

# ANALIZA HOMEOSTAZE PROTEINA U PRIMARNIM STANIČNIM LINIJAMA IZ MIŠEVA DIVLJEG TIPA I STI-HETEROZIGOTNIH MIŠEVA

---

**Majnarić, Dora**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:801047>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-25**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dora Majnarić

ANALIZA HOMEOSTAZE PROTEINA U PRIMARNIM  
STANIČNIM LINIJAMA IZ MIŠEVA DIVLJEG TIP A I *STI*-  
HETEROZIGOTNIH MIŠEVA

Završni rad

RIJEKA, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dora Majnarić

ANALIZA HOMEOSTAZE PROTEINA U PRIMARNIM  
STANIČNIM LINIJAMA IZ MIŠEVA DIVLJEG TIP A I *STI*-  
HETEROZIGOTNIH MIŠEVA

Završni rad

RIJEKA, 2019.

Mentor rada: Doc.dr.sc Slađana Bursać, dipl.sanit.ing.

Komentor: Prof. dr. sc. Siniša Volarević, dr. med.

Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_, u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima \_\_\_\_\_ stranica, \_\_\_\_\_ slika, \_\_\_\_\_ tablica, \_\_\_\_\_ literaturnih navoda.

## **Zahvala**

*Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Slađani Bursać, na zalaganju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog završnog rada. Hvala Vam što ste uvijek našla vremena i imala strpljenja za sva moja pitanja.*

*Velika hvala mojim roditeljima i sestri koji su uvijek vjerovali u mene i moj uspjeh. Hvala vam na bezgraničnoj ljubavi i strpljenju.*

## SAŽETAK

Proteini su velike, složene makromolekule. Mnoge životne funkcije vezane su uz specifične proteine, a rast stanice reguliran je brojnim signalnim putevima koji potiču sintezu proteina. 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. U ovome radu određeno je stanje homeostaze proteina u primarnim fibroblastima izoliranim iz kože miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnih miševa, koji uslijed mutacije enzima alanil-tRNA sintetaze ugrađuju aminokiselinu serin umjesto alanina u svoje proteine. Kako bi se odredilo stanje homeostaze proteina u primarnim fibroblastima izoliranim iz kože miševa starosti 3 i 6 mjeseci određen je intenzitet sinteze proteina mjerenjem količine ugradnje analoga puromicina u novosintetizirane proteine metodom imunofluorescencije te je određena količinu agregata proteina upotrebom spoja koji veže agregirane proteine metodom imunofluorescencije.

Dobiveni rezultati pokazuju da nema razlike u intenzitetu sinteze proteina u izoliranim fibroblastima iz kože miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnih miševa starosti 3 i 6 mjeseci. Međutim, veća je količina agregiranih proteina u fibroblastima izoliranim iz tkiva kože *Sti*-heterozigotnih miševa starosti 3 i 6 mjeseci u odnosu na miševe 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, intenzitet sinteze proteina, agregirani proteini

## SUMMARY

Proteins are large complex macromolecules. The specialized roles of the proteins are very important for many functions in the cell and cell growth is regulated with many signaling pathways that stimulate protein synthesis. During the lifetime of mammals, the protein homeostasis become progressively impaired, causing the weakening of most cellular functions, resulting in diseases associated with aging and death. In this work was determined the protein homeostasis in primary fibroblasts isolated from the skin of wild-type mice and *Sti*-heterozygous mice. *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. In order to determine the protein homeostasis in primary fibroblasts isolated from mice that are 3 and 6 months old, protein synthesis intensity was determined by measuring the amount of an alkyne analog of puromycin incorporated in the newly synthesized protein. The amount of protein aggregate was determined using a compound that binds the aggregated proteins by the immunofluorescence analysis.

The results showed no differences in the intensity of protein synthesis in isolated fibroblasts from the skin of wild-type mice and *Sti*-heterozygous mice in age 3 and 6 months. However, it was showed that there are higher amounts of aggregated proteins in fibroblasts isolated from the skin of *Sti*-heterozygous mice in age 3 and 6 months compared to wild-type mice of the same age. The results indicate that protein homeostasis is impaired throughout defects in protein synthesis.

**Key words:** protein homeostasis, *Sti*-heterozygous mice, primary fibroblasts from the skin, intensity of protein synthesis, aggregated proteins

# SADRŽAJ

|                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------|-----|
| SAŽETAK.....                                                     | III |
| SUMMARY .....                                                    | IV  |
| 1. UVOD I PODRUČJE ISTRAŽIVANJA .....                            | 1   |
| 1.1. PROTEINI.....                                               | 1   |
| 1.1.1. Građa proteina.....                                       | 1   |
| 1.1.2. Struktura proteina.....                                   | 3   |
| 1.1.3. Sinteza proteina.....                                     | 5   |
| 1.1.3.1. Aminoacil-tRNK-sintetaze.....                           | 7   |
| 1.1.3.2. Koraci tijekom sinteze proteina.....                    | 9   |
| 1.1.4. Šaperoni – proteini pratioci.....                         | 13  |
| 1.1.4.1. Hsp70 .....                                             | 14  |
| 1.1.4.2. Hsp60 .....                                             | 15  |
| 1.1.5. Pogreške tijekom procesa sinteze proteina .....           | 16  |
| 1.1.5.1. Miševi s mutacijom u enzimu alanil-tRNK sintetazi ..... | 16  |
| 2. CILJ RADA.....                                                | 18  |
| 3. MATERIJALI I METODE .....                                     | 19  |
| 3.1. MATERIJALI.....                                             | 19  |

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.1. Kemikalije.....                                                                                       | 19 |
| 3.1.2. Mediji i puferi za kulturu stanica .....                                                              | 20 |
| 3.1.2.1. Fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS, engl. phosphate buffered saline), pH 7,4..... | 20 |
| 3.1.2.2. Mediji za uzgoj stanica.....                                                                        | 20 |
| 3.1.3. Otopine korištene za imunofluorescenciju.....                                                         | 21 |
| 3.1.3.1. Fiksacija stanica .....                                                                             | 21 |
| 3.1.3.2. Otopina za ispiranje stanica nakon fiksacija .....                                                  | 21 |
| 3.1.3.3. Otopina za permeabilizaciju stanica TBST .....                                                      | 21 |
| 3.1.3.4. Otopina za permeabilizaciju za određivanje agregiranih proteina .....                               | 21 |
| 3.1.4. Stanične linije.....                                                                                  | 21 |
| 3.1.5. Laboratorijsko posuđe i pribor.....                                                                   | 22 |
| 3.1.6. Uređaji.....                                                                                          | 23 |
| 3.2. METODE.....                                                                                             | 23 |
| 3.2.1. Određivanje kapaciteta sinteze proteina .....                                                         | 23 |
| 3.2.2. Određivanje agregata proteina .....                                                                   | 24 |
| 4. REZULTATI.....                                                                                            | 26 |
| 5. RASPRAVA.....                                                                                             | 32 |
| 6. ZAKLJUČCI.....                                                                                            | 34 |

|                    |    |
|--------------------|----|
| 7. LITERATURA..... | 35 |
| ŽIVOTOPIS .....    | 38 |

# 1. UVOD I PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

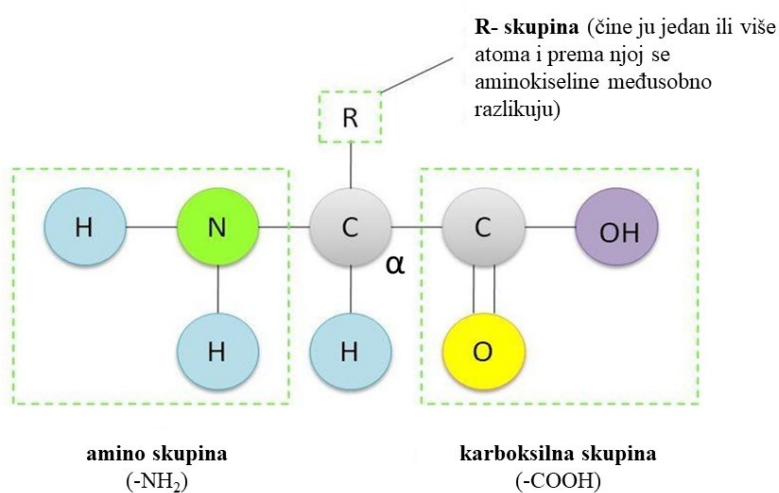
## 1.1. PROTEINI

Proteini su velike, složene makromolekule. Oni čine 80% suhe mase stanice, a sinteza proteina i inhibicija njihove razgradnje ključni su za rast stanice (1). Mnoge životne funkcije su vezane uz specifične proteine, a rast stanice reguliran je brojnim signalnim putevima koji potiču sintezu proteina. Proteini imaju važnu ulogu u stanicama i potrebni su za strukturu, funkciju i regulaciju tjelesnih tkiva i organa. Količina proteina u stanici može se povećati učinkovitom sintezom proteina na ribosomima ili sintezom novih ribosoma koji povećavaju kapacitet sinteze proteina (2).

### 1.1.1. Građa proteina

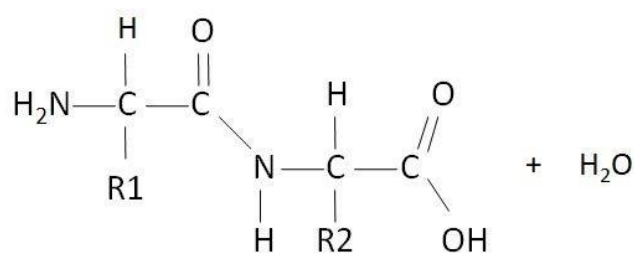
Proteini su građeni od dugih lanaca, koji povezuju stotinu do tisuću aminokiselinskih ostataka. Aminokiseline su međusobno povezane u dugačke lance peptidnom vezom. Iako se u prirodi pojavljuje više od 100 aminokiselina, osobito u biljkama, u većini proteina obično se nalazi samo 20 vrsta. Prema tome, proteini su građeni od 20 različitih aminokiselina, od kojih je 8 esencijalnih, odnosno nužnih za rad čovječjeg organizma, tijelo ih ne može proizvesti. Slijed aminokiselina određuje jedinstvenu trodimenzionalnu strukturu svakog proteina i njegovu specifičnu funkciju. Zajedničko svojstvo svih proteina je da se sastoje od dugih lanaca  $\alpha$ -amino (alfa amino) kiselina. Opća struktura  $\alpha$ -aminokiselina je  $\alpha$ -ugljikov atom u molekuli koji nosi amino skupinu ( $-\text{NH}_2$ ) i karboksilnu skupinu ( $-\text{COOH}$ ). Pored amino i karboksilne skupine, struktura aminokiselina određena je i bočnim lancem koji se naziva

ostatak i obilježava se s R (**slika 1.**). R-skupine sadrže karakteristične osobine pojedine aminokiseline (3).



**Slika 1. Opća struktura aminokiselina.**  $\alpha$ -ugljikov atom nosi amino skupinu (-NH<sub>2</sub>) i karboksilnu skupinu (-COOH). Pored amino i karboksilne skupine, struktura aminokiselina određena je i bočnim lancem (R).

U molekulama proteina  $\alpha$ -aminokiseline su međusobno povezane peptidnim vezama između amino skupine jedne aminokiseline i karboksilne skupine druge aminokiseline (**slika 2.**).

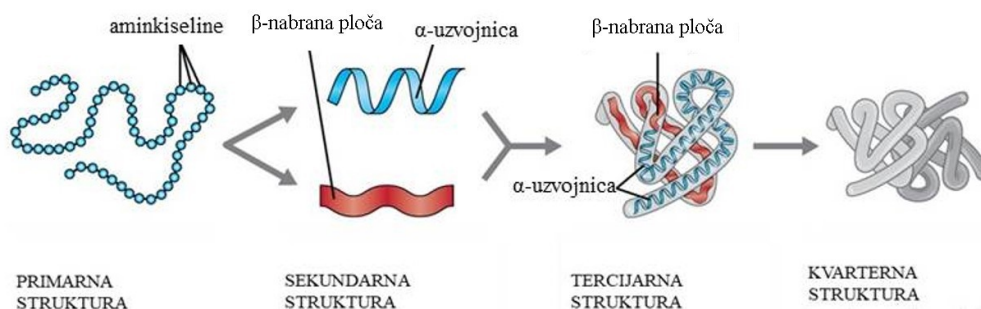


**Slika 2. Peptidna veza u aminokiselinama.** Peptidna veza stvara se između amino skupine jedne aminokiseline i karboksilne skupine druge aminokiseline.

Prema broju aminokiselina u peptidu, oni mogu biti dipeptidi (dvije aminokiseline), polipeptidi (veći broj aminokiselina, oko 50) i proteini. Proteini su makromolekularni polipeptidi, tj. veoma velike molekule sastavljene od mnogih peptidno vezanih aminokiselina. Većina uobičajenih sadrži više od 100 aminokiselina međusobno povezanih u dugom peptidnom lancu.

### 1.1.2. Struktura proteina

Proteini su složene makromolekule nastale povezivanjem nekoliko stotina aminokiselina u jednu molekulu, a mogu biti raspoređeni u prostoru na različite načine (ispruženi lanac, nepravilno klupko ili pravilna uzvojnica). Kod proteina postoje četiri strukturne razine: primarna, sekundarna, tercijarna i kvarterna struktura (**slika 3.**).



**Slika 3. Struktura proteina.** Primarna, sekundarna, tercijarna i kvarterna struktura čine četiri strukturne razine u proteinu. Preuzeto

<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/proteins/>

Primarna struktura proteina je redoslijed aminokiselina u pojedinom proteinu. Konfiguracija ili konformacija proteina određena je međusobnim privlačenjem ili odbijanjem polarnih ili nepolarnih skupina u bočnim lancima (R skupine) aminokiselina. Neki dijelovi peptidnog lanca koji sadrže 100 do 200 aminokiselina mogu tvoriti petlju ili spiralu; druge mogu biti ravne ili oblikovati nepravilne zavojnice. Pojmovi sekundarna, tercijarna i kvarterna struktura često se primjenjuju na konfiguraciju peptidnog lanca proteina. Primarna struktura proteina određena je njegovom aminokiselinskom sekvencom bez obzira na raspored peptidnog lanca u prostoru. Sekundarna struktura je određena prostornim rasporedom glavnog peptidnog lanca bez obzira na konformaciju bočnih lanaca ili drugih segmenata glavnog lanca. Sekundarna struktura može niti  $\alpha$ -uzvojnica,  $\beta$ -nabrana ploča ili nepravilno klupko. Ona je najčešće uvjetovana vodikovim vezama koje se stvaraju između amino i karboksilnih skupina u peptidnim vezama koje su u linearnom slijedu međusobno blizu. Tercijarna struktura određena je i bočnim lancima i drugim susjednim segmentima glavnog lanca, bez obzira na susjedne peptidne lance. Veze između bočnih ogranaka mogu biti kovalentne

(disulfidni mostovi) i nekovalentne (ionske i vodikove veze) (3). S obzirom na tercijarnu strukturu proteini se mogu podijeliti na :

1. Skleroproteine koji imaju fibrilarnu strukturu, netopljivi su u vodi te služe kao potporni elementi. Pokazuju visoku pravilnost u građi nitaste molekule. Najvažniji predstavnici su kolagen koji izgrađuje vezivno tkivo, kreatini od kojih se sastoji kosa, nokti i perje te miozin mišića.
2. Globularni proteini (sferoproteini) su topljivi u vodi ili u razrijeđenim otopinama soli, a njihova molekula je kuglasta, no pokazuje određenu nepravilnost. U ovu skupinu spadaju proteini krvne plazme, proteini bjelanjka jaja, kao i najveći broj enzima.
3. Proteinski kompleksi građeni su od proteinskog dijela i neke neproteinske skupine. Prema vrsti unutar ove skupine razlikuju se: glikoproteini, lipoproteini, fosfoproteini i metaloproteini (4).

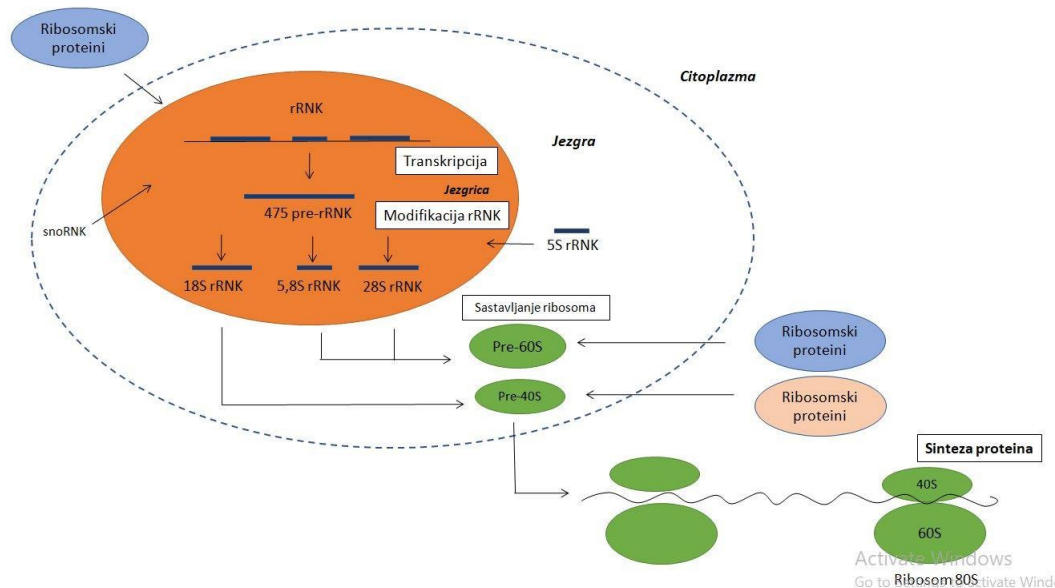
Konačno, termin kvarterna struktura se koristi za raspored identičnih ili različitih podjedinica velikog proteina u kojem je svaka podjedinica odvojeni peptidni lanac (3). Primarnu, sekundarnu i tercijarnu strukturu imaju svi proteini, a kvarternu samo oni koji su građeni od više od jednog polipeptidnog lanca (4).

### **1.1.3. Sinteza proteina**

Sinteza proteina se postiže procesom koji se naziva translacija. Translacija je proces u kojem se genska informacija prepisana s DNK na molekulu glasničke RNK, gRNK (engl. *messenger RNA*) pretvara u specifičan redoslijed aminokiselina u polipeptidnom lancu. Mehanizam kojim se prema uputi s DNK molekule sintetiziraju proteini naziva se molekularna dogma. U translaciji sudjeluju:

1. lanac DNK koji nosi kod (svaku aminokiselinu kodira tri nukleotida u DNK)
2. gRNK nosi genetsku informaciju prepisanu s DNK u obliku sekvence baza koje određuju redoslijed aminokiselina u polipeptidnom lancu
3. transportna RNK, tRNK (engl. *transfer RNA*) nosi antikodon i aminokiselinu, vezanje aminokiseline na tRNA omogućuje enzim aminoacil-tRNA sintetaza koja je specifična za svaku aminokiselinu
4. ribosomska RNK, rRNK (engl. *ribosomal RNA*) gradi ribosome na kojim se odvija sinteza proteina.

Proteini se sintetiziraju na ribosomima. Proces sinteze ribosoma je vrlo složen, energetski vrlo zahtjevan i precizno reguliran proces. Sinteza ribosoma najvećim se dijelom odvija u jezgri, a manjim dijelom u jezgri i citoplazmi (5). Ona uključuje prepisivanje gena s rDNK pri čemu nastaje 47S pre-rRNK, modifikaciju i cijepanje 47S pre-rRNK na 28S, 18S i 5,8S i udruživanje s 80 različitih ribosomskih proteina i 5S rRNK koja se sintetizira u jezgri (6). U procesu sinteze ribosoma osim ribosomskih proteina i rRNK sudjeluje i 100 malih RNK iz jezgri i 300 neribosomskih proteina (7). Nastala mala i velika podjedinica transportira se u citoplazmu gdje formira funkcionalni 80S ribosom nakon vezanja glasničke RNK (**slika 4.**).



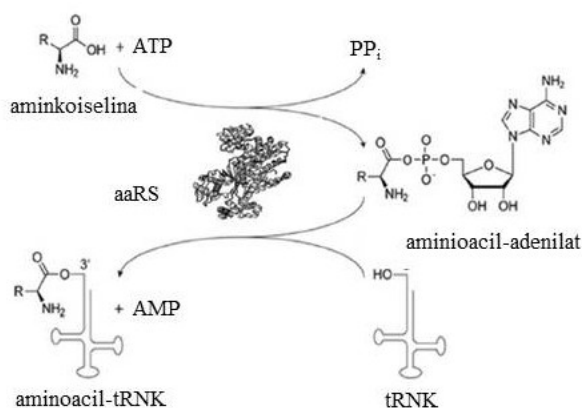
**Slika 4. Sinteza proteina.** Proteini se sintetiziraju na ribosomima. Proces sinteze ribosoma odvija se u jezgri, jezgri i citoplazmi. Počinje prepisivanjem gena s rDNA pri čemu nastaje 47S pre-rRNA koja se cijepa i modificira, zatim udružuje s 80 različitih ribosomskih proteina i 5S rRNA koja se sintetizira u jezgri. U procesu sinteze ribosoma sudjeluju i male RNA i neribosomski proteini. Funkcionalni 80S ribosom stvara se u citoplazmi nakon vezanja gRNA za malu i veliku jedinicu ribosoma.

#### 1.1.3.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Proces sinteze proteina se može podijeliti u dva zasebna koraka: kovalentno vezanje pripadajuće aminokiseline na molekulu tRNA i procese koji obuhvaćaju događanja vezana uz ribosome. U prvom koraku, u reakciji aminoacilacije nastaje aminoacil-tRNA. Ta reakcija katalizirana je od strane aminoacil-tRNA-sintetaza (engl. *aminoacyl tRNA synthetases*, aaRS). Tako aktivirana aminokiselina, vezana na tRNA, doprema se na ribosom u kompleksu s elongacijskim faktorom, EF-1α eukariota, (engl. *translation elongation factor*) gdje se na

temelju ispravnog sparivanja baza kodona gRNK i antikodona tRNK donesena aminokiselina ugrađuje u rastući polipeptidni lanac (8).

Aminoacil-tRNK-sintetaze (aaRS) članovi su obitelji RNA-vežućih proteina s centralnom ulogom u procesu translacije. Ovi enzimi kataliziraju stvaranje aminoacil-tRNK, molekula koje predstavljaju aktivirani oblik aminokiseline iskoristiv u biosintezi polipeptidnog lanca na ribosomu. U većini organizama postoji 20 različitih aaRS1, a svaka od njih odgovorna je za aminoacilaciju svoje pripadne tRNK jedinstvenom aminokiselinom (9). Ova reakcija odvija se u 2 koraka (**slika 5.**).



**Slika 5. Reakcija aminoacil-tRNK-sintetaza.** U prvom koraku karboksilna skupina aminokiseline nukleofilno napada  $\alpha$ -atom fosfora molekule ATP-a, a kao međuprodukt nastaje aminoacil-adenilat i anorganski pirofosfat kao izlazna skupina. U drugom koraku sudjeluje aminoacil-adenilat u reakciji aminoaciliranja u kojem kisik 2'- ili 3'-hidroksilne skupine riboze krajnjeg adenzina na 3'-kraju molekule tRNK nukleofilno napada anhidridni ugljikov atom aminoacil-adenilata i nastaje aminoacil-tRNK i adenzin-monofosfat (AMP) (12).

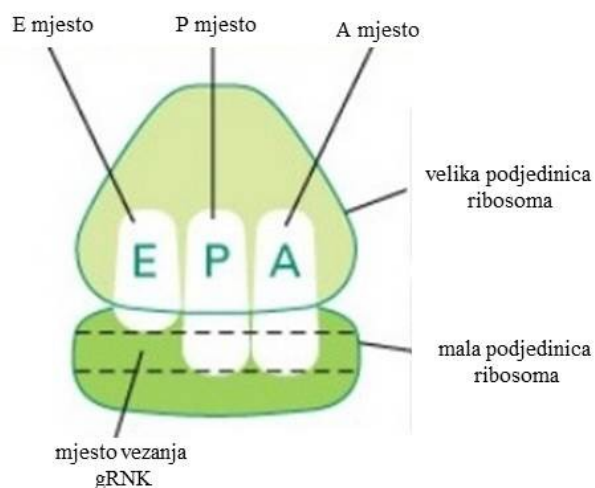
Nakon vezanja malih supstrata (aminokiseline i adenozin-trifosfata, ATP-a) te magnezijevih iona, u prvom koraku nastaje reakcijski intermedijer, aminoacil-adenilat (10). Taj intermedijer ostaje nekovalentno vezan na enzim. Zatim u drugom koraku, aminoacilna skupina se prenosi unutar aktivnog mjesta na jednu od hidroksilnih grupa riboze 3'-terminalnog nukleotida (adenozina) tRNK čime nastaje aminoacil-tRNA (11).

Aminoacilirana tRNK svojim antikodonom prepoznaje kodon gRNK izložen na ribosomu. Uspostavom ispravnih interakcija između kodona i antikodona, ribosomom se pronosi signal o ispravnosti smještene molekule aa-tRNK te dolazi do ugradnje donesene aminokiseline. Budući da se u reakciji aminoacilacije uspostavlja veza između kodona i aminokiseline, često se aminoacil-tRNA-sintetaze nazivaju i (jedinim) staničnim čitačima genetskog koda (12).

### **1.1.3.2. Koraci tijekom sinteze proteina**

Proces translacije započinje vezanjem aminoacil-tRNK, gRNK i obje podjedinice ribosoma. Transportna RNK ima veliku ulogu u procesu translacije proteina. Njezin je zadatak prevesti poruku unutar nukleotidne sekvence gRNK na specifičnu aminokiselinsku sekvencu (13). Ove sekvence su spojene zajedno kako bi tvorile protein. Transportna RNK je oblikovan kao list djeteline s tri petlje. Sadrži mjesto vezanja aminokiselina na jednom kraju i poseban dio u srednjoj petlji nazvan antikodonsko mjesto. Antikodon prepoznaje specifično područje na gRNK nazvano kodon. Translacija se odvija na ribosomima u citoplazmi (14). Nakon izlaska iz jezgre, gRNK treba proći nekoliko modifikacija prije nego što bude prevedena. Uklanjaju se dijelovi gRNK koji ne kodiraju aminokiseline, nazvane intronima. Poli-A rep, koji se sastoji od nekoliko adeninskih baza, dodaje se na jedan kraj gRNK, dok se kapa gvanozin trifosfata dodaje na drugi kraj. Ove modifikacije uklanjaju nepotrebne dijelove

i štite krajeve molekule gRNK. Kada su sve modifikacije završene, gRNK je spremna za prepisivanje. Nakon što je gRNK izmijenjena i spremna za prepisivanje, veže se na specifično mjesto na ribosomu. Kao što je prethodno spomenuto, ribosomi se sastoje od dva dijela, velike podjedinice i male podjedinice. One sadrže mjesto vezanja za gRNK i tri mjesta vezanja za transportnu RNK koja se nalaze u velikoj ribosomskoj podjedinici. Na ribosomu se nalaze tri vezna mjesta na koja se vežu tRNK molekule: A mjesto na koje se veže aminoacil-tRNK (tRNK na koju je vezana aminokiselina); P mjesto na kojem se nalazi peptidil-tRNK (tRNK na koju je vezano nekoliko aminokiselina povezanih peptidnim vezama); tRNK koja je u procesu translacije predala aminokiselinu premješta se na E mjesto (engl. *exit*) (**slika 6.**) (15).



**Slika 6. Vezna mjesta za tRNK na ribosomu.** Na ribosomu se nalaze tri vezna mjesta na koja se vežu tRNK molekule (A mjesto, P mjesto i E mjesto).

Faze translacije u sintezi proteina:

1. Inicijacija: ribosomske podjedinice vežu se za gRNK.
2. Elongacija: ribosom se kreće duž molekule gRNK povezujući aminokiseline i formirajući polipeptidni lanac.

3. Terminacija: ribosom doseže stop kodon, koji završava sintezu proteina i oslobađa ribosom (16).

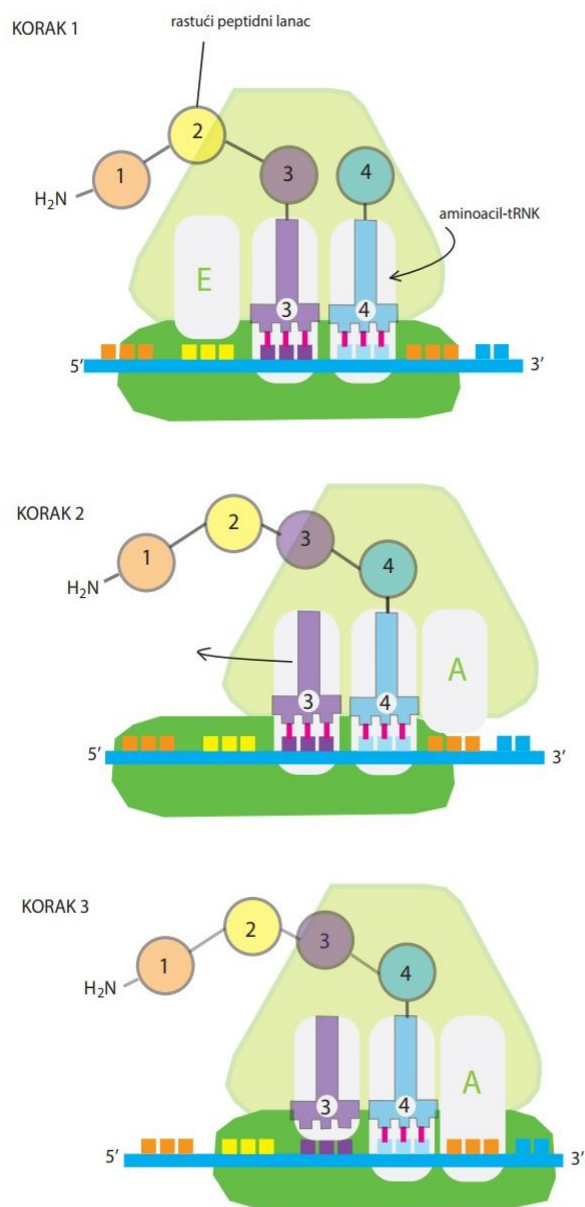
Tijekom prevođenja, mala ribosomska podjedinica se veže na molekulu gRNK. U isto vrijeme inicijacijska molekula tRNK prepoznaje i veže se na specifični kodonski slijed na istoj molekuli gRNK. Velika ribosomska podjedinica tada se pridružuje novoformiranom kompleksu. Inicijacijska tRNK nalazi se na jednom mjestu vezanja ribosoma zvanog P mjesto, ostavljajući drugo mjesto vezanja, A mjesto, prazno za sljedeću aminoacil-tRNK. Kada nova molekula tRNK prepozna sljedeću sekvencu kodona na gRNK, ona se veže na otvoreno A mjesto. Peptidna veza se stvara povezivanjem aminokiseline tRNK u P mjestu s aminokiselinom tRNK u mjestu vezanja A (10).

Tijekom procesa elongacije, dodaje se jedna po jedna aminokiselina, odnosno ribosom se pomiče po gRNK za po jedan kodon, i tako raste polipeptid. Kako određeni kodon dođe na ribosom, on se privremeno, vodikovim vezama i po principu komplementarnosti dušičnih baza, veže s antikodonom na tRNK.

Proces translacije završava kada na A mjesto ribosoma dođe jedan od stop kodona (UAA, UAG ili UGA) (**slika 7.**) (16).

U stanici ne postoji tRNK s antikodonom komplementarnim stop kodonu i stoga se proces translacije završava. Kada se to dogodi, polipeptidni lanac se odvaja od peptidil-tRNK, tRNK i gRNK se odvajaju od ribosoma, a sam ribosom se razdvaja na dvije podjedinice. Novooblikovani polipeptidni lanac prolazi kroz nekoliko modifikacija prije nego postane potpuno funkcionalni protein. Proteini imaju različite funkcije. Neki će se koristiti u staničnoj membrani, dok će ostali ostati u citoplazmi ili će biti izneseni iz stanice. Mnoge kopije proteina mogu biti načinjene od jedne molekule gRNK. Razlog tome je što nekoliko ribosoma

može istodobno prevesti istu molekulu gRNK. Ovi skupovi ribosoma koji prevode jednu sekvencu gRNK nazivaju se poliribosomi ili polisomi (16).



**Slika 7. Translacija.** Nove aminokiseline dodaju se na kraj polipeptidnog lanca prema komplementarnom sparivanju kodona na gRNK i antikodona na tRNK. Tijekom sinteze

proteina ciklus od tri koraka uzastopno se ponavlja. U prvom koraku na prazno A mjesto ribosoma veže se aminoacil-tRNK. U drugom koraku stvara se peptidna veza, a u trećem koraku dolazi do pomaka male ribosomske podjedinice za 3 nukleotida i izbacivanja prazne tRNK molekule s E mjesta. Nakon toga ciklus se ponavlja. Rastući polipeptid tijekom cijelog procesa translacije je vezan preko tRNK molekule na P mjesto ribosoma.

Da bi postao funkcionalan (biološki aktivan), novosintetizirani polipeptidni lanac prolazi određene faze sazrijevanja (obrade) koje obuhvaćaju nekovalentne interakcije i posttranslacijske kovalentne modifikacije. Reakcija prostornog savijanja (engl. *folding*) u nativnu konformaciju omogućuje vršenje biološke funkcije.

#### **1.1.4. Šaperoni – proteini pratioci**

Šaperoni su obitelj proteina koji igraju vitalnu ulogu u stabilizaciji proteina. Ova stabilizacija pomaže u mnogim procesima kao što su translokacija, degradacija i preklapanje. Uloge šaperona – proteina pratioca navedene su u Tablici 1.

Postoji nekoliko obitelji šaperona i svaka ima različite funkcije. Primjer proteina šaperona su "proteini toplinskog šoka", HSP (engl. *heat shock proteins*) (17). HSP su vrlo dobro očuvani proteini, koji su prvi put otkriveni krajem 1960-ih nakon opažanja da je kod *Drosophila*, koje su bile izložene povišenim temperaturama, uzrokovalo povećanu sintezu skupine proteina koji su pomogli u zaštiti stanica od toksičnih učinaka topline (18). Nazvani su proteini toplinskog šoka, a kasnije se pokazalo da se njihova ekspresija povećava ne samo kada su stanice izložene povišenim temperaturama, nego i kao odgovor na druge podražaje stresa kao što su infekcija, upala, gladovanje i hipoksija. Ti proteini omogućuju proces

savijanja kroz cikluse vezanja i oslobađanja supstrata koji su regulirani njihovom aktivnošću ATP-aze, a potpomognuti su interakcijama s kofaktorskim proteinima (19).

**Tablica 1. Uloge šaperona – proteina pratioca**

|                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Šaperoni – proteini pratioci (engl. <i>molecular chaperones</i> ) imaju više različitih uloga:                         |
| ➤ Sprječavaju agregaciju i pogrešno savijanje novosintetiziranih proteina                                              |
| ➤ Omogućuju transport proteina kroz biološke membrane                                                                  |
| ➤ Omogućuju udruživanje polipeptida u funkcionalno aktivne komplekse                                                   |
| ➤ Agregirane i/ili parcijalno denaturirane proteine dezagregiraju, odvijaju i ponovo savijaju u biološki aktivan oblik |
| ➤ Omogućuju degradaciju denaturiranih proteina                                                                         |

#### **1.1.4.1. Hsp70**

Hsp70 (engl. *heat shock protein*) je obitelj šaperona koja veže kratke nizove hidrofobnih aminokiselina u novosintetiziranim polipeptidima, štiteći ih od otapala (20). Proteini Hsp70 šaperona su katalizatori koji pomažu u različitim vrstama postupaka savijanja, poput ponovnog smotavanja ili pogrešnog savijanja agregiranih proteina, te u savijanju i sastavljanju novih proteina. Ovi proteini su monomerni i sadrže dvije različite domene

nazvane N i C terminalne domene. N terminalna domena sadrži ATP-azu, dok se na C terminalni kraj veže za supstrat. Hidroliza ATP-a unutar N terminalnog kraja omogućuje otvaranje C-terminalnog kraja i vezanje na supstrat. Hsp70 prepoznaje područje neotvorenog polipeptidnog lanca nazvanog "proširena regija". Ova proširena regija sadrži mnoge hidrofobne ostatke. Vezanje Hsp70 sprječava agregaciju ovih proteina (21,22). Nedavna istraživanja ukazuju Hsp70 sustav ima važnu ulogu kod neurodegenerativnih bolesti, ukazujući na to da su oni potencijalni ciljevi kod liječenja bolesti uzrokovanih pogrešno savijenim proteinima kao što su neurodegenerativne bolesti poput Alzheimerove, Parkinsonove i Huntingtonove bolesti koje su povezane s nakupljanjem agregata proteina u neuronima (19).

#### **1.1.4.2. Hsp60**

Obitelj šaperona Hsp60, razlikuje se od obitelji šaperona Hsp70 i njihovih homologa u aminokiselinskom slijedu i strukturi. Hsp60 kasnije djeluje, često s Hsp70 šaperonima, u procesu nabiranja proteina. Središnje udubljenje šaperona Hsp60, osigurava zaklonjeno okruženje u kojem se polipeptidi mogu nabirati sve dok se sva hidrofobna područja polipeptida ne smjeste u njegovu unutrašnjost, čime se onemogućava agregacija (23). Hsp60 također ima dva različita oblika. Prvo stanje je vezni oblik, u kojem je vezan ATP, a nesavijeni proteini mogu ući u rupu između dva prstena. Hidroliza ATP-a zatim inicira formiranje zatvorenog stanja, nazvanog aktivno-stanje preklapanja. Ova konformacijska promjena sprječava napuštanje proteina i potiče preklapanje proteina. Ovo zatvoreno stanje traje oko 15 sekundi prije nego što se konformacija promijeni i pravilno preklopljeni protein se oslobodi u citoplazmu (24).

### 1.1.5. Pogreške tijekom procesa sinteze proteina

Pogreške u različitim koracima u sintezi ribosoma rezultiraju promjenama broja ili kakvoće ribosoma što može poremetiti sintezu proteina i dovesti do razvoja brojnih patoloških procesa u ljudi i životinja. Bolesti nastaju kao posljedica promjena u količini sintetiziranih proteina ili kao posljedica promjena u kakvoći sintetiziranih proteina (25).

#### 1.1.5.1. Miševi s mutacijom u enzimu alanil-tRNK sintetazi

*Sti*-heterozigotni miševi (engl.*sticky*), uslijed mutacije enzima alanil-tRNK sintetaze ugrađuju aminokiselinu serin umjesto aminkoiseline alanina u svoje proteine i razvijaju slijedeće patološke fenotipove: ataksija, tremor, gubitak dlake (26).

U ovom radu proučavat će se utjecaj kvalitativnih promjena odnosno posljedice mutacije u enzimu alanil-tRNK sintetazi, na homeostazu proteina, a izolirani fibroblasti iz *Sti*-heterozigotnih miševa koristit će se kao stanični model za istraživanje.

Kao posljedica takve mutacije nastaju nepravilno savijeni odnosno pogrešno savijeni proteini koji su toksični za stanicu i povezani su s nekoliko patoloških stanja, uključujući i neurodegenerativne promjene (27). Istraživanja kod *Sti*-heterozigotnih miševa pokazala su da pogrešno prenesene tRNA, odnosno ugradnja serina umjesto alanina, dovodi do unutarstaničnog nakupljanja pogrešno savijenih proteina u neuronima gdje se nakupljaju kao agregati proteina. Histopatološkom analizom pokazano je da dolazi do gubitka Purkinje stanica u malom mozgu, a stanice neurona su najviše osjetljive iz razloga jer se ne dijele. Te promjene posljedica su degeneracije neurona u središnjoj regiji mozga i gubitka stanica malog mozga uslijed nakupljanja agregiranih proteina. Pokazano je da su šaperon HSP70 i njegov

ko-šaperon udruženi s agregatima proteina u neuronima. Nakupljanje ovih nepravilno savijenih proteina je toksično za stanicu i dovodi do stresa u endoplazmatskom retikulumu kao i aktivacije šaperona, GRP78 i transkripcijskog faktora CHOP prisutnih u endoplazmatskom retikulumu.

Prema tome, nepravilno savijeni proteini zauzimaju abnormalne konfiguracije koje dovode do nakupljanja agregata proteina koji su toksični za stanicu. Stoga je od velike važnosti pratiti molekularne promjene koje se događaju tijekom narušavanja homeostaze proteina u tim uvjetima (25).

## 2. CILJ RADA

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 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.

Cilj ovog rada je usporediti molekularne promjene koje ukazuju na stanje homeostaze proteina u primarnim fibroblastima izoliranim iz kože iz divljeg tipa miševa i *Sti*-heterozigotnih miševa starosti 3 i 6 mjeseci u kojima su genetički uvedene minimalne pogreške u sintezi proteina. Usporedit ću sljedeće molekularne promjene koje ukazuju na stanje homeostaze proteina:

1. intenzitet sinteze proteina mjerenjem količine ugradnje analoga puromicina u novosintetizirane proteine metodom imunofluorescencije
2. količinu agregata proteina upotrebom spoja koji veže agregirane proteine metodom imunofluorescencije.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Kemikalije

Bakar sulfat ( $\text{CuSO}_4$ )

Cikloheksimid ( $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ ), Sigma

DAPI (engl. *4',6'-diamidino-2-phenylindole*,  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5$ ), Sigma-Aldrich

DMEM medij, Gibco BRL

Etanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), Kemika

Etilendiamintetraoctena kiselina,  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ , Roth

Fetalni teleći serum (FCS, engl. *fetal calf serum*), Gibco BRL

L-Glutamin ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ ), Gibco BRL

Izopropanol (2-propanol,  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ ), Kemika

Kalcij klorid ( $\text{CaCl}_2$ ), Kemika

Kalij dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Kemika

Kalij hidrogenkarbonat ( $\text{KHCO}_3$ ), Kemika

Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), Kemika

Natrij-askorbat ( $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na}$ )

Natrij dihidrogenfosfat-2-hidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), Kemika

Natrij klorid (NaCl), Kemika

2-Merkaptoetanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS), Sigma-Aldrich

MG132, Tocris

Otopina penicilina i streptomicina, Gibco

Paraformaldehid, Sigma

ProLong Gold antifade reagent, Invitrogen

Reagens za određivanje agregata proteina, Abcam

Trizma-baza (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>), Sigma-Aldrich

Triton X-100, Pharmacia Biotech

### **3.1.2. Mediji i puferi za kulturu stanica**

#### **3.1.2.1. Fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS, engl. phosphate buffered saline), pH 7,4**

Natrij klorid (NaCl) 137 mM, kalij klorid (KCl) 2,7 mM, natrij-dihidrogenfosfat-2-hidrat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O) 4,3 mM, kalij-dihidrogenfosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1,4 mM.

#### **3.1.2.2. Mediji za uzgoj stanica**

Medij DMEM, L-glutamin 2 mM, 2-merkaptetanol 50 uM, penicilin 105 U/L, streptomicin 0,1 g/L, gentamicin 0,035 g/L, FCS 12% (v/v)

### **3.1.3. Otopine korištene za imunofluorescenciju**

#### **3.1.3.1. Fiksacija stanica**

Hladni methanol

4% otopina paraformaldehida

#### **3.1.3.2. Otopina za ispiranje stanica nakon fiksacija**

Tris buffer saline (TBS, TRis 10 mM pH 7,5, 150 mM NaCl)

#### **3.1.3.3. Otopina za permeabilizaciju stanica TBST**

Triton X-100, 0,2 %-tna otopina u TBS

#### **3.1.3.4. Otopina za permeabilizaciju za određivanje agregiranih proteina**

0,5% Triton X-100, 3mM EDTA pH 8,0 u 1x Assay puferu

### **3.1.4. Stanične linije**

**Primarne stanice iz tkiva kože iz miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnih miševa na specifičnim stadijima starenja.**

Na Zavodu za Molekularnu medicinu i biotehnologiju već su izolirane stanice iz tkiva kože iz miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnih miševa u dobi od 3 i 6 mjeseci. Stanice fibroblasta iz tkiva kože izolirane su prema standardnom protokolu (28). Uzgajala sam ih na 37 °C i atmosferi od 5 % CO<sub>2</sub> u DMEM mediju uz dodatak fetalnog telećeg seruma (10 % v/v), glutamina i otopine penicilina/streptomicina.

### **3.1.5. Laboratorijsko posuđe i pribor**

Boce od 200 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL

Bürker-Türk Hemocitometar

Epruvete za centrifugiranje od 15 mL i 50 mL, Greiner

Magneti

Mikrocentrifugalne tubice od 1,5 mL i 2 mL, Greiner

Nastavci za pipete, univerzalni (0,1-2, 2-20, 20-200 i 100-1000  $\mu$ L), Gilson

Nastavci za pipete, filter (0,1-2, 2-20, 20-200 i 100-1000  $\mu$ L), Gilson

Odmjerne menzure, tikvice i čaše

Pinceta

Pipete, Eppendorf i Gilson

Pipetori, Gilson

Plastični lijevci i kadice

Ploče za kulturu (6 cm, 10 cm, 15 cm), Greiner

Plastične pipete (2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL), Orange Scientific

Predmetna i pokrovna stakalca

Škare

### **3.1.6. Uređaji**

Centrifuge (rashladne): Eppendorf , Chill Spin, Sorvall

Hladnjaci (+4 °C, −20 °C, −80 °C, −140 °C)

Horizontalna tresilica, Ika

Inkubator, Jouan

Konfokalni mikroskop, LSM 700, Zeiss

Magnetska mješalica, Ika

pH metar, Mettler Toledo

Vodena kupelj, Biosan

Vibracijska mješalica, Ika

## **3.2. METODE**

### **3.2.1. Određivanje kapaciteta sinteze proteina**

Kapacitet za sintezu proteina u fibroblastima iz tkiva kože miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnih miševa određen je pomoću analoga puromicina, O-propagil-puromicin (OPP), Jena Bioscience i fluorescentne boje AF549-azid. Prvi dan stanice su nasadene na 10 cm ploče na koje su prethodno stavljena predmetna stakalca na koja će se adherirati stanice kako bi se stakalca nakon fiksacije stanica mogla koristiti za metodu imunofluorescencije. Spoj cikloheksimid inhibira sintezu proteina te je korišten kao negativna kontrola i dodan je u koncentraciji 50 ug/mL 15 minuta prije dodatka O-propagil-puromicina. O-propagil-

puromicin dodan je na fibroblaste iz tkiva kože u koncentraciji 50 uM tijekom 60 minuta. OPP se ugrađuje u C-terminalni kraj polipeptida u translaciji te na taj način zaustavlja translaciju. Tako obilježene bjelančevine vizualiziraju se inkubacijom s fluorescentnom bojom. Po završetku inkubacije stanica s OPP-om, stanice su oprane dva puta sa PBS-om, a potom su fiksirane hladnim metanolom u trajanju 2 minute na temperaturi -20°C. Po završetku fiksacije stanice su oprane dva puta s TBS puferom te je nakon toga provedena permeabilizacija s TBST otopinom u trajanju 7 minuta nakon čega su stanice oprane dva puta s TBS-om. Po završetku permeabilizacije pripremljena je otopina za vizualizaciju količine ugrađenog OPP-a te su stanice inkubirane sa fluorescentnom bojom tijekom 30 minuta. Komponente otopine u koju se dodaje fluorescentna boja su slijedeće:

u 200 uL PBS-a dodano je 10 uL 2 M Tris pH 8,5, 3 uL 50 mM CuSO<sub>4</sub>, 30 uL 0,5 M Na-askorbata te 2 uL fluorescentne boje alexa 549-azid koncentracije 2mM. Nakon inkubacije s fluorescentnom bojom stanice su oprane dva puta s otopinom TBS-a. Osim toga, dodala sam fluorescentnu boju DAPI koja boji DNK, u trajanju od 5 minuta, u mraku, pri sobnoj temperaturi. Dobiveni fluorescentni signal analizirala sam primjenom konfokalnog mikroskopa LSM 700 (Zeiss).

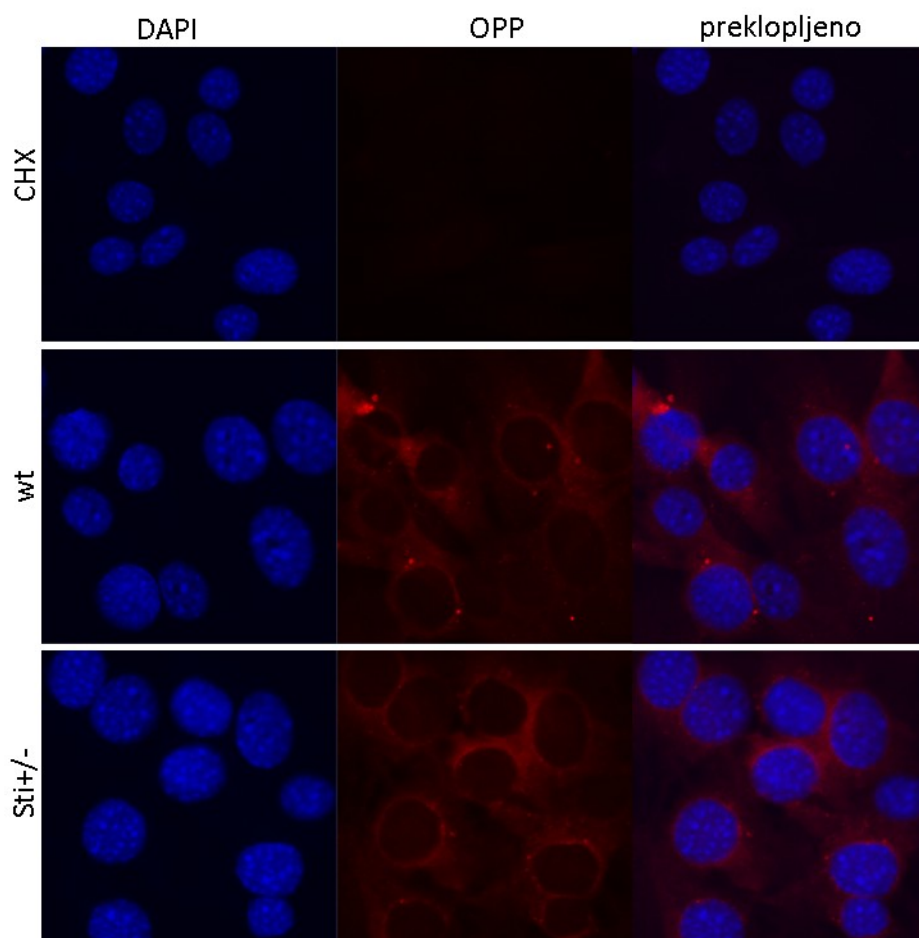
### **3.2.2. Određivanje agregata proteina**

Količina agregata proteina u fibroblastima iz tkiva kože miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnih miševa određena je upotrebom spoja koji veže agregirane proteine. Prvi dan stanice su nasadene na 10 cm ploče na koje su prethodno stavljena predmetna stakalca na koja će se adherirati stanice kako bi se stakalca nakon fiksacije stanica mogla koristiti za metodu imunofluorescencije. Spoj, MG132, koristio se kao pozitivna kontrola jer sprječava

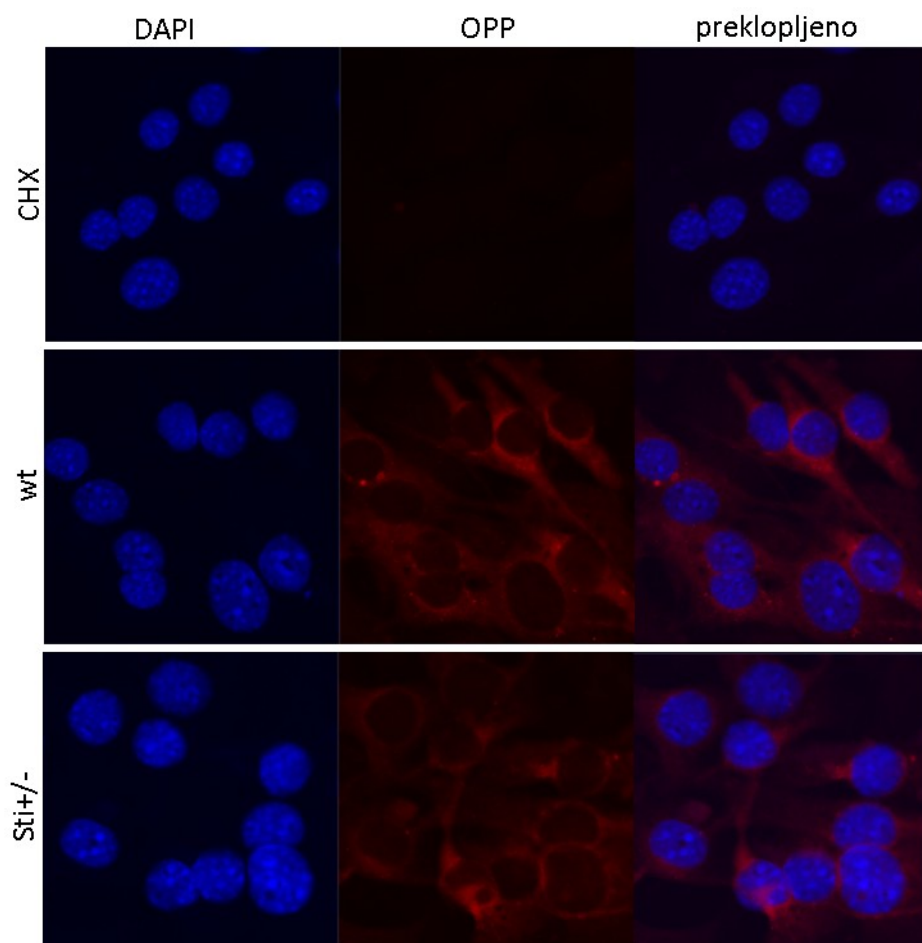
razgradnju proteina u proteasomima i na taj način dovodi do nakupljanja agregiranih proteina, a dodan je u koncentraciji 10 uM tijekom 12 sati. Po završetku inkubacije s MG132 stanice su oprane dva puta s PBS-om, a zatim su fiksirane 4% otopinom paraformaldehida na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Nakon fiksacije stanice su oprane dva puta s PBS-om, a permeabilizacija je provedena na ledu na horizontalnoj tresilici u trajanju od 30 minuta. Po završetku permeabilizacije stanice su oprane dva puta s PBS-om i inkubirane sa spojom koji veže agregirane proteine u trajanju od 30 minuta. Nakon inkubacije sa spojom koji veže agregirane proteine, stanice su oprane dva puta s PBS-om. Osim toga, dodala sam fluorescentnu boju DAPI koja boji DNK, u trajanju od 5 minuta, u mraku, pri sobnoj temperaturi. Dobiveni fluorescentni signal analizirala sam primjenom konfokalnog mikroskopa LSM 700 (Zeiss).

## 4. REZULTATI

*Sti*-heterozigotni miševi, uslijed mutacije enzima alanil-tRNK sintetaze ugrađuju aminokiselinu serin umjesto aminkoiseline alanin u svoje proteine i razvijaju slijedeće patološke fenotipove: ataksija, tremor, gubitak dlake (25). U ovom radu proučavao se utjecaj kvalitativnih promjena, odnosno posljedice mutacije u enzimu alanil-tRNK sintetazi, na homeostazu proteina, a izolirani fibroblasti iz kože *Sti*-heterozigotnih miševa (engl.*sticky*) koristili su kao stanični model za istraživanje. U primarnim fibroblastima izoliranim iz kože miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnih miševa starosti 3 i 6 mjeseci određen je kapacitet sinteze proteina na temelju količine ugrađenog OPP-a, analoga puromicina, u novosintetizirane proteine metodom imunofluorescencije. OPP se ugrađuje u C-terminalni kraj polipeptida u translaciji, na taj način zaustavlja translaciju i tako obilježene bjelančevine vizualiziraju se inkubacijom s fluorescentnom bojom. Na **Slici 8.** prikazan je intenzitet sinteze proteina u miševima divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnim miševima starosti 3 mjeseca, dok je na **Slici 9.** prikazan intenzitet sinteze proteina u miševima divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnim miševima starosti 6 mjeseca. Spoj cikloheksimid inhibira sintezu proteina i koristio se kao negativna kontrola, a na obje slike je vidljivo da je sinteza proteina u potpunosti spriječena u prisutnosti cikloheksimida. Iz rezultata prikazanih na **Slikama 8. i 9.** vidljivo je da nema razlike u intenzitetu sinteze proteina kod miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigonih miševa starosti 3 i 6 mjeseci. Ti rezultati upućuju da uslijed mutacije enzima alanil-tRNK sintetaze nije narušen intenzitet sinteze proteina što ne znači da uslijed te mutacije ne mogu nastati pogreške tijekom sinteze proteina.

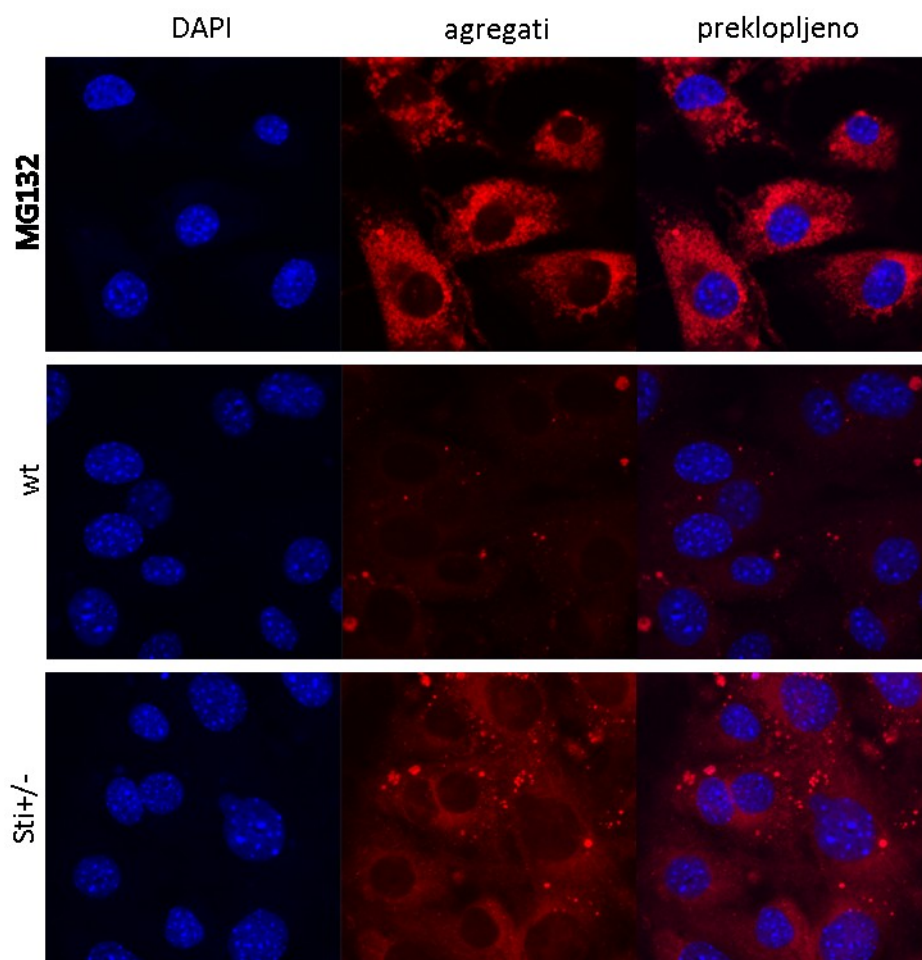


**Slika 8. Kapacitet sinteze proteina u fibroblasima iz tkiva kože miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnih miševa starosti tri mjeseca.** Kapacitet za sintezu proteina u fibroblastima iz tkiva kože određen je pomoću analoga puromicina, O-propagil-puromicin (OPP). OPP je dodan u koncentraciji 50 uM tijekom 60 minuta, a spoj cikloheksimid (CHX), inhibira sintezu proteina i dodan je 15 minuta prije dodatka OPP-a. Fluorescentna boja DAPI boji jezgru i prikazana je plavo, dok se bjelančevine obilježene OPP-om vizualiziraju dodatkom crvene fluorescentne boje. Fluorescentni signali analizirani su konfokalnim mikroskopom.

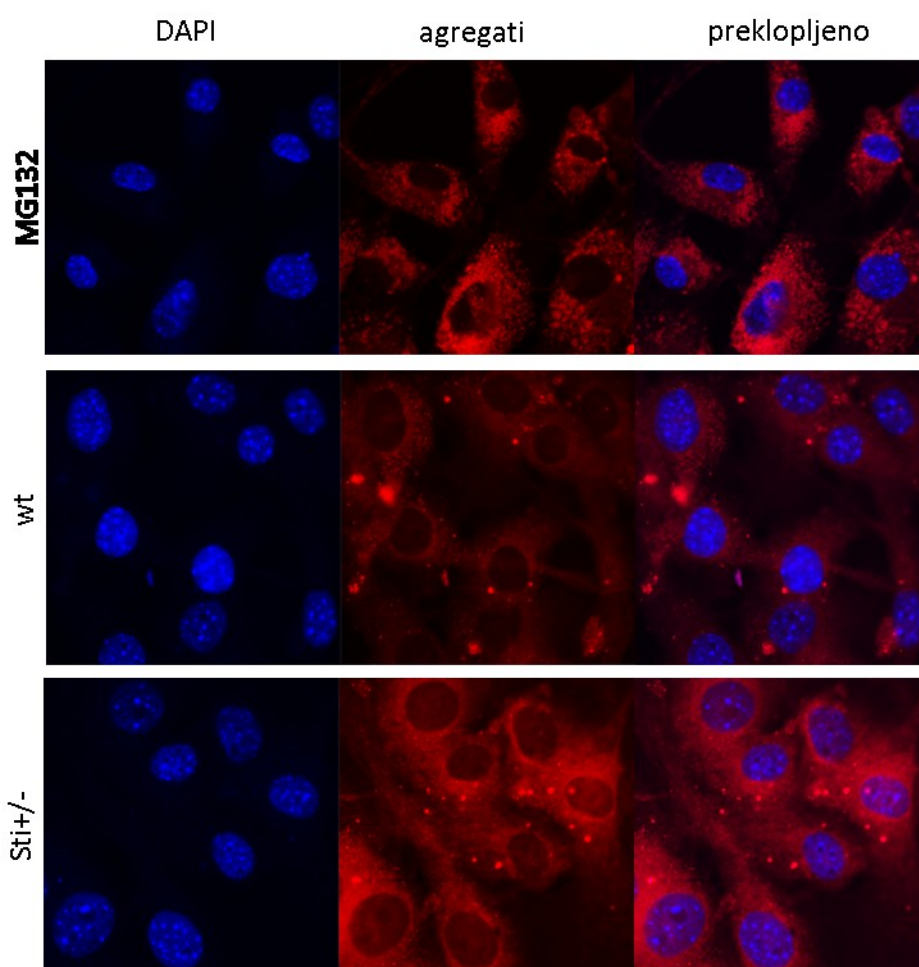


**Slika 9. Kapacitet sinteze proteina u fibroblasima iz tkiva kože miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnih miševa starosti šest mjeseci.** Kapacitet za sintezu proteina u fibroblastima iz tkiva kože određen je pomoću analoga puromicina, O-propagil-puromicin (OPP). OPP je dodan u koncentraciji 50 uM tijekom 60 minuta, a spoj cikloheksimid (CHX), inhibira sintezu proteina i dodan je 15 minuta prije dodatka OPP-a. Fluorescentna boja DAPI boji jezgru i prikazana je plavo, dok se bjelančevine obilježene OPP-om vizualiziraju dodatkom crvene fluorescentne boje. Fluorescentni signali analizirani su konfokalnim mikroskopom.

Poznato je da pogreške u sintezi proteina potiču njihovu agregaciju. Prethodna istraživanja kod *Sti*-heterozigotnih miševa pokazala su da pogrešno prenesene tRNA, odnosno ugradnja serina umjesto alanina, dovodi do nakupljanja nepravilno savijenih proteina koji se nakupljaju kao agregati proteina. Stoga je slijedeći cilj bio odrediti količinu agregata proteina upotrebom spoja koji veže agregirane proteine metodom imunofluorescencije. Na **Slici 10.** prikazani su rezultati nakon mjerenja količine agregiranih proteina u miševima divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnim miševima starosti 3 mjeseca dok su na **Slici 11.** prikazani rezultati nakon mjerenja količine agregiranih proteina u miševima divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnim miševima starosti 6 mjeseca.



**Slika 10. Određivanje agregiranih proteina u fibroblasima iz tkiva kože miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnih miševa starosti tri mjeseca.** Količina agregata proteina određena je upotrebom spoja koji veže agregirane proteine metodom imunofluorescencije. Spoj MG132, inhibitor proteasoma, dodan je u koncentraciji 10 uM tijekom 12 sati. Fluorecentna boja, DAPI, boji jezgu i prikazana je plavom bojom dok su agregirani proteini prikazani crvenom bojom. Fluorescentni signali analizirani su konfokalnim mikroskopom.



**Slika 11. Određivanje agregiranih proteina u fibroblasima iz tkiva kože miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnih miševa starosti šest mjeseci.** Količina agregata proteina određena

je upotrebom spoja koji veže agregirane proteine metodom imunofluorescencije. Spoj MG132, inhibitor proteasoma, dodan je u koncentraciji 10 uM tijekom 12 sati. Fluorecentna boja, DAPI, boji jezgu i prikazana je plavom bojom dok su agregirani proteini prikazani crvenom bojom. Fluorescentni signali analizirani su konfokalnim mikroskopom.

Spoj MG132 dovodi do nakupljanja agregiranih proteina jer sprječava razgradnju proteina u proteasomima te se koristio se kao pozitivna kontrola. Na obje slike, **Slika 10. i 11.**, vidljivo je da MG132 dovodi do nakupljanja agregata proteina. Iz rezultata prikazanih na **Slici 10.** vidljivo je da je veća količina agregiranih proteina u fibroblastima izoliranim iz tkiva kože *Sti*-heterozigotnih miševa starosti 3 mjeseca u odnosu na miševe divljeg tipa. Isto tako, iz rezultata prikazanih na **Slici 11.** vidljivo je, da je također veća količina agregiranih proteina u fibroblastima izoliranim iz tkiva kože *Sti*-heterozigotnih miševa starosti 6 mjeseci u odnosu na miševe divljeg tipa iste starosti. Rezultati prikazani na **Slikama 10. i 11.** potvrđuju prethodno objavljene rezultate koji su pokazali da uslijed mutacije u enzimu alanil-tRNK sintetazi dolazi do nakupljanja agregata proteina. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da uslijed pogrešaka u sintezi proteina dolazi do narušavanja homeostaze proteina.

## 5. RASPRAVA

Prethodna istraživanja kod *Sti*-heterozigotnih miševa pokazala su da u neuronima dolazi do unutarstaničnog nakupljanja pogrešno savijenih proteina gdje se nakupljanju kao agregati proteina uslijed mutacije enzima alanil-tRNK sintetaze. Osim toga, pokazano je da se šaperoni, proteini pratioci, kolokaliziraju s agregiranim proteinima. Nakupljanja agregata proteina toksično je za stanicu stoga je od velike važnosti pratiti molekularne promjene koje se događaju tijekom narušavanja homeostaze proteina u tim uvjetima. Budući da se vrlo malo zna o kinetici poremećaja homeostaze proteina u ovom radu odlučila sam karakterizirati poremećaje homeostaze proteina u primarnim fibroblastima kože izoliranim iz divljeg tipa miševa C57BL/6 na specifičnim stadijima njihovog postnatalnog životnog ciklusa te ih usporediti s poremećajima homeostaze proteina u *Sti*-heterozigotnim miševima, koji uslijed mutacije enzima alanil-tRNA sintetaze ugrađuju aminokiselinu serin umjesto alanina u svoje proteine.

U primarnim fibroblastima izoliranim iz kože miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnih miševa starosti 3 i 6 mjeseci određen je kapacitet sinteze proteina na temelju količine ugrađenog OPP-a, a dobiveni rezultati ukazuju da nema razlike u intenzitetu sinteze proteina na ovim stadijima njihovog posnatalnog životnog ciklusa. Bilo bi zanimljivo testirati hoće li na specifičnim stadijima starenja (9, 12 i 18 mjeseci) postojati razlika u sintezi proteina između miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnih miševa. Može se pretpostaviti da u stanici postoji kontrolni mehanizam, koji će u tim kasnijim stadijima njihovog posnatalnog životnog ciklusa, usporiti sintezu proteina u *Sti*-heterozigotnim miševa kako bi se sprječila sinteza proteina s pogreškama.

S obzirom da već postoje saznanja da se pogrešno savijeni proteini nakupljanju kao agregati proteina, odredila sam količinu agregiranih proteina u fibroblastima izoliranim iz kože miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnih miševa starosti 3 i 6 mjeseci. Dobiveni rezultati pokazuju da se kod *Sti*-heterozigotnih miševa starosti 3 i 6 mjeseci nakuplja veća količina agregata proteina u usporedbi s miševima divljeg tipa. Ti rezultati ukazuju da uslijed pogrešaka u sintezi proteina dolazi do narušavanja homeostaze proteina.

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. Međutim, na temelju dobivenih rezultata koji pokazuju da u kasnijim stadijima životnog ciklusa dolazi do nakupljanja veće količine agregiranih proteina, može se pretpostaviti da i nakupljanje agregata proteina doprinosi ubrzanom starenju sisavaca i razvoju bolesti povezanim sa starenjem. Osim toga, bilo bi vrlo zanimljivo pratiti kinetiku poremećaja homeostaze proteina u ovom staničnom modelu u kasnijim stadijima njihovog životnog ciklusa kako bi se dobio uvid u nove mehanizme koji dovode do narušavanja homeostaze proteina.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Nema razlike u kapacitetu sinteze proteina u fibroblasima iz tkiva kože miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnih miševa starosti tri mjeseca.
2. Nema razlike u kapacitetu sinteze proteina u fibroblasima iz tkiva kože miševa divljeg tipa i *Sti*-heterozigotnih miševa starosti šest mjeseci.
3. Količina agregiranih proteina veća je u fibroblastima izoliranim iz tkiva kože *Sti*-heterozigotnih miševa u odnosu na miševe divljeg tipa starosti 3 mjeseca.
4. Količina agregiranih proteina veća je u fibroblastima izoliranim iz tkiva kože *Sti*-heterozigotnih miševa u odnosu na miševe divljeg tipa starosti 6 mjeseca.
5. Pogreške u sintezi proteina, uslijed mutacije enzima alanil-tRNK sintetaze, u fibroblastima izoliranim iz tkiva kože *Sti*-heterozigotnih miševa dovode do nakupljanja agregiranih proteina.

## 7. LITERATURA

1. Volarević S, Thomas G., Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;65:101-27.
2. Warner JR, Nascent ribosomes, *Cell.* 2001 Oct 19;107(2):133-6.
3. <https://www.britannica.com/science/protein/Conformation-of-proteins-in-interfaces>
4. Peter Karlson, Biokemija, Udžbenik za studente tehnološkog, prehrambeno-tehnološkog, biotehnološkog, prirodoslovnog-matematičkog, medicinskog i farmaceutskog-biokemijskog fakulteta, 8.izdanje, Školsko knjiga, Zagreb, 1993.
5. Fromont-Racine M., Senger B., Saveanu C., Fasiolo F., Ribosome assembly in eukaryotes, *Gene.* 2003 Aug 14;313:17-42.
6. Robledo S., Idol RA, Crimmins DL, Ladenson JH, Mason PJ, Bessler M., The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production, *RNA.* 2008 Sep;14(9):1918-29. doi: 10.1261/rna.1132008. Epub 2008 Aug 12.
7. Nazar RN, Ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in eukaryotes, *IUBMB Life.* 2004 Aug;56(8):457-65.
8. Maciej Szymański, Marzanna Deniziak and Jan Barciszewski, The new aspects of aminoacyl-tRNA synthetases, Review, Institute of Bioorganic Chemistry of the Polish Academy of Sciences, 60-704 Poznań, Poland Received: 29 December, 1999; revised: 24 May, 2000; accepted: 02 June, 2000
9. Maciej Szymanski and Jan Barciszewski, Aminoacyl-tRNA synthetases database Y2K, *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1; 28(1): 326–328.
10. [https://www.pmf.unizg.hr/\\_download/repository/14obk-p37-p38-Sinteza\\_proteina.pdf](https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/14obk-p37-p38-Sinteza_proteina.pdf)
11. Ibba M., Curnow AW, Söll D., Aminoacyl-tRNA synthesis: divergent routes to a common goal, *Trends Biochem Sci.* 1997 Feb;22(2):39-42.

12. Rongzhong Li, Lindsay M. Macnamara, Jessica D. Leuchter, Rebecca W. Alexander and Samuel S. Cho, MD Simulations of tRNA and Aminoacyl-tRNA Synthetases: Dynamics, Folding, Binding, and Allostery, *Int. J. Mol. Sci.* 2015, *16*(7), 15872-15902;
13. Eugene V. Koonin and L. Aravind, Genomics: Re-evaluation of translation machinery evolution, *Current Biology* 1998, *8*:R266–R269
14. <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-molecular-genetics/hs-rna-and-protein-synthesis/a/hs-rna-and-protein-synthesis-review>
15. Kurt Fredrick and Michael Ibba, Protein synthesis, Errors rectified in retrospect, *Nature*. 2009 Jan 8; *457*(7226): 157–158.
16. <https://www.thoughtco.com/protein-synthesis-translation-373400>
17. <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-are-Chaperone-Proteins.aspx>
18. Oikawa D., Kimata Y., Kohno K., Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor, Ire 1. *J Cell Sci* 2007; *120*: 1681-1688.
19. Barral JM, Broadley SA, Schaffar G, Hartl FU., Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases, *Semin Cell Dev Biol.* 2004 Feb;*15*(1):17-29.
20. Robert K. Murray David A. Bender Kathleen M. Botham Peter J. Kennelly Victor W. Rodwell P. Anthony Weil, Harperova ilustrirana biokemija, 28.izdanje, Medicinska naklada
21. Kampinga HH, Craig EA., The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Aug;*11*(8):579-92.
22. Zuiderweg ER, Bertelsen EB, Rousaki A, Mayer MP, Gestwicki JE, Ahmad A., Allostery in the Hsp70 chaperone proteins, *Top Curr Chem.* 2013;*328*:99-153.

23. Robert K. Murray David A. Bender Kathleen M. Botham Peter J. Kennelly Victor W. Rodwell P. Anthony Weil, Harperova ilustrirana biokemija, 28.izdanje, Medicinska naklada
24. <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-are-Chaperone-Proteins.aspx>
25. Jeong Woong Lee, Kirk Beebe, Leslie A. Nangle, Jaeseon Jang, Chantal M. Longo-Guess, Susan A. Cook, Muriel T. Davisson, John P. Sundberg, Paul Schimmel & Susan L. Ackerman, Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration, *Nature* volume 443, pages 50–55 (2006)
26. <https://www.jax.org/strain/002560>
27. Jiqiang Ling, Hervé Roy, and Michael Ibba, Mechanism of tRNA-dependent editing in translational quality control, PNAS January 2, 2007 104 (1) 72-77
28. Amita Vaidya, Vera Gorbunova, Establishing Primary Adult Fibroblast Cultures From Rodents Andrei Seluanov, Journal of Visualized Experiments, 2010.

## ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Dora Majnarić

Datum rođenja: 10. kolovoz 1997.

Mjesto rođenja: Rijeka

Državljanstvo: Hrvatsko

Narodnost: Hrvatica

Adresa: Franje Čandeka 23b, 51000 Rijeka

Telefon: +385 91 2555 899

E-mail: [doramajnaric7@gmail.com](mailto:doramajnaric7@gmail.com)

Obrazovanje:

2004.-2008. Osnovna škola - Scuola elementare Gelsi, Rijeka

2008.-2012. Osnovna škola Podmurvice, Rijeka

2012.-2016. Prva riječka hrvatska gimnazija

2016.-2019. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Prediplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva

Vještine:

Strani jezici: engleski i talijanski jezik

Vozačka dozvola: B kategorija