kao stanični model koristili su se fibroblasti iz tkiva kože i pluća miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa u dobi od 3 i 6 mjeseca. Ti izolirani fibroblasti su vrlo koristan model za sistematska istraživanja posljedica poremećene funkcije ribosoma na homeostazu proteina i brojne stanične procese, ali bi mogli biti i model za identifikaciju i testiranje novih lijekova koji usporavaju procese starenja.

Prethodna istraživanja pokazala su da se homeostaza proteina pogoršava tijekom starenja, što rezultira nastankom bolesti povezanih sa starenjem, uključujući neurodegenerativne i metaboličke bolesti te zloćudne tumore (8, 9, 10, 11). Nepoznato je uzrokuju li mutacije gena koji reguliraju funkciju ribosoma poremećaje homeostaze proteina i ubrzavaju li starenje sisavaca. Dobiveni rezultati ukazuju da je količina ROS-a u fibroblastima izoliranim iz Sti-heterozigotnih miševa starosti 6 mjeseci značajno veća nego u fibroblastima iz miševa divljeg tipa. Bilo bi zanimljivo odrediti količinu ROS-a na specifičnim stadijima starenja (9, 12 i 18 mjeseci) u fibroblastima miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa kako bi se dobio uvid u nove mehanizme koji dovode do narušavanja homeostaze proteina. Može se pretpostaviti da u stanici postoji kontrolni mehanizam koji će u kasnijim stadijima postnatalnog životnog ciklusa usporiti sintezu proteina u Sti-heterozigotnim miševima kako bi se spriječila sinteza proteina s pogreškama. S druge strane, oštećenje DNA udruženo je sa starenjem organizma. Međutim, nepoznati su glavni uzroci tih promjena. U budućim istraživanjima bit će važno testirati uzrokuje li ROS u Sti-heterozigotnim miševima oštećenje DNA.

Rezultati ovog istraživanja razjasnit će ulogu pogrešaka u sintezi proteina u ubrzanju poremećaja procesa koji održavaju normalnu homeostazu proteina i DNA, a dugoročno i njihovu ulogu u starenju organizma sisavaca i bolestima povezanim sa starenjem.

## **6. ZAKLJUČAK**

U ovom radu izolirani su fibroblasti iz tkiva kože i pluća miševa divljeg tipa i Sti-heterozigotnih miševa. Ti izolirani fibroblasti su vrijedan materijal u kojima se može detaljnije karakterizirati učinak poremećaja homeostaze proteina na biološke procese u tim stanicama. Poremećaj homeostaze proteina očituje se nakupljanjem agregata nenormalnih proteina, poremećajem funkcije mitohondrija i nakupljanjem reaktivnih kisikovih radikala. U ovom radu je utvrđena veća količina ROS-a u fibroblastima Sti-heterozigotnih miševa starosti 6 mjeseci u odnosu na fibroblaste miševa divljeg tipa iste starosti. S povećanjem kronološke dobi nakuplja se veća količina ROS-a. Dobiveni rezultati upućuju da uslijed pogrešaka u sintezi proteina dolazi do narušavanja homeostaze proteina.

## 7. LITERATURA

1. Voet D., Voet J.G., Pratt C.W. *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*. 5. izd. SAD: Wiley; 2016.
2. Walsh G., editor. *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*. 2. izd. Limerick: Sveučilište u Limericku, Irska: Wiley; 2014.
3. O'Connor C., Adams J.U., Fairman J.E. *Protein Structure*. Essentials of Cell Biology [Internet]. Cambridge, MA: NPG Education; 2010.
4. Brainard J., Henderson R. *Protein Synthesis* [Internet]. CK-12; FlexBooks 2.0. 2018.
5. Goodfellow S.J., Zomerdijk J.C. *Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes*. Subcell Biochem. Volume 61. Pages 211-236. 2013.
6. O'Connor C., Adams J.U., Fairman J.E. *Ribosomes, Transcription and Translation*. Essentials of Cell Biology [Internet]. Cambridge, MA: NPG Education; 2010.
7. Nucleic Acids Book. *Transcription, Translation and Replication* [Internet]. ATDBio
8. Gregory B., Rahman N., Bommakanti A., Shamsuzzaman M., Thapa M., Lescure A., Zengel J.M., Lindahl L. *The small and large ribosomal subunits depend on each other for stability and accumulation*. Life Sci Alliance. 2019.
9. Szymanski M., Barciszewski J. *The Aminoacyl-tRNA Synthetase Data Bank (AARSDB)*. Nucleic Acids Research. Volume 27, Issue 1. Pages 332–335. 1999.
10. Szymanski M., Deniziak M.A., Barciszewski J. *Aminoacyl-tRNA synthetases database*. Nucleic Acids Research. Volume 29, Issue 1. Pages 288–290. 2001.
11. Schimmel P. *Mistranslation and its control by tRNA synthetases*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 366(1580):2965-

2971. 2011.
12. Wankhede N.L, Kale M.B., Upaganlawar A.B., Taksande B.G., Umekar M.J., Behl T., Abdellatif A.A.H., Bhaskaran P.M., Dachani S.R., Sehgal A., Singh S., Sharma N., Makeen H.A., Albratty M., Dailah H.G., Bhatia S., Al-Harrasi A., Bungau S. *Involvement of molecular chaperone in protein-misfolding brain diseases.* Biomedicine & Pharmacotherapy. Volume 147. 2022.
  13. Buchner J. *Molecular chaperones and protein quality control: an introduction to the JBC Reviews thematic series.* Journal of Biological Chemistry. Volume 294, Issue 6. Pages 2074-2075. 2019.
  14. Ponomarenko M., Stepanenko I., Kolchanov N. *Heat Shock Proteins.* Editor(s): Maloy S., Hughes K. Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition). Academic Press. Pages 402-405. 2013.
  15. Miller D.J., Fort P.E. *Heat Shock Proteins Regulatory Role in Neurodevelopment.* Frontiers in Neuroscience. Volume 12. 2018.
  16. Lee J.W., Beebe K., Nangle L.A., Jang J., Longo-Guess C.M., Cook S.A., Davisson M.T., Sundberg J.P., Schimmel P., Ackerman S.L. *Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration.* Nature. Volume 443. Pages 50-5. 2006.
  17. Chong Y.E., Yang X., Schimmel P. *Natural Homolog of tRNA Synthetase Editing Domain Rescues Conditional Lethality Caused by Mistranslation.* Journal of Biological Chemistry. Volume 283, Issue 44, Pages 30073-30078. 2008.
  18. Ransohoff R.M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. Science. Volume 353. 2016.
  19. Muchowski P.J. *Protein misfolding, amyloid formation and neurodegeneration: A critical role for molecular chaperones?* Neuron. Volume 35, Pages 9-12. 2002.
  20. Mitchell J.D, Borasio G.D. *Amyotrophic lateral sclerosis.* The Lancet. Volume 369, Issue 9578, Pages 2031-2041. 2007.
  21. Young, J. J., Lavakumar, M., Tampi, D., Balachandran, S., Tampi, R. R. *Frontotemporal dementia: latest evidence and clinical*

- implications. Therapeutic advances in psychopharmacology*, Volume 8, Issue 1, Pages 33–48. 2018.
22. Gandhi J., Antonelli A.C., Afridi A., Vatsia S., Joshi G., Romanov V., Murray I.V.J., Khan S.A. *Protein misfolding and aggregation in neurodegenerative diseases: a review of pathogenesis, novel detection strategies, and potential therapeutics*. *Reviews in the Neurosciences*. Volume 30, Number 4, Pages 339-358. 2016.
  23. Sweeney, P., Park, H., Baumann, M. et al. *Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies*. *Transl Neurodegener*. 2017.
  24. Muchowski P.J. *Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: a critical role for molecular chaperones?* *Neuron*. Volume 35, Pages 9-12. 2002.
  25. Strang, K. H., Golde, T. E., Giasson, B. I. *MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration*. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. Volume 99, Issue 7, Pages 912–928. 2019.
  26. Hergesheimer R.C., Chami A.A., de Assis D.R., Vourc'h P., Andres C.R., Corcia P., Lanznaster D., Blasco H. *The debated toxic role of aggregated TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis: a resolution in sight?* *Brain*. Volume 142, Issue 5, Pages 1176-1194. 2019.
  27. Seluanov A., Vaidya A., Gorbunova V. *Establishing Primary Adult Fibroblasts Cultures From Rodents*. *Journal of Visualized Experiments*. 2010
  28. Jeong Woong Lee et al. *Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration*. *Nature*, 2006.

## **8. ŽIVOTOPIS**

### **Osobne informacije**

**Ime i prezime:** Tea Tomljanović

Datum rođenja: 01. kolovoza 1995.

### **Kontakt informacije:**

E-mail adresa: [tea.tomljanovic95@gmail.com](mailto:tea.tomljanovic95@gmail.com)

Broj mobitela: (+385) 098 965 7231

Adresa: Tići 22/2, 51 000 Rijeka (Hrvatska)

### **Obrazovanje i osposobljavanje**

#### **Diplomski sveučilišni studij Biotehnologija u medicini**

*Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci [ 2020. – Trenutačno ]*

Adresa: Ul. Radmile Matejčić, 51000 Rijeka (Hrvatska)

Diplomski rad: Izolacija i karakterizacija primarnih fibroblasta iz kože i pluća miševa divljeg tipa i Sti- heterozigotnih miševa (mentorica: doc.dr.sc. Slađana Bursać)

---

#### **Diplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo**

*Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci [ 2017. – 2019. ]*

Adresa: Braće Branchetta 20/1, 51000 Rijeka (Hrvatska)

Diplomski rad: Obilježja smrtnosti od ozljeda u Primorsko-goranskoj županiji u razdoblju od 2008. do 2017. godine (<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:912762>) (mentorica: Vanja Tešić, dr.med., spec.epidem.)

---

#### **Prediplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo**

*Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci [ 2014. – 2017. ]*

Adresa: Braće Branchetta 20/1, 51000 Rijeka (Hrvatska)

Diplomski rad: Epidemiološke značajke obolijevanja od pertussisa u Zagrebu u periodu od 2010. do 2014. godine

(<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:503343>) (mentorica: Vanja Tešić, dr.med., spec.epidem.)

---

### **Opća gimnazija**

*Prva riječka hrvatska gimnazija* [ 2010. – 2014. ]

Adresa: Frana Kurelca 1, 51000 Rijeka (Hrvatska)

### **Radno iskustvo**

#### **Samostalni analitičar**

*Hidro. Lab. d.o.o.* [svibanj 2022. – trenutno]

Mjesto: Rijeka, Hrvatska

Opis posla:

Priprema uzoraka za digestiranje i analizu (vaganje, prelijevanje, dodavanje reagensa)

Sušenje uzoraka

Mrjevenje uzoraka

Analiza količine metala u uzorcima vode, tla, otpada, mulja pomoću ICPE-OES uređaja (Shimadzu)

Obrada podataka pomoću Excela

Vođenje radnih knjiga i naloga

Provođenje postupaka po ISO standardima

Održavanje radnog prostora

Vođenje skladišta i briga o zalihama robe

-

---

#### **Tehničarka u proizvodnji (studentski posao)**

*Natural Elements d.o.o.* [ listopad 2020. – srpanj 2021. ]

Mjesto: Rijeka, Hrvatska

Opis posla:

Punjenje kapsula dodacima prehrani

Razvrstavanje kapsula u bočice

Lijepljenje LOT oznaka i zaštitnih folija

Miješanje smjesa dodataka prehrani

---

#### **Administrativna pomoćnica u zdravstvenoj ordinaciji (studentski posao)**

*Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije* [ travanj 2021. – srpanj 2021.]

Mjesto: Rijeka, Hrvatska

Opis posla:

Pomoć pri cijepljenju protiv COVID-19

Upisivanje cijepljenih osoba u sustav

Objašnjavanje posljedica od cjepiva

Pripremanje šprica i ostale opreme

Dezinfekcija radnog prostora

---

### **Profesorica kemije u srednjoj školi**

*Prva riječka hrvatska gimnazija* [ ožujak 2020. – listopad 2020. ]

Mjesto: Rijeka, Hrvatska

Opis posla:

Priprema nastavnih materijala za nastavu kemije od prvog do četvrtog razreda gimnazije Priprema i provođenje pismenih i usmenih provjera

Provođenje pokusa

### **Jezične vještine**

Materinji jezik: hrvatski

Drugi jezici:

engleski – slušanje C1; čitanje C1; pisanje B2; govorna produkcija B2; govorna interakcija B2

njemački – slušanje A1; čitanje A1; pisanje A1; govorna produkcija A1; govorna interakcija A1

### **Digitalne vještine**

MS Office

Komunikacijski programi (Skype, Zoom, MS Teams, Big Blue Button)

Društvene mreže (Facebook, Instagram, Youtube)

Internet pretraga, uključujući pretraživanje specijalnih baza podataka (Pubmed, Protein Data Bank itd.)

Programi za računalni dizajn bioloških molekula (VMD, Spark, RStudio, Chimera, Avogadro; PyMOL)

Programi za statistiku (Excel, Statistica, MedCalc)

## **Laboratorijske vještine**

Osnovne laboratorijske vještine (korištenje analitičke vage, prelijevanje kemikalija, rad s plamenikom, priprema otopina, titracija, pipetiranje, destilacija, ekstrakcija, otparavanje otapala, dokazne reakcije itd.)

Digestiranje uzoraka

Mikroskopiranje (priprema preparata, bojenje preparata)

Kultivacija i identifikacija bakterija, određivanje broja bakterija u uzorku

Transformacija bakterija

Priprema i kultivacija staničnih kultura

Izolacija matičnih stanica iz različitih tkiva

Priprema medija

Pasažiranje stanične linije

Transfekcija stanica

Kloniranje DNA fragmenata

Western blot

PCR

Analiza uzoraka pomoću ICPE-OES

## **Ostale vještine**

### *Komunikacijske i međuljudske vještine*

Od završetka srednje škole radila sam razne studentske poslove. Gotovo svi poslovi koje sam radila bili su rad s ljudima, prilikom čega sam stekla odlične komunikacijske, ali i prodajne vještine, te se naučila samokontroli i timskom radu.

### *Organizacijske vještine i sposobnost vođenja*

Istovremeno studiranje, rad i treninzi zahtijevaju dobre organizacijske vještine. Osim toga, u slobodno vrijeme pišem programe treninga i držim privatne treninge u teretani, što također zahtijeva organizaciju i liderske vještine. Liderske i organizacijske vještine intenzivno sam razvijala prilikom rada u srednjoj školi (profesorica kemije).

### *Osobni razvoj*

Jako sam usredotočena na osobni i profesionalni razvoj te težim cjeloživotnoj edukaciji. Dokaz tome su i dva fakulteta te certifikat za fitnes trenera.

## **Certifikati i licence**

### **Certifikat instruktora fitnesa u teretani**

*Fitness učilište* [ rujun 2020. – prosinac 2020. ]

Adresa: Avenija Dubrovnik 15, 10 000 Zagreb (Hrvatska)

## **Hobiji i interesi**

### **Bodybuilding i weightlifting**

Posljednjih 10 godina se aktivno bavim dizanjem utega, a posljednjih tri se rekreativno bavim bodybuildingom. Posjedujem certifikat instruktoreice fitnesa u teretani. (<https://fitnes-uciliste.hr/zelim-da-se-svi-osjecaju-onako-kako-se-ja-osjecam-zahvaljujuci-fitnesu-tea-tomljanovic/>)

## **Vozačka dozvola**

Kategorija: B  
Aktivan vozač