Karakterizacija novoproizvedenog protutijela protiv CD63 proteina u sisavaca

Padavić, Roberta

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:012435

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

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

Roberta Padavić

Karakterizacija novoproizvedenog protutijela protiv CD63 proteina u sisavaca

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

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

Roberta Padavić

Karakterizacija novoproizvedenog protutijela protiv CD63 proteina u sisavaca

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

Mentorica: izv.prof. dr. sc. Kristina Grabušić
Komentorica: izv. prof. dr. sc. Mladenka Malenica

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
University Graduate Programme
Biotechnology in medicine

Roberta Padavić

Characterization of newly produced antibody against CD63 protein in mammals

Master's Thesis

Rijeka, 2019.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Kristina Grabušić
Comentor: izv. prof. dr. sc. Mladenka Malenica

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Kristina Grabušić

Komentor: izv. prof. dr. sc. Mladenka Malenica

Diplomski rad obranjen je dana 3. lipnja 2020 pred povjerenstvom:

1. izv. prof. dr. sc. Elitza Markova Car
2. prof. dr. sc. Natalia Kučić
3. izv. prof. dr. sc. Kristina Grabušić
4. izv. prof. dr. sc. Mladenka Malenica Staver

Rad ima 43 stranice, 16 slika, 0 tablica i 32 literaturna navoda

Sažetak

CD63 je membranski glikoprotein koji pripada superobitelji tetraspanina. Molekularna masa CD63 iznosi 25 kDa, ali može doseći i do 60 kDa zbog različitih stupnjeva glikozilacije ovog proteina. Prisutan je u svim ljudskim stanicama, te ima mnogo potvrđenih i još više ne potvrđenih funkcija. CD63 se u stanici nalazi u endosomalnom sustavu, egzosomima i na površini stanice. Uključen je u signalnu transdukciju koja regulira razvitak, aktivaciju, rast i pokretljivost stanice. Promovira preživljenje stanice, reorganizaciju citoskeleta, adheziju, migraciju, te je uključen u transport proteina. Jako je eksprimiran u ranim fazama raznih tumora, a u kasnijim fazama ga gotovo uopće nema. Ima ulogu i u nekim drugim patološkim stanjima, te bi mogao imati izvanrednu dijagnostičku, prognostičku i terapijsku vrijednost i služiti kao marker za stadije tumora.

Cilj ovog rada je optimizacija imunofluorescencije i karakterizacija novoproizvedenog anti-CD63 protutijela (hCD63.01).

Provedeno je više pokusa imunofluorescencije na HeLa, SW620 i MCF-7 staničnim linijama. Mijenjane su koncentracije sredstva za permeabilizaciju i sredstva za blokiranje, te i samo sredstvo za permeabilizaciju. Za usporedbu je korišteno MEM-259 anti-CD63 protutijelo. Kako bi odredili je li novoproizvedeno protutijelo prošlo kroz promjene tijekom pročišćavanja, provedena je imunofluorescencija sa nepročišćenim supernatantom hCD63.01, te su rezultati uspoređeni sa onima pročišćenog protutijela hCD63.01.

Utvrđeno je da hCD63.01 protutijelo nije značajno promijenjeno tijekom pročišćavanja. Predložen je optimizirani protokol imunofluorescencije sa Tween-om 20 kao sredstvom permeabilizacije. hCD63.01 je u svim pokusima dalo jači signal od MEM-259 komercijalno dostupnog protutijela za CD63., te je moguće da hCD63.01 prepoznaje više formi ovog proteina. Dodatna istraživanja su potrebna za potpunu karakterizaciju i razumijevanje potencijala hCD63.01 novoproizvedenog protutijela.

Ključne riječi: CD63, imunofluorescencija, protutijelo, hCD63.01

Summary

CD63 is a membrane glycoprotein which belongs to a superfamily of tetraspanins. Its molecular weight is 25 kDa but can reach up to 60 kDa depending on the level of glycosylation the protein went through. It is present in all human cell types and has lots of different functions some of which are known and some of which have yet to be proven. CD63 can be found in the cell endosomal system, egzosomes and on the cell surface. It is involved in signal transduction which regulates cell development, activation, growth and motility. It promotes cell survival, reorganization of actin cytoskeleton, adhesion, cell migration and is included in protein transport. It is highly expressed in early stages but almost nonexistent in the later stages of most tumors and has a role in some other pathological states. CD63 could have an excellent diagnostic, prognostic and therapeutical value for different pathological conditions and be used as a stage marker for various tumors.

Aim of this paper is the optimization of immunofluorescence and characterization of a novel anti-CD63 antibody (hCD63.01).

Several immunofluorescence experiments were conducted on HeLa, SW620 and MCF-7 cell lines. Changes in the protocol were made regarding concentration of the permeabilization reagent and the blocking buffer. Different permeabilization reagents were used. Apart from the hCD63.01 antibody, a commercial anti-CD63 antibody (MEM-259)was used for comparison. Supernatant of nonpurified hCD63.01 was also used in order to establish possible changes which may have occurred in the antibody purification process.

It was established that hCD63.01 did not went through significant changes during purification. Optimized immunofluorescence protocol was proposed with Tween 20 as the permeabilization reagent. In every experiment hCD63.01 had a stronger signal than MEM-259 commercially available CD63 antibody. It is possible that hCD63.01 recognizes more forms of CD63. Further studies are needed for the complete characterization and understanding of hCD63.01 antibody’s potential.

Key words: CD63, immunofluorescence, antibody, hCD63.01

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Tetraspanini 1

1.2. CD63 1

1.2.1. Građa i posttranslacijske modifikacije i CD63 1

1.2.2. Lokalizacija CD63 u stanici 4

1.2.3. Funkcija CD63 6

1.2.4. Poremećaji ekspresije CD63 9

1.2.5. Moguća terapijska primjena EV i CD63 11

1.3. Imunofluorescencija 11

1.4. Protutijela 12

1.5. Proizvodnja monoklonalnih protutijela 13

2. Cilj rada 15

3. Materijali i metode 16

3.1. Materijali: 16

3.1.1. Stanice 16

3.1.2. Kemikalije 16

3.1.3. Mediji i puferi 16

3.1.4. Protutijela 17

3.1.5. Laboratorijsko posuđe i oprema 17

3.2. Uzgoj i priprema staničnih linija za imunofluorescenciju 18

3.3. Imunofluorescencija 18

3.3.1. Imunofluorescencija sa 0,1% sredstva za permeabilizaciju (Tween 20, Triton X-100 i Saponin) uz 3% BSA za blokiranje 20

3.3.2. Imunofluorescencija sa 0,5% sredstva za permeabilizaciju (Tween 20 i Triton X-100) uz 3% BSA za blokiranje 22

3.3.3. Imunofluorescencija sa 0,5% sredstva za permeabilizaciju (Tween 20 i Triton X-100) i 5% BSA 22

3.3.4. Imunofluorescencija na staničnim linijama SW620 i MCF-7 23

3.3.5. Usporedba djelovanja nepročišćenog supernatanta protutijela i pročišćenog protutijela na staničnim linijama HeLa, SW620 i MCF-7 23

3.3.6. Analiza jačine signala 23

4. Rezultati 24

4.1. Djelovanje 0,1% koncentracije detergenata (Tween 20, Triton X-100, saponin) uz 3% BSA za blokiranje 24

4.2. Djelovanje 0,5% koncentracije detergenata (Tween 20, Triton X-100) uz 3% BSA za blokiranje 25
4.3. Djelovanje 0,5% koncentracije detergenata (Tween 20, Triton X-100) uz 5% BSA za blokiranje 26
4.4. Analiza jačine signala na HeLa stanicama 27
4.5. Vizualizacija CD63.01 kod staničnih linija SW620 i MCF-7 28
4.6. Vizualizacija CD63 sa CD63.01 i nepročišćenim supernatantom CD63.01 29
4.7. Analiza jačine signala optimizirane imunofluorescencije na HeLa, SW620 i MCF-7 staničnim linijama 30
5. Rasprava 33
6. Zaključak 38
7. Literatura 39
8. Životopis 42

1. Uvod

1.1. Tetraspanini

Obitelj tetraspanina prvi put se spominje 1990 godine. Tetraspanini se sastoje od 4 hidrofobne transmembranske domene (TM1-TM4), velike i male izvanstanične petlje (EC1 i EC2), te dva kratka unutarstanična amino i karboksi repa (Slika 3.) Superobitelj tetraspanina se dijeli na 4 podobitelji: CD (eng. *cluster of differentiation*), CD63, uroplakin i RSD, a u ljudskom genomu postoji 33 gena za tetraspanine. CD63 čini posebnu podobitelj zato što je evolucijski stariji od ostalih CD tetraspanina. Homolozi CD63 su nađeni kod spužvi što upućuje na to da CD63 ima vrlo drugačije i starije porijeklo od drugih tetraspanina [1–3].

1.2. CD63

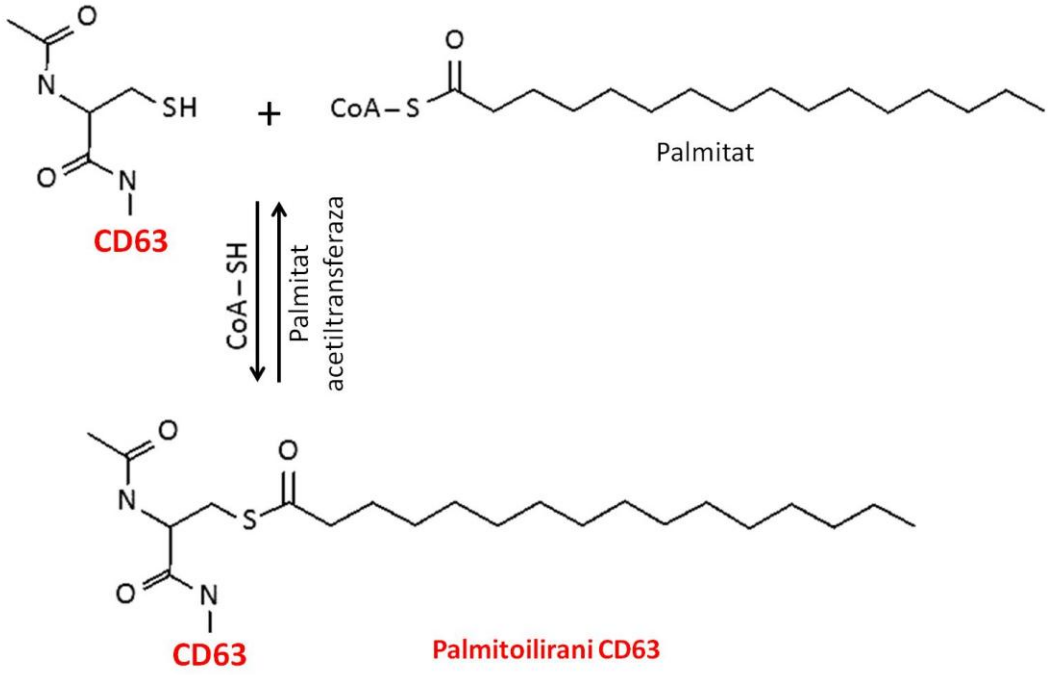
CD63 je prvi okarakterizirani tetraspanin. Prvotno je pronađen u stanicama ranog stadija melanoma (1984. godine), pa je nazvan antigen melanoma 491 (ME491). Nekoliko godina kasnije (1989. godine) otkriven je na aktiviranim trombocitima, te se naziva eng. *platelet glycoprotein 40* (Pltgp40). Naziva se još i membranskim glikoproteinom povezanim s lizosomima (*eng. lysosome associated membrane protein*; LAMP-3), te integralni lizosomalni membranski protein 1 (*eng. Lysosomal integral membrane protein 1*; LIMP-1). Gen za CD63 se nalazi na kromosomu 12q13. CD63 je eksprimiran u svim stanicama, te se sastoji od 237 aminokiselina i ima Mr=25,475 kDa, koji može doseći i 60 kDa ovisno o tome koliko je protein glikoziliran [1,4,5].

1.2.1. Građa i posttranslacijske modifikacije i CD63

Tetraspanini se sintetiziraju u endoplazmatskom retikulumu (ER), te prolaze kroz palmitoilaciju u Golgiju. Palmitat (Slika 1.) se kovalentno veže na cisteinske ostatke u blizini membrane što omogućuje stvaranje tetraspaninom obogaćenih mikrodomena (*eng. Tetraspanin enriched*

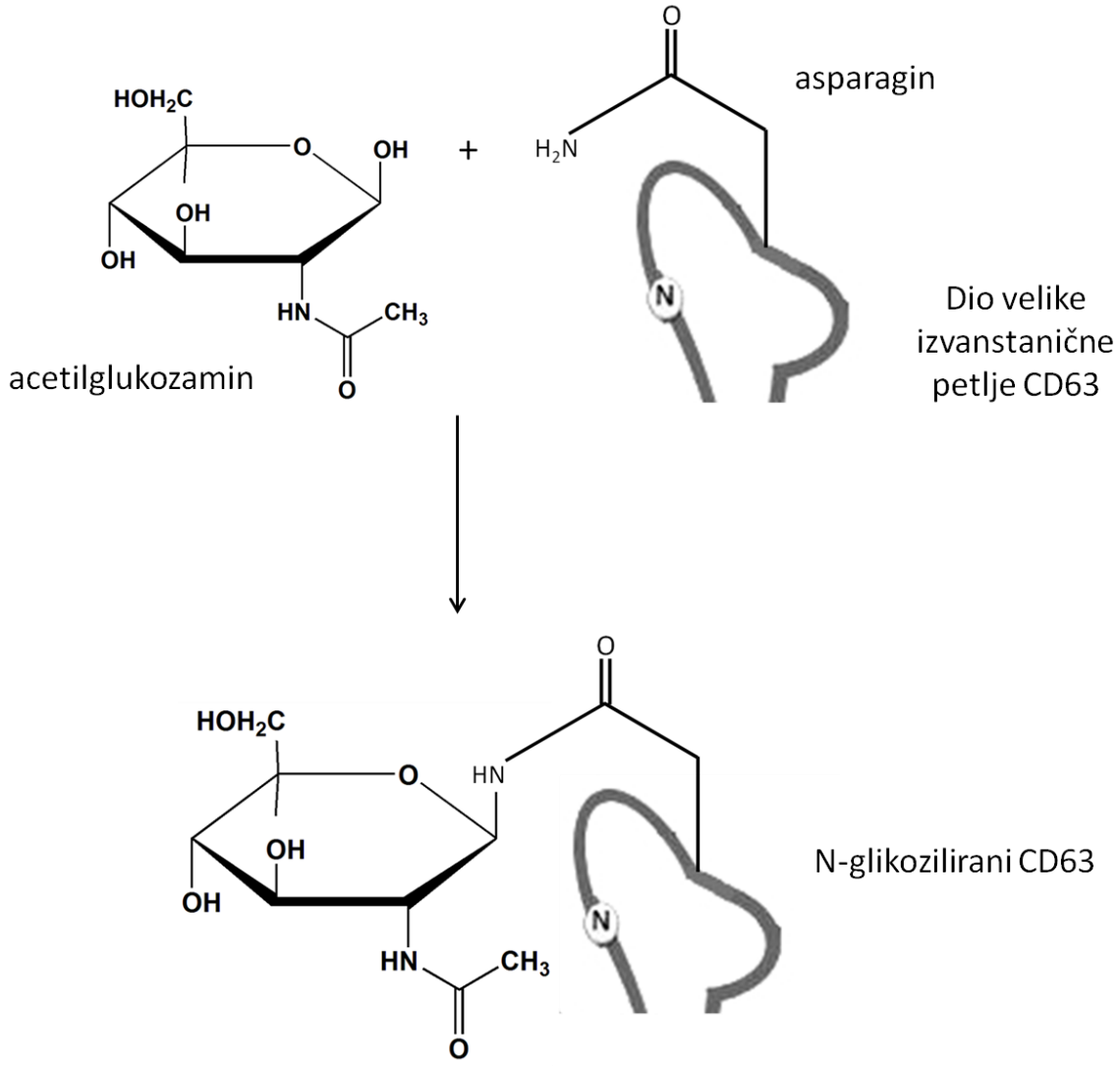
micrdomains; TEMs) na površini stanice. Nakon palmitoilacije se najčešće tvore homodimeri koji se transportiraju na površinu stanice gdje grade TEMs. TEMs su funkcionalne membranske mikrodomene koje se sastoje od nekoliko različitih tetraspanina i drugih molekula kao što su receptori, gangliozidi, integrini i kolesterol, te su specifične za tip stanica na kojima se nalaze. Veličina TEMs varira ovisno o tipu stanice na kojoj se nalaze: 16 nm – 400 nm^2 [1,6,7].

CD63 prolazi i kroz N-glikozilaciju, proces vezanja oligosaharida (tzv. glikana) na četvrti atom dušika asparagina (Slika 2.). Pretpostavlja se da CD63 sadrži tri mjesta za vezanje glikana (Slika 3). Sva poznata mjesta glikozilacije nalaze se na velikoj izvanstaničnoj petlji (hidrofilna domena između treće i četvrte transmembranske regije) [8]. Na stanicama tumora dojke dokazano je da je riboforin II (RPN2), koji je dio kompleksa N-oligosaharil transferaze, odgovoran za glikozilaciju CD63 [9]. CD63 je glikoziliran ovisno o stanici u kojoj se nalazi pa njegova molekularna masa može imati raspon od 25-60 kDa [5].



Slika 1. Prikaz palmitoilacije CD63 (CoA označava koenzim A)[1]

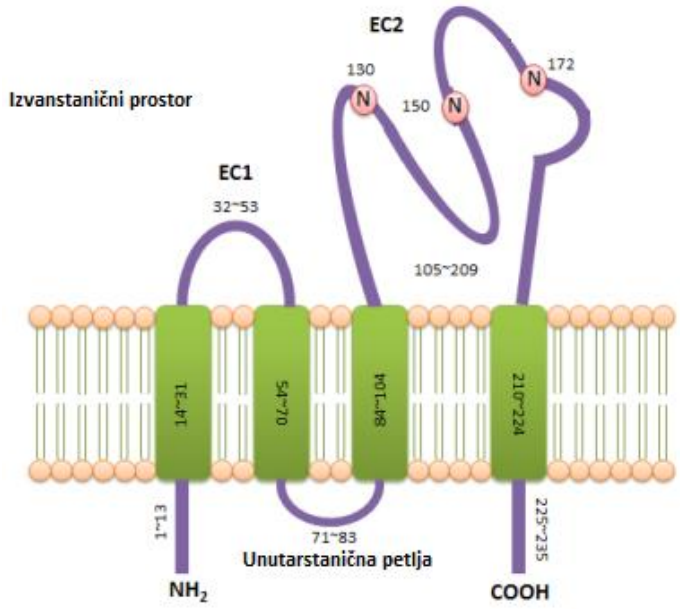
[1] Slika je napravljena pomoću programa Microsoft Office PowerPoint (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD), Paint (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD) i MarvinSketch (ChemAxon, Budimpešta, Mađarska)



Slika 2. Prikaz N-glikozilacije[2]

CD63 sadrži 6 konzerviranih ekstracelularnih cisteinskih ostataka, te polarne ostatke unutar transmembranskih domena. C-terminalna regija CD63 je ključna za njegovo sortiranje i put u stanici kroz interakciju sa nekoliko podjedinica kompleksa sklapajućih (adaptorskih) proteina (*eng. Assembly polypeptide;* AP) [6,10].

[2] Slika je napravljena pomoću programa Microsoft Office PowerPoint (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD), Paint (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD) i MarvinSketch (ChemAxon, Budimpešta, Mađarska)



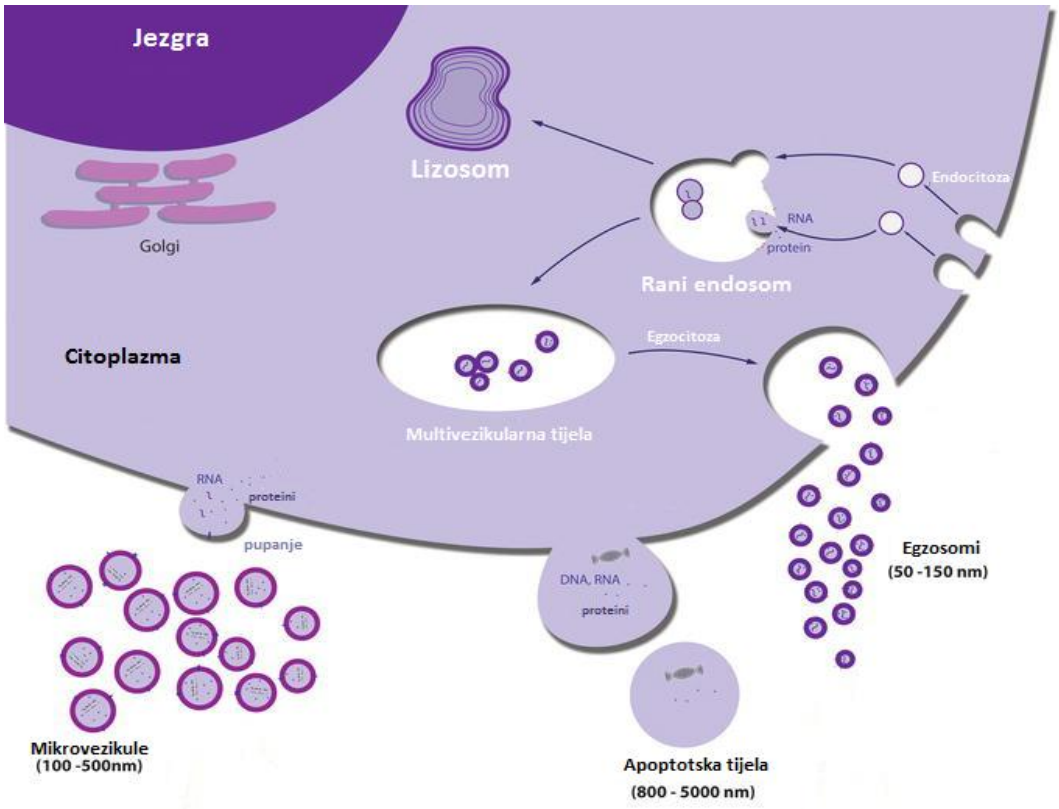
Slika 3. Građa CD63 sa označenim dušikovim atomima na kojima najvjerojatnije dolazi do glikozilacije. [3]

1.2.2. Lokalizacija CD63 u stanici

CD63 se nalazi u endosomalnom sustavu stanice u: intralumenalnim vezikulama (ILVs), endosomima/multivezikularnim tjelešcima (MVBs) i lizosomima. Visoka koncentracija tetraspanina u ovim organelima nalaže da su relativno otporni na lizosomalnu proteolizu. Lizosomalna proteoliza je proces razgradnje proteina u lizosomima koji sadrže niz razgrađujućih enzima. Tetraspanini su prisutni i u tzv. sekretornim lizosomima kao što su: Weibel-Paladeova tjelešca u endotelnim stanicama, guste i α-granule trombocita, melanosomi u melanocitima, citotoksične granule u T-stanicama i odjeljci glavnog kompleksa histokompatibilnosti II (eng. *Major Histocompatibility Complex II*; MHCII) u dendritičkim stanicama. Nakon stimulacije ovi organeli mogu se spojiti sa staničnom membranom i ispustiti svoje ILVs koje se nazivaju egzosomima. Egzosomi su izvanstanične vezikule (EV) endsomalnog podrijetla promjera 50-100 nm, koje nose proteine, lipide, mRNA, te regulatorne mikroRNA iz stanica, služe kao glasnici intracelularne mreže omogućujući razmjenu staničnih komponenti između stanica. Prenošenje navedenih molekula može

[3] Prilagođena slika preuzeta sa (zadnji pristup: 16.11.2019): https://graduateway.com/investigating-the-structure-and-function-of-tetraspanin-cd63/

regulirati ekspresiju gena i promijeniti sudbinu ciljanih stanica, tj. potaknuti ih na diferencijaciju, aktivaciju ili dediferencijaciju. Egzosomi nastaju kada se MVB spoje sa plazma membranom na kraju endocitotskog ciklusa recikliranja, a otpuštaju ih različite vrste stanica. EV mogu prezentirati antigene, nositi imunosupresivne molekule, glavni kompleks histokompatibilnosti (*eng. Major histocompability complex*; MHC) i direktno provoditi interakciju sa T-stanicama, te tako prouzročiti antigen specifične imune odgovore. CD63 se nalazi i u vezikulama sličnim egzosomima koje nastaju pupanjem plazma membrane. U manjim količinama CD63 se nalazi i na površini stanice. Prava uloga CD63 na površini stanice nije poznata, moguće je da CD63 samo prolazi površinom stanice na putu do kasnih endosoma i lizosoma, ali je moguća i specifična funkcija [1,6,11,12].



Slika 4 Shematski prikaz nastajanja i otpuštanja EV.[4]

[4] Prilagođena slika preuzeta sa (zadnji pristup:16.11.2019): https://www.intechopen.com/books/erythrocyte/the-biology-and-therapeutic-applications-of-red-blood-cell-extracellular-vesicles

Put CD63 kroz stanicu je reguliran adaptorskim proteinskim kompleksima AP-2 i AP-3 koji se vežu na tirozinski motiv na C-terminalnoj citoplazmatskoj domeni CD63. Na isto mjesto veže se i sintenin-1 pa se nagađa da on funkcionira kao kompetitivni inhibitor, te preusmjerava CD63 na alternativne puteve u stanici [13].

Ekspresija CD63 na površini stanice je strogo regulirana sinteninom-1 koji povećava njegovu količinu na površini stanice i stvara alternativni put endocitoze. Preekspresija sintenina-1 smanjuje internalizaciju CD63 tako što se veže na C-terminalnu regiju proteina inhibirajući vezanje AP-2. L6-Ag antigen koji je visoko eksprimiran na epitelnim tumorskim stanicama negativno regulira ekspresiju CD63 na površini stanice pa je CD63 slabo eksprimiran na stanicama metastazirajućih tumora, a unutarstanična distribucija L6-Ag se gotovo potpuno podudara sa onom CD63 [1,13].

Dio CD63 sa površine stanice se endocitira kroz interakciju sa μ2 podjedinicom AP-2 koja prepoznaje Tyr-Xaa-Xaa-Ø (gdje Ø označava aminokiselinu sa velikim hidrofobnim repom) motiv, te ugrađuje CD63 u klatrinom obložene vezikule. Gly-Tyr-Glu-Val-Met motiv upućuje CD63 u kasne endosomalne/lizosomalne odjeljke vežući se na μ3A podjedinicu AP-3. Nakon fuzije endocitnih vezikula sa ranim endosomom, CD63 se ili vraća na površinu stanice ili se transportira u lizosome. Osim endocitoze ovisne o klatrinu, CD63 može prolaziti i kroz endocitozu ovisnu o dinaminu u kalveolama. Kalveole su invaginacije plazma membrane veličine 50-100 nm. Transport iz ranih u kasne endosome i lizosome uključuje barem 2 različita puta: inkorporaciju u intralumenalne vezikule (AP-2 put) i AP-3 put koji je odgovoran i za transport CD63 u Weibel-Paladeova tjelešca u endotelnim stanicama [1,10].

1.2.3. Funkcija CD63

CD63 regulira signalnu transdukciju koja igra ulogu u regulaciji staničnog razvoja, aktivacije, rasta i pokretljivosti, te ima centralnu ulogu u sortiranju tereta izvanstaničnih vezikula. Sudjeluje u transportu staničnih proteina, degranulaciji neutrofila, sazrijevanju pigmentnih granula,

pozitivnoj regulaciji internalizacije receptora, transportu iz endosoma u melanosome, regulaciji transmembranskog transporta kalija, te u pozitivnoj regulaciji endocitoze.

Uključen je u aktivaciju staničnih signalnih kaskada, aktivaciju integrin beta 1 prekursora (*eng. Integrin beta- 1 precursor*; ITGB1) i pozitivnu regulaciju signalizacije integrina koja dovodi do aktivacije protein kinaze B (*eng. protein kinase B*; AKT), kinaze fokalne adhezije (*eng. focal adhesion kinase/protein tyrosine kinase 2*; FAK/PTK2) i mitogen aktivirajuće kinaze (*eng. Mitogen-activated protein kinase*; MAP). Putem aktivacije ovih kinaza potiče preživljenje stanice, reorganizaciju aktinskog citoskeleta, adheziju, širenje i migraciju stanica.

CD63 je receptor za tkivni inhibitor metalopeptidaze 1 (*eng. tissue inhibitor of metallopeptidase 1*; TIMP1) koji je inhibitor metaloproteaza tipa 1 povezanih s membranom (*eng. Membrane-associated type-1 matrix metalloprotease*; MT1-MMP), te potiče proliferaciju stanica, a vjerojatno ima i antiapoptotičke funkcije. MT1-MMP povećava invazivnost i metastaziranje tumora, a CD63 ga veže na svoj N-terminalni kraj, što vodi njegovoj endocitozi i degradaciji u lizosomima. TIMP-1 inhibira aktivnost MT1-MMP čime smanjuje turnover i reorganizaciju ekstracelularnog matriksa (ECM), uz to provodi interakciju s β1 integrinima na površini stanice, te ih održava u aktivnoj konformaciji. CD63 je jedini poznati membranski receptor koji veže TIMP-1, te potiče njegovu interakciju s β1 integrinima koja dovodi do pokretanja signalizacije za preživljenje stanice i inhibiciju apoptoze. TIMP-1, kroz interakciju sa CD63 na površini stanice, smanjuje rast mezenhimalnih matičnih stanica i njihovu osteogenu diferencijaciju. Razne stanice središnjeg živčanog sustava (SŽS) luče velike koncentracije TIMP-1 kada su oštećene, tj. u stanju upale, ozlijede ili malignog glioma. Vezanje TIMP-1 za CD63 na staničnoj membrani ljudskih neuralnih matičnih stanica (*eng. human neural stem cells*; hNSC) aktivira signalnu transdukciju koja uzrokuje širenje i migraciju ovih stanica prema patološkim nepravilnostima u CNS-u. Postoji pretpostavka da interakcija TIMP-1 i CD63 inducira granulopoezu na mijeloidnim

progenitorima [14,15].

CD63 igra ulogu u signalizaciji vaskularnog endotelnog faktora rasta (*eng. vascular endothelial growth factor*; VEGFA) putem regulacije internalizacije receptora za vaskularni endotelni faktor rasta 2 (*eng. vascular endothelial growth factor receptor 2*; VEGFR2). CD63 je nužan za formaciju VEGFR2-β1 integrin kompleksa. Pri nedostatku CD63 na površini stanice smanjena je aktivacija i signalizacija VEGFR2, a pretpostavlja se da do toga dolazi zbog smanjenja stupnja internalizacije VEGFR2. CD63 deficijente endotelne stanice ne mogu sudjelovati u pupanju angiogeneze niti se organizirati u tubularne strukture [16].

U dendritičkim stanicama CD63 ima interakciju sa MHCII molekulama u njihovim odjeljcima i na površini stanice. Pretpostavlja se da CD63 služi kao šaperon MHCII molekulama kroz endosomalni sustav, ali MHCII molekule mogu putovati i neovisno o CD63.

U parijetalnim stanicama želuca uključen je u reciklažu H, K-ATP pumpe imeđu plazma membrane i intracelularnih odjeljaka za skladištenje.

U T-limfocitima suprimira ekspresiju C-X-C kemokinog receptora tipa 4 (*eng. C-X-C chemokine receptor type 4*; CXCR4) na površini stanice. Provodi interakciju sa CXCR4 svojim N-povezanim glikanima te ga usmjerava u endosome/lizosome, a ne na površinu stanice. Pronađen je i u kompleksu sa T-staničnim receptorom [9,17].

U neutrofilima CD63 ima ulogu u transportu neutrofil elastaze u primarne granule. Prisutan je u mijeloperoksidaznim i azurofilnim granulama neutrofila, regulira aktivaciju i adheziju zrelih neutrofila na endotel, te otpuštanje granula. Visoko je eksprimiran na apoptotičkim neutrofilima [5,15].

CD63 je ključni efektor mehanizma nastajanja multivezikularnih endosoma *(eng. multivesicular endosomes*; MVE) neovisnog o endosomalnom sortirajućem kompleksu odgovornom za transport (*eng. endosomal sorting complex required for transport;* ESCRT). Ovaj mehanizam nužan je za polimerizaciju luminalnih domena predmelanosomnog proteina (eng. *premelanosome protein luminal*

domains; PMEL) u funkcionalne amiloidne fibrile. PMEL luminalna domena je esencijalna za razvoj i maturaciju melanocita. Interakcija PMEL C-terminalnog fragmenta i CD63 stabilizira PMEL unutar endosomalnih domena koje sudjeluju u ESCRT-neovisnoj formaciji ILV. CD63 je važan modulator ravnoteže između dva mehanizma sortiranja MVE koji određuju idu li proteini na degradaciju ili u organele povezane s lizosomima (*eng. Lysosim related organels;* LRO). Pretpostavlja se da je ključna uloga CD63 zaštita tereta od ESCRT ovisne razgradnje. ILV ovisne o CD63 idu u melanosome dok se ESCRT ovisne ILV razgrađuju. ILV formacija, izolacija PMEL i biogeneza melanosoma su jako smanjene u nedostatku ekspresije CD63 [18].

Uključen je u adheziju leukocita na endotelne stanice putem regulacije P-selektin distribucije. CD63 koklasterira sa P-selektinom, te ga održava na plazma membrani aktiviranih endotelnih stanica. Nedostatak CD63 ima isti učinak kao i nedostatak samog P-selektina, ne može doći do pokretanja inflamacije pa niti do efektivne regrutacije leukocita. Nije poznato gdje se P-selektin i CD63 slažu u funkconalne strukture. CD63 ima važnu ulogu u kaskadi inflamatorne adhezije, te utječe na ovaj proces u njegovim različitim fazama [19].

Pretpostavlja se da igra ulogu u degranulaciji mastocita preko stimulacije Ms4a2 (*eng. membrane spanning 4-domains A2*). CD63 provodi interakciju sa IgE receptorom (FcεRI) u mastocitima i bazofilnim granulocitima. Jedan je od aktivacijskih markera trombocita, te igra ključnu ulogu u njihovoj agregaciji, adheziji za kolagen, degranulaciji i regulaciji angiogeneze [1,17].

CD63 i neki drugi tetraspanini, kao što je CD9, inhibiraju fuziju zdravih stanica sa stanicama zaraženim HIV-1 virusom [20]. Gen za CD63 je povezan sa progresijom tumora, jako je izražen u početnoj fazi tumora, a u kasnijim fazama se ekspresija smanjuje. Smanjena ekspresija CD63 korelira sa pojačanom pokretljivošću i metastaziranjem [1].

1.2.4. Poremećaji ekspresije CD63

Nedostatak ekspresije CD63 promatran je u trombocitima osoba oboljelih od Hermansky-Pudlak sindroma. Hermansky-Pudlak sindrom je heterogeni, rijetki, autosomalni, recesivni poremećaj karakteriziran okulokutanim albinizmom, krvarenjem zbog deficijencije trombocita i defekta u skladištenju lizosoma.

CD63 je preeksprimiran u stanicama koje nose BRAF mutaciju. U nekim tumorima dojke CD63 ima pozitivan učinak na pojačanu invazivnost kad je kolokaliziran sa MDR1 (*eng. Multidrug Resistance Protein 1*) [9,21]. Visoko je eksprimiran na površini stanica u ranoj fazi melanoma gdje je primarno i otkriven. Tijekom daljnje progresije melanoma ekspresija CD63 se smanjuje proporcionalno sa stupnjem invazivnosti stanice. Ovaj fenomen primjećen je i u drugim tumorima kao što je tumor jajnika gdje smanjena ekspresija CD63 korelira s povećanom šansom metastaziranja. Preekspresija CD63 u stanicama ljudskog melanoma smanjuje njihovu pokretljivost i invazivnost čak i kad su stanice izložene pro-invazivnim faktorima. CD63 inhibira tranziciju iz epitelnog u mezenhimalni fenotip stanica melanoma [1,22].

U adenokarcinomu pluća smanjena ekspresija CD63 utječe na pojačani rast tumora i indikator je loše prognoze za preživljenje pacijenta. Negativna korelacija između CD63 i invazivnosti tumora dokazana je i u tumorima dojke i debelog crijeva. U Merkelovom staničnom karcinomu CD63 ima pojačanu ekspresiju u razdoblju remisije [1,23].

Tetraspanini reguliraju invazivnost stanica kroz interakcije sa peptidazama, disintegrinima i metaloproteinazama (*eng. a disintegrin and metalloproteinase*; ADAMs), metaloproteinazama matriksa (*eng. Matrix metalloproteinases;* MMPs) i urokinazom (tip površinskog receptora aktivatora plazminogena) [22].

Povezanost ekspresije CD63 sa pokretljivošću stanice može se objasniti njegovom interakcijom s integrinima koja dovodi do vezanja stanice na ekstracelularni matriks. Pretpostavlja se da CD63 utječe na aktivnost i stabilnost integrina kroz svoje interakcije sa drugim tetraspaninima u TEMs. Moguće je i da CD63 sudjeluje u endocitozi integrina, a vjerojatno

ima ulogu u regulaciji transporta drugih proteina uključenih u razvoj tumora. Jedan od takvih proteina je MT1-MMP koja ima funkciju u turnoveru ekstracelularnog matriksa, te zato može povećati invazivnost i metastaziranje tumora [1].

CD63 ima ulogu i u infekciji herpes simplex virusom 1 (HSV-1). Virusna replikacija stimulira proizvodnju ekstracelularnih vezikula (EV) koje sadrže veliku količinu CD63. Zaražene stanice izbacuju CD63 koji, uz pomoć drugih molekula u EV, aktivira antiviralne odgovore [24].

Poremećaj ekspresije CD63 ima ulogu u patofiziologiji endometrioze. Kako sudjeluje u inhibiciji apoptoze, angiogenezi i proliferaciji stanica, dovodi do gubitka stanične homestaze u ektopičnom endometriju što pomaže implataciji i preživljenju stanica u ekstrauterinom okolišu [25].

CD63 knockout miševi razvijaju nakupljanje lamelarnih inkluzija u stanicama sakupljajućeg kanala bubrega (Belinijeva cijev). $CD63^-$ miševi gube puno više vode kroz bubrege i GIT nego jedinke divljeg tipa [17].

1.2.5. Moguća terapijska primjena EV i CD63

EV su predmet mnogih istraživanja zbog mogućnosti njihove primjene kao neinvazivnih biomarkera u bioinžinjeringu i klinici. EV nose lipide, proteine i RNA iz stanice koja ih otpušta, te njihov sastav može dati uvid u stanje u kojem se stanica ili stanice u njezinoj blizini nalaze.

CD63 bi u budućnosti mogao sužiti kao marker za određivanje stadija raznih tumora, kao što su: melanom, tumor jajnika, dojke, adenokarcinom pluća, Merkelov stanični karcinom i mnogi drugi. S obzirom da su promjene u ekspresiji CD63 zamjećene u raznim patološkim stanjima ovaj protein mogao bi imati izvrsnu dijagnostičku, prognostičku i terapijsku vrijednost [1,6,11].

1.3. Imunofluorescencija

Imunofluorescencija je tehnika koja koristi fluorescentno označena protutijela za detekciju specifičnih antigena. Postoji direktna i indirektna imunofluorescencija. Direktna koristi protutijela koja su već označena

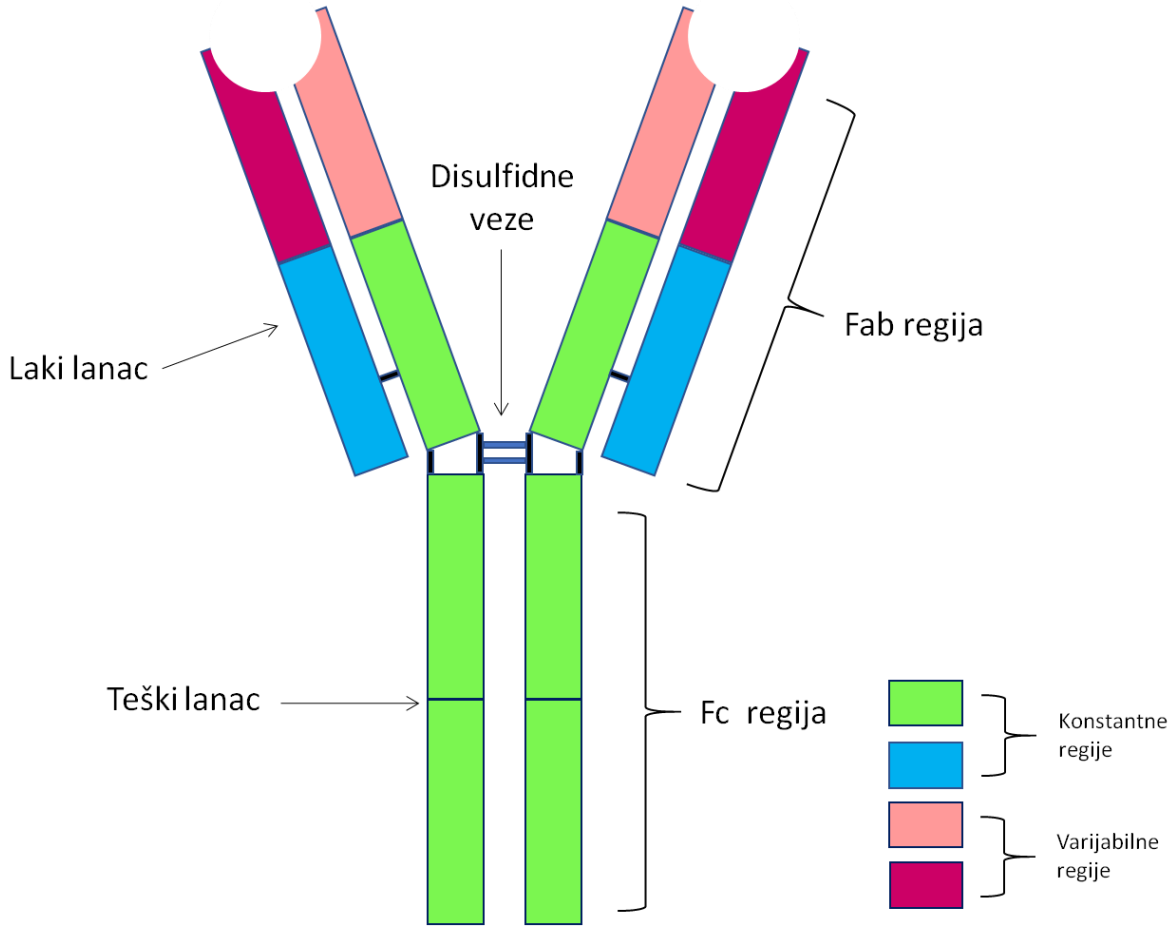
fluorescentnom bojom. Indirektna fluorescencija koristi primarno, neoznačeno, protutijelo koje se veže za metu. Nakon vezanja primarnog protutijela, uvodi se sekundarno protutijelo koje na sebi nosi fluorescentnu boju, a veže se za Fc fragment primarnog protutijela. Postupak pripreme uzorka za imunofluorescenciju se sastoji od fiksacije i permeabilizacije stanica, blokiranja nespecifičnog vezanja, te inkubacije protutijela. Stanice se najčešće fiksiraju sa 100% metanolom ili 4% paraformaldehidom u PBS-u. Za blokiranje nespecifičnog vezanja najčešće se koristi goveđi serumski albumin (*eng. Bovine serum albumin*; BSA). Stanica se može permeabilizirati organskim otapalima kao što su: etanol, metanol, aceton, te detergentima kao što su: Tween 20, Triton X-100 i saponin.

Saponin je glikozid dobiven iz biljaka koji selektivno uklanja kolesterol iz membrana ostavljajući pore veličine ~100Å. Permeabilizacija saponinom je reverzibilna i održava integritet površinskih antigena. Triton X-100 je derivat polioksietilena i sadrži alkilfenilnu hidrfobnu grupu. Permeabilizira sve lipidne dvosloje uključujući i jezgrinu ovojnicu tako što umeće monomer detergenta među membranske lipide. Najčešće je korišten detergent za peremabilizaciju stanica, ali nedostatak mu je što nije selektivan pa uz lipide može estrahirati i proteine koji se nalaze u membrani. U velikim koncentracijama ili u slučaju preduge inkubacije može lizirati stanicu. Tween 20 je polisorbatski neionski surfaktant sa hidrofilnim repom na koji je vezano 20 ponavljajućih molekula polietilen glikola. Funkcionira na način sličan Triton-u X-100, ali je mnogo nježniji i ne utječe na proteinsku aktivnost [26–29].

1.4. Protutijela

Protutijela (imunoglobulini, Ig) su proteini koje proizvode B stanice, a služe za pokretanje imunog odgovora na ciljani antigen. Protutijelo ima 2 laka i 2 teška lanca povezana disulfidnim vezama, a sastoji se od Fab fragmenta, koji ima varijabilnu i konstantnu regiju, i Fc fragmenta (Slika 5.). Antigen se veže na varijabilne regije Fab fragmenta, a Fc domenu

prepoznaju stanice, imuno proteini, te druga protutijela [29].



Slika 5. Shematski prikaz građe protutijela[5]

1.5. Proizvodnja monoklonalnih protutijela

Monoklonalna protutijela se proizvode tako da se stanice mijeloma pomoću polietilen glikola (PEG), fuziraju sa B stanicama (najčešće iz mišje slezene ili limfnih čvorova) koje proizvode željeno protutijelo. Takve, fuzirane stanice, se nazivaju hibridomi, besmrtne su, ali zadržaaju sposobnost proizvodnje protutijela. Hibridomi se stavljaju u hipoksantin-aminopterin-timidin (HAT) medij u kojem preživljavaju samo fuzionirane stanice, zato što stanicama mijeloma nedostaju enzimi timidin kinaza i hipoksantin-gvanin-fosforibozil transferaza (HGPRT). Fuzionirane stanice su dobile ove enzime iz B stanica, te će samo takve stanice preživjeti u

[5] Nacrtano u Microsoft Office PowerPoint-u (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD)

HAT mediju (B stanice se ne dijele beskonačno pa će nakon nekog vrijemena umrijeti). Klonovi hibridoma prolaze kroz *skrining* (gleda se specifičnost antigena i klase imunoglubulina), te se bira jedan klon iz kojeg raste nova linija stanica koje proizvode željeno protutijelo (monoklonalno zato što je dolazi od klonova jedne stanice).

2. Cilj rada

Cilj rada je optimizacija metode imunofluorescencije i karakterizacija novoproizvedenog protutijela hCD63.01 (Centar za Proteomiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci) protiv humanog CD63 proteina. Optimizacija metode imunofluorescencije za hCD63.01 testiranjem odgovarajućeg sredstva za permeabilizaciju i njegove koncentracije, te vremena inkubacije, koncentracije i sastava otopine za blokiranje. Usporedba ekspresije i lokalizacije CD63 primjenom protutijela u metodi imunoflourescencije na nekoliko staničnih linija: HeLa (tumor cerviksa), SW620 (tumor kolona) i MCF-7 (tumor dojke). Testiranje utjecaja metode pročišćavanja protutijela na njegovu učinkovitost usporedbom djelovanja supernatanta nepročišćenog protutijela i pročišćenog protutijela.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali:

3.1.1. Stanice

ATCC (eng. American Type Culture Collection) ljudska linija stanica HeLa (rak grlića maternice)
ATCC (eng. American Type Culture Collection) ljudska linija stanica MCF-7 (adenokarcinom epitela dojke, metastatski)
ATCC (eng. American Type Culture Collection) ljudska linija stanica SW620 (adenokarcinom debelog crijeva, metastatski)

3.1.2. Kemikalije

4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
BSA (eng. Bovine serum albumin), PAN-Biotech, Njemačka
DMEM medij (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium), PAN-Biotech, Njemačka
FBS (eng. Fetal bovine serum), PAN-Biotech, Njemačka
Mowiol 4-88, Fluka DABCO (1,4-Diazobiciklo [2.2.2.] oktan), Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
Paraformaldehid (PFA), Sigma Aldrich, Missouri, SAD
Saponin, Carl Roth, Njemačka
Tripansko modrilo, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
Tripsin, Gibco, SAD
Triton X-100, Rohm&Haas , SAD
Tween 20, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

3.1.3. Mediji i puferi

DMEM medij (DMEM, 2 mM L-glutamin, 1x105 U/L penicilin, 0,1 g/L streptomicin-sulfat, 10 % (FCS))
Paraformaldehid (PFA), pH 7,4 (za 25mL 4% PFA u H2O: 1g PFA, Sigma-Aldrich, 0,476g NaH2PO4 x 2H2O, Merck, 0,096g NaOH, T.T.T. Zaprešić,

0,135g D-(+)-glukoza, bezvodna, Kemika)
PBS (eng. Phosphate-buffered saline) (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na2HPO4 x 2H2O, 1,5 mM KH2PO4, 0,7 mM CaCl2 i 0,7 mM MgCl2 x 6H2O),
Saponin: 0,1% saponin v/v u PBS-u
Triton X-100: 0,1% Triton X-100 u PBS-u
0,5% Triton X-100 u PBS-u
Tween 20: 0,1% Tween 20 u PBS-u
0,5% Tween 20 u PBS-u
Uklopno sredstvo: 2,4 g Mowiol, 6 mL glicerol, 0,2 M, 0,2 M Tris-hidroskimetil-aminometan, 2,5% DABCO

3.1.4. Protutijela

Komercijalno protutijelo MEM-259, Alexa Fluor 488 mouse anti-human CD63, Thermo Fisher, SAD
Sekundarno protutijelo: Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, life technologies, SAD
Supernatant nepročišćenog primarnog protutijela hCD63.01 Kappa IgG1 lot001 (18.5.2018.), Centar za Proteomiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Hrvatska
Primarno protutijelo hCD63.01 Kappa IgG1 lot001 (18.5.2018.), Centar za Proteomiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Hrvatska

3.1.5. Laboratorijsko posuđe i oprema

Adhezivna stakalca pohranjena u 70%-tnom etanolu, Carl Roth, Njemačka
Centrifuga, Megafuge 1.0R Heraeus, Njemačka
Epruvete s poklopcem 1,5 mL, Eppendorf, Njemačka
Fluorescentni mikroskop Olympus UPLFN60X/0,9, Njemačka
HERA cell inkubator, Heraeus, Njemačka
Komorica za brojanje stanica, Marienfeld, Njemačka
Plastične epruvete 50mL, Cellstar, Greiner bio-one, Austrija

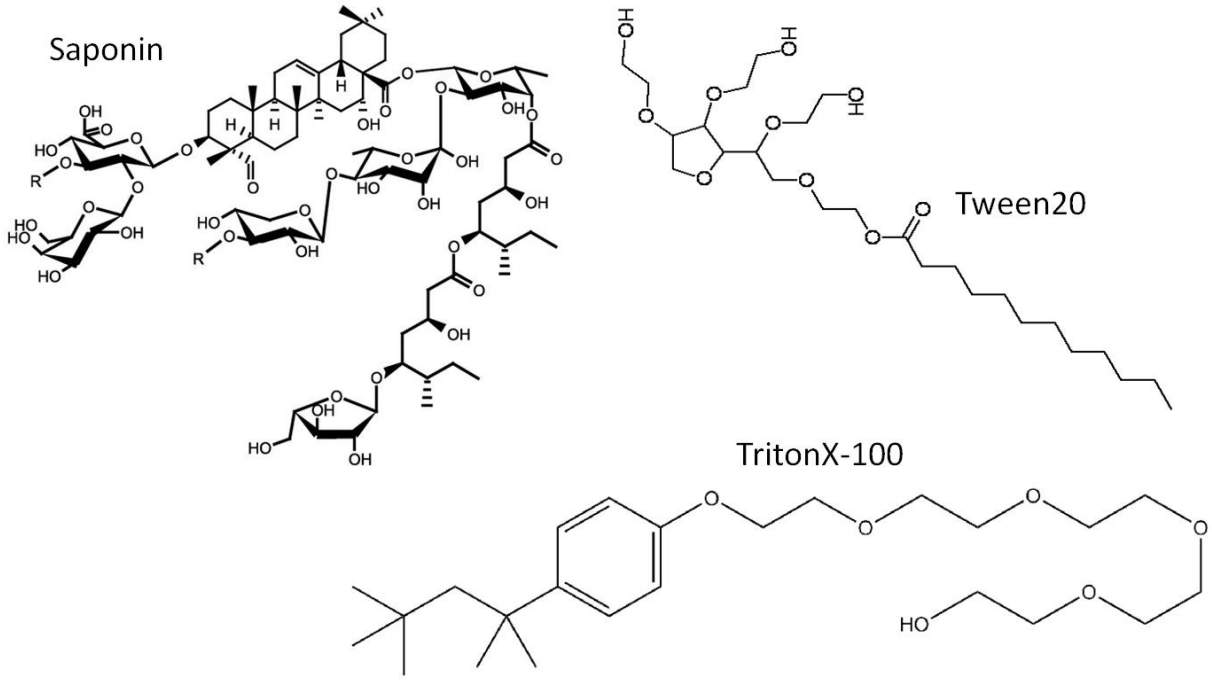
Pločice s 24 jažice (*eng. 24 well)*, Cellstar, Greiner bio-one, Austrija
Svjetlosni mikroskop CH20/Olympus, Njemačka

3.2. Uzgoj i priprema staničnih linija za imunofluorescenciju

HeLa, SW620 i MCF-5 stanice su inkubirane na 37°C s 5% CO_2 u DMEM mediju obogaćenom sa 10% FBS. Medij je uklonjen, te je u kulturu dodan tripsin kako bi se stanice odlijepile s podloge, nakon nekoliko minuta dodan je medij kako bi se zaustavilo djelovanje tripsina. Stanice su prebačene u sterilnu, plastičnu epruvetu od 50mL, te centrifugirane na 1200 rpm, 5 min na 4°C. Supernatant je odpipetiran, te je dodano 5mL DMEM uz resuspendiranje. Uzeto je 25 µL kulture i obojano sa 100 µL tripanskog modrila, te su stanice prebrojane u komorici pod svjetlosnim mikroskopom. Stanice su, zajedno sa medijem, prebačene u prethodno pripremljenu pločicu s 24 jažice sa stakalcima za adheziju stanica i to tako da u svakoj jažici bude oko $3x10^4$ stanica. Stanice su inkubirane tokom 48h na 37°C s 5% CO_2. Cijeli postupak odrađen je u komori za sterilan rad.

3.3. Imunofluorescencija

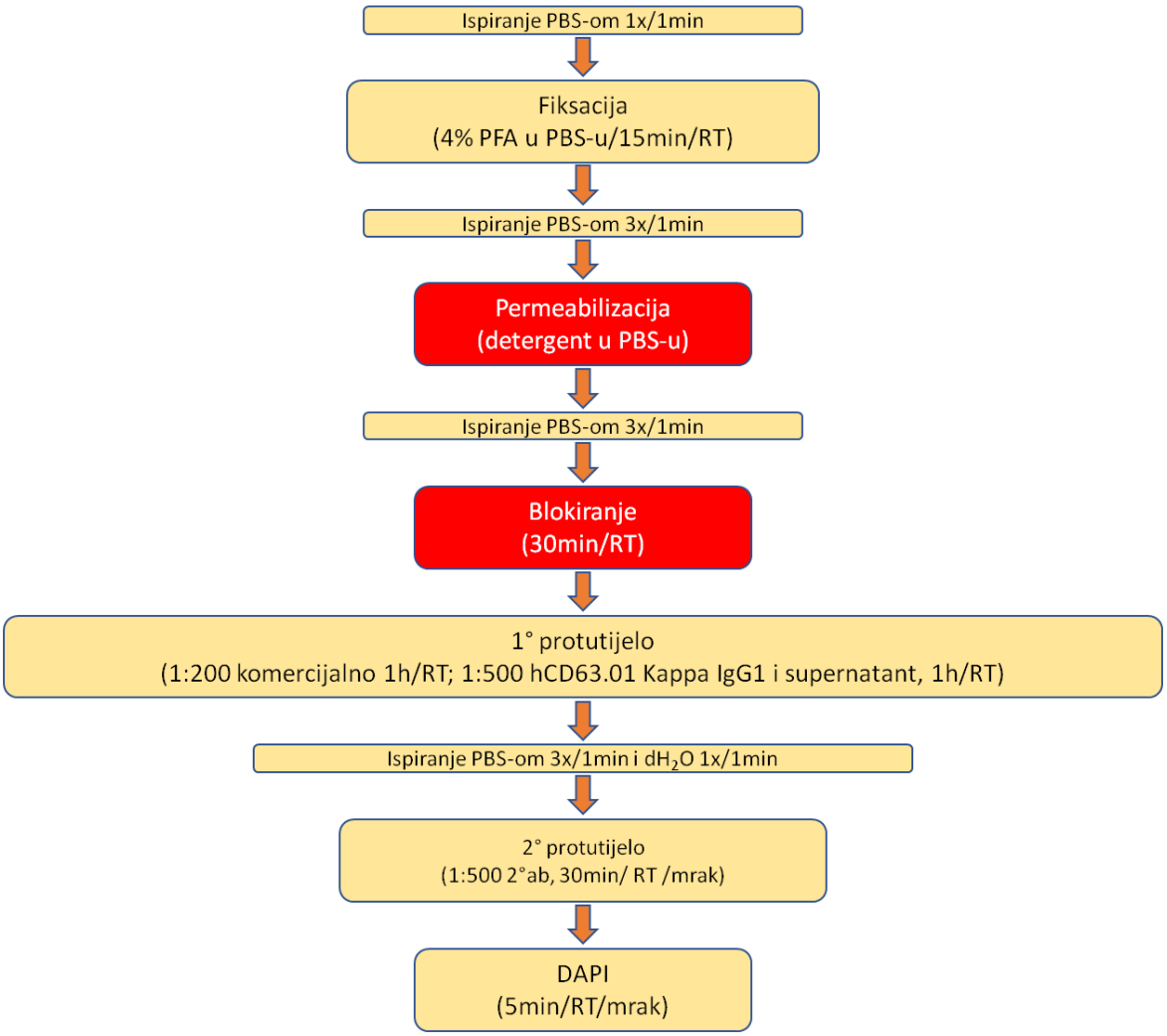
Za provedbu imunofluorescencije primjenjen je protokol prikazan na slici 7. Sve stanice fiksirane su sa 500 µL 4%-tnog PFA u PBS-u uz inkubaciju 15 minuta na sobnoj temperaturi. U pokusima su korištena 3 različita sredstva za permeabilizaciju: Tween-20, Triton X-100 i Saponin, te je mijenjana njihova koncentracija.



Slika 6. Molekularne strukture Saponina, Tween 20 i Triton X-100[6]

Blokiranje je provedeno sa BSA u PBS-u uz promjene koncentracije BSA, te sa ili bez sredstva za permeabilizaciju. Protutijela su razrijeđena u istoj otopini koja je korištena za blokiranje. Jezgre su obojane fluorescentnom bojom DAPI koja je 1000 puta razrijeđena u destiliranoj vodi.

[6] Prilagođene slike preuzete sa (zadnji pristup: 16.11.2019):
https://www.lookchem.com/casno9005-64-5.html;
https://phytotechlab.com/triton-x-100.html;
https://www.fishersci.co.uk/shop/products/saponin-from-quillaja-saponaria-molina-pract-acros-organics-3/10157800

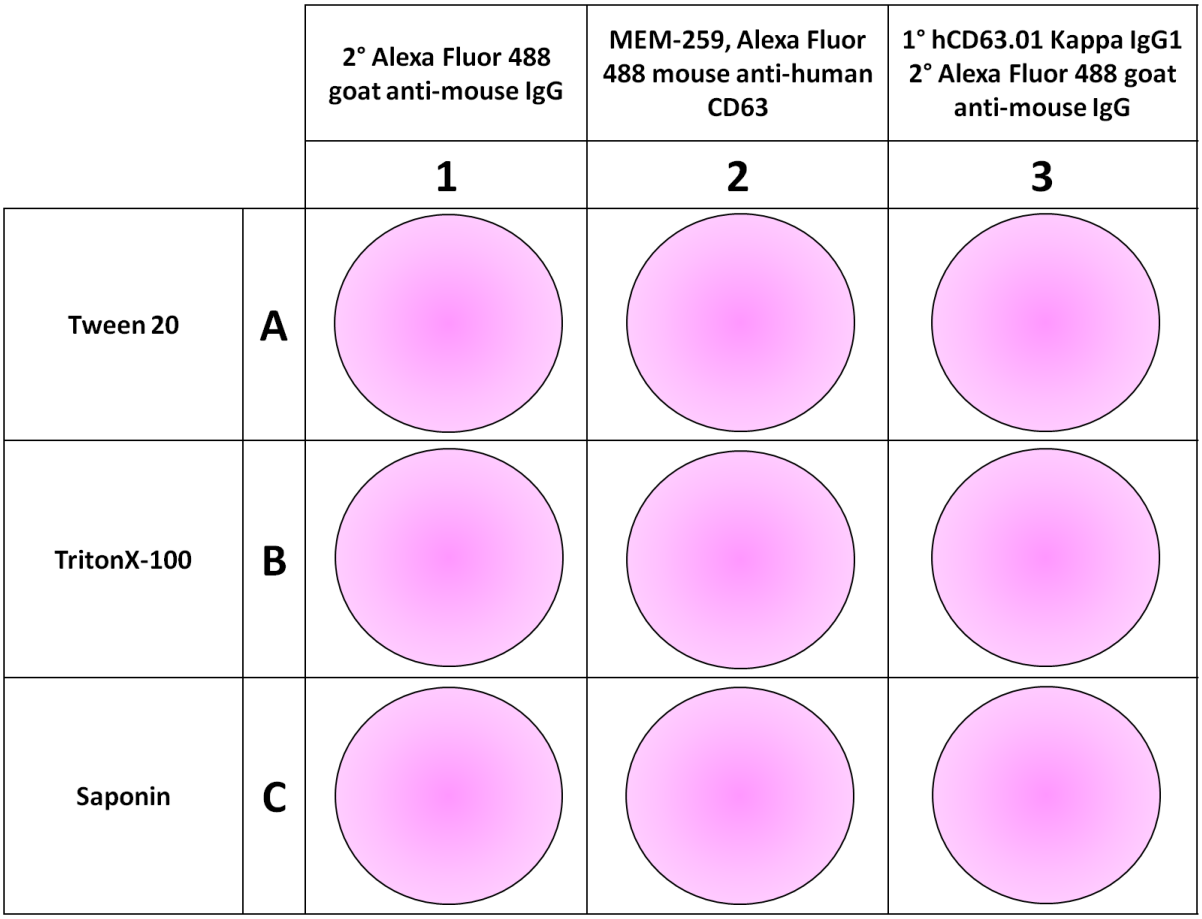


Slika 7. Shematski prikaz općeg protokola imunofluorescencije. Crvenom bojom su značeni koraci u kojima je mijenjana koncentracija ili sredstvo za različite skupine stanica.

3.3.1. Imunofluorescencija sa 0,1% sredstva za permeabilizaciju (Tween 20, Triton X-100 i Saponin) uz 3% BSA za blokiranje

Imunofluorescencija je obavljena po protokolu prikazanom na slici 7. HeLa stanice su permeabilizirane dodatkom 500 µL detergenta u PBS-u: 0,1% Triton-a X-100 (Slika 8., A1-A3), 0,1% Tween-a 20 (Slika 8., B1-B3), te 0,1% saponin (Slika 8., C1-C3) uz inkubaciju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Stanice su isprane PBS-om, te blokirane dodatkom 500 µL 3% BSA u PBS-u uz odgovarajući 0,1%-tni detergent. U jažice sa stanicama, permeabilizirane različitim detergentima, dodano je 200 µL sekundarnog protutijela (1:500 Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG), kao

negativna kontrola, u otopini za blokiranje sa 0,1% sredstva za permeabilizaciju uz inkubaciju 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi (Slika 7., A1, B1, C1). Na isti je način dodano primarno komercijalno protutijelo direktno obilježeno sa Alexa Flour 488 fluorescentnom bojom (1:200 MEM-259, Alexa Fluor 488 mouse anti-human CD63), kao pozitivna kontrola, te je inkubirano 1h u mraku na sobnoj temperaturi (Slika 8., A2, B2, C2). U preostale jažice dodano je ispitivano primarno protutijelo (1:200 hCD63.01) u otopini za blokiranje s 0,1% sredstva za permeabilizaciju, te je inkubirano 1h u mraku na sobnoj temperaturi (Slika 8., A3, B3, C3). Nakon inkubacije stanice su isprane PBS-om, te je u jažice sa ispitivanim protutijelom (Slika 8., A3, B3, C3). dodano 200 µL sekundarnog protutijela u otopini za blokiranje s 0,1% sredstva za permeabilizaciju uz inkubaciju 30 min u mraku na sobnoj temperaturi. Svim stanicama je dodano 200 µL otopine DAPI (1:1000 u dH_2O), te su inkubirane 5 min na sobnoj temperaturi. Stanice su ispirane PBS-om i destiliranom vodom. Stakalca sa stanicama su izvađena iz pločice sa 24 jažice, osušena i uklopljena na predmetna stakalca pomoću Mowiola. Protokol prikazan na slikama 7. i 8. primjenjen je u svim daljnjim pokusima uz izmjene koncentracija detergenata, koncentracije BSA i sastava sredstva za bokiranje.



Slika 8. Shematski prikaz pločice korištene za imunofluorescenciju

3.3.2. Imunofluorescencija sa 0,5% sredstva za permeabilizaciju (Tween 20 i Triton X-100) uz 3% BSA za blokiranje

HeLa stanice su do koraka permeabilizacije tretirane na isti način kao pod 3.3.1. Stanice su permeabilizirane dodatkom 500 µL 0,5% Triton-a X-100, te 0,5% Tween-a 20 u PBS-u uz inkubaciju od 7 min. Stanice su isprane PBS-om, te blokirane dodatkom 500 µL 3% BSA u PBS-u uz 0,1% odgovarajućeg detergenta. Ostatak pokusa proveden je isto kao pod 3.3.1.

3.3.3. Imunofluorescencija sa 0,5% sredstva za permeabilizaciju (Tween 20 i Triton X-100) i 5% BSA

HeLa stanice su tretirane na isti način kao pod 3.3.1. samo što je otopina za blokiranje bila 5% BSA u PBS-u bez dodatka detergenata.

3.3.4. Imunofluorescencija na staničnim linijama SW620 i MCF-7

Stanične linije SW620 i MCF-7 su prethodno opisanim postupkom nasađene na pločice sa 24 jažice, te su permeabilizirane 0,5% Tween 20 detergentom. Ostatak postupka imunofluorescencije proveden je isto kao pod 3.3.3.

3.3.5. Usporedba djelovanja nepročišćenog supernatanta protutijela i pročišćenog protutijela na staničnim linijama HeLa, SW620 i MCF-7

Optimiziranim protokolom opisanim pod 3.3.3. provedena je imunofluorescencija na staničnim linijama HeLa, SW620 i MCF-7. Osim pročišćenog hCD63.01 korišten je i nepročišćeni supernatant hCD63.01. Stanice u koje je dodan supernatant tretirane su na isti način kao i one u koje je dodano hCD63.01 protutijelo.

3.3.6. Analiza jačine signala

Slike su analitički obrađene u programu otvorenog koda *fiji* (Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (LOCI), Sveučilište Wisconsin-Madison, Wisconsin, SAD) koji se koristi za kvantifikaciju stanica i signala imunofluorescencije. Podaci dobiveni pomoću programa *fiji* statistički su obrađeni i grafički prikazani pomoću programa *Microsoft Excel* (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD).

4. Rezultati

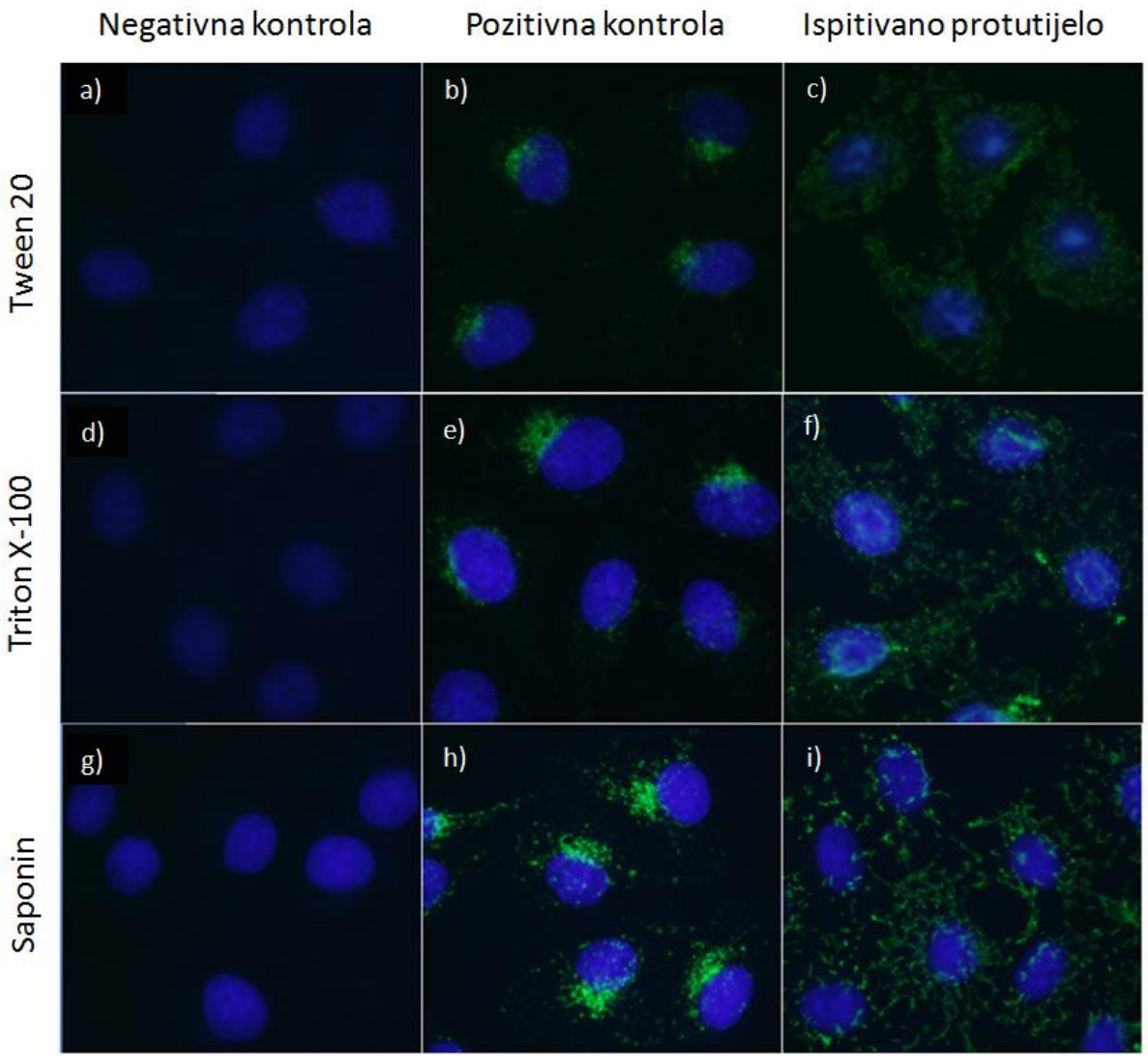
4.1. Djelovanje 0,1% koncentracije detergenata (Tween 20, Triton X-100, saponin) uz 3% BSA za blokiranje

Provedena je imunofluorescencija za detekciju CD63 na HeLa stanicama. Kao pozitivna kontrola korišteno je primarno protutijelo za CD63 direktno konjugirano na obilježivač (eng. *MEM-259, Alexa Fluor 488 mouse anti-human CD63*), a kao negativna kontrola sekundarno protutijelo (eng. *Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG*) na CD63.01 ispitivano primarno protutijelo. Jezgre stanica obojane su fluorescentnom DAPI bojom, a slike su dobivene fluorescentnim mikroskopom.

Kod pozitivne kontrole stanica, koje su permeabilizirane 0,1%-tnim Tween 20 detergentom, signal je vidljiv uz jezgru stanice (Slika 9. b). Slike dobivene pomoću CD63.01 imaju signal koji nije lokaliziran samo uz jezgru već je difuzno raspoređen kroz cijelu stanicu (Slika 9. c).

Kod pozitivne kontrole stanica, koje su permeabilizirane 0,1% Triton-om X-100, signal je vidljiv uz jezgru stanice (Slika 9. e). Signal na slikama dobivenim pomoću CD63.01 je vidljiv kroz cijelu stanicu, te se može uočiti nespecifično obojenje struktura koje su prisutne kroz cijelu stanicu (Slika 9.f).

Provedena je imunofluorescencija za detekciju CD63 uz 0,1% Saponin kao sredstvo za permeabilizaciju. Pozitivna kontrola pokazuje intenzivan signal u nakupini s jedne strane stanične jezgre (Slika 9. h). Signal na slikama dobivenim pomoću CD63.01 u obliku je zrakastih struktura sličnim izdancima plazma membrane (Slika 9. i).



Slika 9. Rezultati imunofluorescencije sa 0,1% sredstva za permeabilizaciju: Tween 20, Triton X-100 i Saponin, te 3% BSA za blokiranje, povećanje 1000X

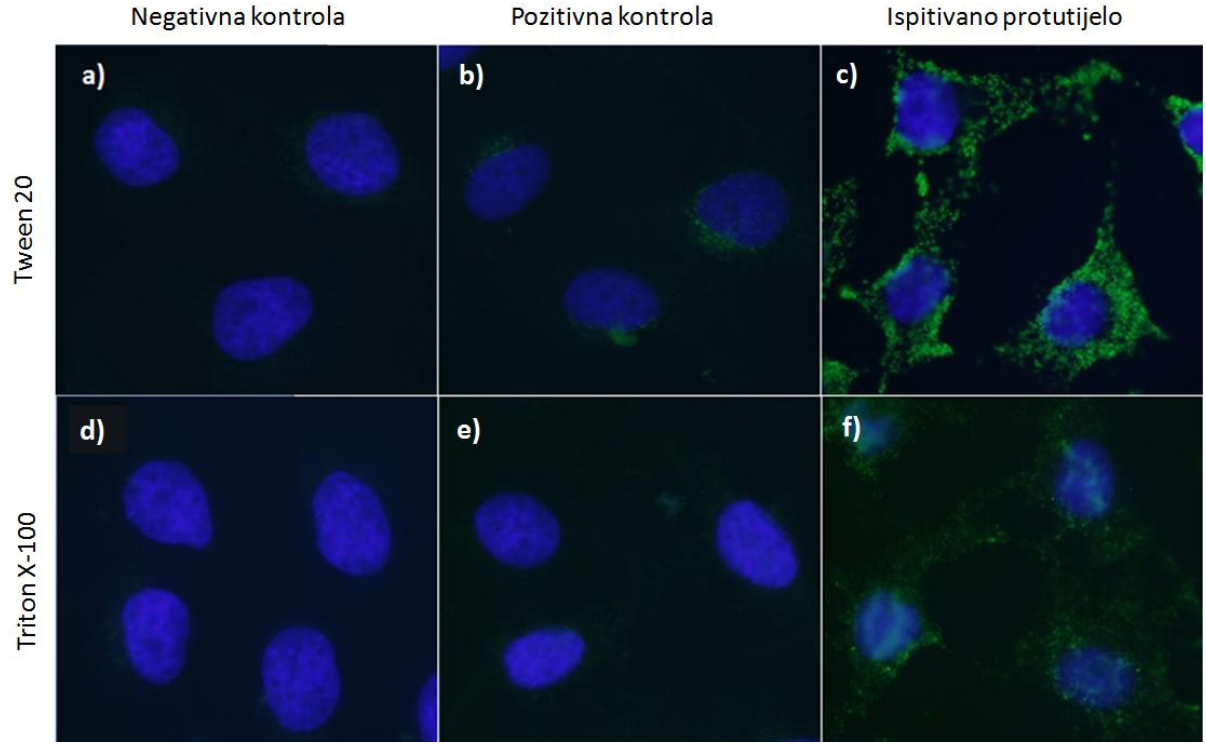
4.2. Djelovanje 0,5% koncentracije detergenata (Tween 20, Triton X-100) uz 3% BSA za blokiranje

Kod pozitivne kontrole stanica, koje su permeabilizirane 0,5% Tween-om 20, vidljiv je signal lokaliziran s jedne strane stanične jezgre (Slika 10. b). Signal na slikama dobivenim pomoću CD63.01 nije lokaliziran samo uz jezgru, te se može uočiti obojenje kroz cijelu stanicu uz nešto intenzivniji signal mjestimično uz plazma membranu (Slika 10. c).

Kod pozitivne kontrole stanica, koje su permeabilizirane 0,5% Triton-om X-100, signal je vrlo slab, te je karakteristično obojenje uz jezgru stanice vrlo slabo uočljivo (Slika 10. e). Signal na slikama dobivenim pomoću

CD63.01 je vidljiv kroz cijelu stanicu, te se može uočiti mjestimično jače točkasto obojenje uz jezgru (Slika 10. f).

Na svim slikama vidljivo je i pozadinsko obojenje (eng. *background*).

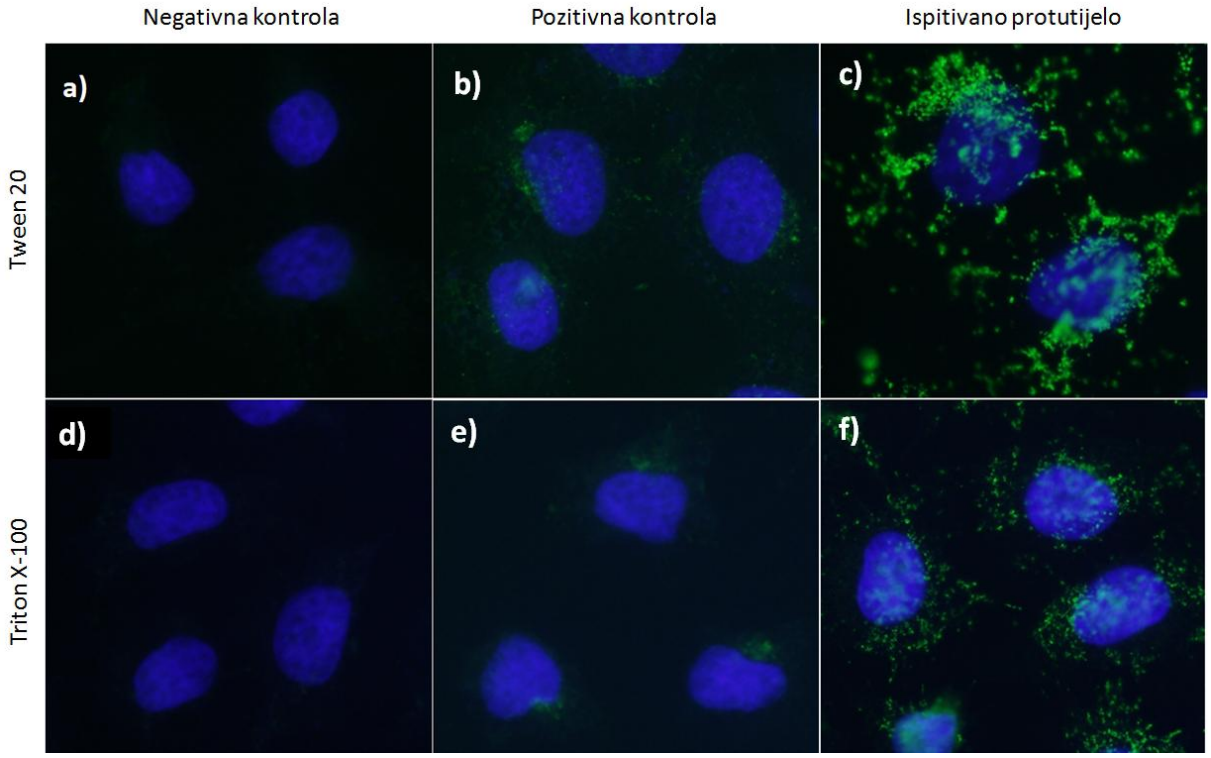


Slika 10. Imunofluorescencija sa 0,5% sredstva za permeabilizaciju: Tween 20, Triton X-100 uz 3% BSA za blokiranje, povećanje 1000X

4.3. Djelovanje 0,5% koncentracije detergenata (Tween 20, Triton X-100) uz 5% BSA za blokiranje

Kod pozitivne kontrole, permeabilizirane Tween-om 20, vidljiv je slab signal lokaliziran uz jedan dio jezgre stanice (Slika 11. b). Signal na slikama dobivenim pomoću CD63.01 je intenzivan, te je lokaliziran kroz cijelu stanicu. Može se uočiti obojenje struktura koje podsjećaju na izdanke plazma membrane, te točkastih struktura (Slika 11. c).

Kod pozitivne kontrole, permeabilizirane s Triton-om X-100, vidljiv je slab signal lokaliziran u nakupini s jedne strane jezgre stanice (Slika 11. e). Signal na slikama dobivenim pomoću CD63.01 je lokaliziran kroz cijelu stanicu, te se može uočiti obojenje točkastih struktura, manjih od onih dobivenih sa Tween-om 20 kao sredstvom permeabilizacije (Slika 11. f).

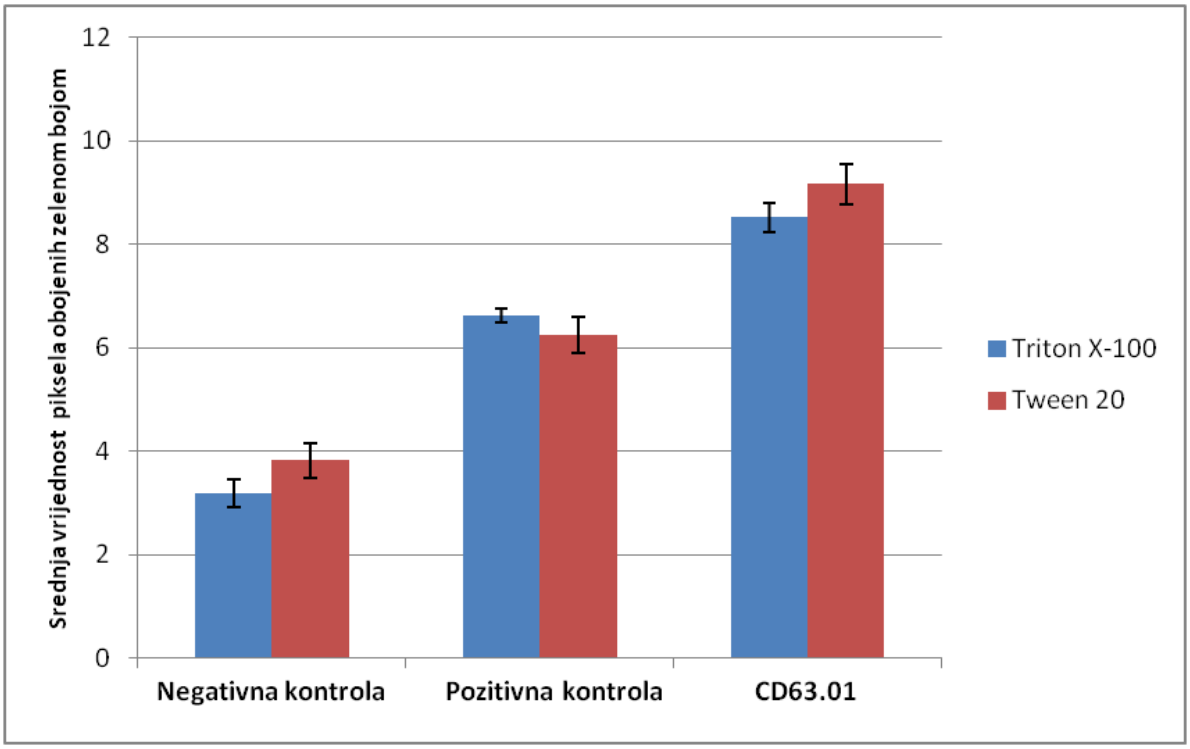


Slika 11. Imunofluorescencija sa 0,5% sredstva za permeabilizaciju i 5% sredstva za blokiranje: Tween 20, Triton X-100 uz 5% BSA za blokiranje, povećanje 1000X

4.4. Analiza jačine signala na HeLa stanicama

Pomoću programa *Fiji* dobivena je srednja vrijednost zeleno obojanih piksela na slikama dobivenim imunofluorescencijom provedenom po protokolu prikazanom na slici 7., na staničnoj liniji HeLa. Na svakoj slici su analizirane četiri stanice, a svaki stupić na grafičkom prikazu predstavlja srednju vrijednost i odgovarajuću standardnu devijaciju zeleno obojenih piksela na tri slike.

Kvantificiran je signal optimiziranog protokola imunofluorescencije na stanicama permeabiliziranim 0,5%-tnim Triton-om X-100 i Tween-om 20 uz 5% BSA. Najjači signal dobiven je za stanice permeabilizirane 0,5% Tween-om 20 i tretirane CD63.01 novoproizvedenim protutijelom (Slika 12.).



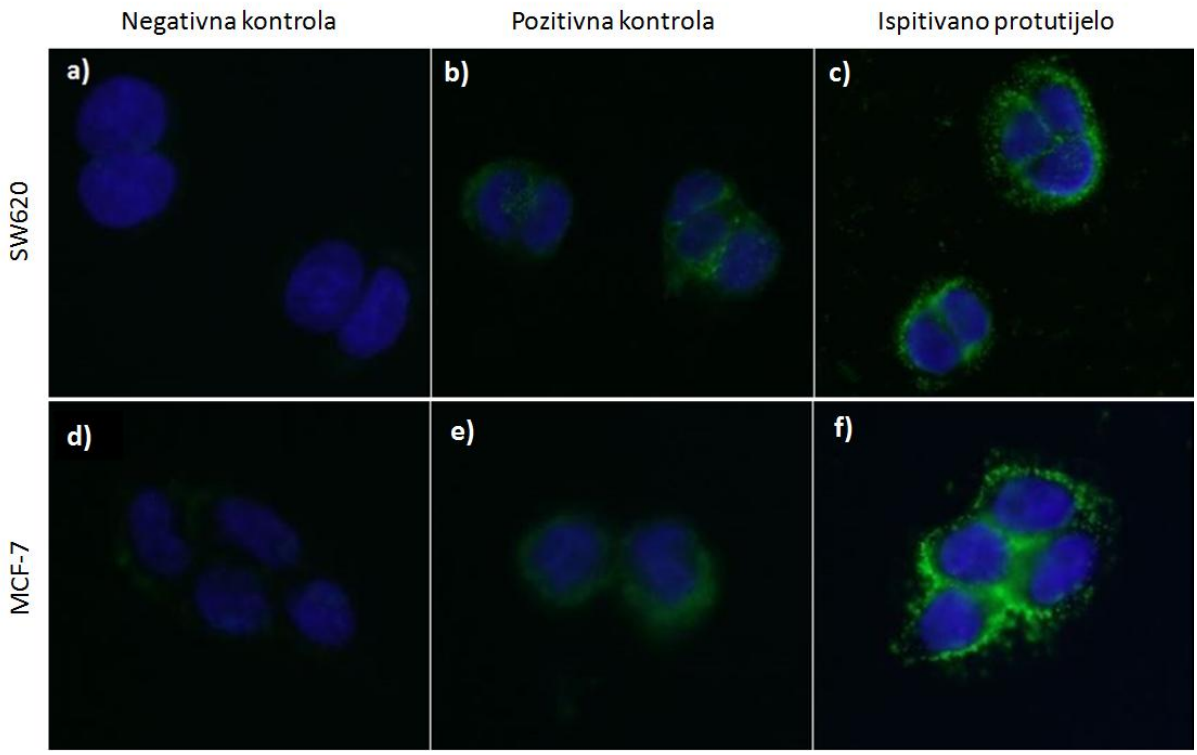
Slika 12. Kvantifikacija jačine signala imunofluorescencije za detekciju CD63 na HeLa stanicama permeabiliziranim sa 0,5% Tween 20 ili Triton X-100 uz 5% BSA

4.5. Vizualizacija CD63.01 kod staničnih linija SW620 i MCF-7

Provedena je imunofluorescencija u optimiziranim uvjetima za detekciju CD63 u SW620 i MCF-7 staničnim linijama pomoću CD63.01 i uz 0,5% Tween-om 20 kao sredstvo za permeabilizaciju, te 5% BSA kao sredstvo za blokiranje.

Kod pozitivne kontrole, za SW620 stanice, vidljiv je signal lokaliziran oko cijele jezgre stanice (Slika 13. b). Signal na slikama dobivenim pomoću CD63.01 je intenzivniji i nepravilnijeg oblika, ali lokaliziran jednako kao na pozitivnoj kontroli (Slika 13. c).

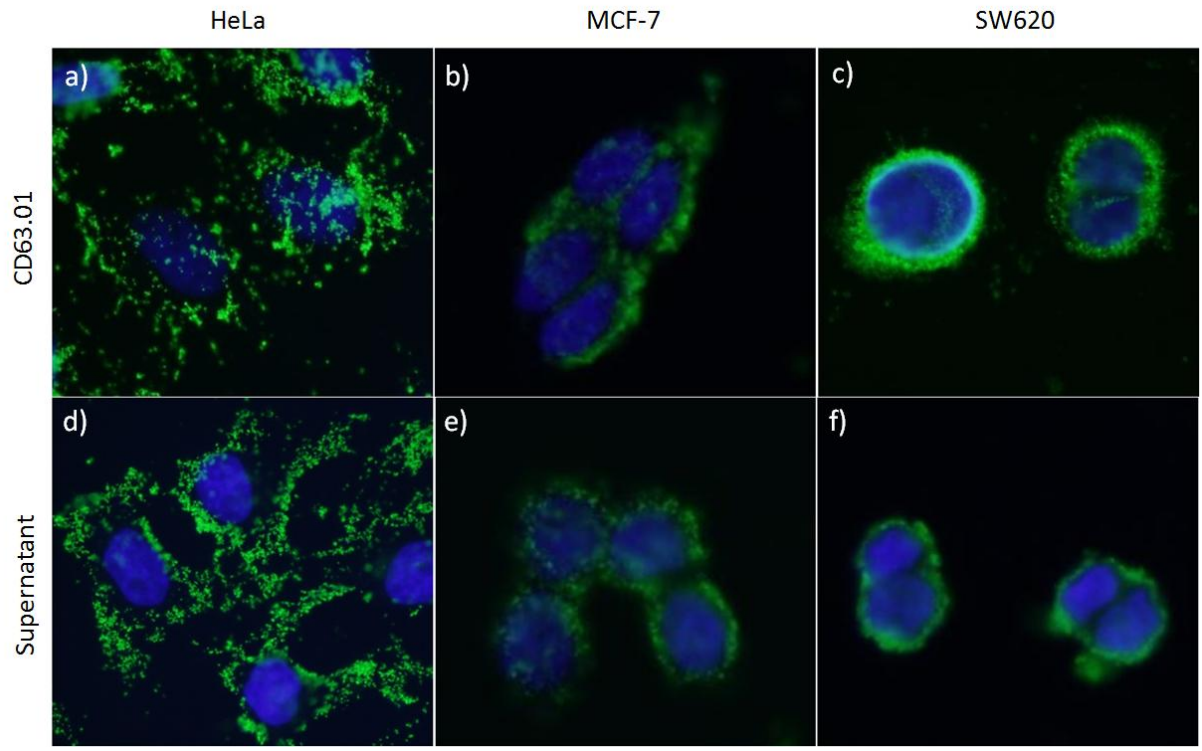
Na pozitivnoj kontroli za MCF-7 stanice signal je difuzno lokaliziran oko cijele jezgre stanice (Slika 13. e). Signal na slikama dobivenim pomoću CD63.01 je intenzivniji, ali lokaliziran jednako kao na pozitivnoj kontroli, te su mjestimično vidljive točkaste strukture (Slika 13. f).



Slika 13. Imunofluorescencija na staničnim linijama SW620 i MCF-7 sa 0,5% Tween 20 sredstva za permeabilizaciju uz 5% BSA za blokiranje, povećanje 1000X

4.6. Vizualizacija CD63 sa CD63.01 i nepročišćenim supernatantom CD63.01

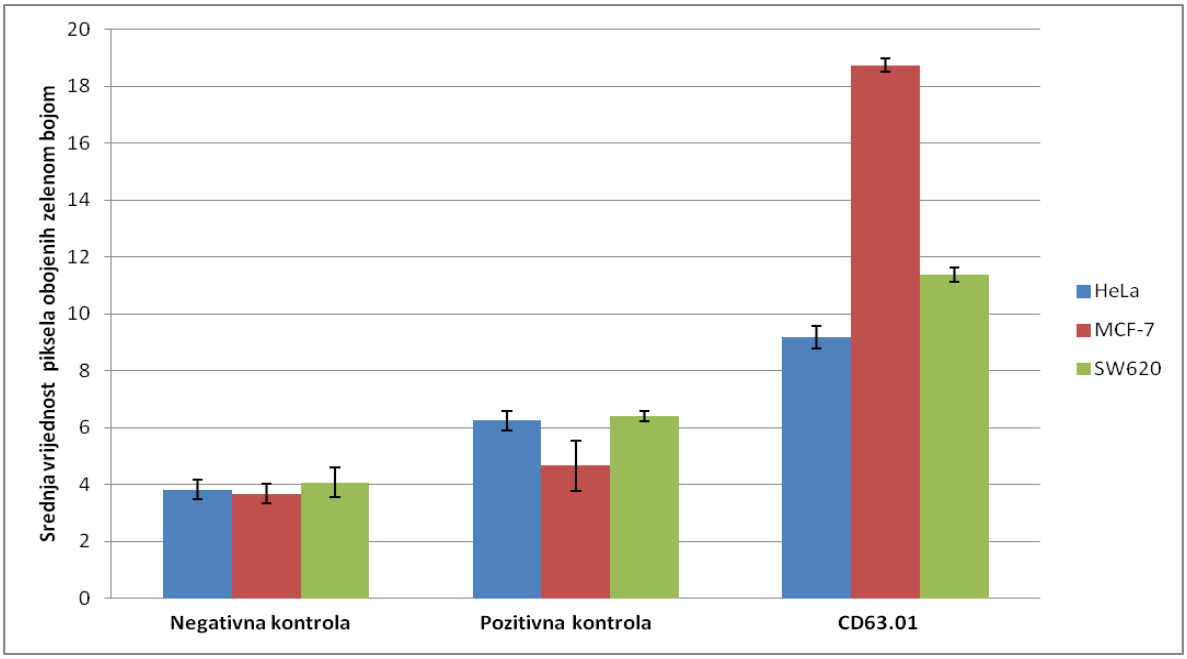
Slike HeLa stanica dobivene pomoću supernatanta nepročišćenog CD63.01 imaju intenzivan signal koji je lokaliziran slično kao i signal dobiven pročišćenim protutijelom. U oba se slučaja mogu uočiti točkaste i zrakaste strukture koje se protežu kroz čitavu stanicu, te nalikuju izdancima plazma membrane (Slika 14. a i d). Slike SW620 i MCF-7 stanica dobivene pomoću supernatanta nepročišćenog CD63.01 imaju signal vrlo sličan signalu koji daje CD63.01 (Slika 14. b, c, e i f.).



Slika 14. Imunofluorescencija sa 0,5% Tween 20 kao sredstvo za permeabilizaciju uz 5% BSA za blokiranje na staničnim linijama HeLa, MCF-7 i SW620 tretiranim CD63.01 pročišćenim protutijelom i nepročišćenim supernatantom CD63.01, povećanje 1000X

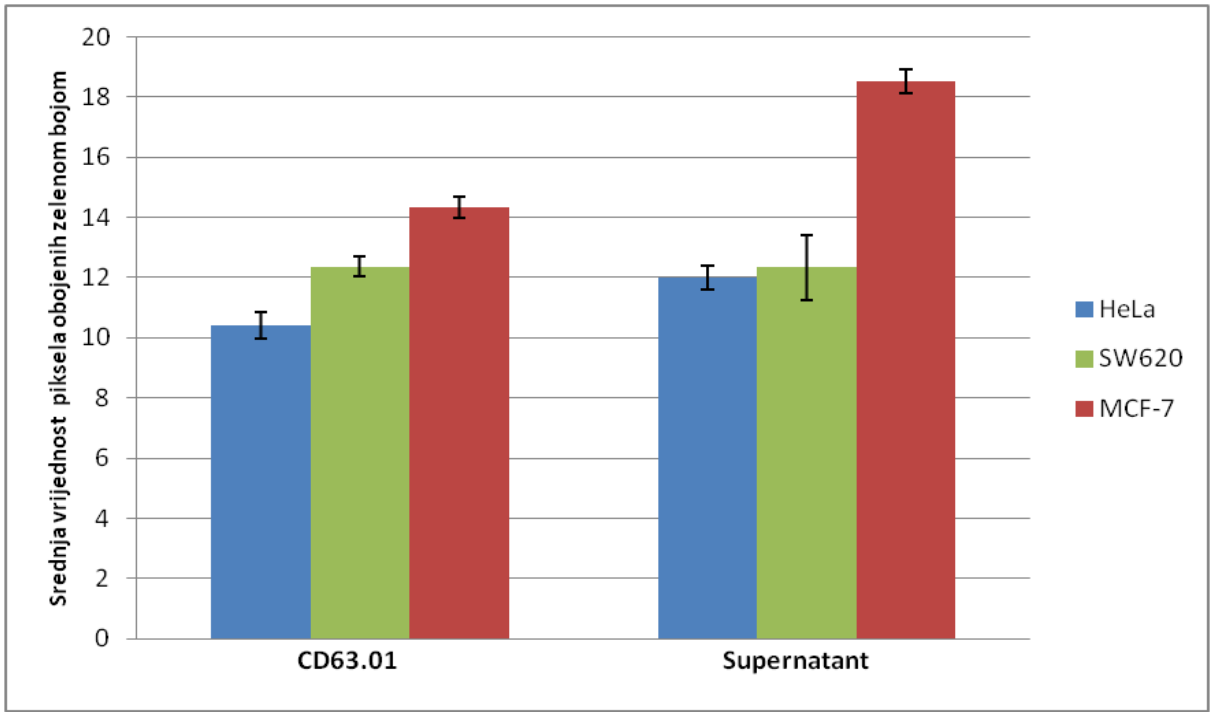
4.7. Analiza jačine signala optimizirane imunofluorescencije na HeLa, SW620 i MCF-7 staničnim linijama

Analiza jačine signala provedena je isto kao pod 4.4. Kvantifikacija kod HeLa, SW620 i MCF-7 staničnih linija pokazuje da ispitivano protutijelo CD63.01, uz 0,5% Tween 20 za permeabilizaciju i 0,5% BSA za blokiranje, ima najjači signal u sve 3 stanične linije. Dodatno, stanična linija MCF-7 pokazuje najjači signal od svih testiranih linija za ispitivano protutijelo CD63.01 (Slika 15.).



Slika 12. Kvantifikacija jačine signala imunoflourescencije za detekciju CD63 na HeLa, MCF-7 i SW620 staničnim linijama uz 0,5% Tween 20 kao sredstvo za permeabilizaciju i 5% BSA za blokiranje

Stanice peremeabilizirane sa 0,5% Tween-om 20 i blokirane sa 5% BSA, te tretirane CD63.01 i supernatantom CD63.01 daju sličan signal uz odstupanje u staničnoj liniji MCF-7 gdje značajno jači signal daje supernatant (Slika 16.).



Slika 13. Kvantifikacija jačine signala imunoflourescencije za detekciju CD63 na HeLa, MCF-7 i SW620 staničnim linijama pomću CD63.01 pročišćenog protutijela i nepročišćenog supernatanta CD63.01 uz 0,5% Tween 20 i 5% BSA

5. Rasprava

Provedena je optimizacija imunofluorescencije na staničnoj liniji HeLa po protokolu prikazanom na slici 7. U imunofluorescenciji je korišteno novoproizvedeno protutijelo na transmembranski protein CD63, CD63.01. Ispitana su različita sredstva za permeabilizaciju stanica: Triton X-100, Saponin i Tween 20, kako bi se odredilo koje sredstvo daje najbolje rezultate za detekciju CD63, tj. koje sredstvo najbolje pogoduje vezanju CD63.01 protutijela na protein CD63. Optimiziran je sastav i koncentracija pufera za blokiranje kako bi se izbjeglo pozadinsko obojenje.

Stanice su prvo permeabilizirane trima različitim detergentima (Triton X-100, Saponin i Tween 20; 0,1%), otopina za blokiranje je, uz 3% BSA, sadržavala i 0,1% odgovarajućeg detergenta.

Na stanicama tretiranim CD63.01 i permeabiliziranim Triton-om X-100 i saponinom vide se točkaste i izdužene strukture koje nalikuju izdancima plazma membrane (Slika 9. f), dok se kod stanica permeabiliziranim Tween-om 20 vidi difuzni signal u jasnim konturama stanice (Slika 9. c). Kod pozitivne kontrole (MEM-292) za sve ispitane detergente signal je lokaliziran u nakupini samo s jedne strane stanične jezgre (Slika 9. b, e, h).

Saponin je pogodan za detekciju transmembranskih proteina, selektivno se veže za kolesterol i izuzima ga iz membrane, na taj način stvarajući rupe u membrani. Tween 20 i Triton X-100 su organska otapala koja otapaju lipide iz stanične membrane čineći membranu poroznom. Ova dva detergenta nisu selektivna, te uz lipide mogu otopiti i proteine koje treba detektirati [27]. Rezultati imunofluorescencije za sva su tri detergenta bili vrlo slični, Tween 20 i Triton X-100 su najčešće korištena sredstva za permeabilizaciju, te su stoga uključeni u daljnja testiranja.

Kako bi se dobio intenzivniji i čišći signal, povećana je koncentracija detergenta, stanice su permeabilizirane 0,5% Triton-om X-100 i Tween-om 20 uz 3% BSA sa 0,5% odgovarajućeg detergenta za blokiranje.

Rezultat imunofluorescencije stanica permabiliziranih Triton-om X-100 i tretiranih MEM-292 protutijelom bio je slab signal (Slika 10. e). Stanice tretirane CD63.01 protutijelom imale su nešto intenzivnije obojenje, difuzno raspoređeno kroz stanicu (Slika 10. f). Slike dobivene permeabilizacijom sa Tween-om 20 pokazuju vidljivo jači signal u odnosu na slike dobivene permeabilizacijom sa Triton-om X-100 (Slika 10. b i c). Na slici 10. b slabo je vidljivo karakteristično obojenje oko dijela jezgre, dok je na slici 10. c, gdje su stanice tretirane sa CD63.01, vidljivo intenzivnije obojenje točkasto i mjestimično difuzno raspoređeno kroz cijelu stanicu. Sve slike su, neovisno o detergentu, imale značajno pozadinsko obojenje, do kojeg je najvjerojatnije došlo zbog nespecifičnog vezanja, tj. nedovoljne koncentracije BSA u puferu za blokiranje.

Kako bi se izbjeglo pozadinsko obojenje povećana je koncentracija BSA u puferu za blokiranje sa 3% na 5% bez prisutnosti sredstva za permeabilizaciju. Triton X-100 i Tween 20 trajno permeabiliziraju stanicu pa je detergent izbačen iz otopine za blokiranje. Protokoli imunofluorescencije variraju u različitim istraživanjima, te se detergent ponekad koristi u otopini za blokiranje, a ponekad nije prisutan [27]. Stanice su ponovno permeabilizirane 0,5% Triton-om X-100 i Tween-om 20. Stanice permeabilizirane Tween-om 20 imale su intenzivniji signal (Slika 11. b i c) od onih permeabiliziranih Triton-om X-100 (Slika 11. e i f). Stanice tretirane CD63.01 protutijelom i permeabilizirane Tween-om 20 dale su intenzivan, raspršen signal koji se proteže kroz cijelu stanicu (Slika 11. c), dok su stanice permeabilizirane Triton-om X-100 imale slabiji, točkasto raspoređen signal bez jasnih granica (Slika 11. f).

Provedena je kvantitativna usporedba imunofluorescencije provedene na HeLa stanicama permeabiliziranim s različitim 0,5% detergentima. Stanice permeabilizirane Tween-om 20 imale su jači signal od stanica tretiranih Triton-om X-100, osim u pozitivnoj kontroli gdje je signal stanica peremeabiliziranih Triton-om X-100 bio nešto jači od onog dobivenog pomoću Tween-a 20. Signal stanica tretiranih s CD63.01 protutijelom pokazao se jačim od signala stanica tretiranih MEM-292 protutijelom

(Slika 12.).

Tween 20 je nježniji detergent od Triton-a X-100, ne utječe na aktivnost proteina, te postoji pretpostavka da ima pozitivan efekt na vezanje protutijela i antigena [26,28]. Tween 20 je, u ovom slučaju, odabran kao najbolje sredstvo za permeabilizaciju stanice.

Optimizirana imunofluorescencija provedena je na još dvije stanične linije: SW620 i MCF-7. Obje stanične linije dale su jak signal što je pokazalo da je optimizacija imunofluorescencije ispravno provedena (Slika 13.).

CD63.01 protutijelo je u svim eksperimentima imalo intenzivniji i šire rasprostranjeni signal kroz stanicu nego komercijalno protutijelo. CD63 prolazi kroz posttranslacijske modifikacije, ima više mjesta glikozilacije, te se nalazi na različitim mjestima u stanici što daje moguće objašnjenje za ovakav rezultat. Moguće je prepoznavanje većeg broja formi CD63 od strane CD63.01 novoproizvedenog protutijela u odnosu na komercijalno dostupno protutijelo (MEM-259). Do takve situacije može doći ako je antigen koji protutijelo prepoznaje skriven zbog različite konformacije ili položaja proteina na stanici, ali i ako je promijenjen tijekom posttranslacijskih modifikacija [8]. CD63.01 protutijelo nije označeno fluorescentnom bojom, kao MEM-259 protutijelo, već mu je potrebno sekundarno protutijelo za stvaranje signala. Primarno protutijelo može vezati više od jednog sekundarnog protutijela što je moguće objašnjenje za intenzivniji signal stanica tretiranih sa CD63.01 od signala na stanicama tretiranim MEM-259 protutijelom [29].

Optimizirana imunofluorescencija provedena je na staničnim linijama HeLa, SW620 i MCF-7, kako bi se usporedio signal na različitim staničnim linijama. Kvantitativno je uspoređen intenzitet signala kod sve 3 stanične linije, te su MCF-7 stanice imale najjači signal na slikama dobivenim CD63.01 protutijelom (Slika 15.). Poznato je da je CD63 visoko eksprimiran u stanicama tumora dojke [9,30] kojima pripada i MCF-7 stanična linija, što potvrđuje i ovaj rezultat. Tominaga i sur. su na MCF-7 stnicama utvrdili da je lokalizacija CD63 određena riboforin II (RPN2) reguliranom glikozilacijom važna za maligne karakteristike raka dojke, te

da RPN2-regulirana glikozilacija CD63 određuje lokalizaciju gena za otpornost na više lijekova *(eng. Multi drug resistance gene*; MDR1). Metodom imunofluorescencije je na MCF-7 staničnoj liniji istraživana ovisnost lokalizacije CD63, te kolokalizacije CD63 i MDR1 o ekspresiji RPN2. Zaključeno je da visoka ekspresija CD63 u stanicama raka dojke, te njegova interakcija sa MDR1 utječe na otpornost na lijekove i invazivnost stanica raka dojke [9].

Nakon optimizacije metode, provedena je imunofluorescencija sa supernatantom nepročišćenog CD63.01 u cilju usporedbe rezultata sa onima pročišćenog protutijela. Sve stanične linije podvrgnute su imunofluorescenciji sa novoproizvedenim protutijelom CD63.01, te supernatantom nepročišćenog CD63.01 protutijela kako bi se ustanovilo prolazi li protutijelo tijekom pročišćavanja kroz neželjene promjene. Provedena je kvantitativna usporedba imunofluorescencije uz primjenu supernatanta nepročišćenog protutijela, te pročišćenog CD63.01 protutijela. Sve stanične linije imale su vrlo sličan intenzitet signala dobivenog upotrebom CD63.01 pročišćenog protutijela u usporedbi sa signalom dobivenim upotrebom nepročišćenog supernatanta protutijela. MCF-7 linija stanica dala je nešto intenzivniji signal u kombinaciji sa supernatantom nepročišćenog protutijela (Slika 16.). Tehnike pročišćavanja protutijela zahtijevaju nizak pH koji može imati negativan učinak na kvalitetu, specifičnost i funkciju pročišćenih protutijela [31]. Dobiveni rezultati ukazuju da protutijelo nije prošlo kroz relevantne promjene prilikom pročišćavanja, te da je jednako učinkovito kao i supernatant nepročišćenog protutijela (Slika 14. i 16.).

Na slikama obojenim pomoću CD63.01 protutijela uočljive su razne strukture koje se protežu kroz cijelu stanicu, one ne mogu biti točno imenovane samo ovim istraživanjem. Kako bi mogli bolje okarakterizirati vidljive strukture potreban je konfokalni mikroskop koji omogućuje stvaranje 3D slike promatrane stanice što znači da se može odrediti točan položaj signala u stanici [32]. Fluorescentni mikroskop prikazuje sve slojeve stanice jedan na drugome pa se ne može odrediti dolazi li signal sa

stanične membrane ili iz unutrašnjosti stanice. Kako bi sa sigurnošću odredili lokacije antigena CD63.01 protutijela u stanici potrebno je provesti kolokalizaciju sa markerima staničnih organela. Signal dobiven imunofluorescencijom nije garancija da novoproizvedeno protutijelo zaista veže CD63. Kako bi se sa sigurnošću moglo odrediti što protutijelo veže potrebno je provesti imunoprecipitaciju i western blot.

6. Zaključak

Provedena je optimizacija metode imunofluorescencije za CD63.01 novoproizvedeno protutijelo na staničnim linijama HeLa, SW620 I MCF-7. Predložen je optimizirani protokol imunofluorescencije u kojem se koristi 0,5 % Tween 20 kao sredstvo permeabilizacije, te pufer za blokiranje bez detergenta sa 5% BSA. Optimizirana imunofluorescencija dala je dobre rezultate, te je CD63.01 protutijelo imalo šire rasprostranjen i intenzivniji signal od korištenog komercijalno dostupnog protutijela (MEM-259). Potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi se utvrdila specifičnost vezanja CD63.01. Daljnja istraživanja CD63.01 protutijela trebala bi uključivati imunoprecipitaciju, western blot, kolokalizaciju protutijela sa protutijelima specifičnim za stanične organele, te proučavanje stanica podvrgnutih imunofluorescenciji kroz konfokalni mikroskop.

7. Literatura

1. Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research* 2009; **315**: 1584–1592.

2. Garcia-España A, Chung P-J, Sarkar IN, Stiner E, Sun T-T, Desalle R. Appearance of new tetraspanin genes during vertebrate evolution. *Genomics* 2008; **91**: 326–334.

3. Romanska HM, Berditchevski F. Tetraspanins in human epithelial malignancies. *J Pathol* 2011; **223**: 4–14.

4. Kobayashi T, Vischer UM, Rosnoblet C, Lebrand C, Lindsay M, Parton RG *et al.* The tetraspanin CD63/lamp3 cycles between endocytic and secretory compartments in human endothelial cells. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 1829–1843.

5. Ageberg M, Lindmark A. Characterisation of the biosynthesis and processing of the neutrophil granule membrane protein CD63 in myeloid cells. *Clin Lab Haematol* 2003; **25**: 297–306.

6. Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function. *Front Immunol* 2014; **5**. doi:10.3389/fimmu.2014.00442.

7. Yáñez-Mó M, Barreiro O, Gordon-Alonso M, Sala-Valdés M, Sánchez-Madrid F. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol* 2009; **19**: 434–446.

8. Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Peters PJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK, Clevers HC. CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J Biol Chem* 1991; **266**: 3239–3245.

9. Tominaga N, Hagiwara K, Kosaka N, Honma K, Nakagama H, Ochiya T. RPN2-mediated glycosylation of tetraspanin CD63 regulates breast cancer cell malignancy. *Mol Cancer* 2014; **13**: 134.

10. Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci* 2003; **28**: 106–112.

11. Nakai W, Yoshida T, Diez D, Miyatake Y, Nishibu T, Imawaka N *et al.* A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. *Scientific Reports* 2016; **6**: 33935.

12. Cooper GM. Protein Degradation. *The Cell: A Molecular Approach 2nd edition* 2000.https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9957/ (accessed 16 Nov2019).

13. Lekishvili T, Fromm E, Mujoomdar M, Berditchevski F. The tumour-associated antigen L6 (L6-Ag) is recruited to the tetraspanin-enriched microdomains: implication for tumour cell motility. *J Cell Sci* 2008; **121**: 685–694.

14. Lee SY, Kim JM, Cho SY, Kim HS, Shin HS, Jeon JY *et al.* TIMP-1 modulates chemotaxis of human neural stem cells through CD63 and integrin signalling. *Biochem J* 2014; **459**: 565–576.

15. Kobuch J, Cui H, Grünwald B, Saftig P, Knolle PA, Krüger A. TIMP-1 signaling via CD63 triggers granulopoiesis and neutrophilia in mice. *Haematologica* 2015; **100**: 1005–1013.

16. Tugues S, Honjo S, König C, Padhan N, Kroon J, Gualandi L *et al.* Tetraspanin CD63 Promotes Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2-β1 Integrin Complex Formation, Thereby Regulating Activation and Downstream Signaling in Endothelial Cells in Vitro and in Vivo. *J Biol Chem* 2013; **288**: 19060–19071.

17. Schröder J, Lüllmann-Rauch R, Himmerkus N, Pleines I, Nieswandt B, Orinska Z *et al.* Deficiency of the Tetraspanin CD63 Associated with Kidney Pathology but Normal Lysosomal Function. *Mol Cell Biol* 2009; **29**: 1083–1094.

18. van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P *et al.* The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Developmental Cell* 2011; **21**: 708–721.

19. Doyle EL, Ridger V, Ferraro F, Turmaine M, Saftig P, Cutler DF. CD63 is an essential co-factor to leukocyte recruitment by endothelial P-selectin. *Blood* 2011; : blood-2010-11-321489.

20. Symeonides M, Lambelé M, Roy NH, Thali M. Evidence showing that tetraspanins inhibit HIV-1-induced cell-cell fusion at a post-hemifusion stage. *Viruses* 2014; **6**: 1078–1090.

21. Kannengiesser C, Spatz A, Michiels S, Eychène A, Dessen P, Lazar V *et al.* Gene expression signature associated with BRAF mutations in human primary cutaneous melanomas. *Mol Oncol* 2008; **1**: 425–430.

22. Lupia A, Peppicelli S, Witort E, Bianchini F, Carloni V, Pimpinelli N *et al.* CD63 tetraspanin is a negative driver of epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2014; **134**: 2947–2956.

23. Woegerbauer M, Thurnher D, Houben R, Pammer J, Kloimstein P, Heiduschka G *et al.* Expression of the tetraspanins CD9, CD37, CD63, and CD151 in Merkel cell carcinoma: strong evidence for a

posttranscriptional fine-tuning of CD9 gene expression. *Mod Pathol* 2010; **23**: 751–762.

24. Dogrammatzis C, Deschamps T, Kalamvoki M. Biogenesis of extracellular vesicles during herpes simplex virus type 1 infection: The role of the CD63 tetraspanin. *J Virol* 2018. doi:10.1128/JVI.01850-18.

25. Gomes VA, Bonocher C de M, Rosa-E-Silva JC, de Paz CCP, Ferriani RA, Meola J. The Apoptotic, Angiogenic and Cell Proliferation Genes CD63, S100A6 e GNB2L1 are Altered in Patients with Endometriosis. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2018; **40**: 606–613.

26. An overview of permeabilization in immunocytochemistry (ICC). Novus Biologicals. 2017.https://www.novusbio.com/antibody-news/antibodies/an-overview-of-permeabilization-in-immunocytochemistry-icc (accessed 31 Oct2019).

27. Jamur MC, Oliver C. Permeabilization of cell membranes. *Methods Mol Biol* 2010; **588**: 63–66.

28. Johnson M. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. *Materials and Methods* 2019./method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.html (accessed 31 Oct2019).

29. Odell ID, Cook D. Immunofluorescence techniques. *J Invest Dermatol* 2013; **133**: e4.

30. Lai X, Lai X, Gu Q, Gu Q, Zhou X, Zhou X *et al.* Decreased expression of CD63 tetraspanin protein predicts elevated malignant potential in human esophageal cancer. *Oncology Letters* 2017; **13**: 4245–4251.

31. Bergmann-Leitner ES, Mease RM, Duncan EH, Khan F, Waitumbi J, Angov E. Evaluation of immunoglobulin purification methods and their impact on quality and yield of antigen-specific antibodies. *Malar J* 2008; **7**: 129.

32. Collazo A, Bricaud O, Desai K. Use of Confocal Microscopy in Comparative Studies of Vertebrate Morphology. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, 2005, pp 521–543.

8. Životopis

OSOBNE INFORMACIJE Padavić Roberta

Sveti križ 32, 51000 Rijeka (Hrvatska)

+385918856817

roberta.padavic@gmail.com

Spol Žensko | Datum rođenja 24/07/1995 | Državljanstvo hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

03/2018–danas **Rad u restoranu**
Globalna hrana d.o.o., Rijeka (Hrvatska)

21/10/2014–danas **Prodavačica**
AVON kozmetika d.o.o., Zagreb (Hrvatska)

07/2015–10/2017 **Prodavačica na štandu**
Trgovački obrt Faro Dos, Poreč (Hrvatska)

2011–danas **Instrukcije**

05/2012–05/2016 **Office clerk**
PIK dd, Rijeka (Hrvatska)

05/2012–05/2016 **Rad u skladištu**
PIK dd, Rijeka (Hrvatska)

10/04/2015–28/05/2016 **Promocije**
PIK dd, Rijeka (Hrvatska)

06/2013–09/2015 **Punjač polica**
PIK dd, Poreč (Hrvatska)

2017–2018 **Demonstrator**
Odjel za biotehnologiju, Imunologija, Rijeka (Hrvatska)

2017–2017 **Studentska praksa**
JGL d.d., Rijeka (Croatia)

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

10/2017–danas

Odjel za biotehnologiju sveučilišta u Rijeci, Diplomski sveučilišni studij "Biotehnologija u medicini", Rijeka (Hrvatska)

10/2014–09/2017

univ. bacc. biotech. et. pharm. inv.

Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

Uz završni rad: "Matične stanice kao izvor megakariocita i trombocita" pod mentorstvom izv. prof.dr.sc. Antonija Jurak Begonja

09/2010–06/2014

Srednja stručna sprema

Prva sušačka hrvatska gimnazija, Rijeka (Hrvatska)

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik: Hrvatski

Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski	C2	C2	C2	C2	C2
Talijanski	A2	A2	A1	A1	A1
Njemački	A1	A1	A1	A1	A1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine: Komunikativna, dobro funkcioniram u timskom radu

Digitalne vještine

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

Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu

- Odlično poznavanje Microsoft Office programa (PowerPoint, Word, Excel)
- Osnovno poznavanje kemoinformatičkih programa PyMol, Chimera, Avogadro, Marvin Sketch, Gamess i Tenua
- Osnovno poznavanje programa Adobe Photoshop

Vozačka dozvola: AM, B

DODATNE INFORMACIJE

Članstva: Član studentske udruge Odjela za biotehnologiju USBRi 2014. - danas

Volontiranje: Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci: Info pult na Festivalu znanosti 2016.
USBRi: Humanitarna akcija Rijeka dobrih želja 2016.
USBRi: Dan otvorenih vrata, SOBRI i Festival znanosti 2017.

Kongresi: Prihvaćen sažetak na internacionalni studentski kongres u Grazu

Zahvale

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Kristini Grabušić, te komentorici izv. prof. dr. sc. Mladenki Malenici na pruženom znanju, strpljenju i pomoći kod pisanja rada.

Hvala mojoj obitelji, prijateljima i dečku na neizmjernoj podršci i strpljenju.