

Lokalizacija proteina NME6 i testiranje antitijela anti-NME6

Ačkar, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:518552>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lucija Ačkar

**Lokalizacija proteina NME6 i testiranje antitijela
anti-NME6**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“, pod vodstvom dr.sc. Maje Herak Bosnar, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Veliko hvala dr.sc. Maji Herak Bosnar na stručnom vodstvu i ukazanom povjerenju. Hvala Vam na uvijek otvorenim vratima, na poticanju diskusije, razumijevanja eksperimenata i znanstvene prakse. Hvala Vam na komentarima poput „kruške, jabuke i još malo marelica“, koje su me nasmijale u stresnim periodima izrade ovog Diplomskog rada.

Veliko hvala mag.chem. Martini Radić na pomoći tijekom izvođenja eksperimenta, uvažavanju mišljenja te beskrajnom strpljenju. Hvala ti na svim zabavnim trenucima, šalama i smjehovima koje su sve ovo skupa olakšale, uljepšale i „zaokružile“.

Hvala LPD, dr.sc. Heleni Četković i mag.biol Luciji Horvat na svim stručnim savjetima i eksperimentalnoj pomoći tijekom izvođenja diplomskog rada.

Hvala prof.dr.sc. Ingi Marijanović na stručnom vodstvu tijekom pisanja diplomskog rada, prilici za stručnu praksu tijekom studija te na svom prenesenom znanju i poticanju stvaranja kritičkog razmišljanja.

Hvala mojim prijateljima koji su bili uz mene, pružali mi podršku i davali komplimente kada bih se osjećala loše (posebno Adriani Vučetić i Lauri Bračun).

Veliko hvala obitelji Jakšić na svim stručnim savjetima, poticajima, prijedlozima i obrabrivanju kada god je to bilo potrebno.

Veliko hvala mojoj dragoj šogorici, Željki Ačkar, na „uskakanju“ u svim hitnim situacijama, na pristupačnosti i potpunom razumijevanju te na beskonačnim prijevozima na faks u zadnji tren .

Posebno hvala, Franu Jakšiću što me potaknuo da još više volim faks i svoju struku. Hvala na neumornoj podršci tijekom svih mojih „drama, žalopojki i ne mogu više“, a posebno tijekom izrade ovog Diplomskog rada. Zauvijek ću ti biti zahvalna na uloženom trudu, energiji i razumijevanju.

Posebno hvala mojim roditeljima, Iliji i Nadi Ačkar, na bezuvjetnoj ljubavi i podršci tijekom cijelog mog života, posebno za vrijeme studija. Hvala vam što ste bili ponosni na mene u svakom trenutku. Što ste me pustili da pogriješim i naučim. Što ste mi davali beskonačno savjeta, no nikada mi niste stvarali pritisak i što ste na kraju uvijek vjerovali u moje odluke. Hvala što kad sam bila pod stresom niste puno pitali, što ste razumjeli, uvijek opraštali i maksimalno poticali u svim životnim aspektima.

Također, posebno hvala mome velikom braci, Kristianu Ačkaru, na beskonačnom poticanju tijekom cijelog mog života i pomicanju granica. Što sam uvijek znala da nisam sama, da imam najboljeg zaštitnika, brata i prijatelja. Iako mi ponekad nije bilo jasno zašto me „mučiš“ da sve moram razumjeti, a ne samo naučiti tako kako je, danas sam ti beskrajno zahvalna na tome. Hvala što si na svakoj mojoj životnoj prekretnici bio uz mene, davao mi savjete i pomogao mi da pronađem što je najbolje za mene. Na kraju, hvala što si me upoznao s molekularnom biologijom.

Ovaj Diplomski rad posvećujem svojoj obitelji kao znak zahvale za vašu ljubav i najveću podršku. Sretan 61. rođendan, tata.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Lokalizacija proteina NME6 i testiranje antitijela anti-NME6

Lucija Ačkar

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nukleozid-difosfatske kinaze (NDPK/Nm23/NME) čine obitelj evolucijski očuvanih enzima, koji prenose fosfatnu skupinu γ s andenozin trifosfata na nukleozid difosfate i na taj način održavaju ravnotežu nukleotida u stanci, a smatra se da imaju i neke druge biokemijske funkcije. Nukleozid-difosfatske kinaze sudjeluju u brojnim biološkim procesima kao što su proliferacija, diferencijacija i razvoj, a imaju značajnu ulogu i u razvoju tumora i metastaziranju. Unatoč brojnim istraživanjima, njihova biološka funkcija nije do danas u potpunosti razjašnjena. Deset članova obitelji proteina NME (od NME1 do NME10) podijeljeni su u dvije skupine. Skupinu I čine proteini od NME1 do NME4 i svi posjeduju aktivnost kinaze NDP, dok u skupinu II ubrajamo NME5 do NME10, od kojih većina ne pokazuje aktivnost kinaze NDP. Strukturno, NME6 dijeli svega 34-41% homologije s proteinima iz prve skupine, dok je njegov izražaj relativno nizak u većini tkiva. Malobrojna istraživanja upućuju na to da je NME6 smješten u mitohondrijima i u citoplazmi. Cilj diplomskog rada bio je odrediti lokalizaciju proteina NME6 u humanim tumorskim stanicama HeLa uz pomoć fluorescentnog reporterskog sustava, testirati antitijelo anti-NME6 te optimizirati metodu *Western blot*. U tu svrhu, koristili smo metode transformacije, transfekcije, fluorescentnu imunocitokemiju, analizu *Western blot* te konfokalnu mikroskopiju.

(45 stranice, 16 slika, 4 tablice, 52 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: NME6, mitohondrij, *mitotracker*, HeLa

Voditelj: Dr. sc. Maja Herak Bosnar, viša znanstvena suradnica

Suvoditelj: Dr. sc. Inga Marijanović, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Inga Marijanović, doc.; dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.; dr. sc. Ana Galov, izv. prof.

Rad prihvaćen: 4.1.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

NME6 protein localisation and anti-NME6 antibody testing

Lucija Ačkar

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nucleoside diphosphate kinases are evolutionary conserved enzymes which transfer the γ phosphate from adenosine triphosphates to nucleoside diphosphates consequently maintaining the nucleotide homeostasis in the cell. Additionally, they are also considered to have other biochemical functions. NDP kinases are involved in several biological processes such as proliferation, differentiation and development. Moreover, they are proven to have a significant role in tumour development and metastasis. However, despite intensive research in the field, all of their biological functions still aren't completely resolved. The NME family consists of 10 genes/proteins (from NME1 to NME10), divided into two groups. Group I encompasses proteins from NME1 to NME4 which all exhibit the NDP kinase. Group II consists of proteins from NME5 to NME10 most of which show no NDP kinase activity. Structurally, NME6 shares only 34-41% homology with Group I proteins, while its expression is relatively low in most tissues. Scarce data on NME6 indicates that it is located in the mitochondria and the cytoplasm. The aim of this thesis was to determine the localization of the NME6 protein in HeLa tumour cells using GFP reporter system, to test the anti-NME6 antibody, and optimise the Western blot method. For that purpose, we used transformation, transfection and fluorescent immunocytochemistry methods, Western blot analysis and confocal microscopy.

(45 pages, 16 pictures, 4 tables, 52 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: NME6, mitochondrion, mitotracker, HeLa

Supervisor: Dr. sc. Maja Herak Bosnar, senior research associate

Cosupervisor: Doc. dr. sc. Inga Marijanović

Reviewers: dr. Inga Marijanović, Asst. Prof.; dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.; dr. Ana Galov, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 4th of January, 2018

SADRŽAJ

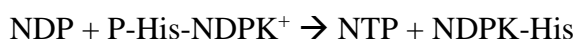
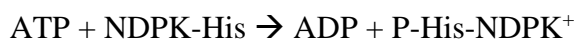
1.	UVOD	1
1.1.	Obitelj gena/proteina NME/Nm23	1
1.1.1.	Podjela obitelji gena/proteina NME/Nm23	1
1.1.2.	Evolucija obitelji gena/proteina NME/Nm23	2
1.1.3.	Struktura i kinetička aktivnost proteina NME/Nm23	2
1.1.4.	Izražaj i lokalizacija proteina NME/Nm23	3
1.1.5.	Uloge proteina NME/Nm23	3
1.2.	Član NME6/Nm23-H6 iz obitelji gena/proteina NME/Nm23	4
1.2.1.	Gen <i>NME6/Nm23-H6</i>	4
1.2.2.	Struktura proteina NME6/Nm23-H6	4
1.2.3.	Uloge proteina NME6/Nm23-H6	5
1.2.4.	Izražaj i lokalizacija proteina NME6/Nm23-H6	6
1.3.	Stanice raka vrata maternice (HeLa)	6
1.4.	Cilj rada	7
2.	MATERIJALI I METODE	8
2.1.	Materijali	8
2.1.1.	Kemikalije	8
2.1.2.	Stanična linija, bakterijski soj i vektori	9
2.1.3.	Hranjive podloge za uzgoj stanica	9
2.1.4.	Primarna antitijela i sekundarna antitijela	10
2.1.5.	Otopine i puferi	10
2.1.1.	Komercijalni kompleti	11
2.1.2.	Biljezi za određivanje veličine i boje	12
2.1.3.	Ostali materijali	12
2.1.4.	Uređaji	12
2.2.	Metode	13
2.2.1.	Transformacija elektrokompetentnih bakterija <i>E.coli</i>	13

2.2.2.	Nasađivanje transformacijske smjese na selektivnu podlogu	14
2.2.3.	Umnažanje, izolacija i određivanje koncentracije plazmidne DNA	14
2.2.4.	Restriksijska razgradnja plazmidne DNA	15
2.2.5.	Elektroforeza DNA u gelu agaroze	15
2.2.6.	Otapanje početnica i priprema otopina za sekvenciranje	16
2.2.7.	Odmrzavanje i uzgoj stanica HeLa	16
2.2.8.	Brojanje stanica	17
2.2.9.	Transfekcija stanica HeLa	17
2.2.10.	Fiksiranje, permeabilizacija i imunocitokemijska analiza stanica HeLa	18
2.2.11.	Određivanje lokalizacije NME6 -GFP u živim stanicama	20
2.2.12.	Izolacija proteina iz stanica HeLa za analizu <i>Western blot</i>	20
2.2.13.	Određivanje ukupne koncentracije staničnih proteina	21
2.2.14.	SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)	21
2.2.15.	Analiza <i>Western blot</i>	23
3.	REZULTATI	25
3.1.	Potvrda slijeda gena <i>NME6</i> u konstruktima pCMV6-NME6-MYC-FLAG i pCMV6-NME6-GFP	25
3.2.	Lokalizacija fuzijskih proteina NME6-GFP i NME6-MYC-FLAG u stanicama HeLa	26
3.3.	Lokalizacija fuzijskog proteina NME6-GFP u mitohondrijima živih stanica HeLa	30
3.4.	Utvrđivanje izražaja proteina NME6 u stanicama HeLa	31
4.	RASPRAVA	35
5.	ZAKLJUČCI	39
6.	LITERATURA	40

1. UVOD

1.1. Obitelj gena/proteina NME/Nm23

Obitelj gena *Nme/Nm23* dobila je ime po prvom otkrivenom članu, *Nme1*, budući da je on supresor metastaziranja, pa od tuda i ime Nm23 - *Nonmetastatic clone 23* (Steeg i sur., 1988.). Čine ju nukleozid-difosfatske kinaze (NDPK/Nm23/NME, od eng. *Nucleoside diphosphate kinase*), enzimi koji kataliziraju prijenos fosfatne skupine γ s adozin trifosfata na (deoksi)nukleozid difosfate i na taj način održavaju ravnotežu nukleotida u stanici (Boissan i Lacombe 2011.). *Ping-pong* mehanizam kinazne reakcije NDP uključuje očuvani histidinski ostatak kao intermedijer, kojemu su imidazolni bočni lanci autokatalitički fosforilirani. γ -fosforilna skupina se prenosi s imidazolne skupine na (deoksi)nukleozid difosfat (Lascu i sur., 1996.).



NDPK je *house-keeping* enzim koji se sastoji od podjedinica NME1 (NDPK A) i NME2 (NDPK B), koje se slažu u homo- ili heteroheksamer, aktivnu formu, u svim mogućim kombinacijama podjedinica (A6, A5B,....B6) (Ćetković i sur., 2015.).

1.1.1. Podjela obitelji gena/proteina NME/Nm23

Do sada je otkriveno 10 članova obitelji gena/proteina *NME*, koji su podijeljeni u dvije skupine na osnovu filogenetičke analize, prisutnosti proteinskih domena i struktura egzona i introna (Ćetković i sur., 2015.). Proteini prve skupine međusobno su homologni u slijedu aminokiselina 58-88% (NME1 do NME4) te svi posjeduju aktivnost kinaze NDP. Druga skupina proteina je znatno divergentnija i njeni članovi pokazuju znatno manju homologiju u slijedu aminokiselina (NME5-NME9) (Lacombe i sur., 2000.). Kinazna aktivnost ustanovljena je samo za protein NME6 (Tsuiki i sur., 1999.), dok je za NME8 i NME9 ustanovljeno da sadrže strukturne elemente koji bi mogli omogućavati kinaznu aktivnost, no ona nije eksperimentalno dokazana (Desvignes i sur., 2009.). NME10 imao je potpuno drugačiji evolucijski put jer je njegova kinazna domena umetnuta naknadno. Stoga se vode rasprave pripada li ovaj protein u drugu skupinu ili se promatra zasebno, neovisno o prvoj i drugoj skupini proteina NME.

1.1.2. Evolucija obitelji gena/proteina NME/Nm23

Sve tri domene života, bakterije, arheje i eukarioti, posjeduju kinaze NDP, a očuvanost aminokiselinskog slijeda proteina ukazuje na važnost ovih proteina u svakoj stanici (Ćetković i sur., 2015.). Prva skupina proteina NME nastala je puno kasnije tijekom evolucije u odnosu na drugu skupinu (Perina i sur. 2011.). Također, geni *Nme* druge skupine nisu prošli velike evolucijske promjene u kralježnjaka, dok se u genima prve skupine dogodilo nekoliko neovisnih duplikacija u istoj liniji. Kao primjer, geni *Nme1-Nme4* u sisavaca su ortolozi gena *Awd* vinske mušice i to je jedini gen *Nme* iz skupine I nađen u tom organizmu (Desvignes i sur., 2011.). S druge strane, ortolozi gena *Nme5-Nme8* mogu se naći u većini vrsta metazoa, osim u onima čiji su geni jako divergirali ili se izgubili tijekom evolucije (Desvignes i sur., 2011.).

1.1.3. Struktura i kinetička aktivnost proteina NME/Nm23

Sva četiri proteina prve skupine (NME1-NME4) posjeduju motiv aktivnog mjesta za kinaznu aktivnost (NXXHG/ASD), katalitički su aktivni sa sličnim kinetičkim parametrima, stvaraju heksamere i posjeduju 9 aminokiselinskih ostataka potrebnih za katalizu i stabilnost kinaze NDP (Lacombe i sur., 2000.). Također, posjeduju jednu domenu NDK (Ćetković i sur., 2015.). Proteine druge skupine karakteriziraju tri umetnute aminokiseline u tzv. Kpn-petlji (X-A-R/K) i dodatne promjene (umetanje ili izrezivanje) blizu 21. aminokiselinskog ostatka NME1 (Lacombe i sur., 2000.). Za razliku od prve skupine proteina, duljina krajeva -N i -C im varira (Lacombe i sur., 2000.) i samo NME6 i C-kraj NME8 i NME9 imaju aminokiseline potrebne za vezanje nukleotida i katalizu (Desvignes i sur., 2009.). Proteini druge skupine mogu posjedovati jednu ili više domena NDK različitih tipova (Ćetković i sur., 2015.). Svi proteini NME posjeduju očuvani serin na mjestu 120 te su Georgescauld i sur. (Georgescauld i sur., 2011.) ustanovili da njegova mutacija u glicin značajno smanjuje stabilnost pri kemijskoj i termalnoj denaturaciji proteina NME1. Pretpostavili su da mutacija ne mijenja svojstva sekundarnih struktura, ali da daje prednost konformacijskim promjenama iz $\alpha\beta$ konfiguracije u β -ploče, obzirom da Ser120 sudjeluje u vodikovim vezama s $\alpha 4$ zavojnicom i $\beta 1$ lancem. I mutirani i divlji tip NME1 formiraju heksamere, ali je utvrđeno da je heksamerni kompleks divljeg tipa stabilniji te da se u mutantu konformacijske promjene odvijaju već na 45-50° C, dok se u divljem tipu odvijaju na 55-60° C.

1.1.4. Izražaj i lokalizacija proteina NME/Nm23

NME1 i NME2 su izraženi u svim tkivima, a najzastupljeniji su u mozgu, bubrezima, jetri, gušterači i srcu (Bilitou i sur., 2009.). Po nekim autorima NME1 primarno je lokaliziran u citosolu, a NME2 u jezgri (Postel i sur. 1993.), a po drugim autorima su lokalizirani i na plazma membrani i u jezgri (Mitchel i sur., 2004.; Lutz i sur., 2003.). Bosnar i sur. su utvrdili da NME1 i NME2 uvijek kolokaliziraju te su analizama imunofluorescencije uočili da kolokaliziraju i s endoplazmatskim retikulumom (ER od engl. Endoplasmic reticulum), unatoč tome što ne posjeduje signalni slijed za ER niti su posttranslacijski modificirani (Bosnar i sur., 2004.). Za NME1 je utvrđeno i da je sekretorni protein (Okabe-Kado i sur., 2005.). NME3 je također izražen u svim tkivima, a najviše u regijama centralnog živčanog sustava, poput malog mozga i hipofize (Bilitou i sur., 2009.) te je smješten u citoplazmi (Barraud i sur. 2002.). NME4 je visoko izražen u srčanom tkivu, prostati i jetri (Bilitou i sur., 2009.) te je vezan za unutrašnju membranu mitohondrija, a posjeduje dvojnju orijentaciju prema međumembranskom prostoru i matriksu mitohondrija (Tokarska-Schlattner i sur., 2008.). NME4 nije pronađen u topljivim frakcijama (Milon i sur., 2000.). NME5 je u vrlo velikim količinama izražen u testisima, dok je u mozgu i bubrezima izražaj vrlo nizak (Munier i sur. 1998.), a lokalizira uzduž bazalne membrane spermatogonija i ranih spermatocita (Lacombe i sur., 2000.). NME6 je izražen u većini ispitanih ljudskih tkiva s najvišom zastupljenosti u skeletnim mišićima, bubregu, prostati, jajnicima, crijevima i slezeni (Mehus i sur., 1999.). Prema radu Tsuiki i sur. čini se da je smješten u mitohondrijima i u citosolu (Tsuiki i sur., 1999.). NME7 i NME8 su najviše izraženi u testisima, ali i u jetri, srcu, mozgu, jajniku, tankom crijevu i slezeni te su lokalizirani na aksonemama spermija (Padma i sur., 2001.), a povezani su i s poremećajima pokretanja bičeva i cilija (Duriez i sur., 2007.). NME9 je također visoko izražen u testisima, ali i u plućima i drugim tkivima koja sadrže cilijarne stanice (Boissan i sur., 2009.) te kolokalizira s mikrotubularnim strukturama cilija i aksonemama spermata (Sadek i sur., 2003.). Posljednji otkriveni član obitelji proteina NME/Nm23, NME10, izražen je u većini do sada ispitanih tkiva (Schwahn i sur., 1998.) te je uglavnom smješten u citoplazmi, ali se može premjestiti u jezgru prilikom tretiranja stanica reagensima koji oštećuju DNA i induciraju oksidativni stres (Yoon i sur., 2006.).

1.1.5. Uloge proteina NME/Nm23

Obitelj proteina NME karakterizira multifunkcionalna priroda te su proliferacija, diferencijacija, razvoj embrija, kretanje cilija i pojava metastaza neke od bioloških uloga (Hsu

2011.). Također, posjeduju i druge biokemijske uloge, uz već opisanu funkciju nukleozid difosfatske kinaze. Smatra se da posjeduju aktivnost proteinske kinaze, vežu DNA i djeluju kao DNaze, u procesu apoptoze koja je neovisna o kaspazama djeluju kao nukleaze, imaju 3'-egzonukleaznu aktivnost, a služe i kao transkripcijski faktori i kao sekretorni faktor rasta (Hsu 2011.). Uloge obitelji gena u fiziologiji i razvoju uvelike ovise o razini izražaja. Bilo kakav prekomjerni izražaj ili gubitak izražaja *NME* mogu dovesti do abnormalnog staničnog fenotipa (Hsu 2011.).

1.2. Član NME6/Nm23-H6 iz obitelji gena/proteina NME/Nm23

1.2.1. Gen *NME6/Nm23-H6*

Gen *NME6* smješten je na kraćem kraku 3. kromosoma, između gena za α -1 kolagen tipa VII i gena za glutation peroksidazu-1, koji su smješteni na 3p21.3 (Mehus i sur., 1999.; Tsuiki i sur., 1999.). U mnogim zloćudnim tumorima pronađene su somatske promjene 3p21 lokusa, što upućuje da ova regija sadrži gene koji su u uskoj vezi s nastankom tumora (Fearon, 1997.).

1.2.2. Struktura proteina NME6/Nm23-H6

cDNA slijed gena *NME6* su 1999., neovisno jedna o drugoj, otkrile dvije istraživačke skupine (Mehus i sur., 1999.; Tsuiki i sur., 1999.). Protein NME6 ima 194 aminokiselina, u neutralnom obliku je pri $pI=8,5$, a molekularna masa mu je 21,142 Da (Mehus i sur., 1999.). U usporedbi s NME1 i NME2, ima 7 dodatnih aminokiselina na -N kraju, 22 dodatne aminokiseline na -C kraju, kojima prethodi skup negativno nabijenih aminokiselina (YEEEEEP) te ne posjeduje terminalne aminokiselinske ostatke Tyr-Gly tipične za stabilnost heksamernih proteina NME. Posjeduje dodatnu aminokiselinu blizu 21. aminokiselinskog ostatka NME1 i tri dodatne aminokiseline u tzv. Kpn petlji. Posjeduje svih 9 aminokiselina neophodnih za enzimsku aktivnost (Lys20, Tyr61, Phe69, Arg97, Thr103, Arg117, Asn127, His130, Glu141) i karakteristični motiv oko histidina u aktivnom mjestu, koji je uključen u prijenos fosforilne skupine u kinaznoj reakciji NDP. Također, utvrđeno je da protein NME6 ne posjeduje signalni slijed za unos u organele ili za prijenos vezikulama (Mehus i sur., 1999.; Tsuiki i sur., 1999.).

Uz već opisane promjene u tzv. Kpn petlji i duljini -C kraja, NME6 na 105 mjestu ima još i supstituciju prolina u valin (Mehus i sur., 1999.). Ove strukturne razlike zapravo

sprječavaju stvaranje heksamera, budući da su one neophodne za kontakte monomernih podjedinica i stabilizaciju heksamerne strukture (Mehus i sur., 1999.). Heksamerna struktura je nužna za katalitičku aktivnost kinaza NDP i unatoč tome što postoje eksperimenti koji potvrđuju katalitičku aktivnost proteina NME6, iako znatno nižu, možda se radi o lažno pozitivnoj reakciji izazvanoj onečišćenjem bakterijskom NDPK.

Nme6 u bazalnih Metazoa (ili ne-bilateralnih životinja) posjeduje signalnu sekvencu za mitohondrij. Perina i sur. unijeli su cDNA gena *Nme6* u ljudske stanice, no nisu potvrdili kolokalizaciju proteina s mitohondrijima. Moguće je da spužvin enzim zaista ne lokalizira u mitohondriju. Drugi mogući razlog leži u činjenici da se radi o eksperimentu u heterolognom sustavu te je stoga moguće da ljudska stanica ne prepoznaje protein iz spužve kao svoj te ga degradira (protein je lokalizirao s ranim, kasnim i reciklirajućim endosomima) (Perina i sur. 2011.). Također, nisu utvrdili katalitičku aktivnost NDP proteina Nme6 niti proteina Nme6 Δ 31 kojem su uklonili signalni slijed za mitohondrije, budući da je NME4 katalitički aktivan tek nakon uklanjanja signalnog slijeda (Perina i sur. 2011.).

Utvrđeno je također da negativno nabijeni klasteri, kao što je to YEEEEEP u NME6, koordiniraju kalcijeve, magnezijeve i cinkove ione te da stabiliziraju kvartarnu strukturu u nekim proteinima (Zhu i Karlin, 1996.).

1.2.3. Uloge proteina NME6/Nm23-H6

Protein NME6 jedini je član druge skupine za koji je pokazano da katalizira kinaznu reakciju NDP (Ćetković i sur., 2015.), no aktivnost autofosforilacije je mnogo niža u odnosu na NME1 (Tsuiki i sur., 1999.). Tsuiki i sur. utvrdili su da prekomjerni izražaj NME6 u SAOS2 stanicama rezultira smanjenjem rasta i nastankom stanica s više jezgara, zbog čega se smatra da ovaj protein ima ulogu u staničnom rastu i progresiji staničnog ciklusa, no konkretan mehanizam djelovanja još je nepoznat (Tsuiki i sur., 1999.).

Wang i sur. (Wang i sur., 2012.) su utvrdili da *knockdown* proteina NME6 potiče izražaj diferencijacijskih markera i da smanjuje stvaranje embrioidnih tijela i teratoma te da su neophodni za izražaj Oct4, Nanog, Klf4, MYC, telomerazu, Dnmt3B, Sox2 i ERas, ključnih regulatora obnavljanja matičnih stanica, no konkretan mehanizam djelovanja još nije objašnjen.

1.2.4. Izražaj i lokalizacija proteina NME6/Nm23-H6

Polukvantitativnom analizom *RT-PCR* utvrđena je niska razina izražaja proteina NME6 u većini ljudskih tkiva, osim u skeletnim mišićima, bubrezima, prostati, jajnicima, crijevima i slezeni, gdje je povećana obzirom na kontrolni protein (Mehus i sur., 1999.). Unatoč tome što ne posjeduje signalni slijed za organele, Tsuiki i sur. su 1999. imunocitokemijskom analizom utvrdili da je NME6 smješten u mitohondrijima, dok su Mehus i sur. iste godine došli do zaključka da je protein izražen u cijeloj stanici. Nakon njihovog otkrića, do danas nije utvrđena točna lokalizacija proteina NME6.

1.3. Stanice raka vrata maternice (HeLa)

Stanice HeLa pripremljene su iz raka vrata maternice i prve su ljudske stanice uspješno uzgojene u kulturi 1951. godine, a uzete su od pacijentice Henriette Lacks po kojoj su i dobile ime (Gey i sur., 1952.).

Potječu od epitelnih stanica vrata maternica, čija infekcija humanim papiloma virusom-18 (HPV od engl. Human papilloma virus) dovodi do integracije dijela genoma virusa u fragilno mjesto na kromosomu 8q24.21 epitelnih stanica vrata maternice i inicira tumorigenezu. Integrirani genom uključuje cjelovite kopije E6 i E7 onkogene potrebnih za aktivnost telomeraze i nema kopije E2, koji inhibira E6 i E7. Virusna integracija djeluje i kao snažni aktivator izražaja onkogene *MYC*, što uzrokuje snažan rast stanica (Adey i sur., 2013.). Stanice HeLa karakteriziraju i aneuploidija i gubitak heterozigotnosti (LOH od engl. Loss of heterozygosity), koji su i inače obilježja tumora (Adey i sur., 2013.) te kromotripsija, koja je povezana sa 2-3% svih tipova tumora (Landrey i sur., 2013.).

Danas su stanice HeLa jedan od najčešće korištenih modelnih sustava te su omogućile karakterizaciju važnih bioloških procesa u više od 70 000 publikacija (Landry i sur., 2013.). Jedna od najranijih primjena stanica HeLa svakako je razvoj cjepiva protiv polio virusa (Scherer i sur., 1953.), a skeniranje interferirajuće RNA (RNAi od engl. Interference ribonucleic acid) dovelo je do otkrića i funkcionalne raspodjele gena uključenih u mitozu/citokinezu, endocitozu i druge stanične procese (Landrey i sur., 2013.). Snažan rast, neograničena dioba te vrijeme diobe manje od 24h omogućavaju im jednostavnu adaptaciju i korištenje u brojnim pokusima, ali zbog istih svojstva mogu i lako kontaminirati druge pokuse (Adey i sur., 2013.). Jedan od ključnih faktora za upotrebu je svakako i činjenica da se vrlo jednostavno transfeciraju.

1.4. Cilj rada

Naša hipoteza bila je da je protein NME6 smješten u mitohondrijima te da se komercijalna antitijela anti-NME6 (HPA) i anti-NME6 (SAB) mogu koristiti za analize imunocitokemije i *Western blot*. Također, pretpostavljali smo da će izražaj NME6 u stanicama biti relativno slabo detektibilan. Kako bismo testirali našu hipotezu, cilj diplomskog rada bio je odrediti lokalizaciju proteina NME6 u humanim tumorskim stanicama HeLa uz pomoć fluorescentnog reporterskog sustava, testirati antitijela anti-NME6 (HPA) i anti-NME6 (SAB) te optimizirati metodu *Western blot*. U tu svrhu, potrebno je bilo umnožiti komercijalne konstrukte pCMV6-NME6-MYC-FLAG i pCMV6-NME6-GFP u bakterijama, transfecirati stanice HeLa s umnoženim konstruktima te imunocitokemijski ili u živim stanicama odrediti lokalizaciju fuzijskih proteina NME6-MYC-FLAG i NME6-GFP pomoću konfokalne mikroskopije. Izražaj proteina NME6, antitijela anti-NME6 (HPA) i anti-NME6 (SAB) potrebno je bilo testirati analizama imunocitokemije i *Western blotom*.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Kemikalije

2-propanol (Kemika, Hrvatska)

Agar (Merck, SAD)

Agaroz MP (Roche, SAD)

Akrilamid (Sigma Aldrich, SAD)

Amonijev persulfat (APS od engl. Amonium persulfate) (Sigma Aldrich, SAD)

Ampicilin (Pliva, Hrvatska), c = 100 mg/mL

Bisakrilamid (Sigma Aldrich, SAD)

Bromfenol plavo (Sigma Aldrich, SAD)

Destilirana voda (deH₂O)

Dimetil-sulfoksid (DMSO) (Kemika, Hrvatska)

Etanol (Kemika, Hrvatska)

Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Kemika, Hrvatska)

Formaldehid, 36% (Kemika, Hrvatska)

Glicin (Kemika, Hrvatska)

Kanamycin (Pliva, Hrvatska), c = 50 mg/mL

KCl (Kemika, Hrvatska)

KH₂PO₄ (Kemika, Hrvatska)

L-glutamin (Sigma Aldrich, SAD)

Metanol (Kemika, Hrvatska)

Na₂HPO₄ (Kemika, Hrvatska)

NaCl (Kemika, Hrvatska)

Naftol modri (Kemika, Hrvatska)

Natrij dodecil sulfat (SDS) (Sigma Aldrich, SAD), pH = 7,2

Natrijev piruvat (Gibco™, SAD)

N, N, N, N-tetrametiletildiamin (TEMED) (Sigma Aldrich, SAD)

Obrano mlijeko u prahu (Dukat, Hrvatska)

Octena kiselina (Kemika, Hrvatska)

Penicilin (Gibco™, SAD)

qH₂O

Restriksijski enzimi EcoRI i Xho (Thermo Fischer Scientific, SAD)

Serum fetusa goveda (Gibco™, SAD)

Streptomycin (Gibco™, SAD)

Tripsin (Sigma Aldrich, SAD)

Tris-baza (Sigma Aldrich, SAD)

Tween 20 (Sigma Aldrich, SAD)

2.1.2. Stanična linija, bakterijski soj i vektori

- Stanična linija HeLa (stanice karcinoma grlića maternice) (ATCC, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Bakterijski soj *Mach1 Escherichia coli* (elektrokompetentne bakterije)
- pCMV6-Entry s ugrađenom cDNA gena za NME6-MYC-FLAG fuzijski protein
- pCMV6-Entry s ugrađenom cDNA gena za NME6-GFP fuzijski protein
- pCMV6-GFP s ugrađenom cDNA gena za zeleni fluorescentni protein (GFP od engl. Green fluorescent protein)
- pEGFPN1COX s ugrađenom cDNA gena za GFP-COX fuzijski protein
- pCFP-mito s ugrađenom cDNA gena za modrozeleni fluorescentni protein (CFP od engl. Cyan fluorescent protein) koji posjeduje signalni slijed za mitohondrij
- pcDNA3-FLAG-NME1 s ugrađenom cDNA gena za FLAG-NME1 fuzijski protein
- pcDNA3-MYC-NME2 s ugrađenom cDNA gena za MYC-NME2 fuzijski protein

2.1.3. Hranjive podloge za uzgoj stanica

Tekuća hranjiva podloga *Luria-Bertani* (LB) za uzgoj transformiranih bakterija, γ (LB)= 20 g/L (10 g/L triptona, 5 g/L kvašćevog ekstrakta, 5 g/L NaCl) (Sigma Aldrich, SAD); γ (ampicilin) = 100 μ g/mL (Pliva, Hrvatska), γ (kanamicin) = 100 μ g/mL (Pliva, Hrvatska)

Čvrsta hranjiva podloga *Luria-Bertani* (LB) za odabir transformiranih bakterija, γ (LB)=20 g/L (10 g/L triptona, 5 g/L kvašćevog ekstrakta, 5 g/L NaCl) (Sigma Aldrich, SAD); γ (agar) = 13 g/L (Merck, SAD); γ (ampicilin) = 100 μ g/mL (Pliva, Hrvatska), γ (kanamicin) = 100 μ g/mL (Pliva, Hrvatska)

Tekuća hranjiva podloga DMEM (od engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies, SAD) za uzgoj animalnih stanica, 10% seruma telećeg fetusa (Sigma Aldrich,

SAD), 2 mM L-glutamin (Sigma Aldrich, SAD), 100 mM natrijev piruvat (Gibco™, SAD), 100 U/mL penicilina (Gibco™, SAD), 100 µg/mL streptomicina (Gibco™, SAD)

Tekuća hranjiva podloga DMEM (od engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies, SAD) za transfekciju animalnih stanica, 10% seruma telećeg fetusa (Sigma Aldrich, SAD), 2 mM L-glutamin (Sigma Aldrich, SAD), 100 mM natrijev piruvat (Gibco™, SAD)

Reducirana tekuća hranjiva podloga DMEM (od engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies, SAD) za transfekciju animalnih stanica, 5% L-glutamina i 5%-natrijevog piruvata

Krioprotektivna hranjiva podloga za zamrzavanje animalnih stanica, 45% serum, 45% DMEM, 10% DMSO

Medij za uklapanje stanica za mikroskopiranje (Dako, SAD), fluorescentna boja, reagens protiv izbljeđivanja, 0,015 mol/L natrijev azid

2.1.4. Primarna antitijela i sekundarna antitijela

- Primarno poliklonsko antitijelo iz zeca anti-NME6 (HPA) (Sigma-Aldrich, SAD)
- Primarno poliklonsko antitijelo iz miša anti-NME6 (SAB) (Sigma-Aldrich, Tajvan)
- Primarno poliklonsko antitijelo iz kunića anti-NME1/NME2, afinitetno pročišćeno, proizvedeno u suradnji I. Lascu, M. Herak Bosnar i S. Volarević)
- Primarno monoklonsko antitijelo iz miša anti-FLAG (Sigma-Aldrich, SAD)
- Primarno monoklonsko antitijelo iz miša anti-MYC (Santa Cruz Biotechnology, SAD)
- Sekundarno poliklonsko antitijelo anti-mišje Alexa Fluor® 594 iz kože, c = 2 mg/mL (Invitrogen, SAD)
- Sekundarno poliklonsko antitijelo anti-mišje FITC iz zeca, c = 2 mg/mL (Abcam, Austrija)
- Sekundarno antitijelo ECL™ anti-mišje iz ovce s vezanom peroksidazom iz hrena (GE Healthcare, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Sekundarno antitijelo anti-zečje iz kože s vezanom peroksidazom iz hrena (Cell Signaling Technology, Njemačka)

2.1.5. Otopine i puferi

- Matična otopina akrilamid/bisakrilamida: 30% akrilamid, 7% bisakrilamid

- Pufer za donji gel poliakrilamida/gel za razdvajanje, pH = 8,8: 1,5 M Tris, deH₂O
- Pufer za gornji gel poliakrilamida/gel za sabijanje, pH = 6,8: 1 M Tris, deH₂O
- 10x pufer za elektroforezu: 0,025 M Tris-baza, 0,192 M glicin, 0,1% SDS, deH₂O
- 10x pufer za prijenos (TB od engl. Transfer buffer): 184 mM Tris-baza, 140 mM glicin, deH₂O
- Pufer za prijenos: 10% 10x TB, 20% metanol, 70% deH₂O
- Otopina za bojanje membrane: γ (Naphtol blue) = 1 g/L, 10% metanola, 2% octene kiseline, deH₂O
- Otopina za odbojavanje membrane: 40% metanol, 7% octena kiselina, deH₂O
- 10x pufer TBST (od engl. Tris buffer saline Tween): 150 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,5% Tween-20, deH₂O
- Otopina za blokiranje membrane: 5% obrano mlijeko u prahu u puferu TBST
- Blokirajuća otopina Protein Block Serum Free (Dako, Danska)
- 4x pufer za nanošenje uzorka (LB od engl. Laemmli buffer) (Sigma-Aldrich, SAD)
- Fosfatni pufer (PBS od engl. Phosphate buffer solution), pH = 7,4: γ (NaCl) = 8 g/L, γ (KCl) = 0,2 g/L, γ (Na₂HPO₄) = 1,44 g/L, γ (KH₂PO₄) = 0,24 g/L, deH₂O
- Fosfatni pufer (DPBS od engl. Dulbecco's phosphate buffered saline) za izolaciju proteina (Sigma-Aldrich, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Pufer TE (od engl. Tris-EDTA buffer solution), pH=8,0: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, deH₂O
- Pufer TAE, pH 8,6: 40 mM Tris, 20 mM octena kiselina, 1 mM EDTA, deH₂O

2.1.1. Komercijalni kompleti

Komercijalni komplet za određivanje koncentracije proteina: *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, SAD)

Komercijalni komplet za pročišćavanje plazmidne DNA: *QIAprep® Spin Miniprep Kit (50)* (Qiagen, Njemačka)

Komercijalni komplet za restrikcijsku razgradnju: *Fast Digest* (Thermo Fischer Scientific, SAD)

Komercijalni komplet za detekciju proteina kemiluminiscencijom: *Wester Lightning® Plus-ECL* (PerkinElmer, Nizozemska)

2.1.2. Biljezi za određivanje veličine i boje

- Standard za određivanje molekularne mase proteina, *Precision Plus Protein Standards Dual Color*, raspona 10-250 kDa (BioRad, SAD)
- Standard za određivanje molekularne mase dvolančane DNA, *1 Kb Plus DNA Ladder*, raspona 0,1-12 kb (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- 0,03% tripanско modriло: 1 mol/mL fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF), 1 mg/mL BSA, sterilna qH₂O
- Midori Green Advance (NIPPON Genetics EUROPE, Njemačka)
- Orange G (Sigma-Aldrich, SAD), 1 mg/mL
- DAPI (Sigma-Aldrich, SAD), 300 nM
- Selektivna proba za mitohondrij *Mitotracker Deep Red FM* (Thermo Fischer Scientific, 2008), c (štok) = 1 mM

2.1.3. Ostali materijali

- Reagens za transfekciju: *Lipofectamine*[®] 2000 (Thermo Fischer Scientific, SAD)
- Inhibitor proteaza: *Complete Mini EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets*
- Standardi za određivanje koncentracije proteina: otopine proteina albumina iz goveđeg seruma, BSA (od engl. *bovine serum albumine*) u koncentracijama 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 µg/mL
- Nitrocelulozna membrana za prijenos proteina, promjera 0,22 µm (Millipore, SAD)

2.1.4. Uređaji

- Uređaj za oslikavanje *Alliance 4.7* (UVItec, Velika Britanija)
- Centrifuga, *Harrier 18/80* (MSE, Velika Britanija)
- Centrifuga *Sorvall Lynx 4000* (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Centrifuge, tip *51445 R* i *5403* (Eppendorf, Njemačka)
- Čitač pločica *ELISA* (Multiscan MS Labsystems, Finska)
- Inkubator za uzgoj stanica (Kambič, Slovenija)
- Invertni mikroskop *Wilovert S* (Hund Wetzlar, Njemačka)
- Kabinet za rad u sterilnim uvjetima (Iskra, Slovenija)
- Kružna miješalica
- Magnetska miješalica *MSH Basic* (Ika, Njemačka)

- Sustav za elektroforezu Mini-Protean II (BioRad, SAD)
- Termoblok, *Thermomixer Comfort* (Eppendorf, Njemačka)
- Tresilica za bakterije *Unimax 1010* (Heidolph, Njemačka)
- Tresilica za mikrotitarske pločice, tip *715* (Asal, Italija)
- Ultrazvučna sonda, *Labsonic® M*, veličine 1 mm (B. Brown Biotech International, Sartorius Group, SAD)
- Uređaj za napajanje Power Pac Basic Power Supply i PowerPac 300 (BioRad, SAD)
- UV spektrofotometar *NanoPhotometer® N60* (Implen, Njemačka)
- Vaga, tip *PM 4000* (Mettler Toledo, SAD)
- Vodena kupelj za mikrotitarske pločice, tip *1083* (GFL, Njemačka)
- Zibalica *PMR-30 Rocking Shaker* (Grant Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Laserski pretražni konfokalni mikroskop *Leica TCS SP2 AOB*S (Leica, Njemačka)

2.2. Metode

2.2.1. Transformacija elektrokompetentnih bakterija *E.coli*

Transformacija bakterija je unošenje plazmidne DNA u kompetentne bakterijske stanice, gdje se kompetencija odnosi na privremeno stanje bakterije u kojem je moguć unos egzogene DNA (Johnston i sur. 2014.), a koristi se radi umnožavanja željene DNA za daljnje pokuse. Koristili smo elektrokompetentne bakterije Mach1 *E.coli* i metodu elektroporacije, kojom se reverzibilno povećava propusnost membrane stanice pod utjecajem električnog polja, što omogućava unos egzogene DNA, lijekova ili drugih molekula (Neumann i sur. 1982.).

Transformirali smo elektrokompetentne bakterije Mach1 *E. coli* s pCMV6-NME6-MYC-FLAG, odnosno pCMV6-NME6-GFP. U staklene hladne kivete od 2 mm dodali smo 50 μ L elektrokompetentnih bakterija i 50 ng plazmida. Lupkanjem kivete o radnu površinu sadržaj smo spustili na dno i stavili kivetu u uređaj za elektroporaciju (Gene Pulser Xcell, BioRad, SAD). Transformacijsku smjesu s pCMV6-NME6-MYC-FLAG smo elektroporirali 5,0 ms, a smjesu s pCMV6-NME6-GFP 5,2 ms, pod uvjetima od 2500 V, 25 μ F i 20 Ω .

Nakon elektroporacije u kivete smo dodali 1 mL tekuće hranjive podloge LB bez antibiotika, sadržaj smo resuspendirali i prebacili u sterilnu epruvetu *Eppendorf* od 1,5 mL i inkubirali jedan sat pri 37° C na tresilici *Thermomixer Comfort* (Eppendorf, Njemačka) kako bi se stanice oporavile.

2.2.2. Nasadivanje transformacijske smjese na selektivnu podlogu

pCMV6-NME6-MYC-FLAG sadrži gen za rezistenciju na kanamicin, a pCMV6-NME6-GFP na ampicilin, stoga smo napravili selektivne krute hranjive podloge Lauria-Bertani (LB) s kanamicinom (u omjeru 1:1000), odnosno s ampicilinom (u omjeru 1:1000). Kanamicin stupa u interakciju s velikom i malom podjedinicom bakterijskog ribosoma te inhibira translokaciju tijekom sinteze proteina, zbog čega nastaju nefunkcionalni polipeptidni lanci (Misumi i Tanaka 1980.). Bakterije koje su primile pCMV6-NME6-MYC-FLAG sintetiziraju aminoglikozid acetiltransferazu koja inhibira kanamicin (Nakano i sur. 1983.) pa će one rasti na selektivnoj podlozi, dok netransformirane bakterije neće. Ampicilin inhibira enzim transpeptidazu, a time i sintezu stanične stijenke bakterija. Bakterije koje su primile pCMV6-NME6-GFP sintetiziraju β -laktamazu koja hidrolizira β -laktamski prsten i inaktivira ampicilin (Brinas i sur. 2002.) pa će one rasti na selektivnoj podlozi, dok netransformirane bakterije neće.

Selektivne podloge smo pripremili uz plamenik, kako ne bi došlo do zagađenja te smo na njih nasadili 50 μ L i 150 μ L transformacijske smjese. Selektivne podloge s nasadenim bakterijama inkubirane su preko noći pri 37° C u inkubatoru za uzgoj bakterija (Memmert, Njemačka).

2.2.3. Umnažanje, izolacija i određivanje koncentracije plazmidne DNA

Inokulirali smo po tri kolonije koje sadrže pCMV6-NME6-MYC-FLAG i tri kolonije koje sadrže pCMV6-NME6-GFP i prebacili u staklene epruvete u 3 mL tekuće hranjive podloge LB s kanamicinom (1:1000), odnosno s ampicilinom (1:1000). Tekuće stanične suspenzije uzgajali smo osam sati pri 37° C u inkubatoru *Unimax1010* (Heidolph, Njemačka) uz protresanje. Rast bakterija smo zaustavili u eksponencijalnoj fazi, a hranjiva podloga bila je zamućena.

Za izolaciju plazmidne DNA koristili smo komplet za izolaciju plazmida *QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (50)* (Qiagen, Njemačka), prema uputama proizvođača. Koncentraciju izoliranih plazmidnih DNA odredili smo UV spektrofotometrom *NanoPhotometer[®] N60* (Implen, Njemačka) pri valnoj duljini od 260 nm. Nanosili smo 1 μ L uzorka, a kao slijepu probu koristili smo qH₂O.

2.2.4. Restriksijska razgradnja plazmidne DNA

Koristili smo komplet za restriksijsku razgradnju *Fast Digest* (Thermo Fischer Scientific, Švicarska), prema uputama proizvođača.

Restriksijsku smjesu izoliranih i originalnih plazmida pCMV6-NME6-MYC-FLAG i pCMV6-NME6-GFP pripremili smo u *Eppendorf* epruветama od 1,5 mL, u koje smo stavili 13,5 μ L Q vode, 2 μ L pufera, 1 μ L enzima EcoRI, 1 μ L enzima Xho i 1 μ g plazmida. Smjese smo inkubirali 30 minuta pri 37° C na grijaču *Thermomixer Comfort* (Eppendorf, Njemačka), a nakon toga smo odsječke razdvojili elektroforezom DNA u gelu agaroze.

2.2.5. Elektroforeza DNA u gelu agaroze

Elektroforeza u gelu agaroze je metoda koja omogućuje razdvajanje molekula DNA ovisno o njihovoj veličini. Električno polje pomiče negativno nabijene molekule DNA kroz gel prema pozitivnoj elektrodi, anodi. Budući da je gel ispunjen porama, manje molekule putuju brže jer manje zapinju za polimere od velikih molekula. Također, mogu se razdvojiti i različite konformacije DNA budući da je superuvijena DNA kompaktnija pa putuje brže od linearne ili kružne DNA (Lee i sur.2012.).

Koristili smo gel s 1% agaroze u puferu 1xTAE. Kako bi se agarozna otopila u puferu, otopinu smo zagrijavali u mikrovalnoj do vrenja, a potom hladili na, otprilike, 40° C. Dodali smo 5 μ L fluorescentne boje *Midori Green Advance* (NIPPON Genetics EUROPE, Njemačka), dobro promiješali, izlili u kadicu za elektroforezu i stavili češljic za 15 bunarića. *Midori Green Advance* je alternativna otopina tradicionalnom etidijevom bromidu za detekciju DNA i RNA. Budući da je manje mutagena te nije toksična niti kancerogena, smatra se mnogo sigurnijom otopinom od navedenog etidijevog bromida (NIPPON Genetics EUROPE, online 2017.).

Nakon polimerizacije, gel smo uronili u sustav za elektroforezu *Mini-Protean II* (BioRad, SAD), koji smo napunili puferom TAE. Na gel smo nanijeli 2 μ L biljega DNA, nerazgrađene plazmide i restriksijski razgrađene plazmide. Nerazgrađene plazmide smo nanijeli na sljedeći način: na parafilm smo nanijeli 4 μ L pufera TE, 100 ng plazmida i 1 μ L Orange G koji nam služi za praćenje uzorka. U postupku restriksijske razgradnje, pufer sadrži boju pa smo na gel nanijeli ukupnu smjesu iz restriksijske razgradnje (20 μ L). Elektroforeza se odvijala 40 minuta pri konstantnom naponu od 60 V na sobnoj temperaturi, a gel smo fotografirali u sustavu za fotografiranje (UVItec, Ujedinjeno Kraljevstvo).

2.2.6. Otapanje početnica i priprema otopina za sekvenciranje

Kako bismo sekvencirali cDNA gena *NME6* u vektorima pCMV6-NME6-MYC-FLAG i pCMV6-NME6-GFP prvo smo liofilizirane početnice stavili u centrifugu (MiniSpin Plus, Eppendorf, Njemačka) 2 min na 13000xg. Dodali smo 10 μ L qH₂O i inkubirali 30 minuta pri 37° C na vibracijskoj miješalici *Thermomixer Confort* (Eppendorf, Njemačka). U epruvetu *Eppendorf* od 0,2 mL stavili smo 13,5 μ L Q vode, 0,5 μ L 5' početnice, odnosno 3' početnice (c = 10 nM) i 1 μ g plazmida (pCMV6-NME6-MYC-FLAG, odnosno pCMV6-NME6-GFP). Slijed nukleotida u uzorcima određen je Sangerovom dideoksi metodom u Laboratoriju za molekularnu genetiku, Zavod za molekularnu biologija Instituta Ruđer Bošković (zahvaljujemo dr.sc. Heleni Četković).

2.2.7. Odmrzavanje i uzgoj stanica HeLa

. Stanice HeLa (ATCC, Ujedinjeno Kraljevstvo) bile su smrznute na -80° C u kriotubici, u krioprotektivnom mediju (45% serum, 45% DMEM, 10% DMSO). Budući da je DMSO u tekućem stanju toksičan za stanice, u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima (Iskra, Slovenija) smo pustili da se stanice malo odmrznu kako bi ih mogli prenijeti u staklenu epruvetu s 5 mL tekuće hranjive podloge DMEM. Stanice smo centrifugirali 5 minuta na 1500xg, pri 4° C (Sanyo MSE Harrier 18 80 Refrigerated Centrifuge Digital, Ujedinjeno Kraljevstvo). Supernatant smo bacili, kako bismo uklonili DMSO, a dodali smo 10 mL tekuće hranjive podloge DMEM, resuspendirali i prebacili u Petrijevu zdjelicu promjera 100 mm.

Staničnu liniju HeLa uzgajali smo u sterilnim uvjetima u Petrijevim zdjelicama promjera 100 mm, u tekućoj hranjivoj podlozi DMEM (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies, SAD), u inkubatoru za uzgoj stanica (Kambič, Slovenija) pri 37° C, u atmosferi zasićenoj vlagom i pri 5% CO₂. S kulturom stanica smo radili u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima (Iskra, Slovenija). Sav laboratorijski pribor, otopine i puferi koje smo koristili u radu su bili sterilni.

Stanice su rasle u jednom sloju, a presađivali smo ih pri 90% popunjenosti. Hranjivu podlogu DMEM odsisali smo iz Petrijeve zdjelice koju smo potom isprali s 10 mL fosfatnog pufera (PBS od engl. Phosphate buffered saline). Dodali smo 1 mL tripsina i inkubirali stanice oko tri minute pri 37° C. Tripsin je serinska proteaza, koja hidrolizira proteine cijepajući peptidne lance na karboksilnoj strani lizina ili arginina (Nelson i Cox, 2013.). Kada se stanice inkubiraju s tripsinom, on cijepa međustanične i adhezijske veze, što omogućava odvajanje

stanica od podloge. Tripsin smo inaktivirali dodavanjem 5 mL svježe tekuće hranjive podloge DMEM, jer serum iz podloge sadrži inhibitore proteaza. Sadržaj smo dobro resuspendirali i 0,5 mL stanične suspenzije smo vratili u Petrijevu zdjelicu u koju smo dodali 10 mL tekuće hranjive podloge DMEM.

2.2.8. Brojanje stanica

Dvadeset mikrolitara stanične suspenzije pomiješali smo s 80 μ L 0,03%-tnog tripanskog modrila i dobro resuspendirali. Tripansko modrilo boji mrtve stanice jer ga stanične pumpe ne izbacuju van iz stanice pa se pri brojanju stanica koristi za eliminaciju mrtvih. Smjesu smo nanijeli na Neubauerovu komoricu i na invertnom mikroskopu *Wilovert S* (Hund Wetzlar, Njemačka) pod povećanjem 100x izbrojali stanice u 64 polja.

Broj stanica u 1 mL izračunat je prema formuli:

$$\text{broj stanica / mL} = \frac{\text{broj izbrojanih stanica} * \text{faktor razrjeđenja} * 10000 \text{ st/mL}}{\text{broj izbrojanih kvadratića}}$$

broj izbrojanih kvadrata (16 kvadratića) = 4

Faktor razrjeđenja = 5

2.2.9. Transfekcija stanica HeLa

Transfekcija je proces unošenja strane DNA u eukariotsku stanicu (Alberts i sur.2008.; Cooper 2000.). Ako se DNA unesena transfekcijom ne ugradi u genom domaćina, radi se o prolaznoj transfekciji budući da se unesena DNA svakom mitozom stanice razrjeđuje i da ju stanične nukleaze razgrađuju. Pri stabilnoj transfekciji, unesena DNA se ugrađuje u genom domaćina (Guide to Eucariotic Transfection with Cationic Lipid Reagents, 2002.). Stanice HeLa prolazno smo transfecirali metodom lipofekcije. U ovoj metodi, pozitivno nabijeni lipidi stvaraju agregate s negativno nabijenom molekulom DNA i stvaraju liposomske vezikule koje se lako spajaju sa staničnom membranom. Pri spajanju vezikula sa staničnom membranom omogućen je unos strane DNA u stanicu (Felgner i sur. 1994.).

Dan prije transfekcije nasadili smo 47000 stanica u bunariće, na predmetnom stakalcu sa silikonskim pregradama, površine 0,93 cm² (za transfekciju HeLa s pCMV6-NME6-MYC-FLAG, pcDNA3-FLAG-NME1, pcDNA3-MYC-NME2 ili pCMV6-GFP), odnosno 100000

stanica u svaku četvrtinu Petrijeve zdjelice promjera 35 mm podijeljene na četiri dijela (za transfekciju HeLa s pCMV6-NME6-GFP, pEGFPN1COX ili s pCFP-myto), a za analizu *Western blot* smo nasadili $1,6 \times 10^6$ stanica u Petrijeve zdjelice promjera 60 mm, kako bi u vrijeme transfekcije popunjenost stanica bila oko 90%.

Za transfekciju stanica u bunarićima površine $0,93 \text{ cm}^2$ smo u jednu epruvetu *Eppendorf* od 1,5 mL stavili 70 μL tekuće hranjive podloge DMEM bez seruma i 1,5 μg pDNA, a u drugu 70 μL tekuće hranjive podloge DMEM bez seruma i 2,27 μL Lipofektamina 2000. Svaku epruvetu smo nježno resuspendirali i ostavili 5 minuta na sobnoj temperaturi. Sadržaj iz jedne epruvete smo prebacili u drugu i nježno resuspendirali te ostavili 30 minuta pri sobnoj temperaturi. U međuvremenu, sa stanica smo uklonili hranjivu podlogu te na njih dodali 350 μL svježe tekuće hranjive podloge DMEM. Nakon završene inkubacije, sadržaj iz epruvete smo pažljivo nakapali na cijelu površinu stanica, lagano resuspendirali i pohranili u inkubator pri 37° , 5% CO_2 , 24 sata.

U pokusima gdje smo transfekciju izvodili u drugačijem posuđu, količinu upotrijebljenih materijala smo prilagodili (Tablica 1).

Tablica 1. Količine materijala korištenih tijekom transfekcije.

Materijali	Petrijeva zdjelica (promjer 60 mm)	$\frac{1}{4}$ Petrijeve zdjelice (promjer 35 mm)	Bunarić (površine 0,93 cm^2)
Broj stanica	$1,6 \times 10^6$	100000	47000
pDNA (μg)	8	1,25	1,5
Lipofektamin 2000 (μL)	20	1,9	2,27
Reducirana podloga DMEM za transfekciju (μL)	500	62	70
Podloga DMEM za transfekciju (μL)	5000	400	350

2.2.10. Fiksiranje, permeabilizacija i imunocitokemijska analiza stanica HeLa

Dvadesetčetiri sata nakon transfekcije s pCMV6-NME6-MYC-FLAG, pcDNA3-FLAG-NME1, pcDNA3-MYC-NME2 ili pCMV6-GFP, stanice smo isprali tri puta s PBS-om, a potom dodali 400 μL 2%-tnog formaldehida (no isprobali smo i 1%-tni i 4%-tni formaldehid) za fiksaciju stanica i inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi. Stanice smo ponovno isprali tri puta s PBS-om te smo dodali 400 μL metanola za permeabilizaciju membrane i inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi. Ukoliko se proučava neki unutarstanični antigen, stanice je

potrebno permeabilizirati, pogotovo nakon fiksacije s reagensom koji stvara križne veze. Moguće je koristiti organska otapala, poput metanola ili acetona te deterdžente, poput Triton X-100 i Tween-20. Organska otapala otapaju lipide u staničnoj membrani i omogućavaju ulazak antitijela u stanicu, no za razliku od deterdženta ne uklanjaju proteine (Jamur i Constance 2010.).

Imunocitokemijska analiza temelji se na vezanju specifičnog antitijela na antigen u stanici. Nakon fiksiranja i permeabilizacije, stanice smo isprali tri puta s PBS-om i dodali 1 kap blokirajuće otopine *Protein block serum free* (DAKO, Danska), kako bi spriječili nespecifično vezanje antitijela. Nakon toga smo na stanice nanijeli 200 μ L primarnog antitijela u odgovarajućem razrjeđenju (Tablica 2) i inkubirali pri 4° C preko noći. Idući dan smo isprali primarno antitijelo tri puta s PBS-om, dodali 200 μ L sekundarnog antitijela odgovarajućeg razrjeđenja (Tablicu 2) i inkubirali 45 minuta pri sobnoj temperaturi u mraku. Stanice smo isprali tri puta s PBS-om, dodali selektivnu probu za mitohondrij *Mitotracker* (c = 50 nM, c = 100 nM, c = 150 nM ili c = 300 nM) i inkubirali 30 minuta. Potom smo ih opet isprali tri puta s PBS-om i uklopili u medij za uklapanje koji sadrži fluorescentnu boju DAPI (c=300 nM) kojom smo obilježili jezgre. Unutarstaničnu lokalizaciju proteina NME6 promatrali smo pomoću konfokalnog mikroskopa na Zavodu za molekularnu biologiju (zahvaljujemo mag.biol. Luciji Horvat i Laboratoriju za biofiziku stanice), pri čemu smo proteine FLAG-NME1 i MYC-NME2 koristili kao kontrole imunocitokemijske analize, a GFP kao kontrolu transfekcije plazmida s ugrađenim genom za protein GFP.

Tablica 2. Odgovarajuća razrjeđenja primarnih i sekundarnih antitijela pri imunocitokemijskoj analizi stanica HeLa.

Primarno antitijelo	Razrjeđenje primarnog antitijela	Sekundarno antitijelo	Razrjeđenje sekundarnog antitijela
HPA anti-NME6	1:200 1:350 1:500	Alexa 594	1:500
SAB anti-NME6	1 μ g/mL 3,2 μ g/mL 5 μ g/mL	FITC	1:50
Anti-MYC	1:200 1:500		
Anti-FLAG	1:500 1:1000		

2.2.11. Određivanje lokalizacije NME6 -GFP u živim stanicama

Nakon 24 sata transfekcije stanica HeLa s pCMV6-NME6-GFP, pEGFPN1COX ili s pCFP-myto sa stanica smo uklonili medij s transfecirajućim reagensom te dodali svježi sa selektivnom probom za mitohondrij ($c = 50 \text{ nM}$ i $c = 150 \text{ nM}$) i inkubirali 30 minuta. Nakon inkubacije, stanice smo isprali tri puta s PBS-om, a potom promatrali uz pomoć konfokalnog mikroskopa na Zavodu za molekularnu biologiju (zahvaljujemo mag.biol. Luciji Horvat i Laboratoriju za biofiziku stanice Instituta Ruđer Bošković), gdje su nam GFP-COX, CFP i selektivna proba za mitohondrij označavali mitohondrije.

2.2.12. Izolacija proteina iz stanica HeLa za analizu *Western blot*

Prethodno smo uzgojili stanice u pet Petrijevih zdjelica promjera 60 mm do popunjenosti od oko 90%. Stanice u jednoj Petrijevoj zdjeli nismo transfecirali i koristili smo ih kao kontrolu u analizi *Western blot*, a stanice u ostalim Petrijevim zdjelicama smo transfecirali s jednim od plazmida: pCMV6-NME6-MYC-FLAG, pCMV6-NME6-GFP, pNME2-MYC ili pNME1-FLAG.

Dvadesetčetiri sata nakon transfekcije, na ledu smo odsisali medij iz svih Petrijevih zdjelica i dodali 5 mL PBS-a. Stanice smo sastrugali pomoću sterilne strugalice, a sadržaj iz Petrijeve zdjelice prebacili u epruvetu *Falcon* od 15 mL. Postupak smo ponovili dva puta, nakon čega smo sadržaj u epruveti centrifugirali pet minuta na 1500xg pri 4° C u centrifugi (Sanyo MSE Harrier 18 80 Refrigerated Centrifuge Digital, Ujedinjeno Kraljevstvo) kako bismo stanice oslobodili medija. Supernatant smo bacili, a talog ili pohranili na -80° C ili resuspendirali za izolaciju proteina.

Na talog iz epruvete dodali smo 60 μL PBS-a (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, SIGMA, Ujedinjeno Kraljevstvo), koji ne sadrži CaCl_2 i MgCl_2 u koji smo prethodno dodali inhibitore proteaza (*Complete Mini EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets*). Sadržaj smo dobro resuspendirali i prebacili u epruvete od 1,5 mL.

Za izolaciju proteina koristili smo metodu sonifikacije kojom se pomoću ultrazvučnih valova narušava integritet staničnih membrana i otpušta stanični sadržaj. Ultrazvučnu sondu od 1 mm (LABSONIC® M.B. Braun Biotech International, Sartorius group, SAD) isprali smo sa 70% EtOH, a potom s deH₂O. Staničnu suspenziju smo sonicirali 10 sekundi pri amplitudi 80, a postupak smo ponovili dva puta s razmakom od 10 sekundi. Sve smo radili na ledu, kako bismo dodatno smanjili mogućnost degradacije proteina.

2.2.13. Određivanje ukupne koncentracije staničnih proteina

Koristili smo komplet za određivanje koncentracije proteina „*Pierce BCA Protein Assay Kit*“. Metoda se bazira na redukciji Cu^{2+} u Cu^+ pomoću proteina u lužnatim uvjetima s veoma osjetljivom, selektivnom detekcijom Cu^+ kationa pomoću reagensa BCA, koji apsorbira pri 570 nm. U drugoj reakciji stvara se ljubičasto obojenje kao rezultat formiranja helata između iona bakra i dvije molekule BCA (ThermoFischer Scientific, online 2017.).

Uzorke smo držali na ledu zajedno s BSA (od engl. *Bovine serum albumine*, albumin iz seruma goveda) standardima poznatih koncentracija koje smo koristili za izradu standardne krivulje. Uz pomoć standardne krivulje i jednadžbe pravca izračunali smo koncentracije proteina.

U mikrotitarsku pločicu s 96 bunarića nanijeli smo po 20 μL standarda BSA u koncentracijama 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500 $\mu\text{g/mL}$, 20 μL reH₂O i 2 μL uzorka kojeg smo pomiješali s 18 μL reH₂O, a uzorke smo nanijeli u duplikatu. U svaki bunarić smo stavili smo 200 μL reagensa za određivanje koncentracije *BCA Protein Assay Kit*, kojeg smo pripremili miješanjem otopina A i B u omjeru 50:1. Pločicu smo stavili na tresilicu za mikrotitarske pločice (tresilica za mikrotitarske pločice tip 715, Asal, Italija) na 1 minutu, a potom prekrili i inkubirali 30 minuta na 37° C u vodenoj kupelji (vodena kupelj za mikrotitarske pločice tip 1083, GFL, Njemačka). Nakon inkubacije, pločicu smo ohladili na sobnu temperaturu i očitali apsorbanciju pri 570 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Čitač pločica *ELISA*, Multiscan MS Labsystems, Finska). Iz očitanih apsorbancija otopina BSA izradili smo baždarnu krivulju, pomoću koje smo izračunali ukupnu koncentraciju proteina u uzorcima.

2.2.14. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)

SDS-PAGE (od engl. Sodium dodecyl sulphate polyacryl gel electrophoresis) ili SDS poliakrilamidna gel elektroforeza je metoda kojom se u električnom polju razdvajaju proteini na osnovu razlike u masi. U poliakrilamidni gel dodaje se deterđent SDS (od engl. Sodium dodecyl sulphate) te se otprilike jedna molekula SDS-a veže na svaki aminokiselinski ostatak proteina, što maskira naboj proteina i doprinosi ukupnom negativnom naboju molekule. Na taj način, svi proteini u uzorku imaju jednak omjer mase i naboja. Također, vezanje SDS-a djelomično denaturira protein pa svi proteini imaju linearni oblik. Prema tome, u osnovi, SDS-

PAGE razdvaja proteine na osnovu razlike u njihovim molekulskim masama, gdje manji proteini putuju brže (Nelson i Cox, 2013.).

Koristili smo diskontinuiranu SDS-poliakrilamidnu gel elektroforezu, za koju smo pripremili dva gela, od kojih se svaki sastoji od gela za sabijanje i gela za razdvajanje. Gornji, 5%-tni gel za sabijanje i donji, 15%-tni gel za razdvajanje međusobno se razlikuju u sastavu i pH (Tablica 3). Gel za sabijanje je rjeđi i manjeg pH (pH=6,8) te služi za poravnavanje uzoraka, dok je gel za razdvajanje gušći i većeg pH (pH=8,8) i služi za razdvajanje proteina na temelju razlika u molekulskim masama.

Tablica 3. Sastav gelova za razdvajanje i sabijanje

	GEL ZA RAZDVAJANJE 15%	GEL ZA RAZDVAJANJE 5%
SASTOJAK	Volumen / mL	Volumen / mL
ReH₂O	2,3	2,7
30%-tna otopina AAS	5,0	0,67
1,5 M Tris (pH=8,8)	2,5	-
1 M Tris (pH=6,8)	-	0,5
10%-tni SDS	0,1	0,4
10%-tni APS	0,1	0,4
TEMED	0,004	0,004

Napravili smo dva gela i koristili stakalca za gel elektroforezu s razmaknicom od 1,5 mm i pokrovno stakalce te ih postavili na nosače. Između njih smo prvo ulili gel za razdvajanje te nakon njegove polimerizacije dodali gel za sabijanje i postavili češljic za 15 bunarića.

Nanijeli smo 15 µg ukupnih staničnih proteina i pomiješali s puferom za nanošenje koji u sebi sadrži boju. Boja nam pomaže u praćenju uzoraka za vrijeme putovanja kroz gel tijekom elektroforeze. Smjesu smo zagrijavali pet minuta pri 96° C u grijaču *Thermomixer Comfort* (Eppendorf, Njemačka) kako bi se proteini potpuno denaturirali, a potom smo ih kratko centrifugirali (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Njemačka). Nakon polimerizacije gela za sabijanje, izvadili smo češljic, a stakla s gelovima prenijeli u kadicu (*Mini-Protean II*, BioRad, SAD), koju smo do pola napunili s 1 x puferom za elektroforezu. U bunariće smo nanijeli 2 µL biljega *Precision Plus Protein Standards Dual Color* i smjesu staničnih proteina te spojili kadicu na uređaj za napajanje *Power Pac Basic Power Supply* ili *PowerPac300* (BioRad,SAD). Kroz gel za sabijanje uzorci su putovali pri konstantnom naponu od 90 V oko 30 minuta, a kroz gel za razdvajanje pri konstantnom naponu od 110V oko 1,5 sat, odnosno, dok boja bromfenol plavo ne izađe iz gela.

2.2.15. Analiza *Western blot*

Western blot je imunokemijska metoda u kojoj se proteini elektroforetski razdvojeni na gelu prenose na nitroceluloznu membranu. Membrana se blokira, a potom tretira s primarnim antitijelom, sekundarnim antitijelom s vezanim enzimom te se dodaje supstrat koji omogućava vizualizaciju. Budući da obojeni precipitat nastaje samo na mjestu gdje se nalazi protein od interesa iz uzorka, *Western blot* omogućuje detekciju proteina od interesa te određivanje njegove približne molekulske mase (Nelson i Cox, 2013.)

Koristili smo tzv. tehniku mokrog prijenosa, pri kojoj proteini iz gela izlaze u pufer za prijenos i vežu se na površinu membrane, gdje su lako dostupni za interakcije sa specifičnim monoklonskim ili poliklonskim antitijelima.

Nakon završene elektroforeze, uklonili smo gel za sabijanje i složili kazetu za prijenos proteina na sljedeći način: na dio kazete bliži katodi postavili smo spužvicu, dva filter papira, gel za razdvajanje koji sadrži proteine, nitroceluloznu membranu (pore veličine 0,2 μm), dva filter papira i spužvicu te smo zatvorili kazetu za prijenos pazeći da nema mjehurića ni u jednom sloju.

U kadicu (*Mini-Protean II*, BioRad, SAD) smo ulili hladni pufer za prijenos, složenu kazetu za prijenos proteina, led, magnetič te ju postavili na magnetsku miješalicu *MSH Basic* (Ika, Njemačka). Sustav za prijenos proteina spojili smo na izvor napajanja *Power Pac Basic Power Supply* ili *PowerPac 300* (BioRad, SAD) pod uvjetima stalne jakosti struje od 200 mA na 2 sata ili pri konstantnom naponu od 14 V preko noći te su proteini preneseni na membranu pomoću električne struje. Led i miješanje su važni za hlađenje sustava, budući da električna struja zagrijava, što može degradirati proteine.

Proteine na membrani potom smo isprali destiliranom vodom uz zibanje kako bi se uklonio metanol iz pufera za prijenos. Obojali smo ih s *Naphtol blue*, kao potvrdu da su elektroforeza i prijenos proteina na membranu uspjeli te odbojani otopinom za odbojavanje membrane.

Membranu smo stavili u kadicu na zibalici i ispirali tri puta po 10 min s 1 x TBST, kako bismo uklonili ostatke metanola i octene kiseline iz otopine za odbojavanje, nakon čega smo ju blokirali u 5%-tnom mlijeku (obrano mlijeko u prahu otopljeno u puferu 1 x TBST-u) na 30 minuta, kako ne bi došlo do nespecifičnog vezanja antitijela.

Primarna i sekundarna antitijela smo razrijedili u 5%-tnom mlijeku na željenu koncentraciju (Tablica 4) te smo nanijeli primarno antitijelo na membranu, tako da prekrije površinu membrane. Inkubirali smo pri 4° C dva sata ili preko noći. Membranu smo isprali tri puta po 10 minuta u 1 x TBST-u kako bismo uklonili nevezana primarna antitijela. Membrane smo inkubirali u otopini sa sekundarnim antitijelom s vezanom peroksidazom iz hrena 45 minuta pri sobnoj temperaturi.

Tablica 4. Razrjeđenja primarnih i sekundarnih antitijela za analizu *Western blot*.

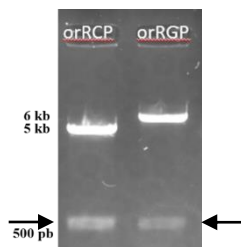
Primarno antitijelo	Razrjeđenje primarnog antitijela	Sekundarno antitijelo	Razrjeđenje sekundarnog antitijela
HPA anti-NME6	1:1000 1:600 1:100	R	1:3000
SAB anti-NME6	5 µg/mL	M	1:3000
Anti-FLAG	1:500	M	1:3000
Anti-MYC	1:200	M	1:3000
Anti-NME1/NME2	1:3000	R	1:3000

Kao supstrat za vizualizaciju koristili smo komplet *Western Lightning[®] Plus-ECL* (PerkinElmer, Nizozemska). u omjeru reagens A : reagens B = 1 : 1. Membranu sa supstratom inkubirali smo jednu minutu u mraku na sobnoj temperaturi, a onda stavili u sustav za fotografiranje (UVItec, Ujedinjeno Kraljevstvo).

3. REZULTATI

3.1. Potvrda slijeda gena *NME6* u konstruktima pCMV6-NME6-MYC-FLAG i pCMV6-NME6-GFP

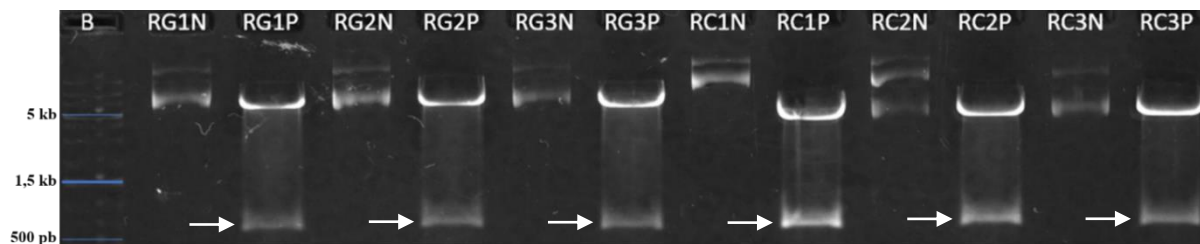
Kako bismo potvrdili da komercijalni konstrukti pCMV6-NME6-MYC-FLAG i pCMV6-NME6-GFP sadrže gen *NME6*, nakon transformacije kompetentnih bakterija i nasađivanja na selektivnu podlogu iz izraslih kolonija izolirali smo plazmide te njih i originalne konstrukte restriksijski razgradili enzimima EcoRI i Xho. Nakon restrikcije, plazmidi su bili razgrađeni na dva odsječka. Razgradnjom originalnih konstrukata pCMV6-NME6-MYC-FLAG i pCMV6-NME6-GFP dobiveni su veći odsječci od oko 5000 pb i od oko 6000 pb, koji odgovaraju praznom vektoru, i manji odsječak od oko 550 pb, koji odgovara umetnutom genu *NME6* (Slika 1.). Razgradnjom umnoženih plazmida smo dobili pruge na jednakim pozicijama kao kod razgradnje komercijalnih konstrukata (Slika2.).



Slika 1. Restriksijska razgradnja originalnih konstrukata pCMV6-NME6-GFP i pCMV6-NME6-MYC-FLAG.

Fragmenti označeni strelicama predstavljaju gen *NME6* iz originalnih konstrukata pCMV6-NME6-MYC-FLAG i pCMV6-NME6-GFP razgrađenih restriksijskim enzimima EcoRI i Xho. orRCP – originalni komercijalni konstrukt pCMV6-NME6-MYC-FLAG razgrađen s EcoRI i Xho. orRGP – komercijalni konstrukt pCMV6-NME6-GFP razgrađen s EcoRI i Xho.

Komercijalne konstrukte pCMV6-NME6-MYC-FLAG i pCMV6-NME6-GFP poslali smo na sekvenciranje u Laboratorij za molekularnu genetiku Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković (zahvaljujemo dr.sc. Heleni Četković). Sekvenciranjem smo potvrdili da komercijalni konstrukti sadrže gen *NME6* i pripadajuće privjeske GFP, odnosno MYC-FLAG.



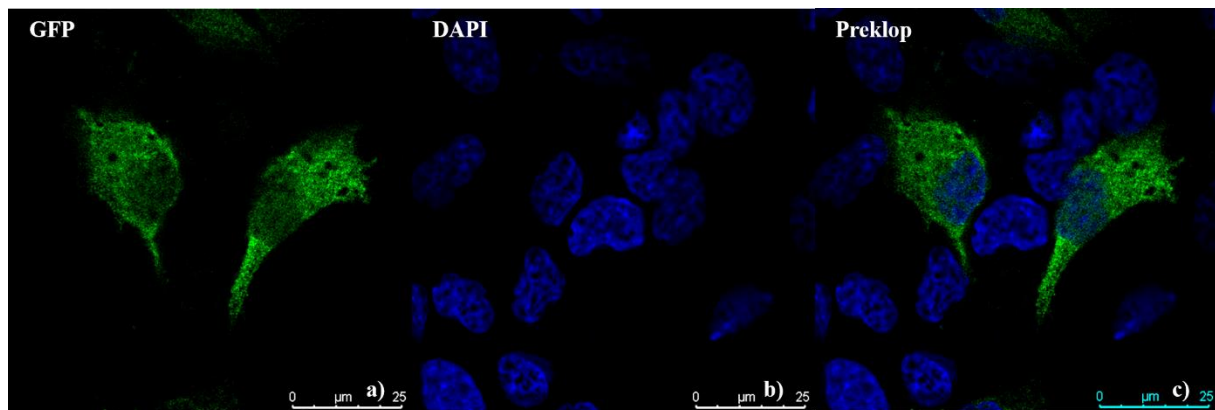
Slika 2. Restriksijska razgradnja umnoženih konstrukata pCMV6-NME6-GFP i pCMV6-NME6-MYC-FLAG.

Fragменти označeni strelicama predstavljaju gen *NME6* iz umnoženih konstrukata pCMV6-NME6-MYC-FLAG i pCMV6-NME6-GFP razgrađenih s restriksijskim enzimima EcoRI i Xho. B – DNA biljeg. RG1N, RG2N, RG3N – nerazgrađeni pCMV6-NME6-GFP plazmidi izolirani iz tri različite kolonije transformiranih bakterija. RG1P, RG2P, RG3P - pCMV6-NME6-GFP plazmidi izolirani iz tri različite kolonije transformiranih bakterija i razgrađeni s EcoRI i Xho. RC1N, RC2N, RC3N - nerazgrađeni pCMV6-NME6-MYC-FLAG plazmidi izolirani iz tri različite kolonije transformiranih bakterija. RC1P, RC2P, RC3P - pCMV6-NME6-MYC-FLAG plazmidi izolirani iz tri različite kolonije transformiranih bakterija i razgrađeni s EcoRI i Xho.

3.2. Lokalizacija fuzijskih proteina NME6-GFP i NME6-MYC-FLAG u stanicama HeLa

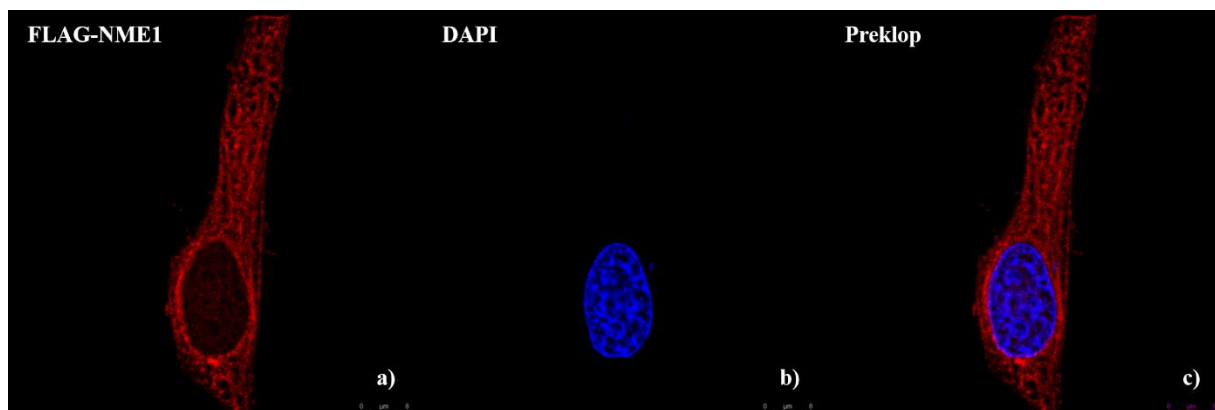
Stanice HeLa transfecirali smo s umnoženim plazmidima pCMV6-NME6-MYC-FLAG i pCMV6-NME6-GFP, kako bismo lokalizirali protein NME6 te s pCMV6-GFP, pcDNA3-FLAG-NME1 i pcDNA3-MYC-NME2 koji su nam služili kao kontrole. Stanice smo promatrali pod konfokalnim mikroskopom 24 sata nakon završene transfekcije ili nakon imunocitokemijske analize, tj. 48 h nakon završene transfekcije.

Stanice transfecirane s pCMV6-GFP smo 24 sata nakon završene transfekcije fiksirali, a potom promatrali uz pomoć konfokalnog mikroskopa. Pokazivale su zeleno fluorescentno obojenje po cijeloj stanici, gdje je intenzitet obojenja nešto veći u citoplazmi nego u jezgri (Slika 5.).



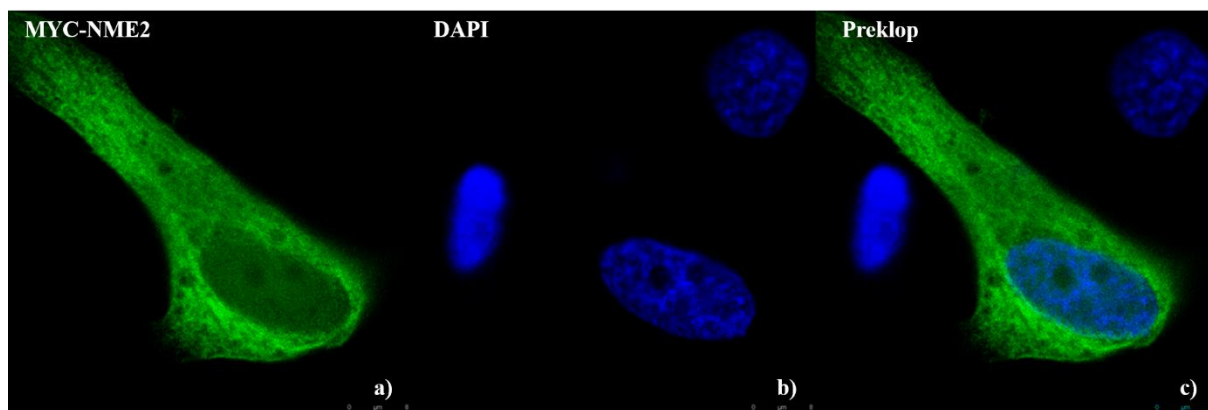
Slika 5. Lokalizacija zelenog fluorescentnog proteina (GFP).

Stanice HeLa transfecirane su s pCMV6-GFP i bojane bojom DAPI. **a)** Lokalizacija zelenog fluorescentnog proteina (GFP) u cijeloj stanici. **b)** Jezgre stanica HeLa obojane bojom DAPI. **c)** Preklop slika a) i b).



Slika 6. Lokalizacija proteina NME1 pomoću antitijela anti-FLAG.

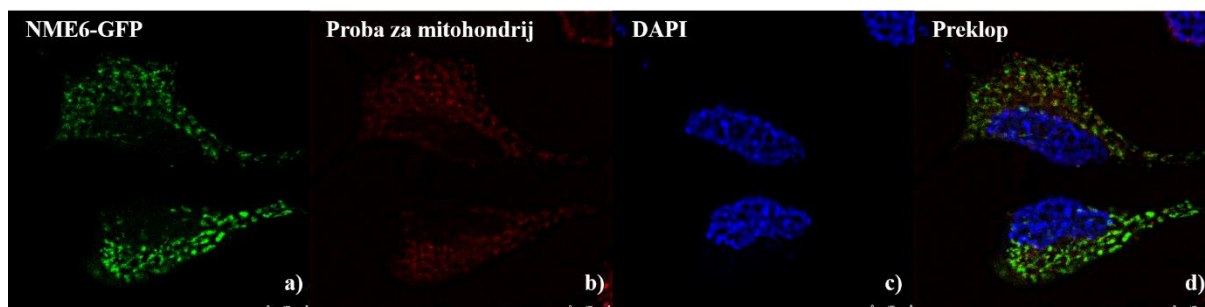
Stanice HeLa transfecirane su s pcDNA3-FLAG-NME1, tretirane primarnim antitijelom anti-FLAG (razrjeđenje 1:1000), sekundarnim antitijelom Alexa 594 (razrjeđenje 1:500) i bojane bojom DAPI. **a)** Lokalizacija proteina FLAG-NME1 u cijeloj stanici. **b)** Jezgre stanica HeLa obojane bojom DAPI. **c)** Preklop slika a) i b).



Slika 7. Lokalizacija proteina NME2 pomoću antitijela anti-MYC.

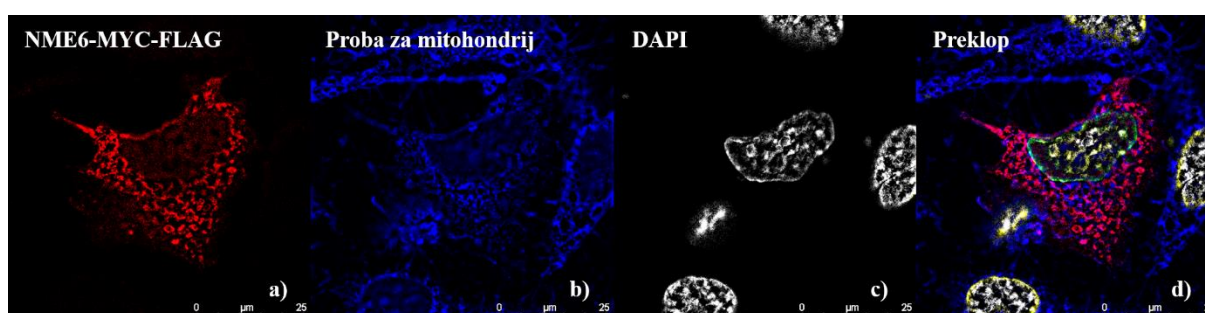
Stanice HeLa transfecirane s pcDNA3-MYC-NME2, tretirane su s primarnim antitijelom anti-MYC (razrjeđenje 1:200), sekundarnim antitijelom FITC (razrjeđenje 1:50) i bojane bojom DAPI. **a)** Lokalizacija proteina MYC-NME2 u cijeloj stanici. **b)** Jezgre stanica HeLa obojane bojom DAPI. **c)** Preklop slika a) i b).

Stanice transfecirane s pCMV6-NME6-MYC-FLAG smo pod konfokalnim mikroskopom promatrali 48 sati nakon transfekcije, a u međuvremenu smo ih fiksirali, permeabilizirali te tretirali s primarnim i sekundarnim antitijelom. Stanice transfecirane s pCMV6-NME6-GFP smo fiksirali 24 sata nakon transfekcije i promatrali konfokalnim mikroskopom. Za razliku od kontrola, transfeciranih stanica je bilo znatno manje te je bilo teško pronaći reprezentativnu sliku. Opaženo je da NME6-GFP i NME6-MYC-FLAG lokaliziraju u citoplazmi ili u nekim citoplazmatskim strukturama (Slika 8., Slika 9. i Slika 10.), a nemoguće je isključiti i lokalizaciju u jezgri (Slika 8. i Slika 9.). S obzirom da smo očekivali lokalizaciju NME6 u mitohondrijima, koristili smo selektivnu probu za mitohondrij međutim ona nije bila sasvim reprezentativna. Na slikama 8., 9. i 10. vidi se da je selektivna proba za mitohondrij razmazana te da je prisutna i u jezgri. Na slici 8. i 10. mogu se uočiti nakupine proteina NME6 u pojedinim dijelovima citoplazme, dok se na slici 9. nazire obojenje nalik na mrežastu strukturu kakvu tvore mitohondriji, no to iz ovih slika ne možemo tvrditi s velikom sigurnošću.



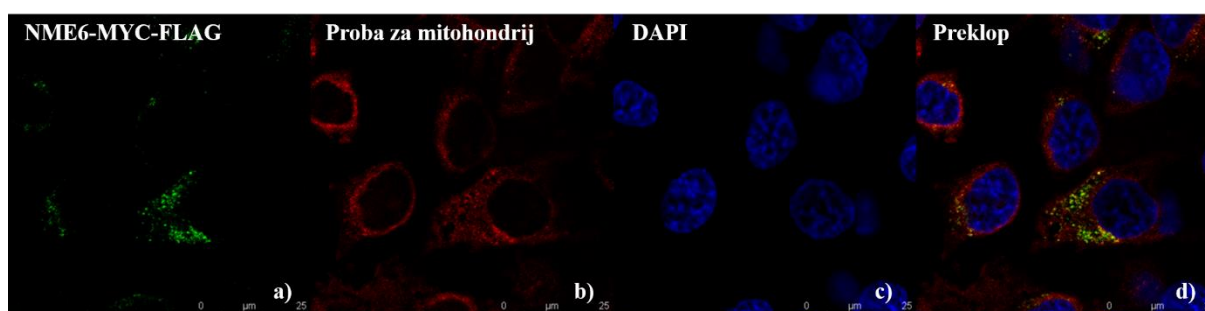
Slika 8. Lokalizacija proteina NME6-GFP.

Stanice HeLa transfecirane s pCMV6-NME6-GFP, bojane bojom DAPI i selektivnom probom za mitohondrij ($c = 150 \text{ nM}$). **a)** Lokalizacija NME6-GFP ne može se precizno utvrditi. **b)** Selektivna proba za mitohondrij **c)** Jezgre stanica HeLa obojane bojom DAPI. **d)** Preklop slika a), b) i c).



Slika 9. Lokalizacija proteina NME6-MYC-FLAG pomoću antitijela anti-FLAG.

Stanice HeLa transfecirane s pCMV6-NME6-MYC-FLAG, tretirane su s primarnim antitijelom anti-FLAG (razrjeđenje 1:500), sekundarnim antitijelom Alexa 594 (razrjeđenje 1:500) te su bojane bojom DAPI i selektivnom probom za mitohondrij ($c = 150 \text{ nM}$) **a)** Lokalizacija NME6-MYC-FLAG ne može se precizno utvrditi. **b)** Selektivna proba za mitohondrij. **c)** Jezgre stanica HeLa obojane bojom DAPI. **d)** Preklop slika a), b) i c).



Slika 10. Lokalizacija proteina NME6-MYC-FLAG pomoću antitijela anti-NME6.

Stanice HeLa transfecirane s pCMV6-NME6-MYC-FLAG, tretirane su s primarnim antitijelom anti-NME6 (HPA) (razrjeđenje 1:500), sekundarnim antitijelom FITC (razrjeđenje 1:50) te su bojane bojom DAPI i selektivnom probom za mitohondrij ($c = 150 \text{ nM}$). **a)** Lokalizacija NME6 ne može se precizno utvrditi. **b)** Selektivna proba za mitohondrij **c)** Jezgre stanica HeLa obojane bojom DAPI. **d)** Preklop slika a), b) i c).

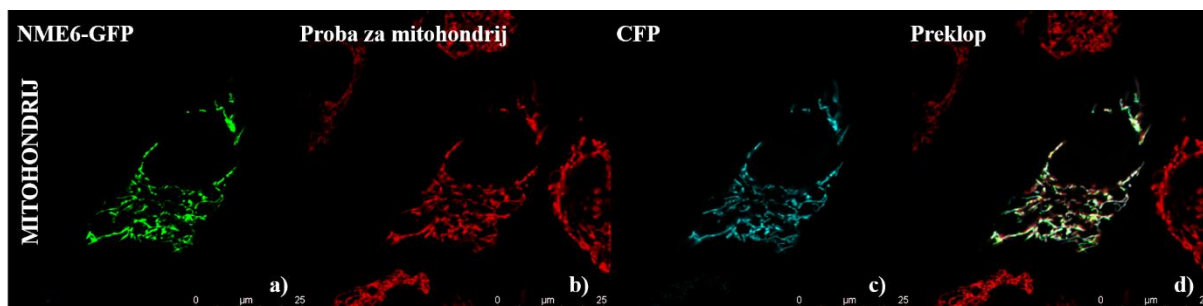
3.3. Lokalizacija fuzijskog proteina NME6-GFP u mitohondrijima živih stanica HeLa

Budući da imunocitokemijskom analizom nismo uspjeli dobiti reprezentativne rezultate, usprkos nekoliko pokušaja optimiziranja eksperimenta, odlučili smo se za detekciju lokalizacije NME6 u živim stanicama kako bismo izbjegli fiksaciju. Stanice HeLa smo transfecirali s pEGFPN1COX kao kontrolu za selektivnu probu za mitohondrij, budući da citokrom oksidaza (COX od engl. cytochrome oxidase) lokalizira u mitohondrijima. Također, napravili smo i kotransfekciju stanica HeLa s pCMV6-NME6-GFP i pCFP-myto kao dodatnu kontrolu, obzirom da CFP također lokalizira u mitohondrijima. Na kraju, napravili smo i transfekciju stanica HeLa samo s pCMV6-NME6-GFP, nakon što smo potvrdili da selektivna proba za mitohondrij adekvatno obilježava mitohondrij u intaktnoj-živoj stanici. Uočili smo da se protein COX preklapa sa selektivnom probom za mitohondrij, kao i CFP (Slika 10. i Slika 11.). NME6-GFP također lokalizira s mitohondrijima te se preklapa sa selektivnom probom za mitohondrij i proteinom CFP (Slika 11. i Slika 12.).



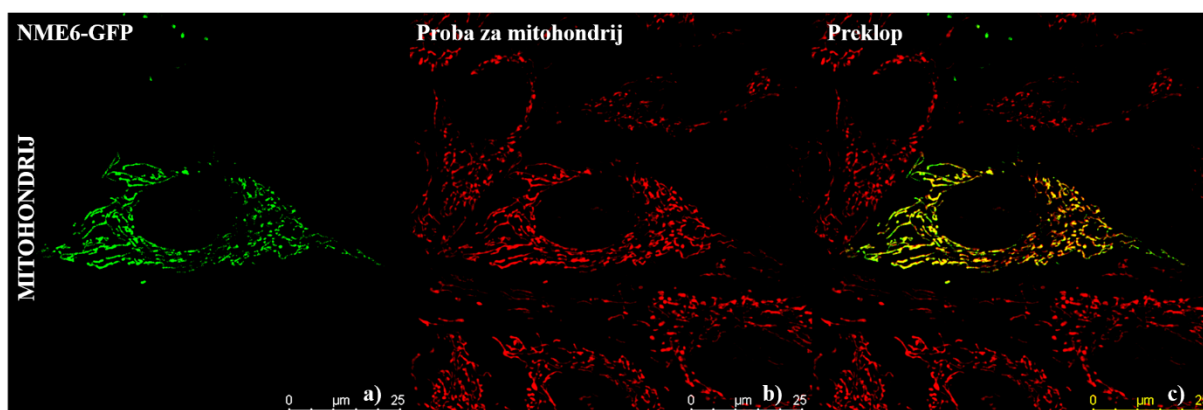
Slika 10. Kolokalizacija proteina COX s mitohondrijima.

Stanice HeLa transfecirane su s pEGFPN1COX i bojane selektivnom probom za mitohondrij ($c = 150 \text{ nM}$) **a)** Lokalizacija proteina GFP-COX. **b)** Selektivna proba za mitohondrij. **c)** Kolokalizacija proteina COX i selektivne probe za mitohondrij.



Slika 11. Kolokalizacija proteina NME6-GFP i CFP s mitohondrijima.

Stanice HeLa kotransfecirane su s pCMV6-NME6-GFP i pCFP-myto te bojane selektivnom probom za mitohondrij ($c = 150 \text{ nM}$) a) Lokalizacija proteina NME6-GFP. b) Selektivna proba za mitohondrije ($c = 150 \text{ nM}$). c) Lokalizacija modrozelenog fluorescentnog proteina (CFP). d) Kolokalizacija proteina NME6-GFP, CFP i selektivne probe za mitohondrij.



Slika 12. Kolokalizacija proteina NME6 s mitohondrijima.

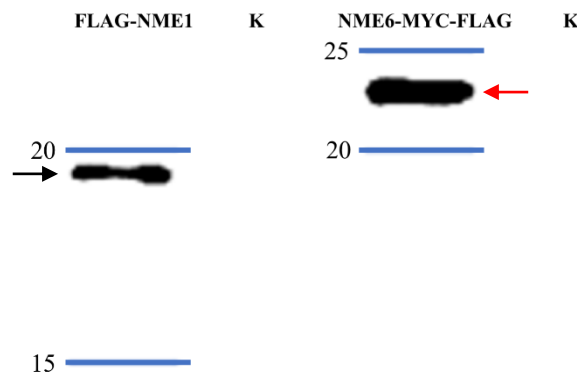
Stanice HeLa transfecirane su s pCMV6-NME6-GFP i bojane selektivnom probom za mitohondrij ($c = 150 \text{ nM}$) a) Lokalizacija proteina NME6-GFP. b) Selektivna proba za mitohondrij ($c = 150 \text{ nM}$). c) Kolokalizacija proteina NME6-GFP i selektivne probe za mitohondrij.

3.4. Utvrđivanje izražaja proteina NME6 u stanicama HeLa

Western blot analizom htjeli smo potvrditi izražaj proteina NME6 u stanicama, specifičnost antitijela koja su korištena u imunocitokemijskim analizama, posebno specifičnost antitijela anti-NME6 obzirom da ta antitijela još nisu testirana. Za potrebe ovog pokusa, stanice HeLa smo transfecirali s pcDNA3-FLAG-NME1, pcDNA3-MYC-NME2, pCMV6-NME6-MYC-FLAG i pCMV6-NME6-GFP. Dvadesetčetiri sata nakon transfekcije, izolirali smo proteine, izmjerili im koncentraciju te smo SDS elektroforezom u poliakrilamidnom gelu razdvojili proteine po veličini i prenijeli ih na nitroceluloznu membranu. Proteine smo tretirali

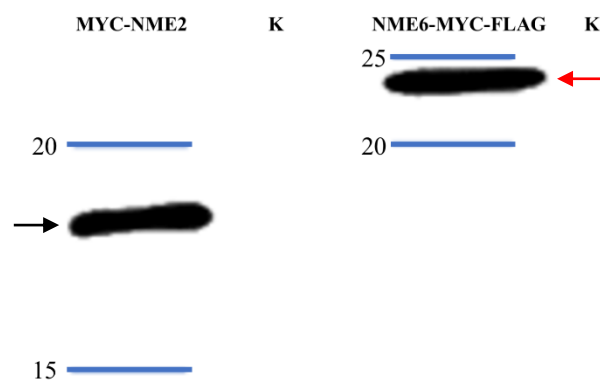
s primarnim antitijelima anti-FLAG, anti-MYC, anti-NME1/NME2 i anti-NME6 te odgovarajućim sekundarnim antitijelom koje ima vezanu peroksidazu iz hrena. Proteine izolirane iz netransfeciranih stanica HeLa koristili smo kao kontrolu.

Primarna antitijela anti-FLAG i anti-MYC specifično su vezala proteine FLAG-NME1, odnosno MYC-NME2, i NME6-MYC-FLAG te su potvrdila izražaj proteina NME6 u stanicama HeLa (Slika 13. i Slika 14.). Protein FLAG-NME1 i protein MYC-NME2 detektirani su između 15 i 20 kDa, što odgovara njihovim masama, a protein NME6-MYC-FLAG između 20 i 25 kDa, što također odgovara njegovoj masi. U kontrolnim uzorcima uz pomoć antitijela anti-FLAG i anti-MYC nismo detektirali ni jedan ni drugi protein tj. nije bilo nespecifičnih proteinskih linija.



Slika 13. Analiza *Western blot* FLAG-NME1 i NME6-MYC-FLAG s antitijelom anti-FLAG.

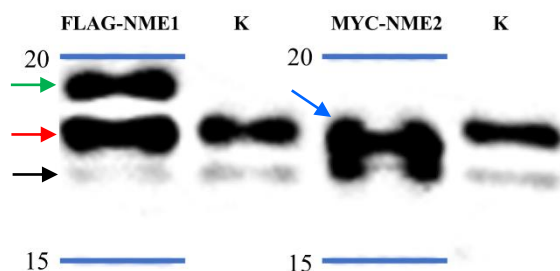
Crna strelica predstavlja protein FLAG-NME1, a crvena protein NME6-MYC-FLAG. Razrjeđenje primarnog antitijela anti-FLAG je 1:500, a sekundarnog antitijela anti-mišje 1:3000. FLAG-NME1 – proteini iz stanica HeLa transfeciranih s pcDNA3-FLAG-NME1. NME6-MYC-FLAG – proteini iz stanica HeLa transfeciranih s pCMV6-NME6-MYC-FLAG. K – kontrolni endogeni proteini iz netransfeciranih HeLa stanica.



Slika 14. Analiza *Western blot* MYC-NME2 i NME6-MYC-FLAG s antitijelom anti-MYC.

Crna strelica predstavlja protein MYC-NME2, a crvena protein NME6-MYC-FLAG. Razrjeđenje primarnog antitijela anti-MYC je 1:200, a sekundarnog antitijela anti-mišje 1:3000. MYC-NME2 – proteini iz stanica HeLa transfeciranih s pcDNA3-MYC-NME2. NME6-MYC-FLAG – proteini iz stanica HeLa transfeciranih s pCMV6-NME6-MYC-FLAG. K – kontrolni endogeni proteini iz netransfeciranih HeLa stanica.

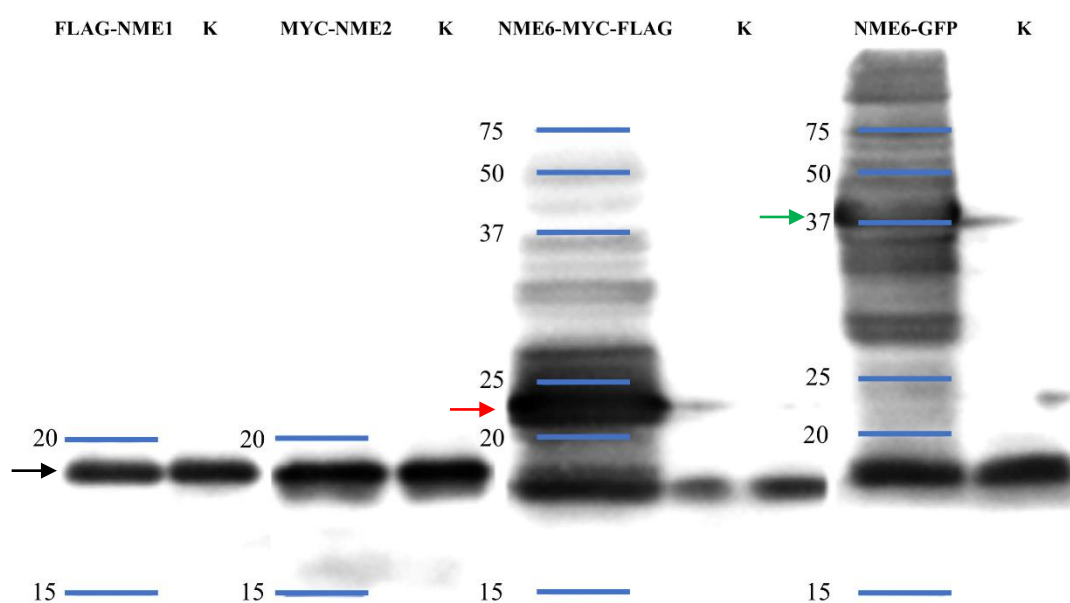
Antitijelo anti-NME1/NME2 također je specifično vezalo proteine NME1 i NME2. Detektirane su tri pruge između 15 i 20 kDa u transfeciranim FLAG-NME1 uzorcima. Najviša pruga označava protein FLAG-NME1, srednja pruga označava endogeni NME1, a najniža pruga označava endogeni NME2. U transfeciranim MYC-NME2 uzorcima detektirane su dvije pruge između 15 i 20 kDa, od kojih gornja označava endogeni NME1 i MYC-NME2 čiji se signali preklapaju, a donja endogeni NME2. U kontrolnim uzorcima detektirane su također po dvije pruge između 15 i 20 kDa, od kojih gornja predstavlja endogeni NME1, a donja endogeni NME2 (Slika 15.).



Slika 15. Analiza *Western blot* FLAG-NME1 i MYC-NME2 s antitijelom anti-NME1/NME2.

Zelena strelica predstavlja protein FLAG-NME1, crvena endogeni protein NME1, crna endogeni protein NME2, a plava protein MYC-NME2. Razrjeđenje primarnog antitijela anti-NME1/NME2 i sekundarnog antitijela anti-zečje je 1:3000. FLAG-NME1 – proteini iz stanica HeLa transfeciranih s pcDNA3-FLAG-NME1. MYC-NME2 – proteini iz stanica HeLa transfeciranih s pcDNA3-MYC-NME2. K – kontrolni endogeni proteini iz netransfeciranih HeLa stanica.

Antitijelo anti-NME6 također je specifično vezalo protein NME6 i potvrdilo njegov izražaj u stanicama HeLa (Slika 16.). Detektirana je po jedna pruga ispod 20 kDa u transfeciranim FLAG-NME1 i MYC-NME2 uzorcima te u svim kontrolnim uzorcima, koja označava endogeni protein NME6. U transfeciranim NME6-MYC-FLAG i NME6-GFP uzorcima detektirano je više pruga, od kojih su najistaknutije pruge na pozicijama ispod 20 kDa, koja predstavlja već spomenuti endogeni protein NME6, između 20 i 25 kDa, koja odgovara prethodnim rezultatima s antitijelima anti-FLAG i anti-MYC te na 37 kDa, koja odgovara proteinu NME6-GFP. Za preostale pruge u transfeciranim NME6-MYC-FLAG i NME6-GFP uzorcima smatramo da predstavljaju različite oligomere nastalog proteina.



Slika 16. Analiza Western blot proteina NME s antitijelom anti-NME6 (HPA).

Crna strelica predstavlja endogeni protein NME6, crvena protein NME6-MYC-FLAG, a zelena protein NME6-GFP. Razrijeđenje primarnog antitijela anti-NME6 (HPA) je 1:1000, a sekundarnog antitijela anti-zečje 1:3000. FLAG-NME1 - proteini iz stanica HeLa transfeciranih s pcDNA3-FLAG-NME1. MYC-NME2 – proteini iz stanica HeLa transfeciranih s pcDNA3-MYC-NME2. NME6-MYC-FLAG – proteini iz stanica HeLa transfeciranih s pCMV6-NME6-MYC-FLAG. NME6-GFP – proteini iz stanica HeLa transfeciranih s pCMV6-NME6-GFP. K – kontrolni endogeni proteini iz netransfeciranih HeLa stanica.

4. RASPRAVA

Unatoč tome što je protein NME6 otkriven prije gotovo dva desetljeća vrlo se malo zna o ovom proteinu. Utvrđeno je da protein NME6 posjeduje katalitičku aktivnost kinaza NDP, da ima ulogu u staničnom rastu i progresiji staničnog ciklusa (Tsuiki i sur., 1999.) te da je ključni regulator obnavljanja matičnih stanica (Wang i sur., 2012.). Tsuiki i sur. objavili su da ovaj protein kolokalizira s mitohondrijima, međutim niti jedna neovisna studija nije potvrdila taj nalaz. Lokalizacija proteina puno govori o njegovoj ulozi te je taj podatak od izuzetne važnosti za istraživanje njegove funkcije. Budući da su istraživanja pokazala da bi mogao imati ulogu u staničnom rastu i progresiji staničnog ciklusa te da ima ulogu u obnavljanju matičnih stanica, pretpostavlja se da narušavanje njegove ravnoteže može dovesti do pojave tumora. Gen *NME6* smješten je na kromosomu 3 u regiji koja sadrži gene za tumorske supresore te je utvrđeno da prekomjerni izražaj u SAOS2 stanicama rezultira smanjenjem rasta stanica što podržava pretpostavku da je *NME6* na neki način uključen u nastanak i/ili progresiju tumora (Tsuiki i sur., 1999.). Kako bismo mogli definirati mehanizme njegovog djelovanja potrebno je odrediti/potvrditi njegovu točnu unutarstaničnu lokalizaciju što je bio jedan od ciljeva ovog diplomskog rada. Drugi dio rada odnosi se na testiranje komercijalnih antitijela za NME6 te njihovo testiranje u imunofluorescenciji i analizi *Western blot*.

Kako bismo ostvarili ciljeve rada koristili smo komercijalne konstrukte pCMV6-NME6-MYC-FLAG i pCMV6-NME6-GFP za transfekciju stanica HeLa koje smo potom analizirali imunocitokemijski i *Western blotom*. cDNA gena *NME6* provjerili smo restriksijskom razgradnjom i određivanjem slijeda nukleotida. Restriksijskom razgradnjom smo prema očekivanjima detektirali jedan manji odsječak nešto veći od 550 pb, koji odgovara veličini gena *NME6* razgrađenog restriksijskim enzimima EcoRI i Xho, te veći fragmenti od oko 5000, odnosno, 6000 pb. Detekcija od oko 5000 pb veličinom odgovara praznom konstrukt pCMV6-Entry od 4,9 kb, a od oko 6000 pb praznom konstrukt pCMV6-AC-GFP od 6,6 kb (Slika 1. i 2.). U uzorcima koji nisu tretirani restriksijskim enzimima detektirano je više pruga veličina iznad 5000 pb, koje označavaju različite konformacije konstrukta, od kojih cirkularnu konformaciju predstavlja najviša pruga, linearnu srednja, a superuvijenu najniža pruga (Slika 2.). To su prirodne konformacije plazmida koje se pojavljuju u bakterijama te je njihova prisutnost također bila očekivana. Sekvenciranjem konstrukata pCMV6-NME6-MYC-FLAG i pCMV6-NME6-GFP pomoću 5' i 3' početnica smo prema očekivanjima potvrdili da komercijalni konstrukti sadrže gen *NME6* i pripadajuće privjeske GFP, odnosno MYC-FLAG. Unatoč tome što proizvođač garantira ispravnost konstrukata, to ne mora uvijek biti točno. Iz

tog razloga odlučili smo dodatno provjeriti konstrukte sekvenciranjem kako bismo 100% bili sigurni da imaju ugrađeni gen *NME6*.

Kako bismo odredili lokalizaciju proteina NME6, stanice HeLa smo transfecirali s različitim plazmidima, pri čemu smo transfekciju s pcDNA3-FLAG-NME1 i pcDNA3-MYC-NME2 koristili kao kontrole za imunocitokemijske reakcije, ispravnost primarnih antitijela za biljege *MYC* i *FLAG* te ispravnost sekundarnih antitijela obilježenih fluorescentnim bojama, budući da su ovi konstrukti u prijašnjim eksperimentima dali reprezentativne rezultate i da je lokalizacija proteina NME1 i NME2 poznata. Transfekciju s pCMV6-GFP koristili smo kao kontrolu transfekcije i kao kontrolu da protein GFP ne uvjetuje lokalizaciju fuzijskog proteina NME6-GFP.

Do danas, samo su Tsuki i sur. 1999. određivali unutarstaničnu lokalizaciju proteina NME6 te su imunocitokemijskom analizom uz prisutnost specifične probe za mitohondrij utvrdili da je protein lokaliziran u mitohondrijima, a u pokusima bez specifične probe za mitohondrij uočili su lokalizaciju NME6 i u citoplazmi (Tsuki i sur., 1999.). Naši pokusi imunocitokemijske analize stanica HeLa s prekomjerno izraženim proteinima NME6-GFP i NME6-MYC-FLAG dali su vrlo neuobičajene rezultate. Na slikama 8. i 9. vidi se da je proba za mitohondrije manje specifična nego što smo očekivali, te da je razmazana po stanici, a pojavljuje se i u jezgri. Preporučene radne koncentracije probe za mitohondrij od strane proizvođača bile su 100-500 nM, a vrijeme inkubacije 15-30 min. Najmanja radna koncentracija koju smo mi testirali bila je 50 nM, a vrijeme inkubacije 20 min. Relativna nespecifičnost probe za mitohondrije može biti uzrokovana prevelikom radnom koncentracijom probe za mitohondrije. Prevelika koncentracija može dovesti do obilježavanja drugih staničnih struktura pored mitohondrija čime proba gubi na specifičnosti. Nadalje, pokazano je da formaldehid narušava strukturu mitohondrija i dovodi do njegove fragmentacije u 45% stanica u uzorku (Margaron i sur., online 2017.) što može imati za posljedicu nespecifičnost probe koja „curi“ iz degradiranih mitohondrija. Na slikama 8., 9. i 10. pokušali smo odrediti lokalizaciju proteina NME6, no nismo bili zadovoljni rezultatom upravo zbog nespecifične lokalizacije probe za mitohondrij prilikom imunocitokemijske analize. Na slici 10. uočen je slab signal proteina NME6 uz korištenje antitijela anti-NME6 (HPA). Naime, formaldehid vrlo brzo reagira s funkcionalnim skupinama bioloških makromolekula i križno ih povezuje (Fox i sur., 1985.). Također, izuzetno snažno blokira antigene bogate s amino i amidnim skupinama te antitijelo koje se veže na takve skupine ne omogućava adekvatnu imunodetekciju (Puchtler i Meloan 1984.). Antitijelo anti-NME6 (HPA) prepoznaje slijed aminokiselina koji obuhvaća

aminokiseline s amino- i amidnim skupinama. Pretpostavljamo da je formaldehid križno vezao te skupine i da smo zbog toga dobili slabu detekciju proteina. Taj problem mogao bi se u budućnosti riješiti tako da se isproba neki drugi fiksativ iako je 4% formaldehid u mnogim publikacijama metoda izbora pri vizualizaciji mitohondrija.

Budući da u imunocitokemijskoj analizi proba za mitohondrije nije kolokalizirala specifično s mitohondrijima, njezinu specifičnost za mitohondrije odlučili smo provjeriti proteinima COX i CFP u živim stanicama. Naime, protein COX (citokrom-oksidaža) lokaliziran je u matriksu mitohondrija, gdje sudjeluje u reakciji prijenosa kisika u respiratornom lancu (Seligman i sur., 1968.), a protein CFP nosi signalni slijed i konstruiran je na način da kolokalizira s mitohondrijima. Ukoliko proba za mitohondrije označava specifično i samo mitohondrije signal bi se trebao preklapati sa signalom proteina COX i CFP. Na slici 10. prema očekivanjima vidi se potpuna kolokalizacija probe za mitohondrij i proteina COX. Na slici 11. gdje je prikazana kotransfekcija proteina CFP i NME6, također se vidi kolokalizacija probe za mitohondrij i proteina CFP. Protein NME6 također kolokalizira s proteinom CFP i probom za mitohondrije (Slika 11. i 12.) što se poklapa sa literaturnim podacima da NME6 kolokalizira s mitohondrijima (Tsuiki i sur. 1999.).

NME4, ljudska kinaza NDP, lokalizira isključivo s mitohondrijima i naša je pretpostavka da protein NME6 u mitohondrijima nema istu ulogu kao mitohondrijski NME4. Perina i sur. su Nme6 iz spužve unijeli u ljudske stanice. Nme6 posjeduje signalnu sekvencu za mitohondrije iako nisu napravljeni pokusi koji bi i potvrdili tu potencijalnu lokalizaciju. NME6 iz spužve nije pokazao katalitičku aktivnost niti nakon uklanjanja signalne sekvence za mitohondrije što je potrebno ljudskom mitohondrijskom proteinu NME4 za katalitičku aktivnost kinaze NDP (Perina i sur., 2011.). NME6 iz spužve nije lokalizirao s mitohondrijima u ljudskim tumorskim stanicama. Nadalje, ameba *Dictyostelium discoideum* posjeduje mitohondrijsku kinazu NDP i ona sadrži signalni slijed za mitohondrij te enzimatsku aktivnost (Troll i sur., 1993.). Mitohondrijska kinaza NDP iz *D. discoideum* homolog je ljudskog NME6, dok je NME4 evolucijski znatno mlađi gen koji nalazimo tek kod kralješnjaka. Postoji mogućnost da je NME6 kod beskralješnjaka obavlja funkciju NME4 dok je u kralješnjaka NME6 zadobio neku drugu funkciju. Kolokalizaciju s mitohondrijem treba još dodatno potvrditi staničnim frakcioniranjem.

Analizom *Western blot* potvrdili smo specifičnost antitijela anti-NME6 (HPA) i njegovu pouzdanu uporabu u ovoj metodi. Antitijelom anti-NME6 (SAB) nisu dobiveni uspješni rezultati unatoč optimiziranju metode. Preporučeni raspon koncentracija antitijela od strane

proizvođača bio je 1-5 µg/mL te smo vrlo slabi signal dobili tek s najvećom preporučenom koncentracijom (rezultati nisu prikazani). Istovremeno, koristili smo najmanje preporučeno razrjeđenje antitijela anti-NME6 (HPA) (1:100), no dobili smo znatno jači signal (rezultati nisu prikazani) te smo daljnje pokuse i optimiziranja odlučili izvršiti s antitijelom anti-NME6 (HPA). Mogućnost je da bi antitijelo anti-NME6 (SAB) dao adekvatan signal u većim koncentracijama od preporučenih. Sigurni smo da manjak pouzdanog signala nije uzrokovan neadekvatnim sekundarnim antitijelom budući da smo isto sekundarno antitijelo koristili za antitijela anti-MYC i anti-FLAG, čiji su signali vrlo jaki. Optimalno razrjeđenje antitijela anti-NME6 (HPA) u analizi *Western blot*, prema našim rezultatima je 1:1000, što je puno više od preporučenog razrjeđenja (1:100 – 1:250). Moguće da antitijelo anti-NME6 (HPA) ima jak afinitet vezanja za protein NME6 pa je dovoljno i veće razrjeđenje antitijela za adekvatnu detekciju. Analizom *Western blot*, također smo potvrdili izražaj proteina NME6. Mehus i sur. su u većini ispitanih tkiva utvrdili nisku razinu izražaja proteina NME6 te je naša pretpostavka bila da će izražaj endogenog NME6 biti slab. Na slici 16. uočen je značajan izražaj proteina NME6 u stanicama HeLa, sličan onome proteina NME1 i NME2 za koje se zna da su jako izraženi u stanici (Hudelist i sur., 2005.). Naime, Mehus i sur. nisu ispitivali tkivo vrata maternice, no ova indikacija može upućivati na specifičnu funkciju proteina NME6 u stanicama vrata maternice ili na funkciju proteina koja je nužna za tumorske stanice. Vrlo oskudna literatura vezana uz gen/protein NME6 ne daje nam mogućnost diskusije o njegovoj ulozi međutim lokalizacija ovog proteina uz mitohondrij upućuje na njegovu ulogu u staničnoj energetici iako se i druge funkcije vezane, primjerice, uz apoptozu ne mogu isključiti. U tom pravcu nastaviti će se istraživanja koje će nastojati rasvijetliti točnu lokalizaciju ovog proteina unutar mitohondrija, te odrediti strukturu i funkciju ovog proteina u stanici.

5. ZAKLJUČCI

1. Protein NME6 lokaliziran je u mitohondrijima, a u manjoj količini i u jezgri.
2. Antitijela anti-NME6 (HPA) i (SAB) nisu pogodna ili nisu dovoljno optimizirana za imunocitokemijsku analizu.
3. Antitijelo anti-NME6 (HPA) pogodno je za analizu *Western blot*, a optimalno razrjeđenje je 1:1000.
4. Antitijelo anti-NME6 (SAB) daje vrlo slabi signal u analizi *Western blot* te u uvjetima u kojima smo ga mi koristili, nije pogodan za detekciju signala u analizi *Western blot*.

6. LITERATURA

Adey A., Burton J.N., Kitzman J.O., Hiatt J.B., Lewis A.P., Martin B.K., Qiu R., Lee C., Shendure J. 2013. The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line. *Nature* 500, 207-211.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2008. *Molecular biology of the cell*, 5th edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York/Abingdon.

Barraud P., Amrein L., Dobremez E., Dabernat S., Masse K., Larou M., Daniel J.Y., Landry M. 2002. Differential expression of nm23 genes in adult mouse dorsal root ganglia. *Journal of Comparative Neurology* 444, 306-323.

Bilitou A., Watson J., Gartner A., Ohnuma S-I. 2009. The NM23 family in development. *Molecular and Cellular Biochemistry* 329, 17-33.

Boissan M., Dabernat S., Peuchant E., Schlattner U., Lascu I., Lacombe M-L. 2009. The mammalian Nm23/NDPK family: from metastasis control to cilia movement. *Molecular and Cellular biochemistry* 329, 51-62.

Boissan M., Lacombe M-L. 2011. Learning about the functions of *NME/NM23*: lessons from knockout mice to silencing strategies. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 384, 421-431.

Brinas L., Zarazaga M., Saenz Y., Larrea F.R., Torres C. 2002. β -Lactamases in Ampicilin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Foods, Humans, and Healthy Animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 3156-3163.

Ćetković H., Perina D., Harcet M., Mikoč A., Herak Bosnar M. 2015. Nme family of proteins-clues from simple animals. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 388, 133-142.

Desvignes T., Fauvel C., Bobe J. 2011. The nme gene family in zebrafish oogenesis and early development. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 384, 439-449.

Desvignes T., Pontarotti P., Fauvel C., Bobe J. 2009. Nme protein family avolutionary history, a vertebrate perspective. *BMC Evolutionary Biology* 9, 256 doi:10.1186/1471-2148-9-256.

Duriez B., Duquesnoy P., Escudier E., Bridoux A-M., Escalier D., Rayet I., Marcos E., Vojtek A-M., Bercher J-F., Amselem S. 2007. A common variant in combination with a nonsense mutation in a member of the thioredoxin family causes primary ciliary dyskinesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 3336-3341.

Fearon E.R. 1997. Human Cancer Syndromes: Clues to the Origin and Nature of Cancer. *Science* 278, 1043-1050.

Felgner J.H., Kumar R., Sridhar C.N., Wheeler C.J., Tsai Y.J., Border R., Ramsey P., Martin M., Felgner P.L. 1994. Enhanced Gene Delivery and Mechanism Studies with a Novel Series of Cationic Lipid Formulations. *Journal of Biological Chemistry* 269, 2550-2561.

Fox C.H., Johnson F.B., Whiting J., Roller P.P. 1985. Formaldehyde Fixation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 33, 845-853.

Georgescauld F., Sabate R., Espargaro A., Ventura S., Chaignepain S., Lacombe M-L., Lascu I. 2011. Aggregation of the neuroblastoma-associated mutant (S120G) of the human nucleoside diphosphate kinase-A/*NM23-H1* into amyloid fibrils. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 384, 373-381.

Gey G.O., Coffman W.D., Kubicek M.T. 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12, 264-265.

Heike T., Winckler T., Lascu I., Muller N., Saurin W., Veron M., Mutzel R. 1993. Separate Nuclear Genes Encode Cytosolic and Mitochondrial Nucleoside Diphosphate Kinase in *Distiostelium discoideum*. *The Journal of BIOLOGICAL Chemistry* 268, 25469-25475.

Herak Bosnar M., de Gunzburg J., Bago R., Brečević L., Weber I., Pavelić J. 2004. Subcellular localization of A and B Nm23/NDPK subunits. *Experimental Cell Research* 298, 275-284. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.04.018

Hudelist G., Czerwenka K., Singer C., Pischinger K., Kubista E., Manavi M. 2005. cDNA array analysis of cytobrush-collected normal and malignant cervical epithelial cells: a feasibility study. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 158, 35-42.

Hsu Tien. 2011. *NME* genes in epithelial morphogenesis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 384, 363-372.

Jamur M.C., Constance O. 2010. Permeabilization of cell membranes. *Methods Mol Biol* 588, 63-66.

Johnston C., Martin B., Fichant G., Polard P., Claverys J.P. 2014. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature reviews. Microbiology* 12, 181-196.

Lacombe M-L., Milon L., Munier A., Mehus J.G., Lambeth D.O. 2000. The Human Nm23/Nucleoside Diphosphate Kinases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 32, 247-58.

Landry J.J.M., Pyl P.T., Rausch T., Zichner T., Tekkedil M.M., Stutz A.M.M., Anna J., Aiyar R.S., Pau G., Delhomme N., Gagneur J., Korbel J.O., Hauber W., Steinmetz L.M. 2013. The Genomic and Transcriptomic Landscape of HeLa Cell line. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 3, 1213-1224.

Lasci I., Morera S., Chiadmi M., Cherfils J., Janin J., Veron M. 1996. Mechanism of the nucleoside diphosphate kinase reaction: X-ray structure of the phosphohistidine intermediate. *Techniques in Protein Chemistry* 7, 209-217.

Lee P.Y., Costumbrado J., Hsu C.Y., Kim Y.H. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* 62, e3923, 1-5. <http://doi.org/10.3791/3923>

Lutz S., Mura R.A., Hippe H.J., Tiefenbacher C., Niroomand F. 2003. Plasma membrane-associated nucleoside diphosphate kinase (nm23) in the heart is regulated by beta-adrenergic signaling. *British journal of pharmacology* 140, 1019-1026.

Margaron Y., Degot S., Fuchs A., Loiraud C. Efficient labeling of mitochondrial network in micropatterned cells for toxicity studies. [9.12.2017.]. <http://cellproduce.co.jp/wp-content/uploads/2014/02/ApplicationNote-002.pdf>

Mehus J.G., Deloukas P., Lambeth D.O. NME6: a new member of the nm23/nucleoside diphosphate kinase gene family located on human chromosome 3p21.3. *Human Genetics* 104, 454-459.

Milon L., Meyer P., Chiadmi M., Munier A., Johansson M., Karlsson A. Johansson M., Karlsson A., Ioan L., Capeau J., Janin J., Lacombe M-L. 2000. The human nm23-H4 gene product is a mitochondrial nucleoside diphosphate kinase. *Journal of biological chemistry* 275, 14264-14272.

Misumi M., Tanaka N. 1980. Mechanism of Inhibition of Translocation by KanaMYCin and VioMYCin: a Comparative Study with Fusic Acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 92, 647-564.

Mitchel K.A., Gallagher B.C., Szabo G., Otero A.S. 2004. NDP kinase moves into developing primary cilia. *Cell Motil Cytoskeleton* 59, 62-73.

Munier A., Feral C., Milon L., Pinon V.P., Gyapay G., Capeau J., Guellaen G., Lacombe M-L. 1998. A new human nm23 homologue (nm23-H5) specifically expresses in testis germinal cells. *Febs Letters* 434, 289-294.

Nakano M.M., Mashiko H., Ogawara H. 1984. Cloning of the KanaMYCin Resistance Gene from a KanaMYCin-Producing StreptoMYCes Species. *Journal of Bacteriology* 157, 79-83.

Nelson D.L., Cox M.M. 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6th edition. W. H. Freeman and Company, New York.

Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal* 1, 841-845.

NIPPON Genetics EUROPE Internet stranica. Opis *Midori Green Advance* proizvoda [14.11.2017.]. <https://www.nippongenetics.eu/en/product/midori-green-advance/>

Okabe-Kado J., Kasukabe T., Honma Y., Hanada R., Nakagawara A., Kaneko Y. 2005. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. *Cancer science* 96, 653-660.

Padma P., Hozumi A., Ogawa K., Inaba K. 2001. Molecular cloning and characterization of a thioredoxin/nucleoside diphosphate kinase related dynein intermediate chain from the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Gene* 275, 177-183.

Perina D., Herak Bosnar M., Mikoč A., Muller W.E.G., Četković H. 2011. Characterization of Nme6-like gene/protein from marine sponge *Suberites domuncula*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 384, 451-460.

Postel E.H., Berberich S.J., Flint S.J., Ferrone C.A. 1993. Human MYC transcription factor PuF identified an nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science* 261, 478-480.

Sadek C.M., Jimenez A., Damdimopoulos A.E., Kieselbach T., Nord M., Gustafsson J-A., Spyrou G., Davis E.C., Oko R., van der Hoorn F.A., Miranda-Vizuete A. 2003. Characterization of Human Thioredoxin-like 2 A novel microtubule-binding thioredoxin expressed predominantly in the cilia of lung airway epithelium and spermatid manchette and axoneme. *Journal of Biological Chemistry* 278, 13133-13142.

Scherer W.F., Syverton J.T., Gey G.O. 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. *Journal of Experimental Medicine* 97, 695-710.

Schwahn U., Lenzner S., Dong J., Feil S., Hinzmann B., van Duijnhoven G., Kirschner R., Hemberger M., Bergen A.A.B., Rosenberg T., Pinckers A.J.L.G., Fundele R., Rosenthal A., Cremers F.P.M., Ropers H-H., Berger W. 1998. Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. *Nature Genetics* 19, 327-332.

Seligman A.M., Karnovsky M.J., Wasserkrug H.L., Hanker J.S. 1968. Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidin (DAB). *The Journal of Cell Biology* 38, 1-14.

Steeg P.S., Bevilacqua G., Kopper L., Thorgeirsson U.P., Talmadge J.E., Liotta L.A., Sobel M.E. 1988. *Journal of the National Cancer Institute* 80, 200-204.

Tokarska-Schlattner M., Boissan M., Munier A., Borot C., Mailleau C., Speer O., Schlattner U., Lacombe M-L. 2008. The Nucleoside Diphosphate Kinase D (NM23-H4) Binds the Inner Mitochondrial Membrane with High Affinity to Cardiolipin and Couples Nucleotide Transfer with Respiration. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 26198-26207.

ThermoFischer Scientific internet stranica. Opis kompleta za određivanje ukupne koncentracije proteina „Pierce BCA Protein Assay Kit“ [12. kol. 2017.]. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225>

Tsuiki H., Nitta M., Furuya A., Hanai N., Fujiwara T., Inagaki M., Kochi M., Ushio Y., Saya H., Nakamura H. 1999. A Novel Human Nucleoside Diphosphate (NDP) Kinase, Nm23-H6, Localizes in Mitochondria and Affects Cytokinesis. *Journal of Cellular Biochemistry* 76, 254-269.

Wang C-H., Ma N., Lin Y-T., Wu C-C., Hsiao M., Lu F.L., Yu C-C., Chen S-Y., Lu J. 2012. A shRNA Functional Screen Reveals Nme6 and Nme7 are Crucial for Embryonic Stem Cell Renewal. *Stem Cells* 30, 2199-2211.

Yoon J-H., Qiu J., Cai S., Chen Y., Cheetham M.E., Shen B., Pfeifer G.P. 2006. The retinitis pigmentosa-mutated RP2 protein exhibits exonuclease activity and translocates to the nucleus in response to DNA damage. *Experimental cell research* 312, 1323-1334.

Zhu Z-Y., Karlin S. 1996. Clusters of charged residues in protein three-dimensional structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 8350-8355

LUCIJA AČKAR

+385 922582354 ◊ lucija.ackar@gmail.com

1. Kozari put 8a ◊ 10000 Zagreb, Hrvatska

Skype: lucijaackar ◊ LinkedIn: linkedin.com/in/lucijaackar

Nacionalnost: hrvatsko ◊ 14.06.1993 ◊ Vozačka dozvola

OBRAZOVANJE

Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu 2015–2018

M. Sc. molekularne biologije

- Tehničko sveučilište u Madridu, semestar Erasmus studentske razmjene na Biotehnološkom odjelu

Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu 2012–2015

B. Sc. molekularne biologije

- Demonstrator na kolegiju Opće i anorganske kemije

ISKUSTVO

Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu 2015-2016

Studentska praksa

Zagreb, Hrvatska

- Sazrijevanje tumorskih matičnih stanica osteosarkoma pomoću genske terapije – tretman s proteinom BMP2.
- Iskustvo u pripremi i organizaciji projekta, tehnikama stanične kulture poput nasadijanja i brojanja stanica, transdukcije stanica i biofizičke tehnologije poput protočne citometrije. Analiza genske ekspresije matičnih i koštanih genskih markera i osjetljivosti na konvencionalnu kemoterapiju.

Boehringer Ingelheim

Srp-Kol 2015

Studentska praksa

Biberach an der Riss, Njemačka

- Odjel za neklinička istraživanja i razvoj; Zavod za metabolizam lijekova i farmakokinetiku; Farmakogenomika.
- Rad na projektu R&D zavoda Farmakogenomike – Iskustvo u analizi genoma, izolacija nukleinskih kiselina iz različitih izvora materijala, analize RT-PCR.

OSTALA ISKUSTVA

Be Madrid 2016

Koordinator putovanja i kulturnih događanja

Madrid, Španjolska

- Vođenje i informiranje ljudi tijekom putovanja, pomoć stranim studentima u prilagodbi i upoznavanju Španjolske kulture.

Brand Karma

2015-2017

Koordinator događanja i promotor

Zagreb, Hrvatska

- Koordinacija i organizacija događanja, edukacija zaposlenika o novim proizvodima, promocija proizvoda na tržištu.

Noć biologije

2013-2016

- Projekt popularizacije znanosti u trajanju od tri mjeseca (tri godine sudjelovanja); Organizacija i koordinacija radionica, izvođenje laboratorijskih eksperimenata i održavanje kratkih predavanja javnosti, predstavljanje fakulteta na HRT-u kao voditelj radionice Alergijska reakcija.

FameLab

Ožu 2015

- Državno finale natjecanja; Natjecanje popularizacije znanosti, inženjerstva i tehnologije u prezentacijama u trajanju do 3 minute – pomoću znanstveno točnog uvida u svijet znanosti zainteresirati javnost

RAČUNALNE VJEŠTINE

Software paketi: Microsoft Office, ChemSketch, Graphpad Prism

STRANI JEZICI

Hrvatski: Materinji (C2)

Engleski: Napredni (CEFR B2 diploma)

Španjolski: Osnovni (A1)

Njemački: Osnovni (A1)