

# Razvoj monoklonskih protutijela i upotreba transfeciranih staničnih linija za proučavanje biologije proteina PrPC (prion protein cellular)

---

Mihalić, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:444795>

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

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

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

*Andrea Mihalić*

*Razvoj monoklonskih protutijela i upotreba transfeciranih staničnih  
linija za proučavanje biologije staničnog prionskog proteina PrP<sup>C</sup>*

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

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

*Andrea Mihalić*

*Razvoj monoklonskih protutijela i upotreba transfeciranih staničnih  
linija za proučavanje biologije staničnog prionskog proteina PrP<sup>C</sup>*

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: *dr.sc. Tihana Lenac Roviš*

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
Master's program  
Biotechnology in medicine

*Andrea Mihalić*

*Development and validation of monoclonal antibodies and  
transfected cells to monitor biological activities of prion protein  
cellular PrP<sup>C</sup>*

Master's thesis

Rijeka, 2019.

Diplomski rad obranjen je dana 23.07.2019., u 10:00 h

Pred povjerenstvom:

1. dr.sc. Antonija Jurak Begonja (predsjednik povjerenstva)
2. dr.sc. Jelena Ban
3. dr.sc. Tihana Lenac Roviš (mentor rada)

Rad ima **64** stranica, **13** slika, **7** tablica, i **31** literaturnih navoda.

## Sažetak

Stanični prionski protein (engl. **Prion Protein Cellular, PrP<sup>C</sup>**) je sastavni dio različitih tkiva pri čemu je njegova fiziološka uloga i dalje predmet debate. Unutar stanice se može pronaći u više formi - citoplazmatskoj, transmembranskoj te formi koja je putem glikozilfosfatidilinozitolnog sidra pričvršćena na membranu, pri čemu je posljednja forma najraširenija. Pojedine forme proteina utvrđene su u gotovo svim odjeljcima stanice, što uključuje plazmatsku membranu, endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat, endosome, pojedine vezikule te citoplazmu. Dodatnu kompleksnost u izučavanju biologije ovog proteina unose glikoforme, odnosno različite šećerne modifikacije, kojih ima nekoliko. Monoklonska protutijela, koja uspješno detektiraju različite molekule PrP<sup>C</sup> unutar stanice te omogućavaju praćenje pojedinih specifičnih (gliko)formi i određivanje njihova interaktoma, nezamjenjiv su alat u istraživanju biološke uloge PrP<sup>C</sup>. Ovim radom se utvrđivala djelotvornost novo-proizvedenih monoklonskih protutijela, u formi supernatanta, na sposobnost prepoznavanja mišjeg i humanog PrP<sup>C</sup> u metodama Western blot/imunoblot, imunofluorescentnoj mikroskopiji te protočnoj citometriji. Svi pokusi su rađeni na staničnim linijama mišjeg glioma GL261, mišjih embrionalnih fibroblasta MEF, mišjeg limfoma BW i transfektanti BW-PrP te na humanoj staničnoj liniji adenokarcinoma alveolarnih bazalnih epitelnih stanica A549, kao prikladnim staničnim modelima za ispitivanje PrP<sup>C</sup> i validacije monoklonskih protutijela na sposobnost prepoznavanja PrP<sup>C</sup> unutar stanice. Protutijela HuPrP.01, HuPrP.02 te HuPrP.04 su pokazala najveći potencijal u prepoznavanju humanog PrP<sup>C</sup> dok se u prepoznavanju mišjeg PrP<sup>C</sup> najboljim kandidatom pokazalo protutijelo MoPrP.03. Ova protutijela imaju potencijal za daljnji razvoj, koji će započeti proizvodnjom koncentriranih pripravaka poznate koncentracije protutijela putem pročišćavanja ispitanih supernatanata. Zanimljivo je kako je jedno od protutijela na humani PrP<sup>C</sup>, protutijelo 1G8, detektiralo PrP<sup>C</sup> putem imunofluorescentne mikroskopije u području membrane jezgre, gdje isti protein još do sada nije opisan. Zaključno, na temelju ukupnih rezultata prikupljenih različitim metodama, utvrdili smo koja novo-proizvedena protutijela vrijedi dalje razvijati, pročišćavati i validirati te koristiti u budućim istraživanjima bioloških uloga PrP<sup>C</sup>.

**Ključne riječi:** Stanični prionski protein, PrP<sup>C</sup>, monoklonska protutijela

## **Abstract**

PrP<sup>C</sup> is an integral part of different tissues, and its physiological role remains the subject of debate. Within the cell, this protein can be found in several forms, including a cytoplasmic form and a transmembrane form. However, the most widespread form is one that is attached to the membrane through a glycosylphosphatidylinositol anchor. Certain protein forms have been found in almost all cell compartments including the plasma membrane, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, endosomes and other vesicles, as well as the cytoplasm. An additional level of complexity in the study of the biology of this protein is its glycoprofile, or different sugar modifications, of which there are several. Monoclonal antibodies that successfully detect different PrP<sup>C</sup> molecules within cells also enable the monitoring of specific forms of PrP<sup>C</sup> (glyco)forms and determination of the PrP<sup>C</sup> interactome. The present study determined the efficacy of newly-produced monoclonal antibodies to recognize mouse and human PrP<sup>C</sup> in Western blotting/immunoblotting, immunofluorescence microscopy, and flow cytometry. Antibodies HuPrP.01, HuPrP.02 and HuPrP.04 showed the greatest potential for recognition of human PrP<sup>C</sup>, while the antibody MoPrP.03 showed best capability in recognition of mouse PrP<sup>C</sup>. These antibodies have the potential for further development, which will start by the production of concentrated preparations of known antibody concentrations by purifying the supernatants that were tested. Interestingly, one of the anti-HuPrP antibodies, 1G8, detected immunofluorescence signal around the nucleus membrane, where the PrP<sup>C</sup> localization has not been previously described. Based on the obtained results, we have determined which newly-produced antibodies are candidates for further development, purification and validation, and can be used in future research of the biological role of PrP<sup>C</sup>.

**Key words:** Prion cellular protein, PrP<sup>C</sup>, monoclonal antibodies

## Sadržaj

|                                                                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. UVOD .....</b>                                                                                                    | <b>9</b>  |
| 1.1. Stanični prionski protein (engl. PrP <sup>C</sup> , <i>Prion cellular protein</i> ).....                           | 9         |
| 1.2. Struktura, stanična biologija i ispoljavanje PrP <sup>C</sup> .....                                                | 9         |
| 1.2.1. Struktura PrP <sup>C</sup> .....                                                                                 | 9         |
| 1.2.2. Ispoljavanje PrP <sup>C</sup> .....                                                                              | 11        |
| 1.2.3. Unutarstanični transport.....                                                                                    | 12        |
| 1.2.4. Glikozilacija PrP <sup>C</sup> .....                                                                             | 13        |
| 1.3. Uloga PrP <sup>C</sup> u neurodegenerativnim bolestima.....                                                        | 14        |
| 1.4. Fiziološke funkcije proteina PrP <sup>C</sup> .....                                                                | 15        |
| 1.4.1. PrP <sup>C</sup> interaktom.....                                                                                 | 16        |
| 1.4.2. Uloga PrP <sup>C</sup> u živčanom sustavu .....                                                                  | 17        |
| 1.4.3. Uloga PrP <sup>C</sup> u staničnom ciklusu i signalizaciji.....                                                  | 17        |
| 1.4.4. Imunološka uloga PrP <sup>C</sup> .....                                                                          | 18        |
| 1.5. Stanične kulture za proučavanje biološke funkcije PrP <sup>C</sup> .....                                           | 19        |
| 1.6. Dizajn monoklonskih protutijela .....                                                                              | 20        |
| 1.7. Imunološke analize PrP <sup>C</sup> .....                                                                          | 21        |
| 1.7.1. Imunoenzimski test (ELISA, engl. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> ).....                                 | 22        |
| 1.7.2. Imunofluorescencija i konfokalna mikroskopija .....                                                              | 23        |
| 1.7.3. Protočna citometrija .....                                                                                       | 23        |
| <b>2. Ciljevi rada.....</b>                                                                                             | <b>25</b> |
| <b>3. Materijali i metode .....</b>                                                                                     | <b>26</b> |
| 3.1. Stanične linije .....                                                                                              | 26        |
| 3.2. Odmrzavanje i uzgoj stanica .....                                                                                  | 26        |
| 3.3. Priprema staničnih lizata .....                                                                                    | 27        |
| 3.4. Proizvodnja monoklonskih protutijela.....                                                                          | 27        |
| 3.5. ELISA .....                                                                                                        | 28        |
| 3.6. Imunofluorescencija i konfokalna mikroskopija.....                                                                 | 29        |
| 3.6.1. GL261 stanice .....                                                                                              | 29        |
| 3.6.2. A549 stanice .....                                                                                               | 30        |
| 3.7. SDS- PAGE elektroforeza i Western blot.....                                                                        | 30        |
| 3.7.1. Detekcija pročišćenih rekombinantnih proteina PrP <sup>C</sup> , MoPrP i HuPrP, monoklonskim protutijelima ..... | 30        |
| 3.7.2. SDS-PAGE elektroforeza i Western blot/Imunoblot na staničnim lizatima .....                                      | 31        |



|                                                                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.8. Protočna citometrija .....                                                                                                                      | 32        |
| <b>4. Rezultati .....</b>                                                                                                                            | <b>34</b> |
| 4.1. Početni probir anti-PrP <sup>C</sup> monoklonskih protutijela .....                                                                             | 34        |
| 4.1.1. ELISA test supernatanata na prisustvo anti-PrP <sup>C</sup> monoklonskih protutijela .....                                                    | 34        |
| 4.1.2. Western blot/Imunoblot test supernatanata na prisustvo anti-PrP <sup>C</sup> monoklonskih protutijela .....                                   | 35        |
| 4.2. Razvoj MoPrP i HuPrP protutijela .....                                                                                                          | 36        |
| 4.2.1. MoPrP monoklonska protutijela .....                                                                                                           | 36        |
| 4.2.2. HuPrP monoklonska protutijela .....                                                                                                           | 39        |
| 4.3. Primjenjivost razvijenih monoklonskih protutijela koja prepoznaju rekombinantne proteine za detekciju prirodnog proteina PrP <sup>C</sup> ..... | 40        |
| 4.3.1. Primjenjivost razvijenih MoPrP-protutijela za Western blot/Imunoblot analize na staničnim lizatima .....                                      | 40        |
| 4.3.2. Primjenjivost razvijenih HuPrP-protutijela za Western blot/Imunoblot analize na staničnim lizatima .....                                      | 41        |
| 4.3.3. Primjenjivost razvijenih protutijela za imunofluorescentnu analizu proteina PrP <sup>C</sup> na stanicama .....                               | 42        |
| 4.3.4. Primjenjivost razvijenih protutijela za analizu proteina PrP <sup>C</sup> protočnom citometrijom .....                                        | 47        |
| <b>5. Rasprava .....</b>                                                                                                                             | <b>52</b> |
| <b>6. Zaključak .....</b>                                                                                                                            | <b>59</b> |
| <b>7. Literatura .....</b>                                                                                                                           | <b>61</b> |
| <b>8. Životopis .....</b>                                                                                                                            | <b>64</b> |

## 1. UVOD

### 1.1. Stanični prionski protein (engl. PrP<sup>C</sup>, **Prion cellular protein**)

Stanični prionski protein (**PrP<sup>C</sup>**, engl. **Prion cellular protein**) je protein kojeg posjeduju stanice različitih organa i tkiva, s naročito visokom razinom ispoljavanja u središnjem i perifernom živčanom sustavu (1). PrP<sup>C</sup> ima važnu ulogu u patogenezi prionskih bolesti, odnosno prijenosnih spongiformnih encefalopatija (TSE, engl. **Transmissible spongiform encephalopathies**) koje uzrokuju teške neurodegenerativne poremećaje. Međutim, normalna, fiziološka uloga i funkcija proteina ostaje nerazjašnjena (2). Zanimljivo je kako PrP<sup>C</sup> sadrži evolucijski visoko konzervirane regije u sisavaca, što ukazuje na njegov potencijalno veliki fiziološki značaj (1). Obzirom da je riječ o jedinom do sada poznatom proteinu čija patološka forma može biti zarazna, PrP<sup>C</sup> je među najintenzivnije istraživanim proteinima te su njegova kemijska svojstva mnogo bolje poznata nego same biološke funkcije (3). Pojavljuje se u mnogo izoformi te je pokazano da stupa u interakciju s velikim brojem partnera (4).

### 1.2. Struktura, stanična biologija i ispoljavanje PrP<sup>C</sup>

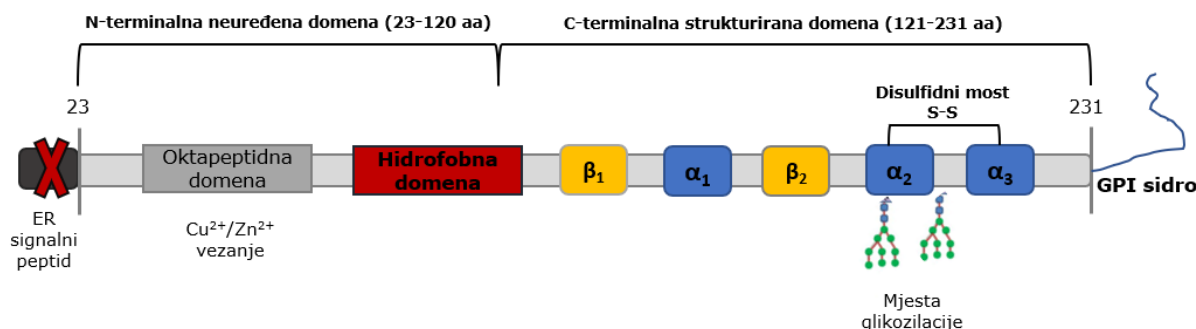
#### 1.2.1. Struktura PrP<sup>C</sup>

PrP<sup>C</sup> je glikoprotein koji se sastoji od 209 aminokiselina, veličinom se kreće između 20 i 40 kDa, a kodiran je *Prnp* (engl. **Prion protein**) genom (4). *Prnp* gen je evolucijski visoko konzerviran među vrstama, kod ljudi se nalazi na 20. kromosomu (p krak), a kod miša na 2. kromosomu. Gen se sastoji od tri egzona, od kojih zadnji egzon sadrži čitavi otvoreni okvir čitanja konačnog, zrelog proteina (ORF, engl. **Open reading frame**) (5). Sam protein se sastoji od N-terminalne, nestrukturirane, fleksibilne domene i C-terminalne, globularne domene, koja je visoko konzervirana. N-terminal kraj se sastoji od: endoretikularnog prijenosnog signalnog peptida (ERSP, engl. **Endoreticular transfer signal peptid**) koji se tijekom maturacije/sazrijevanja proteina uklanja u lumenu endoplazmatskog

retikula; zatim okta-ponavljajućih regija bogatih glicinom i histidinom koji su važni za vezanje divalentnog iona bakra ili cinka; te dvije regije heksapeptida i hidrofobne domene (*Slika 1.*) (1). Pretpostavlja se kako su okta-ponavljajući slijedovi, okruženi pozitivno nabijenim aminokiselinama, takozvanim nabijenim klasterima CC1 i CC2 (engl. *charge cluster*), važni za transport izvanstaničnog iona bakra u endosomalne odjeljke u stanici (6). C- terminalni globularni dio PrP<sup>C</sup> se većinski sastoji od α-uzvojnica (43%), dok samo mali dio proteina čine β-ploče (3%). Uzvojnice α2 i α3 povezane su disulfidnim mostom (*Slika 1.*). Na kraju C-terminalne domene nalazi se glikozilfosfatidilinozitolno sidro (GPI, engl. ***Glycosyl-phosphatidyl-inositol***), koje služi kako bi se PrP<sup>C</sup> učvrstilo za membranu stanice (4). Uzvodno od GPI sidra nalaze se i dva mjesta za N-glikozilaciju (vezivanje šećera na proteinsku okosnicu putem aminokiseline asparagina). Nakon transporta na površinu stanice, PrP<sup>C</sup> se zadržava u lipidnim splavima (engl. *Lipid rafts*). Osim glikozilacije, stvaranja disulfidnih mostova i GPI sidra, važni događaji post-translacijskog dorađivanja su proteolitička cijepanja, odnosno procesuiranje prekursorskog PrP<sup>C</sup> proteina pomoću α-, β- te γ-cijepanja (1). Naime, PrP<sup>C</sup> se sintetizira kao prekursorski protein veličine 253 aminokiselina. Prvih 22 aminokiselina se cijepa nakon translacije, dok se zadnjih 23 aminokiselina cijepa neposredno prije dodatka GPI sidra na Ser230 (7). Navedena cijepanja bi mogla biti vrlo bitna za fiziološku, ali i patološku ulogu PrP<sup>C</sup>. Obitelj ADAM enzima (engl. ***a disintegrin and metalloproteinase***) se smatra odgovornom za PrP<sup>C</sup> cijepanja (1).

Strukturne analize N-terminalne fleksibilne domene PrP<sup>C</sup> su ukazale na prisustvo intrinzički neuređene domene (IDR, engl. ***Intrinsically disordered domain***), koja omogućuje interakciju PrP<sup>C</sup> sa širokim spektrom različitih supstrata, kao što su transkripcijski faktori, proteini skela (engl. *scaffold proteins*) i signalne molekule zbog čega se pretpostavlja da su upravo te domene zaslužne za sudjelovanje PrP<sup>C</sup> u raznim fiziološkim funkcijama. Sukladno tome, uočeno je kako je N-terminalna domena genetski raznovrsnija u odnosu na visoko konzerviranu C-terminalnu domenu. Mnogi

proteini ispoljeni na stanicama sustava prirodene imunosti i virusni proteini su također bogati IDR regijama, što bi moglo posredovati njihovu interakciju s PrP<sup>C</sup> i objasniti njegovu ulogu u infekciji i imunološkom sustavu koja je nedavno uočena i predmet je novijih istraživanja (4).



**Slika 1. Strukturna organizacija PrP<sup>C</sup>.** Na početku N-terminalnog dijela nalazi se ER signalni peptid, koji nakon sinteze usmjerava PrP<sup>C</sup> u ER i potom se uklanja. N-terminalni dio (23-120 aminokiseline) se sastoji od okta-ponavljajućih slijedova i hidrofobne domene, dok se C-terminalni dio (121-231 aminokiseline) sastoji od 2x $\beta$  ploče i 3x $\alpha$  uzvojnice, od kojih su  $\alpha_2$  i  $\alpha_3$  povezane disulfidnim mostom te se tamo nalaze dva mjesta za N-glikozilaciju. Na kraju C-terminalne domene nalazi se GPI sidro. Slika napravljena po uzoru na i) Acevedo-Morantes CY, Wille H. The Structure of Human Prions: From Biology to Structural Models — Considerations and Pitfalls. *Viruses* 2014; **6**: 3875 te ii) Watts JC, Bourkas MEC, Arshad H. The function of the cellular prion protein in health and disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 2018; **135**: 159–178 (8).

### 1.2.2. Ispoljavanje PrP<sup>C</sup>

PrP<sup>C</sup> je ubikvitirano ispoljen, odnosno može ga se naći na različitim tkivima, primjerice u živčanom sustavu, imunološkom i limforetikularnom sustavu, reproduktivnom te intestinalnom sustavu (5). Najviše ga sadrže stanice središnjeg i perifernog živčanog sustava. U reproduktivnom sustavu je pronađen u testisima, uterusu i ovariju. Također se može naći na endotelnim stanicama, neuronskim i ostalim vrstama matičnih stanica, kao što su CD34<sup>+</sup> hematopoetske matične stanice (HSC, engl. *Hematopoietic stem cell*) gdje doprinosi njihovom jedinstvenom svojstvu samo-obnavljanja (4). Na potencijalnu važnost PrP<sup>C</sup> u imunološkom sustavu

ukazuje njegovo ispoljavanje na stanicama imunološkog sustava. Tijekom diferencijacije HSC u limfoidnu ili mijeloidnu staničnu liniju, održava se razina ispoljavanja PrP<sup>C</sup> na površini stanica, dok se tijekom sazrijevanja granulocita smanjuje razina PrP<sup>C</sup>. T-limfociti, i to posebice kada su aktivirani, te NK-stanice imunskog sustava ispoljavaju visoku razinu PrP<sup>C</sup>, dok se na B-limfocitima nalazi u tragovima (4). Također, CD8<sup>+</sup> T-limfociti sadrže više PrP<sup>C</sup> u odnosu na CD4<sup>+</sup>. CD45RO<sup>+</sup> memorijski T-limfociti također izražavaju veće količine PrP<sup>C</sup> u odnosu na naivne. Općenito, PrP<sup>C</sup> se nalazi u većoj količini na površini zrelih stanica imunološkog sustava u odnosu na naivne stanice, uz određena odstupanja (4). Također je ispoljen kod zrelih monocita i dendritičkih stanica, trombocita i folikularnih dendritičkih stanica (2). Na *Prnp* genu su pronađena vezna mjesta za niz transkripcijskih faktora, kao što su NFAT (engl. **N**uclear **f**actor of **a**ctivated **T**-cells) i NF-IL-6 (engl. **N**uclear **f**actor for **i**nterleukine **6**), važnih za imunološki odgovor čime sam tijekom imunološkog odgovora može utjecati na povećanje razine PrP<sup>C</sup> (2).

### 1.2.3. Unutarstanični transport

PrP<sup>C</sup> se nakon sinteze translocira na endoplazmatski retikulum (ER) pomoću N-terminalnog signalnog peptida, otkuda putuje kroz Golgijev aparat. Nakon translokacije u ER, PrP<sup>C</sup> se sintetizira u barem tri sekretorne forme, što je glavni put sinteze PrP<sup>C</sup>. Pri tome nastaju COOH-(<sup>ctm</sup> PrP<sup>C</sup>), NH<sub>2</sub>-(<sup>ntm</sup> PrP<sup>C</sup>) transmembranske forme i, dominantno prisutna, GPI-usidrena forma. GPI sidro se dodaje u ER-u, nakon uklanjanja COOH-terminalnog signalnog peptida. GPI-PrP<sup>C</sup> je najprisutniji i najbolje izučen PrP<sup>C</sup> protein, dok je transmembranskim formama PrP<sup>C</sup> i dalje nepoznata fiziološka uloga (9). Većina GPI-usidrene forme PrP<sup>C</sup> nalazi se u lipidnim splavima, odnosno membranskim domenama bogatim kolesterolom i sfingolipidima, područjima membrane koja su bitna za stanične procese, protein-protein i protein-lipid interakcije. Lipidne splavi su uključene u proces invazije patogena, staničnu signalizaciju te sortiranje proteina i lipida. S obzirom da je PrP<sup>C</sup> sastavni dio takvih membranskih domena, smatra se da utječe i

sudjeluje u navedenim procesima. Također se smatra kako lipidne splavi utječu na raspodjelu zrelog PrP<sup>C</sup> na različitim područjima plazmatske membrane. Osim što se nalazi na membrani, PrP<sup>C</sup> se može pronaći i u solubilnom obliku u citosolu, međutim nije u potpunosti razjašnjeno zbog čega se PrP<sup>C</sup> zadržava u citosolu. Također se zadržava u ostalim unutarstaničnim odjeljcima. U Golgiju se odvijaju post-translacijske modifikacije proteina, kao što je N-glikozilacija na asparaginu, formiranje disulfidnih mostova i završna obrada GPI sidra na C- kraju proteina (5). Osim kolokalizacije s ER i Golgijem, istraživanja su pokazala kako se PrP<sup>C</sup> zadržava u endosomalnim odjeljcima i vezikulama te perinuklearnom prostoru, ovisno o uvjetima unutar stanice (9). Pokazano je kako PrP<sup>C</sup> kolokalizira s Rab5<sup>+</sup>, što dokazuje njegovu akumulaciju u ranim endosomima. Također je pokazano kako unutarstanični transport PrP<sup>C</sup> nije identičan kao kod ostalih GPI-usidrenih proteina te kako PrP<sup>C</sup> očito posjeduje vlastite specifične signale neovisne o GPI (10). Istraživanja su pokazala kolokalizaciju PrP<sup>C</sup> i kaveolina, te se pretpostavlja kako PrP<sup>C</sup> podliježe endocitozi posredovanoj kaveolinom (9,10).

#### 1.2.4. Glikozilacija PrP<sup>C</sup>

PrP<sup>C</sup> je prisutan u različitim varijantama s obzirom na glikozilaciju, odnosno u različitim glikoformama. Kao što je već prethodno spomenuto, PrP<sup>C</sup> sadrži visoko konzerviranu N-terminalnu regiju, na kojoj se odvija glikozilacija (Asn181 i Asn197). PrP<sup>C</sup> kod ljudi dolazi u različitim formama: kao neglikoziliran te mono- i di-glikoziliran. Svaka forma se razlikuje s obzirom na veličinu iako se različite monoforme (nastale glikozilacijom jednog ili drugog asparagina) ne mogu razlikovati jednostavnim tehnikama poput tehnike Western blot/imunoblot. Glikozilacija utječe i na unutarstanični transport i lokalizaciju PrP<sup>C</sup>, omogućuje produživanje poluvijeka života u organizmu i usmjeravanje prema plazmatskoj membrani (4). Prisutan je različit obrazac glikozilacije kod normalne forme proteina u odnosu na patološku (11) te nedostatak N-glikozilacije dovodi do nemogućnosti lokalizacije PrP<sup>C</sup> na plazmatskoj membrani, posljedičnog

stvaranja PrP<sup>Sc</sup> i povećanja citotoksičnosti i neuroinvazije PrP<sup>Sc</sup> agregata (12).

Dodavanje sijalične kiseline je posljednja modifikacija koja uključuje glikane, s obzirom da svaki glikan može kovalentno vezati dvije ili više sijalične kiseline. Vezanje sijalične kiseline dovodi do promjene izoelektrične točke, odnosno naboja PrP<sup>C</sup>, što dovodi do regulacije signalizacije posredovane proteinom PrP<sup>C</sup>. Pretpostavlja se da dodavanje sijalične kiseline utječe na patološki oblik proteina, pri čemu povećava njegovu infektivnost i replikaciju prionskih čestica. S druge strane, određena istraživanja su pokazala kako sama glikozilacija dovodi do stabilizacije sekundarne strukture PrP<sup>C</sup> i nemogućnosti konverzije  $\beta$ -ploča u PrP<sup>Sc</sup>, što predstavlja osnovu patološke konverzije (12).

### 1.3. Uloga PrP<sup>C</sup> u neurodegenerativnim bolestima

PrP<sup>C</sup> je u svojem patološkom obliku prvi puta otkriven 1982. godine od strane američkog neurologa Stanley Ben Prusiner (13). Patološki izmijenjen PrP<sup>C</sup> je netopiv, nalazi se u agregiranoj formi te se naziva PrP<sup>Sc</sup> (engl. *scrapie*), jer su simptomi bolesti prvi puta detektirani u ovčama pri čemu bi oboljele ovce češanjem sastrugale vunu. PrP<sup>Sc</sup> je karakteriziran kao infektivna proteinska čestica bez nukleinske kiseline, krivo nabrani protein (engl. *misfolded protein*), koji je visoko otporan na degradaciju. PrP<sup>Sc</sup> oblik proteina je otporan na radijaciju i razgradnju proteazama i standardne uvjete denaturacije proteina. Istraživanja strukture PrP<sup>Sc</sup> su dovela do saznanja kako se većinski sastoji od  $\beta$ -ploča (43%), što dovodi do visoke otpornosti na degradaciju proteazama i povezivanja u proteinske agregate, s obzirom da  $\beta$ -ploče imaju veću tendenciju vezanja drugih proteina koji sadrže  $\beta$ -ploče. PrP<sup>Sc</sup> uzrokuje tešku i fatalnu neurodegeneraciju kod ljudi, kao što je Kuru bolest i Creutzfeld-Jacobsonova bolest, fatalna familijarna nesanica i Gerstmann-Straussler-Scheinker sindrom (5). Kuru bolest je otkrivena u Papui Novoj Gvineji, u plemenu Fora, gdje su se prionske bolesti

prenosile kroz ritual kanibalizma. Kod ovaca uzrokuje *scrapie* bolest, odnosno svrbež te kod krava takozvano „kravlje ludilo“ (engl. *mad cow disease*) (9). Mehanizam koji dovodi do nastanka bolesti nije u potpunosti razjašnjen. Poznato je više od 30 mutacija u *Prnp* genu koje dovode do genetski predodređenog nastanka prionskih bolesti (6). Najučestalije mutacije *Prnp* gena povezane s nastankom bolesti su točkaste mutacije (zamjene jednog nukleotida), koje mogu dovesti do zamjene jedne aminokiseline u sekvenci (engl. *missense mutation*), te mogu dovesti do prerane terminacije (engl. *nonsense mutation*). Također su učestale insercije i delecije (6). Nadalje, bolest može započeti sporadično, odnosno može doći do spontanog nastanka krivo smotanog proteina PrP<sup>Sc</sup>, koji potom vezanjem za ostale zdrave oblike proteina PrP<sup>C</sup> dovodi do njihove konverzije u patološki oblik. Konačno, dokazano je kako se PrP<sup>Sc</sup> može prenositi, tj. da bolest može biti zarazna (2). Tijekom infekcije, patološki oblik PrP<sup>Sc</sup> se akumulira u stanicama živčanog i limforetikularnog sustava. PrP<sup>Sc</sup> agregati se sastoje od fibrila povezanih  $\beta$ -pločama, što su zapravo glavne karakteristike svih amiloida koji se pojavljuju u raznim neurodegenerativnim bolestima, kao što su Parkinsonova (PD) i Alzheimerova bolest (AD). Stoga su saznanja prikupljena prilikom istraživanja biologije agregata proteina PrP<sup>C</sup> bila vrijedan izvor informacija za razumijevanje agregiranja proteina koji se nalaze u podlozi AD i PD. Jedina razlika jest, što su agregati PrP<sup>Sc</sup> infektivni te se mogu prenositi između organizama i dalje uzrokovati bolest (5). Drugi takav protein do danas nije pronađen.

#### 1.4. Fiziološke funkcije proteina PrP<sup>C</sup>

Istraživanja interaktoma PrP<sup>C</sup> otkrivaju niz interakcijskih partnera, što ukazuje na veliki značaj PrP<sup>C</sup> u biološkim funkcijama. Istraživanja su do sada pokazala kako PrP<sup>C</sup> sudjeluje u staničnoj signalizaciji, preživljavanju neurona i neuroprotekciji, apoptozi, stvaranju sinapsi, oksidativnom stresu, staničnoj adheziji i diferencijaciji, imunomodulaciji, mikroRNA metabolizmu,



embriogenezi i samo-obnavljanju matičnih stanica, ali i njihovoj proliferaciji i diferencijaciji u druge tipove stanica te nizu ostalih funkcija koji se odvijaju unutar organizma (5). Ono što je zanimljivo, kako se i dalje ne zna ključan mehanizam i utjecaj PrP<sup>C</sup> u fiziologiji stanice (5). Naime, smatralo se kako protein mora igrati neku esencijalnu fiziološku ulogu, obzirom da bi ga u suprotnom evolucija eliminirala kao izrazitu prijetnju. Međutim, miš kome je uklonjen protein PrP<sup>C</sup> je vijabilan te čak nema nekih izrazitih manjkavosti (9). Stoga se smatra da uloga proteina PrP<sup>C</sup> još nije utvrđena te da bi protein mogao biti važan tijekom razvoja ili u nekim specifičnim stanjima kao što je susret s pojedinim patogenima.

#### 1.4.1. PrP<sup>C</sup> interaktom

Istraživanja PrP<sup>C</sup> otkrivaju vezajuće domene za velik broj liganada i interakcijskih partnera. PrP<sup>C</sup> može vezati DNA i RNA, razne transkripcijske faktore, šaperone, Hsp60,70 i 90 [Hsp, engl. **Heat shock protein**]) i Hop/STI1 koji modulira aktivnost Hsp (9). Zatim je pokazana kolokalizacija PrP<sup>C</sup> s LRP (engl. **Laminin receptor precursor**) te LR (engl. **Laminin receptor**) koji su identificirani i kao receptori za određene viruse, a pretpostavlja se kako su uključeni u endocitozu PrP<sup>C</sup>, kako preko njih PrP<sup>C</sup> veže heparin i heparan sulfat (glikozaminoglikani) u vanstaničnom matriksu (5). PrP<sup>C</sup> sadrži domenu za vezanje iona bakra, te stupa u interakciju s DPP6 (engl. **Dipeptidyl peptidase-like 6**), podjedinicom kalijevih kanala reguliranih naponom. Također sadrži domene za regulaciju ionskih kanala (Ca<sup>2+</sup>) i receptora neurotransmitera (NMDA receptori za glutamat [engl. **N-methyl-D-aspartic acid**]) (5). PrP<sup>C</sup> se također veže za NCAM (engl. **Neural cell adhesion molecule**), razne proteine u mozgu (npr. sinapsin 1b), tirozin kinaze (Fyn, ZAP-70) i fosfataze (PTPD1), Bcl-2 anti-apoptotski faktor, G-protein receptore (npr. mGluR1/5 [engl. **Metabotropic glutamate receptors of group 1/5**]) i mnoge ostale ligande (9). Zaključno, lista interakcijskih partnera proteina PrP<sup>C</sup> svakodnevno raste i biva sve raznovrsnija što donekle otežava pronalaženje njegove osnovne funkcije jer je teško izdvojiti ključne stanične procese.

#### 1.4.2. Uloga PrP<sup>C</sup> u živčanom sustavu

PrP<sup>C</sup> je općenito jako ispoljen u živčanom sustavu, iako je razina ispoljavanja različita s obzirom na regije mozga te na vrstu stanica. Osim na neuronima, PrP<sup>C</sup> se može pronaći na glija stanicama živčanog sustava (5) te je također ispoljen na astrocitima, oligodendrocitima i mikrogliji (1). Obzirom da su poremećaji vezani uz patološku formu proteina dominantno vezani uz centralni živčani sustav, a nisu doveli do eliminacije ovog proteina tijekom evolucije, to upućuje kako je PrP<sup>C</sup> vrlo važan u živčanom sustavu. Uporabom raznih mišjih PrP<sup>C</sup> *knock-out* modela, došlo se do mnogo saznanja i predloženih fizioloških funkcija PrP<sup>C</sup> u živčanom sustavu (9). Neke od predloženih funkcija su da PrP<sup>C</sup> regulira komunikaciju neurona, odnosno sinaptičku aktivnost i pobudu neurona obzirom na sposobnost PrP<sup>C</sup> da veže ione bakra, koji se luče iz neuronskih završetaka tijekom depolarizacije (9). PrP<sup>C</sup> sudjeluje u neuroprotekciji, posebice u obrani od slobodnih kisikovih radikala (ROS, engl. **Reactive oxygen species**), te sudjeluje u održavanju integriteta mijelina (1). Također se ističe njegova uloga u stvaranju memorije i utjecaju na ponašanje (9). Zanimljivo je kako se PrP<sup>C</sup> spominje u regulaciji cirkadijalnog ritma i stabilizaciji spavanja, s obzirom da patološki oblik proteina dovodi do bolesti koja je prema simptomima nazvana fatalna obiteljska nesanica (FFI, engl. **Fatal familial insomnia**).

#### 1.4.3. Uloga PrP<sup>C</sup> u staničnom ciklusu i signalizaciji

Biološki značaj PrP<sup>C</sup> se primarno vezuje uz živčani sustav, međutim istraživanja ukazuju na niz važnih uloga i izvan područja živčanog sustava. PrP<sup>C</sup> je vrlo bitan u održavanju homeostatskih procesa, neovisno o staničnom tipu. Ističe se njegova uloga u ranom embrionalnom razvoju, u samo-obnavljanju stanica odraslog organizma te staničnoj proliferaciji, diferencijaciji i apoptozi, na što ukazuju PrP<sup>C</sup> interakcijski partneri koji sudjeluju u navedenim procesima. Primjerice, postoji niz proteina koji sudjeluju u prijenosu stanične signalizacije a pokazana je njihova kolokalizacija s PrP<sup>C</sup>, kao što su kaveolin (transport kolesterola i

inkorporacija proteina u membranu), Fyn kinaza (engl. *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase*) iz obitelji Src kinaza, cAMP i protein kinaza A, Erk i MAP kinaze, protein kinaza C,  $\text{Ca}^{2+}$ , PI 3- kinaza/Akt signalizacija, i ostali (9).

#### 1.4.4. Imunološka uloga PrP<sup>C</sup>

Osim živčanog sustava, još jedno bitno polje istraživanja PrP<sup>C</sup> je njegova uloga u imunološkom sustavu. Novija istraživanja su pokazala kako je PrP<sup>C</sup> široko rasprostranjen u imunološkom sustavu, hematopoetskim matičnim stanicama (HSC) te zrelim limfoidnim i mijeloidnim staničnim linijama. PrP<sup>C</sup> je u humanim T-limfocitima lokaliziran u lipidnim splavima, gdje kolokalizira s kinazama i ko-receptorima bitnim u aktivaciji i imunološkom prepoznavanju (imunološka sinapsa), nadalje kolokalizira s T-staničnim receptorom i MHC-II kompleksom u dendritičkim stanicama (2).

Zanimljivo je kako *Prnp*<sup>-/-</sup> mišji sojevi pokazuju fenomen manjih promjena u funkciji imunološkog sustava. Oni normalno ispoljavaju molekule MHC-I i MHC-II, dolazi do normalnog razvoja dendritičkih stanica, proliferacije nešto većeg broja HSC, CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfocita te sasvim normalnog broja B limfocita, što ukazuje da ne dolazi do većih perturbacija imunološkog prepoznavanja uslijed izostanka PrP<sup>C</sup>. Također, takvi miševi su se pokazali kao dobar model za proizvodnju anti-PrP mišjih protutijela svih IgG razreda, što ukazuje na učinkovit odgovor limfocita B i T (4). Ukoliko razmatramo imunološki sustav prilikom razvoja prionske bolesti onda dolazi do izostanka imunološkog odgovora, i do jednog vida tolerancije, na patološku formu PrP<sup>Sc</sup>. Imunološki sustav zapravo doprinosi umnožavanju PrP<sup>Sc</sup> u limfoidnim odjeljcima što pogoduje širenju zaraze po organizmu, pogotovo u slučaju infekcije zaraženom hranom. Tada od stanica imunološkog sustava kreće prionska infekcija dalje na živčani sustav. Imunološki sustav u prvim fazama doprinosi razvoju infekcije, djelomično kroz ispoljavanje PrP<sup>C</sup> na imunološkim stanicama (2).

Nedavna istraživanja su pokazala kako je PrP<sup>C</sup> izrazito ispoljen u organima kao što su oko, mozak, placenta, uterus i testisi, što su zapravo područja koja su zaštićena od upale (imunološki privilegirana mjesta), te imaju ograničen kapacitet regeneracije. Istovremeno, PrP<sup>C</sup> je ispoljen na većini stanica limforetikularnog sustava. Prema jednoj hipotezi, PrP<sup>C</sup> pridonosi imunološkom utišavanju upale u područjima za koja je važno da budu zaštićena od presnažnog upalnog odgovora. PrP<sup>C</sup> time pridonosi modulaciji imunološkog odgovora pri čemu je prema spomenutoj hipotezi bitan za imunološko utišavanje. U skladu s time, PrP<sup>C</sup> *knock-out* miševi se u sterilnim uvjetima razvijaju bez većih odstupanja, no uočeno je kako se u odsustvu PrP<sup>C</sup> pogoršava oštećenje uslijed upalnog procesa u zaštićenim organima, što se pogotovo odnosi na izraženo veću neuroinflamaciju/upalu u mozgu. Pretpostavlja se kako PrP<sup>C</sup> doprinosi neuroprotekciji prilikom upale, direktno utječe na T-limfocitnu aktivaciju, preživljavanje i diferencijaciju u T-regulatorne te T<sub>H1</sub> pro-upalne limfocite (4).

#### 1.5. Stanične kulture za proučavanje biološke funkcije PrP<sup>C</sup>

Mnogo različitih tipova stanica u organizmu ispoljava ili veže PrP<sup>C</sup> te se mogu koristiti kao prikladni modeli za proučavanje PrP<sup>C</sup> interaktoma i potencijalne biološke uloge. Najčešće su korišteni neuroni ili stanice dobivene iz nekog dijela mozga, s obzirom da sadrže najveću količinu PrP<sup>C</sup>, međutim mogu se koristiti i ostale stanice. Mišja stanična linija neuroblastoma N2a i mišje stanice hipotalamusa GT1 su dvije najučestalije stanične linije za istraživanje PrP<sup>C</sup>, ali i patološke forme PrP<sup>Sc</sup>. Također se koriste i MG20 mišje mikroglija stanice koje prekomjerno ispoljavaju PrP<sup>C</sup>, primarna stanična linija CAS mišjih cerebralnih astrocita, NSC mišjih neuronskih matičnih stanica i druge. Od ne-neuronskih staničnih linija najviše se koriste mišji fibroblasti (kao što su stanične linije L929, NIH/3T3), Schwannove stanice i zečje epitelne stanične linije koje također prekomjerno ispoljavaju PrP<sup>C</sup> te primarne stanične linije mišjih mezenhimalnih matičnih stanica iz koštane srži (5).

Također se prilikom istraživanja određenog proteina, njegovih uloga te interakcijskih partnera, mogu koristiti reporterske stanične linije. Radi se o transfeciranim stanicama s dodatno unesenim genom koji kodira protein od interesa koji se želi proučavati te se takav rekombinantni protein ispoljava pod snažnim promotorom u većoj količini na površini stanice, u obliku receptora. Reporterske stanice se potom mogu inkubirati s različitim supstratima ili monoklonskim protutijelima od interesa, također i drugom staničnom linijom te ukoliko je došlo do prepoznavanja i vezanja liganda, i posljedične aktivacije receptora, doći će do lučenja mišjeg interleukina 2 (mIL-2) i detekcije putem ELISA testa (14). Takve stanične linije su korisne za identifikaciju interakcijskih partnera te staničnih ili solubilnih elemenata koji mogu dovesti do vezanja i/ili aktivacije ciljnog proteina na njihovoj površini, u našem slučaju proteina PrP<sup>C</sup>. Prilikom pisanja ovog diplomskog rada, upotreba ovakve transfecirane stanične linije bila je ograničena na svrhu ispitivanja specifičnosti novo-proizvedenih anti-PrP<sup>C</sup> protutijela.

#### 1.6. Dizajn monoklonskih protutijela

U zadnjih tridesetak godina, monoklonska protutijela su se pokazala moćnim alatom u znanosti i medicini te se koriste za različite metode istraživanja, u dijagnostičke i terapijske svrhe. Danas se sve uspješnije koriste za imunoterapiju tumora, ali i ostalih bolesti poput kardiovaskularnih, respiratornih, autoimunih bolesti te infekcija. Monoklonska protutijela su prvi put proizvedena 1975. godine otkrićem i produkcijom hibridoma, odnosno imortaliziranih staničnih linija, nastalih fuzijom stanice mijeloma i B-limfocita sa sposobnošću proizvodnje protutijela na određeni antigen (15). Prilikom proizvodnje protutijela, životinja (najčešće miš), je imunizirana određenim antigenom na koji se želi dobiti specifično protutijelo. Životinja ne smije imati gene za prirodno stvaranje istovjetnog proteina (antigena). Nastala hibridomska stanična linija posjeduje svojstvo beskonačnog umnožavanja u staničnoj kulturi te luči monoklonska protutijela u stanični medij (16). Prilikom rasta u kulturi,

potrebno je razlikovati fuzionirane stanice od stanica mijeloma i ishodišnih B-limfocita. Zbog toga se hibridomi kultiviraju na posebnom selekcijskom mediju hipoksantin-aminopterin-timidin (HAT, engl. ***hypoxanthine-aminopterin-thymidine***). Aminopterin je lijek koji inhibira *de novo* sintezu purina unutar stanice i metilaciju deoksiuridilata kako bi se formirao timidilat, dok hipoksantin služi kako bi se u stanici sinteza purina odvijala po reciklažnom putu, tzv. „*salvage*“ put sinteze, u kojem bitnu ulogu ima enzim hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferaza (HGPRT, engl. ***Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase***). Dakle, u prisustvu aminopterina, HGPRT<sup>+</sup> stanice će proliferirati, dok stanice koje nemaju navedeni enzim će umrijeti. Normalni B-limfociti u kulturi sadrže HGPRT, međutim nemaju neograničeno svojstvo diobe i stanice će nakon kratkog vremena umrijeti. Mijeloma stanice su HGPRT<sup>-</sup> te neće proliferirati, dok su stanice hibridoma HGPRT<sup>+</sup> (zbog fuzije s B-limfocitima), i one će se jedine dijeliti u HAT- selekcijskom mediju. Najčešće korištene mišje mijeloma stanice za fuziju su sp2/0 stanična linija, jer ne proizvodi komponente imunoglobulina kao neke ostale linije mijeloma, što bi potencijalno dovelo do miješanja lakih i teških lanaca imunoglobulina s onima iz B-limfocita (17). Monoklonska protutijela dugo su vremena izučavana kao mogući lijekovi koji bi spriječili konverziju u patološku formu proteina PrP<sup>Sc</sup>. Nezamjenjiv su alat prilikom istraživanja bilo kojeg proteina pa tako i prilikom istraživanja do sada nerazjašnjenih bioloških uloga PrP<sup>C</sup>. Korištenjem specifičnih monoklonskih protutijela, PrP<sup>C</sup> se može detektirati i vizualizirati unutar stanice, može se pratiti njegova kolokalizacija sa staničnim organelima i ostalim proteinima, primjerice prilikom istraživanja PrP<sup>C</sup> interaktoma.

### 1.7. Imunološke analize PrP<sup>C</sup>

Imuno-analize se temelje na specifičnosti vezanja antigena i protutijela pri čemu mogu biti kvantitativne i kvalitativne (18). Antigen je molekula koja potakne proizvodnju protutijela, u kojem se slučaju još zove i

imunogen, specifičnih na prepoznavanje određenog antigena kojeg želimo izučavati (19). Moguće je koristiti prirodne, ili mnogo češće, rekombinantne pripravke za imunizaciju prilikom čega nastala protutijela ispitujuemo na njihovu sposobnost prepoznavanja prirodnog proteina (izučavanog antigena) u različitim tehnikama od interesa.

#### 1.7.1. Imunoenzimski test (ELISA, engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*)

ELISA je osjetljiva i selektivna metoda za detekciju i kvantifikaciju antigena spektrofotometrijskim mjerenjem absorbance na određenim valnim duljinama. ELISA-om se analiziraju antigeni, koji mogu biti proteini, peptidi, nukleinske kiseline, metaboliti, hormoni i dr. Protutijelo koje prepoznaje antigen je konjugirano s enzimom koji omogućuje detekciju. Najčešće korišteni enzimi su alkalna fosfataza, peroksidaza hrena te  $\beta$ -galaktozidaza (18).

Postoji više vrsta ELISA testova, kao što je direktna, indirektna, konkurentna i „sendvič“ ELISA. Prilikom izrade ovog diplomskog rada za analize je korišteno oblaganje pločica antigenom (humanim ili mišjim proteinom PrP<sup>C</sup>). Protein se imobilizira na površini jažice te se dodaje blokirajući medij kako bi se spriječila nespecifična vezanja. Potom se dodaje uzorak za koji ispitujuemo postoji li u njemu protutijelo koje specifično prepoznaje imobilizirani antigen. Zatim se dodaje sekundarno protutijelo konjugirano enzimom peroksidaze hrena koja dovodi do pojave obojenja (ili se vizualizacija vrši putem biotin-streptavidin sustava, u kojem je detekcijsko protutijelo biotilirano te njega prepoznaje streptavidin konjugiran s peroksidazom hrena). Prilikom dodatka supstrata, peroksidaza hrena razgrađuje supstrat te dolazi do promjene boje. Intenzitet obojenja ovisi o koncentraciji antigena te su međusobno proporcionalni. Pomoću uređaja se mjeri absorbanca obojenja na određenim valnim duljinama, koja je izravno proporcionalna količini antigena (18,19).

### 1.7.2. Imunofluorescencija i konfokalna mikroskopija

Obilježavanje stanica fluorescentno-obilježenim protutijelima je jedna od najčešćih bioloških metoda koje se koriste prilikom istraživanja lokalizacije i vizualizacije određene mete unutar stanice. Imunofluorescentna analiza stanica je metoda koja se obično temelji na fiksciji stanica na stakalce; potom bojanja s primarnim protutijelom koje prepoznaje ciljani protein unutar stanice; te detekcije sekundarnim protutijelom koje je konjugirano s fluorokromom (fluorescentnom bojom), koja će prilikom pobuđivanja odgovarajućom valnom duljinom zračenja preći na više energetska stanje i emitirati zračenje druge valne duljine te na taj način dati fluorescentni signal (20). Konfokalna mikroskopija omogućuje 3D snimanje uzorka, veću rezoluciju, kontrast i osjetljivost te također optičko rezanje uzorka (snimanje u dubinu). Učinak snimanja u dubinu se postiže smještanjem konfokalne aperture (engl. *pinhole*). Kroz konfokalnu aperturu prolazi samo svjetlost iz ravnine u fokusu dok je svjetlost iz ostalih slojeva uzorka blokirana. Dakle, prednost snimanja konfokalnim mikroskopom je mogućnost detekcije svjetlosti samo iz jedne fokalne ravnine i tzv. „rezanje uzoraka“, što predstavlja veliku važnost prilikom analize vrlo malih struktura unutar stanice kada nije lako odrediti u kojoj se od bliskih struktura nalazi naš ispitivani antigen uzorka (50  $\mu\text{m}$ ). U slučaju konfokalne mikroskopije laserom se vrlo precizno pobuđuje samo određena valna duljina unutar uzorka odnosno dobiva se fluorescentni signal samo određene fluorofore u uzorku u fokusu pri čemu se izbjegava pozadinski signal autofluorescencije kompletnog uzorka ili signal od drugih fluorofora u uzorku, što može biti uzrok povećanog neželjenog, pozadinskog signala u klasičnoj fluorescentnoj mikroskopiji koja za ponudu koristi živinu ili halogenu žarulju kontinuiranog spektra (21).

### 1.7.3. Protočna citometrija

Protočna citometrija (FC, engl. ***Flow cytometry***) je metoda istovremene analize višestrukih karakteristika jedne čestice, najčešće se radi o analizi jedne stanice (engl. *single cell analysis*). Protočni citometar se sastoji od tri



glavna sustava: a) tekućinskog, koji omogućava prolaz uzorka, odnosno jedne po jedne stanice, kroz mlaz tekućine do lasera, b) optičkog sustava, koji se sastoji od lasera i optičkih filtera koji prenose signal do detektora, te c) elektronskog sustava, koji pretvara svjetlosni signal (fotone) u električni, koji se potom obrađuje pomoću računala i specijaliziranih softvera. Svojstva stanice koja se mjere pomoću FC su veličina stanice (FSC, engl. **Forward-scattered light**), granulacija i unutarnja kompleksnost (SSC, engl. **Side-scattered light**) te intenzitet fluorescencije pojedinih signala koje smo na stanicama mjerili. Analiza omogućuje i sortiranje (odnosno razdvajanje) stanica prema određenim svojstvima. FSC i SSC nastaju reflektiranjem zrake svjetla od površine stanice, ili od unutarnjih organela i granula. FSC daje podatke o vanjskim dimenzijama stanice, dok SSC govori o unutarnjim strukturama. Obzirom da su spomenuta svojstva karakteristična za pojedine stanične vrste, prema dobivenim grafovima raspršivanja svjetla možemo odrediti o kojim stanicama se radi, ukupni uzorak stanica podijeliti na stanične populacije i odrediti te odabrati populaciju koja nas zanima za daljnje analize. Fluorescentni signal dobivamo pomoću lasera koji pobuđuje fluorokrom, fluorokrom prelazi u više energetske stanje i emitira fluorescenciju određene valne duljine, koja se potom detektira. Kada je fluorokrom konjugiran na monoklonalno protutijelo, može se koristiti za identifikaciju određenog proteina ili druge ciljane molekule koja se nalazi na stanici. Pritom je uobičajen način upotrebe preciznije određivanje staničnog tipa, s obzirom na markere koji se nalaze na površini stanica. U uzorku gdje se nalaze različite populacije stanica, može se koristiti više fluorescentnih boja za identifikaciju i razdvajanje stanica na više subpopulacija, uz početne FSC i SSC vrijednosti. Jedan od najčešće korištenih fluorokroma je fluorescein izotiocijanat (FITC, engl. **Fluorescein isothiocyanate**), koji se pobuđuje argonskim ionskim laserom (plavi) na 488 nm. Također postoji i niz drugih lasera, primjerice crveni laser (633 nm). U slučaju obasjavanja uzorka sa spomenuta 2 lasera, svaka stanica prolazi kroz crveni i plavi laser odvojeno vremenski i prostorno (22).

## **2. Ciljevi rada**

Svrha ovog rada je bila:

1. Ispitati, metodom ELISA, prepoznaju li proizvedena monoklonska protutijela pročišćene proteine koji su korišteni kao imunogeni: rekombinantni mišji PrP<sup>C</sup> (MoPrP) i rekombinantni humani PrP<sup>C</sup> (HuPrP).
2. Ispitati prepoznaju li proizvedena monoklonska protutijela prirodni mišji i humani protein PrP<sup>C</sup> ispoljen na stanicama putem sljedećih metoda: Western blot/Imunoblot analiza, imunofluorescentna mikroskopija i protočna citometrija.
3. Ispitati lokalizaciju proteina PrP<sup>C</sup> unutar stanice pomoću monoklonskih protutijela i fluorescentne mikroskopije uz analizu konfokalnim mikroskopom.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Stanične linije

Stanične linije korištene u pokusima u ovom radu su GL261 stanice mišjeg glioma, MEF stanice mišjih embrionalnih fibroblasta (engl. ***Mouse embryonic fibroblast***), BW stanice mišjeg limfoma i BW-PrP stanice, koje su stabilne transfektante koji ispoljavaju velike količine PrP<sup>C</sup> na površini stanice BW, te humane stanice A549 (engl. *Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells*). MEF stanice rastu u 10% DMEM mediju (10% fetalni teleći serum [FCS, engl. ***fetal calf serum***], L-glutamin, penicilin-streptomycin), dok se GL261 stanice uzgajaju u 10% RPMI (FCS, L-glutamin, penicilin-streptomycin,  $\beta$ -merkaptoetanol), na 37 °C, pri 5% CO<sub>2</sub>. A549 i BW stanice se uzgajaju u 10% RPMI (+ NeAA-neesencijalne aminokiseline, NaPy-natrijev piruvat), dok se transfektante BW stanica uzgajaju u istom mediju uz dodatak 3 mg/ml G418, obzirom da posjeduju gen za rezistenciju na neomicin kao selekcijski marker.

#### 3.2. Odmrzavanje i uzgoj stanica

Stanice su čuvane na -80°C u mediju za smrzavanje (10%-tni DMSO [***dimetilsulfooksid***], 20% FCS, 70% RPMI), koji je inače toksičan za stanice na sobnoj temperaturi. Prilikom odmrzavanja, alikvot stanica je zagrijavan u vodenoj kupelji na 37°C te je potom ispran s 30 ml MEM medija (minimalni esencijalni medij, engl. ***minimal essential medium***), kako bi se uklonio medij za smrzavanje. Stanice su centrifugirane na 1500 rpm (ROTINA 380R, Hettich) 5 minuta, na sobnoj temperaturi. Nakon centrifuge, talog stanica je resuspendiran u novom, prethodno zagrijanom 10% DMEM mediju za MEF, 10% RPMI za GL261, 10% RPMI (+NeAA, NaPy) za BW i A549 stanice, te 10% RPMI (+ NeAA, NaPy, 3 mg/ml G418) za BW-PrP stanice, te su stanice prenesene u novu plastičnu Petrijevu zdjelicu za daljnji uzgoj u inkubatoru na 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>. Nakon brojanja stanica uz diskriminaciju mtrvih tripanskim modrilom, za imunofluorescenciju je nasađena konačna koncentracija 150 000 st./bunarčić ploče s dvanaest bunarčića (engl. i

nadalje *well*) za GL261 i 100 000 st./well za A549 dok su MEF stanice i ostatak A549 stanica prikupljeni i liziran za Western blot/imunoblot analize.

### 3.3. Priprema staničnih lizata

Uzorci stanica su centrifugirani na 1300 rpm/5 minuta (ROTINA 380R, Hettich), te je talog resuspendiran u puferu PBS (PBS, engl. ***Phosphate-buffered saline***). Nakon ponovljene centrifuge, na talog stanica je dodan pufer za lizu stanica (0.01 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.2, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP40, inhibitori proteaza, 1:1 u destiliranoj vodi), te su stanice držane 20 minuta na ledu uz povremeno preokretanje. Potom su uzorci centrifugirani 20 minuta na 13000 rpm/4 °C (Eppendorf, 5415 R), te je supernatant sačuvan za daljnje analize. Određena je koncentracija ukupnih proteina metodom BCA.

### 3.4. Proizvodnja monoklonskih protutijela

Monoklonska protutijela korištena prilikom pisanja ovog diplomskog rada, proizvedena su u Centru za proteomiku, iz hibridomskih staničnih linija. Hibridomi su nastali spajanjem, odnosno fuzijom B-limfocita imuniziranog PrP<sup>C</sup><sup>-/-</sup> miša s imortaliziranom Sp2/0 stanicom mišjeg mijeloma. PrP<sup>C</sup><sup>-/-</sup> miševi su imunizirani tri puta rekombinantnim purificiranim PrP<sup>C</sup>, proizvedenim u *E. Coli*. Nakon zadnje imunizacije prikupljen je pozitivan serum i napravljena fuzija stanica, te su hibridomi kultivirani na 96-well mikrotitarskim pločicama i inkubirani na 37°C, 5% CO<sub>2</sub> u selektivnom HAT mediju. Nakon što su stanice hibridoma porasle, preseljene su u 24-well pločice, te se kroz nekoliko ciklusa zamrzavanja stanica prikupljao supernatant u kojem su se nalazila protutijela. Nakon kultivacije i selekcije, prisutnost specifičnih protutijela u supernatantu je testirano ELISA-om, na imobilizirani ciljani antigen u jažici (MoPrP-mišji PrP<sup>C</sup>, mPrP-Ig, te HuPrP-humani). Nakon tri pozitivne provedene ELISA-e, dobila se nestabilna stanična linija koja proizvodi monoklonska protutijela na PrP<sup>C</sup> (MW, engl. ***motherwell***). MW su zapravo mješavine fuzioniranih B limfocita koji mogu biti pozitivni ili negativni na proizvodnju monoklonskih protutijela (mAb,

engl. **monoclonal antibody**). Pozitivne MW stanice su dalje klonirane u stabilne stanične linije, koje nastavljaju lučiti protutijela. Za pokuse imunofluorescencije, Western blota i protočne citometrije korištena su monoklonska protutijela navedena u *Tablici 1*. Također su ispitivana dva mAb 4H7 i 4E11 dobivena imunizacijom putem fuzijskog proteina (mPrP-Ig).

**Tablica 1.** Monoklonska protutijela dobivena imunizacijom na antigene MoPrP i HuPrP MW\*, engl. *motherwell*- nestabilne stanične linije koje mogu proizvoditi protutijela, te se dalje kloniraju u stabilne stanične linije (klon).

| MoPrP        |              | HuPrP        |      |
|--------------|--------------|--------------|------|
| klon         | MW           | klon         | MW   |
| /            | 1F3          | /            | 1H2  |
|              | 1F9          |              | 1H7  |
|              | 1F10         |              | 1G8  |
|              | 4H5          |              | 2A3  |
|              | 5H2          |              | 3D1  |
| MoPrP<br>.03 | 1D5          | HuPrP.<br>01 | 4D1  |
|              | MoPrP<br>.01 |              | 3G8  |
| MoPrP<br>.02 | 3B10         | HuPrP<br>.02 | 6D3  |
| /            | 2A2          | HuPrP<br>.03 | 6D4  |
|              | 2H3          | HuPrP<br>.05 | 5B10 |
|              | 4G2          | /            | /    |
|              | 1H1          |              |      |
|              | 1A6          |              |      |
| 1B7          |              |              |      |
| 2G6          |              |              |      |
|              | 2B11         |              |      |

### 3.5. ELISA

Za početni probir anti-PrP<sup>C</sup> monoklonskih protutijela 96-well ploča s visokim afinitetom vezanja proteina (engl. *Enhanced protein-binding 96 well ELISA plates* [Nunc Maxisorb]) je inkubirana s 2-5 µg/ml pročišćenog MoPrP i HuPrP imunogena te humanog serpina (HuSerA3), koji je korišten kao negativna kontrola. Nakon ispiranja, dodan je pufer za blokiranje (albumin frakcion V, 10% NaN<sub>3</sub>, Tween20, destilirana voda), te je ploča inkubirana preko noći na + 4°C. Potom je na ploču dodan supernatant iznad hibridomskih stanica razrjeđenja 1: 1 u puferu TBST. Nakon inkubacije od 1 sata na sobnoj i ispiranja, dodano je sekundarno protutijelo konjugirano

sa streptavidin-peroksidazom (1:1000 u PFT-u) te je ploča inkubirana pola sata, na sobnoj temperaturi. Zatim je dodan supstrat (OPD, engl. **O-phenylenediamine dihydrochloride**, u citratnom puferu pH 5.5 i vodikovom peroksidu), te je ploča inkubirana 10-tak minuta na sobnoj temperaturi, u mraku. Nakon 10-tak minuta i pojave boje, reakcija je zaustavljena 1M sulfatnom kiselinom, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbanca je očitana na 492 nm/630 nm pomoću MikroWin2000 softvera, na TriStarLB941 uređaju (*Berhold Technologies*).

### 3.6. Imunofluorescencija i konfokalna mikroskopija

#### 3.6.1. GL261 stanice

GL261 stanice su nasađene u 12-well ploče (150 000 st./well) i fiksirane na tri različita načina: ledeno–hladnim metanolom (engl. *ice cold methanol*, -20°C) 5 minuta, 2,5% paraformaldehidom (PFA, engl. **paraformaldehyde**) u PBS-u 20 minuta, te 2,5% PFA u PBS-u 20 minuta i potom 0,1% TritonX-100 u PBS-u 7 minuta. Nakon fiksacije stanica i ispiranja PBS-om, dodana su primarna monoklonska protutijela 4H7, 4E11 i HuPrP.02 (1:1 u PBS-u), te su stanice inkubirane 45 minuta na sobnoj temperaturi. Korištena pozitivna kontrola je komercijalno humano anti-mišje PrP<sup>C</sup> protutijelo D13 (*Creative Biolabs*® [23]), 1:200 u PBS-u). Nakon inkubacije stanica i ispiranja PBS-om, dodana su anti-mišja sekundarna protutijela konjugirana sa FITC (1:200 u PBS-u), te anti-humano sekundarno protutijelo konjugirano sa FITC (1:200 u PBS-u) za detekciju pozitivne kontrole D13. Stanice su inkubirane 30 minuta sa sekundarnim protutijelom, te su isprane 2x PBS-om. Uzorci su analizirani konfokalnim mikroskopom Olympus FV300 i analizirani Fluoview v. 5.0 softverom.

### 3.6.2. A549 stanice

A549 stanice su nasađene u 12-well ploče (150 000 st./well i fiksirane 2,5% PFA u PBS-u 20 minuta i potom 0,1% TritonX-100 u PBS-u 7 minuta. Nakon fiksacije stanica dodana su primarna monoklonska protutijela HuPrP.01, HuPrP.02, HuPrP.03, HuPrP.05, 1D5, 5B10, te 2A3 (1:1 u PBS-u), te su stanice inkubirane 45 minuta na sobnoj temperaturi. Kao pozitivne kontrole korištena su komercijalna protutijela D13 i 3F4 (1:200 u PBS-u), te MenY-specifično protutijelo kao negativna kontrola (1:1 u PBS-u). Nakon inkubacije stanica i ispiranja PBS-om, dodana su anti-mišja sekundarna protutijela konjugirana sa FITC (1:200 u PBS-u), te anti-humano sekundarno protutijelo konjugirano sa FITC (1:200 u PBS-u) za detekciju pozitivnih kontrola D13 i 3F4.

### 3.7. SDS- PAGE elektroforeza i Western blot

#### 3.7.1. Detekcija pročišćenih rekombinantnih proteina PrP<sup>C</sup>, MoPrP i HuPrP, monoklonskim protutijelima

Uzorci pročišćenog mišjeg rekombinantnog proteina PrP<sup>C</sup> (MoPrP, koncentracije 0.54 mg/ml) i pročišćenog HuPrP (koncentracije 0.78 mg/ml) su pripremljeni na ledu u ukupnom volumenu od 45 µl (40 µg proteina, 5X pufer za uzorke (sample buffer, [5x Laemmli, 0.5 M Tris pH=6.8, glicerol, 10% SDS), β- merkaptioetanol, 1% bromfenol plavo, destilirana voda], te nadopunjeni do ukupnog volumena destiliranom vodom). Pripremljen je 12% donji gel za razdvajanje (1.5M Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS, 30% akrilamid, TEMED, 10% amonij persulfat ([APS, engl. **ammonium persulfate**], destilirana voda), te gornji gel za sabijanje uzoraka (0.5 M, pH 6.8 Tris-HCl, 10% SDS, 30% akrilamid, TEMED, 10% APS, destilirana voda). Uzorci su razdvajani na gelu u puferu za elektroforezu (10x Reservoir Buffer Laemmli- SDS, Tris, glicin, destilirana voda). Za određivanje veličine proteina korišten je proteinski standard (*Thermo Scientific*). Elektroforeza je provedena na dva gela istovremeno uz 300V/70 mA, oko sat i pol.

Nakon provedene elektroforeze slijedio je prijenos proteina s gela na nitroceluloznu membranu (*Amersham, Life sciences*) u puferu za transfer (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% metanol, pH=8,3). Transfer je proveden na 80V/400 mA, sat i 15 minuta. Membrana je blokirana s mlijekom u prahu u TBS-T (10mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) nešto više od 30 minuta. Time je spriječeno nespecifično vezanje protutijela na membranu. Nakon blokiranja, jedna membrana je inkubirana MoPrP primarnim monoklonskim protutijelima (1:1 u TBS-T), preko noći na + 4°C. Korištena primarna MoPrP su: 1F3, 1F9, 1F10, 1D5, 3B10, 2A2, 2H3, 4G2, 1H1, 1A6, 1B7, 2G6, 2B11. 4H7, 4E11, MoPrP.01, MoPrP.03. Druga membrana je inkubirana HuPrP protutijelima: 1H2, 1H7, 1G8 , 2A3, 4D1, 3D6, 5B10, HuPrP.01, HuPrP.02, te HuPrP.04.

Nakon inkubacije s primarnim protutijelima, membrane su isprane 3x po 15 minuta sa 1xTBS-T. Zatim su dodana anti-mišja sekundarna protutijela konjugirana s peroksidazom hrena (1:8000), te su membrane inkubirane 45 minuta. Nakon inkubacije, membrane su isprane 3x po 15 minuta sa 1xTBS-T. Proteinski signali, tzv. bendovi (prema engl. *protein bands*) vizualizirani su korištenjem reagensa otopine luminola i otopine peroksida u omjeru 1:1, te slikani na *ImageQuant LAS4000 mini*.

### 3.7.2. SDS-PAGE elektroforeza i Western blot/Imunoblot na staničnim lizatima

Nakon provedene Western blot analize na rekombinantne proteine PrP<sup>C</sup>, pozitivna monoklonska protutijela testirana su dalje na MEF i A549 staničnim lizatima. Uzorci MEF (konc. ukupnih proteina 3,3 mg/ml) i A549 stanica (13,33 mg/ml) su pripremljeni na ledu (u sample bufferu [5x Laemmli, 0.5 M Tris pH=6.8, glicerol, 10% SDS),  $\beta$ - merkaptetoetanol, 1% bromfenol plavo, destilirana voda], i destiliranoj vodi). Uzorci su nanešeni na u ukupnom volumenu od 45  $\mu$ l i ukupnoj količini od 100  $\mu$ g lizata po uzorku. Pripremljen je 12% donji gel za razdvajanje proteina u uzorku. Za



određivanje veličine proteina korišten je proteinski standard (*Thermo Scientific*). Elektroforeza je provedena na 300V/30 mA, oko sat i pol.

Nakon elektroforeze je proveden transfer na 80V/400 mA, sat i 15 minuta. Membrana je blokirana sa mlijekom u prahu u TBS-T, nešto više od 30 minuta. Za MEF-stanične lizate, membrana je nakon blokiranja, inkubirana anti-MoPrP primarnim monoklonskim protutijelima (1:1 u TBS-T), te su kao pozitivne kontrole korištena komercijalna protutijela: D13 i D18 humana anti-mišja PrP<sup>C</sup> protutijela (*Creative Biolabs*<sup>®</sup> [24]) i mišje anti-mišje PrP<sup>C</sup> W226 protutijelo (*Creative Biolabs*<sup>®</sup> [25], 1:1500 u TBS-T). Nakon primarnih protutijela dodana su anti-mišja sekundarna protutijela (1:8000 u TBS-T), dok je za pozitivne kontrole D13, D18 i W226 FAB korišteno anti-humano sekundarno protutijelo (1:5000) te su sva sekundarna protutijela bila konjugirana s peroksidazom hrena. Za A549 stanične lizate, membrana je inkubirana s ispitivanim anti-HuPrP protutijelima (1:1 u TBS-T) te je kao pozitivna kontrola korišteno humano PrP<sup>C</sup> 3F4 komercijalno protutijelo (*Chemicon*<sup>®</sup> [26], 1:1500 u TBS-T). Za detekciju primarnih protutijela korištena su anti-mišja sekundarna protutijela konjugirana sa peroksidazom hrena (1:8000 u TBS-T).

### 3.8. Protočna citometrija

BW, BW-PrP, A549 i GL261 stanice su nakon brojanja nasadene u 96-well pločice u koncentraciji 300 000 st./well, centrifugirane 5 minuta na 1500 rpm, te potom držane na ledu tijekom cijele pripreme uzoraka za protočnu citometriju. Nakon ispiranja s FACS-medijem (BSA [albumin fraction V], NaN<sub>3</sub>, PBS), dodana su primarna protutijela navedena u *Tablici 2.* (1:1 u FACS mediju), te D13-humano primarno protutijelo (1:300 u FACS mediju) kao pozitivna kontrola i MenY-specifično protutijelo (1:1 u FACS mediju), kao negativna kontrola. U primarna protutijela je stavljena boja za detekciju živih stanica protočnom citometrijom (FVD, engl. **Fixible viability dye** u omjeru 1:1000). Stanice su inkubirane 25 minuta s primarnim protutijelima

na ledu, u mraku. Nakon inkubacije, stanice su isprane FACS-medijem i ponovno centrifugirane 5 minuta/1500 rpm. Potom su dodana anti-mišja sekundarna protutijela konjugirana s FITC (1:100 u FACS-mediju), te anti-humano sekundarno protutijelo konjugirano s FITC (1:100) za detekciju pozitivne kontrole D13, i stanice su inkubirane 20 minuta u mraku i na ledu. Nakon inkubacije su ponovno isprane FACS medijem i centrifugirane, te potom resuspendirane u 200 µl FACS medija. Neposredno prije analize protočnim citometrom, suspenzija stanica je prenesena kroz cijedilo za stanice (engl. *cell strainer*) u novu plastičnu epruvetu za analizu. Uzorci su analizirani DB FACS Aria™ Ili protočnim citrometrom, pomoću softvera BD FACS Diva, te potom obrađeni programom FlowJo.

**Tablica 2.** Korištena anti-MoPrP i anti-HuPrP monoklonska protutijela u protočnoj citometriji.

| <b>HuPrP</b>                                             | <b>MoPrP</b> |
|----------------------------------------------------------|--------------|
| HuPrP.01*                                                | MoPrP.02     |
| HuPrP.02*                                                | MoPrP.03     |
| HuPrP.04*                                                | 1A6          |
| * ELISA-om pokazano kako prepoznaju i mišji i humani PrP | 1B7          |
|                                                          | 2G6          |
|                                                          | 4H7          |
|                                                          | 4E11         |

## 4. Rezultati

### 4.1. Početni probir anti-PrP<sup>C</sup> monoklonskih protutijela

#### 4.1.1. ELISA test supernatanata na prisustvo anti-PrP<sup>C</sup> monoklonskih protutijela

Otkako je otkriven protein PrP<sup>C</sup>, velik napor se ulaže u razvijanje monoklonskih protutijela kao alata u istraživanju njegovih bioloških funkcija. Istovremeno se ulaže u razvitak protutijela za dijagnostiku patološke forme PrP<sup>Sc</sup> proteina te razvitak protutijela kao potencijalnih inhibitora PrP<sup>Sc</sup> (16). Centar za proteomiku, Medicinski fakultet, Sveučilišta u Rijeci započeo je istraživanja potencijalnih bioloških uloga PrP<sup>C</sup> te specifično njegove imunološke uloge. U tu svrhu radi na razvijanju vlastitih monoklonskih protutijela na mišji i humani PrP<sup>C</sup> kako bi osigurali dostupnost velike količine protutijela koju zahtijevaju pojedine analize kao što je blokada imunološkog odgovora te raznovrsnost protutijela koja prepoznaju protein PrP<sup>C</sup> u različitim tehnikama. Nakon imunizacije životinja, fuzije mišjih B-limfocita sa Sp2/0-stanicama mišjeg mijeloma i uzgoja hibridomskih staničnih linija na selektivnom HAT-mediju, supernatanti dobivenih hibridoma su testirani u najranijem stupnju, kada se svaki pojedini hibridom nalazi u jednom bunarčiću uzgojne ploče od 96 bunarčića, na prisustvo monoklonskih protutijela koja specifično prepoznaju imunogen. Supernatanti su ispitani ELISA-om na sposobnost prepoznavanja mišjeg PrP<sup>C</sup> (MoPrP) ili humanog PrP<sup>C</sup> (HuPrP) te humanog serpina (HuSerA3). Mišji i humani PrP<sup>C</sup> su korišteni kao imunogeni, a serpin je korišten kao negativna kontrola, obzirom da se radi o proteinu koji je proizveden u istom sustavu, korištenjem *E.Coli*, kao i PrP<sup>C</sup> te posjeduje određene sličnosti sa samom metom, proteinom PrP<sup>C</sup>. Rezultati u *Tablici 3. A)* prikazuju primjer jedne od ispitivanih ploča s 96 bunarčića pri čemu vrijednosti odgovaraju izmjerenoj absorbanci testiranih supernatanta na prepoznavanje mišjeg PrP<sup>C</sup>, dok su pod *B)* prikazane izmjerene absorbance na kontrolni protein, humani serpin. Supernatanti s najvećom absorbancom su odabrani za daljnji uzgoj.

**Tablica 3. ELISA-rezultati testiranja mišjih monoklonskih protutijela na MoPrP i HuSerA3. A)** Izmjerene apsorbance na mišji rekombinantni PrP<sup>C</sup> (MoPrP), zeleno označeni pozitivni supernatanti. **B)** Izmjerene apsorbance na kontrolni protein HuSerA3.

| A) | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A  | 0,142 | 0,394 | 0,487 | 0,411 | 0,426 | 0,410 | 1,443 | 0,263 | 0,495 | 0,315 | 0,504 |
| B  | 1,628 | 1,532 | 0,454 | 0,620 | 0,436 | 0,500 | 0,516 | 0,595 | 0,342 | 0,334 |       |
| C  | 0,275 | 0,404 | 0,531 | 0,590 | 0,675 | 0,405 | 0,394 | 0,315 | 0,548 | 0,193 |       |
| D  | 0,352 | 0,589 | 0,488 | 0,492 | 0,676 | 0,469 | 0,614 | 0,355 | 0,548 | 0,169 |       |
| E  | 0,761 | 0,480 | 0,350 | 0,348 | 0,411 | 0,448 | 0,511 | 0,418 | 0,360 | 0,082 |       |
| F  | 0,498 | 0,477 | 0,611 | 0,503 | 0,379 | 0,413 | 0,502 | 0,408 | 0,542 | 0,160 |       |
| G  | 0,552 | 0,453 | 0,385 | 0,426 | 0,544 | 0,446 | 0,398 | 0,348 | 0,459 | 0,078 |       |
| H  | 0,590 | 0,468 | 0,769 | 0,367 | 0,462 | 0,422 | 0,357 | 0,257 | 0,291 | 0,101 |       |

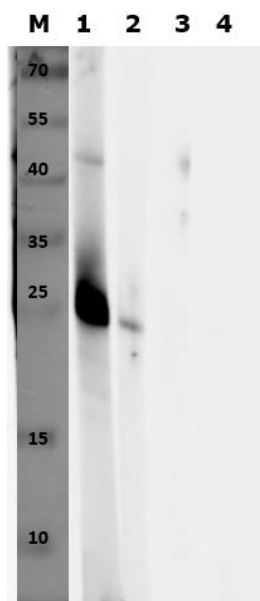
| B) | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A  | 0,134 | 0,006 | 0,014 | 0,013 | 0,009 | 0,007 | 0,015 | 0,017 | 0,013 | 0,014 | 0,019 |
| B  | 0,046 | 0,046 | 0,025 | 0,018 | 0,027 | 0,028 | 0,019 | 0,016 | 0,016 | 0,015 |       |
| C  | 0,024 | 0,025 | 0,022 | 0,018 | 0,021 | 0,017 | 0,016 | 0,020 | 0,014 | 0,014 |       |
| D  | 0,019 | 0,017 | 0,020 | 0,021 | 0,023 | 0,017 | 0,010 | 0,020 | 0,015 | 0,013 |       |
| E  | 0,021 | 0,019 | 0,026 | 0,018 | 0,022 | 0,016 | 0,017 | 0,011 | 0,013 | 0,012 |       |
| F  | 0,025 | 0,024 | 0,023 | 0,023 | 0,017 | 0,013 | 0,015 | 0,016 | 0,015 | 0,011 |       |
| G  | 0,023 | 0,023 | 0,022 | 0,022 | 0,016 | 0,015 | 0,017 | 0,026 | 0,023 | 0,026 |       |
| H  | 0,029 | 0,026 | 0,021 | 0,023 | 0,012 | 0,020 | 0,024 | 0,025 | 0,027 | 0,039 |       |

Iz priloženog (Tablica 3.) vidimo kako je velik broj protutijela specifično prepoznavao protein MoPrP u metodi ELISA, pri čemu su za daljni uzgoj odabrani hibridomi čija je apsorbancija bila veća od 0,5. Istovjetna analiza protutijela koja potencijalno prepoznaju protein HuPrP dala je odabir početnog seta pozitivnih kandidata (nije prikazano).

#### 4.1.2. Western blot/Imunoblot test supernatanata na prisustvo anti-PrP<sup>C</sup> monoklonskih protutijela

Početna ELISA-testiranja supernatanata na prisustvo monoklonskih protutijela koja prepoznaju pročišćene proteine, imunogene, izdvojila su nekoliko potencijalnih kandidata za daljnji uzgoj i ispitivanje. Stanične linije koje luče navedena protutijela se potom umnažalo uzgajanjem u većim bunarčićima, onim uzgojne ploče s 24 bunarčića. Odabrani su supernatanti

četiri najbrže rastuće hibridomske stanične linije i testirani putem Western blot/imunoblot metode na prepoznavanje rekombinantnog mišjeg PrP<sup>C</sup>. Dva supernatanta su pokazala sposobnost detekcije karakterističnih PrP<sup>C</sup>-bendova između 20 i 40 kDa (*Slika 2.*). Pozitivni supernatantni (1D5 i 3B10) su dalje prikupljani zajedno s uzgojem ostalih pozitivnih hibridoma iz početnog probira, osim prikazana četiri koja su imala najbrži rast. Istovremeno, Centar za proteomiku je stanice hibridoma 1D5 i 3B10 odmah klonirao postupkom velikog razrjeđenja (engl. *limiting dilution*).



**Slika 2. Western blot analiza supernatanta na sposobnost detekcije rekombinantnog mišjeg PrP<sup>C</sup>.** Nakon SDS-PAGE-razdvajanja 40 ug rekombinantnog proteina i prenosa proteina na membranu, membrana je inkubirana sljedećim supernatantima koji sadrže MoPrP-protutijela (1:1 u puferu TBS-T): 1- 1D5, 2- 3B10, 3- 4H2, 4- 5H2. Supernatanti 1D5 i 3B10 prikazuju pojavu bendova između 20-40 kDa, karakterističnih za PrP<sup>C</sup>.

## 4.2. Razvoj MoPrP i HuPrP protutijela

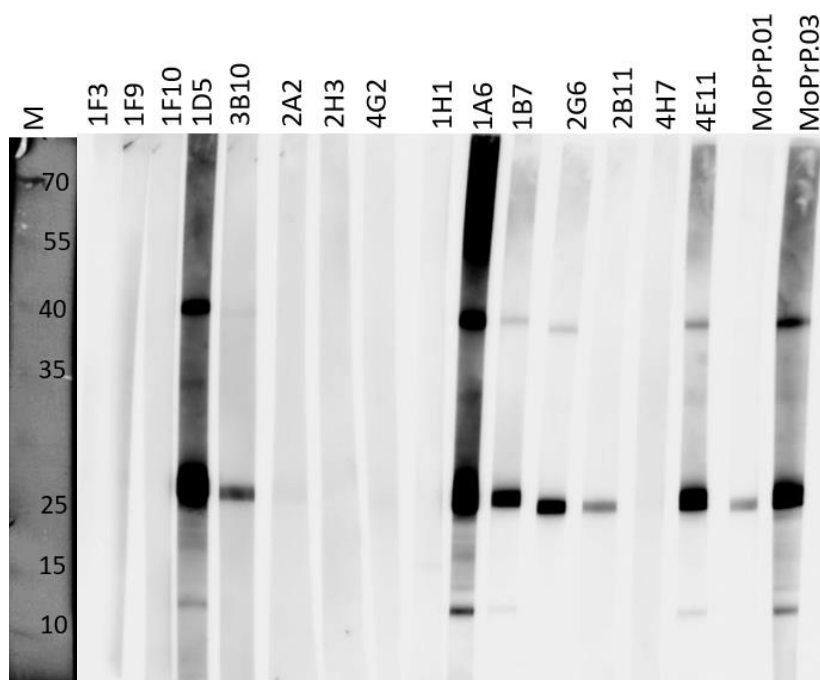
### 4.2.1. MoPrP monoklonska protutijela

Nakon što je utvrđena adaptacija/preživljavanje hibridoma u uzgojnim posudama s 24 bunarčića, stanice su smrznute, a supernatanti su testirani kako bi se ispitalo jesu li nestabilne hibridomske stanične linije (tzv. *Motherwellovi*, MW) zadržale pozitivnost, odnosno luče li i dalje protutijela

na PrP<sup>C</sup>. Istovremeno su klonovi (klonirane stanične linije od MW koji su bili pozitivni u metodi Western blot/Imunoblot) ispitani ELISA-om na prepoznavanje MoPrP. Neki od MW-supernatanta su ostali pozitivni, kao što su pozitivni bili i svi klonovi dobiveni od MW-hibridoma 1D5 i 3B10, koji su pokazali potencijal za rad u tehnici Western blot/imunoblot (*Tablica 4.*). Istovremeno su provedene Western blot/Imunoblot analize svih MW koji su dostigli stupanj uzgoja u 24 well bunarčićima na MoPrP. Rezultati prikazuju bendove na pozicijama između 20-40 kDa, koje su karakteristične za PrP<sup>C</sup> (*Slika 3.*). Pojava signala u Western blotu je pokazala na potencijalnu sposobnost MoPrP monoklonskih protutijela 1D5, 3B10, 1A6, 1B7, 2G6, 2B11, 4E11, MoPrP.01 te MoPrP.03, za prepoznavanje rekombinantnog mišjeg PrP<sup>C</sup>. Ovi pozitivni supernatanti, u slučaju da je ELISA potvrdila kako su hibridomske stanične linije zadržale pozitivnost i po njihovu umnažanju u pločama s 24 bunarčića (*Tablica 4.*), su nadalje testirani na mišjim staničnim lizatima, kako bi se utvrdilo da li osim imunogena protutijelo ima sposobnost prepoznavanja originalnog proteina poteklog iz eukariotskih stanica.

**Tablica 4. ELISA-testiranje supernatanta iz uzgojnih posuda većeg kapaciteta na prisustvo anti-MoPrP monoklonskih protutijela.** ELISA-ploče su obložene s antigenom MoPrP te potom inkubirane s navedenim supernantima u svrhu detekcije specifičnih monoklonskih protutijela. HuSerA3 je korišten kao negativna kontrola. Mjerena je absorbanca pri 492 nm/630 nm, te su u tablici označeni pozitivni supernatanti (zeleno), u odnosu na kontrolu.

| Uzorci                 | OD (MoPrP) | OD (HuSerA3) |
|------------------------|------------|--------------|
| Neg.serum 1:1000       | 0,113      | 0,022        |
| Poz. serum 1:1000      | 0,955      | 0,908        |
| <b>MoPrp.01 (3B10)</b> | 0,486      | 0,010        |
| <b>MoPrp.02 (3B10)</b> | 0,562      | 0,011        |
| <b>MoPrp.03 (1D5)</b>  | 0,806      | 0,012        |
| 1F3                    | 0,023      | 0,013        |
| 1F9                    | 0,047      | 0,013        |
| 1F10                   | 0,028      | 0,011        |
| 4H5                    | 0,021      | 0,005        |
| 5H2                    | 0,032      | 0,009        |
| <b>1D5</b>             | 0,893      | 0,009        |
| <b>3B10</b>            | 0,624      | 0,013        |
| mPrp-Ig: 4H7           | 0,023      | 0,010        |
| <b>mPrp-Ig: 4E11</b>   | 0,446      | 0,014        |
| HuPrP: 5B10            | 0,023      | 0,014        |
| 1H1                    | 0,110      | 0,015        |
| <b>1A6</b>             | 0,856      | 0,015        |
| <b>1B7</b>             | 0,567      | 0,015        |
| <b>2G6</b>             | 0,728      | 0,015        |
| 2B11                   | 0,030      | 0,015        |



**Slika 3. Western blot analiza supernatanta na prisustvo MoPrP-monoklonskih protutijela i sposobnost detekcije rekombinantnog mišjeg PrP<sup>C</sup>.** 40 µg pročišćenog rekombinantnog mišjeg proteina PrP<sup>C</sup> (koncentracije 0.54 mg/ml) je korišteno za preparativnu gel elektroforezu. Membrana je inkubirana s navedenim primarnim MoPrP protutijelima (1:1 u TBS-T). MoPrP monoklonska protutijela 1D5, 3B10, 1A6, 1B7, 2G6, 2B11, 4E11, MoPrP.01 i MoPrP.03 pokazuju sposobnost prepoznavanja rekombinantnog proteina i pojavu karakterističnih bendova između 20-40 kDa.

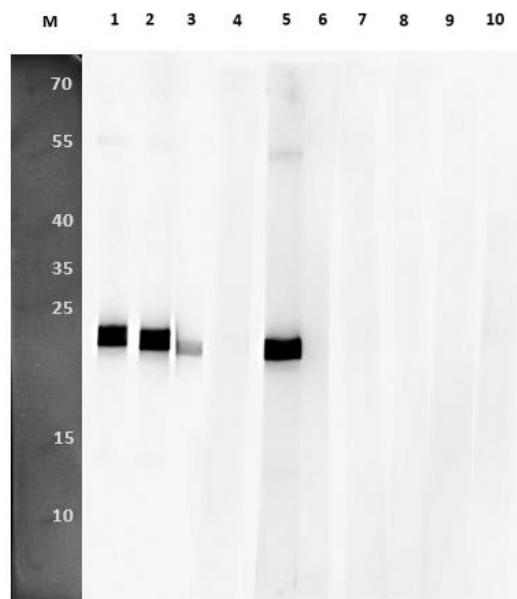
#### 4.2.2. HuPrP monoklonska protutijela

Sukladno postupcima opisanim u odjeljku 3.2.1., istovremeno su se provodile analize metodama ELISA i Western blot/Imunoblot supernatanta protutijela na HuPrP. Testirani su supernatanti MW-hibridoma i pojedinih njihovih klonova, na sposobnost detekcije pročišćenog rekombinantnog humanog proteina PrP<sup>C</sup>. Rezultati ELISA-e ukazuju na održanu pozitivnost MW HuPrP protutijela 3G8, 6D3, 6D4 prilikom uzgoja u većim uzgojnim bunarčićima te također i pozitivnost svih klonova proizašlih iz navedenih MW (*Tablica 5.*). Western blot rezultati prikazuju detekciju karakterističnih bendova na pozicijama između 20-40 kDa (*Slika 4.*). Pozitivni supernatantni iz Western blot analize su nadalje testirani na humanim staničnim lizatima.

**Tablica 5. ELISA-testiranje supernatanta na prisustvo HuPrP-monoklonskih protutijela.** 96-well ploče su obložene s antigenom HuPrP te inkubirane navedenim supernantima u svrhu detekcije specifičnih monoklonskih protutijela. HuSerA3 je korišten kao negativna kontrola. Mjerena je absorbanca pri 492 nm/630 nm te su u tablici označeni pozitivni supernatanti (zeleno), u odnosu na kontrolu.

| Uzorci                | OD (HuPrp) | OD (HuSerA3) |
|-----------------------|------------|--------------|
| Neg.serum 1:1000      | 0,056      | 0,041        |
| Poz. serum 1:1000     | 0,996      | 0,904        |
| <b>HuPrp.01 (3G8)</b> | 0,778      | 0,017        |
| <b>HuPrp.02 (6D3)</b> | 0,893      | 0,019        |
| <b>HuPrp.03 (6D3)</b> | 0,868      | 0,021        |
| <b>HuPrp.04 (6D4)</b> | 0,875      | 0,023        |
| <b>HuPrp.05 (6D4)</b> | 0,832      | 0,023        |
| 1H2                   | 0,132      | 0,023        |
| 1H7                   | 0,022      | 0,005        |
| 1G8                   | 0,023      | 0,009        |
| 2A3                   | 0,023      | 0,009        |
| 3D1                   | 0,030      | 0,013        |
| 4D1                   | 0,025      | 0,010        |
| <b>3G8</b>            | 0,910      | 0,014        |
| <b>6D3</b>            | 0,872      | 0,014        |
| <b>6D4</b>            | 0,867      | 0,015        |





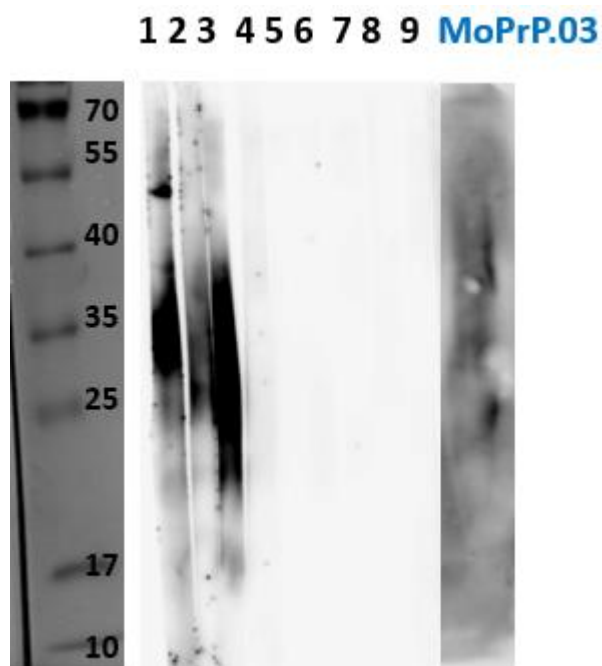
**Slika 4. Western blot analiza supernatanta na prisustvo specifičnih monoklonskih protutijela i sposobnost detekcije rekombinantnog humanog PrP<sup>C</sup>.** 40 µg pročišćenog rekombinantnog humanog proteina PrP<sup>C</sup> je korišteno za preparativnu gel elektroforezu. Membrana je inkubirana navedenim primarnim humanim protutijelima (1:1 u puferu TBS-T): 1- HuPrP.04, 2- HuPrP.02, 3-HuPrP.01, 4- 5B10, 5-6D3, 6- 4D1, 7-2A3, 8- 1G8, 9- 1H7, 10- 1H2. HuPrP-monoklonska protutijela HuPrP.04, HuPrP.02, HuPrP.01, te 6D3 pokazuju sposobnost prepoznavanja rekombinantnog proteina i pojavu karakterističnih bendova između 20-40 kDa.

#### 4.3. Primjenjivost razvijenih monoklonskih protutijela koja prepoznaju rekombinantne proteine za detekciju prirodnog proteina PrP<sup>C</sup>

##### 4.3.1. Primjenjivost razvijenih MoPrP-protutijela za Western blot/Imunoblot analize na staničnim lizatima

MoPrP-protutijela, koja su detektirala mišji rekombinantni pročišćeni protein PrP<sup>C</sup> (*Slika 3.*) su testirana na MEF-staničnim lizatima, kako bi ispitali mogućnost detekcije prirodnog proteina PrP<sup>C</sup> unutar stanice. Klon MoPrP.03 (*Slika 5.*) pokazuje pozitivan signal pojave bendova između 20 i 40 kDa. Međutim, taj signal je značajno slabiji u odnosu na korištene pozitivne kontrole, komercijalna validirana protutijela, D13, D18 i W226, koje pokazuju izuzetno jak pozitivan signal također između 20-40 kDa (*Slika 5.*, trakice 1-3). Pozitivne kontrole, D13 koncentracije 1,5 mg/ml te D18 1

mg/ml, su korištene u razređenju 1:1000, a supernatanti u kojima se nalazi nepoznata količina protutijela, u minimalnom razređenju, 1:1.

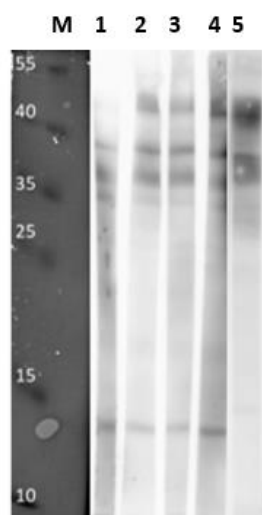


**Slika 5. Western blot analiza MoPrP-monoklonskih protutijela na sposobnost detekcije mišjeg PrP<sup>C</sup> na MEF-staničnim lizatima.** MEF-stanični lizati su nanoseni ili na preparativni gel u količini od 750 µg te zasebno u jažicu po 100 µg. Membrana nastala nakon razdvajanja preparativnog gela je isječena na trakice i inkubirana sa sljedećim MoPrP primarnim protutijelima (1:1 u TBS-T): 1- D13, 2- D18, 3- W226, 4- 1A6, 5- 1B7, 6- 2G6, 7- 2B11, 8- 4E11, 9- MoPrP.01, te MoPrP.03. D13, D18 humana primarna protutijela i W226 protutijelo su korištena kao pozitivne kontrole. Pojava bendova karakterističnih za PrP<sup>C</sup> (20-40 kDa) su vidljiva kod pozitivnih kontrola (1,2,3), te se značajno slabiji signal može zamijetiti klona MoPrP.03.

#### 4.3.2. Primjenjivost razvijenih HuPrP-protutijela za Western blot/Imunoblot analize na staničnim lizatima

HuPrP-protutijela, koja su se pokazala pozitivna na detekciju rekombinantnog humanog PrP<sup>C</sup> (Slika 4.) su testirana na A549-staničnim lizatima kako bi se ispitala mogućnost detekcije pravog proteina PrP<sup>C</sup> unutar stanice. Testirana anti-HuPrP protutijela 3G8, HuPrP.01, HuPrP.02 te HuPrP.04 pokazuju pozitivan signal u usporedbi sa signalom komercijalne,

validirane 3F4-pozitivne kontrole (pojava bendova između 20 i 40 kDa, *Slika 6.*).



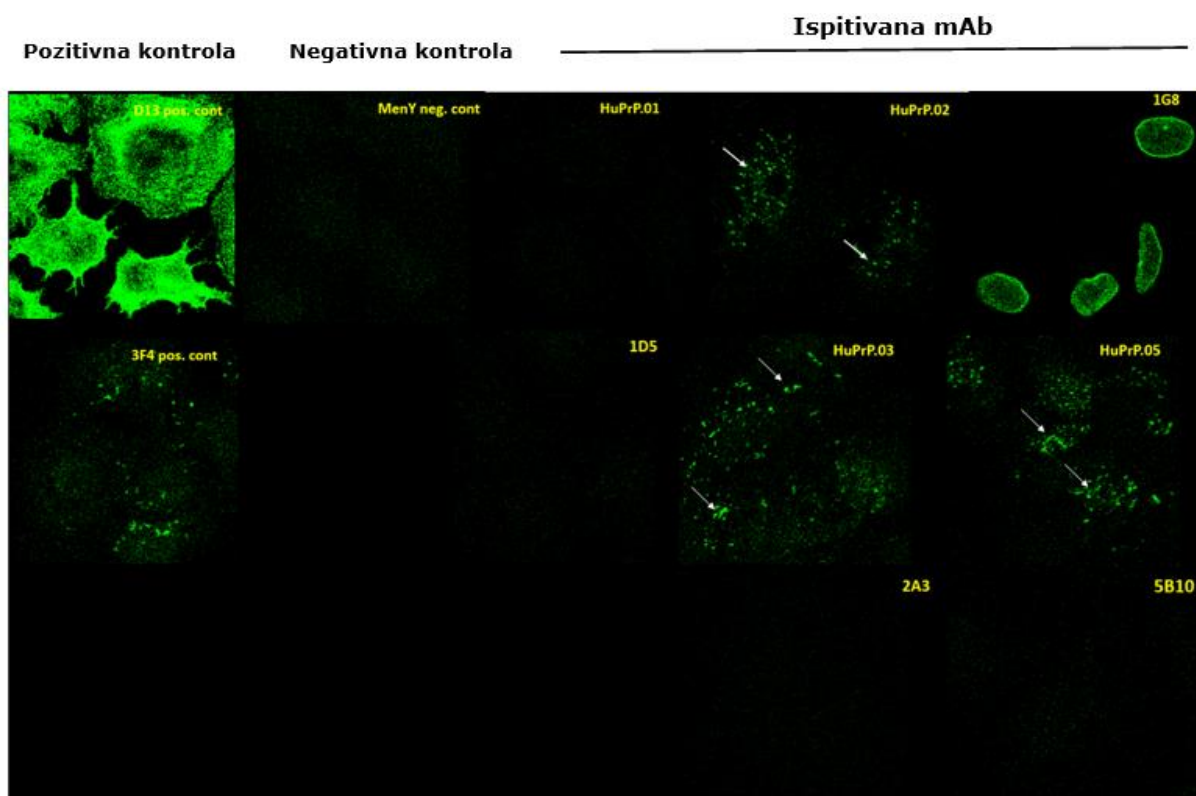
**Slika 6. Western blot analiza HuPrP-monoklonskih protutijela na sposobnost detekcije humanog PrP<sup>C</sup> na A549-staničnim lizatima.** A549-stanični lizati su naneseni na preparativni gel u količini od 500 µg. Membrana je isječena na trakice i inkubirana sa sljedećim HuPrP-primarnim protutijelima (1:1 u puferu TBS-T): 1- 3G8, 2- HuPrP.01, 3- HuPrP.02, 4- HuPrP.04, 5- 3F4. 3F4-protutijelo je korišteno kao pozitivna kontrola. Pojava bendova karakterističnih za PrP<sup>C</sup> (20-40 kDa) je vidljiva kod 3F4-pozitivne kontrole.

#### 4.3.3. Primjenjivost razvijenih protutijela za imunofluorescentnu analizu proteina PrP<sup>C</sup> na stanicama

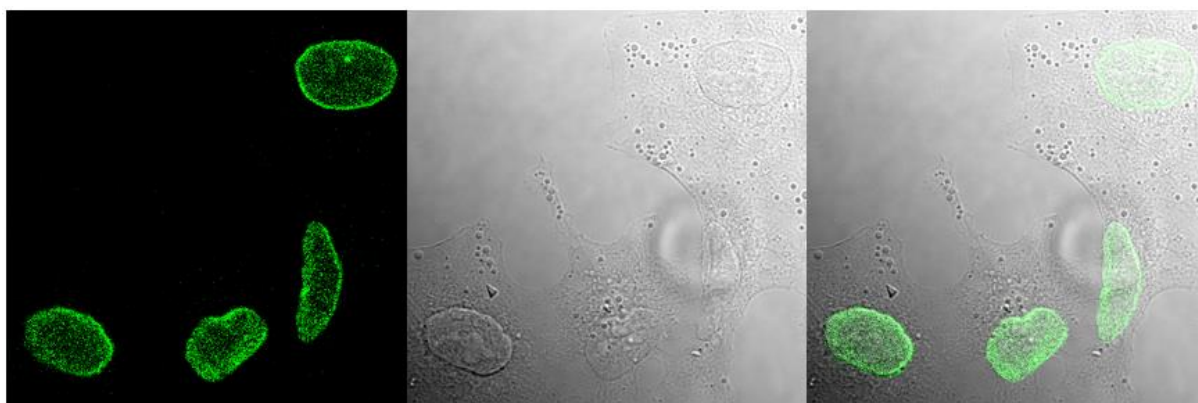
Rezultati ELISA i Western blot/Imunoblot testiranja su ukazali na pozitivnost određenih MoPrP- i HuPrP- protutijela. Pozitivni supernatanti su nadalje testirani u metodi imunofluorescencije, kako bi se ispitala sposobnost detekcije nativnog proteina PrP<sup>C</sup> u mišjim GL261 i humanim A549-staničnim linijama. Sva sekundarna protutijela obilježena su fluoroforom FITC, a sukladno objavljenim rezultatima, signal fluorescencije proteina PrP<sup>C</sup> trebao se nalaziti i na površini i unutrašnjosti stanice (10).

#### 4.3.3.1. Imunofluorescentna analiza HuPrP protutijela na A549 stanicama

A549-stanice su fiksirane s 2,5% PFA i 0,1% TritonX te potom inkubirane HuPrP-supernatantima i 1D5 MoPrP-supernatantom, za kojeg je prethodno ELISA-om pokazano kako prepoznaje i mišji i humani PrP<sup>C</sup>. Komercijalna protutijela D13 i 3F4 su korištena kao pozitivne kontrole, dok je protutijelo koje prepoznaje bakterijski šećer MenY korišteno kao negativna kontrola. Rezultati imunofluorescencije, odnosno detekcije zelenog signala fluorofore FITC, pokazuju pozitivnost HuPrP.02, HuPrP.03 i HuPrP.05 klonova za detekciju PrP<sup>C</sup> u tehnici imunofluorescencije (*Slika 7.*). Signal se pojavljuje na površini i unutar stanice. Anti-HuPrP-protutijelo 1G8 je pokazalo zanimljiv signal u području membrane jezgre, obzirom da isti do sada nije opisan (*Slika 8.*). 1D5-protutijelo nije pokazao pozitivan signal. Pozitivna kontrola, D13- protutijelo, je pokazalo puno jači signal u imunofluorescenciji od pozitivne kontrole 3F4 (*Slika 7.*). Niti jedno novo-razvijeno protutijelo u formi supernatanta, u kojoj nije moguće precizno odrediti količinu protutijela i uz minimalno razrjeđenje 1:1, nije dalo signal koji po jačini odgovara pozitivnoj kontroli D13 (1,5 mg/ml; razrjeđenje 1:200).



**Slika 7. Detekcija humanog proteina PrP<sup>C</sup> monoklonskim protutijelima.** A549-stanice su nasađene u količini od 150 000 st./well, fiksirane 2,5% PFA, permeabilizirane putem detergenta TritonX 100 te inkubirane s HuPrP-supernatantima (1:1 u PBS-u). Komercijalna protutijela D13 i 3F4 na PrP<sup>C</sup> (1:200 u PBS-u) su korištena kao pozitivna kontrola, te MenY kao negativna kontrola (1:1 u PBS-u). PrP<sup>C</sup> je vizualiziran detekcijom zelenog fluorescentnog signala (sekundarno protutijelo obilježeno FITC-om, 1:200 u PBS-u) konfokalnim mikroskopom. Strelice ukazuju na signal FITC-fluorescencije na površini i unutrašnjosti stanice, i detekcije PrP<sup>C</sup> HuPrP.01, HuPrP.03 i HuPrP.05 monoklonskim protutijelima. 1G8-protutijelo pokazuje signal detekcije u području membrane jezgre.

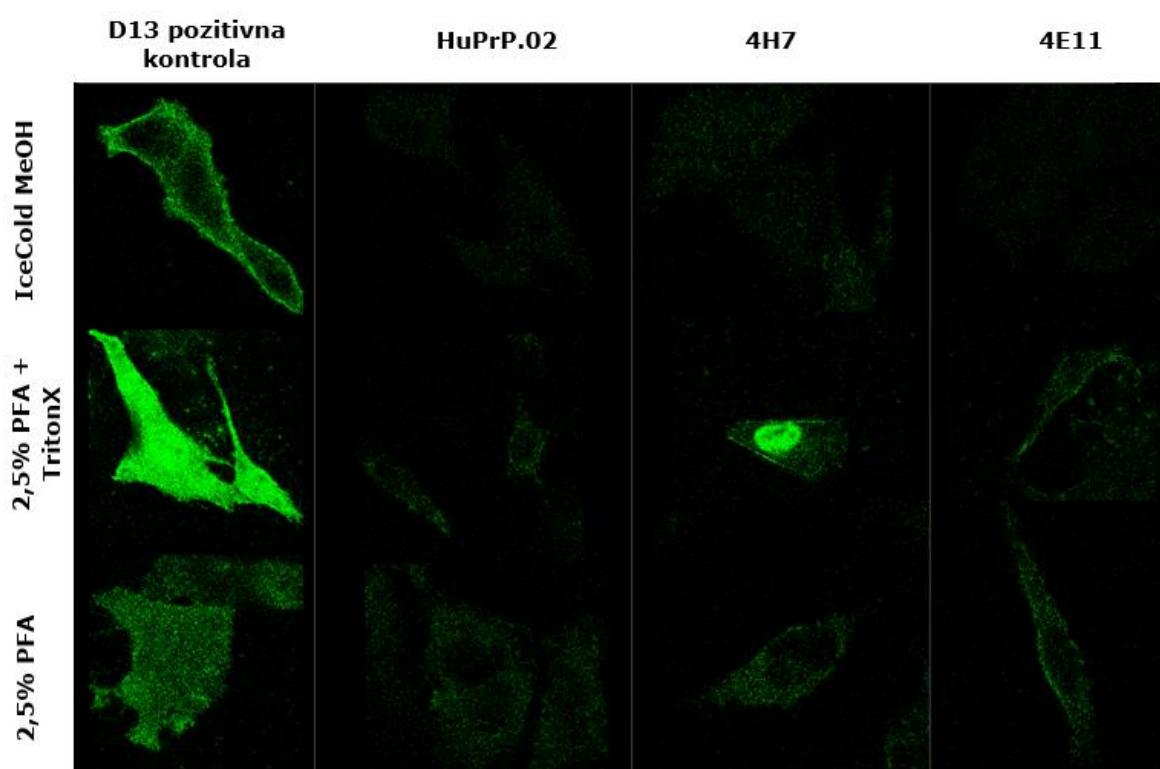


**Slika 8. Anti-HuPrP-protutijelo 1G8 pokazuje signal FITC fluorescencije u području membrane.** A549-stanice su nasadene u količini od 150 000 st./well, fiksirane s 2,5% PFA, permeabilizirane putem detergenta TritonX 100 te inkubirane s HuPrP-supernatantom 1G8 (1:1 u puferu PBS). PrP<sup>C</sup> je vizualiziran detekcijom zelenog fluorescentnog signala (sekundarno protutijelo obilježeno FITC-om, 1:200 u PBS-u) konfokalnim mikroskopom. Preklapanjem native slike stanica i FITC fluorescencije, može se uočiti kako se signal pojavljuje u području membrane jezgre.

#### 4.3.3.2. Imunofluorescentna analiza MoPrP-protutijela na GL261-stanicama

Sukladno činjenicama i postupcima iznesenim u odlomku 4.3.3.1., novo-proizvedena protutijela su testirana i na mišjim staničnim linijama tehnikom imunofluorescencije. Osim ispitivanja djelotvornosti proizvedenih protutijela, istovremeno se ispitalo najoptimalniji način fiksacije stanica radi vizualizacije proteina PrP<sup>C</sup> putem upotrebe pozitivnih kontrola, odnosno komercijalnih protutijela na PrP<sup>C</sup> za koja se zna kako rade u imunofluorescenciji. GL261-stanice su fiksirane na tri različita načina (ledeno-hladnim metanolom, 2,5% PFA i TritonX 100, te 2,5% PFA), kako bi se ispitao najbolji način fiksacije stanica za detekciju FITC-fluorescencije i proteina PrP<sup>C</sup> unutar stanice. Komercijalno protutijelo D13 je korišteno kao pozitivna kontrola. Najjači signal FITC-fluorescencije je zabilježen kod 2,5% PFA i TritonX-fiksacije (*Slika 9.*). Komercijalno protutijelo D13 pokazuje jak signal u imunofluorescenciji i detekciju PrP<sup>C</sup> na površini i unutar stanice. Novo-proizvedena protutijela 4H7 i 4E11 ne pokazuju pozitivan signal kod

fiksacije metanolom, međutim signal se pojavljuje na površini stanice, te nešto malo unutar stanice kod ostala dva načina fiksacije (PFA, PFA+Tx). 4H7-protutijelo pokazuje jači signal u području jezgre kod fiksacije sa 2,5%PFA i TritonX. Za HuPrP.02-protutijelo je ELISA-om pokazano da prepoznaje i mišji i humani PrP<sup>C</sup>, te je imunofluorescencom testirano njegovo prepoznavanje mišjeg PrP<sup>C</sup>. Nije zabilježen pozitivan signal, osim vrlo slab signal prilikom fiksacije s 2,5% PFA.



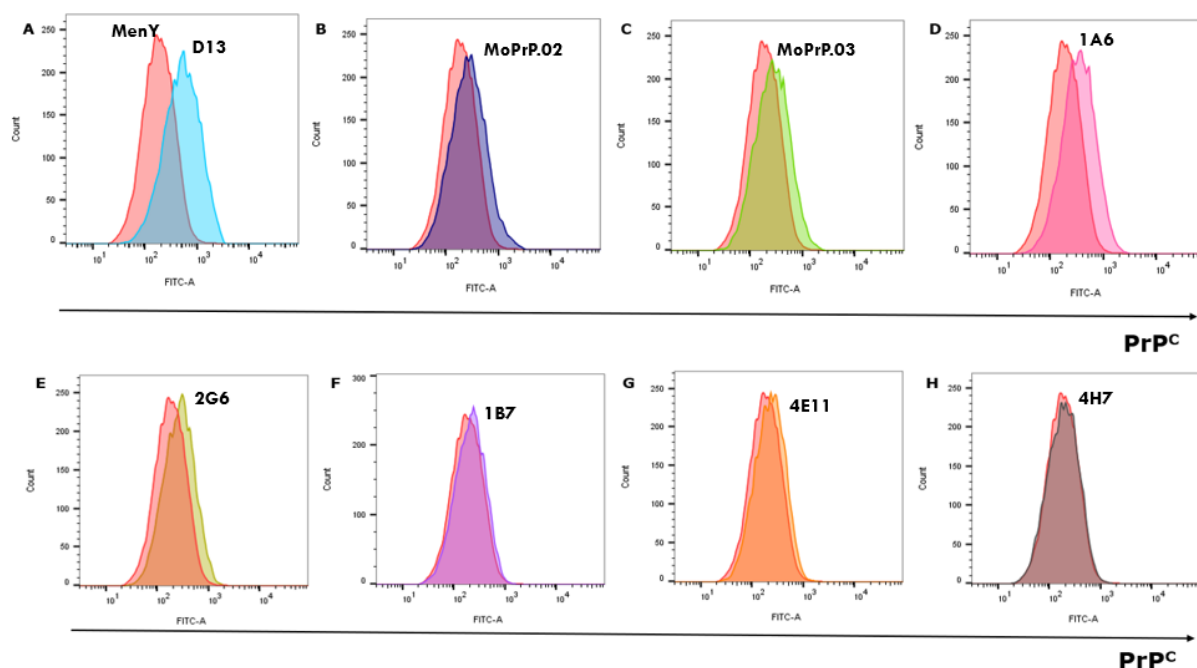
**Slika 9. Detekcija mišjeg proteina PrP<sup>C</sup> monoklonskim protutijelima.** GL261-stanice (150 000 st./well) su fiksirane ledeno-hladnim metanolom, 2,5% PFA i TritonX, i 2,5% PFA, te potom inkubirane s protutijelima 4H7, 4E11 te HuPrP.02 (1:1 u PBS-u). Komercijalno protutijelo D13 na PrP<sup>C</sup> (1:200 u PBS-u) je korišteno kao pozitivna kontrola. PrP<sup>C</sup> je vizualiziran detekcijom zelenog fluorescentnog signala (sekundarno protutijelo obilježeno FITC-om, 1:200 u PBS-u) konfokalnim mikroskopom.

#### 4.3.4. Primjenjivost razvijenih protutijela za analizu proteina PrP<sup>C</sup> protočnom citometrijom

Nakon ispitivanja kandidata novo-proizvedenih protutijela u tehnikama Western blot/Imunoblot i imunofluorescentne mikroskopije pristupili smo analizi stanica protočnim citometrom, uz površinsko bojanje proteina PrP<sup>C</sup>. Za razliku od tehnike Western blot/Imunoblot koja analizira protein u denaturiranom obliku i uglavnom detektira linearne epitope te imunofluorescentne mikroskopije gdje je stanice potrebno fiksirati, tehnika protočne citometrije prepoznaje antigene i na živim stanicama i u njihovom nativnom obliku. Provedena je protočna citometrija, u kojoj je djelotvornost novo-razvijenih mišjih monoklonskih protutijela detektirana pomoću fluorescentnog signala FITC-a konjugiranog na sekundarna anti-mišja protutijela. Protočnom citometrijom su ispitivane GL261 i A549-stanice, koje prirodno ispoljavaju veću količinu proteina PrP<sup>C</sup> na svojoj površini te stanična linija BW-PrP<sup>C</sup>, stabilna transfektanta, ujedno i reporterska stanična linija koja bi trebala sadržavati još veću količinu PrP<sup>C</sup> na staničnoj membrani. Ukoliko monoklonska protutijela prepoznaju PrP<sup>C</sup>, očekujemo snažniji fluorescentni signal u odnosu na kontrolne stanice BW.

Na GL261-stanicama, staničnoj liniji mišjeg glioma, su ispitivana anti-MoPrP-monoklonska protutijela. Komercijalno anti-PrP<sup>C</sup> protutijelo D13 koncentracije 1,5 mg/ml je korišteno kao pozitivna kontrola u razrjeđenju 1:300 te je pokazalo jak pozitivni fluorescentni signal (*Slika 10.A*, plavi pik). Anti-MenY-protutijelo korišteno je kao negativna kontrola, u formi supernatanta, kako bi što bolje odgovaralo samim ispitivanim protutijelima (crveni pik). Pojedina testirana protutijela pokazuju pozitivni pomak FITC-fluorescencije u odnosu na MenY-negativnu kontrolu (*Slika 10.A*, crveni pik). Testirana anti-MoPrP-protutijela: MoPrP.02 (*Slika 10.B*, tamno-plavi pik), MoPrP.03 (*Slika 10.C*, zeleni), 1A6 (*Slika 10.D*, rozi) te 2G6 (*Slika 10.E*, tamno-zeleni), pokazuju pozitivni pomak koji upućuje na pojačanu FITC-fluorescencu u odnosu na MenY-negativnu kontrolu i prepoznavanje mišjeg PrP<sup>C</sup> u GL261 stanicama u metodi protočne citometrije.



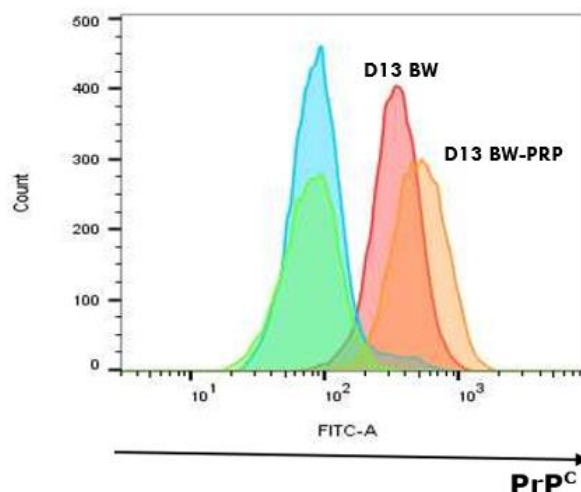


**Slika 10. FACS analiza monoklonskih protutijela na PrP<sup>C</sup> na GL261-staničnoj liniji.**

GL261 stanice (300 000 st./well) su inkubirane s anti-MoPrP mAb u formi supernatanta (1:1) te potom bojane anti-mišjim sekundarnim protutijelom konjugiranim s FITC (1:100). **A** Pročišćeno D13-protutijelo (1,5 mg/ml) je korišteno u razređenju 1:300 kao pozitivna kontrola (plavi pik). Anti-MenY-protutijelo (1:1) je korišteno kao negativna kontrola (crveni pik). **B** MoPrP.02 (tamno-plavo), **C** MoPrP.03 (zeleno), **D** 1A6 (rozo), **E** 2G6 (tamno-zeleno), koji pokazuju pozitivni pomak FITC ekspresije, te **F** 1B7 (ljubičasto), i **G** 4E11 (narančasto), koji pokazuju vrlo mali pomak u odnosu na negativnu kontrolu, te **H** 4E11 (sivo), koji je negativan.

Obzirom na vrlo mali pozitivni signal dobiven analizom GL261 stanične linije s protutijelima na mišji PrP<sup>C</sup>, odlučili smo se ispitati BW-PrP-stanice, transfeciranu staničnu liniju, koja sadrži gen za PrP<sup>C</sup> pod snažnim promotorom i očekujemo da u većoj količini ispoljava protein PrP<sup>C</sup> na površini stanice. Prvo smo ispitali kvalitetu, odnosno pozitivnost BW-PrP-transfektante te je protočnom citometrijom ispitana razina ispoljavanja PrP<sup>C</sup> kod BW-PrP-transfektanta u odnosu na BW-stanice. Pri tome je komercijalno anti-PrP<sup>C</sup> protutijelo D13 korišteno kako bi se usporedila količina PrP<sup>C</sup> kod transfektanti u odnosu na ishodišne BW-stanice. D13-

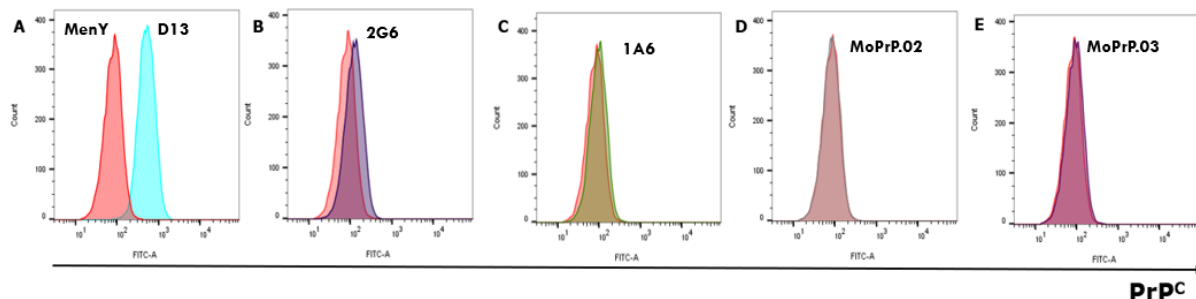
protutijelo praćeno sekundarnim anti-humani IgG FITC protutijelom je kod BW-PrP-transfektanti (*Slika 11.*, narančasti pik) dalo očekivani veći pozitivni pomak FITC-fluorescencije u odnosu na BW-stanice (*Slika 11.*, crveni pik).



**Slika 11. Usporedba PrP<sup>C</sup>-ekspresije kod pozitivne i negativne kontrole u BW i BW-PrP stanicama.** BW i BW-PrP stanice su inkubirane s komercijalnim D13-protutijelom (1,5 mg/ml) na PrP<sup>C</sup> (1:300) kao pozitivnom kontrolom i kontrolom ispoljavanja proteina PrP<sup>C</sup> na transfektanti. D13-protutijelo je bojano anti-humanim sekundarnim protutijelom konjugiranim s FITC (1:100) za vizualizaciju. D13-pozitivna kontrola BW-PrP stanica (narančasti pik) daje veći FITC signal u odnosu na signal BW stanica (crveni pik). Supernatant koji sadrži mAb anti-MenY (1:1) koristio se kao negativna kontrola (plavi i zeleni pik).

Kada smo utvrdili da BW-PrP transfektante ispoljavaju specifično rekombinantni protein mišji PrP<sup>C</sup>, protočnim citometrom smo ispitivali naša novo-proizvedena anti-MoPrP-protutijela na BW-PrP staničnoj liniji. D13-protutijelo je ponovno korišteno kao pozitivna kontrola te daje jak pozitivni fluorescentni signal (*Slika 12.A*, plavi pik). Anti-MoPrP-protutijelo 2G6 pokazuje vrlo mali pomak u odnosu na MenY-negativnu kontrolu (*Slika 12.B*, tamno-plavi pik), a sva ostala protutijela su se pokazala negativnima prilikom testiranja protočnim citometrom na transfeciranoj staničnoj liniji BW-PrP (*Slika 12.C-D*). Zaključujemo kako nismo dobili bolje rezultate korištenjem transfecirane stanične linije u odnosu na mišje stanice GL261. S hipotezom da je mala količina protutijela u supernatantu odgovorna za

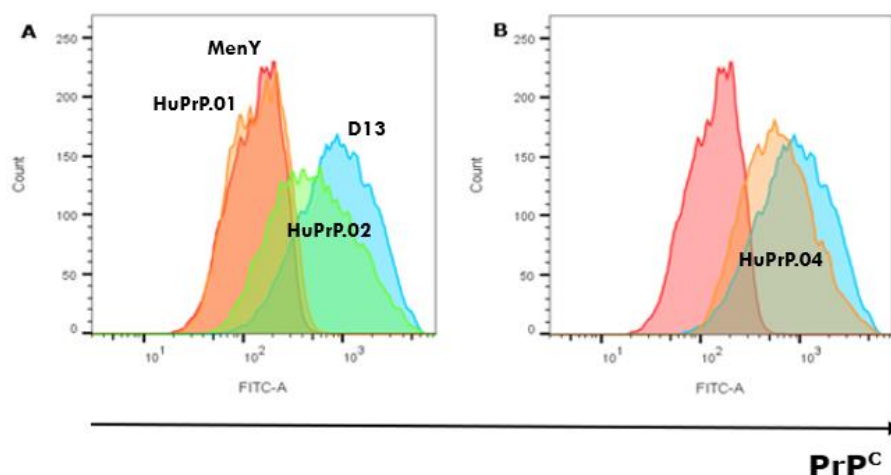
vrlo mali pomak PrP<sup>C</sup> signala, dva protutijela s najvećim pomakom predstavljat će kandidate za proizvodnju, pročišćavanje i koncentriranje.



**Slika 12. FACS-analiza monoklonskih protutijela na PrP<sup>C</sup> i BW-PrP staničnoj liniji.**

BW-PrP transfektante (300 000 st./well) su inkubirane s anti-MoPrP (1:1), te potom bojane anti-mišjim sekundarnim protutijelom konjugiranim sa FITC-om (1:100). **A** D13-protutijelo (1:300) je korišteno kao pozitivna kontrola (plavi pik), dok je MenY-specifično protutijelo (1:1) korišteno kao negativna kontrola (crveni pik). **B** Testirana mAb 2G6 (tamno-plavo), **C** 1A6 (tamno-zeleno), pokazuju mali pomak u odnosu na negativnu kontrolu, te **D** MoPrP.02 (sivi) i **E** MoPrP.03 (ljubičasti), su negativni u odnosu na D13-pozitivnu kontrolu.

Anti-HuPrP-monoklonska protutijela su ispitivana na prepoznavanje humanog PrP<sup>C</sup> u A549-stanicama. D13-protutijelo je ponovno korišteno kao pozitivna kontrola, te pokazuje snažni fluorescentni signal (*Slika 13.* plavi pik). Testirana protutijela HuPrP.02 (*Slika 13.A* zeleni) i HuPrP.04 (*Slika 13.B* narančasti) pokazuju značajan pozitivni pomak FITC fluorescencije u odnosu na MenY-negativnu kontrolu, koji gotovo dostiže fluorescentni signal zabilježen upotrebom pozitivne kontrole. Zaključujemo kako se radi o izvrsnim kandidatima za daljnji razvoj pripravaka protutijela za korištenje u protočnoj citometriji.



**Slika 13. FACS analiza monoklonskih protutijela na PrP<sup>C</sup> i A549 staničnoj liniji.**

A549 stanice (300 000 st./well) su inkubirane s HuPrP mAb (1:1), te potom bojane anti-mišjim sekundarnim protutijelom konjugiranim sa FITC-om (1:100). D13-protutijelo (1:300) je korišteno kao pozitivna kontrola (plavi pik), dok je MenY- specifično protutijelo (1:1) korišteno kao negativna kontrola (crveni pik). **A** Testirana mAb protočnom citometrijom su HuPrP.01 (narančasti) i HuPrP.02 (zeleni), od kojih HuPrP.02 pokazuje pozitivni pomak u odnosu na negativnu kontrolu. **B** Testirano mAb HuPrP.04 (narančasti) pokazuje pozitivni pomak FITC fluorescencije.

## 5. Rasprava

U zadnjih 30-tak godina opsežnih istraživanja nije se uspjelo razriješiti pitanje ključne fiziološke funkcije i molekularnih mehanizama pod kontrolom proteina PrP<sup>C</sup> te razlučiti uloge njegovih različitih formi (4). Različite vrste stanica ispoljavaju PrP<sup>C</sup>, pri čemu se obzirom na činjenicu kako je povezan s nastankom Creutzfeld-Jacobsonove bolesti (CJD) najviše ispituje njegova uloga u centralnom živčanom sustavu. Novije spoznaje ukazuju kako bi PrP<sup>C</sup> mogao imati utjecaj na tijek imunološkog odgovora (5). Prilikom izrade ovog diplomskog rada, cilj je bio uspostaviti alate i osnove metoda za izučavanje proteina PrP<sup>C</sup> na stanicama u svrhu budućih ispitivanja uključenosti ovog proteina u interakcije na stanicama i sa stanicama imunološkog sustava.

Zanimljivo je pitanje lokalizacije proteina PrP<sup>C</sup>, obzirom da se osim na membrani stanice može pronaći u mnogobrojnim unutarstaničnim odjeljcima (10). Stoga se još uvijek radi na uspostavljanju novih metoda za istraživanje vrlo kompleksnog PrP<sup>C</sup>-interaktoma, detekcije pojedinih formi proteina unutar stanice (27) te uspostavi prikladnih staničnih modela za njegovo proučavanje (5). U sklopu ovog diplomskog rada, napravljen je početni probir novo-proizvedenih monoklonskih protutijela na mogućnost prepoznavanja mišjeg ili humanog proteina PrP<sup>C</sup> u različitim staničnim linijama, kako bi se obećavajući kandidati mogli dalje razvijati i upotrebljavati u različitim metodama i tehnikama prilikom istraživanja samog proteina. Nakon imunizacije životinja sa ciljnim imunogenima, obzirom da se istovremeno ispitivalo protutijela na mišju i humanu inačicu proteina PrP<sup>C</sup>, novo-proizvedena anti-PrP<sup>C</sup> protutijela su prvo ispitana na prepoznavanje imunogena, rekombinantnih proteina PrP<sup>C</sup> koji su korišteni prilikom imunizacije. ELISA-testiranja (*Tablice 4. i 5.*) i Western blotovi anti-MoPrP i anti-HuPrP-protutijela na prepoznavanje rekombinantnog mišjeg i humanog PrP<sup>C</sup> (*Slike 3. i 4.*) su pokazali više pozitivnih kandidata, koji su nadalje testirani na prepoznavanje prirodnog antigena, odnosno mišjeg i humanog PrP<sup>C</sup> u staničnim linijama. Anti-HuPrP-protutijela 3G8, HuPrP.01,

HuPrP.02 te HuPrP.04 su u Western blot metodi pokazali pozitivni signal detekcije humanog PrP<sup>C</sup> u A549-staničnom lizatu i pojavu karakterističnih bendova između 20 i 40 kDa (*Slika 6.*), te je signal ispitivanih protutijela istovjetan signalu komercijalnog anti-PrP<sup>C</sup> protutijela 3F4, korištenog kao pozitivna kontrola. Što se tiče anti-MoPrP-protutijela, klon MoPrP.03 je pokazao pozitivni signal detekcije mišjeg PrP<sup>C</sup> u MEF-staničnom lizatu i pojavu karakterističnih bendova za PrP<sup>C</sup> (između 20-40 kDa, *Slika 5.*), međutim nije se uspjela postići kvaliteta signala komercijalnih anti-PrP<sup>C</sup> protutijela D13, D18 i W226, korištenih kao pozitivne kontrole. Dakle, usprkos nizu obećavajućih kandidata-protutijela koja su prepoznavala rekombinantni mišji protein PrP<sup>C</sup>, prilikom ispitivanja Western blotom mnoga su pokazala gubitak prepoznavanja prirodnog PrP<sup>C</sup> u staničnim lizatima te je samo MoPrP.03-protutijelo uspjelo detektirati slabiji signal (*Slika 5.*). Činjenica je da obzirom na velik broj glikoformi PrP<sup>C</sup>, Western blot analiza proteina ne daje jasni signal u vidu jedne vrpce, već se radi o razmazu (engl. *Smear*) koji u najboljem slučaju dopušta razlikovanje tri dominantne glikoforme te je teže identificirati pozitivna protutijela. Rekombinantni pročišćeni protein koji je korišten kao imunogen prilikom proizvodnje protutijela je proizveden pomoću sustava *E. Coli* te se radi o neglikoziliranoj formi rekombinantnog PrP<sup>C</sup>. Pomoću prokariotskog sustava za ispoljavanje rekombinantnih proteina je teže postići kompleksnije post-translacijske modifikacije, primjerice glikozilaciju (28). PrP<sup>C</sup> se unutar eukariotske stanice, u svojoj prirodnoj okolini, osim u neglikoziliranoj formi, može pojaviti kao mono- i di-glikozilirana, pri čemu se neglikozilirana forma nalazi pri ~23 kDa, mono-glikozilirana pri ~28 kDa te di-glikozilirana pri ~35 kDa (29). Obzirom da su monoklonska protutijela proizvedena pomoću imunizacije životinje rekombinantnim PrP<sup>C</sup> proteinom proizvedenim u prokariotskim stanicama, takvu će formu proteina protutijela bolje prepoznavati u odnosu na prirodni protein koji sadrži kompleksniji obrazac glikozilacije, kakav se najčešće pojavljuje unutar stanica. Osim analize Western blotom, u kojoj se protein PrP<sup>C</sup> nalazi u denaturiranom obliku, provela se analiza protočnim citometrom na prepoznavanje nativnog

antigena na mišjim staničnim linijama GL261 i BW te BW-PrP transfektantama (ujedno reporterskoj staničnoj liniji), za koje se očekivalo da ispoljavaju veću količinu PrP<sup>C</sup> u odnosu na BW stanice te također na humanim A549-stanicama. Ispitivanja anti-HuPrP-protutijela protočnim citometrom na humanim A549-stanicama pokazuju najbolje rezultate svih testiranih protutijela. Protutijela HuPrP.02 i HuPrP.04 su pokazali jak pozitivni pomak FITC fluorescencije u odnosu na MenY-negativnu kontrolu (*Slika 13.A i B*). Ispitivanja anti-MoPrP-protutijela na GL261-stanicama su pokazala pozitivni pomak FITC-signal protutijela 1A6, 2G6 te MoPrP.02 i MoPrP.03 klonova (*Slika 10.B-E*), u odnosu na signal MenY-negativne kontrole. Navedena protutijela na humani protein PrP<sup>C</sup> pokazuju veliki potencijal za daljnje razvijanje i korištenje za buduće analize PrP<sup>C</sup> u metodi protočne citometrije dok je kod protutijela na mišji protein PrP<sup>C</sup> upitno hoće li protutijela-kandidati kada jednom budu pripravljeni u većoj koncentraciji moći svojom kvalitetom zamijeniti komercijalna protutijela.

Treba naglasiti kako u metodi protočne citometrije protutijela prepoznaju native antigene na živim stanicama, za razliku od linearnih antigena koje detektiramo u metodi Western blot, nakon što su proteini-antigeni prošli postupak razdvajanja u denaturirajućim uvjetima u prisutstvu detergenta SDS. Protočnim citometrom se također potvrdilo veće ispoljavanje PrP<sup>C</sup> kod BW-PrP transfektanta, obzirom da je zabilježen jači pomak FITC fluorescencije D13-pozitivne kontrole BW-PrP stanica u odnosu na D13-signal BW stanica (*Slika 11.*). Ovo je potvrdilo kako se radi o pravilno transfeciranoj staničnoj liniji koja prekomjerno ispoljava gen za sintezu PrP<sup>C</sup>. Međutim, analiza slabo pozitivnih anti-MoPrP protutijela na BW-PrP stanicama protočnim citometrom je pokazala negativnost većine testiranih supernatanta (*Slika 12.*). Moguće da je ubačeni gen za sintezu PrP<sup>C</sup> u BW-PrP transfektantama, obzirom da se radilo o pokušaju stvaranja reporterske stanične linije u kojoj bi protein PrP<sup>C</sup> bio nadovezan na citoplazmatsku domenu drugog proteina, koji može signalirati putem lučenja IL-2, malo promijenjen te je doveo do promjene nativnog proteina kojeg naša

protutijela u takvom obliku nisu mogla prepoznati. Obzirom da je pokazano veće ispoljavanje PrP<sup>C</sup> kod BW-PrP stanica putem protutijela koje smo koristili kao pozitivnu kontrolu, te se transfecirane stanice u budućnosti vjerojatno mogu koristiti kao reporterska stanična linija, prilikom istraživanja PrP<sup>C</sup> interaktoma. Kod takvih staničnih linija dolazi do otpuštanja interleukina 2 (IL-2) kao detektirajućeg signala ukoliko je došlo do interakcije s metom od interesa (14). Uspostavom takvog reporterskog modela moglo bi se doći do saznanja o interakciji PrP<sup>C</sup>, primjerice koe-kultivacijom sa specifičnim stanicama „metama“ ili potencijalnim partnerima u vidu solubilnih proteina. Treba naglasiti kako bi idealna stanična linija za korištenje kao reporterski sustav bila ona koja uopće ne ispoljava PrP<sup>C</sup>, međutim očito je kako korištene BW-stanice prirodno ispoljavaju PrP<sup>C</sup> (*Slika 11.*). Naime, sama transformacija stanica predstavlja veliki stres za stanicu te se u takvim uvjetima također inducira PrP<sup>C</sup>. Sukladno tome, stanične linije koje uopće ne ispoljavaju PrP<sup>C</sup> je teško napraviti, osim ako se prethodno gen u potpunosti ukloni iz genoma stanica.

Kako bi se ispitala mogućnost prepoznavanja unutarstaničnog PrP<sup>C</sup> novo-proizvedenim protutijelima u metodi imunofluorescencije te također pratila lokalizacija PrP<sup>C</sup> u stanici, pratio se FITC-fluorescentni signal konfokalnim mikroskopom. Analiza ispitivanih anti-HuPrP-protutijela imunofluorescencijom na humanim A549-stanicama je pokazala pozitivnost HuPrP.02, HuPrP.03 te HuPrP.05 klonova (*Slika 7.*) s obzirom na signal komercijalnih anti-PrP<sup>C</sup> protutijela D13 i 3F4. Detektirani FITC-signal se pojavljuje najviše na površini, međutim i unutrašnjosti stanica – pri tome i u citosolu i u jezgrenom prostoru (*Slika 7.*), što se slaže s prethodnim publiciranim rezultatima o lokalizaciji različitih formi proteina PrP<sup>C</sup>. Također je uočeno kako je komercijalno anti-PrP<sup>C</sup> protutijelo D13 dalo puno jači FITC-signal u odnosu na komercijalno 3F4-protutijelo te je pogodnije za korištenje u metodi imunofluorescencije. Također, 3F4-protutijelo se pokazalo pogodnijim za korištenje u Western blotu (26), što se uočava u rezultatima ispitivanja anti-HuPrP-protutijela na humanim staničnim



lizatima (*Slika 6.*). Početnim probirom novo-proizvedenih protutijela identificirali smo pojedine kandidate za detekciju staničnog PrP<sup>C</sup> u različitim tehnikama ispitivanja, pri čemu su pojedini kandidati pokazali efikasnost u Western blotu, pojedini u metodi protočne citometrije, dok su pojedina protutijela bila uspješnija za praćenje lokalizacije PrP<sup>C</sup> metodom imunofluorescencije. Međutim, niti jedno ispitivano protutijelo nije uspjelo postići signal pozitivne kontrole D13. Očekujemo kako je signal detekcije novo-razvijenim kandidatima protutijela bio slabiji zbog manje količine protutijela koja se nalazila u testnom uzorku, obzirom da se radi o supernatantima s nepoznatom količinom protutijela, dok je koncentracija pozitivne kontrole bila točno određena i vrlo visoka. Supernatante, koji su pokazali pozitivnost u pojedinim metodama ispitivanja bi valjalo pročititi, koncentrirati te ponovno ispitati.

Što se tiče komercijalnih pozitivnih kontrola, D13-protutijelo se pokazalo optimalnom pozitivnom kontrolom u sve tri provedene metode (Western blot, imunofluorescencija te protočna citometrija) i za humane i mišje stanične linije. D13-protutijelo je inače razvijeno za detekciju patološke forme proteina sa ciljem imunološke terapije prionskih bolesti te je predstavljalo jedan od kandidata s najboljim svojstvima uopće. Međutim, kroz studije je dokazana neurotoksična aktivnost protutijela te se prestalo razvijati u terapijske svrhe (30). 3F4-protutijelo se pokazalo odličnom pozitivnom kontrolom za humane stanice u Western blot metodi, dok je u imunofluorescenciji optimalniji signal dalo D13-protutijelo (*Slika 7.*). 3F4 protutijelo se u zadnjih dvadesetak godina koristi za proučavanje biologije normalnog proteina, ali i patoloških formi PrP<sup>C</sup> povezanih s nastankom prionskih bolesti te prepoznaje humani PrP<sup>C</sup> (26). Uz D13-protutijelo se u Western blot metodi za detekciju PrP<sup>C</sup> u mišjim staničnim linijama pokazali optimalnim D18 i W226 komercijalna protutijela kao pozitivne kontrole. Obzirom na validirane pozitivne kontrole, testiranja naših protutijela pokazuju nekolicinu potencijalnih kandidata za daljnji razvoj i korištenje u navedenim metodama za istraživanje bioloških uloga PrP<sup>C</sup>.

Osim PrP<sup>C</sup>-lokalizacije, metodom imunofluorescencije je ispitivan optimalan način fiksacije stanica te prepoznavanje mišjeg PrP<sup>C</sup> anti-MoPrP-protutijelima u GL261-staničnoj liniji. Komercijalna anti-PrP<sup>C</sup> protutijela D13 i 3F4 su korištena kao pozitivne kontrole, obzirom da je za njih poznata djelotvornost u metodi imunofluorescence. Stanice su fiksirane na tri različita načina: ledeno-hladnim metanolom, 2.5% PFA te 2.5% PFA uz 0.1% detergent TritonX, kako bi se ispitalo utječe li način fiksacije na jačinu signala FITC-fluorescencije. Na *Slici 9.* se može uočiti kako je najveći signal D13-pozitivne kontrole bio kod fiksacije s 2.5% PFA + TritonX, što se vidi i kod ispitivanih anti-MoPrP-protutijela, HuPrP.02, 4H7 i 4E11. D13-pozitivna kontrola pokazuje detekciju PrP<sup>C</sup> na površini i unutrašnjosti stanice (*Slika 9.*), što je u skladu s prethodno publiciranim literaturnim nalazima. Kod ostalih načina fiksacije testirana protutijela su većinom davala vrlo slab ili negativan FITC-signal. Fiksacija stanica paraformaldehidom dovodi do umreživanja proteina (engl. *cross-linking*) i očuvanja njihove strukture te u teoriji ne dolazi do većih promjena stanične strukture. Prilikom takvog načina fiksacije, stanična membrana ostaje intaktna, tako da su unutarstanične komponente nepristupačne primjerice za detekciju protutijelima. Kako bi unutarstanične komponente postale dostupne protutijelima, osim fiksacije stanica paraformaldehidom koriste se razni detergents (kao što su Triton X, Tween 20 i Saponin), koji dovode do permeabilizacije i stvaranja pora u staničnoj membrani. Fiksacija metanolom dovodi do istovremene fiksacije i permeabilizacije stanica pri čemu se radi o metodi koja je mnogo agresivnija prema epitopima u odnosu na fiksaciju s paraformaldehidom koja se općenito smatra jednim od najblažih načina fiksacije (31). U našim eksperimentima se najboljim načinom detekcije FITC-signala u metodi imunofluorescence pokazao onaj koji uključuje fiksaciju s PFA uz permeabilizaciju stanica Triton X-om, obzirom da su protutijela imala pristup i membranskom i unutarstaničnom PrP<sup>C</sup>.

Posebice zanimljiv pozitivni FITC-signal u području membrane jezgre je dalo anti-HuPrP-protutijelo 1G8 u metodi imunofluorescencije (*Slika 8.*), obzirom da kod lokalizacije proteina PrP<sup>C</sup> takav signal još nije opisan. Istraživanja unutarstaničnog transporta navode kolokalizaciju PrP<sup>C</sup> s ER, Golgijem i endosomima te Rab5<sup>+</sup> ranim endosomima, što upućuje na stalno kruženje PrP<sup>C</sup> sa membrane do unutrašnjih dijelova stanice i obrnuto. Sukladno tome, pojedine studije su detektirale PrP<sup>C</sup> u perinuklearnom prostoru, nakon prolaska kroz Rab5<sup>+</sup> rane endosome. Jedna od postavljenih hipoteza je kako do nakupljanja PrP<sup>C</sup> u perinuklearnom prostoru dolazi zbog uloge proteina PrP<sup>C</sup> kod vezanja i otpuštanja iona bakra, koje je pH osjetljivo i zahtjeva nizak pH te su takvi uvjeti optimalani u perinuklearnom prostoru i endosomima (10). Pitanje je zbog kojeg bi razloga došlo do povremenog nakupljanja PrP<sup>C</sup> u području membrane jezgre te koju bi ulogu u takvim uvjetima obavljao PrP<sup>C</sup>. Obzirom na rezultate sa cijelim nizom validiranih protutijela na PrP<sup>C</sup> koja su do sada korištena za njegovu lokalizaciju, sigurno je da u slučaju kako je naše 1G8-protutijelo specifično za PrP<sup>C</sup>, radi o nekoj vrlo specifičnoj formi ovog proteina. Dodatno, smatramo kako bi protutijelo moglo biti specifično za PrP<sup>C</sup>, obzirom da je osim na A549-stanicama pokazalo identičan signal detekcije na MDA-staničnoj liniji (rezultati nisu prikazani). PrP<sup>C</sup> se u stanici pojavljuje u mnogo različitih formi proteina, od transmembranskog preko usidrenog do solubilnog, u citoplazmi i u jezgri, s različitim fragmentima N- i C-terminalnog dijela proteina te u cijelom nizu različitih glikoformi i stoga je teže utvrditi pozitivnost novo-proizvedenih protutijela. Obzirom na dobivene rezultate, otvaraju se nova pitanja i potencijalna istraživanja o lokalizaciji PrP<sup>C</sup> te pronalasku novih, specifičnih formi proteina unutar stanice.

## 6. Zaključak

Stanični prion protein, PrP<sup>C</sup>, je važna komponenta različitih stanica te se njegov značaj očituje u širokom spektru interakcijskih partnera i potencijalnih staničnih procesa u kojima sudjeluje (9). Obzirom da je njegova biološka uloga nedovoljno ispitana, potrebni su novi alati i modeli za istraživanje. Stoga je ovim radom ispitana mogućnost prepoznavanja mišjeg i humanog PrP<sup>C</sup> novo-proizvedenim monoklonskim protutijelima u različitim metodama, Western blot/imunoblot, imunofluorescenca te protočna citometrija, kako bi se protutijela mogla koristiti za buduća ispitivanja PrP<sup>C</sup>.

1. Klon MoPrP.03 pokazuje najveći potencijal prepoznavanja mišjeg PrP<sup>C</sup> u MEF-staničnim lizatima u Western blot metodi.
2. Anti-HuPrP-protutijela HuPrP.01, HuPrP.02 te HuPrP.04 pokazuju najveću sposobnost prepoznavanja humanog PrP<sup>C</sup> Western blot metodom.
3. Anti-HuPrP-protutijela HuPrP.01, HuPrP.02 te HuPrP.04 pokazuju pozitivni signal u metodi imunofluorescencije.
4. Anti-HuPrP-protutijela HuPrP.02 i HuPrP.04 pokazuju pozitivan signal u metodi protočne citometrije, usporediv sa signalom najboljih dostupnih komercijalnih protutijela.
5. Fiksacija stanica s 2.5% PFA i 0.1% TritonX se pokazala najboljim načinom za prepoznavanja PrP<sup>C</sup> protutijelima u metodi imunofluorescencije.
6. Pojedina anti-HuPrP i anti-MoPrP-protutijela su detektirala PrP<sup>C</sup> lokaliziran na površini i unutrašnjosti stanica, s posebno zanimljivom pojavom fluorescencije dobivene vezivanjem anti-HuPrP-protutijela 1G8 u području membrane jezgre.

Ovaj rad ukazuje na nove potencijalne kandidate u razvoju monoklonskih protutijela koja prepoznaju humani i mišji protein PrP<sup>C</sup> te upućuje na tehnike za njihovu upotrebu u daljnjim istraživanjima PrP<sup>C</sup>.

**Tablica 7. Krajnji rezultati testiranja monoklonskih protutijela na mišji i humani PrP<sup>C</sup> otkrivaju potencijalne kandidate za daljnji razvoj. A** MoPrP.03-protutijelo na mišji PrP<sup>C</sup> pokazuje najbolje rezultate za daljnji razvoj, te **B** HuPrP.01, HuPrP.02 te HuPrP.04 protutijela pokazuju najveću sposobnost prepoznavanja humanog PrP<sup>C</sup> te najbolje rezultate za daljnji razvoj.

**A)**

| MoPrP                             | 1D5           | 3B10 | 1A6 | 1B7 | 2G6 | 4 E11 | MoPrP.01 (3B10) | MoPrP.02 (3B10) | MoPrP.03 (1D5) |
|-----------------------------------|---------------|------|-----|-----|-----|-------|-----------------|-----------------|----------------|
| <b>ELISA</b>                      | +             | +    | +   | +   | +   | +     | +               | +               | +              |
| WB rekombinantni PrP <sup>C</sup> | +             | +    | +   | +   | +   | -     | +               | /               | /              |
| WB stanični lizati                | -             | +    | -   | -   | -   | -     | -               | -               | +              |
| <b>FACS</b>                       | BW-PrP st.    | /    | /   | /   | /   | -     | -               | -               | -              |
|                                   | GL261st.      | /    | /   | /   | +   | -     | +               | /               | +              |
| <b>IF</b>                         | Ice-cold MeOH | /    | /   | /   | /   | -     | -               | /               | /              |
|                                   | 2,5% PFA      | /    | /   | /   | /   | +     | +               | /               | /              |
|                                   | 2,5% PFA + TX | /    | /   | /   | /   | +     | +               | /               | /              |

**B)**

| HuPrP                             | 3G8 | 6D3 | 6D4 | HuPrP.01 (3G8) | HuPrP.02 (6D3) | HuPrP.03 (6D3) | HuPrP.04 (6D4) | HuPrP.05 (6D4) |
|-----------------------------------|-----|-----|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>ELISA</b>                      | +   | +   | +   | +              | +              | +              | +              | +              |
| WB rekombinantni PrP <sup>C</sup> | /   | +   | /   | +              | +              | /              | +              | /              |
| WB stanični lizati                | +   | /   | /   | +              | +              | /              | +              | /              |
| <b>FACS</b>                       | /   | /   | /   | -              | +              | /              | +              | /              |
| <b>IF</b>                         | /   | /   | /   | -              | +              | +              | /              | +              |

## 7. Literatura

- 1 Wulf M-A, Senatore A, Aguzzi A. The biological function of the cellular prion protein: an update. *BMC Biol* 2017; **15**.
- 2 Isaacs JD, Jackson GS, Altmann DM. The role of the cellular prion protein in the immune system. *Clin Exp Immunol* 2006; **146**: 1.
- 3 Riesner D. Biochemistry and structure of PrPC and PrPSc. *Br Med Bull* 2003; **66**: 21–33.
- 4 Bakkebø MK, Mouillet-Richard S, Espenes A, Goldmann W, Tatzelt J, Tranulis MA. The Cellular Prion Protein: A Player in Immunological Quiescence. *Front Immunol* 2015; **6**. doi:10.3389/fimmu.2015.00450.
- 5 Grassmann A, Wolf H, Hofmann J, Graham J, Vorberg I. Cellular Aspects of Prion Replication In Vitro. *Viruses* 2013; **5**: 374.
- 6 Acevedo-Morantes CY, Wille H. The Structure of Human Prions: From Biology to Structural Models — Considerations and Pitfalls. *Viruses* 2014; **6**: 3875.
- 7 Pastore A, Zagari A. A Structural Overview of the Vertebrate Prion Proteins. *Prion* 2007; **1**: 185.
- 8 Watts JC, Bourkas MEC, Arshad H. The function of the cellular prion protein in health and disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 2018; **135**: 159–178.
- 9 Linden RD, Martins VR, Prado MAM, Cammarota M, Izquierdo IA, Brentani RR. Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 2008; **88**: 673–728.
- 10 Magalhães AC, Silva JA, Lee KS, Martins VR, Prado VF, Ferguson SSG *et al.* Endocytic Intermediates Involved with the Intracellular Trafficking of a Fluorescent Cellular Prion Protein. *J Biol Chem* 2002; **277**: 33311–33318.
- 11 Rudd PM, Endo T, Colominas C, Groth D, Wheeler SF, Harvey DJ *et al.* Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 13044.
- 12 Yi C-W, Wang L-Q, Huang J-J, Pan K, Chen J, Liang Y. Glycosylation Significantly Inhibits the Aggregation of Human Prion Protein and Decreases Its Cytotoxicity. *Sci Rep* 2018; **8**: 12603.
- 13 Das AS, Zou W-Q. Prions: Beyond a Single Protein. *Clin Microbiol Rev* 2016; **29**: 633.

- 14 Elias S, Kahlon S, Duev-Cohen A, Mandelboim O. A BW Reporter System for Studying Receptor-Ligand Interactions. *JoVE J Vis Exp* 2019; :
- 15 Surjit Singh, Nitish K. Tank, Pradeep Dwiwedi, Jaykaran Charan, Rimplejeet Kaur, Preeti Sidhu *et al.* Monoclonal Antibodies: A Review. *Curr Clin Pharmacol* 2018; **13**: 85–99.
- 16 Didonna A, Venturini AC, Hartman K, Vranac T, Šerbec VČ, Legname G. Characterization of four new monoclonal antibodies against the distal N-terminal region of PrPc. *PeerJ* 2015; **3**.
- 17 Lerner EA. How to make a hybridoma. *Yale J Biol Med* 1981; **54**: 387.
- 18 Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med* 2018; **72**: 32.
- 19 Information NC for B, Pike USNL of M 8600 R, MD B, Usa 20894. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull World Health Organ* 1976; **54**: 129.
- 20 Donaldson JG. Immunofluorescence Staining. *Curr Protoc Cell Biol Editor Board Juan Bonifacino Al* 2001; **0 4**: Unit.
- 21 Jonkman J, Brown CM. Any Way You Slice It—A Comparison of Confocal Microscopy Techniques. *J Biomol Tech JBT* 2015; **26**: 54.
- 22 BD Biosciences. *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide*. Becton, Dickinson and Company, 2002.
- 23 Anti-Mouse Prnp Therapeutic Antibody (D13). <https://www.creativebiolabs.net/pdf/MRO-943LC.pdf>.
- 24 Anti-Mouse Prnp Therapeutic Antibody (D18). <https://www.creativebiolabs.net/pdf/MRO-944LC.pdf>.
- 25 Anti-Mouse Prnp Therapeutic Antibody (W226). <https://www.creativebiolabs.net/pdf/MRO-952LC.pdf>.
- 26 Lund C, Olsen CM, Tveit H, Tranulis MA. Characterization of the prion protein 3F4 epitope and its use as a molecular tag. *J Neurosci Methods* 2007; **165**: 183–190.
- 27 Tahsin KN, Hasan R, Khan S. Comparative Study on Prion Protein Detection Methods Using Biosensor Technology for Beef and Its Edible Products. *Am J Biomed Life Sci* 2018; **6**: 1.
- 28 Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 2014; **5**.

29 Peralta OA, Eyestone WH. Quantitative and qualitative analysis of cellular prion protein (PrPC) expression in bovine somatic tissues. *Prion* 2009; **3**: 161.

30 Regina R. Reimann, Tiziana Sonati, Simone Hornemann, Uli S. Herrmann, Michael Arand, Simon Hawke *et al.* Differential Toxicity of Antibodies to the Prion Protein. *PLOS Pathog* 2016; **12**.

31 An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging | Elsevier Enhanced Reader.



## 8. Životopis

### OSOBNJE INFORMACIJE

Andrea Mihalić



📍 Kvarnerska 3, 51523 Baška, Otok Krk (Hrvatska)

☎ + (385) 91 95 19 947

✉ [amihalic995@gmail.com](mailto:amihalic995@gmail.com)

Spol Ž | Datum rođenja 05.10.1995. | Državljanstvo Hrvatica

### RADNO ISKUSTVO

Travanj 2019.- Lipanj 2019.

**Rad u laboratoriju, Centar za proteomiku (Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka, Hrvatska)**

- **Mentor:** dr.sc. Tihana Lenac Roviš
- Pisanje diplomskog rada s temom istraživanja staničnog prionskog proteina PrP<sup>C</sup>, razvoja i validacije monoklonskih protutijela te upotreba transfeciranih staničnih linija za proučavanje biologije PrP<sup>C</sup>
- **Stečeno laboratorijsko iskustvo:** rad u staničnim kulturama, biokemijske analize proteina u uzorku, SDS-PAGE elektroforeza i Western blot, protočna citometrija, imunofluorescencija i analiza konfokalnim mikroskopom.

Siječanj 2019.

**Demonstratorica na kolegiju Fizikalna kemija (Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Rijeka, Hrvatska)**

- Pomoć pri održavanju laboratorijskih vježbi (spektrofotometrija, potenciometrijska titracija, potenciometrija)

Veljača 2018

**Demonstratorica na kolegiju Fizikalna kemija (Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Rijeka, Hrvatska)**

- Pomoć pri održavanju laboratorijskih vježbi (spektrofotometrija,

- potenciometrijska titracija i potenciometrija, kalorimetrija i mjerenje površinske napetosti)
- Veljača 2017.- Svibanj 2017. **Rad u Laboratoriju za hematopoezu (Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Rijeka, Hrvatska)**
- **Mentor:** dr.sc. Antonija Jurak Begonja
  - Pisanje završnog rada s temom u molekularnoj signalizaciji te istraživanju potencijalnih interakcijskih partnera PI3P i protein kinaze A
  - **stečene laboratorijske vještine** : rad u staničnoj kulturi, SDS-PAGE elektroforeza i Western blot, Imunofluorescencija, transfekcija stanica, pokusi enzimske kinetike
- 29.05.- 09.06.2017. **Studentska stručna praksa**
- Jadran Galenski Laboratorij, odjel Kontrola kvalitete (Svilno 1, Rijeka, Hrvatska)
  - mentorica: Iva Valentić Žunić, voditeljica Regulatorno-razvojnog odjela
- Lipanj 2014.- Rujan 2018. **Sezonski posao konobarenja u restoranu (Baška)**
- naučene i usvojene komunikacijske vještine i jezici kroz rad s ljudima
- Lipanj 2011.- Rujan 2013. **Sezonski posao bukiranja za taxi boat (Baška)**
- Lipanj 2010.- Rujan 2010. **Sezonski posao u zabavnom parku (Baška)**

## OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

---

- Listopad 2017.- sad **Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)**
- diplomski studij „Biotehnologija u medicini“
  - **stečeno zvanje:**
  - **opći predmeti:** Genska terapija, Tkivno inženjerstvo, Dizajn biološki aktivnih molekula računalnim metodama, Personalizirana i sistemska medicina, Stanična terapija, DNA tehnologije, Proteomika, Registracija i razvoj lijekova, Prirodni spojevi u farmakologiji, Koloidi, Molekularna biotehnologija, Statistika, Uvod u istraživački rad, Protuvirusni lijekovi
  - **laboratorijske tehnike:** PCR, HPLC, MALDI-TOF, SDS-PAGE elektroforeza, kreiranje plazmidne DNA i transformacija stanica

- kompjuterski programi: UCSF Chimera, PyMol, Avogadro, VINA, VMD i NAMD, itd.
- **diplomski rad** (Centar za proteomiku, Rijeka; mentor: dr.sc. Tihana Lenac Roviš): istraživanje biologije staničnog prionskog proteina PrPC, kroz razvoj i validaciju monoklonskih protutijela i upotrebe transfeciranih staničnih linija

Rujan 2014.- Srpanj  
2017.

#### Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)

- preddiplomski studij „Biotehnologija i istraživanje lijekova“
- **stečeno zvanje**: Sveučilišna prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova, *univ. bacc. biotech. et pharm. inv*, **Magna cum laude**
- **opći predmeti**: Engleski jezik, Informatika, Statistika, Kemoinformatika, Stanična i molekularna biologija, Analitička i Organska kemija, Biokemija, Fizikalna kemija, Fizika i Matematika, Farmakologija, Fiziologija i patofiziologija, Mikrobiologija, Imunologija, Toksikologija, Farmakognozija
- **završni rad** „Novi interakcijski partneri: PI3P i protein kinaza A“ (mentor dr.sc. Antonija Jurak Begonja), Laboratorij za hematopoezu, Rijeka

Rujan 2010. – Lipanj  
2014.

#### Srednja škola „Hrvatski kralj Zvonimir“, Krk (Hrvatska)

- opća gimnazija
- završena srednja škola sa ocjenskim stupnjem 5.0

## OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik Hrvatski

Ostali jezici

engleski

| RAZUMIJEVANJE |         | GOVOR               |                    | PISANJE |
|---------------|---------|---------------------|--------------------|---------|
| Slušanje      | Čitanje | Govorna interakcija | Govorna produkcija |         |
| C2            | C2      | C1                  | C1                 | C1      |

|            |    |    |    |    |    |
|------------|----|----|----|----|----|
| talijanski | B2 | B2 | B1 | B1 | B1 |
| njemački   | A2 | A2 | B1 | A2 | A2 |

Stupnjevi: A1/2: Temeljni korisnik - B1/B2: Samostalni korisnik - C1/C2 Iskusni korisnik

#### Komunikacijske vještine

- usvojene komunikacijske vještine kroz prezentacije i seminare tijekom studija
- usvojene izvrsne komunikacijske vještine tokom sezonskih poslova i rada s ljudima

#### Organizacijske / rukovoditeljske vještine

- veliko iskustvo u grupnom i timskom radu, stečeno tokom studiranja
- organizacijske vještine stečene tijekom rada u laboratoriju kao demonstrator
- sudjelovanje na festivalu znanosti 2017. (Laboratorij za hematopoezu)
- članstvo u udruzi studenata biotehnologije UsbRi
- organiziranost i marljivost, te uspješnost pri rješavanju raznih zadataka u seminarskim grupama tijekom studija i srednje škole
- aktivnost u izvannastavnim sadržajima i sudjelovanje u brojim događajima tijekom srednje škole

#### Digitalna kompetencija

| SAMOPROCJENA       |                  |                     |                     |                     |
|--------------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Obrada informacija | Komunikacija     | Stvaranje sadržaja  | Sigurnost           | Rješavanje problema |
| Iskusni korisnik   | Iskusni korisnik | Samostalni korisnik | Samostalni korisnik | Samostalni korisnik |

Stupnjevi: Temeljni korisnik - Samostalni korisnik - Iskusni korisnik  
 Informacijsko-komunikacijske tehnologije - tablica za samoprocjenu

#### • Računalne vještine:

- poznavanje programa Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)

- poznavanje programa za informatičko modeliranje molekula i dizajn biomolekula; stečeno znanje tijekom 2. godine studija na predmetu Kemoinformatika, te 2. godine diplomskog studija na predmetu Dizajn bioaktivnih molekula računalnim metodama (VMD, PyMol, Chimera, Avogadro, Gamess, nešto manje Marvin Sketch, Gamess, Tenua)
- poznavanje i snalaženje u programima ImageJ, Zen, GraphPad Prism
- poznavanje programa Statistica za statističku obradu podataka
- ApE softver za DNA kloniranje

Ostale vještine      Fotografiranje  
Crtanje

Vozačka dozvola      B

## DODATNE INFORMACIJE

---

- Učenica generacije u osnovnoj školi i srednjoj školi

- Član studentske organizacije UsbRi
- sudjelovanje na 5th International Experimental Biology and Medicine Conference BIOLOGICAL CLOCKS: MECHANISMS AND APPLICATION, Rijeka, 6.-8.10.2017.
- Konferencija: „Budućnost i perspektiva studija” 17.12.2018.

- Sudjelovanje na Case Study Competition za GlaxoSmithKlein, te ulazak u finale, 2018.
- 



# CERTIFIKAT

**Andrea Mihalić**

*za ulazak u finale*



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ivana Cvitković'.

Ivana Cvitković,  
voditelj projekta

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ivona Maslač'.

Ivona Maslač,  
koordinator projekta

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dag Rodinis'.

mr.sc Dag Rodinis, mr.ph

## Rezultati Vaše jezične procjene



PREZIME

Mihalić

POSTIGNUTA RAZINA

C2

IME

Andrea

Možete s lakoćom razumjeti gotovo sve što čujete ili pročitate te razlikovati finije nijanse značenja.

POLOŽENO DANA

2019-05-13

JEZIK KOJI SE TESTIRA

English

### Pogledaj svoje rezultate prema vještini:

#### GRAMATIKA C1

Samo će u iznimno rijetkim slučajevima uporaba gramatičke strukture utjecati na vaše razumijevanje bilo kojeg pisanog teksta.

#### VOKABULAR C2

S maksimalnom lakoćom razumijete sva leksička područja s općom i specifičnom terminologijom uz prepoznavanje i korištenje rijetkih idiomatskih izraza i kolokvijalizama.

#### ČITANJE S RAZUMIJEVANJEM C2

Možete čitati gotovo svaki oblik pisanog teksta, uključujući apstraktne tekstove, strukturalno ili lingvistički kompleksne materijale uključujući priručnike, specijalizirane članke i literarna djela.

#### SLUŠANJE S RAZUMIJEVANJEM C2

Nemate poteškoća u razumijevanju bilo koje varijante govornog jezika, bilo u izravnoj komunikaciji ili preko medija, čak ni kada se govori brzinom izvornog govornika, uz uvjet da imate vremena prilagoditi se određenom naglasku. Bez vidljivog napora možete pratiti neverbalne znakove i slušati intonaciju.

## **ZAHVALE**

Zahvaljujem se svim divnim ljudima iz Centra za proteomiku u Rijeci, naročito profesorici Tihani Lenac Roviš, na pruženoj prilici, stjecanju znanja te velikoj pomoći kada god je bilo potrebno.

Hvala mojim prijateljima i obitelji što uvijek potičete najbolje u meni, te veliko hvala M. 



Rad je financiran Europskim fondom za regionalni razvoj; Ref.broj HRZZ projekta KK01.1.1.01.000; te je u radu je korištena oprema Centra za proteomiku u Rijeci, Sveučilišta u Rijeci, Medicinski fakultet.