Endocitozni put i recikliranje MHC molekula I razreda

Blagojević Zagorac, Gordana

Doctoral thesis / Disertacija

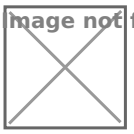
2010

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:188:855159

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

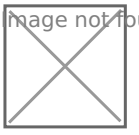
Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository

DIGITALNA KNJIŽNICA





SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

Gordana Blagojević

ENDOCITOZNI PUT I RECIKLIRANJE MHC MOLEKULA I RAZREDA

Doktorska disertacija

Rijeka, 2010.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Pero Lučin

Doktorska disertacija je obranjena dana _____. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Blaženka Grahovac
2. Prof. dr. sc. Alenka Gagro
3. Prof. dr. sc. Sanja Balen
4. Prof. dr. sc. Pero Lučin

Rad ima 220 listova, 86 slika i 4 tablice.

UDK klasifikacija _____

Najveći dio rada izrađen je na Zavodu za fiziologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Dio rada koji se odnosi na matematičko modeliranje izrađen je na Odjelu za matematiku Sveučilišta u Osijeku u suradnji s prof. dr. sc. R. Scitovskim, prof. dr. sc. D. Jukićem i doc. dr. sc. K. Sabom.

Istraživanja su dio znanstvenog projekta "Endocitoza površinskih glikoproteina, virusa i intracelularne bakterije", broj 0062030 kojeg je financiralo Ministarstvo znanosti i tehnologije Republike Hrvatske (2002-2006), glavni istraživač prof. dr. sc. Pero Lučin, te znanstvenog projekta br. 062-0620238-0223 pod nazivom «Sortiranje MHC molekula I razreda na staničnoj membrani i endocitoznim odjeljcima» kojeg od 01. siječnja 2007. financira Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, glavni istraživač prof. dr. sc. Pero Lučin.

Zahvale

*Veliko hvala mom mentoru **prof. dr. sc. Peri Lučinu** na ukazanom povjerenju, intelektualnoj potpori i pružanju vrijednih savjeta tijekom mog znanstvenog rada i razvoja.*

*Neizrecivo hvala **Hani** na podršci, razumijevanju, prijateljstvu i nadasve entuzijazmu kojim me vodila tijekom moga rada.*

*Veliko hvala **"teti" Jeleni** koja mi je bila najveća podrška na mojim samim počecima.*
*Veliko hvala mojim kolegama iz sobe **Hrvoju i Maji** koji su i najteže trenutke učinili ljepšima.*

*Hvala svim **djelatnicima Zavoda za fiziologiju i imunologiju** na podršci i suradnji.*

*Veliko hvala **prof. dr. sc. R. Scitovskom, prof. dr. sc. D. Jukiću i doc. dr. sc. K. Sabi** koji su mi omogućili spoznati sve čari svijeta matematike.*

*Neizrecivo hvala **mojoj obitelji** koja me je uvijek bezrezervno podržavla, pa tako i tijekom izrade ovoga rada.*

*Naposlijetku, zahvaljujem mom najboljem prijatelju, suputniku i najvećoj ljubavi **Marku** što je uz mene.*

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Prvenstveni cilj ovoga rada bila je karakterizacija konstitutivne internalizacije konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda, odnosno karakterizacija njihove endocitoze, recikliranja i degradacije. Poznato je da razlika u konformaciji MHC-I molekula uzrokuje njihovo razdvajanje u sekretornom putu. Stoga su u ovom radu istražena načela njihova razdvajanja tijekom endocitoze i putovanja kroz endosomalne odjeljke. Na temelju eksperimentalnih mjerenja cilj nam je bio i uspostavljanje matematičkog modela za kinetičku analizu endosomalnih putova.

Materijal i metode: Istraživanja smo proveli na mišjim fibroblastima J26 transficiranim s genom koji kodira molekule HLA-B7 (J26-B7), HLA-Cw6 (J26-Cw6) ili HLA-G1 (J26-G1), na humanoj tumorskoj staničnoj liniji HeLa koja konstitutivno izražava sve klasične HLA molekule I razreda, Balb 3T3 mišjim fibroblastima, te L-L^d stanicama (mišji fibroblasti transficirani genom za molekule H2-L^d). Za praćenje MHC molekula I razreda koristili smo monoklonska protutijela (mPt): mPt W6/32, koje prepoznaje sve klasične konformirane HLA molekule i konformirane HLA-G1 molekule, mPt HC-10, koje prepoznaje sve klasične nekonformirane HLA molekule, mPt MEM-G/1 koje prepoznaje nekonformirane molekule HLA-G1, mPt 30-5-7 koje prepoznaje konformirane H2-L^d molekule, te mPt 64-3-7 koje prepoznaje nekonformirane H2-L^d molekule. Transferinski receptor (TfR) smo pratili pomoću mPt R17, a molekule GM_1 pomoću obilježene podjedinice B kolera toksina. Neionski detergent Triton X-100 nam je poslužio za ispitivanje nazočnosti molekula u lipidnim splavima. Oponašanjem uvjeta endosomalnog pH izvan stanice, utvrdili smo promjenu konformacije MHC molekula I razreda u zadanim uvjetima. Kako bismo utvrdili koji putovi su uključeni u endocitozu, endosomalno putovanje, recikliranje i degradaciju ovih molekula, koristili smo različite kemijske inhibitore. Kinetiku internalizacije pratili smo protočnom citometrijom, a unutarstanično putovanje konfokalnom mikroskopijom koristeći princip površinskog vezivanja odgovarajućeg monoklonskog protutijela i njegovog praćenja nakon određene kinetike internalizacije. Internalizirane molekule kolokalizirali smo međusobno, te s određenim endosomalnim markerima. Recikliranje molekula pratili smo modificirajući tri različita protokola iz literature i to protočnom citometrijom i konfokalnom mikroskopijom. U cilju praćenja kinetike degradacije koristili smo metodu površinske biotinilacije, te imunoprecipitacije, elektroforeze na poliakrilamidnim gelovima (SDS-PAGE), Western-blota i kemiluminiscencije. Za matematičko modeliranje i simulacije endocitoznih procesa koristili smo programski paket Mathematica (Wolfram Research Europe Ltd.).

Rezultati: Konformirane MHC-I molekule dobro su izražene na staničnoj površini za razliku od nekonformiranih molekula. Djelovanjem kiselog pH (fiziološke i nefiziološke vrijednosti) izražaj konformiranih MHC-I molekula pada, dok izražaj nekonformiranih raste. Različite konformacije MHC-I molekula u ustaljenom stanju samo djelomično se kolokaliziraju unutar stanice i to prvenstveno u ranim endosomalnim odjeljcima. Niti jedan od ispitivanih kemijskih inhibitora (klorpromazin, *Dynasore*, filipin i AlF_4^-) nije blokirao internalizaciju MHC-I molekula. Nekonformirane MHC-I molekule se znatno brže internaliziraju i degradiraju od konformiranih MHC-I molekula što je najvjerojatnije posljedica činjenice da se konformirane MHC-I molekule usmjeravaju u reciklirajuće odjeljke, a nekonformirane MHC-I molekule u degradacijski put. Tome u prilog govori rezultat da se konformirane MHC-I molekule nakon internalizacije nalaze prvenstveno u jukstanuklearnom području zajedno s Tf/TfR i Rab11 GTPazom, dobro poznatim biljezima jukstanuklearnih reciklirajućih endosoma. Internalizirane konformirane MHC-I recikliraju s učinkovitošću od oko 30%, znatno manje od TfR/Tf koji recikliraju s učinkovitošću od 85-99%, što ukazuje da konformirane MHC-I molekule ulaze u zasebne reciklirajuće odjeljke. Ubrzo nakon internalizacije konformirane i nekonformirane MHC-I se kolokaliziraju s biljegom ranih endosoma (EEA-1), kao i međusobno, ali nedugo zatim stupanj kolokalizacije se smanjuje što znači da se razmjerno brzo razdvajaju. To razdvajanje blokira LY294002 (blokator PI3K), kao i konkanamicin A (blokator endosomalne H^+ crpke). Djelovanjem Tx-ispiru se konformirane MHC-I molekula i TfR sa staničnih membrana, dok se nekonformirane MHC-I molekule i GM_1 ne ispiru. Matematičkim modeliranjem potvrđeni su eksperimentalni rezultati, te izračunati slijedeći parametri: stopa endocitoze, stopa recikliranja i stopa degradacije.

Zaključak: Konformirane MHC-I molekule kao i TfR nalaze se u detergent-osjetljivim membranskim mikrodomenama za razliku od nekonformiranih MHC-I molekula i GM_1, kako na staničnoj površini tako i u unutrašnjosti stanice. Internalizacija MHC-I molekula nije ovisna o klatrinu i dinaminu, već najvjerojatnije o funkciji malih GTPaza (Cdc42 i Arf6). Sortiranje, odnosno odvajanje endosomalnih putova konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula odvija se na razini ranih endosoma i ovisno je o pH. Nakon sortiranja konformirane MHC-I molekule se prvenstveno usmjeravaju u recikliranje, a nekonformirane u degradaciju.

Ključne riječi: Endosomalno recikliranje; Internalizacija, endocitoza; Lipidne splavi; Matematičko modeliranje; MHC molekule I razreda; Sortiranje proteina; Vezikularni transport.

SUMMARY

Objectives: The aim of this study was to characterize constitutive internalization of conformed and non-conformed MHC class I molecules, with respect to their endocytosis, recycling and degradation. Conformational difference is known to segregate MHC-I molecules in secretory pathway. Therefore, we investigated endocytic pathway and putative segregation principles of these molecules during endocytic trafficking. Additionally, based on experimental measurements our goal was to establish a mathematical model for kinetics analysis of endosomal transport.

Material and methods: Experiments were performed on murine fibroblasts J26 transfected with HLA-B7 (J26-B7), HLA-Cw6 (J26-Cw6) or HLA-G1 molecules (J26-G1), on human HeLa cell line that constitutively expresses all classical HLA class I molecules, Balb 3T3 murine fibroblasts, and murine L cells stably transfected with Ld molecules (L-L^d). In order to follow MHC class I molecules, we used the following monoclonal antibodies (mAb): mAb W6/32 for all classical conformed HLA-I molecules and for conformed HLA-G1 molecules, mAb HC-10 for all classical non-conformed HLA-I molecules, mAb MEM-G/1 for non-conformed HLA-G1 molecules, mAb 30-5-7 for conformed H2-L^d molecules, and mAb 64-3-7 for non-conformed H2-L^d molecules. Transferrin receptor (TfR) was followed by mAb R17, and GM_1 molecules with labeled cholera toxin B subunits. Non-ionic detergent Triton X-100 was used for testing the presence of molecules in lipid rafts. Conditions of endosomal pH were simulated outside the cell and the conformation changes of MHC-I molecules were under given conditions. In order to determine which pathways are involved in endocytosis, endosomal trafficking, recycling and degradation of these molecules, we used different chemical inhibitors. The kinetics of surface molecules was followed by flow citometry and their intracellular trafficking by confocal microscopy after binding of appropriate mAbs. Internalized molecules were colocalized with each other as well as with specific endosomal markers. After rearranging three different protocols from the literature we followed molecules recycling by flow citometry and confocal microscopy. In order to monitor the kinetics of degradation, we used the method of surface biotinilation and imunoprecipitation, electrophoresis on polyacrylamide gels (SDS-PAGE), Western-blot and chemiluminiscence. For mathematical modeling and simulation of endocytic processes we used a software package Mathematica (Wolfram Research Europe Ltd.).

Results: Conformed MHC-I molecules are well expressed on the cell surface, unlike non-conformed molecules. Expression of conformed MHC-I molecules decreases due to treatment with acid pH (physiological and non- physiological values), while expression of non-conformed MHC-I molecules increases. Different conformations of MHC-I molecules in steady state conditions are only partially colocalized intracellular, primarily in the early endosomal compartments. Neither of the tested chemical inhibitors (chlorpromazine, Dynasore, filipin and AlF_4^-) did not block internalization of MHC-I molecules. Kinetics of internalization, as well as degradation of non-conformed MHC-I molecules are significantly faster than kinetics of conformed MHC-I molecules, due to fact that conformed MHC-I molecules recycle, unlike non-conformed molecules. These thesis are supported also by the finding that conformed MHC-I molecules after internalization are directed primarily in juxtanuclear region where they colocalize with Tf/TfR, and with Rab11. Internalized conformed MHC-I molecules recycle with 30% efficiency, while TfR/Tf recycling efficiency is 85-99%. Shortly after internalization conformed and non-conformed MHC-I molecules colocalize with early endosomal marker EEA-1, as well as to each other, but soon thereafter the level of colocalization decreases. This separation is blocked due to the influence of LY294002 (inhibitor of PI3K) or concanamycin A (inhibitor of endosomal H^+ pump). Treatment with Tx-100 removes conformed MHC-I molecules and TfR from the cell membranes, while non-conformed MHC-I molecules and GM_1 are resistant to the Tx-100 treatment. Experimental results are confirmed by mathematical modeling, by which the following parameters are also calculated: the rate of endocytosis, the rate of recycling and the rate of degradation.

Conclusion: Conformed MHC-I molecules, as well as transferrin receptor are localized in detergent-sensitive membrane micro domains, while non-conformed MHC-I molecules and GM_1 are localized in detergent-resistant membrane micro domains, not only on the cell surface, but also intracellularly. Internalization of MHC-I molecules is clathrin- and dynamin-independent, but probably depends on the function of small GTPases (Cdc42 and Arf6). Sorting and separation of endosomal pathways of conformed and non-conformed MHC-I molecules occur at the level of early endosomes and is pH dependent. After sorting, conformed MHC-I molecules are primarily directed to recycling while non-conformed are directed to degradation.

Key words: Endosomal recycling; Internalization, endocytosis; Lipid rafts; Mathematical modeling; MHC class I molecules; Protein sorting; Vesicular transport.

SADRŽAJ

1. UVOD (PRIKAZ PODRUČJA) 1
1.1. Endocitoza 1
1.1.1. Klatrinska endocitoza 2
1.1.2. Endocitoza neovisna o klatrinu 3
1.1.2.1. Endocitoza neovisna o klatrinu, a ovisna o dinaminu 4
1.1.2.1.1. Kaveolarna endocitoza 5
1.1.2.1.2. Endocitoza regulirana RhoA GTPazom 7
1.1.2.2. Endocitoza neovisna o klatrinu i neovisna o dinaminu 9
1.1.2.2.1. Endocitoza regulirana Cdc42 GTPazom 9
1.1.2.2.2. Endocitoza regulirana Arf6 GTPazom 10
1.1.3. Inhibicija endocitoze 12
1.1.3.1. Farmakološki inhibitori endocitoze 12
1.1.3.1.1. Inhibitori klatrinske endocitoze 12
1.1.3.1.2. Inhibitori endocitoze neovisne o klatrinu 14
1.2. Vezikularni transport 17
1.2.1. Endosomalni odjeljci 19
1.2.1.1. Rani endosomi 19
1.2.1.2. Kasni endosomalni odjeljci i lizosomi 22
1.2.1.3. Specijalni endosomalni odjeljci 26
1.2.1.3.1. Kaveosomi 26
1.2.1.3.2. CLICs (prijenosnici neovisni o klatrinu) 27
1.2.1.3.3. GEEC (rani endocitozni odjeljak GPI-sidrenih proteina) 27
1.2.1.4. Endosomalni reciklirajući odjeljci i recikliranje 27
1.2.2. Membranske mikrodomene 29
1.2.2.1. Lipidne splavi 29
1.3. MHC molekule I razreda 30
1.3.1. Građa MHC molekula I razreda 31
1.3.2. Sinteza MHC molekula I razreda 32
1.3.2.1. Klasičan put sinteze MHC molekula I razreda 32
1.3.2.2. Alternativni put sinteze MHC molekula I razreda 33
1.3.3. Konformacije MHC molekula I razreda 35
1.3.4. Endocitoza MHC molekula I razreda 36

1.4. Matematičko modeliranje 37
1.4.1. Matematički model endocitoze 37
1.4.1.1. Kinetički model endocitoze 37
1.4.1.2. Mehanistički model endocitoze 38
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 39
3. MATERIJAL I METODE 40
3.1. Laboratorijske životinje 40
3.2. Materijal 40
3.2.1. Kemikalije 40
3.2.2. Mediji i puferi 42
3.2.3. Laboratorijsko posuđe 43
3.2.4. Monoklonska i poliklonska protutijela 44
3.2.4.1. Protutijela koja prepoznaju određene konformacije MHC molekula I razreda 44
3.2.4.2. Biljezi endocitoznih putova 45
3.2.4.3. Biljezi endocitoznih odjeljaka 45
3.2.4.4. Sekundarna poliklonska protutijela 46
3.2.5. Stanične linije 46
3.3. Metode 47
3.3.1. Priprema monoklonskih protutijela 47
3.3.1.1. Održavanje hibridoma 47
3.3.1.2. Priprema monoklonskih protutijela iz supernatanata kulture 47
3.3.1.3. Proizvodnja ascitesa 47
3.3.2. Uzgoj staničnih linija 47
3.3.2.1. Uzgoj atherentnih stanica 47
3.3.2.2. Uzgoj neatherentnih stanica 47
3.3.3. Ispitivanje izražaja MHC molekula I razreda na staničnoj površini i u unutrašnjosti stanice metodom indirektne imunofluorescencije 48
3.3.3.1. Određivanje površinskog izražaja MHC molekula I razreda protočnom citometrijom 48
3.3.3.2. Ispitivanje površinskog izražaja MHC molekula I razreda konfokalnom mikroskopijom 49

3.3.3.3. Određivanje omjera izražaja MHC molekula I razreda na staničnoj površini i u unutrašnjosti stanice protočnom citometrijom 49
3.3.4. Utvrđivanje obrasca izražaja MHC molekula I razreda i njihova kolokalizacija s markerima endosomalnih odjeljaka 50
3.3.5. Ispitivanje utjecaja sniženog pH na izražaj MHC molekula I razreda 50
3.3.5.1. Ispitivanje utjecaja sniženog pH na izražaj MHC molekula I razreda protočnom citometrijom 50
3.3.6. Praćenje endocitoze i endocitoznog puta ispitivanih molekula 50
3.3.6.1. Protočna citometrija 51
3.*3.6.1.1. Praćenje spontane internalizacije uslijed djelovanja cikloheksimida* 51
3.*3.6.1.2. Praćenje spontane internalizacije nakon površinskog vezivanja monoklonskog protutijela ili liganda* 51
3.3.6.2. Konfokalna mikroskopija 51
3.*3.6.2.1. Praćenje kontinuirane internalizacije* 51
3.*3.6.2.2. Praćenje pulse-chase internalizacije* 52
3.3.7. Imunoprecipitacija (praćenje degradacije molekula) 52
3.3.7.1. Biotinilacija površinskih proteina 52
3.3.7.2. Imunoprecipitacija monoklonskim protutijelima 52
3.3.7.3. Gel-elektroforeza 52
3.3.7.4. Elektroblot proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu 53
3.3.7.5. Kemiluminiscencija 53
3.3.8. Praćenje recikliranja molekula 53
3.3.8.1. Protokol recikliranja A 53
3.3.8.2. Protokol recikliranja B 54
3.3.8.3. Protokol recikliranja C 54
3.3.8.4. Modifikacija protokola recikliranja C 55
3.3.9. Ispitivanje smještaja molekula u membranskim mikrodomenama 56
3.3.9.1. Osnovna načela tretmana stanica s neionskim detergentima 56
3.3.9.2. Ispitivanje smještaja molekula u membranskim mikrodomenama na staničnoj površini 56

3.3.9.3. Ispitivanje smještaja molekula u membranskim mikrodomenama u cijeloj stanici 56
3.3.9.4. Ispitivanje smještaja molekula u membranskim mikrodomenama nakon tretmana s kemijskim inhibitorima 57
3.3.10. Umjetno stvaranje nekonformiranih MHC molekula I razreda na staničnoj površini 57
3.3.11. Matematičko modeliranje 57
3.3.12. Statistička obrada podataka 57
4. REZULTATI 58
4.1. Izražaj i stanična raspodjela MHC molekula I razreda 58
4.1.1. Površinski izražaj MHC molekula I razreda 58
4.1.2. Stanična raspodjela MHC molekula I razreda 60
4.1.2.1. Omjer raspodjele MHC molekula I razreda između stanične površine i unutrašnjosti stanice 60
4.1.2.2. Obrazac stanične raspodjele MHC molekula I razreda 61
4.1.2.3. Istodobno obilježavanje konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda 62
4.1.2.3.1. Istodobno obilježavanje konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula nakon narušavanja endosomalnog pH 63
4.1.2.4. Raspodjela konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula u unutarstaničnim odjeljcima 64
4.1.2.4.1. Raspodjela konformiranih i nekonformih MHC-I molekula u odnosu na Golgijev aparat 64
4.1.2.4.2. Raspodjela konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula u odnosu na endsomalne odjeljke u koje se internalizira transferinski receptor/transferin 65
4.1.2.4.3. Raspodjela konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula u odnosu na kasne endosomalne odjeljke 66
4.1.2.4.4. Raspodjela konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekule u odnosu na kasne endosome nakon poništavanja endosomalnog pH 67
4.1.2.4.5. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda s biljegom ranih endosoma 69

4.1.2.5. Promjena konformacije MHC molekula I razreda 69
4.2. Internalizacija MHC molekula I razreda 75
4.2.1. Kinetika spontane internalizacije MHC molekula I razreda 75
4.2.1.1. Kinetika spontane internalizacije MHC molekula I razreda uslijed djelovanja cikloheksimida 75
4.2.1.2. Kinetika internalizacije MHC molekula I razreda nakon površinskog vezivanja monoklonskog protutijela 76
4.2.1.3. Usporedba kinetike internalizacije MHC molekula I razreda s kinetikom internalizacije B podjedinice toksina kolere 78
4.2.2. Utjecaj različitih inhibitora na internalizaciju MHC molekula I razreda 79
4.2.2.1. Utjecaj inhibitora klatrinske endocitoze na internalizaciju MHC molekula I razreda 79
4.2.2.2. Utjecaj inhibitora kaveolarne endocitoze na internalizaciju MHC molekula I razreda 82
4.2.2.3. Utjecaj AlF_4^- na internalizaciju MHC molekula I razreda 86
4.3. Vezikularni transport MHC molekula I razreda 88
4.3.1. Obrazac unutarstanične raspodjele internaliziranih konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda 88
4.3.2. Usporedba unutarstaničnog putovanja MHC molekula I razreda i transferina/transferinskog receptora 90
4.3.3. Uloga kasnih endosomalnih odjeljaka tijekom unutarstaničnog putovanja MHC molekula I razreda 92
4.3.4. Usporedna internalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda 94
4.3.5. Uloga ranih (sortirajućih) endosoma u unutarstaničnom putovanju konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda 95
4.3.6. Utjecaj pH ranih endosoma na endosomalno sortiranje 98
4.3.7. Uloga jukstanuklearnog reciklirajućeg endosomalnog odjeljka u unutarstaničnom putovanju konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda 100
4.3.8. Uloga klatrina i Arf6 GTPaze u unutarstaničnom putovanju konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda (tretman s klorpromazinom, *Dynasore-om* i AlF_4^-) 102
4.3.9. Unutarstanično putovanje B podjedinice toksina kolere 105

4.4. Recikliranje MHC molekula I razreda 107
4.4.1. Recikliranje transferina i transferinskog receptora 107
4.4.2. Recikliranje konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda 110
4.4.2.1. Unutarstanično putovanje recikliranih MHC molekula I razreda 115
4.4.3. Učinak kemijskih inhibitora koji narušavaju endosomalni transport na recikliranje MHC molekula I razreda i transferina 118
4.4.3.1. Utjecaj LY, BFA i AlF_4^- na recikliranje MHC molekula I razreda i transferina nakon internalizacije u prisustvu LY 120
4.4.3.2. Utjecaj LY, BFA i AlF_4^- na recikliranje MHC molekula I razreda i transferina nakon internalizacije u prisustvu BFA 122
4.4.3.3. Utjecaj LY, BFA i AlF_4^- na recikliranje MHC molekula I razreda i transferina nakon internalizacije u prisustvu AlF_4^- 123
4.4.4. Recikliranje B podjedinice toksina kolere 125
4.5. Degradacija MHC molekula I razreda 127
4.5.1. Kinetika degradacije konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda 127
4.5.1.1. Učinak lizosomotropnih tvari na degradaciju MHC molekula I razreda 128
4.5.2. Degradacija B podjedinice toksina kolere 133
4.6. Smještaj konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda u membranske mikrodomene 135
4.7. Matematički model endocitoze MHC molekula I razreda 140
4.7.1. Osnovne pretpostavke matematičkog modela endocitoze MHC molekula I razreda 140
4.7.2. Procjena parametara u matematičkom modelu endocitoze MHC molekula I razreda 143
4.7.3. Primjena matematičkog modela endocitoze u kinetičkim studijama konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda 145
5. RASPRAVA 149
5.1. Izražaj MHC molekula I razreda 149
5.2. Internalizacija MHC molekula I razreda 151
5.3. Vezikularni transport i sortiranje MHC molekula I razreda unutar endocitoznog puta 157

5.4. Recikliranje MHC molekula I razreda 162
5.5. Degradacija MHC molekula I razreda 169
5.6. Smještaj konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda u membranskim mikrodomenama 171
5.7. Doprinos matematičkog modeliranja u kinetičkim studijama endocitotičkih procesa MHC molekula I razreda 173
6. ZAKLJUČCI 176
7. LITERATURA 178
Popis skraćenica 196
Životopis 198

1. UVOD (PRIKAZ PODRUČJA)

1.1. ENDOCITOZA

Endocitoza je bazični stanični proces putem kojeg stanice internaliziraju površinske proteine zajedno s vanstaničnim materijalom i staničnom membranom, a koji potom putuju niz različite vezikularne odjeljke do svog konačnog odredišta unutar stanice (1, 2). Endocitoza ima važnu ulogu u proliferaciji, staničnom preživljavanju, neurotransmisiji, embriogenezi, kao i određivanju stanične sudbine. U osnovi se može podijeliti na fagocitozu i makropinocitozu, procese koji su uglavnom ovisni o remodeliranju aktinskog citoskeleta i kojim se internaliziraju velike čestice, te na mikropinocitozu tj. endocitozu u užem smislu riječi. Mikropinocitoza se nadalje može podijeliti na nekoliko različitih načina, no u posljednje vrijeme najviše se koristi podjela s obzirom na proteine koji su potrebni za odvijanje pojedinog endocitoznog puta: na endocitozu ovisnu o klatrinu (klatrinska endocitoza) i na endocitozu neovisnu o klatrinu (3) (slika 1).

Slika 1. Podjela endocitoze

Slika 1. Podjela endocitoze.

Endocitoza se može podijeliti na fagocitozu, makropinocitozu, te mikropinocitozu (endocitozu u užem smislu riječi). Mikropinocitoza se nadalje dijeli s obzirom na proteine koji su potrebni za odvijanje pojedinog endocitoznog puta (prilagođeno prema referenci 3).

1.1.1. Klatrinska endocitoza

Klatrinska endocitoza (endocitoza ovisna o klatrinu) je brz i do sada najbolje razjašnjen mehanizam internalizacije proteina. Za razliku od ostalih endocitoznih putova, sortiranje molekula u klatrinski endocitozni put je dobro istraženo. Proces klatrinske endocitoze započinje prepoznavanjem signalnog motiva na citoplazmatskom dijelu membranskog receptora od strane adapterskih proteina (AP). Od signalnih motiva najbolje su poznati: tirozinski motiv (YXΨΦ) kojeg prepoznaje podjedinica μ2 adapterskog proteina AP2; dileucinski motiv kojeg također prepoznaje podjedinica μ2 adapterskog proteina AP2; te LDL receptorska obitelj (FxNPxY) koju prepoznaje adapterski protein Dab2 (engl. *Disabled-2*), ali i AP2 (4, 5).

Nakon vezivanja na transmembranski receptor, adapterski kompleks (AP-kompleks) vezuje klatrin, protein koji se nalazi u citoplazmi u obliku heteroheksamera sastavljenog od tri teška i tri laka lanca koji formiraju tronožnu strukturu- triskelion (4), i započinje stvaranje klatrinske jamice (CCP; engl. *clathrin coated pit*). Na klatrin se privremeno vežu i pomoćni proteini (epsin 15, epsin, intersektin) koji mu pomažu u sklapanju i stvaranju mjehurića (6). Klatrinski mjehurići odcjepljuju se od plazmatske membrane djelovanjem proteina dinamina I (4), GTPaze koja se oligomerizira u prstene oko vrata invaginirajuće obložene jamice. Hidroliza GTPa steže prsten i dovodi do odcjepljenja od membrane i stvaranja slobodnoga mjehurića (CCV; engl. c*lathrin coated vesicle)* (7, 8, 9). U ovom procesu sudjeluje i nekoliko pomoćnih proteina (amfifizini, sinaptojanin, sindapin, endofilin) (6, 10). Vrlo brzo nakon što se stvori CCV, dolazi do rasklapanja klatrinskog omotača, a za taj proces zadužena su barem tri proteina: sinaptojanin 1 je fosfataza koja razgrađuje PI(4,5)-bisfosfat (PI – fosfatidil inozitol) koji je ključan za sklapanje klatrinskog omotača posredovanog kompleksima AP180 i AP2, a auksilini 1 i 2 dovode molekulski šaperon Hsp70 i stimuliraju djelovanje njegove ATPaze, što dovodi do depolimerizacije klatrina (6) (slika 2).

Najbolje istražene molekule koje se endocitiraju klatrinskom endocitozom su transferinski receptor/transferin (TfR/Tf) (8), receptor za lipoproteine male gustoće (LDLR; engl. *low density lipoprotein receptor*) i receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR; engl. *epidermal growth factor receptor*), te se najčešće upravo one koriste kao markeri klatrinske endocitoze.

Slika 2. Mehanizam odvijanja klatrinske endocitoze

Slika 2. Mehanizam odvijanja klatrinske endocitoze.
CCV se sastoji od tri paralelna sloja. Unutarnji sloj čine proteini koji će se internalizirati, srednji sloj čine adapterski proteini, a vanjski sloj klatrin (9) (a). Klatrin se preko AP2 kompleksa veže na citoplazmatski dio receptora te dolazi do stvaranja klatrinske jamice. Djelovanjem dinamina I i amfifizina dolazi do odcjepljivanja vezikule obložene klatrinom koja ubrzo nakon internalizacije gubi klatrinski omotač (10) (b).

1.1.2. Endocitoza neovisna o klatrinu

Endocitoza neovisna o klatrinu se jasno može podijeliti na onu koja zahtijeva odcijepanje vezikula posredstvom dinamina (endocitoza neovisna o klatrinu i ovisna o dinaminu) i onu koja zahtijeva neke druge procese (endocitoza neovisna o klatrinu i neovisna o dinaminu). Druga značajka na temelju koje se može vršiti podjela endocitoznih putova neovisnih o klatrinu je sudjelovanje malih GTPaza u odvijanju pojedinih endocitoznih putova neovisnih o klatrinu. No, ta terminologija ne upućuje na izravnu umiješanost određene GTPaze u određeni endocitozni mehanizam. Naime ovi proteini, osim na endocitozu utječu i na mnoge druge stanične procese (3). Stoga još uvijek ostaje otvoreno pitanje definiranja molekula koje su izravno uključene u odvijanje pojedinog endocitoznog puta neovisnog o klatrinu.

Za razliku od klatrinske endocitoze, sortirajući signali za endocitozu neovisnu o klatrinu do sada nisu dovoljno istraženi, tj. do sada nisu poznati adapterski proteini koji bi mogli sudjelovati u tom procesu (3). Jedan od predloženih mehanizama sortiranja je položaj same molekule koja se endocitira u određenim mikrodomenama stanične membrane (11). Tako je pretpostavljeno da se molekule koje su smještene u dobro organiziranim staničnim mikrodomenama (lipidnim splavima) endocitiraju neovisno o klatrinu (12, 13). No, ta teorija nije u potpunosti točna jer postoje molekule koje se nalaze u lipidnim splavima, a endocitiraju se klatrinskom endocitozom. Tako da se danas u obzir uzimaju tri teorije sortiranja molekula u endocitozni put neovisan o klatrinu (3):

1. *Sortiranje na proteinskoj osnovi*

U posljednje vrijeme je predloženo da ubikvitinacija molekula putem ubikvitin ligaza ima ulogu u usmjeravanju molekula u endocitozu neovisnu o klatrinu. Tako je na primjer poznato, da se receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR) endocitira klatrinskom endocitozom, no u slučaju da ga ima u suvišku dolazi do njegove ubikvitinacije te se on premješta u lipidne splavi i endocitira putem koji je neovisan o klatrinu (12). Također je moguće da postoje i signalne sekvence na citoplazmatskom dijelu molekule koja se endocitira, a koje su bitne za usmjeravanje u endocitozni put neovisan o klatrinu (npr. uklanjanje citoplazmatskog dijela γc-citokinskog receptora preusmjerava taj receptor u klatrinsku endocitozu), no te sekvence još uvijek nisu poznate (14, 15).

2. *Sortiranje na lipidnoj osnovi*

U slučaju nedostatka adapterskih proteina, kao i u slučaju nedostatka citoplazmatskog repa membranskih proteina mora postojati neki drugi mehanizam uključen u sortiranje molekula u različite endocitozne putove. Jedna od predloženih teorija je ta da se sortiranje vrši po principu smještaja same molekule u određenu lipidnu nanodomenu stanične membrane (16, 17). Tako na primjer, ovisno o smještaju GM_1 molekule (koja je receptor za kolera toksin) u različite nanodomene stanične membrane, kolera toksin može biti endocitiran klatrinskom, kaveolarnom i CDC42 ovisnom endocitozom (18, 19).

3. *Sortiranje na proteinsko-lipidnoj osnovi*

Postoji mogućnost da određeni integralni membranski proteini, poput kaveolina, sudjeluju kao karika koja povezuje mehanizme sortiranja koji se temelje na lipidnoj osnovi (tj. na položaju molekula u određene mikrodomene stanične membrane) sa specifičnom citoplazmatskom mašinerijom za internalizaciju. Takav slučaj imamo kod endocitoze glikosfingolipida (GSLs) koji se primarno internaliziraju kaveolarnom endocitozom. No ukoliko im promijenimo stereokemičnu strukturu, dolazi do promjene položaja u membranskim mikrodomenama, te se takvi GSPs analozi internaliziraju nekaveolarnim mehanizmima (20, 21).

1.1.2.1. Endocitoza neovisna o klatrinu, a ovisna o dinaminu

Endocitoza neovisna o klatrinu a ovisna o dinaminu obuhvaća dvije vrste endocitoze: kaveolarnu endocitozu i endocitozu reguliranu s RhoA GTPazom (22, 23).

1.1.2.1.1. Kaveolarna endocitoza

Kaveolarna endocitoza je vjerojatno najbolje opisani endocitozni put neovisan o klatrinu. Sam naziv kaveolarna endocitoza potječe od proteina kaveolina, dimernog palmitiliranog proteina koji vezuje kolesterol, poput ukosnice se umeće u unutrašnji sloj plazmatske membrane (PM) i međusobno povezuje stvarajući prugast kaveolinski omotač na površini membranskih invaginacija (24), nužan za odvijanje kaveolarne endocitoze. Kaveolinu se pridaju mnoge uloge: obložnog proteina, regulatora signalnih proteina, vezivanja kolesterola, te proteina koji ima ulogu u prijenosu kolesterola (25, 26, 27). Osim na PM, kaveolin se nalazi i na *trans*-Golgijevom aparatu (TGN; engl. *trans-Golgi network* – *trans*-Golgijeva mreža), te u kaveosomima (vrsta endocitoznih odjeljaka) (26). Nakon uklanjanja kolesterola s PM, kaveole nestaju, a kaveolin se premješta u unutarstanične strukture, i to: endosome, Golgijev aparat (GA) i endoplazmatsku mrežicu (ER; engl. *endoplasmic reticulum*) (26).

Razlikuju se tri vrste kaveolina (28). Kaveolin-1 (kav-1) (29) je najčešći i ispoljen je u velikoj većini stanica, te je bez njega onemogućeno odvijanje kaveolarne endocitoze. Kaveolin-2 je, isto tako, široko rasprostranjen, ali manje obilan nego kaveolin-1 i nije neophodan za odvijanje kaveolarne endocitoze. Kaveolin-3 je dominantna vrsta kaveolina u mišićnim stanicama, no njegova rasprostranjenost po tkivima je ograničena (28). Začuđujuće, nedavna istraživanja ukazuju da kaveolin može negativno djelovati na kaveolarnu endocitozu (25, 26). Kaveolin je odgovoran za oblik i strukturalnu organizaciju membranskih invaginacija-kaveola (slika 3). Kaveole su plosnata uvrnuća stanične membrane veličine 50-80 nm koje su obilježene prisutnošću proteina kaveolina i karakteristično, kao što je već navedeno imaju prugastu teksturu. Pokazano je da su bogate sfingolipidima, kolesterolom, signalnim proteinima i glikozil fosfatidilinozitol sidrenim proteinima (GPI-AP; engl. *glycosylphosphatidylinositol-anchored protein*), te zbog tih obilježja pripadaju podvrsti lipidnih splavi. Kaveole ne nastaju u stanicama iz kojih je uklonjen kolesterol, što upućuje na činjenicu da je sterol neophodan za održanje integriteta ovog prugastog omotača (30), te se pretpostavlja da daje oblik vezikuli i privlači receptore koji koriste ovu jamicu kao mjesto ulaska u endocitozni put. Osim u procesu endocitoze i vezikularnom prijenosu (31), kaveole imaju ulogu u brojnim procesima koji se događaju u stanici. Tako još sudjeluju u transcitozi, potocitozi i staničnom signaliranju (32).

Dokazano je da u odcjepljivanju kaveolarnih mjehurića glavnu ulogu ima dinamin I, ista molekula koja sudjeluje i u klatrinskoj endocitozi. Izgleda da je u njima prisutan dok su

pričvršćene za plazmatsku membranu, ali čim se kaveolarna vezikula oslobodi i on se otpušta (33).

Iako još nije poznato koji je točan signal za internalizaciju molekula kaveolarnim putem, zamijećeno je da se u kaveolama pojavljuju proteini koji su vezani za membranu preko GPI sidra nakon što se unakrsno povežu poliklonskim protutijelima (34, 35). Unakrsno povezivanje takvih proteina, koji su inače difuzno raspoređeni, izaziva njihovo pokretanje i dopremanje u kaveole, odakle dalje mogu međudjelovati sa signalnim proteinima (35, 36).

Slika 3. Struktura kaveole i kaveolina

Slika 3. Struktura kaveole i kaveolina.

Struktura i izgled kaveole. Dio stanične membrane koji sudjeluje u stvaranju kaveole bogat je kolesterolom i sfingolipidima (a). *Pretpostavljena membranska topologija kav-1*. Radi jednostavnosti kav-1 je prikazan kao dimer, ali u biti 14-16 monomera se udružuje čineći jedan kaveolinski homo-oligomer. Obje terminalne domene (amino i karboksilna) su orijentirane prema citosolnoj strani stanične membrane s poput ukosnice umetnutom strukturom u membranski dvosloj (b). *Domene prisutne u kav-1*. Amino-terminalna za membranu pričvršćena domena se još naziva i kaveolin građevna domena (CSD; engl. *caveolin scaffolding domain*) (c) (36).

Aktivacija aktinskog citoskeleta ima nezamjenjivu ulogu tijekom odvijanja kaveolarne endocitoze (37). Pokazano je da je stopa kaveolarne endocitoze ovisna o ravnoteži kaveolina-

1 i lipida u splavima (kolesterol i glikosfingolipidi) – prekomjeran izražaj kaveolina-1 smanjuje stopu kaveolarne endocitoze, dok povećanje izražaja splavnih lipida ubrzava stopu endocitoze (31, 38).

Kaveolarnom endocitozom u stanicu ulazi toksin kolere, albumin, alkalna fosfataza, folna kiselina, laktozilceramid, majmunski virus 40 (SV40, engl. *simian virus 40*), GPI-GFP (zeleni fluorescentni protein konjugiran GPI sidrom) nakon unakrsnog vezivanja i druge molekule. Kolera toksin (Ctx) je ipak jedna od najbolje istraženih molekula koja u stanicu ulazi mehanizmom kaveolarne endocitoze. Međutim, važno je napomenuti da velik broj ovih molekula u stanicu može ući i ostalim endocitoznim mehanizmima, uključujući i klatrinsku endocitozu (npr. kolera toksin, albumin, folna kiselina...) (26, 39, 40, 41) što vjerojatno ovisi o vrsti ispitivane stanične linije, atherenciji stanica (npr. CtxB), intenzitetu agregacije površinskih molekula (npr. GPI-AP).

1.1.2.1.2. Endocitoza regulirana RhoA GTPazom

Drugi endocitozni put neovisan o klatrinu a ovisan o dinaminu je endocitozni put reguliran RhoA GTPazom. Rho GTPaze pripadaju porodici malih GTPaza koje imaju važnu ulogu kako u endocitozi tako i u endosomalnom putovanju, a u ovu porodicu ubrajaju se još i Ras, Ran, Rad, Rab i Arf GTPaze (42, 43).

Postoji 15 različitih Rho GTPaza koje imaju različite uloge. Tako je poznato da RhoD GTPaza ima važnu ulogu u prijenosu kroz rane endosomalne odjeljke (42), RhoB GTPaza je strukturalno i funkcionalno povezana s kasnim endosomima (43). RhoA GTPaza nalazi se u citoplazmi, a nakon aktivacije premješta se na plazmatsku membranu, te ima ulogu u odvijanju samoga procesa endocitoze (44). Za neometanu funkciju svih Rho GTPaza, pa tako i RhoA GTPaze, potrebno je da izmjena Rho GDP i Rho GTP oblika bude prostorno i vremenski usklađena (45) (slika 4). Točna uloga i mehanizam djelovanja RhoA GTPaze u procesu endocitoze nisu dovoljno istraženi. Poznato je samo da ima važnu ulogu u remoduliranju aktinskog citoskeleta (44, 45), pa se pretpostavlja da sudjeluje u regrutiranju aktinske mašinerije kako bi se regulirao ovaj, o njoj ovisan, endocitozni put. Učinci RhoA GTPaze su posredovani putem brojnih nishodnih izvršnih molekula kojima pripada i p160ROCK (proteinska serin/treonin Rho-udružena kinaza), molekula koja pojačava fosforilaciju miozinskog lakog lanca i aktivira aktomiozin ATPazu. Poslijedična kontrakcija aktomiozinske mreže uzrokuje remodulaciju aktina tj. slaganje aktina u stresna vlakana (engl. *stress fibers*) što dovodi do grupiranja integrina i formacije fokalnih adhezija. Upravo kroz

remodulaciju aktinskog citoskeleta objašnjava se činjenica da aktivnost RhoA GTPaze može posljedično imati utjecaja i na ostale vrste endocitoze, uključujući i klatrinsku endocitozu. Naime, poznato je da aktivacija RhoA GTPaze inhibira internalizaciju transferina (44), što se objašnjava činjenicom da je normalan integritet aktinskog citoskeleta važan za otkidanje klatrinske vezikule s plazmatske membrane. Stoga blaga depolimerizacija aktinskog citoskeleta ubrzava, dok jaka depolimerizacija usporava klatrinsku endocitozu (46). Ipak neki podaci govore u prilog teoriji da aktinski citoskelet nije važan za odvijanje klatrinske endocitoze (44). Nadalje, inhibicija klatrinske endocitoze aktivacijom RhoA GTPaze može ubrzati tj. stimulirati endocitozu koja je neovisna o klatrinu (47). Mnogi bakterijski toksini (*Clostridium difficile* toksini A i B, *Clostridium botulinum* C3 ADP-ribosiltransferaze, *Staphylococcus aureus* transferaza, *Bordetella* spp. DNTs, itd.) ostvaruju svoju toksičnost upravo putem modulacije aktinskog citoskeleta putem inaktivacije ili aktivacije Rho GTPaza (48).

Slika 4. Ciklus Rho GTPaza

Slika 4. Ciklus Rho GTPaza.

Rho GTPaze kruže između aktivne (GTP-vezane) i inaktivne (GDP-vezane) konformacije. Taj ciklus između aktivne i inaktivne forme nadziru tri vrste proteina: 60 gvanin nukleotid izmjenjivačkih faktora (GEFs; engl. *guanine nucleotide exchange factors*) koji kataliziraju izmjenu nukleotida i posreduju aktivaciju; više od 70 GTPaza-aktivirajućih proteina (GAPS; engl. *GTPase-activating proteins*) koji stimuliraju hidrolizu GTPa i uzrokuju njenu inaktivaciju, te 4 gvanin nukleotid disocijacijski inhibitor (GDIs; engl. *guanine nucleotide dissociation inhibitors*) koji izdvajaju inaktivne Rho GTPaze iz stanične membrane. U aktivnom stanju Rho GTPaze reagiraju s više od 60 efektorskih proteina (45).

Endocitozni put ovisan o RhoA GTPazi otkriven je istraživanjem endocitoze β podjedinice IL-2 receptora (IL-2Rβ) (49). Naime, pokazano je da na endocitozu za IL-2Rβ ne utječu mnogi faktori bitni za odvijanje klatrinske endocitoze. No istodobno, dominantno negativna mutanta na dinamin i dominantno negativna mutanta na RhoA GTPazu, jednako kao i narušavanje integriteta lipidnih splavi snažno inhibiraju endocitozu IL-2Rβ (49).

Uz IL-2Rβ, RhoA ovisnim putem u stanicu mogu ući i IgE receptor, γc-citokinski receptor, albumin na nekim staničnim linijama i neke druge molekule.

1.1.2.2. Endocitoza neovisna o klatrinu i neovisna o dinaminu

O endocitoznom putu koji je neovisan o klatrinu i dinaminu se najmanje zna. Često se naziva i masivna endocitoza (engl. *bulk endocytosis*) jer podrazumijeva nasumično uvlačenje staničnih membrana a s njima i membranskih komponenti. Najveći dio ovog endocitoznog puta regulira GTPaza Cdc42 a manji dio GTPaza Arf6 (3). Stoga se i on može podijeliti na put ovisan o Cdc42 i put ovisan o Arf6 GTPazi.

1.1.2.2.1. Endocitoza regulirana Cdc42 GTPazom

Cdc42 GTPaza pripada porodici Rho GTPaza, te je stoga slično RhoA GTPazi uključena u remodulaciju aktinskog citoskeleta. No, za razliku od nje ne sudjeluje u stvaranju stresnih filamenata već u formiranju tankih površinskih izbočina koje su bogate aktinom, a nazivaju se filopodije (50). Točna uloga Cdc42 GTPaze u procesu endocitoze nije poznata, pa se smatra da slično RhoA GTPazi na endocitozu utječe prvenstveno preko mobilizacije aktina (51). Cdc42 se u citoplazmi nalazi u inaktivnom obliku vezana za Rho-udruženi gvanin nukleotid disocijacijski inhibitor (RhoGDI; engl. *Rho GDP dissociation inhibitor*). Nakon aktivacije Cdc42 otpušta RhoGDI i veže se za neutralni Wiskott-Aldrich sindrom protein (N-WASP) koji ima autoinhibicijsku aktivnost i na taj način ga aktivira. Tada je omogućeno vezivanje kompleksa Cdc42/N-WASP za protein udružen s aktinom 2/3 (engl. *actin related protein, Arp 2/3*) te je time omogućen proces polimerizacije aktina i stvaranje filopodija.

Aktivacija Cdc42 GTPaze, poput aktivacije RhoA GTPaze, ovisna je o kolesterolu, pa bi tvari koje mijenjaju koncentraciju kolesterola u plazmatskoj membrani mogle imati utjecaja na ovaj endocitozni put (51). Nadalje, neka istraživanja su pokazala da aktivacija same Cdc42 GTPaze može ovisiti i o kaveolinu-1, proteinu za koji se do nedavno smatralo da ima ulogu isključivo u odvijanju kaveolarne endocitoze. Naime, kaveolin-1 posjeduje aminokiselinsku sekvencu koja je slična RhoGDI-u te se preko nje može vezati na inaktivan Cdc42 (Cdc42 vezan s gvanozin difosfatom) i na taj način spriječiti njegovu aktivaciju (52). Arf1 GTPaza također sudjeluje u aktivaciji Cdc42 što za posljedicu ima mobilizaciju aktinskih niti i formiranje GEEC (engl. *GPI APs Enriched Endosomal Compartment*) vezikula (51).

Pokazano je da endocitoza GPI-AP, dekstran, E-cadherin (53), toksin Helicobacter pylori (VacA) (54), B podjedinicu kolera toksina (CtxB; engl. *cholera toxin B subunit*) (39, 40, 55),

aerolizin, ricin (55) i nekih drugih molekula ovisi o aktivnosti Cdc42 GTPaze. Pritom je važno naglasiti da je za nabrojene molekule pokazano da mogu biti endocitirane i ostalim endocitoznim putovima.

1.1.2.2.2. Endocitoza regulirana Arf6 GTPazom

Endocitoza ovisna o Arf6 GTPazi predstavlja manji segment *bulk endocitoze* tj. endocitoze koja je neovisna i o klatrinu i o dinaminu. Prema nekim autorima endocitoza ovisna o ove dvije GTPaze (Arf6 i Cdc42) bi čak mogla predstavljati isti endocitozni put u kojemu bi Cdc42 GTPaza imala ulogu u stvaranju specifičnih endosomalnih transportera (*CLICs*, vidi kasnije) dok bi Arf6 GTPaza imala ulogu u putovanju membrana, te u procesu recikliranja (51).

Poput RhoA i Cdc42 GTPaza, i za Arf6 GTPazu nije poznat precizan mehanizam putem kojeg sudjeluje u samom procesu endocitoze. Ipak, poznato je da preko aktivacije Rac1, a i aktivacije fosfatidilinozitol 4-fosfat-5-kinaze (PIP5K) ima važnu ulogu u remoduliranju aktinskog citoskeleta (56). Nadalje, PIP5K kao i fosfolipaza D (PLD) aktivirani putem Arf6 GTPaze imaju važnu ulogu u unutarstaničnim endocitoznim procesima (stvaranje vezikula, fuzija i fisija vezikula, te posljedično recikliranje molekula) (56, 57) (slika 5).

Slika 5. Učinak Arf6 GTPaze na endocitozni put i recikliranje

Slika 5. Učinak Arf6 GTPaze na endocitozni put i recikliranje.

Arf6 GTPaza aktivira Rac1, te PLD i PIP5K. Posljedično dolazi do remoduliranja aktinskog citoskeleta i regulacije vezikularnog prijenosa (detaljnije objašnjenje nalazi se u tekstu) (prilagođeno prema referenci 56) .

Važno je objasniti značaj aktivacije PLD, enzima čiji izravni (fosfatidna kiselina; PA) i neizravni (diacil glicerol; DAG) produkti bitno utječu na biofizička svojstva membrane u

smislu nastanka zakrivljenja, što snažno utječe na sve endocitozne procese, posebice recikliranje.

Nakon što se jednom stvori $Arf6^+$ vezikula, ona se vrlo brzo nakon internalizacije može ponovno spojiti sa staničnom membranom, te na taj način omogućiti recikliranje endocitiranih molekula (slika 6). Općenito se smatra da Arf6 GTPaza ima značajniju ulogu u procesu recikliranja nego u samom procesu endocitoze tj. da prvenstveno utječe na sam internalizacijski put molekula. Nadalje, poznato je da može utjecati i na proces odvijanja klatrinske endocitoze (56), no treba napomenuti da joj uloga može ovisiti i o vrsti stanica koje ispitujemo.

Arf6 GTPaza ima ulogu u endocitoznom putu E-kadherina, β1 integrina, podjedinice α receptora za IL-2 (IL-2Rα), GPI-AP, te endocitozi MHC molekula I razreda (56, 57, 58, 59).

Slika 6. Uloga Arf6 i Arf1 GTPaza u procesu endocitoze i endocitoznog puta

Slika 6. Uloga Arf6 i Arf1 GTPaza u procesu endocitoze i endocitoznog puta.

Arf6 GTPaza putem aktivacije PLD i PIP5K sudjeluje u remodulaciji aktina, te stimulira stvaranje membranskih nabora i na taj način omogućuje sam proces endocitoze. Nakon što se stvori $Arf6^+$ vezikula, ona se vrlo brzo ponovno spaja s plazmatskom membranom i na taj način je omogućeno brzo recikliranje tj. brz povratak na plazmatsku membranu endocitiranih molekula. Za razliku od Arf6 GTPaze, smatra se da Arf1 GTPaza ima dominantnu ulogu u egzocitozi (procesu važnom u transportu molekula iz endoplazmatskog retikuluma (ER) i Golgi aparata (GA) prema staničnoj površini tj. prema endosomima, odnosno u transportu iz endosoma prema GA) (58).

1.1.3. Inhibicija endocitoze

S obzirom da se podjela endocitoznih putova temelji na proteinima koji su potrebni za odvijanje pojedinog endocitoznog puta, tako se i inhibicija endocitoze temelji upravo na inhibiciji tj. blokiranju učinaka dotičnih proteina. Blokiranje učinka određenog proteina može se postići na nekoliko načina:

1. mutiranjem gena koji kodira dotični protein,
2. blokiranjem translacije mRNA za dotični protein (siRNA), te
3. farmakološkom inhibicijom učinka već sintetiziranog proteina.

1.1.3.1. Farmakološki inhibitori endocitoze

Danas je poznato nekoliko desetaka farmakoloških inhibitora endocitoze. Unatoč tome, niti jedan od poznatih inhibitora nije dovoljno specifičan, odnosno svaki od inhibitora uz to što blokira određeni endocitozni put može, direktno ili indirektno, utjecati i na odvijanje još jednog ili više drugih endocitoznih putova. Podjela farmakoloških inhibitora endocitoze temelji se na podjeli endocitoznog puta, te ćemo ovdje navesti neke od najznačajnijih inhibitora zajedno s njihovim neželjenim efektima.

1.1.3.1.1. Inhibitori klatrinske endocitoze

S obzirom da je klatrinska endocitoza najbolje istraženi endocitozni put, tako je upravo za klatrinsku endocitozu poznato najviše inhibitora, budući da je poznato najviše molekula koje sudjeluju u odvijanju tog puta. Ovdje ćemo navesti neke od najčešće upotrebljavanih farmakoloških inhibitora.

1. Hipertonična otopina sukroze

Hipertonična otopina sukroze (0,4-0,5 M) predstavlja vjerojatno jedan od najpopularnijih načina inhibicije klatrinske endocitoze. Pretpostavlja se da je osnova te inhibicije disperzija klatrinske rešetke na staničnoj membrani (60). Iako se smatra da je inhibicija internalizacije proteina izazvana primjenom hipertonične sukroze jak dokaz za endocitozu ovisnu o klatrinu, taj tretman može dovesti i do inhibicije endocitoznih putova koji nisu ovisni o klatrinu (61, 62, 63). Tako je opaženo da hipertonična sukroza dovodi i do bubrenja kaveola i nestajanja rezidentnih proteina iz njih (64), kao i do dramatičnih promjena u aktinskom citoskeletu (65).

Sve to može biti uzrok inhibicije kako kaveolarne, tako i ostalih endocitoznih putova neovisnih o klatrinu.

2. Deplecija kalija

Deplecija kalija (K^+) je još jedna klasična, ali korisna metoda za blokiranje klatrinske endocitoze (66, 67). Mehanizam joj se također temelji na uklanjanju klatrinskih rešetki sa stanične membrane (60), ali za razliku od hipertonične sukroze, deplecija K^+ je znatno specifičnija. Ipak, pokazano je da deplecija K^+ može također dovesti do narušavanja integriteta aktinskog citoskeleta i to putem blokiranja RhoA GTPaze (68). Stoga bi mogla predstavljati i alat za blokiranje endocitoznog puta neovisnog o klatrinu, a ovisnog o RhoA GTPazi.

3. Zakiseljavanje citosola

Zakiseljavanje citosola može se postići upotrebom amonij-klorida (NH_4Cl). Za razliku od deplecije K^+ i primjene hipertonične sukroze, taj postupak ne sprječava stvaranje klatrinske rešetke na staničnoj membrani, već sprječava odvajanje klatrinskih mjehurića sa stanične membrane (60). Ova metoda je puno nespecifičnija od prethodne dvije s obzirom da utječe kako na reorganizaciju aktinskog citoskeleta, tako i na daljnji endosomalni transport (69, 70).

4. Klorpromazin

Klorpromazin je kationska amfifilna tvar koja, kada se koristi u mikromolarnim koncentracijama (50-100 μM), blokira klatrinsku endocitozu različitih proteina (63, 66). Smatra se da klorpromazin dovodi do gubitka klatrina i AP2 adapterskog kompleksa sa stanične površine i do njihovog artificijalnog udruživanja unutar stanice (endosomalne membrane) (63). U literaturi za sada ne postoje podatci o mogućnosti blokiranja ostalih endocitoznih putova upotrebom klorpromazina. Jedini način na koji bi klorpromazin mogao interferirati s endocitoznim putovima neovisnim o klatrinu je putem inhibicije fosfolipaze C (PLC) koja je jedan od važnih regulatora dinamike aktina (71).

Još jedna kationska amfifilna tvar koja može poslužiti u svrhu blokiranja klatrinske endocitoze je imipramin koji ima isti mehanizam djelovanja kao i klorpromazin, s razlikom da ga stanice puno bolje podnose (72).

5. Monodanzilkadaverin (MDC)

Inhibicija klatrinske endocitoze putem MDC-a temelji se na stabilizaciji klatrinom obloženih jamica na staničnoj površini (73), no taj efekt se postiže samo u visokim koncentracijama koje stanice teško podnose te stoga treba biti oprezan prilikom njegove upotrebe.

6. Fenilarsin oksid (PAO)

PAO dovodi do unakrsnog povezivanja susjednih sulfhidrilnih grupa te na taj način može blokirati učinke mnogih proteina poput tirozinskih fosfataza i Rho GTPaza, te mu je stoga učinak vrlo nespecifičan (74, 75).

7. Dynasore

Dynasore je novi, mali, brzodjelujući i reverzibilni inhibitor čiji se učinak temelji na specifičnom blokiranju dinamin GTPaze, dok na ostale male GTPaze ne djeluje (76, 77). S obzirom da je dinamin nužan i za odvijanje klatrinske endocitoze, ovaj inhibitor se može upotrijebiti kao njen blokator. Blokira klatrinsku endocitozu u dvije faze, odnosno sprječava stvaranje pravih klatrinskih jamica, ali isto tako sprječava odvajanje već stvorenih klatrinom obloženih vezikula od stanične membrane (76, 77). S obzirom da su i kaveolarna endocitoza i endocitoza ovisna o RhoA GTPazi ujedno ovisne i o dinaminu, pomoću *Dynasore-a* se može utvrditi samo da li je endocitoza određenog proteina dinamin ovisna ili ne.

Usprkos vjerovanju da navedene farmakološke tvari selektivno inhibiraju endocitozu ovisnu o klatrinu, niti jedan od ovih inhibitora nije apsolutno selektivan. Svi navedeni inhibitori mogu blokirati makropinocitozu i uzrokovati reorganizaciju aktinskog citoskeleta. Međutim, neki od inhibitora kao što su klorpromazin i deplecija K^+ mogu se upotrijebiti kao alat za razlikovanje endocitoze ovisne o klatrinu od ostalih endocitoznih putova.

1.1.3.1.2. Inhibitori endocitoze neovisne o klatrinu

Budući da je relativno malo podataka dostupno o mehanizmima odvijanja endocitoze neovisne o klatrinu tako postoji i relativno malo farmakoloških inhibitora koji su nam dostupni, a mnogi od njih su i neselektivni, odnosno utječu na odvijanje više od jednoga endocitoznog puta.

1. Statini

Statini, poput lovastatina, genisteina i simvastatina, pripadaju najmoćnijim inhibitorima sinteze kolesterola, a svoj učinak ostvaruju reverzibilnom inhibicijom enzima 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktaze koji predstavlja "usko grlo" u sintezi kolesterola (78). Na taj način oni inhibiraju sve endocitozne putove koji su ovisni o kolesterolu tj. dovode do blokiranja kaveolarne endocitoze, endocitoze ovisne o RhoA GTPazi i endocitoze koja je ovisna o Cdc42 GTPazi. Unatoč činjenici da nakon 3-4 sata inkubacije dovode do gotovo 100%-tne inhibicije sinteze kolesterola, vrlo su nespecifični

budući da sprječavaju i sintezu preteča ostalih lipida, blokirajući na taj način i endocitozne putove koji nisu izravno ovisni o kolesterolu (78, 79, 80).

2. Metil-β-ciklodekstrin (MβCD)

MβCD je često korišteni inhibitor endocitoznih putova ovisnih o kolesterolu (vidi ranije) koji se u 5-10 mM koncentracijama jakim afinitetom vezuje za kolesterol u staničnoj membrani, stvarajući s njim topljive komplekse, te na taj način uklanja kolesterol iz membrane (81). No, pokazano je da može blokirati i klatrinsku endocitozu (82), te dovesti i do promjena u strukturi aktinskog citoskeleta (83).

3. Filipin i nistatin

Polienski antibiotici, filipin i nistatin, vezujući se za kolesterol u staničnoj membrani, te mijenjajući njegova svojstva izazivaju promjene u strukturi membranskih mikrodomena bogatih kolesterolom. Time inhibiraju endocitozne putove ovisne o kolesterolu (vidi ranije) (84). Za razliku od MβCD, učinak filipina je dosta specifičan, te on ne blokira klatrinsku endocitozu, kao niti ostale endocitozne putove koji nisu direktno ovisni o kolesterolu (84, 85). No, pokazano je da filipin može narušiti vezu između F-aktina i stanične membrane (86), ali utjecaj tog učinka na proces endocitoze još treba istražiti.

4. Tvari koje dovode do depolimerizacije F-aktina

Citohalazin D blokira polimerizaciju aktina vezujući se na brzo rastući kraj aktinskih filamenata (87), dok se latrunkulin A veže na monomere aktina. Time ovi inhibitori onemogućuju slaganje aktina u filamente (87), sprječavajući normalno odvijanje endocitoze i vezikularnog transporta. Stoga se trebaju smatrati neselektivnim inhibitorima endocitoze (88, 89).

5. Inhibitori metabolizma fosfoinozitida

Inhibitori fosfoinozitid 3-kinaze (PI3K) i fosfolipaze C (PLC) se upliću u metabolizam fosfoinozitida. Time moduliraju citoskelet i unutarstanični vezikularni transport, te na taj način neselektivno utječu na endocitozni proces (90, 91).

6. *Clostridium difficile* toksin A

Clostridium difficile toksin A je glukoziltransferaza koja inaktivira neke od članova porodice Rho GTPaza putem monoglikozilacije. Pokazano je da inhibira RhoA i Cdc42 GTPaze, dok ne djeluje na Arf6, Ras, Rab ili Ran GTPaze, te se može smatrati inhibitorom endocitoznih putova koji su ovisni ili o RhoA ili o Cdc42 GTPazi (92, 93).

7. Sekramin

Sekramin je novi, reverzibilni inhibitor Cdc42 GTPaze koji stabilizira kompleks Cdc42/RhoGDI u citoplazmi te na taj način sprječava njenu aktivaciju (94, 95).

8. Aluminij fluorid

Aluminij fluorid (AlF_4^-) je poznat kao aktivator Arf6 GTPaze (96), te je tijekom tretmana s AlF_4^- Arf6 GTPaza stalno u aktivna (Arf6-GTP). S obzirom da je općenito za funkcioniranje Rho GTPaza neophodna nesmetana prostorna i vremenska izmjena aktivnog i inaktivnog oblika, AlF_4^- iako u početku aktivira Arf6 GTPazu, u konačnici blokira njenu normalnu funkciju. Tako primjerice dovodi do stvaranja membranskih protruzija koje ostaju imobilizirane u subplazmalemalnom području, ali i do inhibicije recikliranja (97, 98, 99). AlF_4^- također djeluje i na Arf1 GTPazu (100).

9. 1-butanol

1-butanol je inhibitor PLD te stoga ometa normalno stvaranje PA koja je bitna za stvaranje membranskih izbojaka. Iz tog razloga 1-butanol može inhibirati kako klatrinsku, tako i endocitozu neovisnu o klatrinu (98).

10. Y-27632 dihidroklorid monohidrat

Y-27632 dihidroklorid monohidrat (10-60 μM) je jako učinkovit i selektivan inhibitor nishodne efektorske molekule RhoA GTPaze, ROCK-a, te na taj način inhibira endocitozni put ovisan o RhoA GTPazi (50).

1.2. VEZIKULARNI TRANSPORT

Kao što je spomenuto u prethodnom poglavlju, molekule u stanicu mogu ući klatrinskom endocitozom, kaveolarnom endocitozom, te endocitozom reguliranom Arf6, RhoA ili Cdc42-ATPazom. Neovisno o mehanizmu kojim je molekula ušla u stanicu, njezina sudbina može biti dvojaka. Naime, endocitirana molekula se ili degradira (uništava u "probavnom sustavu" stanice) ili pak reciklira, odnosno vraća se ponovno na staničnu površinu (101) (slika 7).

Slika 7. Glavni endosomalni putovi

Slika 7. Glavni endosomalni putovi.

Na slici su prikazani glavni endosomalni putovi: recikliranje (zeleno) i degradacija (svijetlo smeđe). Mikrotubulni organizacijski centar (MTOC; engl. *microtubule organizing centre*) prikazan je plavo. Internalizirane molekule ulaze u rani endosom gdje se odvija glavnina sortiranja. Molekule koje recikliraju usmjeravaju se u reciklirajući endosom, dok se molekule koje se degradiraju usmjeravaju u kasne endosome iz kojih odlaze u lizosome. MVB, multivezikularno tjelešce (engl. *multivesicular body)*; ECV, endosomalna prijenosna vezikula (engl. *endosomal carrier vesicle)* (prilagođeno prema referenci 101).

Sudbinu endocitirane molekule određuju složeni sortirajući mehanizmi. Tijekom unutarstaničnog putovanja do svojeg konačnog odredišta, molekule prolaze kroz dinamičnu mrežu međusobno povezanih endosomalnih odjeljaka koji se razlikuju prema biokemijskom sastavu i smještaju u stanici. Podjela endosomalnih odjeljaka danas se najčešće vrši prema biljezima koji se nalaze na njihovoj citoplazmatskoj površini, a od kojih su najpoznatije

molekule Rab (102-106). To su male GTPaze koje sudjeluju u stvaranju prijenosnih vezikula, njihovoj pokretljivosti, te međusobnom usmjeravanju i fuziji (103), a do sada ih je u ljudskim stanicama poznato više od 60. Neke od najvažnijih Rab molekula i njihov položaj u stanici prikazani su na slici 8. Funkcija i izvršne molekule nekih od Rab molekula navedene su u tablici 1.

Slika 8. Prikaz stanične raspodjele Rab GTPaza u epitelnoj stanici

Slika 8. Prikaz stanične raspodjele Rab GTPaza u epitelnoj stanici.

Unutarstanična lokalizacija Rab proteina u stanicama sisavaca. Neki od tih proteina su specifični za vrstu stanice (npr. Rab17 za epitelne stanice). CCV, klatrinom obložena vezikula (engl. *clathrin-coated vesicle*); CCP, klatrinska obložna jamica (engl. *clathrin-coated pit*); IC, ER-Golgi prijelazni odjeljak (engl. *ER–Golgi intermediate compartment*); TGN, trans Golgi mreža (engl. *trans-Golgi nextwork*) (prilagođeno prema referenci 103).

Tablica 1. Uloga Rab molekula endocitoznog puta.

Rab	*Funkcija*	*Efektorska molekula*	*Položaj u stanici*
Rab4	Sortiranje i recikliranje na razini ranih endosoma; EE-PM transport	Rabaptin-5 i Rabaptin-4	RE, EE
Rab5	Sekvestracija liganda na staničnoj membrani; spajanje CCV-EE i EE-EE; pokretljivost EE; PM-EE transport	Rabenozin-5 Rabaptin-5 EEA-1 hVps34 (PI3K)	PM EE
Rab6	Retrogradni GA-ER transport; transport unutar GA; EE-TGN transport	Rabkinesin-6	GA, ER
Rab7	Transport između LE/MVB i lizosoma, te EE-LE transport	RILP , ORP1L	LE, lizosomi
Rab9	Transport između LE i GA	p40	LE, GA
Rab11	Recikliranje putem reciklirajućih endosoma; transport između stanične membrane i GA	Rab11BP	RE; JNRC
Rab22(a)	Fuzija i transport EE; TGN-EE transport; recikliranje materijala koji je u stanicu ušao endocitozom neovisnom o klatrinu; fagolizosomalna biogeneza	EEA-1	EE, TGN, LE

EE, rani endosomi (engl. *early endosomes*); GA, Golgi aparat; ER, endoplazmatska mrežica; LE, kasni endosomi (engl. *late endosomes*); RE, reciklirajući endosomi (engl. *recycling endosomes*); RILP, Rab7 međudjelujući lizosomalni protein (engl. *Rab7 interacting lysosomal protein*); ORP1L, (engl. *oxysterol-binding protein-related protein 1L*); EEA-1, rani endosomalni antigen 1 (engl. *early endosomal antigen 1*); JNRC, jukstanuklearni reciklirajući odjeljak (engl. *juxtanuclear recycling compartment*); PM, stanična membrane (engl. *plasma membrane*) (prema referencama 103-106).

1.2.1. Endosomalni odjeljci

Endosomalni odjeljci su unutarstanične organele koje čine endosomalni sustav, a razlikuju se po biokemijskom sastavu, smještaju u stanici, te funkciji koju vrše.

1.2.1.1. Rani endosomi

Rani endosomi (EE, engl. *early endosomes*) predstavljaju tubulo-vezikularne odjeljke koji se nalaze uglavnom na periferiji stanice iako ih se u manjoj mjeri može naći i u perinuklearnom području i čiji pH iznosi oko 6,0-6,2 (2, 3, 107). U rane endosome, neovisno

o načinu ulaska u stanicu ulazi oko 95% ukupno endocitiranog materijala, te samim time oni predstavljaju jedan od najvažnijih unutarstaničnih odjeljaka (3, 108). Naime, oni zaprimaju dolazeći materijal kroz 5-10 minuta i nakon toga putuju duž mikrotubula i poprimaju karakteristike kasnih endosoma i taj proces nazivamo sazrijevanje ranih endosoma (2). Endocitirane molekule mogu u rani endosom ući ili izravno ili neizravno putem intermedijalnih odjeljaka (3). Vrlo brzo nakon stvaranja CCV gubi svoj klatrinski omotač, te se spaja s ranim endosomom. Time se molekule koje su u stanicu ušle klatrinskom endocitozom izravno prenose u rane endosome (8, 10, 108, 109).

Molekule koje se endocitiraju kaveolarnom endocitozom mogu također u rani endosom ući izravno, ali i preko intermedijarnih odjeljaka, kaveosoma (vidi poglavlje 1.2.1.3.1.).

Molekule koje u stanicu ulaze ovisno o Cdc42 GTPazi, u rane endosome ulaze putem tubularnih GEEC odjeljaka (rani endosomalni odjeljci bogati glikozil fosfatidilinozitol-sidrenim proteinima; engl. *glycosil phosphatidylinositol-anchored protein enriched early endosomal compartments*) na način ovisan o PI3K (59, 107, 108, 109). U posljednje vrijeme je pokazano da su njihove preteče tzv. CLICs odjeljci (klatrin i dinamin neovisni nosači, engl. *clathrin-and dynamin-independent carriers*) (108).
Molekule koje u stanicu ulaze ovisno o RhoA ili Arf6 GTPazi najvjerojatnije koriste neke međuodjeljke prije nego što dođu u EE, no ti međuodjeljci još uvijek nisu dovoljno okarakterizirani (108, 110).

Rani endosomi su, poput ostalih endosomalnih odjeljaka, karakterizirani prisustvom određenih Rab proteina na svojoj površini. Tako ove endosome prvenstveno opisujemo kao $Rab5^+$ i $EEA\text{-}1^+$ endosomalne odjeljke. Rab5 je molekula koja je odgovorna za homotipsku fuziju (fuziju ranih endosoma međusobno), kao i za heterotipsku fuziju (fuziju ranih endosoma i vezikula/odjeljaka koji ne pripadaju populaciji ranih endosoma) (107, 108). Ova molekula na sebe veže PI3K koja stvara PI3P, a na kojeg se potom mogu vezati izvršne molekule, od kojih je najvažnija EEA-1. EEA-1 se osim na PI3P vezuje i na sam Rab5 GTP (111). Iako se smatralo da nakon inaktivacije PI3K nema vezivanja EEA-1 na rani endosom (112), ipak se pokazalo da se usprkos nedostatku PI3P EEA-1 može vezati na EE (113, 114). No, u tom slučaju EE mijenjaju svoj izgled, te postaju nabubreni i veći. Stoga se smatra da EEA-1 nema ulogu u homotipskoj već više u heterotipskoj fuziji EE i vezikula koje sudjeluju u transportu nishodno od ranih endosoma. U procesu homotipskih i heterotipskih fuzija važnu ulogu imaju i SNARE proteini (engl. *soluble NSF Attachment Protein Receptors*) koji omogućavaju čvrsto priljubljivanje vezikula koje sudjeluju u fuziji (115, 116).

Tijekom homotipskih fuzija, neprekidno se od ranih endosoma odvajaju vezikule koje se usmjeravaju prema staničnoj membrani, odnosno u recikliranje. Te vezikule dobivaju Rab4 molekulu na svojoj površini, te se stoga smatra da je upravo Rab4 GTPaza važna za recikliranje molekula izravno iz ranih endosoma (117, 118), odnosno za proces brzog recikliranja. S druge strane rani endosomi putuju duž mikrotubula prema središnjem dijelu stanice, te bivaju sve veći i gube markere ranih endosoma (Rab5, EEA-1). Usporedno, jedan dio postaje $Rab11^+$ a drugi $Rab7^+$. Smatra se da se $Rab11^+$ domena usmjerava u recikliranje preko jukstanuklearnog reciklirajućeg odjeljka (sporo recikliranje), dok se dio koji postaje $Rab7^+$ upućuje u kasni endosomalni put (slika 9).

Slika 9. Domene ranog endosoma

Slika 9. Domene ranog endosoma.

U ranom endosomu se odvija sortiranje molekula koje se zatim usmjeravaju ili u brzi ($Rab4^+$) odnosno spori ($Rab11^+$) reciklirajući put ili prema kasnim endosomalnim odjeljcima ($Rab7^+$). JNRC, jukstanuklearni reciklirajući odjeljak (engl. *jukstanuclear recycling compartment*); RE, reciklirajući endosom (engl. *recycling endosome*); LE, kasni endosomi (engl. *late endosome*); REE, reciklirajući rani endosom (engl. *recycling early endosome*) (prilagođeno prema 112).

Smatra se da se glavnina sortiranja molekula unutar endocitoznog puta odvija upravo na razini ranih endosoma, te se za rani endosom koristi još i naziv sortirajući endosom i/ili sortirajući rani endosom. Sortiranje na razini ranog endosoma može se odvijati na nekoliko načina. Jedan od njih je i već ranije spomenuti model sortiranja koji se temelji na prisutnosti različitih proteina (među kojima su najvažnije Rab GTPaze) koji sudjeluju u procesima nishodnih fuzija ranih endosoma i različitih endosomalnih odjeljaka (119) (slika 9). Nadalje, s obzirom da rani endosomi imaju jedinstvenu tubulovezikularnu strukturu, smatra se da i sama geometrijska struktura ranih endosoma ima ulogu u sortiranju (2). Naime, zbog kiselog pH unutar ranog endosoma, dolazi do odvajanja liganda i receptorske molekule te je to ujedno i prvi korak sortiranja. Nadalje, tijekom putovanja ranih endosoma duž mikrotubula od njih se otkidaju tubuli maloga promjera koji imaju veći omjer površine i volumena, čime se omogućuje odvajajanje (sortiranje) membranskih molekula (nalaze se u tubulima i recikliraju)

od solubilnih molekula (nalaze se u središnjem dijelu vezikule i posljedično usmjeravaju u kasni endosomalni put). No, treba naglasiti da se u recikliranje ne usmjeravaju svi membranski proteini, već samo oni koji ne posjeduju specifični signal. Stoga se može zaključiti da sortiranje membranskih molekula u kasne endosome zahtijeva specifičnu ciljnu informaciju. Prema tome, jedna od teorija sortiranja se temelji upravo i na selektivnoj retenciji molekula (117) i to putem smještaja membranske molekule u određenu membransku mikrodomenu ili putem posjedovanja specifičnog retencijskog signala.

1.2.1.2. Kasni endosomalni odjeljci i lizosomi

Kao što je ranije navedeno, molekule se nakon ulaska u stanicu usmjeravaju ili u recikliranje ili u degradaciju, a glavnina endosomalnog sortiranja odvija se na razini ranih endosoma. Kao što je i opisano u odjeljku 1.2.1.1. molekule koje se na razini ranih endosoma usmjeravaju u degradaciju prolaze nekoliko međustanica do svog konačnog odredišta- lizosoma koji ujedno predstavljaju i završnu točku endocitoznog puta. Naime, smatra se da molekula nakon što uđe u lizosom ima samo jednu sudbinu- degradaciju.

Vezikule koja služe kao prijenosnici između ranih i kasnih endosoma su multivezikularna tjelešca (MVB; engl. *multivesicular bodies*), poznate još kao i endosomalne prijenosne vezikule (ECV; engl. *endosomal carrier vesicle*) (117).

U nastanku MVB/ECV, odnosno njihovih vanjskih membrana, važnu ulogu ima Aneksin-II (117) koji se veže na rane endosomalne domene bogate kolesterolom (na negativno nabijene fosfolipide, te je vezivanje ovisno o Ca^{2+}) i regulira odvajanje MVB/ECV od ranih endosoma. Na taj način bi sam smještaj molekule u određenu membransku mikrodomenu mogao određivati njezinu daljnju sudbinu (119, 120). Nadalje, u nastanku unutrašnjih MVB/ECV membrana važnu ulogu ima PI3P i njegov efektor HRS *(*engl. *hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate*) te bi stoga molekule koje posjeduju domene za vezivanje tog sortirajućeg kompleksa (npr. monoubikvitin) bile također usmjerene u kasni endosomalni put (slika 10a). S druge strane, Aneksin-II se udružuje s membranskim mikrodomenama koje su bogate kolesterolom i omogućava odcjepljivanje MVB/ECV od ranoga endosoma. Za ovaj proces odvajanja bitna je interakcija navedenih molekula s aktinom. Stoga, u slučaju nedostatka HRS, dolazi do stvaranja MVB ali je smanjen broj unutrašnjih vezikula, za razliku od situacije ukoliko nema Aneksina-II kada su MVB bogata unutrašnjim vezikulama ali se ne mogu odvojiti od ranih endosoma (slika 10b).

Slika 10. Uloga HRS i Aneksina-II u nastanku MVB

Slika 10. Uloga HRS i Aneksina-II u nastanku MVB.

HRS *(*engl. *hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate*) koji se veže na PI3P na ranim endosomima novači EGFR i sortira ga uz pomoć ESCRT (engl. *endosomal sorting complex required for transport*) kompleksa u membranske invaginacije novonastalih MVB. Odvajanje novonastalih MVB zahtjeva prisustvo Aneksina-II koji je udružen s membranskim mikrodomenama koje su bogate kolesterolom (a). Ukoliko nema HRS-a, dolazi do stvaranja MVB ali je smanjen broj unutrašnjih vezikula (b, lijevo), za razliku od situacije ukoliko nema Aneksina-II kada su MVB bogata unutrašnjim vezikulama ali se ne mogu odvojiti od ranih endosoma (b, desno) (117).

Svi endosomi koji se nalaze na putu degradacije posjeduju multivezikularne elemente (vezikularne tvorbe koje nastaju pupanjem membrana u unutrašnjost samog odjeljka, te stvaraju nove vezikule koje se nakupljaju u njegovoj unutrašnjosti), uključujući područja EE (koji odgovaraju novonastalim MVB/ECV) i LE. Bitno je napomenuti da multivezikularni elementi LE sadrže složen sustav internih membrana koji je osim u degradaciju, uključen i u recikliranje proteina i lipida (2, 117, 121).

Nakon što su se otkinuli od ranih endosoma, MVB, koja su tipično kuglastog oblika (promjer 400-500 nm), se prenose preko mikrotubula prema kasnim endosomima, s kojima se u konačnici spajaju (117, 122).

Slika 11. Fuzija i fisija membrana koje sadrže LBPA u lumenu kasnih endosoma

Slika 11. Fuzija i fisija membrana koje sadrže LBPA u lumenu kasnih endosoma.

Unutrašnjost ECV/MVB i kasnih endosoma je prikazana u sivoj boji, dok je citoplazma svijetlo smeđa. ECV/MVB dostavljaju intraluminalne vezikule (crvene membrane) koje sadrže EGFR ili materijal koji će biti izbačen u citoplazmu (zelene membrane; toksin antraksa). Te dvije populacije vezikula se mogu razlikovati u sastavu. Unutar kasnih endosoma toksin antraksa, ali ne i EGFR se prenose u vezikule koje sadrže LBPA (engl. *lyso-bisphosphatidic acid*) (zelene membrane), ali proces tog sortiranja nije razjašnjen. Vezikule koje sadrže LBPA mogu se fuzionirati s vanjskim (limitirajućim) membranama i na taj način svoj sadržaj prenositi u citoplazmu, te se samim time LBPA može kratkotrajno naći i na vanjskim membranama kasnih endosoma. U tom procesu sudjeluje i Aliks. Proteini koji su ograničeni na vanjske membrane su prikazani plavo (123).

Kasni endosomi (slika 11) su visokopolimorfne strukture kiselog pH (5,0-5,5) s cisternalnim, tubularnim i multivezikularnim dijelovima. Proteinski sastav im se razlikuje od onog kod MVB, iako izgledom nalikuju na njih. Smješteni su više jukstanuklearno i koncentrirani oko MTOC (engl. *microtubule-organizing center*). Kasni endosomi sadrže Lamp-1 i Lamp-2 molekule (jednako kao i lizosomi), proteine koji se nalaze u njihovim graničnim (vanjskim) membranama (117, 123, 124, 125, 126), a za njihovu funkciju je važan Rab7 (112, 127). Međutim, za razliku od lizosoma posjeduju manoza-6-fosfatni receptor (MPR). Osim toga, ovi odjeljci u svojim unutarnjim membranama sadrže velike količine lizobisfosfatidne kiseline (LBPA). LBPA se nalazi u velikim količinama upravo u LE, dok nije prisutna u ostalim staničnim odjeljcima (117, 127) (slika 12).

Kasni endosomi za razliku od lizosoma imaju svojstvo sortiranja molekula. Molekule se iz kasnih endosoma mogu reciklirati prema TGN, primjerice TGN38, MPR (receptor manoza 6 fosfata), ali i egzocitirati prema plazmatskoj membrani (121). Ovaj proces egzocitoze je, između ostalog, izuzetno bitan kod antigenskog predočavanja (121).

Slika 12. Anatomija kasnog endosoma

Slika 12. Anatomija kasnog endosoma.

Molekule poput Lamp-1 i Lamp-2 te HLA-DM nalaze se pretežno u vanjskim (limitirajućim) membranama kasnog endosoma, dok se CD63, CD81, CD82, EGFR, te kation neovisni manoza 6-fosfatni receptor (CI-MPR) nalaze pretežito u unutrašnjim (luminalnim) membranama (124).

Mehanizam prijenosa endocitiranog materijala od kasnih endosoma do lizosoma još uvijek ostaje kontraverzan, te je predloženo nekoliko teorija (slika 13).

Prema prvoj teoriji koju nazivamo *teorijom maturacije*, kasni endosomi putuju duž mikrotubula i postepeno u njima dolazi do snižavanja pH vrijednosti, dodavanja lizosomalnih komponenti i uklanjanja komponenti kasnih endosoma. Prema drugoj predloženoj teoriji, koju nazivamo *vezikularnom teorijom*, od kasnih endosoma se odvajaju vezikule koje sadrže materijal koji je usmjeren u degradaciju i taj materijal prenose do lizosoma. Treća teorija, *"kiss-and-run"*, predlaže model prema kojemu dolazi do fuzije kasnih endosoma i lizosoma ("kiss"), izmjene materijala između ta dva odjeljka, te se kasni endosom ponovno odvaja ("run") od lizosoma i putuje nazad kako bi preuzeo novi materijal. Posljednja, četvrta teorija predlaže *hibridni model* prema kojemu dolazi do fuzije kasnih endosoma i lizosoma te nastanka hibridne organele koja sadrži komponente kako kasnih endosoma, tako i lizosoma. Lizosomi se nakon toga reformiraju putem uklanjanja kasnih endosomalnih komponenti (128-131).

Prema posljednjim rezultatima dobivenim elektronskim mikroskopom, najvjerojatnija je teorija fuzije, te su opisana tri koraka koja se pritom događaju (128): *povezivanje* (dvije organele stvaraju veze između sebe na udaljenosti > 25 nm; za taj proces neophodno je važna Rab7 molekula), *formacija trans-SNARE kompleksa* (SNAP receptor; SNAP = soluble NSF

attachment proteins; NSF = N-ethylmaleimide sensitive factor) koji stvara most između dvije organele, te kao posljednje dolazi do *fuzije membrana*.

Slika 13. Dolazak endocitiranog materijala u lizosom i spajanje lizosoma

Slika 13. Dolazak endocitiranog materijala u lizosom i spajanje lizosoma.
Materijal koji se internalizira s PM najprije dolazi u rani endosom a zatim u kasne endosome. Kasni endosomi prenose materijal do lizosoma gdje se odvija degradacija. Predloženi su različiti modeli putovanja materijala od kasnih endosoma do lizosoma. U prvom modelu (maturacija), kasni endosomi sazrijevaju u lizosome putem postepenog dodavanja lizosomalnih komponenti i uklanjanja komponenti kasnih endosoma. U drugom modelu (vezikularnom), vezikule pupaju iz kasnih endosoma i prenose materijal do lizosoma, dok u trećem modelu dolazi do fuzije kasnih endosoma i lizosoma ("kiss-and-run") i na taj način do izmjene materijala. U posljednjem, četvrtom modelu dolazi do fuzije kasnih endosoma i lizosoma i nastanka hibridne organele koja sadrži komponente kako kasnih endosoma, tako i lizosoma. Lizosomi se nakon toga reformiraju putem uklanjanja kasnih endosomalnih komponenti (128).

1.2.1.3. Specijalni endosomalni odjeljci

1.2.1.3.1. Kaveosomi

Molekule internalizirane kaveolarnom endocitozom često ulaze u klasične endosomalne odjeljke, no postoje i zasebni odjeljci karakteristični upravo za tu vrstu endocitoze. Jedan od takvih odjeljaka predstavljaju upravo kaveosomi. To su rane organele u koje ulaze molekule odmah nakon kaveolarnog mehanizma internalizacije (CTxB, SV40, unakrsno vezani GPI-sidreni proteini). Glavna su im obilježja to što su pozitivni na kaveolin-

1, te što su neutralnog pH (26, 39, 132). Nakon kaveosoma, materijal se može prenijeti u ER (npr. SV40) (133), TGN (npr. CTxB) (134), ali i u EE i GEEC odjeljke (135).

1.2.1.3.2. CLICs (prijenosnici neovisni o klatrinu)

CLICs (engl. *Clathrin-Independent Carriers*) su tek nedavno otkriveni, blago kiseli (~6,0), izrazito tubularni odjeljci koji predstavljaju prvu stepenicu ulaska materijala endocitiranog putem ovisnim o Cdc42 GTPazi (59, 136, 137). U nastanku ovih odjeljaka važnu ulogu ima Arf1 GTPaza čija je uloga do sada razmatrana samo u kontekstu sekretornog puta, pa bi ovo otkriće predstavljalo molekularnu osnovu ispreplitanja endocitoze i sekrecije putem regulacije aktivnosti Arf1 GTPaze (136). Naime, pokazano je da se Arf1 GTPaza može aktivirati i na staničnoj membrani, te preko ARHGAP10 aktivirati površinski Cdc42. On nadalje potiče endocitozne procese i stvaranje CLIC vezikula ovisno o prisutnosti kolesterola i normalnom integritetu aktinskog citoskeleta (51). CLICs se međusobno spajaju čime nastaju rani endocitozni odjeljci GPI-sidrenih proteina (GEEC).

1.2.1.3.3. GEEC (rani endocitozni odjeljak GPI-sidrenih proteina)

GEEC (engl. *GPI-anchored proteins early endosomal compartment*) je rani tubulo-vezikularni odjeljak smješten na staničnoj periferiji u kojem se nalaze GPI-sidreni proteini, a nastaje homotipskom fuzijom CLICs. GEEC odjeljci su negativni na markere ranih endosoma (Tf/TfR, Rab4, Rab5 i EEA-1), kao i kaveosoma (kaveolin-1). No, za procese njihove daljnje homotipske fuzije potrebna je aktivnost PI3K, kao i ranija mobilizacija i aktivacija Rab5 i EEA-1. Oni ujedno sudjeluju i u procesima heterotipske fuzije GEEC-a s ranim endosomima (59).

U GEEC odjeljku/cima se osim GPI-sidrenih proteina nakupljaju dekstran i folatni receptor. Ipak, važno je napomenuti da je GEEC-posredovana internalizacija (koja je neklatrinska, nekaveolarna, Cdc42 ovisna, RhoA neovisna i dinamin-neovisna) ključni endocitozni put samo za GPI-AP koji nisu unakrsno povezani.

1.2.1.4. Endosomalni reciklirajući odjeljci i recikliranje

Recikliranje je proces kojim se endocitirani materijal ponovno vraća na staničnu površinu. Sam proces recikliranja može se odvijati na više različitih razina u stanici (slika 14). Kao što je već navedeno, molekule koje su endocitirane putem ovisnim o Arf6 GTPazi mogu reciklirati izravno iz $Arf6^{+}$ mjehurića prije njihova stapanja u rani endosom (138, 139). U tom

se slučaju molekule iznimno brzo vraćaju na staničnu površinu (engl. *rapid recycling*) što zahtijeva očuvan integritet aktinskog citoskeleta. Za sada nije istraženo da li molekule koje koriste ostale putove endocitoze, neovisne o Arf6, mogu biti reciklirane na ovaj način, iako je to moguće.

Slika 14. Model recikliranja transferinskog receptora, transferina i MHC-I molekula

Slika 14. Model recikliranja transferinskog receptora/transferina i MHC-I molekula.
TfR/Tf se endocitiraju klatrinskom endocitozom, za razliku od MHC-I molekula. Na razini ranog endosoma (EE) njihov put se isprepliće i iz njega TfR/Tf može reciklirati u procesu koji je ovisan o Rab4 GTPazi i PI3K (LY koji je inhibitor PI3K blokira ovaj proces). Iz EE obje molekule se usmjeravaju u jukstanuklearni reciklirajući odjeljak (JNRC), ali u različite domene. Recikliranje TfR/Tf ovisno je o Rab11 GTPazi, klatrinu, dinaminu i osjetljivo je na brefeldin A (BFA), dok recikliranje MHC-I iz JNRCa pretežito ovisi o funkciji Rab22a i Arf6 GTPaza. (prilagođeno prema referencama 140 i 141).

Druga razina je brzo recikliranje (engl. *fast recycling*), iz ranih endosoma. Povratak molekula ovim putem je također brz, no ipak znatno sporiji od rapidnog recikliranja. Ovisan je o temperaturi, te o aktivnosti fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K) i Rab4 GTPazi (140, 141). Recikliranje na trećoj i četvrtoj razini je znatno sporije (engl. *slow recycling*) a događa se iz kasnih ranih endosoma i iz jukstanuklearnog reciklirajućeg odjeljka (JNRC; engl. *juxtanuclear recycling compartment*) (8, 140, 141), te je poznato da su u ovaj proces

uključene GTPaze Rab11 i Rab22a. Recikliranje iz jukstanuklearnog reciklirajućeg odjeljka osjetljivo je na brefeldin A (BFA) (140). Put brzog i sporog recikliranja utvrđen je i karakteriziran u istraživanjima s Tf i TfR, no izgleda da se i mnogi drugi proteini mogu vraćati na staničnu površinu tim putovima. (57, 142). I posljednja, peta razina, koja se samo u širem smislu može rastumačiti kao recikliranje, odnosi se na povratak proteina na staničnu površinu iz kasnih endosoma. Stoga se može nazvati i kasno recikliranje (engl. *late recycling*) ili egzocitoza, što je najčešće korišteni naziv jer obuhvaća i molekule koje su u kasne endosome ušle iz sekretornog puta (143).

Proces recikliranja najviše je istraživan u sklopu endocitoznog puta TfR/Tf, s obzirom da su to molekule koje se nakon endocitoze usmjeravaju isključivo u recikliranje, odnosno ne podliježu procesu degradacije (139, 140, 141).

1.2.2. Membranske mikrodomene

Membranske mikrodomene predstavljaju omeđena područja posebnih fizikalnih obilježja koja ih razlikuju od njihova okruženja. To su izuzetno dinamičke strukture u koje molekule stalno ulaze i iz njih izlaze prvenstveno ravnajući se prema proteinsko-lipidnim i proteinsko-proteinskim međudjelovanjima (144). Membranske mikrodomene se prema strukturi mogu podijeliti na klatrinske jamice i kaveole, a prema lipidnom sastavu na organizirane dijelove (lipidne splavi) i neorganizirane dijelove. Dok je najvažnija karakteristika klatrinskih jamica prisutnost proteina klatrina (4, 9, 10), a kaveola prisutnost proteina kaveolina (37, 38), karakteristika lipidnih splavi je specifičan sastav membranskih lipida.

Lipidi su sastavni dijelovi staničnih membrana (plazmatske membrane, te membrana unutarstaničnih organela). Upravo njihov sastav i raspored određuju stupanj uređenosti samih membrana, odnosno na temelju njihove organiziranosti membranu možemo dijeliti na organizirane i neorganizirane dijelove (145). Organizirani dijelovi stanične membrane sastavljeni su uglavnom od sfingolipida, fosfolipida s dugačkim i zasićenim acilnim lancima, te kolesterola. Nasuprot tome, neorganizirane dijelove membrane čine većinom fosfolipidi koji se sastoje od fosfoglicerolipida s višestruko nezasićenim masnim kiselinama (145, 146).

1.2.2.1. Lipidne splavi

Lipidne splavi (engl. *lipid rafts)* predstavljaju dio dobro organiziranih membranskih mikrodomena, a u posljednje vrijeme naročito se ispituje njihov značaj u staničnom

signaliranju, kao i u sortiranju molekula u određeni endocitozni put. Ove izrazito dinamične strukture, osim u plazmatskoj membrani, zastupljene su u ranim endosomima, reciklirajućim endosomima, te *trans*-GA (147). Po jednoj od definicija, to su male (50-200 nm), heterogene, visokodinamične, sterolima i sfingolipidima bogate domene koje određuju stanične procese. Male splavi ponekad mogu stvarati veće platforme putem proteinsko-proteinskih i proteinsko-lipidnih međudjelovanja (148). Lipidne splavi građene su od lipidnog i proteinskog dijela. Lipidni dio čine: kolesterol, ceramid, glikosfingolipidi, sfingomijelin, te fosfolipidi sa zasićenim acilnim ostatcima (145, 148). Proteinski dio lipidnih splavi čine proteini koji su ili trajno u njima smješteni (kaveolin, flotilini, sinaptofizin) ili se samo povremeno u njih smještaju (CD44, MHC-II, T-stanični receptor) (149).

Usmjeravanje i smještaj molekula u lipidne splavi nije potpuno jasan, ali se pretpostavlja da važnu ulogu igraju transmembranska domena samog proteina i acilacija (145, 150). Isto tako, moguće je da se proteini smještaju u lipidne splavi i na temelju proteinsko-proteinskih interakcija, pa bi tako kaveolin koji je konstitutivno smješten u lipidnim splavima, mogao regrutirati proteine koji posjeduju kaveolin-vezujuću domenu (145, 149).

Ispitivanje lipidnih splavi, kao i smještaja proteina u njima može se vršiti na nekoliko načina. Korištenje neionskih detergenata, te uklanjanje kolesterola su najjednostavnije i najčešće primjenjivane metode. Metoda korištenja neionskog detergenata temelji se na saznanjima da jaka lipid-lipidna međudjelovanja u uređenim domenama (lipidne splavi) čine molekule koje se u njima nalaze otpornijim na otapanje u neionskim detergentima. Triton-X-100 najčešće je primjenjivani detergent (145, 151). Metoda uklanjanja kolesterola (pomoću ciklodekstrina, statina i polienskih antibiotika) temelji se na činjenici da je kolesterol vrlo bitan za održavanje integriteta lipidnih splavi (145).

1.3. MHC MOLEKULE I RAZREDA

MHC molekule (molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti; engl. *major histocompatibility complex*) su polimorfni površinski i solubilni glikoproteini čija je uloga aktivacija imunološkog sustava kao odgovora na prisutnost virusa, bakterija, te njihovih produkata (152). MHC molekule dijele se u dva razreda. MHC molekule I razreda (MHC-I molekule) su izražene na površini svih nukleiranih stanica, a imaju važnu ulogu u predočavanju uglavnom endogenih antigena citotoksičnim $CD8^+$ limfocitima T. Time se omogućuje imunološki odgovor na infektivne čestice i tumorske stanice (152). S druge strane,

MHC molekule II razreda (MHC-II molekule) predočavaju egzogene, uglavnom endocitirane peptidne dijelove, a nalaze se na antigen predočnim stanicama koje aktiviraju imunološki sustav, prvenstveno pomagačkim limfocitima T (152).

1.3.1. Građa MHC molekula I razreda

MHC-I molekule (slika 15) normalno su izražene kao trimolekularni kompleksi, a sastoje se od glikoziliranog transmembranskog teškog lanca (45 kDa) na koji su nekovalentno vezani β_2-mikroglobulin (12 kDa) i kratki peptid od 8 do 10 aminokiselina (153-156).

Slika 15. Građa MHC molekula I razreda

Slika 15. Građa MHC molekula I razreda.
MHC molekule I razreda su trimolekularni kompleksi sastavljeni od teškoga lanca, β-2-mikroglobulina (β_2-m) i peptida. Teški lanac sastavljen je od 3 domene (α1-α3), transmembranskog hidrofobnog dijela, te kratkog citoplazmatskog repa (prilagođeno prema referenci 157).

Teški lanac sastoji se od tri izvanstanične domene (α_1-α_3) od po oko 90 aminokiselina, jednog hidrofobnog transmembranskog segmenta i kratkog citoplazmatskog repa od 30-40

aminokiselina. Domene α_1 i α_2 sadrže dvije α-uzvojnice postavljene na plohi od 8 nabranih β-ploča, stvarajući utor za vezivanje peptida s džepovima u koje se smještaju odgovarajući aminokiselinski postranični lanci (sidreni izdanci). Ovi džepovi se između različitih alela razlikuju prema dubini i kemijskim osobinama, a u skladu s time i određuju skupine peptida koje se mogu vezati za određene alele. Sve tri izvanstanične domene su u dodiru s β_2-mikroglobulinom (β_2-m), a većina antigenskih determinanti se nalazi u α_1 i α_2 domenama (154, 155). Peptid postaje sastavni dio strukture MHC I molekule i igra važnu ulogu u sastavljanju, stabilnosti i prijenosu MHC molekula I razreda (156).

1.3.2. Sinteza MHC molekula I razreda

1.3.2.1. Klasičan put sinteze MHC molekula I razreda

MHC molekule I razreda se sklapaju u endoplazmatskom retikulumu (ER) i uglavnom predočavaju peptide endogenog porijekla koji većinom nastaju iz citosolnih i jezgrinih proteina djelovanjem proteasoma, multikatalitičkog proteinaznog kompleksa (slika 16). Kada peptidi uđu u ER pomoću proteinskog kompleksa TAP (engl. *transporter associated with antigen processing*), tamo ih čekaju podjedinice MHC-I molekula – teški lanac i β_2-m. U tom ranom razdoblju, dok još nisu vezani s peptidom, stabilizaciji MHC-I molekula pomaže nekoliko šaperonskih proteina. Tako se teški lanac još tijekom sinteze povezuje s kalneksinom, koji vjerojatno ima ulogu u njihovom zadržavanju u ER, svijanju, te stvaranju disulfidnih mostova i poticanju vezivanja s β_2-m (158). Potom nastaje kompleks koji se sastoji od teškog lanca i β_2-m, ali i ERp57, kalretikulina, tapasina i TAP kompleksa. Tapasin je još jedna šaperonska molekula, a posjeduje neovisna vezna mjesta, kako za prazne MHC molekule I razreda (α_2 i α_3 domene), tako i za TAP (159), te između njih stvara fizičku vezu. Takvim koncentriranjem MHC-I molekula uz TAP kompleks povećava se vjerojatnost da će peptid susresti praznu MHC molekulu. Nadalje, on zadržava nepotpuno sklopljene MHC-I molekula u endoplazmatskoj mrežici, te vezivanjem α-domene teškoga lanca, tapasin održava mjesto za vezanje peptida prazne MHC-I molekule u nestabilnoj, "otvorenoj" konformaciji (160). Osim toga, smatra se da bi mogao imati ključnu ulogu u stabilizaciji i transformaciji praznih MHC-I molekula u stanje koje vezuje peptid (161, 162, 163).

Nakon vezivanja peptida dolazi do promjene konformacije MHC-I molekule. Posljedično se otpušta tapasin, kao i ostali dijelovi šaperonskog dijela kompleksa. U pravilu, samo stabilno konformirane trimolekularne MHC-I molekule otpuštaju se iz endoplazmatske mrežice, te se

preko GA (gdje se dovršava N-vezana glikozilacija) i sekretornih vezikula prenose do stanične površine gdje mogu predočiti antigenski peptid. Suprotno tome, nepotpuno sklopljeni kompleksi se translokacijom prenose u citoplazmu i degradiraju u proteasomima (162).

Slika 16. Klasičan put sinteze MHC molekula I razreda

Slika 16. Klasičan put sinteze MHC molekula I razreda.
Peptidi koji nastaju razgradnjom na proteasomima, TAP ovisnim putem ulaze u ER gdje ih čeka kompleks teškog lanca i β_2-m kojeg stabiliziraju šaperonske molekule (163).

Iako postoji velika varijabilnost između MHC-I molekula (poznato je nekoliko stotina različitih alela) osnovni mehanizam njihove sinteze je konzerviran, a čak je sličan i između različitih vrsta (164).

1.3.2.2. Alternativni način nastanka MHC molekula I razreda

Iako većina MHC molekula I razreda predočava endogene antigene, na način kako je ranije opisano, postoji također i mogućnost predočavanja egzogenog antigena procesom u kojem prvenstveno sudjeluju APC (antigen predočne stanice). Pretpostavlja se da je u makrofazima makropinocitoza glavni put predočavanja egzogenog peptida MHC-I molekulama (165), dok endocitoza posredovana receptorom pretpostavlja predočavanje istog peptida MHC-II molekulama (165).

Razlikuju se dva osnovna puta predočavanja egzogenog petpida MHC-I molekulama: put ovisan o TAP kompleksu te put neovisan o TAP kompleksu.

Put ovisan o TAP-kompleksu

Nedirnuti peptidni odlomci ili fagocitirani egzogeni antigeni mogu dospjeti u citosol, degradirati se na proteasomima, te putem TAP kompleksa ući u ER i nastaviti klasičan put stvaranja zrelih MHC-I molekula (166).

Tako različite tvari iz endosomalnih i fagosomalnih odjeljaka mogu prijeći u citosol bez narušavanja integriteta membrane odjeljka (167), ali i kao posljedica prevelike fagocitoze i gubitka integriteta membrane fagolizosoma (168).

Put neovisan o TAP-kompleksu

Postoji više načina putem kojih se egzogeni antigen, neovisno o TAP kompleksu, može predočiti u sklopu MHC-I molekula. Jedan od načina je da se antigen endocitira/fagocitira, i obradi u endosomalnim odjeljcima. Potom se izbaci na staničnu površinu na kojoj se može vezati za MHC-I molekule (169, 170), bilo zato što su one prazne (nemaju vezani peptid) ili stoga što na sebi imaju peptid vezan slabim afinitetom (mehanizam ponovnog vraćanja; engl. *regurgitation mechanism*). Drugi način je da se punjenje MHC-I molekula odvija već u endosomalnim odjeljcima. MHC-I molekule u ove odjeljke mogu dospjeti ili izravnim prijenosom iz ERa ili nakon ponovne internalizacije sa stanične površine (156). Smatra se da se pri nižem, ali ne jako niskom pH peptidi otpuštaju s MHC-I molekula, ali je omogućeno i vezivanje drugih peptida prisutnih u endosomalnim odjeljcima, odnosno omogućena je peptidna izmjena (171, 166).

Jedno od pitanja koje se postavlja je mehanizam vezivanja peptida, odnosno β_2-m, za teški lanac MHC-I molekula. Naime, poznato je da tijekom klasičnog puta u tom procesu vrlo važnu ulogu imaju razne šaperonske molekule koje djeluju prvenstveno u ER, a one su najvjerojatnije odsutne tijekom ovih alternativnih načina, osobito TAP neovisnih. Smatra se da se vezivanje β_2-m na teški lanac najvjerojatnije događa u procesu izmjene (172). Tom procesu bi bile podložnije MHC-I molekule koje inače vezuju β_2-m slabijim afinitetom, primjerice molekule HLA-Cw6 i H2-L^d, ali niti drugi aleli ne moraju biti isključeni. Nadalje, i sama uloga β_2-m u procesu vezivanja peptida nije u potpunosti jasna. Tako neki autori smatraju da vezivanje egzogenog β_2-m oslobađa vezno mjesto za β_2-m na teškom lancu i omogućava peptidnu izmjenu. No, ispitivanjem kompleksa molekula K^b i peptida u bezstaničnom sustavu pokazano je da se peptidna izmjena može događati bez prisustva egzogenog β_2-m, te da se ovaj proces događa u rasponu pH 5,5-7,5 koji inače vlada u velikom broju endosomalnih odjeljaka, a uključuje i staničnu površinu (173).

S druge strane postavlja se pitanje mehanizma vezivanja peptida. Naime, postoji mogućnost da se on vezuje za prazne MHC-I molekule, ali i da se u stvari događa proces peptidne izmjene, što bi uglavnom podrazumijevalo zamjenu niskoafinitetnog peptida za onaj koji se vezuje većim afinitetom. Međutim, obzirom da različiti aleli imaju općenito različit afinitet za peptide, te da se različiti peptidi mogu vezati na isti alel različitom jačinom, ove se dvije mogućnosti međusobno ne isključuju.

1.3.3. Konformacije MHC molekula I razreda

MHC molekule I razreda mogu se naći u dva oblika, odnosno konformacije: kao konformirani trimolekularni kompleksi koji su sastavljeni od teškog lanca (HC; engl. *heavy chain*), peptida i β2-mikroglobulina (konformirane ili «pune» molekule), te kao nekonformirane molekule koje se sastoje samo od teškog lanca na koji je ponekad nekovalentno vezan β2-mikroglobulin (nekonformirane ili «prazne» molekule) (174, 175).

Na staničnoj površini većina MHC molekula I razreda nalazi se upravo u obliku konformiranih trimolekularnih kompleksa sastavljenih od teškoga lanca, β_2-m i peptida. Nekonformirane (prazne) molekule se zbog svoje nestabilnosti nalaze uglavnom u unutarstaničnim odjeljcima a na staničnoj površini su zastupljene u vrlo malom postotku, no taj postotak varira u zavisnosti o ispitivanom alelu (176). Nastanak nekonformiranih MHC-I molekula, odnosno njihov dolazak na staničnu površinu je proces koji nije u potpunosti razjašnjen, a pretpostavlja se da mogu nastati kako tijekom biosintetskog puta izbjegavanjem kontrole na izlasku iz ER, tako i raspadom pravilno svijenih MHC-I molekula kako u biosintetskom (TGN), tako i u endocitoznom putu. Biokemijskom analizom je pokazano da su ove molekule na površini izražene kao potpuno glikozilirane zrele molekule, koje su fosforilirane na tirozinima i posjeduju kinaznu aktivnost (177). Nekonformirane MHC-I molekule na staničnoj površini, i to vrlo često one koje se nalaze u obliku slobodnih teških lanaca, pokazuju sklonost nakupljanju i povezivanju (178), a pokazano je da stvaranje ovih MHC-I kompleksa ima svrhu kako bi i nekonformirane molekule bile prepoznate od strane citotoksičnih limfocita T (178). Ovo bi povezalo prisustvo nepravilno svijenih (nekonformiranih) MHC-I molekula s njihovom ulogom u kontroli aktivacije citotoksičnih limfocita T.

S obzirom na navedene karakteristike, MHC molekule I razreda mogu poslužiti kao model za izučavanje mehanizama sortiranja u endocitoznom putu.

1.3.4. Endocitoza MHC molekula I razreda

Iako se već duže vremena zna da se MHC-I molekule mogu endocitirati (57, 138, 179, 180), te da njihov citoplazmatski rep ima važnu ulogu tijekom odvijanja ovog procesa (181), signal za njihovo sortiranje još uvijek nije dobro razjašnjen. Nadalje, pokazano je da neke stanice pokazuju veću sklonost internaliziranju svojih MHC-I molekula, dok su druge dosta inertne. Mi smo u našim ranijim ispitivanjima (182) pratili konstitutivnu endocitozu konformiranih i nekonformiranih mišjih H-2^d molekula na više staničnih linija (mastocitomu P815, fibroblastima Balb 3T3, te staničnoj liniji fibroblasta L-L^d (L fibroblasti H-2^k haplotipa transficirani s genom za izražavanje molekula L^d). Koristeći dva različita pristupa (inhibiciju sinteze proteina djelovanjem cikloheksimida, te praćenje internaliziranih molekula nakon vezivanja odgovarajućeg mPt) ustanovili smo da se različiti aleli internaliziraju različitom kinetikom koja prvenstveno ovisi o njihovoj stabilnosti koja se tiče ne samo alelne specifičnosti, već i konformacije (182).

Također je i opisano da se većina endocitiranih MHC-I molekula reciklira na staničnu površinu, a samo manji dio se usmjerava u degradaciju (156, 179).

Iako se u nekim ranijim radovima govori da se MHC-I molekule internaliziraju mehanizmom klatrinske endocitoze (171, 183), a samo iznimno kaveolarno, i to nakon snažnog unakrsnog vezivanja protutijelima (184), noviji radovi ukazuju da se konformirane MHC-I molekule, jednako kao i Tac (IL-2Rα) internaliziraju tzv. masovnom (*bulk*) endocitozom, neovisnom o klatrinu, dinaminu i lipidnim splavima (57, 138). Međutim, uklanjanje kolesterola ipak može narušiti njihovu internalizaciju (57). Na HeLa staničnoj liniji pokazano je da nakon ulaska u stanicu, MHC-I se spaja s kolesterol-bogatim vezikulama u kojima se nalaze molekule čiji je ulazak ovisan o lipidnim splavima (CD59, GPI-sidreni proteini). Zajedno s njima ulazi u $Arf6^+$ tubularne strukture (imaju manje kolesterola) koje sadrže zamjetne količine PIP_2. One vjerojatno imaju ulogu sortiranja, te se iz njih molekule mogu usmjeriti prema EEA-1-pozitivnim ranim endosomima, te tako postati dio glavnog (klatrinskog) endocitoznog puta, a nakon toga se mogu degradirati. S druge strane, mogu se usmjeriti u ranije opisan $Arf6^+$ reciklirajući odjeljak, te prema staničnoj membrani. Postoji također i mogućnost da iz sortirajućih $Arf6^+$ endosoma mogu prijeći u klasičan jukstanuklearan ERC (Tf^+ i $Rab11^+$), te se također na taj način reciklirati (57, 138).

1.4. MATEMATIČKO MODELIRANJE

Matematičko modeliranje je nastojanje da se matematičkim jezikom opiše neki sustav. Ono se ne koristi samo u prirodnim, već i u društvenim, tehničkim, informatičkim i drugim znanstvenim granama. Svrha matematičkog modeliranja je matematički precizno okarakterizirati ispitivani sustav i njegove elemente, te predvidjeti njegovo ponašanje kroz dulja vremenska razdoblja. Jedan od složenih sustava sastavljen od puno elemenata je i endocitoza kao vrlo važan stanični proces. Iako do danas u literaturi postoji mnoštvo podataka o endocitozi različitih molekula, često su ti podatci različiti i nedostatni. Stoga se u posljednjih nekoliko godina endocitozu pokušava staviti u matematičke okvire, a sve sa svrhom dobivanja što pouzdanijih podataka.

1.4.1. Matematički model endocitoze

Matematički model endocitoze je model više odjeljaka (engl. *multicompartment model*) koji opisuje prijenos internaliziranih molekula kroz više odjeljaka koji su međusobno povezani. Internalizirana molekula dolazi u rani endosom iz kojega se može usmjeriti ili u recikliranje (povratak na staničnu membranu) ili u lizosome u degradaciju. Molekule koje su izreciklirale mogu ponovno sudjelovati u sljedećim endocitoznim ciklusima. S druge strane, molekule usmjerene u degradaciju se trajno uništavaju, te na taj način dolazi do smanjivanja ukupnog broja molekula u stanici. Na dinamiku endocitoznog ciklusa utječe i sinteza novih molekula i njihov dolazak na staničnu površinu (185, 186, 187). Kinetički i mehanicistički model dva su najvažnija matematička modela endocitoze.

1.4.1.1. Kinetički model endocitoze

Svrha ovog matematičkog modela endocitoze (slika 17) je opisati kinetiku putovanja molekula kroz stanicu, te izmjeriti stope procesa putovanja molekula između različitih staničnih odjeljaka. Tijekom cijelog endocitoznog ciklusa, počevši od ulaska molekule u stanicu u trenutku t_0, odjeljci su definirani na temelju njihovog položaja na vremenskoj skali duž puta, te karakterizirani svojim svojstvima i stopama prijenosa koje su dane kao konstantne i izražene u zadanim vremenskim intervalima (najčešće u minutama). Pretpostavljeno je da proces prijenosa slijedi jednostavnu kinetiku prvoga reda, pa su stoga konstante direktno proporcionalne količini materijala dostupnog za prijenos. Ponekad se radi

jednostavnijeg izračuna neke od stopa definiraju kao brzine koje se određuju proizvoljno i ne ovise o ostalim parametrima sustava, odnosno dijelovi procesa opisuju se kao linearne funkcije (185, 188).

Slika 17. Kinetički model endocitoze

Slika 17. Kinetički model endocitoze.

Stope su pridružene odgovarajućim koracima endocitoznog ciklusa prema njihovome slijedu: endocitoza (k_e), recikliranje (k_r) i degradacija (k_x). Radi matematičke jednostavnosti u modelu se pretpostavlja da su sinteza i degradacija linearni procesi, tj. da su brzina sinteze (k_s) i brzina degradacije (k_x) konstante koje su uzete proizvoljno i ne ovise o drugim promatranim parametrima u modelu. Broj molekula na staničnoj površini ovisan je o njihovoj sintezi, endocitozi, recikliranju i degradaciji (prilagođeno prema referenci 185).

1.4.1.2. Mehanistički model endocitoze

Ovaj matematički model endocitoze ima za svrhu opisati specifične mehanizme endocitoznog ciklusa, te izmjeriti parametre prijenosa molekula unutar stanice ovisno o biokemijskim i biofizičkim karakteristikama samih molekula i drugih komponenti endocitoznog ciklusa. Ovaj tip matematičkog modela rjeđe se primjenjuje od kinetičkog modela endocitoze.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Prvenstveni cilj ovoga rada bila je karakterizacija *konstitutivne internalizacije površinskih molekula*, i to posebice MHC molekula I razreda. Nadalje, dio istraživanja bio je posvećen i B podjedinici toksina kolere (CtxB), te transferinu (Tf), odnosno njegovom receptoru (TfR).

Internalizacija predstavlja neto gubitak molekula sa stanične površine, a preduvjet za internalizaciju je endocitoza, odnosno ulazak molekula u stanicu. Nakon procesa endocitoze, molekule se mogu reciklirati (vratiti ponovno na staničnu površinu), zadržavati (retinirati) u staničnoj unutrašnjosti, ali i degradirati se (trajno se uništiti). Dok recikliranje umanjuje vrijednost internalizacije, retencija, kao i degradacija tu vrijednost povećavaju. Stoga nam je bio cilj uspostaviti model za praćenje svake od navedenih komponenti ovog izrazito složenog procesa. Kao preduvjet postizanja tog cilja, uspostavili smo kontrolne modele koji su više ili manje prethodno bili poznati iz literature (CtxB i TfR/Tf). Naime, TfR i Tf su nam poslužili za uspostavljanje modela klatrinske endocitoze i recikliranja, a CtxB za uspostavljanje modela klatrinske, kaveolarne i Cdc42 ovisne endocitoze s posljedičnom degradacijom.

Kako je sortiranje molekula osnova svih ovih događanja, bitno je bilo ispitati u kojim staničnim odjeljcima i na temelju čega se određuje sudbina pojedine molekule. Posebnu pažnju posvetili smo značaju konformacije, a kao model koristili smo MHC molekule I razreda. Bitno nam je bilo ispitati da li se i gdje konformirane i nekonformirane MHC-I molekule razdvajaju tijekom svog endocitoznog puta.

Eksperimentalna mjerenja koristili smo za razvijanje matematičkog modela i uz pomoć računalne simulacije napravili kinetičku analizu endosomalnih putova. Pritom smo definirali sljedeće pojmove za modeliranje: stopu endocitoze, stopu recikliranja i stopu degradacije.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. LABORATORIJSKE ŽIVOTINJE

U pokusima su korišteni miševi genetski čistih sojeva BALB/c ($H2^d$), te CBA (($H2^b$) iz uzgojne kolonije Medicinskog fakulteta u Rijeci. Životinje su hranjene standardnim keksima za laboratorijske životinje (Biotehnički fakultet, Domžale) i vodovodnom vodom *ad libitum.*

3.2. MATERIJAL

3.2.1. Kemikalije

Aluminij-klorid-heksahidrat, 01169, Kemika, Hrvatska
Biotin/Streptavidin-POD kit za blotiranje, blokiranje i kemiluminiscenciju, 1 559 097, La Roche, Švicarska
Brefeldin A, B-7651, Sigma, Njemačka
Cikloheksimid, C-6255, Sigma, Njemačka
DABCO (1,4-Diazabicyclo [2.2.2.] octane, Triethzlenediamine), D-2522, Sigma, Njemačka
Dimethylsulfoxid (DMSO), 2931, Merck, Njemačka
Dynasore monohydrate, D7693, Sigma, Njemačka
EDTA (Ethylenediaminetetraacetat-Na_2-salt), 11280, Serva, Njemačka
Fetalni telećI serum (FCS; engl. *fetal calf serum*), 011-06290M, Gibco, SAD
Fiksir, Paul-Trade Matulji, Hrvatska
Filipin III (iz Streptomyces filipinensis), F-4767, Sigma, Njemačka
Glicerol, 0111901, Kemika, Hrvatska
Hepes, 25245, Serva, Njemačka
Klorpromazin hidroklorid (2-Chloro-10-(3dimethylaminopropyl)phenothiazine hydrochloride), C-0982, Sigma, Njemačka
Konkanamicin A, C-9075, Sigma, Njemačka
Kloridna kiselina, 1 824 301, Kemika, Hrvatska
Kodak Biomax film, 25-0098-21, Amersham, Njemačka
Leupeptin, L-9783, Sigma, Njemačka
L-Glutamin, 289, Merck, Njemačka

LY294002, L-9908, Sigma, Njemačka

Magnezij-klorid, $MgCl_2$ x H_2O, 5831, Merck, Njemačka

Markeri – proteinski plavi za SDS-PAGE, P-1677, Sigma, Njemačka

MEM (Minimal Essential Medium), 041-01090, Gibco, SAD

Metanol, 1 308 901, Kemika, Hrvatska

metil – β– ciklodekstrin, C 4555, Sigma, Njemačka

Moviol 4-88, #81381, Fluka, Njemačka

Natrij-dihidrogenfosfat-2-hidrat,NaH_2PO_4 x $2H_2O$, 7647-14-8, Kemika, Hrvatska

Natrij-fluorid, 14079, Kemika, Hrvatska

di-Natrij-hidrogenfosfat-12-hidrat,Na_2HPO_4 x $12H_2O$, Kemika, Hrvatska

Natrij-hidroksid, NaOH, 1310-73-2, Kemika, Hrvatska

Natrij-klorid, NaCl, 7647-14-5, Kemika, Hrvatska

Nonidet P-40 (NP-40), N-6507, Sigma, Njemačka

Paraformaldehid, P-6148, Sigma, Njemačka

Pacitaxel, semisynthetic, T-7191, Sigma, Njemačka

Penicilin, 113944, Grunenthal, Njemačka

Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), P7626, Sigma, Njemačka

Pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane), T-7640, Sigma, Njemačka

Propidij jodid, 33671, Serva, Njemačka

Protein A-sefaroza, 17-0780-01, Amersham, Njemačka

PVDF membrana za Western blot, 3010040, Roche, Švicarska

Razvijač, Paul-Trade Matulji, Hrvatska

rIFN-gamma, rekombinantni mišji IFN-γ, M3-RD48, Bender, Austrija

RPMI 1640 medium, 074-01800, Gibco, SAD

Sfingomijelinaza, S9396, Sigma, Njemačka

Sodium azide, NaN_3, 0601-13, Difco, SAD

Sodium vanadate, S-6383, Sigma, Njemačka

Streptavidin-fluorescein, 1 055 097, Boehringer Mannheim, Njemačka

Streptomicin sulfat, 10117, Merck, Njemačka

Sulfo NHS-LC-Biotin, 21 335, Pierce, SAD

SuperSignal West Pico supstrat za kemiluminiscenciju, 34080, Pierce, SAD

Tripansko modrilo, 37252, Serva, Njemačka

Tripsin, 25300062, Gibco, SAD

Tris-Hydroxymethyl-aminomethan, 708976, Boehringer Mannheim, Njemačka

Triton X-100, NEF936, Rohm&Haas, SAD

Tween-20 (polyoxyethylene-sorbitan monolaureat), P-1379, Sigma, Njemačka

Western blocking reagens, 1 921 673, Roche, Švicarska

3.2.2. Mediji i puferi

Bikarbonatni pufer

0,5 mM natrij karbonat (Na_2CO_3) i 45 mM natrij bikarbonat ($NaHCO_3$).

Kompletan RPMI 1640 medij

(medij za uzgoj hibridomskih linija)

Medij RPMI 1640, 2 mM L-glutamin, $5x10^{-5}$M 2-merkaptoetanol, 10 mM Hepes pH 7.2, 1x 10^5 U/L, penicilin 0,1 g/L, streptomicin sulfat, 0,05 g/L,gentamicin-sulfat i 5-10% fetalni goveđi serum (FCS).

Kompletan D-MEM medij

(medij za uzgoj J26, Balb 3T3 i HeLa staničnih linija)

Medij D-MEM, 2 mM L-glutamin, $1x10^5$ U/L penicilin, 0.1 g/L streptomicin-sulfat, 0,05 g/L gentamicin-sulfat i, 10% fetalni goveđi serum (FCS), 1% piruvat.

PBS (fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom)

140 mM natrijev klorid (NaCl), 2,7 mM kalijev klorid (KCl), 6,5 mM natrij-hidrogenfosfat-2-hidrat (Na_2HPO_4 x $2H_2O$), 1,5 mM kalij-dihidrogenfosfat (KH_2PO_4),, 0,7 mM kalcij-klorid ($CaCl_2$) i 0,7 mM magnezij-klorid-6-hidrat ($MgCl_2$ x $6H_2O$).

Medij za FACS (medij za imunofluorescenciju protočnim citometrom)

PBS, 10 mM EDTA, 20 mM Hepes (pH 7,2), 2% fetalni goveđi serum i, 0,1% natrijev azid (NaN_3).

Medij za smrzavanje stanica

10% dimetil-sulfoksid (DMSO), 20% fetalni goveđi serum i 70% medij RPMI.

Otopina za razaranje eritrocita

17 mM, tris-hidroksimetil-aminometan, 130 mM amonijev klorid (NH_4Cl), 10 mM EDTA i natrijev hidroksid (NaOH) do pH 7.2.

Otopina za razaranje stanica

0,15 M natrijev klorid (NaCl), 0,05 M Tris-Cl,, 1 mM EDTA, 1%NP-40 ili 1% digitonin, 0,02 % natrijev azid (NaN_3), 2 mM PMSF.

Otopina za ispiranje (imunoprecipitacija)

0,15 M Natrij klorid (NaCl), 2 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl (pH 7,5), 0,2% NP-40 ili 0,2% digitonin.

Otopina za denaturaciju

0,125 M Tris-Cl (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,1% bromfenolsko plavilo,30% glicerol.

Paraformaldehid

40g/L Paraformaldehid, 16,833 g/L natrijev dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4 x H_2O), 3,85 g/L natrijev hidroksid (NaOH), glukoza (5,4 g/L)

Pufer za biotinilaciju

50 mM Na-borat, pH 8,0, 150 mM natrijev klorid (NaCl)

Otopina za zaustavljanje biotinilacije (biotinylation stop solution)

Amonijev klorid (NH_4Cl) 50mM

Otopina za liziranje biotinom obilježenih staničnih proteina

50mM natrijev borat, 150 mM natrijev klorid (NaCl), 0,1 mg/mL fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), 1μg/mL aprotinin, 1μg/mL leupeptin, 1% NP-40

Uklopno sredstvo za fluorescentne mikroskopske preparate (Mowiol)

2,4 g Mowiol, 6 mL glicerol, 0,2 M Tris, 2,5% (0,6g) DABCO

Transfer pufer za western blotting (prema Towbinu)

25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% (v/v)metanol

TBS

20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,5

TTBS

20 mM Tris , 0,5 M NaCl, 0,05% Tween 20 pH 7,5

3.2.3. Laboratorijsko posuđe

Ploče za kulturu tkiva s 6 rupica, Greiner
Ploče za kulturu tkiva s 24 rupice, Greiner
Ploče za kulturu tkiva s 48 rupica, Costar
Ploče za kulturu tkiva s 96 rupica, Greiner
Ploče za ELISA s 96 rupica, Golias
Bočice za kulturu tkiva od 50 i 250 ml, Greiner

Petrijeve posude za uzgoj tkiva, Greiner

Ploče za neadherentne kulture s 12 rupica, Greiner 150 200

3.2.4. Monoklonska i poliklonska protutijela

3.2.4.1. Protutijela koja prepoznaju određene konformacije MHC molekula I razreda

U našim istraživanjima za detekciju MHC-I molekula koristili smo mPt specifična za određenu konformaciju molekula. Popis i specifikacija korištenih protu-MHC-I mPt prikazan je u tablici 2, a ispitivane konformacije MHC-I molekula prikazane su na slici 18.

Protu–HLA-I (klon W6/32); mišje IgG_{2a} protutijelo, vlastita proizvodnja

Protu–HLA-I (klon HC-10); mišje IgG_{2a} protutijelo, vlastita proizvodnja

Protu–HLA-I (klon MEM-147); mišje IgG_1 protutijelo, EXBIO, 11-242-M001

Protu–HLA-G_1 (klon MEM-G/1); mišje IgG_1 protutijelo, EXBIO, 11-291-M001

Protu-H2-L^d (klon 30-5-7); mišje IgG_{2a} protutijelo, vlastita proizvodnja

Protu- H2-L^d (klon 64-3-7); mišje IgG_{2b} protutijelo, vlastita proizvodnja

Za detekciju konformiranih ljudskih MHC-I molekula na svim ispitivanim staničnim linijama korišteno je mPt W6/32. Izuzetak čine eksperimenti u kojima su kolokalizirane konformirane i nekonformirane ljudske MHC-I molekule na J26-Cw6, J26-B7 i HeLa stanicama, te je u tim slučajevima za vizualizaciju konformiranih HLA-I molekula korišteno mPt MEM-147.

Tablica 2. Monoklonska protutijela protiv MHC-I molekula.

Protutijelo	Molekule koje prepoznaje	Izotip	Referenca
W6/32	α_2 domena konformiranih ljudskih MHC-I molekula (aleli lokusa A, B, C, G, E i F)	mišje IgG_{2a} protutijelo	174, 175, 189
MEM-147	konformirane ljudske MHC-I molekule (aleli lokusa A, B i C)	mišje IgG_1 protutijelo	190
HC-10	α_1 domena nekonformiranih ljudskih MHC-I molekula (aleli lokusa A, B i C)	mišje IgG_{2a} protutijelo	175, 176
MEM-G/1	Nekonformirane ljudske MHC-I molekule (aleli lokusa G)	mišje IgG_1 protutijelo	191, 192
30-5-7	α_2 domena konformiranih mišjih MHC-I molekula (alel d lokusa L)	mišje IgG_{2a} protutijelo	193
64-3-7	α_1 domena nekonformiranih mišjih MHC-I molekula (alel d lokusa L)	mišje IgG_{2b} protutijelo	193

Slika 18. Ispitivane konformacije MHC-I molekula

Slika 18. Ispitivane konformacije MHC-I molekula.
MHC-I molekule mogu se naći u dva osnovna oblika: konformirane (pune) MHC-I molekule koje su sastavljene od teškog lanca (prikazano plavo), β_2-m (prikazano žuto) i peptida (prikazano crveno), te kao nekonformirane MHC-I molekule koje su sastavljene samo od teškoga lanca (prikazano plavo) na koji ponekad može biti vezan β_2-m (prikazano žuto) (prilagođeno prema referencama 174-176).

3.2.4.2. Biljezi endocitoznih putova

Protu-TfR (klon R17); štakorsko IgG_{2a} protutijelo
Kolera toksin, podjedinica B – Alexa 488; Molecular Probes, C-34775
Kolera toksin, podjedinica B – Alexa 555; Molecular Probes, C-34776
Kolera toksin, podjedinica B – biotin; Molecular Probes, C-34779
Transferin – Alexa 488; Molecular Probes, T13342
Transferin – Alexa 555; Molecular Probes, T35352
Transferin – biotin; Molecular Probes, T23363

3.2.4.3. Biljezi endocitoznih odjeljaka

Caveolin Cy3, poliklonsko kunićje protutijelo; Sigma, C-3990
Protu-EEA-1, poliklonsko pileće protutijelo; Zymed, 40-5700
Protu-Rab11, poliklonsko kunićje protutijelo; Zymed, 71-5300
Protu-Lamp1, štakorsko IgG_{2a} protutijelo; Pharmingen, 55792
Protu-LBPA, mišje IgG_1 protutijelo (klon 6C4, dobijeno od Jean Gruenberga)
Protu-GM130, mišje IgG_1 protutijelo; Transduction Laboratories, 610823
Protu-CD63; mišje IgG_1 protutijelo; Pharmingen, 556019

Streptavidin Alexa 488; Molecular Probes, S11223

3.2.4.4. Sekundarna poliklonska protutijela

Protu-mišji Ig, kozje protutijelo konjugirano FITC; BD Pharmingen, 394031
Protu–mišji IgG_1 Alexa 488; Molecular Probes, A21121
Protu–mišji IgG_1 Alexa 555; Molecular Probes, A21127
Protu–mišji IgG_{2a} Alexa 488; Molecular Probes, A21131
Protu–mišji IgG_{2a} Alexa 555; Molecular Probes, A21137
Protu–štakorski IgG Alexa 488; Molecular Probes, A11006
Protu–štakorski IgG Alexa 555; Molecular Probes, A21434
Protu–pileći IgG Alexa 488; Molecular Probes, A11039
Protu–pileći IgG Alexa 555; Molecular Probes, A213477

3.2.5. Stanične linije

Za ispitivanje MHC-I molekula korišteno je pet staničnih linija koje su prikazane u tablici 3..

Tablica 3. Korištene stanične linije.

Stanična linija	Opis	Izražaj MHC-I molekula	Referenca
HeLa	ljudski adenokarcinom cerviksa	HLA-A3 i –A28, HLA-B15 i –B35, te HLA-CwX	194, 195
J26-Cw6	mišji fibroblasti stabilno transficirani s genom za HLA-Cw6 i genom za ljudski β_2-m	HLA-Cw6	196, 197
J26-B7	mišji fibroblasti stabilno transficirani s genom za HLA-B7 i genom za ljudski β_2-m	HLA-B7	196, 197
J26-G1	mišji fibroblasti stabilno transficirani s genom za HLA-G1 i genom za ljudski β_2-m	HLA-G1	196, 197
L-L^d	mišji fibroblasti transficirani genom za H2-L^d	H2-L^d	198

Za karakterizaciju endocitoznog puta B podjedinice toksina kolere korištena je i Balb 3T3 stanična linija.

3.3. METODE

3.3.1. Priprema monoklonskih protutijela

3.3.1.1. Održavanje hibridoma

Hibridomske linije koje luče monoklonska protutijela uzgajane su u kompletnom RPMI mediju na 37°C uz 5% CO_2 u plastičnim bočicama za uzgoj tkiva. Dugoročno su pohranjene u tekućem dušiku (-180 °C), zamrznute u mediju za smrzavanje.

3.3.1.2. Priprema monoklonskih protutijela iz supernatanta kulture

Iz iscrpljenih uzgoja hibridoma sakupljeni su supernatanti koji su nakon određivanja koncentracije mPt raspodijeljeni u manje alikvote, te do uporabe čuvani na –20 °C.

3.3.1.3. Proizvodnja ascitesa

Većina hibridoma uzgojena je u peritonealnoj šupljini pogodnog soja miševa (Balb/c, CBA, C57Bl/6), prethodno tretiranih s 0,4 ml Pristana. Uspješan rast hibridoma u peritonealnoj šupljini životinja je praćen proizvodnjom ascitesa koji je prikupljan peritonealnom punkcijom i pohranjen na –20 °C.

3.3.2. Uzgoj staničnih linija

3.3.2.1. Uzgoj adherentnih stanica

Adherentne stanice uzgajane su u plastičnim Petrijevim posudama s medijem D-MEM, na temperaturi od 37 °C i uz 5% CO_2. S obzirom na njivovu sklonost prijanjanju za plastiku, nakon nekoliko dana (3-5) uzgoja, stanice prekriju dno Petrijeve posude pa se mogu prebaciti u nove, gdje se uzgajanje nastavlja do željene gustoće.

3.3.2.2. Uzgoj neadherentnih stanica

Neadherentne stanice (stanice hibridoma) uzgajane su u mediju RPMI 1640, u plastičnim bočicama pri temperaturi od 37 °C i uz 5% CO_2. Neadherentne stanice slobodno plivaju u mediju i nakon nekoliko dana (1-3) uzgoja, mogu se prebaciti u nove bočice, gdje se uzgajanje nastavlja do željene gustoće.

3.3.3. Ispitivanje izražaja MHC molekula I razreda na staničnoj površini i u unutrašnjosti stanice metodom indirektne imunofluorescencije

3.3.3.1. Određivanje površinskog izražaja MHC molekula I razreda protočnom citometrijom

Adherirane stanice inkubirane na plastičnim Petrijevim posudama odvojeni su od podloge kratkom tripsinizacijom. Djelovanje tripsina zaustavljeno je dodavanjem desetorostrukog većeg volumena medija s 10% FCS. Stanice su isprane jednom u MEM mediju, a zatim resuspendirane u FACS-mediju. Broj stanica je podešen na 10^5/100 μl volumena za svaku epruvetu.

Stanice pripremljene na prethodno opisan način pomiješane su sa 100 μl razrijeđenog monoklonskog protutijela (komercijalnog u omjeru 1:100, proizvedenog u supernatantu u omjeru 1:1, ili ascitesu 1:500). Kao kontrola upotrebljena su mišja protutijela istog izotipa koja ne prepoznaju antigene na ispitivanim stanicama. Nakon inkubacije od 45 minuta na ledu (kako bi se spriječila endocitoza), stanice su dva puta isprane s 1 ml hladnog FACS medija. Na talog stanica koji je dobiven nakon drugog ispiranja dodana su sekundarna protutijela konjugirana s fluorescein-izotiocijanatom (FITC) i inkubirana 45 minuta. Stanice su ponovo dva puta isprane, a zatim resuspendirane u 0,5 ml hladnog FACS-medija s 1 μg/ml propidij-iodida.

Analiza stanica vršena je na protočnom citometru FACSCalibur (Becton-Dickinson, SAD). Pomoću izvora laserske svjetlosti valne duljine 488 nm može se odrediti relativna veličina i unutrašnja složenost (granuliranost) stanica, te detektirati emisija fluorokroma s obilježenih stanica. FITC emitira zelenu svjetlost (500-550 nm), a propidij-iodid crvenu (600-650 nm). Analizirano je 5000-10000 stanica koje svojom relativnom veličinom i unutrašnjom složenošću odgovaraju ispitivanim stanicama. Mrtve stanice isključene su iz analize na osnovu emisije crvene svjetlosti propidij-iodida koji ulazi samo u mrtve stanice. Analiza stanica vršena je pomoću programa CellQuestPro (CellQuestPro software Becton-Dickinson), a grafička obrada rezultata u programu za osobno računalo WinMDI 2.8. Rezultati su prikazani kao histogrami učestalosti broja stanica u odnosu na srednji intenzitet fluorescencije, odnosno kao grafički prikaz srednjeg intenziteta fluorescencije (MFI - engl. *mean fluorescence intensity*) ili postotka izražaja tijekom ispitivanog vremenskog razdoblja. *Postotak početnog izražaja* predstavlja omjer MFI u ispitivanom i nultom vremenu pokusa, dok *postotak izražaja* predstavlja omjer MFI vrijednosti tretiranih i netretiranih stanica (pH,

inhibitori...). Srednji intenzitet fluorescencije u datom vremenu uvijek je umanjen za odgovarajuću vrijednost analogne negativne kontrole u koju je dodano samo sekundarno protutijelo.

3.3.3.2. Ispitivanje površinskog izražaja MHC molekula I razreda konfokalnom mikroskopijom

Adherentne stanice uzgajane su u pločama u koje su prethodno stavljena sterilizirana pokrovna stakalca dok nisu prekrile 50-60% podloge. Nakon ispiranja s PBS fiksirane su 20 minuta u 4% PFA. Blokiranje nespecifičnih mjesta vršeno je 20 minuta u 1% BSA.

Primarno protutijelo je dodano kao supernatant stanične kulture u kojem su uzgajani hibridomi, kao ascites u prikladnom razrijeđenju, ili komercijalno protutijelo (razrjeđenje protutijela je vršeno u staničnom mediju s 10% FCS). Nakon 1h dodano je sekundarno protutijelo (razrijeđeno u PBSu) 30 minuta do 1 sat. Potom su stanice uklopljene. Između svakog koraka stanice su 3 puta isprane u PBSu. Svi koraci su vršeni na sobnoj temperaturi.

Preparati su slikani na konfokalnom mikroskopu u programu Olympus Fluoview FV300 (Olympus Optical Company, Tokyo, Japan) koristeći 60xPlanApo objektiv. U svakom preparatu 8-10 stanica je nasumično odabrano, te prikazano u različitim povećanjima koja zadovoljavaju obrazac razlučivanja. Slike jedne stanice koje su dobivene na jednom povećanju su prebačene u format TIFF, te procesuirane pomoću programa Fluoview, Version 4.3 FV 300 (Olympus Optical Company). Prezentacija slika je dovršena u programu Adobe Photoshop i Image Composer.

3.3.3.3. Određivanje omjera izražaja MHC molekula I razreda na staničnoj površini i u unutrašnjosti stanice protočnom citometrijom

Stanice pripremljene na prethodno opisan način (poglavlje 3.3.3.1.), fiksirane su 20 minuta na sobnoj temperaturi s 4%-tnim PFA i podijeljene u dva dijela. Jedan dio stanica je bez prethodne permeabilizacije obilježen specifičnim protu-MHC-I mPt kako bi se utvrdio površinski izražaj MHC-I molekula, dok je drugi dio stanica prije dodavanja 1° mPt probušen s 0,4%-tnim Tween 20 (20 minuta na sobnoj temperaturi) kako bi se utvrdio ukupan izražaj MHC-I molekula. Stanice su dva puta isprane u FACS puferu, te im je zatim dodano sekundarno protutijelo konjugirano s fluorescein-izotiocijanatom (FITC) i inkubirane 45 minuta. Stanice su ponovo dva puta isprane, a zatim resuspendirane u 0,5 ml hladnog FACS-medija. Analiza stanica vršena je na protočnom citometru. Postotak površinskog izražaja

MHC-I molekula dobiven je kao omjer MFI vrijednosti površinskog i MFI vrijednosti ukupnog izražaja MHC-I molekula pomnoženog sa 100. Unutarstanični izražaj MHC-I molekula dobiven je kao razlika 100% i postotka površinskog izražaja.

3.3.4. Utvrđivanje obrasca izražaja MHC molekula I razreda i njihova kolokalizacija s biljezima endosomalnih odjeljaka

Obrazac unutarstaničnog izražaja MHC-I molekula praćen je konfokalnom mikroskopijom. Ukratko, netretirane stanice, ili stanice koje su određeno vrijeme bile podvrgnute djelovanju nekog od inhibitora, fiksirane su 20 minuta u 4% PFA, te permeabilizirane 7 minuta u 0,5% TX-100, te zatim imunofluorescentno obilježene. Kako bi se ustanovio stupanj kolokalizacije (žuta fluorescencija, obzirom da su korištene samo crvena i zelena fluorescentna boja), zapaženi primjeri su slikani na konfokalnom mikroskopu a u slikama prikazani reprezentativni rezultati iz 3-5 ponovljenih pokusa, na način kao što je ranije opisano (poglavlje 3.3.3.2.)

3.3.5. Ispitivanje utjecaja sniženog pH na izražaj MHC molekula I razreda

3.3.5.1. Ispitivanje utjecaja sniženog pH na izražaj MHC molekula I razreda protočnom citometrijom

Stanice su ekvilibrirane u svježem mediju fiziološkog pH (RPMI 1640 ± 10% FCS). Zatim su centrifugirane, isprane s PBS, nakon čega im je dodan prethodno pripremljen zakiseljen medij (±10% FCS) kojem je pH dva puta podešavan sa 1M HCl na željenu vrijednost kako bi ostao stabiliziran. U nultom vremenu, kao i nakon točno određenog vremenskog razdoblja, uzorci su odvojeni i izražaj ispitivanih molekula određen indirektnom imunofluorescencijom na protočnom citometru. Postotak promjene izražaja MHC-I molekula uslijed kiselog pH dobiven je kao omjer MFI vrijednosti tretiranih i netretiranih stanica pomnožen sa 100.

3.3.6. Praćenje endocitoze i endocitoznog puta ispitivanih molekula

Kinetika endocitoze, kao i endocitozni put, internaliziranih molekula praćen je na nekoliko načina: protočnom citometrijom, konfokalnom mikroskopijom i imunoprecipitacijom nakon površinske biotinilacije.

3.3.6.1. Protočna citometrija

3.3.6.1.1. Praćenje spontane internalizacije usljed djelovanja cikloheksimida

Neposredno prije izvođenja pokusa, stanice su ekvilibrirane u svježem mediju 30 minuta do 1 sat. Potom je dodan cikloheksimid (CHX) 15 μg/ml, te su u nultom vremenu, kao i nakon odgovarajućeg vremenskog razdoblja, uzorci odvojeni i analizirani indirektnom imunofluorescencijom na protočnom citometru.

3.3.6.1.2. Praćenje spontane internalizacije nakon površinskog vezivanja monoklonskog protutijela ili liganda

Nakon kultivacije u mediju neposredno prije izvođenja pokusa stanicama je dodano odgovarajuće monoklonsko protutijelo (osim u kontrolni uzorak), nakon čega su inkubirane 30-45 minuta na +4 °C. Potom su centrifugirane, isprane 2 puta u FACS puferu i dodan im je svježi medij bez protutijela, nakon čega su prebačene na 37 °C. U nultom vremenu, kao i nakon odgovarajućeg vremenskog razdoblja, uzorci su odvojeni i analizirani indirektnom imunofluorescencijom na protočnom citometru. U slučaju kada se pratio učinak inhibitora na poluživot molekula na staničnoj površini, stanice su prije inkubacije s mPt prethodno bile tretirane, kako je navedeno u pokusu, s inhibitorom koji je nadalje cijelo vrijeme bio prisutan.

3.3.6.2. Konfokalna mikroskopija

3.3.6.2.1. Praćenje kontinuirane internalizacije

Protokol je modificiran prema već ranije opisanom (199). Ukratko, stanice su površinski obilježene odgovarajućim mPt. Potom je protutijelo uklonjeno, a stanicama dodan svjež medij prethodno zagrijan na 37°C. Nakon navedenog vremena internalizacije stanice su kratkotrajno zakiseljene (pH=2,0; 45 sek.) kako bi se uklonilo preostalo površinski vezano mPt, isprane 3 puta hladnim PBSom, te fiksirane. Potom su permeabilizirane, imunofluorescentno obilježene i analizirane konfokalnom mikroskopijom kako je opisano.
Ako je bio praćen utjecaj inhibitora, stanice su najprije tretirane inhibitorom a zatim površinski obilježavane. Inhibitor je također bio prisutan i cijelo vrijeme tijekom internalizacije.

3.3.6.2.2. Praćenje pulse-chase internalizacije

Protokol je također modifikacija ranije opisanog protokola (199). Stanice su nakon površinskog obilježavanja (4 °C, 1h) i internalizacije na 37°C (*pulse*) površinski zakiseljene kako bi se uklonilo preostalo površinsko mPt. Potom je dopuštena daljnja internalizacija određeno vrijeme (*chase*), nakon čega su stanice imunofluorescentno obilježene i analizirane konfokalnom mikroskopijom. U slučaju ispitivanja utjecaja inhibitora, protokol je vršen na gore objašnjen način.

3.3.7. Imunoprecipitacija (praćenje degradacije molekula)

3.3.7.1. Biotinilacija površinskih proteina

Stanice su tri puta isprane hladnom otopinom PBS s $MgCl_2$ i $CaCl_2$ nakon čega je na 10^6 stanica dodan 1mL pufera za biotinilaciju i 5 µl biotina-7-NHS (D-biotinoyl-β-aminocaproic acid-N-hydroxysuccinimide ester). Nakon toga, stanice su inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena na ledu tijekom slijedećih 15 minuta, dodavanjem 50 µL/ml otopine za zaustavljanje biotinilacije (završna koncentracija 50 mM NH_4Cl). Stanice su potom 2 puta isprane s hladnim PBS, nakon čega su lizirane dodatkom 1ml otopine za razaranje pH 7,4 (osim u slučaju kada je praćena promjena konformacije izdvojenih molekula u kiselom lizatu, no tada je pH naveden u prikazu pokusa).

3.3.7.2. Imunoprecipitacija monoklonskim protutijelima

Lizati površinski biotinom obilježenih stanica prethodno su pročišćeni sa 50 µl protein A-sefaroze, te inkubirani s monoklonskim protutijelom (60 minuta na +4°C), na što je dodano 50 µl 50% otopine sefaroze s vezanim proteinom A. Imuni kompleksi, vezani za protein-A sefarozu, istaloženi su centifugiranjem i isprani tri puta u otopini za ispiranje te na kraju jedanput u 10 mM Tris-Cl (pH 7,5). Imunoprecipitirani antigeni su zatim denaturirani grijanjem na 96 °C tijekom 5 minuta u otopini za denaturaciju u nereducirajućim uvjetima.

3.3.7.3. Gel-elektroforeza

Proteini dobiveni u postupku imunoprecipitacije razdvojeni su poliakrilamid gel-elektroforezom (SDS-PAGE) na 13% gelu. Nakon elektroforeze, proteini obilježeni biotinom i razdvojeni na gelu su prebačeni na PVDF membranu (bloting).

3.3.7.4. Elektroblot proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu

Nakon elektroforeze proteina obilježenih biotinom, gel je inkubiran 30 minuta u transfer puferu. PVDF membrana za blotiranje navlažena je u u metanolu i ekvilibrirana u transfer puferu, te je potom složen kompleks za bloting koji se sastoji od filter papira, gela i membrane. On se uklopljen u transfer-puferu blotira 1-3 sata na 60 V/200 mA.

3.3.7.5. Kemiluminiscencija

Proteini blotirani na membrani i obilježeni biotinom postaju vidljivi nakon inkubacije membrane sa streptavidin-peroksidazom koja razgradi supstrat luminol/iodofenol. Kemiluminiscentni signal se zabilježi izlaganjem membrane na film. Vrijeme ekspozicije je različito: od nekoliko sekundi do 30 minuta ili čak i duže. Intenzitet signala je kvantificiran pomoću programa ImageJ.

3.3.8. Praćenje recikliranja molekula

Recikliranje ispitivanih molekula praćeno je pomoću četiri različita protokola.

3.3.8.1. Protokol recikliranja A

Protokol je prilagođen prema protokolu opisanom u referenci 140. Ukratko, stanicama je dodan Tf obilježen fluorescentnom bojom, te je dozvoljena njegova internalizacija kroz 60-90 minuta. Nakon toga stanice su kratkotrajno zakiseljene (pH 2, 1 minutu) kako bi se uklonio Tf s površine, te su stanice dalje inkubirane u različitim vremenskim intervalima. Potom su stanice praćene konfokalnom mikroskopijom ili protočnom citometrijom. Dio Tf-a koji reciklira gubi se iz stanice, te je smanjenje intenziteta fluorescencije mjera recikliranja Tf-a. On je dodatno kvantificiran ukoliko je korištena protočna citometrija. Tako je postotak recikliranja Tf-a izražen je kao postotak Tf-a koji je reciklirao u odnosu na Tf prisutan u stanici u početnom vremenu recikliranja, odnosno dobiven je kao razlika 100% i kvocijenta MFI vrijednosti promatranog vremenskog intervala i MFI vrijednosti nakon internalizacije (pH 2) pomnoženog sa 100. Kao negativna kontrola korištene su stanice kojima je bio dodan neobilježeni Tf.

Ukoliko se pratio učinak inhibitora na recikliranje Tf-a, on je izražen na način da je normaliziran prema kontroli, odnosno postotak recikliranja Tf-a za svaki ispitivani uvjet (inhibitor) dobiven je kao omjer recikliranog Tf-a uz naznačeni inhibitor (razlika MFI

vrijednosti 90 minuta po internalizaciji, pH 2 i MFI vrijednosti nakon 20 minuta recikliranja uz naznačeni inhibitor) i recikliranog Tf-a u čistom mediju (razlika MFI vrijednosti 90 minuta po internalizaciji, pH 2 i MFI vrijednosti nakon 20 minuta recikliranja u čistom mediju) pomnožen sa 100.

3.3.8.2. Protokol recikliranja B

Protokol je prilagođen prema protokolu opisanom u referenci 200. Ukratko, molekule su bile površinski obilježene protutijelom nakon čega je puštena njihova internalizacija tijekom 60-90 minuta u čistom mediju ili u prisustvu naznačenog inhibitora. Stanice su zatim kratkotrajno zakiseljene (pH 2, 1 minutu) kako bi se uklonilo površinsko protutijelo, te su stanice dalje inkubirane u različitim vremenskim intervalima u prisustvu fluorescentno obilježenog sekundarnog protutijela u mediju sa ili bez inhibitora. Naime, očekivano je da će samo one molekule koje se vrate na staničnu površinu (recikliraju) moći vezati sekundarno protutijelo. Intenzitet fluorescencije u različitim vremenskim intervalima recikliranja praćen je ili protočnom citometrijom ili konfokalnom mikroskopijom. Ukoliko je recikliranje molekula praćeno protočnom citometrijom, postotak recikliranja molekula izražen je kao postotak molekula koje su reciklirale u odnosu na internalizirane molekule, odnosno dobiven je kao kvocijent MFI vrijednosti promatranog vremenskog intervala recikliranja i razlike MFI vrijednosti u nultom vremenu internalizacije i MFI vrijednosti 90 minuta nakon internalizacije (pH 7) pomnoženog sa 100. Kao negativna kontrola korištene su stanice inkubirane u prisustvu samo sekundarnog protutijela.

Ukoliko je praćen učinak inhibitora na recikliranje molekula, on je izražen na način da je normaliziran prema kontroli, odnosno postotak recikliranja molekula za svaki ispitivani uvjet dobiven kao omjer recikliranih molekula uz naznačeni inhibitor (MFI vrijednost 40 minuta po recikliranju uz naznačeni inhibitor) i recikliranih HLA-I molekula u čistom mediju (MFI vrijednost 40 minuta po recikliranju u čistom mediju) pomnožen sa 100, uz uvjet da je internalizacija provedena u istim uvjetima.

3.3.8.3. Protokol recikliranja C

Protokol je prilagođen prema protokolu opisanom u referenci 141. Ukratko, molekule su bile površinski obilježene protutijelom nakon čega je puštena njihova internalizacija tijekom 60-90 minuta. Stanice su zatim kratkotrajno zakiseljene (pH 2, 1 minutu) kako bi se uklonilo površinsko protutijelo, te su stanice dalje inkubirane u različitim vremenskim

intervalima u mediju bez sekundarnog protutijela. U svim naznačenim vremenskim intervalima stanice su ponovno kratkotrajno zakiseljene kako bi se uklonile novopristigle molekule s površine stanice (molekule koje su u tom razdoblju reciklirale). Potom su stanice fiksirane i probušene i dodano im je sekundarno protutijelo kako bi se detektirale molekule koje su ostale u unutrašnjosti stanice (nisu reciklirale). Stanice su analizirane protočnom citometrijom. Postotak recikliranja molekula izražen je kao postotak molekula koje su reciklirale u odnosu na internalizirane molekule, odnosno dobiven je kao razlika 100% i kvocijenta MFI vrijednosti promatranog vremenskog intervala i MFI vrijednosti nakon 90 minuta internalizacije (pH 2) pomnoženog sa 100. Kao kontrolu koristili smo stanice kojima je nakon fiksacije i bušenja bilo dodano sekundarno protutijelo bez prethodnog dodavanja primarnog protutijela.

3.3.8.4. Modifikacija protokola recikliranja C

Molekule su bile površinski obilježene protutijelom nakon čega je puštena njihova internalizacija tijekom 60-90 minuta. Stanice su zatim kratkotrajno zakiseljene (pH 2, 1 minutu) kako bi se uklonilo površinsko protutijelo, te su stanice dalje inkubirane u različitim vremenskim intervalima u mediju bez sekundarnog protutijela. U svim naznačenim vremenskim intervalima jedan dio stanica je ponovno kratkotrajno zakiseljen kako bi se uklonile novopristigle molekule s površine stanice, a drugi dio stanica u navedenim vremenima nije bio tretiran s kiselim pH kako bi paralelno pratili i ukupan izražaj molekula. Potom su stanice fiksirane i probušene i dodano im je sekundarno protutijelo, te analizirane protočnom citometrijom.

Postotak recikliranih + degradiranih molekula dobiven je kao razlika 100% i kvocijenta MFI vrijednosti stanica koje su nakon recikliranja bile tretirane s pH 2 i MFI vrijednosti internaliziranih molekula (90 minuta internalizacije=0 minuta recikliranja; pH 2) pomnoženog sa 100.

Postotak degradiranih molekula dobiven je kao razlika 100% i kvocijenta MFI vrijednosti stanica koje nakon recikliranja nisu bile tretirane s kiselim pH i MFI vrijednosti internaliziranih molekula (90 minuta internalizacije; pH 2) pomnoženog sa 100.

Postotak recikliranih molekula dobiven je kao razlika tih dvaju postotaka.

3.3.9. Ispitivanje smještanja molekula u membranskim mikrodomenama

3.3.9.1. Osnovna načela tretmana stanica s neionskim detergentima

Osnovna načela tretmana stanica s neionskim detergentima i njihovo djelovanje prikazano je na slici 19.

Slika 19. Osnovna načela djelovanja neionskih detergenata na membranske molekule

Slika 19. Osnovna načela djelovanja neionskih detergenata na membranske molekule.
Nakon hladnog tretmana neionskim detergentima molekule koje se nalaze u membranama otpornim na njegovo djelovanje (DRM; engl. *detergent resistant membranes*; lipidne splavi), moći će se i dalje vizualizirati. Suprotno tome, molekule koje se nalaze u membranama osjetljivim na djelovanje detergenta (DSM; engl. *detergent soluble membranes*), uklanjaju se i više se ne uočavaju (protokol prilagođen prema referenci 138).

3.3.9.2. Ispitivanje smještaja molekula u membranskim mikrodomenama na staničnoj površini

Ukoliko se želio pratiti samo površinski smještaj ispitivanih molekula u lipidnim splavima, molekule su na 4 °C površinski obilježene pomoću odgovarajućeg mPt, te su 1 minutu tretirane na ledu (osim ukoliko nije drugačije navedeno) s 0,5%-tnim Tx-100. Nakon toga su isprane 1-2 puta u hladnom PBSu, fiksirane u 4% PFA 20 minuta, inkubirane s specifičnim 2° pt tijekom 45 minuta i analizirane konfokalnom mikroskopijom.

3.3.9.3. Ispitivanje smještaja molekula u membranskim mikrodomenama u cijeloj stanici

Ukoliko se želio pratiti smještaj molekula u lipidnim splavima u cijeloj stanici, stanice su prethodno ohlađene, te na ledu (ako nije navedeno drugačije) tretirane s 0,5%-tnim Tx-100 tijekom jedne minute. Nakon toga su isprane 1-2 puta u hladnom PBSu, fiksirane u 4% PFA, permeabilizirane s 0,5%-tnim Tx-100 7 minuta. Stanicama je zatim dodano odgovarajuće 1° mPt (1 sat), stanice su isprane 2 puta u PBSu, inkubirane 45 minuta s 2° pt, ponovno 2 puta isprane u PBSu, uklopljene i analizirane konfokalnim mikroskopom.

3.3.9.4. Ispitivanje smještaja molekula u membranskim mikrodomenama nakon tretmana s kemijskim inhibitorima

Ukoliko se želio ispitati utjecaj kemijskih inhibitora na smještaj molekula u membranskim mikrodomenama, kako na površini tako i u cijeloj stanici, stanice su prethodno bile tretirane na 37 °C s naznačenim inhibitorom. Od inhibitora korišteni su: MβCD (8 μM) i sfingomijelinaza (5 IU/ml).

3.3.10. Umjetno stvaranje nekonformiranih MHC-I molekula na staničnoj površini

HeLa stanice su kratkotrajno (1 minutu) izložene kiselom pH (2,0), 2 puta isprane u PBSs, te proslijeđene na dalji postupak. Osnovni princip postupka prikazan je na slici 20.

Slika 20. Umjetno stvaranje nekonformiranih MHC-I molekula na staničnoj površini

Slika 20. Umjetno stvaranje nekonformiranih MHC-I molekula na staničnoj površini.
HeLa stanice su kratkotrajno (1 minuta) izložene mediju kisele pH vrijednosti (pH 2,0), isprane dva puta u PBSu, te proslijeđene na daljnji postupak.

3.3.11. Matematičko modeliranje

Za matematičko modeliranje i simulacije endocitoznih procesa koristili smo programski paket Mathematica (Wolfram Research Europe Ltd.).

3.3.12. Statistička obrada podataka

Rezultati dobiveni istraživanjem analizirani su uporabom računalne aplikacije Sigma Plot Scientific Graphing System, v8.0. Podaci su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Statistička značajnost izračunata je pomoću Student t-testa. Ukoliko nije rađena statistička obrada podataka, prikazani rezultati su reprezentativni primjeri 2-6 puta ponovljenih eksperimenata.

4. REZULTATI

4.1. IZRAŽAJ I STANIČNA RASPODJELA MHC MOLEKULA I RAZREDA

U ovome radu praćene su MHC molekule I razreda, i to: humane MHC molekule I razreda (HLA-B7, HLA-Cw6 i HLA-G1), te mišje MHC molekule I razreda (H2-L^d). Izražaj humanih MHC molekula I razreda, kako na površini stanice tako i u staničnoj unutrašnjosti, praćen je na mišjim fibroblastima (J26 stanična linija) transficiranim s specifičnim HLA-I alelom, te na HeLa staničnoj liniji. HLA-B7 molekule su praćene na J26-B7 staničnoj liniji, HLA-Cw6 molekule na J26-Cw6 staničnoj liniji, HLA-G1 na J26-G1 staničnoj liniji. HeLa stanična linija izražava samo klasične humane MHC molekule I razreda (HLA-A, HLA-B i HLA-C molekule) dok neklasične MHC molekule I razreda na HeLa staničnoj liniji nisu izražene, te su stoga na HeLa staničnoj liniji praćene sve klasične HLA-I molekule. Mišje MHC-I molekule praćene su na L-L^d fibroblastima.

MHC-I molekule izražavaju se u dva različita oblika: *konformirane molekule* (pune molekule) koje predstavljaju stabilne trimolekularne komplekse sastavljene od teškog lanca, β_2-mikroglobulina i peptida, te *nekonformirane molekule* (prazne molekule) koje su sastavljene samo od teškog lanca i eventualno mogu na sebe imati vezan β_2-mikroglobulin. Za vizualizaciju ispitivanih molekula koristili smo paletu monoklonskih protutijela (mPt): *mPt W6/32* koje prepoznaje konformirane HLA-I molekule, *mPt HC-10* koje prepoznaje nekonformirane klasične HLA-I molekule, *mPt MEM-G/1* koje prepoznaje nekonformirane HLA-G1, *mPt 30-5-7* za konformirane H2-L^d molekule, te *mPt 64-3-7* za nekonformirane H2-L^d molekule. Nadalje, u iznimnim slučajevima, za detekciju konformiranih klasičnih MHC-I molekula, koristili smo i *mPt M-147*.

4.1.1. Površinski izražaj MHC molekula I razreda

Površinski izražaj konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda praćen je metodom indirektne imunofluorescencije na nepermeabiliziranim stanicama metodoma protočne citometrije ili konfokalne mikroskopije. U svrhu povećana izražaja MHC molekula I razreda L-L^d stanična linija bila je tretirana s IFNγ tijekom 48h (kao i u svim daljnjim pokusima). IFNγ nije utjecao na promjenu obrasca izražaja ispitivanih molekula (nije prikazano).

Slika 21. Izražaj MHC molekula I razreda na staničnoj površini

Slika 21. Izražaj MHC molekula I razreda na staničnoj površini.

Površinski izražaj konformiranih i nekonformiranih molekula (HLA-B7, HLA-G1, HLA-Cw6, H2- L^d i klasičnih MHC-I molekula na HeLa staničnoj liniji) je prikazan metodom protočne citometrije (a), te konfokalne mikroskopije (b) bez permeabilizacije stanične membrane. Mjerna crta = 20 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

U uvjetima ustaljenog stanja (engl. *steady state*) konformirane molekule svih alela su dobro izražene na staničnoj površini, s tim da najjači izražaj pokazuju klasične konformirane HLA-I molekule na HeLa staničnoj liniji (slika 21a i 1b /HLA-B7, HLA-Cw6, HLA-G1, HeLa i H2-L^d). Nekonformirane molekule HLA-Cw6, H2-L^d i nekonformirane klasične HLA-I molekule na HeLa staničnoj liniji su površinski relativno dobro izražene, iako znatno manje nego konformirane molekule istog alela (slike 21a i 21b / HLA-Cw6, HeLa i H2-L^d). Nekonformirane HLA-B7 molekule pokazuju slabiji površinski izražaj od nekonformiranih HLA-Cw6, H2-L^d i nekonformiranih klasičnih MHC-I molekula na HeLa staničnoj liniji (slike 21a i 21b). Naposljetku, nekonformirane HLA-G1 molekule na staničnoj površini se ne mogu detektirati niti jednom metodom indirektne imunofluorescencije (slika 21a i 21b /HLA-G1).

4.1.2. Stanična raspodjela MHC molekula I razreda

4.1.2.1. Omjer raspodjele MHC molekula I razreda između stanične površine i unutrašnjosti stanice

Omjer izražaja konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda na staničnoj površini i u njezinoj unutrašnjosti praćen je protočnom citometrijom na staničnim linijama: J26-B7, J26-Cw6, J26-G1, L-L^d i HeLa. U tu svrhu na jednom dijelu stanica su određene samo površinske, a u drugom dijelu stanica ukupne MHC-I molekule. Kao kontrola korištene su fiksirane i permeabilizirane stanice kojima je dodano samo sekundarno protutijelo. Rezultat je izražen kao postotni omjer površinskog i ukupnog staničnog srednjega intenziteta fluorescencije (engl. *mean fluorescence intensity, MFI*).

Slika 22. Omjer raspodjele konformiranih i nekonformiranih molekula istog MHC-I alela između unutrašnjosti i površine stanice

Slika 22. Omjer raspodjele konformiranih i nekonformiranih molekula istog MHC-I alela između unutrašnjosti i površine stanice.

Omjer raspodjele konformiranih i nekonformiranih molekula MHC-I molekula (HLA-B7, HLA-G1, HLA-Cw6, H2-L^d i klasičnih MHC-I molekula na HeLa staničnoj liniji) analiziran je protočnom citometrijom. Odgovarajuće mPt je vezano ili na nepermeabilizirane stanice (površinski izražaj) ili na prethodno permeabilizirane stanice (ukupni izražaj), dodano je sekundarno protutijelo (protu mišji IgG FITC), te su stanice analizirane protočnom citometrijom. Rezultat je izražen kao srednja vrijednost postotnog omjera površinskog i ukupnog staničnog MFI ± standardna devijacija (n=4).

U uvjetima ustaljenog stanja (engl. *steady state*) konformirane MHC-I molekule se pretežno nalaze na staničnoj površini. Nekonformirane molekule HLA-B7, HLA-Cw6, H2-L^d, te klasične nekonformirane HLA-I molekule na HeLa staničnoj liniji iako se djelomično nalaze na staničnoj površini, pretežito su smještene u unutrašnjosti stanice (slika 22). Izuzetak su nekonformirane HLA-G1 molekule koje se nalaze isključivo u unutrašnjosti stanice (slika 22 i slika 21a i 21b/HLA-G1).

4.1.2.2. Obrazac stanične raspodjele MHC molekula I razreda

Obrazac raspodjele konformiranih i nekonformiranih, odnosno punih i praznih MHC-I molekula na staničnoj površini i u unutrašnjosti stanice dobiven je metodom konfokalne mikroskopije.

Slika 23. Obrazac stanične raspodjele konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda

Slika 23. Obrazac stanične raspodjele konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda. Stanice J26-B7, J26-Cw6, J26-G1, L-L^d i HeLa su fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano specifično mPt, te izotip-specifično sekundarno Pt. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Analizom obrasca stanične raspodjele MHC molekula I razreda uočava se jak površinski izražaj konformiranih, odnosno slab površinski izražaj nekonformiranih molekula, koje se, prema tome nalaze uglavnom unutar stanice. Također je zamjetan različit obrazac raspodjele konformiranih i nekonformiranih molekula istoga alela unutar stanice. Naime, konformirane HLA-B7 molekule se unutar stanice nalaze dominantno u jukstanuklearnom području, za razliku od nekonformiranih molekula istoga alela koje se nalaze u obliku citoplazmatskih difuznih vezikularnih tvorbi. Vrlo sličan obrazac unutarstanične raspodjele konformiranih i nekonformiranih HLA molekula I razreda dobili smo i za HLA-G1 molekule (slika 23). Za razliku od HLA-B7 i HLA-G1 molekula, HLA-Cw6, H2-L^d te klasične HLA molekule I razreda na HeLa staničnoj liniji pokazuju nešto drugačiji obrazac unutarstanične raspodjele. Naime konformirane HLA-Cw6, H2-L^d i konformirane klasične molekule na HeLa staničnoj liniji smještene su također jukstanuklearno u tubulovezikularnim formacijama, ali se mogu naći i u vezikularnim tvorbama smještenim perinuklearno. Nadalje, nekonformirane HLA-Cw6, H2-L^d i nekonformirane klasične molekule na HeLa staničnoj liniji nisu raspršene po staničnoj citoplazmi poput nekonformiranih HLA-B7 i nekonformiranih HLA-G1 molekula,

već se nalaze u većim vezikularnim tvorbama koje su smještene dominantno u perinuklearnoj regiji (slika 23).

4.1.2.3. Međusobna kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda

U prethodnim rezultatima pokazano je da konformirane i nekonformirane MHC molekule I razreda istoga alela pokazuju različiti obrazac smještaja unutar stanice (slika 3), te smo stoga ispitali njihovu međusobnu kolokalizaciju unutar stanice metodom konfokalne mikroskopije.

Slika 24. Međusobna kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda

Slika 24. Međusobna kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda.
Stanice J26-B7, J26-Cw6, J26-G1, L-L^d i HeLa su fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano specifično mPt (*MEM-147* izotipa mišji IgG1 za konformirane HLA-B7, HLA-Cw6 te klasične HLA-I molekule na HeLa staničnoj liniji, *HC-10* izotipa mišji IgG_{2a} za nekonformirane HLA-B7, HLA-Cw6 te klasične HLA-I molekule na HeLa staničnoj liniji, *W6/32* izotipa mišji IgG_{2a} za konformirane HLA-G1 molekule, MEM-G/1 izotipa mišji IgG1 za nekonformirane HLA-G1 molekule, *30-5-7* za konformirane H2-L^d molekule, te *64-3-7* za nekonformirane H2-L^d molekule), te specifično sekundarno Pt. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Na slici 24 prikazana je međusobna kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda. Konformirane molekule prikazane su zelenom bojom, nekonformirane crvenom bojom, a njihovo je preklapanje (kolokalizacija) prikazano žutom bojom. Iz dobivenih rezultata može se vidjeti da se konformirane i nekonformirane HLA-B7 i HLA-G1 molekule nalaze u različitim unutarstaničnim odjeljcima, odnosno između njih nije opažena kolokalizacija. Međutim, iako se konformirane MHC-I molekule pretežito nalaze u jukstanuklearnom području, a nekonformirane u perinuklearnom području, djelomično

jukstanuklearno i perinuklearno preklapanje konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula opaženo je na J26-Cw6, L-L^d i HeLa staničnoj liniji (slika 24).

4.1.2.3.1. Međusobna kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I nakon tretmana s konkanamicinom A

Za održavanje integriteta mnogih unutarstaničnih odjeljaka, kao i molekula koje se u njima nalaze, bitan je kiseli pH. Prema tome, moguće je da narušavanje pH vrijednosti mijenja raspodjelu i međusobnu kolokalizaciju konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula. Stoga smo stanice tretirali s konkanamicinom A (KonA) koji je blokator H-ATPaze i stoga spriječava zakiseljavanje organela, te smo nakon toga međusobno kolokalizirali konformirane i nekonformirane MHC-I molekule.

Slika 25. Međusobna kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda nakon tretmana s konkanamicinom A

Slika 25. Međusobna kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda nakon tretmana s konkanamicinom A.

HeLa, J26-B7, J26-Cw6 i J26-G1 stanice su tretirane s 50 nM konkanamicinom A preko noći. Nakon imunofluorescentnog obilježavanja (vidi sliku 24) stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Konkanamicin A nije značajnije promijenio raspodjelu konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula na J26-B7 i J26-G1 stanicama, odnosno nije opažen veći stupanj njihove međusobne kolokalizacije u odnosu na fiziološke uvjete (usp. slika 24 i slika 25). No, nakon jednakog tretmana, na J26-Cw6 i HeLa stanicama uočavamo gotovo potpunu kolokalizaciju obiju konformacija MHC-I molekula u hipertrofiranim perinuklearnim odjeljcima, dok se u jukstanuklearnom području detektiraju samo konformirane MHC-I molekule, čak i izraženije nego u fiziološkim uvjetima (usporedi slika 24 i slika 25).

4.1.2.4. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda s biljezima unutarstaničnih odjeljaka

U svrhu daljnje karakterizacije unutarstanične lokalizacije MHC-I molekula, kolokalizirali smo ih sa specifičnim biljezima unutarstaničnih odjeljaka.

4.1.2.4.1. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda s Golgi aparatom

GM-130 se nalazi u cis-Golgi aparatu i jedan je od najčešće korištenih biljega Golgijevog aparata (GA), te smo stoga s njim kolokalizirali MHC molekule I razreda.

Slika 26. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHCmolekula I razreda s Golgi aparatom

Slika 26. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHCmolekula I razreda s Golgi aparatom. Stanice J26-B7, J26-Cw6, J26-G1 i HeLa su fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano specifično protu-MHC-I mPt i protu-GM-130 protutijelo. Nakon vezivanja sekundarnog Pt-a stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm (a) Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Zapažena je izrazito jaka kolokalizacija ispitivanih konformiranih MHC-I molekula i GM-130 biljega, iako postoje odjeljci u kojima se nalaze konformirane MHC-I, a koji su negativni na GM-130 (slika 26). Kolokalizacija nekonformiranih HLA-B7 i HLA-G1 molekula s GM-130 nije opažena (slika 26), za razliku od nekonformiranih HLA-Cw6 i nekonformiranih HLA-I

molekula na HeLa staničnoj liniji koje se kolokaliziraju s GM-130, iako slabije (slika 26). Naime, iako na prvi pogled može izgledati da se radi o većem stupnju kolokalizacije, pri većim povećanjima se jasno uočava da se prvenstveno radi o susjednim odjeljcima (nije prikazano).

4.1.2.4.2. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda s internaliziranim transferinskim receptorom/transferinom

Nakon internalizacije transferinski receptor/transferin se unutar stanice smješta u rane i reciklirajuće odjeljke. Međutim, obzirom da je najprisutniji u reciklirajućim endosomima koristi se kao jedan od najvažnijih biljega tog odjeljka (uz Rab11).

Slika 27. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda s internaliziranim Tf(R)

Slika 27. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda s internaliziranim Tf(R).

Nakon površinskog vezivanja Tf(R) je internaliziran na stanicama J26-B7, J26-Cw6, J26-G1 i HeLa tijekom 30 minuta i kolokaliziran s MHC-I molekulama. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Sve ispitivane konformirane molekule, HLA-B7, HLA-Cw6, HLA-G1 i konformirane klasične HLA-I molekule na HeLa staničnoj liniji, pokazuju znatan stupanj kolokalizacije s Tf(R) u jukstanuklearnom području (slika 27a). Dio konformiranih MHC-I molekula koji se jukstanuklearno ne kolokalizira s Tf(R) posljedica njihova smještaja u GA (usp. slika 26). Za razliku od konformiranih molekula, nekonformirane MHC-I molekule svih ispitivanih alela izuzetno se slabo kolokaliziraju s Tf(R) (slika 27b). Slaba kolokalizacija može se opaziti jedino na HeLa i J26-Cw6 stanicama i to pretežito u perinuklearnom području koja je najvjerojatnije posljedica toga što obje molekule na svom putu prolaze kroza rane endosome (vidi kasnije).

4.1.2.4.3. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda s biljezima kasnih endosomalnih odjeljaka (Lamp-1 i CD63)

Kako bismo utvrdili da li se MHC molekule I razreda nalaze u kasnim endosomalnim odjeljcima / lizosomima, kolokalizirali smo ih s Lamp-1 ili s CD63 biljezima.

Niti jedna od ispitivanih konformiranih MHC-I molekula ne kolokalizira se s Lamp-1^+ niti s $CD63^+$ odjeljcima (slika 28a). Djelomična kolokalizacija opažena je jedino između nekonformiranih HLA-I molekula i $CD63^+$ odjeljaka na HeLa staničnoj liniji (slika 28b), odnosno nekonformiranih HLA-I molekula i Lamp-1^+ odjeljaka na J26-Cw6 staničnoj liniji (slika 28b). Kolokalizacija između nekonformiranih HLA-B7 odnosno nekonformiranih HLA-G1 i Lamp-1^+ odjeljaka nije opažena (slika 28b).

Slika 28. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih HLA molekula I razreda s Lamp-1 i CD63 pozitivnim odjeljcima

Slika 28. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih HLA molekula I razreda s Lamp-1^{+}/CD63^{+} odjeljcima.

Stanice J26-B7, J26-Cw6, J26-G1 i HeLa su fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano specifično protu-MHC-I mPt, a kasni odjeljci vizualizirani su protu-Lamp-1 i protu-CD63 protutijelom. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

4.1.2.4.4. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda s biljezima kasnih odjeljaka (Lamp-1/ CD63) nakon tretmana s konkanamicinom A

Odsutnost znatnije kolokalizacije između konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda s biljezima kiselih kasnih odjeljaka tj. lizosoma (pH 4,5 – 5,5) (slika 28) može biti posljedica njihove brze razgradnje kojoj upravo pogoduje vrlo niski pH. Stoga smo željeli ispitati kako narušavanje pH gradijenta utječe na smještaj MHC-I molekula u kasnim odjeljcima tako što smo stanice tretirali s konkanamicinom A.

Slika 29. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda s Lamp-1 i CD63 pozitivnim odjeljcima nakon tretmana s konkanamicinom A

Slika 29. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda s Lamp-1$^+$/CD63$^+$ odjeljcima nakon tretmana s konkanamicinom A.

Stanice J26-B7 , J26-Cw6, J26-G1 i HeLa su tretirane s 50 nM konkanamicinom A preko noći. Potom su fiksirane, permeabilizirane, te im je dodano specifično protu-MHC-I mPt. Kasni odjeljci vizualizirani su protu-Lamp-1 i protu-CD63 protutijelom. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Nakon tretmana s konkanamicinom A zamijećena je pojačana kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula na stanicama J26-Cw6, kao i pojačana kolokalizacija obiju konformacija klasičnih MHC molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji (slika 29a i 29b) s navedenim biljezima kasnih odjeljaka. Kolokalizacija niti konformiranih niti nekonformiranih HLA-B7 i HLA-G1 molekula s Lamp-1$^+$ odjeljcima nije zamijećena (slika 29a i 29b). Također treba zamijetiti da je nakon tretmana s konkanamicinom A došlo do hipertrofije odjeljaka u kojima se nalaze konformirane molekule svih alela (slika 29), a ta razlika u odnosu na fiziološke uvjete je najizraženija na J26-Cw6 i HeLa stanicama. Nadalje može se uočiti da su hipertrofirali i odjeljci u kojima se nalaze nekonformirane HLA-Cw6 i nekonformirane

klasične HLA molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji. Za razliku od tih odjeljaka, odjeljci u kojima se nalaze nekonformirane HLA-B7 i nekonformirane HLA-G1 nisu pokazali promjenu nakon tretmana s konkanamicinom A (slika 29b).

4.1.2.4.5. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda s biljegom ranih endosoma

Budući da nekonformirane MHC molekule I razreda na HeLa staničnoj liniji i nekonformirane HLA-Cw6 molekule pokazuju specifičan obrazac unutarstanične distribucije koji prema izgledu ne odgovara samo endoplazmatskom retikulumu (ER), kao što bi bilo za očekivati, kolokalizirali smo ih s još jednim endosomalnim biljegom: molekulom EEA-1 (engl. *early endosomal antigen-1*) koja se nalazi u ranim (sortirajućim) endosomima.

Slika 30. Kolokalizacija nekonformiranih MHC molekula I razreda s EEA-1 pozitivnim odjeljcima

Slika 30. Kolokalizacija nekonformiranih MHC molekula I razreda s EEA-1$^+$ odjeljcima.
Stanice J26-Cw6 i HeLa su fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano specifično protu-MHC-I mPt. Rani (sortirajući) endosomi vizualizirani su pomoću protu-EEA-1 protutijela. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Osim vidljive djelomične kolokalizacije nekonformiranih HLA-Cw6 molekula i nekonformiranih MHC molekule I razreda na HeLa staničnoj liniji s EEA-1$^+$ odjeljcima (slika 30), bitno je i uočiti da se ispitivane MHC-I molekule mogu separirati u zasebne domene unutar EEA-1$^+$ odjeljka, odnosno može se zamijetiti kompartmentalizacija (slika 30a; umetnute slike).

4.1.2.5. Promjena konformacije MHC molekula I razreda

Budući da rezultati prikazani u odjeljcima *4.1.2.3.1.* i *4.1.2.4.4.* sugeriraju važnost kiselog pH u pretvorbi konformiranih u nekonformirane MHC-I molekule željeli smo preciznije ispitati tu mogućnost. Kako bi potvrdili da pri niskim pH vrijednostima uistinu dolazi do promjene konformacije MHC molekula I razreda, stanice smo tretirali kroz kratko

vrijeme (2 minute) na 4 °C s medijem nefiziološkog pH (pH 2), te detektirali površinski izražaj konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula različitih alela prije i nakon tretmana metodom protočne citometrije. U pokusu su korištena ranije navedena specifična mPt koja prepoznaju različite konformacije MHC molekula I razreda (vidi 4.1.).

Nakon izlaganja intaktnih stanica nefiziološkim pH vrijednostima (pH 2) smanjuje se površinska ekspresija konformiranih MHC-I molekula, dok ekspresija nekonformiranih molekula raste (slika 31).

Slika 31. Učinak nefiziološkog pH (pH 2) na površinsku ekspresiju konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda

Slika 31. Učinak nefiziološkog pH (pH 2) na površinsku ekspresiju konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda.

Stanice J26-B7, J26-Cw6, J26-G1, L-L^d i HeLa su bile izložene mediju: pH 7,0 (puna crta) ili pH 2,0 (isprekidana crta) na 4°C tijekom 2 minute. Stanice su potom površinski obilježene specifičnim protu-MHC-I mPt čiji izražaj je analiziran protočnom citometrijom.

Budući da su molekule tijekom svog putovanja kroz različite unutarstanične odjeljke izložene različitim pH vrijednostima kroz različiti vremenski period (ovisno kroz koji odjeljak putuju i koliko se u njemu zadržavaju), primijenili smo eksperimentalni model kojim smo oponašali pH vrijednosti kojima su izložene MHC-I molekule tijekom svog unutarstaničnog putovanja. Naime, stanice smo inkubirali u različitim vremenskim intervalima u medijima različitih pH vrijednosti (od pH 7,4 koji možemo susresti u neutralnim odjeljcima poput ER-a, pa sve do pH 4,5 koji vlada u lizosomima). Promjene izražaja površinskih konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda pratili smo protočnom citometrijom.

Slika 32. Učinak fizioloških pH vrijednosti na izražaj HLA-Cw6 molekula u različitim vremenskim intervalima

Slika 32. Učinak fizioloških pH vrijednosti na izražaj HLA-Cw6 molekula u različitim vremenskim intervalima.

Stanice J26-Cw6 bile su izložene mediju različitih fizioloških pH vrijednosti (prikazano na grafu) tijekom 1, 15, 30 ili 45 minuta. Stanicama je zatim dodano specifično protu-MHC-I mPt, te je površinski izražaj konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula analiziran protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao omjer MFI vrijednosti pri naznačenom pH i MFI vrijednosti pri pH 7,4 pomnožen sa 100.

Slika 33. Kinetika promjene izražaja HLA-Cw6 molekula pri različitim fiziološkim pH vrijednostima

Slika 33. Kinetika promjene izražaja HLA-Cw6 molekula pri različitim fiziološkim pH vrijednostima. Stanice J26-Cw6 bile su tretirane s medijem različitih pH vrijednosti (pH 7,4, pH 6,8, pH 6,2, pH 5,5, pH 5,0 i pH 4,5) u različitim vremenskim intervalima. Stanicama je zatim dodano specifično protu-MHC-I mPt. Površinski izražaj konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula analiziran je protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao omjer MFI vrijednosti pri naznačenom pH i MFI vrijednosti pri pH 7,4 pomnožen sa 100.

Pad izražaja konformiranih, odnosno porast izražaja nekonformiranih HLA-Cw6 molekula počinje se događati pri vrijednosti pH 6,2, a sa daljnjim izlaganjem sve nižim pH vrijednostima, razlika u izražaju je sve više uočljiva (slika 32). Ukoliko rezultat sagledavamo pri istoj pH vrijednosti ali u različitim vremenskim intervalima, tada možemo zamijetiti da se promjena izražaja HLA-Cw6 molekula počinje događati nakon otprilike desetak minuta, no što je promatrana pH vrijednost niža, to je i taj interval kraći. U pravilu, nakon otprilike 30 minuta inkubacije stanica s nekom od pH vrijednosti postiže se plato promjene izražaja (usp. slika 32 i slika 33).

Povećan izražaj nekonformiranih, odnosno smanjen izražaj konformiranih HLA-Cw6 molekula uočen je i nakon izlaganja staničnog ekstrakta kiselom pH lizata. Stanice su bile

površinski biotinilirane i zatim lizirane s puferom za lizu različitih pH vrijednosti (pH 7,4, pH 6,2 i pH 5,5) u kojem su inkubirane narednih 30 minuta. Zatim je napravljena imunoprecipitacija pomoću specifičnih protu-HLA-I mPt te SDS-PAGE elektroforeza i Western blot analiza. Pri pH 6,2 izražaj konformiranih HLA-Cw6 molekula pada dok izražaj nekonformiranih HLA-Cw6 raste, a ta promjena je još izraženija prilikom pH 5,5 (slika 34).

Slika 34. Promjene konformacije HLA-Cw6 molekula u staničnom lizatu

Slika 34. Promjene konformacije HLA-Cw6 molekula u staničnom lizatu.

Stanice J26-Cw6 su biotinilirane i zatim lizirane s puferom za lizu koji je bio različitih pH vrijednosti (pH 7,4, pH 6,2 i pH 5,5), te su u njemu inkubirane 30 minuta. Zatim je napravljena imunoprecipitacija s specifičnim mPt, te SDS-PAGE elektroforeza na 13% gelu. Grafički prikaz dobiven je kvantifikacijom intenziteta signala na filmu nakon kemiluminiscencije pomoću AdobePhotoshopa.

Iako su slični rezultati promjene izražaja konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula prilikom tretiranja stanica s medijem kisele pH vrijednosti dobiveni i za alele HLA-B7, HLA-G1, kao i za klasične MHC molekule I razreda na HeLa staničnoj liniji (slika 35), treba naglasiti da HLA-Cw6 molekule ipak pokazuju najveći stupanj nestabilnosti. Nadalje, kod HLA-G1 molekula opažene promjene površinskog izražaja bile su najmanje uočljive (slika 35).

Slika 35. Promjena konformacije HLA-B7, HLA-G1 i klasičnih MHC molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji pri različitim pH vrijednostima

Slika 35. Promjena konformacije HLA-B7, HLA-G1 i klasičnih MHC molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji pri različitim pH vrijednostima.

Stanice su bile izložene mediju različitih pH vrijednosti (vrijednosti prikazane na grafu) kroz 30 minuta. Stanicama je zatim dodano specifično protu-MHC-I mPt, te je površinski izražaj konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula analiziran protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao omjer MFI vrijednosti pri naznačenom pH i MFI vrijednosti pri pH 7,4 pomnožen sa 100.

4.2. INTERNALIZACIJA MHC MOLEKULA I RAZREDA

Internalizacija je proces kojim se površinske molekule uklanjaju sa stanične površine. Ona je posljedica *endocitoze*, odnosno ulaska molekula u stanicu, te *recikliranja*, povratka endocitiranih molekula natrag na staničnu površinu. Stoga nam praćenje nestanka molekula sa stanične površine ne govori o kinetici endocitoze, već o kinetici njihove internalizacije. Naime, endocitozu ne možemo direktno pratiti. Internalizaciju MHC-I molekula usporedili smo s internalizacijom B podjedinice toksina kolere i kinetikom internalizacije transferina/transferinskog receptora.

4.2.1. Kinetika spontane internalizacije MHC molekula I razreda

Kinetiku spontane internalizacije MHC-I molekula moguće je pratiti na dva načina. Prvi način predstavlja njihovu spontanu internalizaciju uslijed djelovanja cikloheksimida, dok drugi način predstavlja njihovu spontanu internalizaciju nakon površinskog vezivanja mPt.

4.2.1.1. Kinetika spontane internalizacije MHC molekula I razreda uslijed djelovanja cikloheksimida

U svrhu praćenja kinetike spontane internalizacije MHC molekula I razreda stanice smo tretirali s cikloheksimidom (CHX) u koncentraciji 15 μg/mL kako bi zaustavili dotok novosintetiziranih molekula na staničnu površinu, te bili u mogućnosti s nje pratiti nestanak postojećih molekula. Kao što je vidljivo iz slike 36, kinetika spontane internalizacije nekonformiranih MHC-I molekula je u prosjeku brža od kinetike internalizacije konformiranih MHC-I molekula istih alela, što naročito dolazi do izražaja kod HLA-B7 molekula koje se kao nekonformirane spontano internaliziraju znatno brže od konformiranih oblika. Konformirane HLA-G1 molekule u prosjeku pokazuju najsporiju kinetiku internalizacije (slika 36) od svih ispitivanih konformiranih MHC-I molekula.

Slika 36. Kinetika spontane internalizacije HLA-B7, HLA-Cw6, HLA-G1, H2-L^d i klasičnih MHC molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji uslijed djelovanja cikloheksimida

Slika 36. Kinetika spontane internalizacije HLA-B7, HLA-Cw6, HLA-G1, H2-L^d i klasičnih MHC molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji uslijed djelovanja cikloheksimida.

Stanicama koje su rasle u kulturi dodan je CHX u koncentraciji 15 μg/mL, te su u naznačenim vremenima uzeti uzorci koji su analizirani protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti postotaka početnog izražaja koji predstavlja omjer MFI vrijednosti u ispitivanom i nultom vremenu pomnožen sa 100, ± standardna devijacija (n=3-6).

4.2.1.2. Kinetika spontane internalizacije MHC molekula I razreda nakon površinskog vezivanja monoklonskog protutijela

Kinetiku spontane internalizacije konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula pratili smo i nakon površinskog obilježavanja odgovarajućim mPt. U tu svrhu stanice su inkubirane na 4 °C u prisutnosti odgovarajućeg mPt kako bi se omogućilo vezivanje, a istovremeno spriječila internalizacija. Nakon ispiranja nevezanog mPt, stanice su inkubirane u različitim vremenskim intervalima na 37 °C, i internalizacija je praćena protočnom citometrijom. Uspoređujući sliku 36 i sliku 37 vidljivo je da kinetika spontane internalizacije MHC-I molekula uslijed djelovanja cikloheksimida i kinetika spontane internalizacije nakon površinskog vezivanja mPt prate isti trend. Bitno je uočiti da se, kao i u prethodnom pokusu, konformirane MHC-I molekule stabilnijih alela (HLA-B7 i HLA-G1) u prosjeku sporije internaliziraju od konformiranih molekula nestabilnijih alela (slika 37).

Slika 37. Kinetika spontane internalizacije HLA-B7, HLA-Cw6, HLA-G1, H2-L^d i klasičnih MHC molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji u različitim vremenskim intervalima nakon površinskog vezivanja mPt

Slika 37. Kinetika spontane internalizacije HLA-B7, HLA-Cw6, HLA-G1, H2-L^d i klasičnih MHC molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji u različitim vremenskim intervalima nakon površinskog vezivanja mPt.

Stanice su površinski obilježene odgovarajućim mPt (4°C; 1 sat), isprane u PBS-u kako bi se uklonilo nevezano mPt, te inkubirane na 37 °C u mediju. U naznačenim vremenima uzeti su uzorci i analizirani protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti postotaka početnog izražaja koji predstavlja omjer MFI vrijednosti u ispitivanom i nultom vremenu pomnožen sa 100, ± standardna devijacija (n=6).

Kinetiku internalizacije konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula pratili smo i u kraćim vremenskim intervalima.

Razlika u brzini internalizacije konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula izrazito je velika tijekom kraćih vremenskih razdoblja (do 2 sata) s time da se počinje uočavati već nakon 15 minuta (slika 38). Sličan rezultat kinetike internalizacije u kraćim vremenima dobiven je i nakon protokola u kojem se koristila inhibicija dotoka novosintetiziranih molekula na staničnu površinu (nije prikazano). Brža kinetika internalizacije nekonformiranih molekula može biti ili posljedica njihove brže endocitoze ili nedostatka komponente recikliranja (za daljnju analizu vidi kasnije).

Slika 38. Kinetika spontane internalizacije HLA-B7, HLA-Cw6, HLA-G1, H2-L^d i klasičnih MHC molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji u različitim kratkim vremenskim intervalima nakon površinskog vezivanja mPt

Slika 38. Kinetika spontane internalizacije HLA-B7, HLA-Cw6, HLA-G1, H2-L^d i klasičnih MHC molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji u različitim kratkim vremenskim intervalima nakon površinskog vezivanja mPt.

Stanice su površinski obilježene odgovarajućim mPt (4°C; 1 sat), isprane u PBS-u kako bi se uklonilo nevezano mPt, te inkubirane na 37 °C u mediju. U naznačenim vremenima uzeti su uzorci i analizirani protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao postotak početnog izražaja koji predstavlja omjer MFI vrijednosti u ispitivanom i nultom vremenu pomnožen sa 100. Prikazan je reprezentativni od 4 do 8 ponovljenih pokusa.

4.2.1.3. Usporedba kinetike internalizacije MHC molekula I razreda s kinetikom internalizacije B podjedinice toksina kolere

Kinetiku internalizacije B podjedinice toksina kolere (CtxB) pratili smo na Balb 3T3 i HeLa staničnoj liniji, te je usporedili s kinetikom internalizacije MHC-I molekula.

Slika 39. Kinetika internalizacije B podjedinice toksina kolere

Slika 39. Kinetika internalizacije B podjedinice toksina kolere.
Stanicama Balb 3T3 i HeLa dodan je CtxB-FITC (4 °C; 1 sat), stanice su isprane u čistom mediju, te su inkubirane na 37 °C tijekom naznačenih vremenskih intervala. Stanice su zatim tretirane s kiselim pH kako bi se uklonio neinternalizirani (površinski) CtxB. Unutarstanični signal CtxB određen je protočnom citometrijom. Postotak internalizacije predstavlja omjer MFI vrijednosti unutarstaničnih molekula 45 minuta nakon internalizacije i početnih MFI vrijednosti.

Kinetika internalizacije CtxB brža je na HeLa staničnoj liniji u odnosu na Balb 3T3 staničnu liniju (slika 39). Ukoliko kinetiku internalizacije CtxB uspoređujemo s kinetikom internalizacije MHC-I molekula (slika 38) tada možemo zamijetiti da je trend kinetike CtxB sličniji trendu kinetike internalizacije nekonformiranih, nego konformiranih MHC-I molekula.

4.2.2. Utjecaj različitih inhibitora na internalizaciju MHC molekula I razreda

Kako bi utvrdili koji endocitozni put koriste konformirane i nekonformirane MHC molekule I razreda prilikom ulaska u stanicu, stanice smo tretirali paletom kemijskih inhibitora te smo putem protočne citometrije pratili njihov površinski izražaj nakon površinskog vezivanja monoklonskog protutijela. U svim pokusima stanice su dodatno, prije početka eksperimenta, bile pretretirane inhibitorima koji su bili prisutni u mediju tijekom cijelog vremena. Kod korištenja inhibitora, vodili smo računa o vijabilnosti stanica koja je iznosila 85-97%, a tijekom analize nisu uzete u obzir nevijabilne stanice.

4.2.2.1. Utjecaj inhibitora klatrinske endocitoze na internalizaciju MHC molekula I razreda

Budući da je klatrinska endocitoza do sada najistraženiji mehanizam endocitoze, te da ga koriste mnoge molekule za ulazak u stanicu, željeli smo ispitati da li i MHC molekule I razreda u stanicu ulaze tim putem. U tu svrhu smo koristili klorpromazin (CP), kao tvar koja onemogućuje vezivanje klatrinskih triskeliona za staničnu membranu te na taj način inhibira

klatrinsku endocitozu (63, 71, 72), te *Dynasore* (D), tvar koja blokira dinamin GTPazu (76, 77), molekulu koja je neophodna za odvijanje klatrinske endocitoze.

S obzirom da su transferin (Tf), odnosno transferinski receptor (TfR) molekule za koje je poznato da u stanicu ulaze klatrinskom endocitozom (8, 9), Tf/TfR su korišteni kao model proučavanja klatrinske endocitoze, te kao kontrola djelovanja navedenih inhibitora.

Slika 40. Učinak klorpromazina i *Dynasore-a* na internalizaciju transferina

Slika 40. Učinak klorpromazina i *Dynasore-a* na internalizaciju transferina.

Stanice Balb 3T3 su bile pretretirane s klorpromazinom (CP, 7.5 μg/mL), dodan im je Tf-FITC (4°C; 45 minuta), stanice su isprane, te inkubirane na 37 °C tijekom 20 minuta u čistom mediju ili u prisustvu CP-a i zatim analizirane konfokalnom mikroskopijom (a). Učinak Dynasore-a (D, 80μM) i CP-a na internalizaciju površinski vezanog Tf-biotina na stanicama HeLa i J26-Cw6 nakon 5 minuta (b), odnosno 50 minuta (c) dobiven protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti postotaka početnog izražaja koji predstavlja omjer MFI vrijednosti u ispitivanom i nultom vremenu pomnožen sa 100, ± standardna devijacija (n=4) (a i c). Stanice HeLa i J26-Cw6 su nakon pretretmana s D inkubirane na 37 °C tijekom 50 minuta u prisutnosti Tf-AF555 sa ili bez *Dynasore-a*, kratkotrajno zakiseljene kako bi se uklonila površinska fluorescencija te analizirane konfokalnom mikroskopijom (d). Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Klorpromazin i *Dynasore* blokirali su internalizaciju transferina na sve tri stanične linije ($p<0,05$) (slika 40). Treba zamijetiti da u dužoj internalizaciji dio Tf-a (50 minuta) u prisutnosti *Dynasore-a* na stanicama HeLa i J26-Cw6 dio Tf-a ipak uspije ući u stanicu (slika 40c i 40d), no blokiran je dolazak transferina u jukstanuklearno područje, za razliku od netretiranih stanica u kojima je nakon 50 minuta internalizacije transferin smješten isključivo jukstanuklearno (slika 40d). Sličan učinak na dužu internalizaciju Tf-a imao je i CP (nije prikazano).

Nadalje, kao kontrolna molekula korištena je i B podjedinica toksina kolere (CtxB), za koju je u literaturi pokazano da za ulazak u stanicu može koristiti razne endocitotičke mehanizme, ovisno o ispitivanoj staničnoj liniji. Stoga smo, ispitali učinak CP na internalizaciju CtxB na Balb 3T3 i HeLa staničnoj liniji.

CP blokirao je internalizaciju CtxB na HeLa staničnoj liniji, dok na Balb 3T3 staničnoj liniji nije imao učinka na njenu internalizaciju (slika 41). Taj rezultat upućuje na različit mehanizam enodocitoze koji CtxB koristi na ovim staničnim linijama (činjenicu koja se treba imati u vidu kada ovu molekulu koristimo kao kontrolu).

Slika 41. Učinak klorpromazina na internalizaciju B podjedinice toksina kolere

Slika 41. Učinak klorpromazina na internalizaciju B podjedinice toksina kolere.
Stanice Balb3T3 ili HeLa pretretirane su s klorpromazinom (7,5 μg/mL), te im je dodan CtxB-FITC (4°C; 1 sat). Potom su isprane u čistom mediju, te inkubirane na 37°C u mediju sa ili bez inhibitora tijekom 45 minuta. Stanice su zatim tretirane s kiselim pH kako bi se uklonio neinternalizirani (površinski) CtxB. Unutarstanični signal CtxB određen je protočnom citometrijom. % internalizacije predstavlja omjer MFI vrijednosti unutarstaničnih molekula 45 minuta nakon internalizacije i početnih MFI vrijednosti. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=6) (a). Površinski vezana CtxB-AF555 je internalizirana tijekom 45 minuta na Balb3T3 ili HeLa stanicama sa ili bez klorpromazina (7,5 μg/mL) i kolokalizirana s GM-130. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm (b).

Nakon uvedenih kontrola, ispitali smo učinak klorpromazina i *Dynasorea* na internalizaciju konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula. Niti klorpromazin niti

Dynasore nisu značajno utjecali na internalizaciju konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda u odnosu na kontrolu ($p>0.05$) iz čega možemo zaključiti da internalizacija MHC-I molekula neovisno o ispitivanoj konformaciji i ispitivanom alelu nije ovisna o klatrinu i dinaminu (slika 42). Važno je napomenuti da niti jedan od navedenih inhibitora nije uzrokovao značajniju promjenu početnog površinskog izražaja ispitivanih molekula.

Slika 42. Učinak klorpromazina i *Dynasore-a* na internalizaciju MHC molekula I razreda

Slika 42. Učinak klorpromazina i *Dynasore-a* na internalizaciju MHC molekula I razreda.
Stanicama J26-B7, J26-G1, J26-Cw6, L-L^d i HeLa koje su rasle u kulturi dodan je klorpromazin (7,5 μg/mL) ili *Dynasore* (1μM) ili čisti medij, te su stanice inkubirane na 37 °C tijekom 30 minuta. Zatim su stanice površinski obilježene odgovarajućim mPt (4 °C; 1 sat), isprane u čistom mediju kako bi se uklonilo nevezano mPt, te inkubirane na 37 °C u mediju sa ili bez inhibitora u istim koncentracijama tijekom 2 sata. Površinski izražaj MHC molekula I razreda na nultom vremenu i nakon 2 sata inkubacije određen je protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao omjer MFI vrijednosti 2 sata nakon internalizacije i MFI vrijednosti nultog vremena pomnožen sa 100 (srednja vrijednost ± standardna devijacija; n=5).

4.2.2.2. Utjecaj inhibitora kaveolarne endocitoze na internalizaciju MHC molekula I razreda

Filipin (F) i metil-β-ciklodekstrin (MβCD) su kemijski inhibitori koji izmjenom kolesterolskog sastava stanične membrane utječu na mehanizam odvijanja endocitoznih putova ovisnih o lipidnim splavima (81, 84); kaveolarne endocitoze, te endocitoze neovisne o klatrinu i dinaminu (endocitoza ovisna o Cdc42 GTPazi ili ovisna o Arf6 GTPazi). Budući da je filipin mnogo specifičniji inhibitor endocitoze ovisne o lipidnim splavima od metil-β-

ciklodekstrina (84, 85) u našim istraživanjima smo ga pretežno koristili. Kao kontrolne molekule ponovno su nam poslužili Tf i CtxB, a korišteni protokol bio je jednak protokolu opisanom na slikama 40 i 41, s razlikom da je kao inhibitor korišten filipin (1.4 μg/mL).

Slika 43. Učinak filipina na internalizaciju transferina

Slika 43. Učinak filipina na internalizaciju transferina.

Tf-biotin je bio površinski vezan na prethodno filipinom (1.4 μg/mL) pretretirane HeLa i J26-Cw6 stanice, te internaliziran tijekom 10 minuta sa ili bez filipina. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti postotaka početnog izražaja koji predstavlja omjer MFI vrijednosti u ispitivanom i nultom vremenu pomnožen sa 100, ± standardna devijacija (n=4) (a). Prethodno pretretiranim HeLa i J26-Cw6 stanicama dodan je Tf-AF555 zajedno s filipinom (1.4 μg/mL) ili čistim medijem te je njegov izražaj i lokalizacija analiziran konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm (b).

Filipin, kao što je bilo i očekivano nije blokirao internalizaciju Tf-a niti na jednoj od ispitivanih staničnih linija. Isto tako, treba napomenuti, da filipin nije niti blokirao dolazak Tf-a u jukstanuklearno područje (slika 43a i b).

Učinak inhibitora kaveolarne endocitoze ispitali smo i na internalizaciju CtxB na Balb 3T3 i HeLa staničnoj liniji.

Filipin je blokirao internalizaciju CtxB na Balb 3T3 staničnoj liniji dok na HeLa staničnoj liniji nije imao učinka na njezinu internalizaciju (slika 44a i b). Ovaj rezultat dodatno ukazuje da CtxB u HeLa i Balb 3T3 stanice ulazi na različite načine.

Slika 44. Učinak filipina na internalizaciju B podjedinice toksina kolere

Slika 44. Učinak filipina na internalizaciju B podjedinice toksina kolere.

Stanicama Balb 3T3 i HeLa koje su rasle u kulturi dodan je filipin (1,2 μg/mL) ili čisti medij, te je učinak filipina na internalizaciju CtxB praćen po istom protokolu opisanom u slici 21. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=10) (a). Balb 3T3 i HeLa stanicama koje su rasle u kulturi dodan je filipin (1,2 μg/mL) ili čisti medij te su stanice inkubirane na 37 °C tijekom 30 minuta. Zatim je stanicama dodan CtxB-AF555 (4 °C; 1 sat), te su stanice isprane kako bi se uklonio nevezani CtxB, te inkubirane na 37 °C u mediju sa ili bez inhibitora tijekom 45 minuta. Stanice su zatim fiksirane s 4% PFA, dodan je protu-GM-130, te su stanice zatim analizirane konfokalnim mikroskopom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm (b).

S obzirom da filipin, uz kaveolarnu, može blokirati i nekaveolarne endocitoze ovisne o lipidnim splavima, kolokalizirali smo CtxB s kaveolinom-1 (kav-1) tijekom internalizacije. Isto tako, ispitali smo učinak *Dynasore-a* na internalizaciju CtxB na Balb 3T3 staničnoj liniji, budući da je poznato da je kaveolarna endocitoza ovisna o dinaminu (25).

Iako na nultom vremenu kaveolina gotovo da i nema na staničnoj površini, 5 minuta nakon internalizacije CtxB, vidi se jak izražaj kaveolina-1 na citoplazmatskom dijelu stanične membrane, te njihova izrazita kolokalizacija. Nakon 10 minuta internalizacije CtxB i kaveolin-1 i dalje pokazuju znatan stupanj kolokalizacije, ali u vezikularnim tvorbama neposredno uz staničnu membranu (slika 45a). Mobilizacija kaveolina-1 tijekom internalizacije CtxB, te njegova jaka kolokalizacija s CtxB potvrđuju da CtxB na Balb 3T3 staničnoj liniji u stanicu ulazi kaveolarnom endocitozom. Taj rezultat potvrdili smo i pomoću *Dynasore-a* koji inhibira dinamin GTPazu, s obzirom da je kaveolarna endocitoza ovisna o dinaminu. Naime, nakon što je stanica tretirana s *Dynasore-om*, 45 minuta nakon internalizacije CtxB ne može se detektirati u *trans*-GA, već se nalazi na površini stanice i djelomično zarobljena u unutarstaničnim vezikulama (slika 45b).

Slika 45. Kolokalizacija CtxB s kaveolinom-1 tijekom internalizacije na Balb 3T3 staničnoj liniji

Slika 45. Kolokalizacija CtxB s kaveolinom-1 tijekom internalizacije na Balb 3T3 staničnoj liniji.
Stanicama Balb 3T3 koje su rasle u kulturi dodan je CtxB-AF488 (4°C; 1 sat), zatim su stanice isprane kako bi se uklonio nevezani CtxB, te inkubirane na 37 °C u čistom mediju tijekom 0, 5 ili 10 minuta. Stanice su zatim fiksirane s 4% PFA i dodan je protu-kaveolin-1-cy3 (a). Stanicama Balb 3T3 koje su rasle u kulturi dodan je *Dynasore* (1 μM) ili čisti medij. Zatim je stanicama dodan CtxB-AF555 (4 °C; 1 sat), te su stanice isprane kako bi se uklonio nevezani CtxB, te inkubirane na 37 °C u mediju sa ili bez inhibitora tijekom 45 minuta. Stanice su zatim fiksirane s 4% PFA , dodan je protu-GM-130, te su stanice zatim analizirane konfokalnim mikroskopom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm (b).

Kako bi ispitali ulogu lipidnih splavi tijekom internalizacije konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula, J26-B7, J26-G1, J26-Cw6, L-L^d i HeLa stanice smo tretirali s filipinom (1,4 μg/mL). Filipin nije imao značajnog učinka na internalizaciju niti konformiranih niti nekonformiranih MHC-I molekula, neovisno o ispitivanom alelu ($p>0.05$) (slika 46a), te možemo zaključiti da za njihovu internalizaciju nisu neophodne lipidne splavi, odnosno da se njihova internalizacija odvija i u slučaju kada je integritet lipidnih splavi narušen. Naravno, treba napomenuti da ne možemo isključiti ulogu svih tipova lipidnih splavi, s obzirom da je pokazano da postoje dobro organizirane membranske mikrodomene, odnosno lipidne splavi za čiji integritet nije ključan kolesterol (147, 148). Također je važno napomenuti, da iako filipin nije imao učinka na internalizaciju niti jedne od ispitivanih MHC-I molekula, filipin je u prosjeku povećao površinski izražaj nekonformiranih HLA-Cw6, H2-L^d i nekonformiranih MHC molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji u nultom vremenu, odnosno 30 minuta nakon pretretmana s filipinom na 37 °C (46b).

Slika 46. Učinak filipina na internalizaciju MHC molekula I razreda

Slika 46. Učinak filipina na internalizaciju MHC molekula I razreda.
Stanice J26-B7, J26-G1, J26-Cw6, L-L^d i HeLa su pretretirane s filipinom (1.4 μg/mL), površinski obilježene protu-MHC-I mPt te inkubirane sa ili bez filipina tijekom 60 minuta, te su preostale površinske molekule detektirane protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao omjer MFI vrijednosti 60 minuta nakon internalizacije i MFI vrijednosti nultog vremena pomnožen sa 100 (a). Iste stanične linije su 60 minuta inkubirane sa ili bez prisustva filipina i površinski izražaj MHC-I molekula je određen protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao omjer MFI vrijednosti stanica tretiranih s F i MFI vrijednosti netretiranih stanica pomnožen sa 100 (b). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=4) (a i b).

4.2.2.3.Utjecaj AlF_4^- na internalizaciju MHC molekula I razreda

Aluminij fluorid (AlF_4^-) je poznat kao aktivator Arf6 GTPaze (98) za koju je pokazano da ima važnu ulogu u internalizaciji MHC molekula I razreda (56, 57, 58, 59). S obzirom da je općenito za funkcioniranje Rho GTPaza neophodna njihova stalna promjena iz aktivne u inaktivnu formu, AlF_4^-, iako u osnovi posredno aktivira Arf6 GTPazu on ometa njenu normalnu funkciju iz razloga što je akutno aktivira, te dovodi do stvaranja membranskih protruzija koje ostaju imobilizirane u subplazmalematskom području (99, 100). Kako bi ispitali tu činjenicu, stanice smo tretirali s AlF_4^- te pratili kinetiku internalizacije MHC molekula I razreda, uspoređujući je s kinetikom na netretiranim stanicama.

AlF_4^- uzrokovao je ubrzanje kinetike internalizacije kako konformiranih, tako i nekonformiranih MHC-I molekula u odnosu na kontrolu ($p<0.05$) (slika 47a). Nadalje, nakon tretmana intaktnih stanica s AlF_4^- tijekom jednoga sata došlo je do većeg pada površinskog

izražaja MHC-I molekula u usporedbi sa samom internalizacijom (47b). Treba napomenuti da je površinski izražaj dobiven na ovaj način rezultanta i sintetskih i endocitoznih procesa.

Slika 47. Učinak AlF_4^- na internalizaciju MHC molekula I razreda

Slika 47. Učinak AlF_4^- na internalizaciju MHC molekula I razreda.

Stanice J26-B7, J26-G1, J26-Cw6, L-L^d i HeLa bile su kratkotrajno pretretirane s AlF_4^- (30mM NaF + 50 μM $AlCl_3$), te površinski obilježene odgovarajućim protu-MHC-I mPt. Nakon 1 sat internalizacije površinski izražaj je analiziran protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao omjer MFI vrijednosti 1 sat nakon internalizacije i MFI vrijednosti nultog vremena pomnožen sa 100 (srednja vrijednost ± standardna devijacija; n=4) (a). Iste stanične linije su 60 minuta inkubirane sa ili bez prisustva AlF_4^- i površinski izražaj MHC-I molekula je određen protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao omjer MFI vrijednosti stanica tretiranih s AlF_4^- i MFI vrijednosti netretiranih stanica pomnožen sa 100 (srednje vrijednosti ± standardna devijacija; n=4) (b). Tf-biotin je bio površinski vezan na prethodno kratkotrajno s AlF_4^- pretrtirane stanice HeLa, te internaliziran sa ili bez AlF_4^-. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti postotaka početnog izražaja koji predstavlja omjer MFI vrijednosti u ispitivanom i nultom vremenu pomnožen sa 100, ± standardna devijacija (n=4) (c). Nakon kratkotrajnog pretretmana s AlF_4^-, stanicama HeLa i J26-Cw6 dodan je Tf-AF555 zajedno s AlF_4^- ili čistim medijem te je njegov učinak na internalizaciju Tf-a (1 sat) analiziran konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm (d).

S obzirom da se spominje da Arf6 GTPaza može imati učinka na klatrinsku endocitozu (56), ispitali smo i učinak AlF_4^- na internalizaciju Tf-a. AlF_4^- usporio je internalizaciju Tf-a, iako treba zamijetiti da se nakon 1 sat inkubacije, kinetike internalizacije Tf-a na netretiranim stanicama i na stanicama koje su bile tretirane s AlF_4^- izjednače (slika 47c). Taj rezultat potvrđuje i slika 47d iz koje je vidljivo da unatoč tretmanu s AlF_4^-, Tf nakon 60 minuta ipak uspije uči u stanicu, no ostaje zarobljen uz samu staničnu membranu, te u jukstanuklearnom području koje za razliku od kontrole nema klasičnu tubularnu formaciju, već iz „nabijene" kuglaste strukture eventualno mogu izbijati zrakasti nastavci (slika 47d). Iz suprotnog učinka AlF_4^- na internalizaciju Tf-a i internalizaciju MHC-I molekula očigledno je da Tf i MHC-I molekule ne koriste isti endocitotički mehanizam za ulazak u stanicu, no to ne isključuje mogućnost njihovog kasnijeg ispreplitanja u endosomalnom putovanju unutar stanice.

4.3. VEZIKULARNI TRANSPORT MHC MOLEKULA I RAZREDA

Nakon internalizacije, MHC molekule I razreda prolaze kroz mnoge unutarstanične odjeljke na putu do svog konačnog odredišta. Kako bi ispitali koji sve endosomalni odjeljci sudjeluju tijekom njihova unutarstaničnog putovanja, te da li konformirane i nekonformirane MHC molekule I razreda koriste isti unutarstanični put, u različitim vremenima kolokalizirali smo internalizirane konformirane i nekonformirane MHC molekule I razreda međusobno, te svaku od njih s biljezima određenih unutarstaničnih odjeljaka.

4.3.1. Obrazac unutarstanične raspodjele internaliziranih konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda

Unutarstanično putovanje MHC molekula I razreda moguće je pratiti nakon površinskog obilježavanja s odgovarajućim mPt i to metodom indirektne imunofluorescencije pomoću konfokalnog mikroskopa. U tu svrhu, stanice su inkubirane na 4 °C u prisutnosti odgovarajućeg mPt kako bi se omogućilo vezivanje mPt-a, a istovremeno spriječila internalizacija. Stanice su potom isprane, prebačene u inkubator te inkubirane na 37 °C kroz naznačene vremenske intervale. Na kraju ispitivane kinetike stanice su kratkotrajno zakiseljene kako bi se neinternalizirane molekule uklonile s površine, odnosno kako površinska fluorescencija ne bi ometala unutarstanični signal. Potom su fiksirane i analizirane pomoću konfokalnog mikroskopa.

Nekonformirane HLA-G1, kao i nekonformirane HLA-B7 molekule se nakon 90 minuta internalizacije ne mogu detektirati unutar stanice, dok je signal konformiranih molekula istih alela jedva detektibilan. Za razliku od toga, konformirane i nekonformirane HLA-Cw6, konformirane i nekonformirane H2-L^d, te konformirane i nekonformirane MHC-I molekula na HeLa staničnoj liniji pokazuju jak signal, ali različitu raspodjelu unutar stanice nakon 90 minuta internalizacije. Dok se konformirane molekule smještaju pretežito u jukstanuklearni dio te imaju tubularno-vezikularnu formaciju, nekonformirane molekule se nalaze dominantno perinuklearno u pretežito vezikularnim tvorbama (slika 48). Bitno je napomenuti da obrazac internaliziranih MHC-I molekula dosta podsjeća na sliku dobivenu u ustaljenom stanju (slika 23).

Slika 48. Unutarstanična distribucija HLA-B7, HLA-Cw6, HLA-G1, H2-L^d i klasičnih MHC molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji nakon internalizacije

Slika 48. Unutarstanična distribucija HLA-B7, HLA-Cw6, HLA-G1, H2-L^d i klasičnih MHC molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji nakon internalizacije.

Stanice su površinski obilježene odgovarajućim mPt, te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom 90 minuta. Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Umetnute slike prikazuju početnu površinski izražaj. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Obzirom da nakon 90 minuta internalizacije nismo uspjeli dobiti značajniji signal HLA-B7 i HLA-G1 molekula unutar stanice, internalizirali smo ih kroz 3 sata.

Međutim, niti nakon 3 sata internalizacije, nekonformirane HLA-G1 molekule i dalje se ne mogu uočiti unutar stanice (slika 49), što je posljedica činjenice što njihov površinski izražaj nije detektibilan imunofluorescentnim tehnikama (protočna citometrija i konfokalna mikroskopija) (slika 21 i slika 23). Jednako tako, signal internaliziranih nekonformiranih HLA-B7 molekula je izrazito slab (slika 49) što je također u korelaciji s njihovim početnim

površinskim izražajem. Iako se tri sata po internalizaciji konformirane HLA-B7 i HLA-G1 molekule mogu vidjeti unutar stanice, te pokazuju sličan obrazac unutarstanične distribucije kao i konformirane molekule na HeLa staničnoj liniji, te konformirane HLA-Cw6 i konformirane H2-L^d molekule (slika 49), njihov signal nije dovoljno oštar za daljnje podrobnije studije.

Slika 49. Unutarstanična distribucija HLA-B7 i HLA-G1 molekula nakon 3 sata internalizacije

Slika 49. Unutarstanična distribucija HLA-B7 i HLA-G1 molekula nakon 3 sata internalizacije.
Stanice su površinski obilježene odgovarajućim mPt, te inkubirane na 37°C u mediju tijekom 3 sata. Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

4.3.2. Usporedba unutarstaničnog putovanja MHC molekula I razreda i transferina/transferinskog receptora

Sudbina internaliziranih molekula, grubo gledajući, može biti dvojaka. Naime, molekule nakon što su ušle u stanicu (nakon što su se endocitirale), mogu se priključiti ili reciklirajućoj ruti ili se s druge strane mogu usmjeriti u degradaciju. Budući da su TfR/Tf molekule koje se najčešće koriste za obilježavanje endosomalnog puta recikliranja, kolokalizirali smo internalizirane konformirane i nekonformirane MHC molekule I razreda s internaliziranim TfR/Tf kako bi ustanovili da li se MHC molekule I razreda nalaze u sklopu puta recikliranja. Internalizacija je trajala 90 minuta za HLA-Cw6 i MHC-I molekula na HeLa staničnoj liniji, te 180 minuta za HLA-G1 i HLA-B7.

Konformirane MHC-I molekule, neovisno o alelu, tijekom internalizacije u velikoj mjeri se kolokaliziraju s internaliziranim TfR, a kolokalizacija je najizraženija u jukstanuklearnoj regiji. U tom području konformirane MHC-I nalaze se zajedno s TfR, vrlo često u istom odjeljku, ali nerijetko u različitim pododjeljcima (slika 50). Za razliku od konformiranih MHC-I molekula, nekonformirane MHC-I molekule se samo djelomično kolokaliziraju s internaliziranim TfR i to u perijukstanuklearnom dijelu (slika 50). Bitno je ukazati na jasnu kompartmentalizaciju u tim odjeljcima; u obrascu u kojem se nekonformirane MHC-I

molekule nalaze u središtu vezikule, dok je TfR smješten u vezikularnim tubulićima vezanim na vanjskoj strani istog endosoma (slika 50; naglašeno strelicama). Odvajanje TfR i nekonformiranih MHC-I molekula upućuje na njihovu kasniju različitu endosomalnu sudbinu (vidi kasnije; Recikliranje MHC-I molekula). S druge strane, rezultat ukazuje da konformirane MHC-I molekule nakon internalizacije slijede sličan put kao i TfR.

Slika 50. Kolokalizacija HLA-B7, HLA-Cw6, HLA-G1 i klasičnih HLA molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji i transferinskog receptora (TfR) nakon internalizacije

Slika 50. Kolokalizacija HLA-B7, HLA-Cw6, HLA-G1 i klasičnih HLA molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji i transferinskog receptora (TfR) nakon internalizacije.

Stanice su površinski obilježene odgovarajućim mPt na MHC-I molekule i mPt na TfR te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom 90 minuta (HLA-Cw6 i HeLa) ili 180 minuta (HLA-B7 i HLA-G1). Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

4.3.3. Uloga kasnih endosomalnih odjeljaka tijekom unutarstaničnog putovanja MHC molekula I razreda

Kako bi ispitali da li nakon internalizacije MHC-I molekule dolaze u kasne endosomalne odjeljke, odnosno da li slijede put degradacije, kolokalizirali smo ih s biljegom kasnih endosoma – LBPA. LBPA je molekula koja se nalazi isključivo u kasnim endosomima (117, 125) i time nam omogućava preciznije lokalizacije u tzv. ranijim degradacijskim odjeljcima u kojima pH nije toliko kiseo (pH 5,2-5,8) kao što je u lizosomima (pH 4,5-5,0).

Slika 51. Kolokalizacija HLA-B7, HLA-Cw6 i klasičnih MHC molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji s kasnim endosomalnim odjeljcima nakon internalizacije

Slika 51. Kolokalizacija HLA-B7, HLA-Cw6 i klasičnih MHC molekula I razreda na HeLa staničnoj liniji s kasnim endosomalnim odjeljcima nakon internalizacije.

Stanice su površinski obilježene odgovarajućim mPt na MHC-I molekule te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom 90 minuta (HLA-Cw6 i HeLa) ili 180 minuta (HLA-B7). Fiksiranim i permeabiliziranim stanicama je dodano protu-LBPA Pt. Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Nakon 90 minuta (J26-Cw6, HeLa) ili 180 minuta (J26-B7) internalizacije niti konformirane niti nekonformirane MHC-I molekule niti jednog od ispitivanih alela ne kolokaliziraju se u značajnijoj mjeri s markerom kasnih endosomalnih odjeljaka - LBPA (slika 51). No vrlo je važno uočiti bitnu razliku u internalizacijskom obrascu konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula. Naime, dok se konformirane molekule nalaze u onim dijelovima citoplazme u kojima je izražaj LBPA izuzetno slab (jukstanuklearno područje), nekonformirane molekule se nalaze upravo u onim dijelovima u kojima postoji i izuzetno jak izražaj $LBPA^+$ odjeljaka (slika 51). To opažanje upućuje na mogućnost da nekonformirane molekule ipak dolaze u kasne endosomalne odjeljke, no da se nakon dolaska u njima vrlo brzo i razgrađuju ili ga brzo napuštaju.

Internalizirane konformirane i nekonformirane MHC-I molekule kolokalizirali smo i s Lamp-1^+ odjeljcima (kasni endosomi i lizosomi). Kako bismo uklonili sumnju da rezultat nekolokalizacije internaliziranih molekula s kasnim odjeljcima nije posljedica nedostatne osjetljivosti ove metode (naime, manji broj molekula u većem odjeljku, kao što su kasni odjeljci, se dispergira i često ne detektira), internalizaciju smo proveli tijekom 3 sata uz stalno prisutstvo mPt na 37 °C. Naime, taj način praćenja internaliziranih molekula je nerijetko opisan u literaturi iz istih razloga (201). Kako bi ipak sa sigurnošću isključili mogućnost razlike u endosomalnom putovanju MHC-I molekula ovisno o dužini internalizacije i prisutnosti mPt, internalizirane MHC-I molekule kolokalizirali smo i s paralelno internaliziranim TfR-om. Naime, konformirane MHC-I trebale bi se kolokalizirati s internaliziranim TfR-om za razliku od nekonformiranih MHC-I molekula (slika 50). Nakon produžene internalizacije u prisutnosti mPt konformirane MHC-I molekule izrazito se jako kolokaliziraju s internaliziranim TfR-om, dok značajnija kolokalizacija s Lamp-1^+ odjeljcima nije opažena (slika 52), što je u skladu s rezultatom prikazanim ranije (slika 50). Nadalje, kolokalizacija nekonformiranih MHC-I molekula i internaliziranog TfR-a je izuzetno slaba i opaža se isključivo u perinuklearnom području (slika 52), kao i kolokalizacija nekonformiranih MHC-I molekula i Lamp-1^+ odjeljaka. U kolokaliziranim odjeljcima se može i dalje uočiti kako Lamp-1 zadržava svoj smještaj u vanjskim membranama.

Uspoređujući sliku 52 i sliku 50 očito je da unatoč internalizaciji u dužem vremenskom periodu, te prisutnosti mPt prilikom internalizacije, endosomalno putovanje MHC-I molekula nije narušeno.

Slika 52. Kolokalizacija HLA-Cw6 molekula s reciklirajućim i kasnim endosomalnim odjeljcima nakon produžene internalizacije

Slika 52. Kolokalizacija HLA-Cw6 molekula s reciklirajućim i kasnim endosomalnim odjeljcima nakon produžene internalizacije.

Stanice J26-Cw6 su inkubirane na 37°C tijekom 3 sata u prisustvu protu-MHC-I mPt bez (a) ili sa protu-TfR mPt (b). Stanice su zatim fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano ili protu-Lamp-1 Pt (a). Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

4.3.4. Usporedna internalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula

Kako bi potvrdili da se uistinu unutar endocitoznog puta konformirane i nekonformirane MHC-I molekule različito sortiraju, kolokalizirali smo ih međusobno nakon internalizacije. Iako smo u dosadašnjem i kasnijem općem dijelu ispitivanja koristili svih pet različitih staničnih linija, preciznija istraživanja smo fokusirali na J26-Cw6 i HeLa staničnu liniju. Naime, imajući u vidu jačinu njihovog signala, na njima najsigurnije možemo uspoređivati konformirane i nekonformirane molekule.

Slika 53. Međusobna kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula nakon internalizacije

Slika 53. Međusobna kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula nakon internalizacije.

Stanice J26-Cw6, L-L^d i HeLa su površinski obilježene odgovarajućim mPt na MHC-I molekule, te inkubirane na 37 °C tijekom 90 minuta. Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Unatoč kolokalizaciji internaliziranih konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula u perinuklearnom dijelu, vidljivo je da je jukstanuklearni dio (okruženo crvenom linijom) u potpunosti negativan na nekonformirane, ali pozitivan na konformirane molekule (slika 53). Perinuklearna kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula upućuje na postojanje zajedničkih endosomalnih odjeljaka u kojima se isprepliće unutarstanično putovanje konformiranih i nekonformiranih molekula.

4.3.5. Uloga ranih (sortirajućih) endosoma u unutarstaničnom putovanju konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda.

Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula u perinuklearnom području, te istovremena kolokalizacija i konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula s transferinom/receptorom u tom području, upućuje na postojanje endosomalnog odjeljka u kojemu se isprepliću unutarstanični putovi konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula te Tf/TfR-a tijekom njihova putovanja sa stanične membrane prema konačnom odredištu. Budući da se nakon internalizacije niti konformirane niti nekonformirane MHC-I molekule nisu mogle detektirati u Lamp-1/LBPA odjeljcima, a Tf/TfR nakon internalizacije je poznato

da ne odlaze u te odjeljke isključili smo mogućnost ispreplitanja endosomalnog putovanja navedenih molekula u kasnim endosomalnim odjeljcima. Izgled tog područja nalikuje području u kojemu se nalaze rani (sortirajući) endosomalni odjeljci. Kako bi ustanovili da li su rani endosomi zaista odjeljci u kojima se susreću konformirane i nekonformirane MHC-I molekule nakon internalizacije, stanice smo tretirali s LY, reverzibilnim kemijskim inhibitorom koji blokira aktivnost PI3K, te stoga dozvoljava ulazak molekule u EE, ali blokiraju izlazak iz njih, te molekula koja uđe u rani endosom, iz njega više ne može izaći. No kada se LY ukloni iz medija, dolazi do brzog oporavka PI3K funkcije (138).

Slika 54. Kolokalizacija HLA-Cw6 molekula s transferinom nakon inhibicije PI3K (tretman s LY)

Slika 54. Kolokalizacija HLA-Cw6 molekula s transferinom nakon inhibicije PI3K (tretman s LY).
Tf je kontinuirano internaliziran s površine stanica J26-Cw6 90 minuta u čistom mediju ili u prisutnosti LY (100 μM), te je kolokaliziran s EEA-1 (a). Konformirane HLA-Cw6 molekule su nakon površinskog obilježavanja mPt-om internalizirane 90 minuta u prisutnosti LY, te kolokalizirane s Lamp-1 (b). Konformirane i nekonformirane HLA-Cw6 molekule su nakon površinskog obilježavanja mPt-om zajedno s Tf-om ili međusobno internalizirane 90 minuta u prisutnosti LY (*pulse*), te zatim kratkotrajno zakiseljene kako bi se uklonile neinternalizirane molekule i inkubirane u čistom mediju daljnjih 20 minuta (*chase*), te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta=5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Nakon 90 minuta kontinuirane internalizacije u prisutnosti LY, Tf ostaje na periferiji stanice gdje se izuzetno jako kolokalizira s EEA-1^+ odjeljcima (rani endosomi), dok u kontroli dolazi u jukstanuklearni dio a kolokalizacija s EEA-1 je samo djelomična (slika 54a). Iz toga možemo zaključiti da je inhibicija PI3K uistinu blokirala izlazak iz ranih endosoma, dok nije utjecala na ulazak molekula u rane endosome. Nakon internalizacije u prisutnosti LY, i konformirane i nekonformirane HLA-Cw6 molekule izrazito jako se kolokaliziraju kako međusobno, tako i s Tf-om što upućuje na zaključak da te molekule na putu prema svom konačnom odredištu prolaze kroz EEA-1^+ odjeljke (slika 54c, *pulse*). Nakon uklanjanja inhibitora (LY) iz medija, dolazi do oporavka PI3K funkcije, te dolazi i do razdvajanja konformiranih i nekonformiranih HLA-Cw6 molekula, te nekonformiranih HLA-Cw6 molekula i Tf-a, dok konformirane HLA-Cw6 molekule nastavljaju putovati zajedno s Tf-om prema jukstanuklearnom području (slika 54c, *chase*). Tijekom internalizacije u prisustvu LY nije opažena kolokalizacija konformiranih HLA-Cw6 molekula i Lamp-1 odjeljaka (slika 54b).

4.3.6. Utjecaj pH ranih endosoma na endosomalno sortiranje

Budući da pH vrijednost ranih endosoma iznosi oko 6.0 do 6.5 (2), odnosno teži kiselom, željeli smo ispitati da li narušavanje te pH vrijednosti (neutralizacija ranih endosoma) ima utjecaj na sortiranje molekula unutar endocitoznog puta. Stoga smo stanice tretirali s konkanamicinom A (KonA), kemijskim inhibitorom H-ATPaze, te promatrali da li se pod njegovim utjecajem mijenja konačno odredište molekula unutar stanice, odnosno da li dolazi do narušavanja mehanizma sortiranja molekula. U tu svrhu internalizirali smo konformirane i nekonformirane HLA-Cw6 molekule, te TfR u prisustvu KonA na pretretiranim stanicama (5 sati). Konformirane i nekonformirane MHC-I molekule smo kolokalizirali međusobno, s TfR, ili s biljegom kasnih endosomalnih odjeljaka (Lamp-1).

Slika 55. Endosomalno putovanje HLA-Cw6 molekula nakon narušavanja endosomalnog pH gradijenta

Slika 55. Endosomalno putovanje HLA-Cw6 molekula nakon narušavanja endosomalnog pH gradijenta. Učinak KonA (50 nM) je praćen na pretretiranim (3 sata) J26-Cw6 (a-c) i Balb 3T3 (d-e) stanicama. Stanice su inkubirane na 37 °C tijekom 3 sata u prisustvu protu-MHC-I mPt +/- protu-TfR mPt i kolokalizirane s Lamp-1 (a) ili međusobno (c). Stanice su inkubirane na 37 °C tijekom 3 sata u prisustvu protu-TfR mPt i kolokalizirane s Rab11 (b) odnosno EEA-1 (e). Kolokalizacija Lamp-1 i EEA-1 sa i bez KonA (d). Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Nakon tretmana s KonA, i konformirane i nekonformirane HLA-Cw6 molekule se izrazito jako kolokaliziraju s internaliziranim transferinskim receptorom u perinuklearnom području. Zanimljivo je opažanje da se niti TfR, niti konformirane MHC-I molekule više ne mogu detektirati u jukstanuklearnom području (slika 55a i b). U skladu s tim izostaje kolokalizacija TfR i Rab11 molekule (biljega reciklirajućih odjeljaka koji se dominantno smješta jukstanuklearno) (slika 55b). Nadalje, bitno je napomenuti da se obje konformacije MHC-I molekula, osim zajedno s TfR u već spomenutim odjeljcima, nalaze i perifernije citoplazmatski u velikim vezikularnim tvorbama (slika 55a). Iako bi se mogla očekivati izrazita kolokalizacija MHC-I molekula i Lamp-1^{+} odjeljaka (obzirom da KonA narušavanjem pH gradijenta kasnih odjeljaka onemogućuje funkcionalnost kiselih lizosomalnih hidrolaza, a samim time i degradaciju), ta pojava nije uočena (slika 55a). To upućuje da je održavanje pH gradijenta endosomalnih odjeljaka bitno za pravilno sortiranje molekula unutar endocitoznog puta. U skladu s tim, konformirane i nekonformirane MHC-I molekule se nakon internalizacije u prisustvu KonA gotovo u potpunosti međusobno kolokaliziraju (slika 55c) u perinuklearnom području u velikim vakuolama, za razliku od netretiranih stanica (slika 53). Obzirom da je nakon KonA uočena potpuna kolokalizacija TfR i EEA-1 (slika 55e), kao i EEA-1 i MHC-I molekula (nije prikazano) možemo pretpostaviti da se sortiranje ovdje ispitivanih molekula događa na razini ranih endosoma. Nadalje, kolokalizacija Lamp-1 i EEA-1 molekula nije uočena niti nakon KonA tretmana (slika 55d) što ukazuje da ovaj inhibitor ne uzrokuje spajanje klasičnih ranih i kasnih endosoma.

4.3.7. Uloga jukstanuklearnog reciklirajućeg endosomalnog odjeljka u unutarstaničnom putovanju konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda

Jukstanuklearni reciklirajući endosomalni odjeljak (JNRC) karakteriziran je prisustvom Rab11 GTPaze, te prisutnošću Tf-a/TfR-a već 30 minuta nakon internalizacije. Ranije smo pokazali da konformirane MHC-I molekule dolaze u jukstanuklearni dio zajedno s TfR-om, za razliku od nekonformiranih MHC-I molekula koje se kolokaliziraju u puno manjoj mjeri s TfR-om i to isključivo na periferiji stanične citoplazme (rani endosomi) (slika 50 i 52). Prema tome se može zaključiti da JNRC ima ulogu u unutarstaničnom putovanju konformiranih ali ne i nekonformiranih MHC-I molekula. Kako bi potvrdili tu tezu, MHC-I molekule i Tf internalizirali smo u prisustvu brefeldina A (BFA). Naime, pokazano je u

literaturi da BFA koči recikliranje Tf-a iz JNRCa, te uzrokuje njegovu retenciju u tom odjeljku (140).

Slika 56. Endosomalno putovanje HLA-Cw6 molekula i Tf-a nakon tretmana s Brefeldinom A

Slika 56. Endosomalno putovanje HLA-Cw6 molekula i Tf-a nakon tretmana s Brefeldinom A.
Konformirane ili nekonformirane HLA-Cw6 molekule su nakon površinskog obilježavanja mPt-om internalizirane zajedno s Tf-om 90 minuta u prisutnosti BFA (a). Konformirane HLA-Cw6 molekule su nakon površinskog obilježavanja mPt-om internalizirane 90 minuta u prisutnosti BFA ili LY, te su nakon fiksacije i permeabilizacije molekule kolokalizirane s Rab11 ili EEA-1 (b). Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Nakon tretmana s BFA, internalizirani Tf dolazi u jukstanuklearni dio u kojemu se gotovo potpuno kolokalizira s Rab11 biljegom (nije prikazano), što potvrđuje prijašnja saznanja da se Tf nakon internalizacije pod djelovanjem BFA zarobljava u JNRC. Tijekom paralelne internalizacije konformiranih HLA-Cw6 molekula s Tf-om u prisustvu BFA dolazi do njihova nakupljanja u sada kompaktnom jukstanuklearnom odjeljku u kojem se izrazito jako međusobno kolokaliziraju (slika 56a). Taj odjeljak izuzetno je pozitivan na Rab11, ali samo umjereno na EEA-1 (slika 54b). Kao što je i očekivano prema rezultatima prikazanim na slici 54, LY je znatno zakočio izlazak konformiranih MHC-I molekula iz EEA-1^+ odjeljaka koji su negativni na Rab11 (slika 56b). Nekonformirane MHC-I molekule su i nakon BFA tretmana izuzete iz jukstanuklearnog područja (slika 56a).

Iz svega navedenog, možemo zaključiti da se, nakon što izađu iz ranih endosoma, konformirane MHC-I molekule usmjeravaju u JNRC zajedno s Tf-om, dok nekonformirane MHC-I molekule ne slijede taj unutarstanični put.

4.3.8. Uloga klatrina i Arf6 GTPaze u unutarstaničnom putovanju konformiranih i nekonformirani MHC molekula I razreda (tretman s klorpromazinom, *Dyanasore-om* i AlF_4^-)

Klorpromazin i *Dynasore* blokirali su internalizaciju Tf-a u kraćim vremenskim periodima (do 15 minuta), odnosno usporili njegovu internalizaciju u kasnijim vremenima (1 sat) (slika 40). No, obzirom da dio Tf-a koji je uspio ući u stanicu (1 sat internalizacije) se nije mogao detektirati u jukstanuklearnom području (slika 40), možemo zaključiti da klatrin i dinamin osim što imaju ulogu u endocitozi Tf-a, imaju ulogu i u njegovom unutarstaničnom putovanju. Nadalje, internalizacija Tf-a u kraćim vremenskim periodima također je bila blokirana s AlF_4^-, no u dužim vremenskim intervalima (1 sat) krivulje internalizacije Tf-a na tretiranim i netretiranim stanicama su se gotovo izjednačile (slika 47). Međutim, za razliku od CP-a i D-a u čijem prisustvu internalizirani Tf nalazimo u perifernim vezikularnim tvorbama, nakon tretmana s AlF_4^- nalazimo ga uz samu staničnu membranu i "nabijenog" u jukstanuklearnom području (slika 47). Iz toga možemo zaključiti da i Arf6 GTPaza ima ulogu u unutarstaničnom putovanju Tf-a, no na razini različitih endosomalnih odjeljaka. Kako bi ispitali o kojim se unutarstaničnim odjeljcima radi, kolokalizirali smo Tf jedan sat nakon internalizacije u prisustvu navedenih inhibitora s EEA-1 i Rab11 biljezima.

Slika 57. Endosomalno putovanje Tf-a na HeLa staničnoj liniji nakon tretmana s CP, D i AlF_4^-

Slika 57. Endosomalno putovanje Tf-a na HeLa staničnoj liniji nakon tretmana s CP, D i AlF_4^-.
Tf je kontinuirano internaliziran s površine stanica HeLa jedan sat u prisutnosti CP, D ili AlF_4^- nakon kratkotrajnog pretretmana s navedenim inhibitorom. Nakon fiksacije i permeabilizacije dodano je protu-EEA-1 protutijelo, te su stanice analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

U stanicama koje nisu tretirane inhibitorom internalizirani Tf se nalazi dominantno u tubulovezikularnom jukstanuklearnom odjeljku koji se slabo kolokalizira s EEA-1 (slika 57). No, ukoliko se internalizacija Tf-a odvijala u prisustvu CP ili D, Tf se ne nalazi jukstanuklearno već difuzno duž cijele citoplazme u izrazito EEA-1 pozitivnim vezikulama. Kada se internalizacija Tf-a odvijala u prisustvu AlF_4^- tada, kao što je ranije navedeno, dio Tf-a se nalazi neposredno ispod stanične membrane, a dio u „nabijenom“ jukstanuklearnom području. Nadalje, niti subplazmalemalno niti jukstanuklearno smješteni Tf ne kolokalizira se s EEA-1 biljegom (slika 57), za kojeg je važno napomenuti da je nakon tretmana s AlF_4^- slabije izražen. Identični rezultati dobiveni su i na J26-Cw6 stanicama (nije prikazano). Iz svega navedenog možemo zaključiti da CP i D zaustavljaju endosomalni transport Tf-a u odjeljcima koji su EEA-1^+, dok ga AlF_4^- zaustavlja u dva različita odjeljka koja su oba negativna na EEA-1 marker (slika 57). Jukstanuklearni odjeljak u kojemu dolazi do nakupljanja internaliziranog Tf-a u prisustvu AlF_4^- je znatno, ali ne i potpuno Rab11^+, dok su subplazmalemalne vezikule Rab11^- (slika 58).

Slika 58. Kolokalizacija Tf-a internaliziranog u prisustvu AlF_4^- s Rab11 biljegom na HeLa stanicama

Slika 58. Kolokalizacija Tf-a internaliziranog u prisustvu AlF_4^- s Rab11 biljegom na HeLa stanicama.
Tf je kontinuirano internaliziran s površine stanica HeLa jedan sat u prisutnosti AlF_4^- nakon kratkotrajnog pretretmana. Nakon fiksacije i permeabilizacije dodano je protu-Rab11 protutijelo, te su stanice analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Kako bi ispitali da li CP, D i AlF_4^- imaju jednak učinak na unutarstanično putovanje Tf-a i unutarstanično putovanje konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula, stanice smo tretirali s navedenim inhibitorima, te ih kolokalizirali s paralelno internaliziranim Tf-om.

Tijekom intrernalizacije u prisustvu CP ili D i konformirane i nekonformirane MHC-I molekule izrazito jako se kolokaliziraju s paralelno internaliziranim Tf-om u vezikularnim tvorbama smještenim po cijeloj citoplazmi, te se gubi njihov klasičan obrazac nakon internalizacije (konformirane molekule-jukstanuklearno; nekonformirane molekule-perinuklearno; slika 50). Važno je napomenuti da, iako se radi o istim endosomalnim odjeljcima, jasno je vidljivo da se nekonformirane MHC-I molekule nalaze u različitim membranskim domenama od Tf-a (slika 59). Tijekom internalizacije u prisustvu AlF_4^-, konformirane MHC-I molekule pokazuju jednak obrazac kao i Tf u prisustvu navedenog inhibitora, odnosno nalazimo ih u sitnim vezikulama neposredno ispod stanične membrane te u jukstanuklearnom području koje je izrazito nabijeno i kuglasto te je izgubilo svoju klasičnu tubularnu strukturu (slika 59). Nekonformirane MHC-I molekule se nakon internalizacije u prisustvu AlF_4^- ne mogu detektirati unutar stanice (slika 59), iako je zbunjujuće da ih više nema niti na staničnoj površini (slika 47).

Slika 59. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula s Tf-om tijekom internalizacije u prisustvu CP, D ili AlF_4^- na HeLa stanicama

Slika 59. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula s Tf-om tijekom internalizacije u prisustvu CP, D ili AlF_4^- na HeLa stanicama.

Konformirane ili nekonformirane MHC-I molekule su nakon površinskog obilježavanja mPt-om paralelno s Tf-om internalizirane 90 minuta u prisutnosti CP, D ili AlF_4^- nakon kratkotrajnog pretretmana s navedenim inhibitorom. Nakon fiksacije i permeabilizacije stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

4.3.9. Unutarstanično putovanje B podjedinice toksina kolere

Budući da smo ranije pokazali da CtxB na Balb 3T3 i HeLa stanicama koristi različite mehanizme endocitoze za ulazak u stanicu (slika 41 i slika 44), željeli smo ispitati da li joj je i endosomalno putovanje nakon internalizacije na tima dvjema staničnim linijama različito. Kako bi ispitali važnost PI3K u njenom unutarstaničnom putovanju, stanice smo tretirali s LY (100 μM). Značaj endosomalnog pH gradijenta utvrdili smo putem tretiranja stanica s

inhibitorima koji ga narušavaju, a od inhibitora smo koristili: monensin (7,5 μM), bafilomicin A1 (Baf A1; 200 nM) i amonij klorid (NH_4Cl; 15 mM).

Slika 60. Unutarstanično putovanje CtxB, te važnost endosomalnog pH gradijenta i PI3K

Slika 60. Unutarstanično putovanje CtxB, te važnost endosomalnog pH gradijenta i PI3K.
Balb 3T3 i HeLa stanicama dodan je CtxB-AF555 (4 °C; 1 sat), stanice su zatim isprane kako bi se uklonio nevezani CtxB, te inkubirane na 37 °C tijekom naznačenih vremenskih intervala. Stanice su zatim fiksirane s 4% PFA, te je dodan protu-GM-130 (a). Prethodno pretretiranim HeLa i Balb 3T3 stanicama dodan je CtxB-AF555 (4 °C; 1 sat), stanice su zatim isprane kako bi se uklonio nevezani CtxB, te inkubirane na 37 °C u čistom mediju ili u prisustvu naznačenog inhibitora tijekom 45 minuta. Stanice su zatim fiksirane s 4% PFA, te je dodan protu-GM-130 (b). Prethodno pretretiranim Balb 3T3 stanicama dodan je CtxB-AF555 (4 °C; 1 sat), stanice su zatim isprane kako bi se uklonio nevezani CtxB, te inkubirane na 37 °C tijekom naznačenih vremenskih intervala u prisustvu LY. Stanice su zatim fiksirane s 4% PFA, te je dodan protu-GM-130 (c). Stanice su analizirane konfokalnim mikroskopom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm (b).

CtxB nakon internalizacije putuje u GA na obje ispitivane stanične linije, no s razlikom da je kinetika brža na HeLa staničnoj liniji (slika 60a). Uslijed narušavanja endosomalnog pH gradijenta, CtxB se ne može detektirati u GA na HeLa staničnoj liniji, dok mu na Balb 3T3 staničnoj liniji unutarstanično putovanje nije narušeno (slika 60b). Budući da smo pokazali da je pH gradijent nužan za sortiranje molekula na nivou ranih endosoma (slika 55), možemo zaključiti da rani endosomi nemaju važnu ulogu u putovanju CtxB sa plazmatske membrane u GA na Balb 3T3 staničnoj liniji, za razliku od HeLa stanične linije. Taj zaključak potvrđuje i zapažanje da uslijed blokade PI3K, endosomalno putovanje CtxB na Balb 3T3 staničnoj liniji nije narušeno (slika 60c).

4.4.RECIKLIRANJE MHC MOLEKULA I RAZREDA

Konačna sudbina molekule nakon internalizacije može biti ili recikliranje i/ili degradacija. Kao što je poznato, Tf i TfR nakon internalizacije ne podliježu degradaciji već se u cijelosti usmjeravaju u recikliranje, s razlikom da se Tf nakon recikliranja gubi iz stanice, a TfR dolazi na staničnu površinu te ubrzo ponovno podliježe internalizaciji. Kako bi ispitali da li konformirane i nekonformirane MHC-I molekule također podliježu procesu recikliranja i u kojoj mjeri, koristili smo recikliranje transferina i transferinskog receptora kao model, te uz pomoć tretmana s različitim inhibitorima ispitali u kojoj mjeri i koji endosomalni odjeljci su uključeni u taj proces, kako za Tf/TfR tako i za obje konformacije MHC-I molekula.

4.4.1. Recikliranje transferina i transferinskog receptora

Ne postoji univerzalni protokol kojime se može pratiti recikliranje molekula, budući da rezultat jako ovisi o karakteristikama endocitoznog puta molekula koje se ispituju, te su stoga česti kako lažno pozitivni, tako i lažno negativni rezultati. Stoga smo testirali i modificirali nekoliko najčešće korištenih u literaturi (140) nastojeći njihove nedostatke svesti na minimum. Sve korištene protokole testirali smo na Tf-u, TfR-u, te MHC-I molekulama. Detaljniji opis protokola recikliranja nalazi se u poglavlju *Materijal i metode.*

Recikliranje Tf-a pratili smo prema *protokolu A*. Ukratko, stanicama je dodan Tf obilježen fluorescentnom bojom te je dozvoljena njegova internalizacija kroz 60-90 minuta. Nakon toga stanice su kratkotrajno zakiseljene (pH 2, 1 minutu) kako bi se uklonio Tf s površine, te su stanice dalje inkubirane u različitim vremenskim intervalima. Potom je intenzitet fluorescencije praćen ili protočnom citometrijom ili konfokalnom mikroskopijom. Naime, dio Tf-a koji reciklira gubi se iz stanice, te je smanjenje intenziteta fluorescencije mjera recikliranja Tf-a. Postotak recikliranja Tf-a izražen je kao postotak Tf-a koji je reciklirao u odnosu na Tf prisutan u stanici u početnom vremenu recikliranja, odnosno dobiven je kao razlika 100% i kvocijenta MFI vrijednosti promatranog vremenskog intervala i MFI vrijednosti nakon internalizacije (pH 2) pomnoženog sa 100. Kao negativna kontrola korištene su stanice kojima je bio dodan neobilježeni Tf. Budući da ovim protokolom možemo izravno mjeriti recikliranje Tf-a korišten je kao kontrola drugih protokola (B i C) koje smo potom testirali na TfR. Naime, kinetika recikliranja Tf-a i TfR-a bi se trebala preklapati.

S obzirom da se TfR nakon recikliranja ne gubi iz stanice, recikliranje TfR-a nije moguće pratiti pomoću *protokola A*.

U *protokolu B*, TfR je bio površinski obilježen protutijelom nakon čega je puštena njegova internalizacija tijekom 60-90 minuta. Stanice su zatim kratkotrajno zakiseljene (pH 2, 1 minutu) kako bi se uklonilo površinsko protutijelo, te su stanice dalje inkubirane u različitim vremenskim intervalima u prisustvu fluorescentno obilježenog sekundarnog protutijela u mediju. Naime, očekivano je da će samo one molekule koje se vrate na staničnu površinu (recikliraju) moći vezati sekundarno protutijelo. Intenzitet fluorescencije u različitim vremenskim intervalima recikliranja praćen je ili protočnom citometrijom ili konfokalnom mikroskopijom. Postotak recikliranja TfR-a izražen je kao postotak TfR koji je reciklirao u odnosu na internalizirani TfR, odnosno dobiven je kao kvocijent MFI vrijednosti promatranog vremenskog intervala i razlike MFI vrijednosti u nultom vremenu internalizacije i MFI vrijednosti 90 minuta nakon internalizacije (pH 7) pomnoženog sa 100. Kao negativna kontrola korištene su stanice inkubirane u prisustvu samo sekundarnog protutijela (*Materijal i metode*).

U *protokolu C*, TfR je bio površinski obilježen protutijelom nakon čega je puštena njegova internalizacija tijekom 60-90 minuta. Stanice su zatim kratkotrajno zakiseljene (pH 2, 1 minutu) kako bi se uklonilo površinsko protutijelo, te su stanice dalje inkubirane u različitim vremenskim intervalima u mediju bez sekundarnog protutijela. U svim naznačenim vremenskim intervalima stanice su ponovno kratkotrajno zakiseljene kako bi se uklonile novopristigle molekule s površine stanice (molekule koje su u tom razdoblju reciklirale). Potom su stanice fiksirane i probušene i dodano im je sekundarno protutijelo kako bi se detektirale molekule koje su ostale u unutrašnjosti stanice (nisu reciklirale). Stanice su analizirane protočnom citometrijom. Postotak recikliranja TfR-a izražen je kao postotak TfR koji je reciklirao u odnosu na internalizirani TfR, odnosno dobiven je kao razlika 100% i kvocijenta MFI vrijednosti promatranog vremenskog intervala i MFI vrijednosti nakon 90 minuta internalizacije (pH 2) pomnoženog sa 100. Kao kontrolu koristili smo stanice kojima je nakon fiksacije i bušenja bilo dodano sekundarno protutijelo bez prethodnog dodavanja primarnog protutijela (*Materijal i metode*).

Slika 61. Dinamika i obrazac recikliranja transferina i transferinskog receptora prema različitim protokolima

Slika 61. Dinamika i obrazac recikliranja transferina i transferinskog receptora prema različitim protokolima.

Sa površine stanica HeLa internaliziran je Tf, te je u naznačenim vremenima prema protokolu recikliranja A (vidi tekst) praćeno njegovo recikliranje protočnom citometrijom ili konfokalnom mikroskopijom. Rezultat je prikazan kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=7) (a). Sa površine stanica HeLa internaliziran je TfR nakon površinskog obilježavanja mPt, te je protočnom citometrijom praćeno njegovo recikliranje u naznačenim vremenskim periodima prema protokolu recikliranja C. Rezultat je prikazan kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=4) (vidi tekst) (b). Sa površine stanica HeLa internaliziran je TfR nakon površinskog obilježavanja mPt, te je praćeno njegovo recikliranje protočnom citometrijom ili konfokalnom mikroskopijom u naznačenim vremenskim periodima prema protokolu recikliranja B (vidi tekst). Rezultat je prikazan kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=6) (c). TfR je površinski obilježen mPt. Jedan dio stanica kratkotrajno je zakiseljen kako bi se uklonilo površinski vezano mPt te su stanice analizirane konfokalnom mikroskopijom (d). Stanicama HeLa dodano je protumišji IgG-AF488 Pt te su stanice inkubirane na 37 °C kroz jedan sat i nakon toga analizirane konfokalnom mikroskopijom (e). Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Ukoliko usporedimo dinamiku recikliranja Tf-a prema *protokolu recikliranja A* (slika 61a) i TfR prema *protokolu recikliranja B* (slika 61c) uočavamo da su krivulje gotovo identične te da već nakon 10 minuta u prosjeku 60% (± 3%) internaliziranog Tf-a i TfR-a izreciklira, a nakon sat vremena ta brojka dostiže gotovo 100%. Taj rezultat potvrđen je i konfokalnom mikroskopijom iz koje je vidljivo da se Tf nakon 1 sat recikliranja ne može više detektirati unutar stanice iako mu je signal nakon internalizacije unutar stanice izuzetno jak (slika 61a). Jednako tako, TfR jedan sat nakon internalizacije i jedan sat nakon recikliranja pokazuju gotovo jednak intenzitet signala što upućuje na zaključak da nakon jednoga sata ukupni internalizirani TfR podliježe procesu recikliranja (slika 61c). Navedena opažanja, potvrđuju vjerodostojnost rezultata dobivenih *protokolom recikliranja B*. Kako bi isključili mogućnost nespecifičnog vezivanja 2° Pt, kao kontrola su nam poslužile stanice koje su inkubirane u prisustvu samo 2° pt (slika 61e). Druga kontrola, odnosno kontrola uklanjanja površinskih molekula nakon kratkotrajnog zakiseljavanja također je bila negativna (slika 61d) što pokazuje da smo kratkotrajnim zakiseljavanjem uspjeli ukloniti sva površinski vezana pt, te smo time isključili mogućnost lažnog prikazivanja internalizacije kao recikliranja.
Dinamika recikliranja TfR-a koja je bila praćena prema *protokolu recikliranja C* (slika 61b) pokazala je drugačiju kinetiku recikliranja TfR-a od one praćene prema *protokolu recikliranja B*, kao i različitu dinamiku od one dobivene *protokolom recikliranja A* za praćenje recikliranja Tf-a. Uzrok toj pojavi je činjenica što se TfR nakon recikliranja vrlo brzo ponovno internalizira, odnosno vrlo se kratkotrajno nalazi na površini.
Rezultati dobiveni na HeLa staničnoj liniji (slika 61) identični su onima dobivenim na J26 stanicama (nije prikazano).

4.4.2. Recikliranje konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda

Budući da su konformirane i nekonformirane MHC-I molekule membranski glikoproteini koji se, ukoliko recikliraju, ne gube iz stanice poput Tf-a, već u tom smislu odgovaraju TfR-u, protokol recikliranja A nije upotrebljiv za praćenje recikliranja MHC-I molekula. S obzirom da je *protokol recikliranja C*, kao što smo pokazali, primjenjiv samo za praćenje recikliranja molekula koje imaju retenciju na staničnoj površini, za recikliranje MHC-I molekula koristili smo *protokol recikliranja B* (vidi ranije).

Slika 62. Dinamika i obrazac recikliranja konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula

Slika 62. Dinamika i obrazac recikliranja konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula.
Konformirane i nekonformirane MHC-I molekule na HeLa staničnoj liniji površinski su obilježene mPt, te internalizirane tijekom 60 minuta nakon čega je recikliranje molekula praćeno prema protokolu recikliranja B (vidi tekst). Prikazan je reprezentativan rezultat od 7 različitih eksperimenata (a). Konformirane i nekonformirane MHC-I molekule na stanicama HeLa, J26-Cw6, J26-B7 i L-L^d nakon površinskog obilježavanja monoklonskim protutijelom internalizirane su tijekom 60 minuta, te je prema protokolu recikliranja B protočnom citometrijom (b) ili konfokalnom mikroskopijom (c) praćeno njihovo recikliranje nakon jednoga sata (c), odnosno 40 minuta (b). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=7) (b). Umetnute sličice predstavljaju signal recikliranih nekonformiranih MHC-I molekula nakon pH 2 tretmana, dok glavne slike predstavljaju recikliranje nekonformiranih MHC-I molekula nakon pH 7 (c). Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Sve ispitivane konformirane MHC-I molekule recikliraju, dok nekonformirane molekule nakon internalizacije ne podliježu procesu recikliranja tijekom 80 minuta praćenja (slike 62a-

c). Za razliku od Tf i TfR koji nakon internalizacije gotovo u potpunosti recikliraju (slike 61a i 61c), učinkovitost recikliranja konformiranih MHC-I molekula (HLA-Cw6, klasične konformirane HLA-I molekule na HeLa staničnoj liniji i H-L^d) je u prosjeku 30% (± 4%), odnosno 38% (± 5%) za konformirane HLA-B7 molekule. Iz ovog rezultata se može zaključiti da samo dio konformiranih MHC-I molekula nakon internalizacije podliježe procesu recikliranja (slika 62b). Ukoliko promatramo dinamiku recikliranja konformiranih MHC-I molekula na HeLa staničnoj liniji (slika 62a), uočava se da broj recikliranih molekula s vremenom raste, nakon jednoga sata postiže se maksimum, te zatim krivulja lagano počinje padati. Vjerojatno je da i prije isteka prvoga sata počinje proces degradacije recikliranih molekula, odnosno da se dio izrecikliranih molekula nakon ponovne internalizacije usmjerava u degradaciju. Naime, sama činjenica da se samo dio konformiranih MHC-I molekula usmjerava u recikliranje ukazuje na moguće usmjeravanje dijela tih molekula u degradaciju nakon internalizacije. Naravno, budući da TfR ne podliježe procesu degradacije, krivulja recikliranja TfR dobivena ovim protokolom (slika 61c) ne pokazuje pad niti u jednom ispitivanom vremenskom intervalu. Bitno je napomenuti da svi aleli MHC-I molekula (G1, B7, Cw6 i L^d) pokazuju sličan obrazac krivulje recikliranja (nije prikazano). Važno je uočiti da, ukoliko nakon recikliranja površinske molekule nisu uklonjene kratkotrajnim zakiseljavanjem, reciklirane molekule detektiramo uglavnom na površini stanice (slika 62c), no ukoliko su površinske molekule nakon recikliranja uklonjene tada reciklirane molekule detektiramo u tubulovezikularnim formacijama smještenim juksta i perinuklearno (slika 62c) što odgovara obrascu internaliziranih molekula (slika 48).

Zapažanje da je jukstanuklearni obrazac recikliranih konformiranih MHC-I molekula vrlo slabo vidljiv konfokalnom mikroskopijom ukoliko kratkotrajnim zakiseljavanjem ne uklonimo površinske molekule, odnosno da se bez uklanjanja površinskih molekula reciklirane konformirane MHC-I molekule detektiraju dominantno na površini stanice (slika 62c) upućuje na površinsku retenciju istih. Kao što smo ranije naveli, *protokol recikliranja C* može se koristiti za praćenje upravo takvih molekula. Stoga smo pratili kinetiku recikliranja konformiranih MHC-I molekula i prema protokolu C te je usporedili s rezultatima dobivenim protokolom B.

Slika 63. Dinamika recikliranja konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula (usporedba protokola recikliranja B i protokola recikliranja C)

Slika 63. Dinamika recikliranja konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula (usporedba protokola recikliranja B i protokola recikliranja C).
Konformirane (a) ili nekonformirane (b) MHC-I molekule na HeLa staničnoj liniji površinski su obilježene mPt te internalizirane tijekom 90 minuta nakon čega je recikliranje molekula praćeno prema protokolu recikliranja B (crne linije) ili protokolu recikliranja C (crvene linije). Za pojašnjenje protokola vidi tekst. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=4).

Dinamika recikliranja konformiranih MHC-I molekula dobivena *protokolom recikliranja C* razlikuje se od dinamike dobivene *protokolom B* (slika 63a), iako ne toliko drastično kao što je slučaj ukoliko pratimo recikliranje TfR-a (slika 61b). Prvih 10 minuta krivulje recikliranja konformiranih MHC-I dobivene putem ova dva protokola se preklapaju, da bi u kasnijim vremenima u istim vremenskim intervalima postotak recikliranih konformiranih MHC-I molekula dobiven *protokolom C* kontinuirano rastao u odnosu na postotak dobiven *protokolom B* (slika 63a). Naročito je ta razlika uočljiva na kinetici dužoj od jednoga sata kada krivulja dobivena *protokolom B* lagano počinje padati dok krivulja dobivena *protokolom C* i dalje, čak i strmije, raste. Tome bi mogao biti razlog što se u osnovnom *protokolu C* degradirane molekule lažno prikazuju kao reciklirane. U prilog tome ide i rezultat dobiven praćenjem recikliranja nekonformiranih MHC-I molekula po istom protokolu. Naime, prateći dinamiku recikliranja nekonformiranih MHC-I molekula *protokolom C* (slika 63b) dobivamo da nekonformirane MHC-I molekule recikliraju, i to u prosjeku do 40% (± 5%) od ukupno internaliziranih molekula unutar jednoga sata, što se razlikuje od rezultata dobivenim *protokolom recikliranja B*, a koji pokazuje da nekonformirane MHC-I molekule uopće ne recikliraju.

Kako bi provjerili tu pretpostavku, *protokol C* smo modificirali, te smo tijekom praćenja recikliranja internaliziranih MHC-I molekula paralelno pratili i ukupan izražaj molekula

(stanice koje nisu tretirane s kiselim pH u navedenim vremenima). Time smo dobili i vrijednost degradacije internaliziranih molekula, te anulirali lažno reciklirane molekule.

Slika 64. Dinamika recikliranja konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula (usporedba osnovnog i modificiranog protokola recikliranja C)

Slika 64. Dinamika recikliranja konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula (usporedba osnovnog i modificiranog protokola recikliranja C).

Konformirane (a) ili nekonformirane (b) MHC-I molekule na HeLa staničnoj liniji površinski su obilježene mPt te internalizirane tijekom 90 minuta nakon čega su stanice kratkotrajno zakiseljene kako bi se uklonile neinternalizirane (površinske) molekule, te je dalje izražaj internaliziranih molekula praćen u naznačenim vremenskim intervalima. Jedan dio stanica prije svake analize je bio ponovno kratkotrajno zakiseljen (pH 2) kako bi se uklonile reciklirane molekule, a drugi dio stanica je ostao netretiran (pH 7) kako bi se pratila degradacija, odnosno promjena izražaja ukupnih internaliziranih molekula. Sve stanice su prije analize bile fiksirane i probušene te im je dodano sekundarno Pt. Stanice su analizirane protočnom citometrijom. Postotak recikliranih + degradiranih molekula dobiven je kao razlika 100% i kvocijenta MFI vrijednosti stanica koje su nakon recikliranja bile tretirane s pH 2 i MFI vrijednosti internaliziranih molekula (90 minuta internalizacije=0 minuta recikliranja; pH 2) pomnoženog sa 100. Postotak degradiranih molekula dobiven je kao razlika 100% i kvocijenta MFI vrijednosti stanica koje nakon recikliranja nisu bile tretirane s kiselim pH i MFI vrijednosti internaliziranih molekula (90 minuta internalizacije; pH 2) pomnoženog sa 100. Postotak recikliranih molekula dobiven je kao razlika tih dvaju postotaka. Prikazan je reprezentativan rezultat od četiri različita eksperimenta.

Iz slike 64b jasno je da recikliranje nekonformiranih MHC-I molekula dobiveno *protokolom recikliranja C* zapravo predstavlja njihovu degradaciju. Naime, postotak pada izražaja ukupno internaliziranih molekula jednak je i u stanicama koje su bile kratkotrajno zakiseljene (uklanjanje recikliranih molekula) i u netretiranim stanica (ukupni izražaj) (slika 64b). Veliki postotak degradacije (oko 15%) nekonformiranih MHC-I molekula već nakon 10 minuta upućuje na to da se veliki dio internaliziranih nekonformiranih MHC-I molekula nalazi u kasnim endosomalnim odjeljcima nakon internalizacije.

Promjena izražaja konformiranih MHC-I molekula između kratkotrajno zakiseljenih i netretiranih stanica nije bila jednaka. Naime dok je ukupni izražaj (nezakiseljene stanice) nakon jednoga sata pao za svega 9%, izražaj nakon uklanjanja recikliranih (površinskih) molekula nakon jednoga sata pao je za 40%. Upravo ta razlika (31%) upućuje na dio molekula koje su se nakon internalizacije vratile na staničnu površinu, odnosno reciklirale, dok 9% predstavlja degradaciju internaliziranih molekula. Nakon jednoga sata degradacija konformiranih MHC-I molekula postaje značajnija (nakon 90 minuta iznosi oko 23%), a u jednakoj mjeri raste i zbroj degradiranih i recikliranih molekula što ukazuje na to da nakon jednoga sata recikliranje doseže svoj maksimum te da nema značajnijeg daljnjeg porasta udjela recikliranih molekula. Ovi rezultati upućuju na činjenicu da se konformirane MHC-I molekule nakon internalizacije u unutrašnjosti pretežito nalaze u reciklirajućim endosomalnim odjeljcima, ali njihovo retencijsko mjesto je površina.

No, vodeći se svime navedenim, u daljnjem proučavanju recikliranja MHC-I molekula koristili smo isključivo protokol recikliranja B jer je jednostavniji od protokola recikliranja C, a velika mu je prednost, naročito ukoliko proučavamo učinak kemijskih inhibitora na recikliranje, što analiziramo nefiksirane stanice te samim time imamo uvida i u vijabilnost stanica, odnosno možemo isključiti mrtve stanice koje bi nam mogle dati lažne rezultate (protočna citometrija). Naravno, ukoliko se radi o metodi konfokalne mikroskopije, neovisno o protokolu, uvijek analiziramo fiksirane stanice kojima ne možemo utvrditi vijabilnost.

4.4.2.1. Unutarstanično putovanje recikliranih MHC molekula I razreda

Kako bi utvrdili kojim unutarstaničnim odjeljcima prolaze reciklirane MHC-I molekule kolokalizirali smo ih s markerima endosomalnih odjeljaka za koje je poznato da mogu imati ulogu u recikliranju molekula (EEA-1^+ i $Rab11^+$ odjeljci).

Slika 65. Kolokalizacija konformiranih MHC-I molekula tijekom recikliranja s biljezima ranih (EEA-1) i reciklirajućih (Rab11) endosoma

Slika 65. Kolokalizacija konformiranih MHC-I molekula tijekom recikliranja s biljezima ranih (EEA-1) i reciklirajućih (Rab11) endosoma.

Konformirane MHC-I molekule na J26-Cw6 staničnoj liniji površinski su obilježene mPt te internalizirane tijekom 90 minuta, nakon čega su preostale površinske molekule uklonjene kratkotrajnim zakiseljavanjem te su zatim stanice inkubirane u prisustvu sekundarnog protutijela. Nakon isteka indiciranih vremenskih intervala stanice su ponovno kratkotrajno zakiseljene (kako bi se jasnije vidio unutarstanični obrazac recikliranih molekula), fiksirane i probušene, te je dodano ili protu-EEA-1 (a) ili protu-Rab11 (b) protutijelo. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Nakon 30 minuta recikliranja, vrlo malo konformiranih MHC-I molekula se nalazi unutar stanice, i te molekule se vrlo slabo kolokaliziraju s Rab11 i EEA-1. Nakon isteka 60 minuta veliki dio recikliranih unutarstaničnih konformiranih MHC-I se nalazi u EEA-1^{+} odjeljcima, no još uvijek ih nema u Rab11^{+} odjeljcima. Nakon 90 minuta recikliranja kolokalizacija unutarstaničnih recikliranih konformiranih MHC-I molekula s EEA-1 slabi, dok se iste

počinju pojavljivati u $Rab11^+$ odjeljcima (slike 65a i 65b). Iz toga možemo zaključiti da reciklirane konformirane MHC-I molekule tijekom procesa recikliranja prolaze kroz rane i reciklirajuće endosomalne odjeljke.

Kako bi utvrdili da li konformirane MHC-I molekule tijekom recikliranja prolaze istim putem kao i TfR, kolokalizirali smo ih međusobno i utvrdili da se njihov put djelomično preklapa (slika 66). Nakon 30 minuta recikliranja TfR već je došao u jukstanuklearni dio dok su reciklirane MHC-I molekule slabo vidljive unutar stanice što upućuje na različito mjesto njihove retencije (konformirane MHC-I na površini stanice, a TfR u unutrašnjosti stanice). No nakon 60 i 90 minuta recikliranja, postoji konstantna djelomična kolokalizacija TfR i konformiranih MHC-I molekula, te se u tim kasnijim vremenima konformirane MHC-I molekule smještaju sve više jukstanuklearno.

Slika 66. Kolokalizacija konformiranih MHC-I molekula i TfR tijekom njihova recikliranja

Slika 66. Kolokalizacija konformiranih MHC-I molekula i TfR tijekom njihova recikliranja.
Konformirane MHC-I molekule i TfR na J26-Cw6 staničnoj liniji površinski su obilježeni mPt te internalizirani tijekom 90 minuta, nakon čega su preostale površinske molekule uklonjene kratkotrajnim zakiseljavanjem te su zatim stanice inkubirane u prisustvu sekundarnog protutijela (protu-štakorski Ig-AF488 i protu-mišji IgG2a-AF555). Nakon isteka indiciranih vremenskih intervala stanice su ponovno kratkotrajno zakiseljene (kako bi se jasnije vidio unutarstanični obrazac recikliranih molekula), fiksirane i probušene, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

4.4.3. Učinak kemijskih inhibitora koji narušavaju endosomalni transport na recikliranje konformiranih MHC molekula I razreda i transferina

Kako bi ispitali koji su endosomalni odjeljci uključeni u proces recikliranja Tf-a i konformiranih MHC-I molekula, nakon internalizacije u čistom mediju, recikliranje navedenih molekula pratili smo u prisustvu kemijskih inhibitora. Od kemijskih inhibitora korišteni su: LY (100 μM) kao blokator PI3K koja je potrebna za recikliranje molekula na nivou ranih endosoma, BFA (10 μg/ml) koji putem blokade GEF-ova blokira recikliranje na nivou JNRC-a, te AlF_4^- (30 mM NaF + 50 μM $AlCl_3$) koji putem blokade funkcionalnosti Arf1 i Arf6 GTPaza blokira recikliranje na više razina. Recikliranje Tf-a pratili smo prema *protokolu recikliranja A*, odnosno kao gubitak Tf-a iz stanice a koji je bio prisutan u stanici u nultom vremenu recikliranja (90 minuta internalizacije). Rezultati su prikazani na način da su *normalizirani prema kontroli* koju je predstavljala internalizacija u čistom mediju i recikliranje bez prisustva inhibitora, te je ta MFI vrijednost recikliranih molekula računata kao 100%. Postotak recikliranja Tf-a za svaki ispitivani uvjet (inhibitor) dobiven je kao omjer recikliranog Tf-a uz naznačeni inhibitor i recikliranog Tf-a u čistom mediju pomnožen sa 100 (*Materijal i metode*).

Recikliranje konformiranih MHC-I molekula pratili prema *protokolu recikliranja B*, odnosno kao internalizirane molekule koje se ponovno vraćaju na staničnu površinu te stoga mogu vezati fluorescentno obilježeno sekundarno protutijelo prisutno u mediju. Rezultati su ponovno prikazani na način da su *normalizirani prema kontroli* koju je predstavljala internalizacija u čistom mediju i recikliranje bez prisustva inhibitora, te je ta MFI vrijednost recikliranih molekula računata kao 100%. Postotak recikliranja MHC-I molekula za svaki ispitivani uvjet dobiven kao omjer recikliranih MHC-I molekula uz naznačeni inhibitor i recikliranih MHC-I molekula u čistom mediju pomnožen sa 100 (*Materijal i metode*).

Nakon 20 minuta recikliranja oko 78% Tf-a prisutnog u stanici u nultom vremenu praćenja recikliranja je recikliralo, dok je nakon 40 minuta izrecikliralo oko 30% internaliziranih konformiranih MHC-I molekula (nije prikazano).

LY nije blokirao recikliranje Tf-a, a recikliranje konformiranih MHC-I molekula je blokirao za oko 20%. BFA je recikliranje Tf-a blokirao za oko 30%, a sličan učinak imao je i na recikliranje konformiranih MHC-I molekula (slika 67a). AlF_4^- blokirao je recikliranje Tf-a za oko 60%, dok je na recikliranje konformiranih MHC-I molekula imao manji učinak i njihovo recikliranje blokirao za oko 40% (slika 67a). Recikliranje obiju molekula u prisustvu LY, BFA i AlF_4^- praćeno je i konfokalnom mikroskopijom (slika 67b). Možemo zamijetiti da se

nakon 60 minuta recikliranja gotovo sav Tf izgubi iz stanice (izreciklira) u netretiranim stanicama, dok pod utjecajem LY, BFA i AlF_4^- dio Tf-a ostaje u stanici, s napomenom da je blok bio najizraženiji tijekom recikliranja uz AlF_4^-. Konformirane MHC-I molekule reciklirale su kako u netretiranim stanicama, tako i u stanicama tretiranim s inhibitorima, iako slabije, no važno je napomenuti da je signal recikliranih molekula bio najslabiji ukoliko je stanica bila tretirana s AlF_4^-.

Slika 67.

Slika 67. Učinak inhibitora (LY, BFA i AlF_4^-) na recikliranje Tf-a i konformiranih MHC-I molekula.
Nakon površinskog obilježavanja Tf i konformirane MHC-I molekule na HeLa staničnoj liniji internalizirani su tijekom 90 minuta u mediju bez inhibitora. Stanice su zatim kratkotrajno zakiseljene kako bi se uklonile površinske molekule (a i b). Potom je recikliranje molekula praćeno tijekom 20 minuta prema protokolu recikliranja A (Tf) ili tijekom 40 minuta prema protokolu recikliranja B (MHC-I) u čistom mediju ili u prisustvu inhibitora (LY ili BFA ili AlF_4^-). Postotci recikliranih molekula izraženi su na način opisan u tekstu. Prikazani rezultat je reprezentativan rezultat od 2-6 ponovljenih eksperimenata (a). Recikliranje molekula je praćeno tijekom 60 minuta prema protokolu recikliranja A (Tf) ili prema protokolu recikliranja B (MHC-I) u čistom mediju ili u prisustvu inhibitora (LY ili BFA ili AlF_4^-). Stanice su potom fiksirane i analizirane konfokalnom mikroskopijom (b). Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Ravnajući se prema staničnom obrascu ispitivanih molekula koji je dobiven konfokalnom mikroskopijom možemo potvrditi da korišteni inhibitori koče recikliranje i Tf i MHC-I iz odgovarajućih odjeljaka (LY- rani endosomi; BFA- JNRC; AlF_4^- - JNRC i subplazmalemalne vezikule) (slika 67b). Prema dobivenim postotcima inhibicije recikliranja korištenim inhibitorima možemo okvirno pretpostaviti unutarstaničnu zastupljenost internaliziranih ispitivanih molekula.

4.4.3.1. Utjecaj LY, BFA i AlF_4^- na recikliranje konformiranih MHC molekula I razreda i transferina nakon internalizacije u prisustvu LY

Kako bi ispitali da li LY, BFA i AlF_4^- imaju učinak na recikliranje molekula iz ranih endosoma, internalizirali smo 90 minuta Tf i konformirane MHC-I molekule u prisustvu LY, nakon čega je recikliranje praćeno i prikazano na jednak način kao i na slici 67 s razlikom da je kontrolu prema kojoj su normalizirani rezultati predstavljala internalizacija u prisustvu LY i recikliranje bez prisustva inhibitora, te je ta MFI vrijednost recikliranih molekula računata kao 100%, odnosno uzeta kao kontrola prema kojoj su normalizirani rezultati.

Unatoč tome što je LY ubrzao internalizaciju konformiranih MHC-I molekula za oko 30%, postotak recikliranih molekula nakon što se LY uklonio iz medija u odnosu na internalizirane nije se promijenio, odnosno nakon internalizacije u prisustvu LY te recikliranja u čistom mediju oko 30% internaliziranih konformiranih MHC-I molekula nakon 40 minuta je recikliralo (nije prikazano), jednako kao i nakon internalizacije i recikliranja u mediju bez inhibitora. Isto tako, tijekom internalizacije u prisustvu LY, MFI vrijednost Tf-a unutar stanice bila je veća za oko 20%, no i dalje je nakon 20 minuta oko 75% Tf-a izrecikliralo (nije prikazano). Ukoliko se internalizacija odvijala u prisustvu LY, BFA je imao nešto manji učinak na recikliranje obiju molekula nego u slučaju kada se internalizacija odvijala u čistom mediju, tj. blokirao je recikliranje obiju molekula za oko 20% (slika 68a). No ukoliko se internalizacija odvijala u prisutnosti LY, tada je LY imao puno jači učinak na recikliranje i Tf-a i konformiranih MHC-I molekula, te je recikliranje Tf-a blokirao za oko 90%, a recikliranje konformiranih MHC-I molekula za oko 70% u odnosu na kontrolu (slika 68a). Za razliku od njega, AlF_4^- je imao puno slabiji učinak na recikliranje i Tf-a i konformiranih MHC-I molekula ukoliko se internalizacija odvijala u prisustvu LY, odnosno blokirao je recikliranje Tf-a za oko 35%, a recikliranje konformiranih MHC-I za 25%, što je puno manji učinak nego kada se internalizacija odvijala u čistom mediju. Ovi rezultati potvrđeni su i konfokalnom mikroskopijom (slika 68b). Ukoliko se internalizacija odvijala u prisustvu LY,

niti Tf niti konformirane MHC-I molekule 90 minuta po internalizaciji nisu detektirane u jukstanuklearnom području (slika 68b).

Slika 68. Učinak inhibitora (LY, BFA i AlF_4^-) na recikliranje Tf-a i konformiranih MHC-I molekula iz ranih endosoma (internalizacija u prisustvu LY) na HeLa staničnoj liniji

Slika 68. Učinak inhibitora (LY, BFA i AlF_4^-) na recikliranje Tf-a i konformiranih MHC-I molekula iz ranih endosoma (internalizacija u prisustvu LY) na HeLa staničnoj liniji.

Nakon površinskog obilježavanja Tf i konformirane MHC-I molekule na HeLa staničnoj liniji internalizirani su tijekom 90 minuta u prisutnosti LY (100 μM). Stanice su zatim kratkotrajno zakiseljene kako bi se uklonile površinske molekule (a i b). Potom je recikliranje molekula praćeno tijekom 20 minuta prema protokolu recikliranja A (Tf) ili tijekom 40 minuta prema protokolu recikliranja B (MHC-I) u čistom mediju ili u prisustvu inhibitora (LY ili BFA ili AlF_4^-). Postotci recikliranih molekula izraženi su na način opisan u tekstu. Prikazani rezultat je reprezentativan od 2-5 ponovljenih eksperimenata (a). Recikliranje molekula je praćeno tijekom 60 minuta prema protokolu recikliranja A (Tf) ili prema protokolu recikliranja B (MHC-I) u čistom mediju ili u prisustvu inhibitora (LY ili BFA ili AlF_4^-). Stanice su potom fiksirane i analizirane konfokalnom mikroskopijom (b). Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

4.4.3.2. Utjecaj LY, BFA i AlF_4^- na recikliranje konformiranih MHC molekula I razreda i transferina nakon internalizacije u prisustvu BFA

Kako bi ispitali da li koji od navedenih inhibitora utječe na recikliranje molekula iz endosomalnog odjeljka u kojemu se nakupe internalizirane molekule pod utjecajem BFA, ponovili smo isti protokol kao i kod slika 67 i 68, samo što se internalizacija obiju molekula odvijala u prisustvu BFA. Kao kontrola (100% izražaja) prema kojoj su normalizirani prikazani rezultati uzete su MFI vrijednosti recikliranih molekula u čistom mediju nakon internalizacije u prisustvu BFA. BFA je neznatno (oko 5%) ubrzao internalizaciju konformiranih MHC-I molekula, te nije utjecao na postotak recikliranih molekula u odnosu na internalizirane molekule, odnosno nakon internalizacije u prisustvu BFA te recikliranja u čistom mediju, recikliralo je oko 30% internaliziranih molekula (nije prikazano). Isto tako, Tf-a je unutar stanice bile nešto više nakon internalizacije u prisustvu BFA u odnosu na internalizaciju u čistom mediju, no postotak recikliranog Tf-a nije se znatnije promijenio (nije prikazano).

Ukoliko se internalizacija odvijala u prisustvu BFA, LY nije blokirao recikliranje MHC-I molekula, niti recikliranje Tf-a što upućuje na zaključak da PI3K nema važnu ulogu u recikliranju molekula niti iz BFA senzitivnog odjeljka niti nishodno od njega (slika 69a i 69b). Ukoliko se internalizacija odvijala u prisutnosti BFA, tada BFA blokira recikliranje Tf-a i recikliranje konformiranih MHC-I za oko 15%, što je manji učinak nego ukoliko se internalizacija odvijala u čistom mediju (slika 69a) iz čega se može pretpostaviti da BFA uzrokuje stvaranje surogatnog endosomalnog odjeljka iz kojeg molekule mogu reciklirati, iako najvjerojatnije usporeno, usprkos daljnjoj prisutnosti BFA u mediju. Sličan rezultat dobiven je i konfokalnom mikroskopijom (slika 69b). AlF_4^- je blokirao reciliranje Tf-a nakon internalizacije u prisustvu BFA za oko 72%, a konformiranih MHC-I molekula za oko 52% u odnosu na kontrolu (slika 69a), što je jači učinak u odnosu na situaciju kada se internalizacija odvijala u čistom mediju (slika 68a), što može upućivati na mogućnost da AlF_4^- narušava recikliranje molekula iz odjeljka u kojemu se nakupljaju molekule internalizirane u prisustvu BFA i/ili nishodno od njega. Ukoliko istu situaciju promatramo konfokalnom mikroskopijom (slika 69b) možemo uočiti da je signal recikliranih konformiranih MHC-I molekula vrlo slab, te da internalizirani Tf gotovo u potpunosti ostaje zarobljen u stanici, odnosno ne može reciklirati.

Slika 69. Učinak inhibitora (LY, BFA i AlF_4^-) na recikliranje Tf-a i konformiranih MHC-I molekula nakon internalizacije u prisustvu BFA na HeLa staničnoj liniji

Slika 69. Učinak inhibitora (LY, BFA i AlF_4^-) na recikliranje Tf-a i konformiranih MHC-I molekula nakon internalizacije u prisustvu BFA na HeLa staničnoj liniji.

Nakon površinskog obilježavanja Tf i konformirane MHC-I molekule na HeLa staničnoj liniji internalizirani su tijekom 90 minuta u prisutnosti BFA (10 μg/ml). Stanice su zatim kratkotrajno zakiseljene kako bi se uklonile površinske molekule (a i b). Potom je recikliranje molekula praćeno tijekom 20 minuta prema protokolu recikliranja A (Tf) ili tijekom 40 minuta prema protokolu recikliranja B (MHC-I) u čistom mediju ili u prisustvu inhibitora (LY ili BFA ili AlF_4^-). Postotci recikliranih molekula izraženi su na način opisan u tekstu. Prikazan je reprezentativni rezultat od 3-5 ponovljenih pokusa (a). Recikliranje molekula je praćeno tijekom 60 minuta prema protokolu recikliranja A (Tf) ili prema protokolu recikliranja B (MHC-I) u čistom mediju ili u prisustvu inhibitora (LY ili BFA ili AlF_4^-). Stanice su potom fiksirane i analizirane konfokalnom mikroskopijom (b). Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

4.4.3.3. Utjecaj LY, BFA i AlF_4^- na recikliranje konformiranih MHC molekula I razreda i transferina nakon internalizacije u prisustvu AlF_4^-

Budući da odjeljak u kojemu se nakupe Tf i konformirane MHC-I molekule nakon internalizacije u prisustvu BFA, jukstanuklearnim smještajem i kolokalizacijom s Rab11 molekulom, podsjeća na odjeljak u kojemu se nakupe nakon internalizacije u prisustvu AlF_4^- (slike 57-59), željeli smo ispitati da li se uistinu radi o istim odjeljcima. Stoga smo usporedili

kako BFA, LY i AlF_4^- utječu na recikliranje Tf-a i konformiranih MHC-I iz ta dva odjeljka, ponavljajući isti protokol kao i kod slika 67-69 s razlikom što se internalizacija obiju molekula odvijala u prisustvu AlF_4^-. Kao kontrola (100% izražaja) prema kojoj su normalizirani prikazani rezultati uzete su MFI vrijednosti recikliranih molekula u čistom mediju nakon internalizacije u prisustvu AlF_4^-.

Slika 70. Učinak inhibitora (LY, BFA i AlF_4^-) na recikliranje Tf-a i konformiranih MHC-I molekula nakon internalizacije u prisustvu AlF_4^- na HeLa staničnoj liniji

Slika 70. Učinak inhibitora (LY, BFA i AlF_4^-) na recikliranje Tf-a i konformiranih MHC-I molekula nakon internalizacije u prisustvu AlF_4^- na HeLa staničnoj liniji.

Nakon površinskog obilježavanja Tf i konformirane MHC-I molekule na HeLa staničnoj liniji internalizirani su tijekom 90 minuta u prisutnosti AlF_4^- (30 mM NaF + 50 μM $AlCl_3$). Stanice su zatim kratkotrajno zakiseljene kako bi se uklonile površinske molekule (a i b). Potom je recikliranje molekula praćeno tijekom 20 minuta prema protokolu recikliranja A (Tf) ili tijekom 40 minuta prema protokolu recikliranja B (MHC-I) u čistom mediju ili u prisustvu inhibitora (LY ili BFA ili AlF_4^-). Postotci recikliranih molekula izraženi su na način opisan u tekstu. Prikazani rezulta je reprezentativan od 3-5 ponovljenih pokusa (a). Recikliranje molekula je praćeno tijekom 60 minuta prema protokolu recikliranja A (Tf) ili prema protokolu recikliranja B (MHC-I) u čistom mediju ili u prisustvu inhibitora (LY ili BFA ili AlF_4^-). Stanice su potom fiksirane i analizirane konfokalnom mikroskopijom (b). Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

AlF_4^- znatno je ubrzao internalizaciju konformiranih MHC-I molekula, te smanjio postotak recikliranih molekula u odnosu na internalizirane, odnosno nakon internalizacije u prisustvu AlF_4^-, te recikliranja u čistom mediju recikliralo je svega oko 14% internaliziranih molekula (nije prikazano). Devedeset minuta po internalizaciji, AlF_4^- nije utjecao na internalizaciju Tf-a (nije prikazano).

Ukoliko se internalizacija Tf-a i konformiranih MHC-I odvijala u prisustvu AlF_4^- tada je recikliranje Tf-a bilo blokirano za oko 90%, a MHC-I molekula za 82% u prisustvu AlF_4^- (slika 70a), što je znatno veći učinak AlF_4^- na recikliranje navedenih molekula nego u slučaju kada se internalizacija odvijala u čistom mediju (slika 67). Taj rezultat upućuje na zaključak da AlF_4^- izrazito usporava recikliranje Tf-a i MHC-I molekula iz odjeljka u kojemu dolazi do njihova nakupljanja (jukstanuklearni nabijeni odjeljak i subplazmalemalno područje) tijekom internalizacije u prisustvu AlF_4^-. Nakon internalizacije u prisustvu AlF_4^-, LY je blokirao recikliranje Tf-a za oko 30%, konformiranih MHC-I molekula za oko 32%. BFA je za oko 17% blokirao recikliranje Tf-a, odnosno za 16% konformiranih MHC-I molekula (slika 70a). Ovi rezultati u skladu su s rezultatima dobivenim konfokalnom mikroskopijom (slika 70b) iz koje je vidljivo da se Tf i konformirane MHC-I molekule nakon 90 minuta internalizacije u prisustvu AlF_4^- nalaze nabijene u jukstanuklearnom području, te da obje molekule gotovo uopće nisu reciklirale u prisustvu AlF_4^- (internalizacija AlF_4^-), dok je recikliranje pod utjecajem LY i BFA bilo smanjeno (internalizacija AlF_4^-), ali se ipak odvijalo. Najvjerojatnije je da se nakon uklanjanja AlF_4^-, recikliranje iz jukstanuklearnog nabijenog odjeljka, uz prisustvo bilo BFA ili LY, recikliranje ispitivanih molekula može odvijati. Međutim u tom slučaju, iz AlF_4^- subplazmalemalno zakočenih vezikula, molekule mogu progredirati do ranih endosoma odakle su im recikliranje i daljnja progresija blokirani u prisustvu LY. Nasuprot tome, BFA dozvoljava posljedično recikliranje iz ranih endosoma, ali dio koji progredira biva djelomično zaustavljen u BFA surogatnom odjeljku iz kojeg može usporeno reciklirati, ali ne može dalje progredirati.

4.4.4. Recikliranje B podjedinice toksina kolere

B podjedinica toksina kolere (CtxB) je molekula za koju je poznato da ne podliježe procesu recikliranja (200) što smo ispitali koristeći *protokol recikliranja B.*

Kao što je vidljivo iz slike 71, CtxB ne reciklira. Ovaj rezultat nam je ujedno potvrda ispravnosti korištenja protokola recikliranja B, te se time isključuju mogući lažno pozitivni rezultati.

Slika 71. Recikliranje B podjedinice kolera toksina

Slika 71. Recikliranje B podjedinice kolera toksina.

CtxB je vezana i zatim internalizirana jedan sat sa površine Balb 3T3 stanica. Stanice su zatim kratkotrajno zakiseljene te inkubirane u prisustvu SA-AF488 tijekom jednog sata kako bi se pratilo recikliranje CtxB. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

4.5. DEGRADACIJA MHC MOLEKULA I RAZREDA

Iz prijašnjih rezultata (slike 62-64) može se vidjeti da samo oko 30% internaliziranih konformiranih MHC-I molekula reciklira, dok nekonformirane MHC-I molekule nakon internalizacije ne podliježu procesu recikliranja. Vodeći se činjenicom da je konačna sudbina molekula nakon internalizacije ili recikliranje ili degradacija, željeli smo ispitati da li konformirane i nekonformirane MHC-I molekule podliježu degradaciji.

4.5.1. Kinetika degradacije konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula

Kako bi ispitali da li, i kojom brzinom konformirane i nekonformirane MHC-I molekule podliježu degradaciji, površinski smo ih obilježili biotinom, inkubirali na 37 °C u različitim vremenskim intervalima, te nakon imunoprecipitacije pratili njihovo nestajanje, odnosno degradaciju.

I konformirane i nekonformirane MHC-I molekule, neovisno o ispitivanom alelu, podliježu procesu degradacije, s razlikom da je kinetika degradacije nekonformiranih MHC -I molekula brža od kinetike degradacije konformiranih MHC-I molekula. Kinetika degradacije konformiranih MHC-I molekula nije jednaka za sve alele. Konformirane HLA-B7 i HLA-G1 molekule imaju sporiju kinetiku degradacije od konformiranih HLA-Cw6 i konformiranih klasičnih MHC-I molekula na HeLa staničnoj liniji. Suprotno situaciji kod konformiranih molekula, nekonformirane HLA-B7 molekule pokazuju najbržu kinetiku degradacije od svih ispitivanih alela nekonformiranih MHC-I molekula (slika 72).

Na ovaj rezultat bi mogla utjecati činjenica da će se oni aleli konformiranih MHC-I molekula koji pokazuju najveću nestabilnost u kiselom pH (slike 31-34), biti skloniji degradaciji, koja se odvija u kiselim endosomalnim odjeljcima. Nasuprot tome, nekonformirne MHC-I molekule pokazuju suprotan trend, moguće zbog toga što oni aleli koji ne pokazuju sklonost izražavanju u nekonformiranom obliku (na staničnoj površini) pokazuju veću sklonost degradaciji.

Slika 72. Kinetika degradacije konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula

Slika 72. Kinetika degradacije konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula.
Stanice J26-Cw6, J26-B7, J26-G1 i HeLa su površinski biotinilirane, te potom inkubirane u svježem mediju. Nakon naznačenih vremenskih intervala jednak broj stanica je razoren u 1% NP40 puferu, te su iz njega imunoprecipitirane konformirane i nekonformirane MHC-I molekule. Nakon imunoprecipitacije (IP), svi uzorci su razdvojeni na SDS-PAGE elektroforezi i blotirani, a molekule vizualizirane pomoći SA-POD i kemiluminiscencije.

4.5.1.1. Učinak lizosomotropnih tvari na degradaciju MHC molekula I razreda

Degradacija molekula nakon internalizacije odvija se u lizosomima uslijed djelovanja lizosomalnih hidrolaza za čiju normalnu funkciju je neophodan kiseli pH (~4.5 - 5.0). Kako bi ustanovili da li se degradacija, odnosno nestajanje molekula iz stanice doista odvija u lizosomima, stanice smo tretirali s KonA (50 nM) koji inhibira H-ATPazu te time dovodi do neutralizacije kiselih endosomalnih odjeljaka ili s leupeptinom (Leu; 2 μg/ml) koji inhibira

većinu lizosomalnih enzima koji su potrebni za degradaciju. Nakon površinske biotinilacije pratili smo kinetiku degradacije nekonformiranih MHC-I molekula. Djelovanje KonA na gubitak (degradaciju) internaliziranih nekonformiranih MHC-I molekula pratili smo i konfokalnom mikroskopijom.

KonA blokirao je degradaciju nekonformiranih MHC-I molekula, dok je leupeptin u periodu od 2 sata imao znatan učinak, dok je nakon 4 sata djelovao samo djelomično (slika 73a). Budući da nakon površinske biotinilacije pratimo degradaciju molekula koje su u nultom vremenu bile prisutne na staničnoj površini, blokada degradacije uzrokovana konkanamicinom A mogla bi teoretski biti posljedica blokade endocitoze, kao i posljedica narušenog pH gradijenta u endosomalnom sustavu. Kako bi isključili blokadu endocitoze kao uzrok blokade degradacije, konfokalnom mikroskopijom smo istražili što se događa s već internaliziranim molekulama pod utjecajem KonA. Nekonformirane MHC-I molekule smo internalizirali i stanice smo zatim kratkotrajno tretirali s kiselim pH kako bi uklonili neinternalizirane molekule (*pulse)*, te smo u različitim vremenskim intervalima promatrali što se događa s nekonformiranim MHC-I molekulama unutar stanice ovisno o prisutnosti KonA (*chase).* Nakon jednoga sata *chase*-a internalizirane nekonformirane MHC-I molekule više se ne mogu detektirati unutar stanice ukoliko su inkubirane bez KonA, no ukoliko je KonA bio prisutan u mediju signal nekonformiranih MHC-I molekula jednak je kao i neposredno nakon internalizacije (*pulse*) (slika 73d). KonA nije imao značajnijeg učinka na internalizaciju nekonformiranih MHC-I molekula (slika 73b), dok je signal istih unutar stanice nakon internalizacije bio jači (slika 73c).

Blokada degradacije nekonformiranih MHC-I molekula kao posljedica djelovanja KonA nije posljedica blokade endocitoze već narušenog endosomalnog pH gradijenta.

Slika 73. Učinak konkanamicina A i leupeptina na degradaciju nekonformiranih MHC-I molekula

Slika 73. Učinak konkanamicina A i leupeptina na degradaciju nekonformiranih MHC-I molekula.
Stanice J26-Cw6 su površinski biotinilirane, te potom inkubirane bez inhibitora, ili uz KonA ili uz Leu. Stanice su nakon naznačenog vremena razorene u 1% NP40 puferu, te su imunoprecipitirane nekonformirane HLA-Cw6 molekule. Molekule su razdvojene na SDS-PAGE elektroforezi, blotirane, te vizualizirane pomoću SA-POD i kemiluminiscencije (a). Nekonformirane MHC-I molekule su nakon površinskog vezivanja mPt internalizirane s površine J26-Cw6 stanica tijekom 2 sata u mediju bez inhibitora ili uz KonA. Stanice su potom analizirane protočnom citometrijom (b) ili nakon kratkotrajnog zakiseljavanja su analizirane konfokalnom mikroskopijom; mjerna crta = 20μm. (c). Nekonformirane MHC-I molekule su nakon površinskog vezivanja mPt internalizirane s površine J26-Cw6 stanica tijekom 90 minuta, stanice su kratkotrajno zakiseljene kako bi se uklonile neinternalizirane molekule (*pulse*), te su stanice u naznačenim vremenskim intervalima inkubirane ili u mediju sa ili bez KonA. Stanice su zatim analizirane konfokalnom mikroskopijom. (d). Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

KonA blokirao je i degradaciju konformiranih MHC-I molekula u vremenu od 2 sata, dok je nakon 4 sata inkubacije imao nešto slabiji učinak (slika 74a). KonA povećao je i ukupan broj konformiranih MHC-I molekula unutar stanice nakon internalizacije, dok je istovremeno usporio njihovu internalizaciju (uklanjanje molekula s površine) (slika 74b). Usporena internalizacija konformiranih MHC-I molekula u prisutnosti KonA, uz istovremeno povećan broj molekula unutar stanice, upućuje na mogućnost stimulacije recikliranja konformiranih MHC-I molekula u prisutnosti KonA.

Slika 74. Učinak konkanamicina A na degradaciju konformiranih MHC-I molekula

Slika 74. Učinak konkanamicina A na degradaciju konformiranih MHC-I molekula.
Stanice J26-Cw6 su površinski biotinilirane, te potom inkubirane u svježem mediju fiziološkog pH bez inhibitora ili uz KonA, Stanice su nakon naznačenog vremena razorene u 1% NP40 puferu, te su imunoprecipitirane konformirane HLA-Cw6 molekule. Molekule su razdvojene na SDS-PAGE elektroforezi, blotirane, te vizualizirane pomoću SA-POD i kemiluminiscencije (a). Konformirane MHC-I molekule su nakon površinskog vezivanja mPt internalizirane s površine J26-Cw6 stanica tijekom 2 sata u mediju bez inhibitora ili uz KonA. Stanice su potom analizirane protočnom citometrijom i izračunat je postotak internaliziranih molekula s KonA u odnosu na internalizirane molekule bez KonA kao omjer razlika MFI vrijednosti nultog vremena i 2 sata nakon internalizacije sa KonA i bez KonA. Izračunat je i postotak molekula prisutnih u stanici tako što su stanice nakon 2 sata internalizacije zakiseljene kako bi se uklonile površinske molekule, fiksirane i permeabilizirane te je izračunat omjer MFI vrijednosti netretiranih stanica i stanica tretiranih s KonA (b).

Kako bi ispitali da li uistinu KonA povećava recikliranje konformiranih MHC-I molekula, nakon internalizacije u čistom mediju pratili smo recikliranje konformiranih MHC-I molekula uz prisustvo i bez prisustva KonA. Budući da konformirane MHC-I molekule mogu reciklirati iz različitih endosomalnih odjeljaka, pratili smo učinak KonA na recikliranje konformiranih MHC-I molekula nakon internalizacije u prisustvu LY, BFA i AlF_4^- kako bi ustanovili koji od tih odjeljaka su osjetljivi na narušavanje pH gradijenta.

Slika 75. Učinak konkanamicina A na recikliranje konformiranih MHC-I molekula na HeLa stanicama

Slika 75. Učinak konkanamicina A na recikliranje konformiranih MHC-I molekula na HeLa stanicama. Recikliranje konformiranih MHC-I molekula uz ili bez KonA (50 nM) nakon internalizacije u čistom mediju praćen je prema naznačenom protokolu. Postotci recikliranih molekula u prisustvu KonA u naznačenim vremenskim intervalima izraženi su u odnosu na kontrolu (omjer recikliranih molekula u prisustvu KonA i recikliranih molekula bez prisustva inhibitora pomnožen sa 100) (a). Recikliranje konformiranih MHC-I molekula u čistom mediju ili uz prisustvo naznačenih inhibitora (40`) nakon internalizacije uz KonA (50 nM) praćen je prema naznačenom protokolu. Postotci recikliranih molekula u prisustvu naznačenih inhibitora izraženi su u odnosu na kontrolu (omjer recikliranih molekula u prisustvu naznačenih inhibitora i recikliranih molekula bez prisustva inhibitora pomnožen sa 100). (b). Recikliranje konformiranih MHC-I molekula (40`) uz KonA (50 nM) nakon internalizacije u čistom mediju ili uz prisustvo naznačenog inhibitora praćen je prema naznačenom protokolu. Postotak recikliranih molekula u prisustvu KonA izražen je u odnosu na kontrolu (omjer recikliranih molekula u prisustvu KonA i recikliranih molekula u čistom mediju pomnožen sa 100 (c).

KonA povećao je recikliranje konformiranih MHC-I molekula internaliziranih u čistom mediju za 14% u periodu od 20 i 40 minuta, odnosno za 34% nakon 60 minuta praćenja

recikliranja (slika 75a). Porast recikliranja konformiranih MHC-I molekula uz KonA nakon 60 minuta u odnosu na intervale od 20 i 40 minuta vjerojatno je posljedica učinka KonA na blokadu degradacije već recikliranih molekula, te je realnije njegov učinak na čisto recikliranje promatrati u periodu od 20 i 40 minuta kada još ne dolazi do degradacije recikliranih molekula. Odjeljci iz kojih KonA povećava recikliranje konformiranih MHC-I molekula su endosomalni odjeljci u kojima LY blokira endosomalno putovanje internaliziranih konformiranih MHC-I molekula (slika 75c), dok nema utjecaja na recikliranje konformiranih MHC-I molekula iz endosomalnih odjeljaka u kojima ih blokiraju BFA i AlF_4^- (slika 75c). Nakon internalizacije konformiranih MHC-I molekula u prisustvu KonA, njihovo recikliranje blokirali su BFA (23%) i AlF_4^- (44%), dok LY i sam KonA nisu imali značajnijeg učinka (slika 75b).

4.5.2. Degradacija B podjedinice toksina kolere

Budući da smo pokazali da CtxB nakon internalizacije ne podliježe procesu recikliranja (slika 71), logično je očekivati da se usmjerava u degradaciju. Stoga smo ispitali kinetiku njene degradacije. Isto tako, kolokalizirali smo je nakon internalizacije s markerom lizosoma (Lamp-1).

Nakon 60 minuta internalizacije CtxB se izuzetno jako kolokalizira s Lamp-1 biljegom, a nakon 90 minuta kolokalizacija je gotovo potpuna (slika 76a). Nakon jednoga sata internalizacije degradira se oko 40% CtxB, a nakon 3 sata gotovo 100% (slika 76b). Ovi rezultati upućuju na brzu degradaciju CtxB nakon internalizacije.

Slika 76. Degradacija B podjedinice toksina kolere

Slika 76. Degradacija B podjedinice toksina kolere.

Balb3T3 stanicama dodan je CtxB-AF555 (4 °C; 1 sat), stanice su zatim isprane kako bi se uklonio nevezani CtxB, te inkubirane na 37°C tijekom naznačenih vremenskih intervala. Stanice su zatim fiksirane s 4% PFA , te je dodan protu-Lamp-1 Pt. Stanice su analizirane konfokalnim mikroskopom. Mjerna crta = 5μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm (a). Balb 3T3 stanicama dodan je CtxB-biotin (4 °C; 1 sat), stanice su zatim isprane kako bi se uklonio nevezani CtxB, te inkubirane na 37 °C. Nakon naznačenih vremenskih intervala jednak broj stanica je razoren u 1% NP40 puferu, te je iz lizata imunoprecipitirana CtxB. Nakon imunoprecipitacije (IP), svi uzorci su razdvojeni na SDS-PAGE elektroforezi i blotirani, a molekule vizualizirane pomoći SA-POD i kemiluminiscencije (b).

4.6. SMJEŠTAJ KONFORMIRANIH I NEKONFORMIRANIH MHC MOLEKULA I RAZREDA U MEMBRANSKE MIKRODOMENE

Kao što je ranije navedeno (poglavlje 1.2.2.) stanična membrana se sastoji od organiziranih i neorganiziranih dijelova, a od organiziranih dijelova najbolje su upoznate klatrinske jamice i lipidne splavi (202, 203). Smještaj molekula u lipidnim splavima ispitivana je primjenom činjenice da su splavi dobile ime prema svojstvu netopivosti u neionskim detergentima na 4 °C (DRMs- engl. *detergent resistant membranes)*, te specifičnosti u lipidnom sastavu- bogate su kolesterolom, sfingomijelinom, te glikolipidima kao što je gangliozid GM_1 (145, 151) koji je ujedno receptor za toksin kolere (134).

Slika 77. Ispiranje konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula s detergentom sa stanične površine

Slika 77. Ispiranje konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula s detergentom sa stanične površine.

Na površinu naznačenih stanica vezano je odgovarajuće mPt ili ligand, te je zatim jedan dio stanica odmah fiksiran, dok je drugi dio stanica prije fiksacije bio tretiran s 0.5% Tx-100 tijekom jedne minute na 4 °C. Stanice su potom analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 20μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Konformirane MHC-I molekule i TfR u potpunosti se isperu s površine stanica ukoliko je stanica tretirana s Tx-100, dok nekonformirane MHC-I molekule ostaju na staničnoj površini i nakon tretmana s Tx-100 (slika 77). Iz toga možemo zaključiti da se konformirane MHC-I molekule na staničnoj površini, kao i TfR, nalaze u detergent-osjetljivim, a nekonformirane MHC-I molekule u detergent-rezistentnim membranskim mikrodomenama.

Kako bi ispitali da li je položaj ispitivanih molekula i unutar stanice jednak, stanice smo prije dodavanja specifičnog mPt tretirali s Tx-100 (1 minuta, 4 °C).

Sve ispitivane molekule unutar stanice nalaze se u jednakim mikrodomenama kao i na površini stanice (slika 78).

Slika 78. Ispiranje konformiranih i nekonformiranih molekula s detergentom iz unutrašnjosti stanice

Slika 78. Ispiranje konformiranih i nekonformiranih molekula s detergentom iz unutrašnjosti stanice.
Stanice nisu ili su bile tretirane s 0.5% Tx-100 tijekom jedne minute na 4 °C. Sve stanice su potom fiksirane i permeabilizirane, te je dodano specifično mPt. Stanice su potom analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Budući da postoje lipidne splavi kojima je glavna sastavnica kolesterol i lipidne splavi čija su glavna sastavnica sfingomijelini, željeli smo ispitati kakav je sastav lipidnih splavi u kojima se nalaze nekonformirane MHC-I molekule, kako na površini tako i u unutrašnjosti stanice. U tu svrhu stanice smo tretirali ili s metil-β-ciklodekstrinom (MβCD; 7,5 mM) koji narušava homeostazu kolesterola ili s sfingomijelinazom (SM; 5 IU/ml) koja dovodi do razgradnje sfingomijelina. Za očekivati je da će nakon tretmana s MβCD doći do ispiranja nekonformiranih MHC-I molekula ukoliko se one nalaze u lipidnim splavima čija je glavna sastavnica kolesterol, odnosno nakon tretmana s sfingomijelinazom do ispiranja nekonformiranih MHC-I molekula ukoliko se one nalaze u lipidnim splavima čija su glavna sastavnica sfingomijelini.

Slika 79. Ispiranje konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula s detergent s površine i iz unutrašnjosti stanice nakon tretmana s MβCD

Slika 79. Ispiranje konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula s detergent s površine i iz unutrašnjosti stanice nakon tretmana s MβCD.

Stanice J26-Cw6 bile su tretirane s MβCD tijekom 1 sat na 37°C. *Za staničnu površinu*: TfR, konformirane i nekonformirane HLA-Cw6 molekule površinski su obilježene specifičnim mPt tijekom 60 minuta na 4 °C, te je zatim jedan dio stanica odmah fiksiran, dok je drugi dio stanica prije fiksacije bio tretiran s 0.5% Tx-100 tijekom jedne minute na 4 °C. Stanice su potom analizirane konfokalnom mikroskopijom. *Za unutrašnjost stanice*: stanice nisu ili su bile tretirane s 0.5% Tx-100 tijekom jedne minute na 4 °C. Sve stanice su potom fiksirane i permeabilizirane, te je dodano specifično mPt na TfR, konformirane ili nekonformirane HLA-Cw6 molekule. Stanice su potom analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Nakon tretmana s MβCD nekonformirane MHC-I molekule isperu se s detergentom sa stanične površine za razliku od nekonformiranih MHC-I molekula smještenih unutar stanice koje su i nakon tretmana s MβCD rezistentne na detergent (slika 79). Nekonformirane MHC-I molekule smještene unutar stanice postale su osjetljive na detergent tek nakon što su stanice bile tretirane s sfingomijelinazom (slika 80). Iz toga možemo zaključiti da je za očuvanje integriteta lipidnih splavi u kojima se nalaze nekonformirane MHC-I molekule na staničnoj površini ključan kolesterol, dok su za lipidne splavi u kojima se nalaze nekonformirane MHC-I molekule unutar stanice ključni sfingomijelini.

Slika 80. Ispiranje nekonformiranih MHC-I molekula s detergentom iz unutrašnjosti stanice nakon tretmana s sfingomijelinazom

Slika 80. Ispiranje nekonformiranih MHC-I molekula s detergentom iz unutrašnjosti stanice nakon tretmana s sfingomijelinazom.

Stanice J26-Cw6 su bile inkubirane u čistom mediju ili u prisutnosti sfingomijelinaze ili MβCD tijekom 1 sat na 37 °C. Stanice zatim nisu bile tretirane s Tx-100 ili su bile tretirane s 0.5% Tx-100 na 4 °C ili s 0.5% Tx-100 na 37 °C tijekom jedne minute. Sve stanice su potom fiksirane i permeabilizirane, te je dodano specifično mPt na TfR, i nekonformirane HLA-Cw6 molekule. Stanice su potom analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Kako bi ispitali da li je razlika u smještaju konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula unutar staničnih mikrodomena uistinu posljedica njihove različite konformacije pomoću kiselog pH pretvorili smo konformirane MHC-I u nekonformirane MHC-I molekule na staničnoj površini te analizirali da li se te umjetno stvorene nekonformirane MHC-I molekule nalaze u lipidnim splavima, odnosno da li su domene u kojima su smještene otporne na detergent.

Slika 81. Ispiranje konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula s detergentom sa stanične površine

Slika 81. Ispiranje konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula s detergentom sa stanične površine.

Nakon što su stanice HeLa bile inkubirane 1 minutu u mediju pH vrijednosti 7 ili 2 na 4 °C, konformirane i nekonformirane MHC-I molekule površinski su obilježene specifičnim mPt tijekom 60 minuta na 4 °C, te je zatim jedan dio stanica odmah fiksiran, dok je drugi dio stanica prije fiksacije bio tretiran s 0.5% Tx-100 tijekom jedne minute na 4 °C. Stanice su potom analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Nakon tretmana s kiselim pH konformirane MHC-I molekule više se ne mogu detektirati na staničnoj površini, dok nakon kiselog tretmana izražaj nekonformiranih molekula izuzetno raste što potvrđuje da smo kratkotrajnim zakiseljavanje uspjeli promijeniti konformaciju MHC-I molekula, odnosno da su konformirane molekule prešle u nekonformirani oblik (slika 81). Umjetno stvorene nekonformirane MHC-I molekule nalaze se u membranskim mikrodomenama koje su otporne na detergent, isto kao i nativne nekonformirane MHC-I molekule (slika 81).

4.7. MATEMATIČKI MODEL ENDOCITOZE MHC MOLEKULA I RAZREDA

Endocitozu MHC-I molekula pokušali smo opisati i matematičkim jezikom te smo iz tog razloga razvili matematički model kojime se može pratiti njihova endocitoza. Budući da je u endocitozu MHC-I molekula uključeno više staničnih odjeljaka, upotrijebili smo dinamički kontinuirani model više odjeljaka (engl. *multi-compartments model*). Pomoću njega smo, mjereći u različitim vremenskim intervalima izražaj MHC-I molekula na staničnoj površini nakon površinskog obilježavanja molekula u trenutku t_0, nastojali izračunati raspodjelu molekula u pojedinim segmentima endosomalnog sustava u trenutku dt, te definirati i izračunati stopu endocitoze, stopu recikliranja i stopu degradacije MHC-I molekula, kao i ukupan broj recikliranih i degradiranih molekula. Model više odjeljaka opisan u uvodu ovoga rada poslužio nam je kao baza za razvijanje vlastitog modela.

4.7.1. Osnovne pretpostavke matematičkog modela endocitoze MHC molekula I razreda

Slika 82. Shematski prikaz matematičkog modela za praćenje MHC-I molekula (detaljnije objašnjenje u tekstu)

Slika 82. Shematski prikaz matematičkog modela za praćenje MHC-I molekula (detaljnije objašnjenje u tekstu).

Kao pretpostavke modela uzeli smo da se MHC-I u svakom vremenskom trenutku t mogu nalaziti u različitim fazama staničnog procesa, tj. one mogu biti na staničnoj površini, unutar stanice u endosomu, reciklirane ili u degradaciji. Komponentu novosintetiziranih molekula možemo zanemariti budući da u našem modelu endocitoze pratimo molekule na staničnoj površini koje smo prethodno obilježili mPt.

Stoga je:

- $\boldsymbol{S_i}$ broj molekula na staničnoj površini u trenutku t_i
- $\boldsymbol{E_i}$ broj molekula u stanici u trenutku t_i
- $\boldsymbol{R_i}$ broj molekula koje su izreciklirale u trenutku t_i
- $\boldsymbol{D_i}$ broj molekula koje su degradirane u trenutku t_i
- $\boldsymbol{T_i}$ ukupan broj molekula u trenutku t_i;

Budući da molekule koje se degradiraju u trenutku t_i ($\boldsymbol{D_i}$) ne možemo detektirati, a da se molekule koje su izreciklirale u trenutku t_i ($\boldsymbol{R_i}$) vraćene na staničnu površinu i samim time predstavljaju dio molekula $\boldsymbol{S_i}$ u trenutku t_i možemo pisati:

$$\boldsymbol{T_i = E_i + S_i} \quad [1]$$

Neka je:

• $\boldsymbol{k_e}$ takav da je $k_e S_i \triangle t$ broj molekula koje su u vremenu $\triangle t = t_{i+1} - t_i$ sa površine ušle u stanicu: broj endocitiranih molekula u vremenskom intervalu $\triangle t$ proporcionalan je broju molekula S_i na površini stanice u intervalu $\triangle t$;

• $\boldsymbol{k_r}$ takav da je $k_r E_i \triangle t$ broj molekula koje su u vremenu $\triangle t = t_{i+1} - t_i$ izašle iz stanice na površinu: broj recikliranih molekula u vremenskom intervalu $\triangle t$ proporcionalan je broju molekula E_i u stanici u intervalu $\triangle t$;

• $\boldsymbol{k_x}$ takav da je $k_x E_i \triangle t$ broj molekula koje su se u vremenu $\triangle t = t_{i+1} - t_i$ degradirale: broj degradiranih molekula u vremenskom intervalu $\triangle t$ proporcionalan je broju molekula E_i u stanici u intervalu $\triangle t$;

• $\boldsymbol{k_s}$ takav da je $k_x \triangle t$ broj molekula koje su se u vremenu $\triangle dt = t_{i+1} - t_i$ sintetizirale: broj sintetiziranih molekula u vremenskom intervalu $\triangle t$ proporcionalan je duljini vremenskog intervala $\triangle t$; u nastavku pretpostavljamo da je ks =0.

Neka je S_{i+1} broj molekula na površini u vremenskom trenutku t_{i+1}. Tada vrijedi

$$S_{i+1} = S_i + k_r E_i \Delta t - k_e S_i \Delta t.$$

Prema [1] je

$$S_{i+1} = S_i + k_r (T_i - S_i) \Delta t - k_e S_i \Delta t,$$

odakle je

$$\frac{S_{i+1} - S_i}{\Delta t} = k_r T_i - k_r S_i - k_e S_i \quad [2]$$

Jednadžba (2) je diskretizirani oblik diferencijalne jednadžbe

$$\frac{dS}{dt} = k_r T(t) - (k_r + k_e) S(t). \qquad [3]$$

Prirodno je pretpostaviti da za ukupni broj molekula T_{i+1} u vremenskom trenutku t_{i+1} vrijedi

$$T_{i+1} = T_i - k_x E_i \Delta t, \qquad [4]$$

što predstavlja diskretizirani oblik diferencijalne jednadžbe

$$\begin{aligned} \tfrac{dT}{dt} &= -k_x E(t) \\ &= -k_x (T(t) - S(t)) = -k_x T(t) + k_x S(t), \end{aligned} \qquad [5]$$

Na taj način iz [3] i [4] dobivamo sustav linearnih diferencijalnih jednadžbi s odgovarajućim početnim uvjetima

$$\begin{aligned} \tfrac{dT}{dt} &= -k_x T(t) + k_x S(t) \\ \tfrac{dS}{dt} &= k_r T(t) - (k_r + k_e) S(t) \\ T(0) &= S(0) = S_0. \end{aligned} \qquad [6]$$

što u matričnom obliku možemo zapisati kao

$$\begin{bmatrix} T'(t) \\ S'(t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -k_x & k_x \\ k_r & -k_r - k_e \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} T(t) \\ S(t) \end{bmatrix}, \qquad \begin{bmatrix} T(0) \\ S(0) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} S_0 \\ S_0 \end{bmatrix} \qquad [7]$$

Rješavajući ovaj sustav primjenom *Mathematica* modula Dsolve (vidi [2]) dobivamo

$$\begin{aligned} S(t; k_e, k_r, k_x) &= -\tfrac{S_0}{2a} (k_e - k_r - k_x) \left(e^{-\frac{1}{2}(a-b)t} - e^{-\frac{1}{2}(a+b)t} \right) + \tfrac{S_0}{2} \left(e^{-\frac{1}{2}(a-b)t} + e^{-\frac{1}{2}(a+b)t} \right), \\ T(t; k_e, k_r, k_x) &= \tfrac{S_0}{2a} (k_e - k_r - k_x) \left(e^{-\frac{1}{2}(a-b)t} - e^{-\frac{1}{2}(a+b)t} \right) + \tfrac{S_0}{2} \left(e^{-\frac{1}{2}(a-b)t} + e^{-\frac{1}{2}(a+b)t} \right), \end{aligned} \qquad [8]$$

gdje su

$$\begin{aligned} a &:= k_e + k_r + k_x \\ b &:= \sqrt{(k_e + k_r + k_x)^2 - 4 k_e k_x}. \end{aligned} \qquad [9]$$

Funkcija koja opisuje broj endocitiranih molekula u trenutku *t*

$$E(t; k_e, k_r, k_x) = T(t; k_e, k_r, k_x) - S(t; k_e, k_r, k_x), \qquad [10]$$

A također i ukupni broj recikliranih molekula u vremenskom intervalu od 0 do *t*

$$R(t; k_e, k_r, k_x) = k_r \int_0^t E(t; k_e, k_r, k_x)\, dt. \qquad [11]$$

Ukupni broj degradiranih molekula u vremenskom intervalu od 0 do *t*

$$D(t; k_e, k_r, k_x) = k_x \int_0^t E(t; k_e, k_r, k_x)\, dt. \qquad [12]$$

Poluvrijeme života na staničnoj površini dobivamo rješavanjem jednadžbe

$$S(t; k_e, k_r, k_x) = S_0/2 \qquad [13]$$

Funkcija koja opisuje broj recikliranih molekula u trenutku *t*

$$R(t; k_e, k_r, k_x) = k_r E(t; k_e, k_r, k_x) \qquad [14]$$

Funkcija koja opisuje broj degradiranih molekula u trenutku *t*

$$D(t; k_e, k_r, k_x) = k_x E(t; k_e, k_r, k_x) \qquad [15]$$

4.7.2. Procjena parametara u matematičkom modelu endocitoze MHC molekula I razreda

Uz pretpostavke $E_0 = k_s = 0$ i $S_0 = S_1$ za dane podatke mjerenja (w_i, t_i, S_i), $i = 1,....,m$, $T_1 = 0$ treba procijeniti parametre k_e, k_r, k_x u modelu

$$\begin{aligned} \frac{dT}{dt} &= -k_x T(t) + k_x S(t) \\ \frac{dS}{dt} &= k_r T(t) - (k_e + k_r) S(t) \\ T(0) &= S(0) = S_0. \end{aligned} \qquad [16]$$

odnosno

$$\begin{bmatrix} T'(t) \\ S'(t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -k_x & k_x \\ k_r & -(k_e + k_r) \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} T(t) \\ S(t) \end{bmatrix}, \qquad \begin{bmatrix} T(0) \\ S(0) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} S_0 \\ S_0 \end{bmatrix}. \qquad [17]$$

Svojstvene matrice

$$A = \begin{bmatrix} -k_x & k_x \\ k_r & -(k_e + k_r) \end{bmatrix} \text{ su}$$

$$\lambda_1 = -\frac{1}{2}(a + b), \qquad \lambda_2 = -\frac{1}{2}(a - b), \qquad [18]$$

A svojstveni vektori

$$v_1 = \frac{1}{2k_r}\begin{bmatrix} k_e + k_r - k_x - b \\ 2k_r \end{bmatrix}, \qquad v_2 = \frac{1}{2k_r}\begin{bmatrix} k_e + k_r - k_x + b \\ 2k_r \end{bmatrix},$$

gdje je

$$\begin{aligned} a &:= k_e + k_r + k_x \\ b &:= \sqrt{(k_e + k_r + k_x)^2 - 4k_e k_x}. \end{aligned} \qquad [19]$$

Za $k_e, k_r, k_x > 0$ je

$$a = k_e + k_r + k_x > 0 \qquad \text{i} \qquad (k_e + k_r + k_x)^2 - 4k_e k_x = (k_e - k_x)^2 + kr(k_e + k_x) > 0,$$

Pa uvijek postoje dvije različite svojstvene vrijednosti zadane s [18], a rješenje sustava se može zapisati kao

$$\begin{bmatrix} T(t) \\ S(t) \end{bmatrix} = e^{tA}\begin{bmatrix} S_0 \\ S_0 \end{bmatrix} = B\begin{bmatrix} e^{\lambda_1 t} & 0 \\ 0 & e^{\lambda_2 t} \end{bmatrix} B^{-1}\begin{bmatrix} S_0 \\ S_0 \end{bmatrix}, \qquad [20]$$

gdje je B matrica čiji su stupci svojstveni vektori v_1, v_2

Rješavajući Cauchyjev problem [16], odnosno [17] primjenom Mathematica modula Dsolve dobivamo

$$\begin{aligned} S(t; k_e, k_r, k_x) &= -\tfrac{S_1}{2a}(k_e - k_r - k_x)\left(e^{-\frac{1}{2}(a-b)t} - e^{-\frac{1}{2}(a+b)t}\right) + \tfrac{S_1}{2}\left(e^{-\frac{1}{2}(a-b)t} + e^{-\frac{1}{2}(a+b)t}\right), \\ T(t; k_e, k_r, k_x) &= \tfrac{S_1}{2a}(k_e - k_r - k_x)\left(e^{-\frac{1}{2}(a-b)t} - e^{-\frac{1}{2}(a+b)t}\right) + \tfrac{S_1}{2}\left(e^{-\frac{1}{2}(a-b)t} + e^{-\frac{1}{2}(a+b)t}\right), \end{aligned} \qquad [21]$$

Ili jednostavnije

$$\begin{aligned} S(t; C, \lambda_1, \lambda_2) &= Ce^{\lambda_1 t} - (S_1 - C)e^{\lambda_2 t}, \\ T(t; C, \lambda_1, \lambda_2) &= (S_1 - C)e^{\lambda_1 t} + Ce^{\lambda_2 t}, \end{aligned} \qquad [22]$$

gdje je

$$C = \frac{S_1}{2a}(a + k_e - k_r - k_x), \qquad \lambda_1 = -\frac{1}{2}(a + b), \qquad \lambda_2 = -\frac{1}{2}(a - b).$$

$$F(C, \lambda_1, \lambda_2) = \sum_{i=1}^{m} w_i \left|S_i - S(t_i; C, \lambda_1, \lambda_2)\right|^p \to \min_{C, \lambda_1, \lambda_2}. \qquad [23]$$

Nakon toga za dobiveno rješenje (C^*, λ_1*, λ_2*) treba riješiti sustav nelinearnih jednadžbi

$$C^* = \frac{S_1}{2a}(a + k_e - k_r - k_x), \qquad \lambda_1^* = -\frac{1}{2}(a + b), \qquad \lambda_2^* = -\frac{1}{2}(a - b). \tag{24}$$

Rješavanje sustava nelinearnih jednadžbi (24) je poseban i ne tako jednostavan problem, te stoga preferiramo direktnu minimizaciju po (k_e, k_r, k_x)

$$F(k_e, k_r, k_x) = \sum_{i=1}^{m} w_i |S_i - S(t_i; k_e, k_r, k_x)|^p \to \min_{k_e, k_r, k_x}. \tag{25}$$

4.7.3. Primjena matematičkog modela endocitoze u kinetičkim studijama konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda

Budući da se cijeli rad temelji na usporedbi internalizacije, odnosno endocitoze i recikliranja različitih konformacija MHC-I molekula, matematički model testirali smo na primjeru konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula na J26-Cw6 staničnoj liniji.

Slika 83. Kinetička studija konformiranih MHC-I molekula

Slika 83. Kinetička studija konformiranih MHC-I molekula.

Broj molekula na staničnoj površini u trenutku t_i (kružići- izmjerene vrijednosti, puna linija- procijenjene vrijednosti) (a). Usporedba broja molekula na staničnoj površini u trenutku t_i (S_i- crvena linija), ukupnog broja molekula u trenutku t_i (T_i- plava linija) i broja molekula u unutrašnjosti stanice trenutku t_i (E_i- zelena linija) (b). Ukupan broj recikliranih molekula (R) (c). Usporedba broja degradiranih molekula u trenutku t_i (D_i- plava linija), broja izrecikliranih molekula u trenutku t_i (R_i- crvena linija) i broja molekula u unutrašnjosti stanice trenutku t_i (E_i- crna linija) (d). Ukupan broj degradiranih molekula (D) (e).

Slika 84. Kinetička studija nekonformiranih MHC-I molekula

Slika 84. Kinetička studija nekonformiranih MHC-I molekula.

Broj molekula na staničnoj površini u trenutku t_i (kružići- izmjerene vrijednosti, puna linija- procijenjene vrijednosti) (a). Usporedba broja molekula na staničnoj površini u trenutku t_i (S_i- crvena linija), ukupnog broja molekula u trenutku t_i (T_i- plava linija) i broja molekula u unutrašnjosti stanice trenutku t_i (E_i- zelena linija) (b). Ukupan broj recikliranih molekula (R) (c). Usporedba broja degradiranih molekula u trenutku t_i (D_i- plava linija), broja izrecikliranih molekula u trenutku t_i (R_i- crvena linija) i broja molekula u unutrašnjosti stanice trenutku t_i (E_i- crna linija) (d). Ukupan broj degradiranih molekula (D) (e).

Tablica 4. Kinetički parametri endocitoze MHC-I molekula dobiveni matematičkim modelom na J26-Cw6 stanicama.

Vrsta ispitivane molekule	Poluvrijeme života na staničnoj površini	Poluvrijeme degradacije	k_e (min^{-1})	k_x (min^{-1})	k_r (min^{-1})
Konformirane MHC-I mol.	175,08 minuta	199,76 minuta	0,0132	0,0795	0,1902
Nekonformirane MHC-I mol.	60,32 minuta	71,96 minuta	0,0121	0,1298	0,0075

k_e- stopa endocitoze; k_r- stopa recikliranja; k_x- stopa degradacije

Iz priloženih rezultata (slika 83, slika 84 i tablica 4) uočava se da konformirane MHC-I molekule pokazuju znatno veću sklonost recikliranju od nekonformiranih molekula čija je k_r zanemariva. Imajući to u vidu, kao i veći k_x nekonformiranih MHC-I logičan je dobiven rezultat prema kojem konformirane MHC-I imaju duži poluživot, kako ukupan tako i na staničnoj površini. Na kraju bitno je uočiti da je k_e sličan za obje konformacije MHC-I molekula.

Važno je napomenuti da je u programu aktivirana opcija koja apsolutne vrijednosti (u ovom slučaju MFI) izravno pretvara u postotne, odnosno računa da je početni broj molekula 100. Iz toga razloga u grafovima prikazane apsolutne vrijednosti (slike 83 i 84) možemo promatrati i kao postotne. Primjerice, uslijed te pretvorbe zaključujemo da je recikliralo ~ 250% konformiranih MHC-I molekula. Taj rezultat pokazuje da se jedna molekula može reciklirati više puta (slika 83).

5. RASPRAVA

U ovom smo radu karakterizirali konstitutivnu internalizaciju različitih konformacija MHC molekula I razreda i usporedili je s endocitoznim putem B podjedinice toksina kolere (CtxB), te transferina (Tf), odnosno njegovog receptora (TfR). Nadalje, utvrdili smo da se konformirane i nekonformirane MHC-I molekule različito sortiraju već na staničnoj površini što bi moglo biti uzrok i njihovom različitom sortiranju tijekom njihova unutarstaničnog putovanja.

5.1. IZRAŽAJ MHC MOLEKULA I RAZREDA

Dobro je poznato da se MHC molekule I razreda na staničnoj površini mogu izražavati u dva osnovna oblika: kao stabilni trimolekularni kompleksi teškog lanca, β-2-mikroglobulina i peptida (konformirane MHC-I molekule), odnosno kao nestabilni teški lanci sa ili bez β-2-mikroglobulina/peptida (nekonformirane MHC-I molekule) (152, 204). U našim istraživanjima izravno smo pokazali da se u obje konformacije površinski izražavaju sljedeći aleli MHC-I molekula: HLA-Cw6, HLA-B7 i H2-L^d molekule, te klasične HLA-I molekule (HLA-A, HLA-B i HLA-C) na HeLa staničnoj liniji (slika 21). Serološka HLA-tipizacija HeLa stanične linije pokazuje njihov slijedeći fenotip: HLA-A3 i –A28, HLA-B15 i –B35, te HLA-CwX (194, 195, 205). Važno je napomenuti da je zastupljenost nekonformiranih MHC-I molekula znatno manja u usporedbi s konformiranim molekulama istih alela, a od njih se najslabije izražavaju nekonformirane HLA-B7 molekule (slika 21). HLA-G1 molekule se na staničnoj površini izražavaju samo u konformiranom obliku (slike 21-23).

Porijeklo nekonformiranih MHC-I molekula na staničnoj površini još uvijek nije potpuno rasvijetljeno. Naime, uzimajući u obzir strogu kontrolu kvalitete na izlasku iz endoplazmatskog retikuluma (ER) čime se dopušta progresija samo onih pravilno svijenih MHC-I molekula (konformiranih molekula) očekivano je da nekonformirane MHC-I molekule ne nalazimo na staničnoj površini. Stoga je logično očekivati da su one nastale raspadom konformiranih molekula negdje distalno od ER/GIC-a, primjerice uslijed kiselog pH u *trans*GA (biosintetski put) ili u kiselim endosomalnim odjeljcima (endocitozni put). Stoga bi izražaj nekonformiranih MHC-I molekula na staničnoj površini, kao i u tim odjeljcima bio to veći što je molekula nestabilnija. U našim istraživanjima postojanost molekula proučavali smo kao rezultat njene stabilnosti pri kiselim pH vrijednostima budući da

je pH primarna fizikalna varijabla kojoj su molekule izložene u unutarstaničnim odjeljcima. Pokazali smo da tretman s kiselim pH koji odgovara, kako fiziološkim, tako i nefiziološkim vrijednostima uzrokuje u većoj mjeri dezintegraciju HLA-Cw6 i H2-L^d molekula u usporedbi s HLA-B7 i HLA-G1 molekulama proporcionalno pH kiselosti i vremenu izloženosti (slike 32-36). To je u skladu s rezultatom da su nekonformirane MHC-I molekule na staničnoj površini zastupljenije to manje što je molekula stabilnija (slika 21). Nadalje, prema gore navedenom je bilo i za očekivati da će stabilnija konformacija i stabilniji alel biti više zastupljen na staničnoj površini u odnosu na unutrašnjost (slike 22 i 23).

Na unutarstaničnoj razini, konformirane MHC-I molekule svih ispitivanih alela prvenstveno se nalaze u GA (slika 26), te djelomično u TfR^+ tubulovezikularnim odjeljcima (slika 27), dok ih u kasnim endosomalnim odjeljcima općenito ne nalazimo (slika 28). Međutim, postoji razlika u obrascu unutarstaničnog izražaja između različitih alela nekonformiranih MHC-I molekula. Naime, nekonformirani oblici stabilnijih alela (HLA-B7 i HLA-G1) nalaze se dominantno u ERu (slika 23 i nije prikazano), dok se nekonformirani oblici nestabilnijih alela (HLA-Cw6 i H2-L^d) uočavaju i u kasnim i ranim endosomalnim odjeljcima (slike 28 i 30), kao i slabo u trans GA (slika 26). Svi ovi navedeni rezultati govore u prilog teoriji da se konformirane MHC-I molekule pod uvjetom kiselog pH mogu pretvarati u nekonformirane na način koji je izravno proporcionalan njihovoj nestabilnosti. Tako je moguće da nekonformirane MHC-I molekule nastale dezintegracijom konformiranih uslijed kiselog pH u transGA kao takve dođu na staničnu površinu. Isto tako, postoji vjerojatnost da se nekonformirane MHC-I molekule nastale iz konformiranih djelovanjem kiselog endosomalnog pH mogu jednako tako vratiti na plazmatsku membranu. U konačnici, značaj kiselog pH u obrascu izražaja MHC-I molekula ispitan je nakon inhibicije H-ATPaze pomoću KonA. Dok KonA nije promijenio obrazac izražaja niti konformiranih, niti nekonformiranih MHC-I molekula stabilnijih alela, uzrokovao je gubitak nekonformiranih HLA-Cw6 i H2-L^d iz područja transGA (usp. slike 24 i 25, te nije prikazano), kao i hipertrofiju vezikularnih endosomalnih odjeljaka u kojima se nalaze navedene nekonformirane molekule. U tim hipertrofiranim odjeljcima, zamjećuje se izrazita kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula istoga alela (slika 25) što može biti posljedica toga što neutralizacija endosomalnih odjeljaka onemogućuje kako normalnu progresiju, tako i dezintegraciju odnosno degradaciju molekula u kasnim kiselim endosomalnim odjeljcima (vidi kasnije). Ipak, pretpostavljamo da je veća vjerojatnost da se radi o blokadi progresije kroz endosomalne odjeljke, obzirom da nije opažena kolokalizacija s biljezima kasnih

odjeljaka (slika 29). Iako su i u kontrolnim stanicama MHC-I molekule vrlo slabo prisutne u kasnim odjeljcima (slika 28) to se tumači time što se tamo vrlo brzo degradiraju upravo djelovanjem kiselog pH koji je nužan za aktivaciju kiselih endosomalnih hidrolaza (152, 206).

Prema tome, možemo zaključiti da obrazac izražaja MHC-I molekula ovisi o njihovoj konformaciji i alelnoj stabilnosti. Naime, što je molekula stabilnija više se izražava na staničnoj površini, dok što je nestabilnija više je prisutna u unutarstaničnim odjeljcima. Najnestabilniji aleli najviše izražavaju svoje nekonformirane molekule u postER/GIC odjeljcima i u kiselim endosomalnim odjeljcima čime povećavaju vjerojatnost da se nađu i na staničnoj površini.

5.2. INTERNALIZACIJA MHC MOLEKULA I RAZREDA

Obzirom da se u literaturi pojmovi internalizacije i endocitoze često poistovjećuju, bitno je napomenuti da internalizacija predstavlja neto gubitak molekula sa stanične površine i posljedica je njihove endocitoze, recikliranja i degradacije. Iako bi mogućnost izravnog praćenja endocitoze izrazito doprinijela razumijevanju mehanizma ulaska molekula u staničnu unutrašnjost, to na žalost za sada nije moguće. Stoga se praćenje internalizacije molekula koristi u svrhu istraživanja vrsta endocitoze istih. Iz tih razloga i mi smo koristili isti princip prilikom karakterizacije endocitoze ispitivanih molekula, ali imajući cijelo vrijeme u vidu navedeni nedostatak tog pristupa.

U našim istraživanjima internalizaciju molekula smo pratili protočnom citometrijom nakon površinskog obilježavanja protutijelom (slike 37 i 38). Kako bismo potvrdili da su rezultati dobiveni ovim modelom reproducibilni i u drugim uvjetima, gubitak površinskog izražaja molekula pratili smo i nakon blokade proteinske sinteze, tj. uz tretman s cikloheksimidom (slika 36). Obzirom da se rezultati dobiveni obima protokolima u osnovi podudaraju (slike 36 i 37), u daljnjim pokusima primjenjivali smo protokol koji koristi praćenje molekula nakon površinskog vezivanja protutijela, a koji se i inače često primjenjuje u literaturi (199, 207).

Uspoređujući kinetiku internalizacije konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula vidljivo je da je internalizacija nekonformiranih molekula brža u odnosu na internalizaciju konformiranih molekula istog alela (slike 37-39), što naročito dolazi do izražaja u ranijim vremenskim intervalima (do 3 sata). Naime, poluživot konformiranih MHC-I molekula na staničnoj površini iznosi oko četiri (HLA-Cw6, H2-L^d, HLA-C + HLA-B +HLA-A), odnosno

oko osam sati (HLA-B7), ali i duže od osam sati (HLA-G1) što je u skladu s rezultatima koje su prethodno dobili drugi autori (191, 207). S druge strane, poluživot svih ispitivanih nekonformiranih MHC-I molekula je znatno kraći i iznosi 45 do 90 minuta (slike 36-38). Naime, kako je već ranije naglašeno, brzina internalizacije proporcionalna je brzini endocitoze, ali i time manja što je recikliranje ispitivane molekule veće. Stoga, brža kinetika internalizacije nekonformiranih MHC-I molekula u odnosu na konformirane molekule teoretski može biti posljedica ili njihove brže endocitoze ili manjeg recikliranja u odnosu na konformirane MHC-I molekule. Tako se i dulji poluživot konformiranih HLA-B7 i HLA-G1 molekula u odnosu na konformirane MHC-I molekule ostalih ispitivanih alela može objasniti njihovom većom konformacijskom stabilnošću (slike 32 i 35) budući da ona može imati utjecaja i na endocitozu i na recikliranje. Nadalje, u literaturi je pokazano da je citoplazmatski rep HLA-G1 molekula izuzetno kratak, što usporava stopu njihove endocitoze (191, 207), te bi to mogao biti još jedan od razloga sporije kinetike internalizacije konformiranih HLA-G1 molekula.

Dok brzinu endocitoze MHC-I molekula teško možemo odrediti, recikliranje možemo dosta pouzdano mjeriti. Tako smo pokazali da konformirane MHC-I molekule recikliraju, a nekonformirane ne podliježu tom procesu (slika 62).

Ipak, kako bi ispitali da li je razlika u kinetici internalizacije između konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula posljedica i različitog mehanizma njihove endocitoze, ispitali smo učinak različitih kemijskih inhibitora na njihovu internalizaciju. Logično je očekivati da će oni inhibitori koji blokiraju endocitozu ispitivane molekule proporcionalno smanjiti i njezinu internalizaciju.

Kako bi utvrdili da li se MHC-I molekule endocitiraju klatrinskom endocitozom, stanice smo tretirali s klorpromazinom, inhibitorom za kojeg je poznato da dovodeći do gubitka klatrina i AP2 adaptorskog kompleksa sa stanične površine i do njihovog artificijalnog udruživanja unutar stanice uzrokuje blokadu endocitoze ovisne o klatrinu (63, 66). Budući da klorpromazin nije usporio, ali niti ubrzao kinetiku internalizacije niti konformiranih niti nekonformiranih MHC-I molekula svih ispitivanih alela (slika 42), možemo zaključiti da za njihovu endocitozu nije nužno prisustvo klatrina. Vodeći se činjenicom da je za normalno odvijanje klatrinske endocitoze, uz klatrin nužno i prisustvo dinamina (4, 5, 6), ispitali smo i učinak *Dyanasore-a*, tvari koja specifično blokira dinamin GTPazu (76, 77), na kinetiku internalizacije MHC-I molekula i utvrdili da dinamin nije nužan za normalno odvijanje internalizacije konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula (slika 42). Kao kontrolu

učinkovitosti klorpromazina i *Dyansore-a* u blokadi klatrinske endocitoze, njihovo djelovanje testirali smo na internalizaciji transferina, molekule za koju je poznato da neovisno o staničnoj liniji, klatrinsku mašineriju koristi kao osnovni put ulaska u stanicu. To je potvrđeno na Balb 3T3 (slika 40a), HeLa i J26-Cw6 (slika 40b) staničnim linijama u kraćim vremenskim intervalima. No, važno je napomenuti da iako je internalizacija Tf-a u kraćim vremenima bila zakočena (slike 40a i 40b), u dužim vremenskim periodima (50 minuta) dio Tf-a ipak je uspio ući u stanicu (slika 40c). Tome bi razlog mogao biti ili što se transferin prebacio na neki surogatni endocitozni put (59) ili inhibitor nije u potpunosti djelovao. Naime, u literaturi nije pokazano da ovi inhibitori blokiraju internalizaciju transferina kroz dulji vremenski period (76, 77). Isto tako, važno je uočiti da dio Tf-a koji je uslijed djelovanja navedenih inhibitora uspio ući u stanicu, ostaje zarobljen u vezikularnim endosomalnim odjeljcima i ne može se transportirati do jukstanuklearnog dijela (slika 40d). Budući da klorpromazin dovodi do artificijalnog udruživanja klatrina na membranama endosoma (63, 66), vjerojatno je da time remeti normalni endosomalni transport. Isto tako je moguće da dinamin ima ulogu u vezikularnim fisijama (140).

Za B podjedinicu toksina kolere poznato je da u stanicu pretežito ulazi kaveolarnom endocitozom (208, 209), no da ovisno o ispitivanoj staničnoj liniji može koristiti i druge endocitičke mehanizme (26, 39, 40, 41). U skladu s tim, klorpromazin blokirao je endocitozu B podjedinice toksina kolere na HeLa staničnoj liniji, dok na Balb 3T3 staničnoj liniji nije imao učinka na njenu internalizaciju (slika 41) iz čega se može zaključiti da CtxB na HeLa staničnoj liniji u stanicu ulazi klatrinskom endocitozom. Kao dodatna potvrda da se CtxB na HeLa stanicama endocitira drugačijim mehanizmom nego na Balb 3T3 stanicama jeste i obrazac krivulje njene internalizacije koja pokazuje znatno brži rast upravo na HeLa staničnoj liniji (slika 39). Bitno je napomenuti da u ovom slučaju kinetika internalizacije dobro odražava kinetiku endocitoze, obzirom da se CtxB u pravilu ne reciklira (slika 71), te je ta komponenta izuzeta iz internalizacije.

Iako rezultati dobiveni nakon djelovanja *Dynasore-a* pokazuju da je endocitoza MHC-I molekula neovisna o mehanizmu koji zahtjeva prisustvo dinamina (klatrinska, kaveolarna i RhoA ovisna endocitoza) (3), ipak smo dodatno ispitali učinak filipina, inhibitora koji se najčešće koristi za praćenje kaveolarne endocitoze. Naime, filipin je tvar koja narušava integritet kolesterolom bogatih membranskih mikrodomena (84, 85), te stoga osim kaveolarne može narušiti i druge vrste endocitoze koje ovise o prisustvu kolesterola, primjerice Cdc42

ovisan endocitozni put (86). Nadalje, filipin na klatrinsku endocitozu ne bi trebao imati učinka (84, 210).

Filipin nije promijenio kinetiku internalizacije konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula (slika 46a) čime smo potvrdili da se uistinu ne radi o kaveolarnoj endocitozi, a istovremeno možemo zaključiti i da endocitoza ovih molekula ne ovisi o očuvanom integritetu membranskih mikrodomena bogatih kolesterolom (neovisna je o lipidnim splavima). Isto tako, filipin nije djelovao na endocitozu transferina (slika 43), te taj rezultat predstavlja još jednu potvrdu da transferin u stanicu ulazi klatrinskom endocitozom. Nadalje, dok filipin nije blokirao endocitozu CtxB na HeLa staničnoj liniji, na Balb 3T3 stanicama blokirao je njen ulazak u stanicu s učinkovitošću od gotovo 100% (slika 44). Taj rezultat u skladu je s rezultatom dobivenim nakon djelovanja klorpromazina (slika 41). Budući da filipin, kao što smo i ranije naveli, može blokirati različite endocitozne putove, a koji su ovisni o kolesterolu (odnosno lipidnim splavima), željeli smo ispitati da li na Balb 3T3 stanicama CtxB koristi kaveolarnu endocitozu kao osnovni mehanizam za ulazak u stanicu. Stoga smo CtxB tijekom internalizacije kolokalizirali s kaveolinom-1. Naime, poznato je da se kaveolin-1 pretežito nalazi u staničnoj citoplazmi (211, 212), no tijekom odvijanja kaveolarne endocitoze dolazi do njegove mobilizacije na staničnu membranu (211, 212). CtxB se tijekom internalizacije na Balb 3T3 staničnoj liniji izrazito jako kolokalizira s kaveolinom-1, koji je u nultom vremenu jedva detektibilan (slika 45a). Budući da kaveolarna endocitoza pripada endocitoznim mehanizmima koji su ovisni o dinaminu, u prilog kaveolarnoj endocitozi govori i rezultat da *Dynasore* izrazito jako blokira ulazak CtxB u Balb 3T3 stanice (slika 45b). No, treba zamijetiti da dio CtxB nakon djelovanja *Dynasore-a*, za razliku od rezultata dobivenog s filipinom (slika 44), ipak može ući u stanicu (slika 45b). Taj rezultat ostavlja otvorenu mogućnost da su i neki drugi endocitozni mehanizmi ovisni o lipidnim splavima, osim kaveolarne endocitoze, uključeni u njenu endocitozu (npr. Cdc42 ovisan endocitozni put) na Balb 3T3 stanicama.

Usporedba endocitoznog puta B podjedinice toksina kolere na stanicama Balb 3T3 i HeLa prikazana je na slici 85.

Slika 85. Usporedba endocitoznog puta B podjedinice toksina kolere na stanicama Balb 3T3 i HeLa

Slika 85. Usporedba endocitoznog puta B podjedinice toksina kolere na stanicama Balb 3T3 i HeLa.
CCV (vezikula obložena klatrinom). Pune strelice predstavljaju glavni endocitozni put, a isprekidane predstavljaju sporedni (mogući) endocitozni put. Dio stanične membrane tamno crvene boje predstavlja lipidne splavi. Na obje stanične linije CtxB dolazi u Golgi iz kojega odlazi u kasne endosomalne odjeljke/lizosome u kojima se u konačnici degradira. No, put CtxB od stanične membrane do Golgi aparata nije jednak na stanicama HeLa i Balb 3T3. Naime, razlika je u tome što CtxB u Golgi na Balb 3T3 stanicama u najvećem dijelu dolazi preko kaveosoma, a na HeLa stanicama preko CCV i ranih endosoma. Nije isključeno sudjelovanje još nekih endosomalnih odjeljaka u transportu CtxB sa stanične membrane do Golgia na Balb 3T3 stanicama.

Nakon tretiranja stanica s filipinom zamijećen je porast površinskog izražaja nekonformiranih klasičnih HLA-I molekula na HeLa staničnoj liniji, nekonformiranih HLA-Cw6 i nekonformiranih H2-L^d molekula na staničnoj površini (slika 46b). Povećanje njihove površinske ekspresije upućivalo bi ili na sporije uklanjanje s površine ili povećan dotok molekula iz unutrašnjosti stanice na staničnu površinu. S obzirom da filipin nije znatnije utjecao na kinetiku njihove internalizacije (slika 46a), možemo zaključiti da je filipin povećao dotok istih na staničnu površinu.

Prema prethodno dobivenim rezultatima možemo zaključiti da MHC-I molekule, neovisno o ispitivanom alelu i ispitivanoj konformaciji, u stanicu ulaze endocitozom koja je neovisna o dinaminu i neovisna o očuvanom integritetu lipidnih splavi (slike 43 i 46). Jedini endocitozni mehanizam koji zadovoljava te kriterije je endocitoza ovisna o Arf6 GTPazi (59, 96, 97, 98, 99, 100). Iz tog razloga, ispitali smo učinak aluminij fluorida (AlF_4^-) na kinetiku internalizacije konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula. Naime, neki autori

pokazuju da se internalizacija molekula koje se endocitiraju Arf6 putem (uključujući i konformirane MHC-I molekule na HeLa staničnoj liniji) može povećati u slučaju djelovanja AlF_4^- (59, 138). AlF_4^- je poznat kao aktivator Arf6 GTPaze (96), te je tijekom tretmana s AlF_4^- Arf6 GTPaza stalno aktivna (Arf6-GTP). S obzirom da je općenito za funkcioniranje Rho GTPaza neophodna nesmetana prostorna i vremenska izmjena aktivnog i inaktivnog oblika, AlF_4^- iako u početku aktivira Arf6 GTPazu, u konačnici blokira njenu normalnu funkciju. Tako, nakon posljedične ubrzane endocitoze, zbog nemogućnosti inaktivacije, odnosno prelaska u Arf6-GDP formu blokirani su mnogi endocitozni procesi uključujući sve razine recikliranja (59, 96).

AlF_4^- je ubrzao internalizaciju obiju konformacija MHC-I molekula (slika 47a). S obzirom da ubrzana internalizacija može biti posljedica i promjene kinetike endocitoze i promjene kinetike recikliranja, možemo zaključiti da je AlF_4^- ili ubrzao kinetiku endocitoze MHC-I molekula ili usporio recikliranje MHC-I molekula. Najvjerojatnije je da se radi o kumulativnom učinku. Budući da prema našim rezultatima, za razliku od konformiranih MHC-I, nekonformirane MHC-I ne recikliraju (slika 62) njihova ubrzana internalizacija uslijed djelovanja AlF_4^- ne bi mogla biti posljedica blokade recikliranja već isključivo ubrzanja endocitoze. Ovi rezultati bi stoga ukazivali na vjerojatnost da se MHC-I molekule endocitiraju ovisno o Arf6 GTPazi što bi, kada je o konformiranim MHC-I riječ, u skladu s literaturom (138). Međutim, budući da brzinu endocitoze kao što je ranije navedeno ne možemo izravno mjeriti, nije isključena mogućnost da AlF_4^- ubrzava internalizaciju nekonformiranih MHC-I molekula djelujući i na drugi parametar internalizacije, odnosno na recikliranje. Naime, ne može u potpunosti biti isključena mogućnost da nekonformirane MHC-I molekule ipak mogu podlijegati tom procesu, ali toliko brzo tako da ga poznati protokoli recikliranja ne mogu detektirati.

AlF_4^- usporio je internalizaciju transferina (slika 47c), iako se nakon 60 minuta kinetika internalizacije izjednačila s netretiranim stanicama (slike 47c i 47d). Ovaj rezultat je u skladu s literaturom gdje se navodi da AlF_4^- blokira i klatrinsku endocitozu (213, 214).

U skladu s dobivenim rezultatima u kojima AlF_4^- ubrzava internalizaciju MHC-I molekula je i pad njihova površinskog izražaja u ustaljenom stanju nakon AlF_4^- tretmana (slika 47b). Također treba imati u vidu činjenicu da AlF_4^- može djelovati i na sekretorni put djelujući na Arf1 GTPazu (100) i time usporiti dotok molekula iz GA čime se dodatno smanjuje njihov izražaj na staničnoj površini.

Iz svega navedenog možemo zaključiti da se konformirane i nekonformirane MHC-I molekule endocitiraju na način koji je neovisan o dinaminu i lipidnim splavima, a ovisan o malim Rho GTPazama, najvjerojatnije o Arf6 GTPazi.

5.3. VEZIKULARNI TRANSPORT I SORTIRANJE MHC MOLEKULA I RAZREDA UNUTAR ENDOCITOZNOG PUTA

Nakon što su se endocitirale, odnosno ušle u stanicu, molekule putuju duž različitih endosomalnih odjeljaka prema svojem konačnom odredištu koje predstavlja, okvirno gledajući, ili recikliranje preko reciklirajućih odjeljaka ili degradaciju u lizosomima. Unutarstanično putovanje molekula ne događa se nasumično, već prema sortirajućem signalu ili prema biofizičkim svojstvima membranskih domena u kojima su molekule smještene. Međutim, ove dvije mogućnosti sortiranja molekula se međusobno ne isključuju (215).

Kako bi ispitali koji sve endosomalni odjeljci sudjeluju tijekom unutarstaničnog putovanja konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula, te da li konformirane i nekonformirane MHC-I molekule koriste isti unutarstanični put, u različitim vremenima kolokalizirali smo internalizirane konformirane i nekonformirane MHC molekule I razreda međusobno, te svaku od njih s biljezima određenih unutarstaničnih odjeljaka. Nadalje, usporedili smo njihovo unutarstanično putovanje s transferinom/transferinskim receptoru (molekulama koje se unutar stanice usmjeravaju u recikliranje) (140, 216, 217), te s CtxB (molekulom koja se nakon internalizacije usmjerava u degradaciju) (218).

Nekonformirane HLA-G1, kao i nekonformirane HLA-B7 molekule se 90 minuta po internalizaciji ne mogu detektirati unutar stanice, dok je signal konformiranih molekula istih alela vrlo slab (slika 48). Tome je vjerojatno razlog to što je kinetika internalizacije konformiranih MHC-I molekula navedenih alela izrazito spora, te ih se u tom vremenu svega oko 15% ukloni sa stanične površine (slika 38). S druge strane, budući da se nekonformirane HLA-G1 molekule ne izražavaju na staničnoj površini (slika 21), logično je očekivati da se ne mogu niti internalizirati. Nadalje, iako nekonformirane HLA-B7 molekule pokazuju izrazito brzu kinetiku internalizacije (slika 38), njihov izrazito slab površinski izražaj (slika 21) može biti uzrok tome što ih nakon 90 minuta internalizacije ne vizualiziramo unutar stanice. No, unatoč tome, ostaje otvorena mogućnost da se one zbog svoje nestabilnosti vrlo brzo nakon ulaska u stanicu i degradiraju. Tome u prilog govori i rezultat da nekonformirane HLA-B7

molekule pokazuju najbržu kinetiku degradacije od svih ispitivanih nekonformiranih MHC-I molekula (slika 72, vidi kasnije).

S druge strane, konformirane i nekonformirane HLA-Cw6, konformirane i nekonformirane H2-L^d, te konformirane i nekonformirane klasične MHC-I molekula na HeLa staničnoj liniji pokazuju jak signal, ali različitu raspodjelu unutar stanice nakon 90 minuta internalizacije (slika 48). Dok se konformirane molekule smještaju pretežito u jukstanuklearni dio te imaju tubularno-vezikularnu formaciju, nekonformirane molekule se nalaze dominantno perinuklearno u vezikularnim tvorbama (slika 48). Bitno je napomenuti da obrazac internaliziranih MHC-I molekula dosta podsjeća na sliku dobivenu u ustaljenom stanju (slika 23).

Obzirom da nakon 90 minuta internalizacije nismo uspjeli dobiti značajniji signal HLA-B7 i HLA-G1 molekula unutar stanice (slika 48), internalizirali smo ih kroz 3 sata (slika 49). Međutim, niti tada, nekonformirane HLA-G1 molekule se ne mogu uočiti unutar stanice (slika 49), što je posljedica već ranije navedene činjenice što njihov površinski izražaj nije detektibilan imunofluorescentnim tehnikama (protočna citometrija i konfokalna mikroskopija) (slika 21 i slika 23). Jednako tako, signal internaliziranih nekonformiranih HLA-B7 molekula je izrazito slab (slika 49) što je također u korelaciji s njihovim početnim površinskim izražajem (slika 21), ali i s njihovom izrazito brzom kinetikom degradacije (slika 72). Iako se tri sata po internalizaciji konformirane HLA-B7 i HLA-G1 molekule mogu vidjeti unutar stanice, te pokazuju sličan obrazac unutarstanične distribucije kao i konformirane molekule na HeLa staničnoj liniji, te konformirane HLA-Cw6 i konformirane H2-L^d molekule (slika 49), njihov signal nije dovoljno oštar za daljnje podrobnije studije.

Iz svega navedenoga možemo pretpostaviti da unutarstanična distribucija MHC molekula I razreda nakon internalizacije prvenstveno ovisi o konformaciji same molekule, a ne o ispitivanom alelu.

Budući da obrazac unutarstaničnog izražaja nakon internalizacije konformiranih, za razliku od nekonformiranih MHC-I molekula (slika 48), podsjeća na obrazac transferina/transferinskog receptora (slike 40, 43 i 47) kolokalizirali smo MHC-I molekule s transferinskim receptorom tijekom njihove paralelne internalizacije (slika 50). Konformirane MHC-I molekule nakon internalizacije izrazito jako se kolokaliziraju s internaliziranim TfR (slika 50) u jukstanuklearnom području (slika 50). No treba zamijetiti da unatoč postojanju izrazite kolokalizacije između ovih dviju molekula, u jukstanuklearnom dijelu prisutna je i zamjetna

segregacija (slika 50). Budući da je poznato da se u jukstanuklearnom dijelu nalaze reciklirajući endosomalni odjeljci, rezultat je u skladu s pokusima recikliranja (slike 61 i 62) koji pokazuju da ove dvije molekule podliježu procesu recikliranja. No upravo opažena subkompartmentalizacija upućuje na mogućnost da se njihovo recikliranje odvija drugačijim mehanizmima. Za razliku od konformiranih, nekonformirane MHC-I molekule se izrazito slabo kolokaliziraju s TfR-om tijekom njihove paralelne internalizacije, a kolokalizacija je prisutna isključivo u vezikularnim tvorbama koje su smještene perinuklearno i isključene iz jukstanuklearnog područja (slika 50). Ovaj rezultat u skladu je s rezultatom dobivenim istraživanjem recikliranja koji govori da konformirane MHC-I molekule recikliraju, dok nekonformirane molekule ne podliježu tom procesu (slika 62). Naime, logično je očekivati da molekula koja ne reciklira (nekonformirane MHC-I) nakon internalizacije ne dolazi u endosomalne odjeljke u kojima se nalaze molekule koje recikliraju (TfR/Tf). No, postojanje djelomične kolokalizacije između ovih dvaju molekula tijekom internalizacije otvara mogućnost da se unatoč različitom konačnom sortiranju unutar endocitoznog puta, unutarstanično putovanje ovih dvaju molekula, barem na jednoj razini, ispreplićе.

Kako bi bolje vizualizirali internalizirane molekule, TfR, konformirane i nekonformirane MHC molekule internalizirali smo kroz 3 sata uz kontinuirano prisustvo mPt u mediju (slika 52). Bitno je napomenuti da je tijekom internalizacije u prisustvu protutijela onemogućeno lažno obilježavanje molekula. Naime, prisutnost samoga protutijela u određenom odjeljku bez membranski smještene molekule na koju bi se ono vezalo isključuje mogućnost njegove detekcije nakon bušenja stanice koja je dio protokola imunofluorescencije. Nadalje, obilježavanje molekula koje se nalaze u sekretornom putu je također isključeno zbog stroge kontrole odvajanja sekretornog i endocitoznog puta u stanici (219). Uzimajući to u obzir, logičan je dobiveni rezultat da nakon internalizacije u prisustvu mPt obrazac internaliziranih konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula, kao i TfR ostao je isti (slika 52).

Nadalje, konformirane i nekonformirane MHC-I molekule nakon internalizacije su rijetko prisutne u kasnim endosomalnim odjeljcima/lizosomima (slike 51 i 52). Budući da smo pokazali da se obje konformacije MHC-I molekula u konačnici degradiraju, iako različitom kinetikom (slika 72), a poznato je da se degradacija, neovisno o vrsti molekule događa upravo u kasnim endosomalnim odjeljcima, odnosno lizosomima (126, 127), razlog njihovoj slaboj detektibilnosti u tim odjeljcima može biti da se MHC-I molekule nakon što dođu u te odjeljke u njima vrlo brzo razgrađuju (128, 130).

Unatoč tome da raniji rezultati (slike 48, 50, 51, i 52) upućuju na to da konformirane i nekonformirane MHC-I molekule putuju različitim unutarstaničnim endosomalnim odjeljcima, ostaje otvorena mogućnost da se njihovi unutarstanični putovi na nekim razinama križaju. Tome u prilog ide i činjenica da se i putovi TfR i nekonformiranih molekula isprepliću (slike 50 i 52), iako se te dvije molekule endocitiraju na različit način (slike 40, 42, 45 i 46), pokazuju različit unutarstanični obrazac nakon internalizacije (slike 50 i 52), te se u konačnici i različito sortiraju (slike 61 i 62). Stoga smo međusobno kolokalizirali konformirane i nekonformirane molekule tijekom njihove paralelne internalizacije (slika 53). Vidljivo je da je jukstanuklearni dio u potpunosti negativan na nekonformirane, ali pozitivan na konformirane molekule, ali kolokalizacija internaliziranih konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula može se zamijetiti u perinuklearnom dijelu (slika 53), što upućuje na postojanje zajedničkih endosomalnih odjeljaka u kojima se isprepliće unutarstanično putovanje konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula.

Budući da, kao što je ranije i navedeno, sa sigurnošću ne možemo znati da li se segregacija konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula događa već na razini najranijih endocitoznih događanja, prva točka njihovog mogućeg spajanja, a koju je moguće pratiti u našim eksperimentalnim modelima, je na razini ranih endosoma. Naime, jedina točka unutarstanične kolokalizacije konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula su citoplazmatske vezikule (slika 53). Odjeljci tih obilježja podrazumijevaju uglavnom rane ili kasne endosome/lizosome (8, 42, 54, 220, 221). Obzirom da je uočeno da se MHC-I molekule vrlo sporadično nalaze u kasnim odjeljcima (slike 51 i 52), logično je bilo za pretpostaviti da upravo rani endosomi (EE) predstavljaju mjesto njihovog unutarstaničnog susretanja. Kako bi ispitali tu mogućnost, koristili smo inhibitor koji zaustavlja izlazak molekula iz ranih endosoma- LY294002. Obzirom da je ova tvar reverzibilni inhibitor PI3K (138), enzima čija je aktivnost neophodna za progresiju molekula iz EEa, on uzrokuje nakupljanje svih internaliziranih molekula koje prolaze kroz EE i njihovu posljedičnu kolokalizaciju u tom odjeljku (59, 114).

Poznato je da Tf prolazi kroz rane endosome na svom putu prema jukstanuklearnom reciklirajućem odjeljku (JNRC) (140). Stoga, dok se u kontrolnim stanicama Tf nakon internalizacije nalazi primarno jukstanuklearno, odnosno izvan ranih endosoma, nakon tretmana s LY ostaje zarobljen isključivo u ranim endosomima što se očituje njegovom potpunom kolokalizacijom s EEA-1, već navedenim biljegom ranih endosoma (slika 54a) (222). Iz tog razloga smo Tf mogli koristiti kao indikatorsku molekulu koja prolazi kroz rane

endosome i to na način ovisan o učinkovitosti PI3K. Uslijed djelovanja LY294002, konformirane i nekonformirane MHC-I molekule se u potpunosti kolokaliziraju u vezikularnim tvorbama (slika 54c, *pulse*). Nadalje, njihova pojedinačna kolokalizacija s Tf-om je znatna, iako ne i potpuna (slika 54c, *pulse*). Bitno je napomenuti da se MHC-I^+ vezikule koje se ne kolokaliziraju s Tf-om nalaze proksimalno od njega. To ukazuje na mogućnost postojanja prethodničkih odjeljaka za čiju fuziju s EE je također potrebna PI3K. U literaturi je navedeno da u tu skupinu spadaju GEEC odjeljci (59), ali nije isključena mogućnost da se može raditi i o nekim drugim vrlo ranim odjeljcima.

Osim što smo na ovaj način pokazali da se na razini EE isprepliću unutarstanični putovi konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula, također smo i ustanovili da je upravo ovaj odjeljak ujedno i mjesto sortiranja ovih dviju konformacija MHC-I molekula nakon čega se one usmjeravaju u različite endosomalne odjeljke i slijede različite sudbine. To je pokazano drugim dijelom ovoga pokusa u kojem su molekule praćene nakon uklanjanja LY294002, odnosno nakon što je bio dopušten njihov izlazak iz ranih endosoma. Tako smo uočili da se Tf i konformirane MHC-I molekule usmjeravaju jukstanuklearno i separiraju se od nekonformiranih MHC-I molekula koje progrediraju i dalje u vezikularnom obrascu (slika 54c, *chase*).

Budući da neki radovi pokazuju da je kiseli endosomalni pH bitan za sortiranje molekula unutar endocitoznog puta (223), ispitali smo kako narušavanje pH gradijenta endosomalnih odjeljaka utječe na sortiranje konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula. U tu svrhu stanice smo tretirali s konkanamicinom A, inhibitorom H-ATPaze (224). Narušavanje pH gradijenta endosomalnih odjeljaka uistinu onemogućuje njihovu separaciju i segregaciju (slika 55c). Nadalje, u tim uvjetima je zakočena i progresija Tf-a iz EEA-1^+ endosoma u JNRC (slike 55b i 55e). Kao i u primjeru kada je PI3K funkcija bila blokirana, i ovdje se uočava izuzetna kolokalizacija MHC-I molekula s TfR-om. Nadalje, iako se ponovno proksimalno uočavaju MHC-I^+ vezikule negativne na TfR, bitno je napomenuti da su one hipertrofirane za razliku od istih vezikula nakon LY294002 tretmana (usp. slike 54c i 55a). To upućuje da su kod blokade PI3K onemogućeni fuzijski procesi, kako homotipskih fuzija pred EE odjeljaka, tako i heterotopske fuzije njih samih s EE, dok narušavanje pH gradijenta remeti fisiju također kako pred EE odjeljaka, tako i fisiju iz EE.

Budući da dio Tf-a, koji unatoč djelovanju *Dynasore-a* uspije uči u stanicu ne dolazi u jukstanuklearno područje (slika 40), te ostaje zarobljen u EEA-1^+ vezikulama (slika 57), moguće je da dinamin osim na staničnoj površini ima ulogu i endosomalnom transportu na

nivou ranih endosoma. Isti rezultat dobiven nakon tretmana stanica s klorpromazinom mogao bi se objasniti činjenicom da ovaj inhibitor uzrokuje artificijalno nakupljanje klatrina na membranama ranih endosoma te samim time ometa njihovo funkciju (63). Oba inhibitora jednako su djelovanja, osim na Tf, i na MHC-I molekule (slika 59).

Pretežito jukstanuklearno ($Rab11^+$/EEA-1) (slike 57 i 58), ali i subplazmalemalno nakupljanje Tf-a i konformiranih MHC-I molekula nakon djelovanja AlF_4^- (slike 57 i 59) ukazuje da Arf6 GTPaza igra važnu ulogu u njihovom endosomalnom transportu, najvjerojatnije blokirajući njihovu ranu progresiju i put recikliranja na više razina, kao što je već navedeno u literaturi za konformirane MHC-I molekule (57, 58, 98, 142). Ova pojava bi objasnila i nagli pad površinskog izražaja MHC-I molekula, kako u ustaljenom stanju, tako i tijekom internalizacije, kao što je već ranije navedeno (slike 47a i 47b). No, ipak nije jasno zašto se nekonformirane molekule nakon djelovanja AlF_4^- unutarstanično ne uočavaju iako je i njihova internalizacija znatno ubrzana nakon djelovanja AlF_4^-. Razlog bi mogao biti da se nalaze u izrazito raspršenim sitnim vezikulama, ili da se ubrzano usmjeravaju u degradaciju.

Fenotipski slično kao i AlF_4^-, BFA je također uzrokovao nakupljanje konformiranih MHC-I molekula i Tf jukstanuklearno ($Rab11^+$/uglavnom EEA-1-) (ali ne i subplazmalemalno) (slika 56). Međutim, ovaj jukstanuklearni odjeljak nije tako kompaktan kao uslijed djelovanja AlF_4^-. Nadalje, nakon BFA tretmana nekonformirane MHC-I molekule se i dalje ne smještaju jukstanuklearno i izražavaju se u obrascu koji nalikuje onom u netretiranim stanicama (slika 56).

Endocitozni putovi konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula se isprepliću na razini ranih endosoma, gdje se ujedno događa njihovo sortiranje i posljedična separacija koja se temelji na mehanizmima koji su prvenstveno ovisni o djelovanju PI3K i kiselom endosomalnom pH.

5.4. RECIKLIRANJE MHC MOLEKULA I RAZREDA

Kako bi ispitali da li konformirane i nekonformirane MHC-I molekule podliježu procesu recikliranja i u kojoj mjeri, koristili smo recikliranje transferina i transferinskog receptora kao model, te uz pomoć tretmana s različitim inhibitorima ispitali u kojoj mjeri i koji endosomalni odjeljci su uključeni u taj proces, kako za Tf/TfR tako i za obje konformacije MHC-I molekula.

Ne postoji univerzalni protokol kojime se može pratiti recikliranje molekula, budući da rezultat jako ovisi o karakteristikama endocitoznog puta molekula koje se ispituju, te su stoga česti kako lažno pozitivni, tako i lažno negativni rezultati. Stoga smo testirali i modificirali nekoliko najčešće korištenih u literaturi (140) nastojeći njihove nedostatke svesti na minimum. Sve korištene protokole testirali smo na Tfu, TfRu, te MHC- I molekulama.

Recikliranje Tf-a praćeno izravnom metodom preko njegovog gubitka iz stanice (protokol recikliranja A) smatra se najpouzdanijim protokolom za praćenje tog procesa. Stoga je korišten kao kontrola pouzdanosti ostalih protokola. Nakon 20 minuta gotovo sav internalizirani Tf-a izreciklira, što je u skladu s literaturom (140).

S obzirom da se MHC-I molekule nakon recikliranja ne gube iz stanice, recikliranje tih molekula nije moguće pratiti pomoću *protokola A*. Stoga smo za ispitivanje recikliranja MHC-I molekula koristili protokole recikliranja B i C. Ukratko, protokol recikliranja B (200) reciklirane molekule detektira kao one internalizirane molekule koje nakon izlaska na staničnu površinu vežu sekundarno protutijelo i na taj način postaju detektibilne, bilo da ostanu na njoj ili da se kasnije ponovno internaliziraju. S druge strane, protokol recikliranja C (141) reciklirane molekule detektira kao one internalizirane molekule koje dolaze na staničnu površinu i nalaze se na njoj u trenutku isteka zadane kinetike. Stoga je za očekivati da će se na ovaj način moći pratiti recikliranje samo onih molekula koje imaju retenciju na staničnoj površini.
Kako bi ispitali vjerodostojnost protokola recikliranja B i C testirali smo ih na dinamici recikliranja TfR-a, molekuli koja se poput MHC-I molekula nakon recikliranja ne gubi iz stanice, a koja bi trebala odgovarati dinamici recikliranja Tf-a dobivenoj protokolom recikliranja A.

Ukoliko usporedimo dinamiku recikliranja Tf-a prema protokolu recikliranja A (slika 61a) i TfR prema protokolu recikliranja B (slika 61c) uočavamo da su krivulje gotovo identične te da već nakon 10 minuta oko 60% internaliziranog Tf-a i TfR-a izreciklira, a nakon sat vremena ta brojka dostiže gotovo 100%. Taj rezultat potvrđen je i konfokalnom mikroskopijom iz koje je vidljivo da se Tf nakon jedan sat recikliranja ne može više detektirati unutar stanice iako mu je signal nakon internalizacije unutar stanice izuzetno jak (slika 61a). Jednako tako, TfR jedan sat nakon internalizacije i jedan sat nakon recikliranja pokazuju gotovo jednak intenzitet signala što upućuje na zaključak da nakon jednoga sata ukupni internalizirani TfR podliježe procesu recikliranja (slika 61c). Navedena opažanja, potvrđuju vjerodostojnost rezultata dobivenih protokolom recikliranja B.

Budući da je protokol recikliranja B primjenjiv za praćenje recikliranja molekula, neovisno o njihovoj daljnjoj sudbini, recikliranje MHC-I ispitali smo upravo koristeći ovaj protokol.

Sve ispitivane konformirane MHC-I molekule recikliraju, dok nekonformirane molekule nakon internalizacije ne podliježu procesu recikliranja tijekom 80 minuta praćenja (slike 62a-c). Ipak se uočava da najveću učinkovitost recikliranja pokazuju konformirane HLA-B7 molekule (slika 62b), što je najvjerojatnije i posljedica njihove najveće stabilnosti (slika 35). To je ujedno u skladu i s kinetikom internalizacije prema kojoj se konformirane HLA-B7 najsporije internaliziraju od svih klasičnih MHC-I molekula (slika 38 i 39). Za razliku od Tf i TfR koji nakon internalizacije u potpunosti recikliraju (slike 62a i 62c), u vrijeme dosezanja platoa (između 40-60 minute), internaliziranih konformiranih MHC-I molekula recikliralo je oko 30% iz čega se može zaključiti da samo dio konformiranih MHC-I molekula nakon internalizacije podliježe procesu recikliranja. Ukoliko promatramo dinamiku recikliranja konformiranih MHC-I molekula na HeLa staničnoj liniji (slika 62a), uočava se da broj recikliranih molekula s vremenom raste, nakon jednoga sata postiže se maksimum, te zatim krivulja lagano počinje padati. Vjerojatno je da i prije isteka prvoga sata počinje proces degradacije recikliranih molekula, odnosno da se dio izrecikliranih molekula nakon ponovne internalizacije usmjerava u degradaciju. Naime, sama činjenica da se samo dio konformiranih MHC-I molekula usmjerava u recikliranje ukazuje na moguće usmjeravanje dijela tih molekula u degradaciju nakon internalizacije. Naravno, budući da TfR ne podliježe procesu degradacije, krivulja recikliranja TfR dobivena ovim protokolom (slika 61c) ne pokazuje pad niti u jednom ispitivanom vremenskom intervalu. Bitno je napomenuti da svi aleli MHC-I molekula (G1, B7, Cw6 i L^d) pokazuju sličan obrazac krivulje recikliranja (nije prikazano). Stoga je nedostatak ovoga protokola nemogućnost anuliranja kasnijeg degradiranja već recikliranih molekula, što uzrokuje lažno manju vrijednost učinkovitosti recikliranja.

Važno je uočiti da, ukoliko nakon recikliranja površinske molekule nisu uklonjene kratkotrajnim zakiseljavanjem, reciklirane molekule detektiramo uglavnom na površini stanice (slika 62c), no ukoliko su površinske molekule nakon recikliranja uklonjene tada reciklirane molekule detektiramo u tubulovezikularnim formacijama smještenim juksta i perinuklearno (slika 62c) što odgovara obrascu internaliziranih molekula (slika 48).
Zapažanje da je jukstanuklearni obrazac recikliranih konformiranih MHC-I molekula vrlo slabo vidljiv konfokalnom mikroskopijom ukoliko kratkotrajnim zakiseljavanjem ne uklonimo površinske molekule, odnosno da se bez uklanjanja površinskih molekula reciklirane konformirane MHC-I molekule detektiraju dominantno na površini stanice (slika

62c) upućuje na površinsku retenciju istih. Kao što smo ranije naveli, *protokol recikliranja C* može se koristiti za praćenje upravo takvih molekula, i upravo se ovaj protokol najčešće koristi za praćenje recikliranja MHC-I molekula i nekih drugih površinskih glikoproteina (141, 142). Stoga smo pratili kinetiku recikliranja konformiranih MHC-I molekula prema protokolu C te je usporedili s rezultatima dobivenim protokolom B, usporedno testirajući ove protokole na TfR.

Dinamika recikliranja TfR-a koja je bila praćena prema protokolu recikliranja C (slika 61b) pokazala je različitu dinamiku od dinamike recikliranja Tf-a dobivene protokolom recikliranja *A*. Naime, prema tom protokolu izgleda da manje od 30% internaliziranog TfR reciklira što nije realno (140). Uzrok toj pojavi je upravo činjenica što se TfR nakon recikliranja vrlo brzo ponovno internalizira, odnosno vrlo se kratkotrajno nalazi na staničnoj površini. Iz tog razloga protokol recikliranja C nije upotrebljiv za praćenje recikliranja molekula čije retencijsko mjesto nije stanična površina.

Dinamika recikliranja konformiranih MHC-I molekula dobivena *protokolom recikliranja C* razlikuje se od dinamike dobivene *protokolom B* (slika 63a), iako ne toliko drastično kao što je slučaj ukoliko pratimo recikliranje TfR-a (slika 61b). Prvih 10 minuta krivulje recikliranja konformiranih MHC-I dobivene putem ova dva protokola se preklapaju, da bi u kasnijim vremenima u istim vremenskim intervalima postotak recikliranih konformiranih MHC-I molekula dobiven *protokolom C* kontinuirano rastao u odnosu na postotak dobiven *protokolom B* (slika 63a). Naročito je ta razlika uočljiva na kinetici dužoj od jednoga sata kada krivulja dobivena *protokolom B* lagano počinje padati dok krivulja dobivena *protokolom C* i dalje, čak i strmije, raste. Tome bi mogao biti razlog što se u osnovnom *protokolu C* degradirane molekule lažno prikazuju kao reciklirane. U prilog tome ide i rezultat dobiven praćenjem recikliranja nekonformiranih MHC-I molekula po istom protokolu. Naime, prateći dinamiku recikliranja nekonformiranih MHC-I molekula *protokolom C* (slika 63b) dobivamo da nekonformirane MHC-I molekule recikliraju, i to do 40% od ukupno internaliziranih molekula unutar jednoga sata, što se razlikuje od rezultata dobivenim *protokolom recikliranja B*, a koji pokazuje da nekonformirane MHC-I molekule uopće ne recikliraju. Neki autori, neuzimajući u obzir ovaj važan nedostatak protokola recikliranja C, su krivo pretpostavili da nekonformirane MHC-I molekule na HeLa stanicama recikliraju (225).

Kako bi provjerili tu pretpostavku, *protokol C* smo modificirali, te smo tijekom praćenja recikliranja internaliziranih MHC-I molekula paralelno pratili i ukupan izražaj molekula

(stanice koje nisu tretirane s kiselim pH u navedenim vremenima). Time smo dobili i vrijednost degradacije internaliziranih molekula, te anulirali lažno reciklirane molekule.

Iz slike 64b jasno je da recikliranje nekonformiranih MHC-I molekula dobiveno *protokolom recikliranja C* zapravo predstavlja njihovu degradaciju. Naime, postotak pada izražaja ukupno internaliziranih molekula jednak je i u stanicama koje su bile kratkotrajno zakiseljene (uklanjanje recikliranih molekula) i u netretiranim stanica (ukupni izražaj) (slika 64b). Značajan postotak degradacije (oko 15%) nekonformiranih MHC-I molekula već nakon 10 minuta upućuje na to da se veliki dio internaliziranih nekonformiranih MHC-I molekula nalazi u kasnim endosomalnim odjeljcima.

Promjena izražaja konformiranih MHC-I molekula između kratkotrajno zakiseljenih i netretiranih stanica nije bila jednaka. Naime dok je ukupni izražaj (nezakiseljene stanice) nakon jednoga sata pao za svega 9%, izražaj nakon uklanjanja recikliranih (površinskih) molekula nakon jednoga sata pao je za 40%. Upravo ta razlika (31%) upućuje na dio molekula koje su se nakon internalizacije vratile na staničnu površinu, odnosno reciklirale, dok 9% predstavlja degradaciju internaliziranih molekula. Nakon jednoga sata degradacija konformiranih MHC-I molekula postaje značajnija (nakon 90 minuta iznosi oko 23%), a u jednakoj mjeri raste i zbroj degradiranih i recikliranih molekula što ukazuje na to da nakon jednoga sata recikliranje doseže svoj maksimum te da nema značajnijeg daljnjeg porasta udjela recikliranih molekula. Ovi rezultati upućuju na činjenicu da se konformirane MHC-I molekule nakon internalizacije u unutrašnjosti pretežito nalaze u reciklirajućim endosomalnim odjeljcima, ali njihovo retencijsko mjesto površina.

Vodeći se svime navedenim, u daljnjem proučavanju recikliranja MHC-I molekula koristili smo isključivo protokol recikliranja B jer je jednostavniji od protokola recikliranja C, a velika mu je prednost, naročito ukoliko proučavamo učinak kemijskih inhibitora na recikliranje, što analiziramo nefiksirane stanice te samim time imamo uvida i u vijabilnost stanica, odnosno možemo isključiti mrtve stanice koje bi nam mogle dati lažne rezultate (protočna citometrija). Naravno, ukoliko se radi o metodi konfokalne mikroskopije, neovisno o protokolu, uvijek analiziramo fiksirane stanice kojima ne možemo utvrditi vijabilnost.

Prema protokolu koji odgovara ispitivanoj molekuli zaključujemo da konformirane MHC-I molekule recikliraju za razliku od nekonformiranih MHC-I molekula. Ipak, učinkovitost recikliranja MHC-I molekula je manja od učinkovitosti recikliranja transferinskog receptora, odnosno transferina.

Kako bi ispitali koji su endosomalni odjeljci uključeni u proces recikliranja Tf-a i konformiranih MHC-I molekula, nakon internalizacije u čistom mediju, recikliranje navedenih molekula pratili smo u prisustvu kemijskih inhibitora, i to: LY294002 kao blokatora PI3K koja je potrebna za recikliranje molekula na nivou ranih endosoma (140), brefeldina A (BFA) koji na još nedovoljno razjašnjen način blokira recikliranje na nivou JNRC-a (140), te aluminij fluorida (AlF_4^-) koji putem blokade funkcionalnosti Arf1 i Arf6 GTPaza može blokirati recikliranje na više razina (15, 96, 100, 138, 225). Recikliranje Tf-a pratili smo prema protokolu recikliranja A, odnosno kao gubitak internaliziranog Tf-a iz stanice, a recikliranje konformiranih MHC-I molekula prema protokolu recikliranja B, odnosno kao internalizirane molekule koje se ponovno vraćaju na staničnu površinu te stoga mogu vezati fluorescentno obilježeno sekundarno protutijelo prisutno u mediju. Rezultati su prikazani na način da su normalizirani prema kontroli koju je predstavljala internalizacija u čistom mediju i recikliranje bez prisustva inhibitora u datom vremenu, odnosno ta vrijednost je uzeta kao 100%.

Nakon 20 minuta oko 80% internaliziranog Tf-a izreciklira, dok je nakon 40 minuta izrecikliralo oko 30% internaliziranih konformiranih MHC-I molekula (slike 61a i 62b). LY nije blokirao recikliranje Tf-a, a recikliranje konformiranih MHC-I molekula je blokirao za oko 20% (slika 67a). Iako je u literaturi pokazano da oko 50% Tf-a reciklira upravo preko ranih endosoma (140), nedostatak blokade recikliranja Tf-a unatoč blokadi PI3K ne treba čuditi. Naime, taj rezultat samo upućuje na činjenicu da se Tf nakon internalizacije smješta u unutarstanične odjeljke, a koji nisu EE, odnosno da tijekom internalizacije Tf vrlo brzo prođe kroz EE odjeljke, a što je u skladu s njegovim unutarstaničnim obrascem izražaja nakon internalizacije (slika 67b) i s literaturom (221, 226). Naime, internalizirani Tf se smješta pretežito jukstanuklearno, dok ga je u citoplazmatskim vezikulama koje bi odgovarale ranim endosomima vrlo malo (slika 67b). Nadalje, ukoliko recikliranje Tf-a pratimo konfokalnom mikroskopijom (slika 67b), možemo uočiti da u prisutnosti LY294002 internalizirani jukstanuklerano prisutan internalizirani Tf izreciklira, dok u stanici ostaje samo onaj dio internaliziranog Tf-a koji se nakon internalizacije izražavao vezikularno. Isto tako, budući da se konformirane MHC-I molekule nakon internalizacije izražavaju jače vezikularno od Tf-a (slika 67b), logično je da je LY294002 imao značajniji učinak na njihovo recikliranje (slika 67a). Da je mala blokada recikliranja dobivena s LY294002 uistinu posljedica toga što se internalizirane molekule, a naročito Tf, ne zadržavaju u EE odjeljcima potvrđuje i rezultat da je LY294002 blokirao recikliranje Tf-a za oko 90%, a recikliranje konformiranih MHC-I molekula za u prosjeku 70% ukoliko se i internalizacija istih odvijala u njegovoj prisutnosti

(slika 68a). Naime, internalizacija u prisutnosti LY294002 dovela je do nakupljanja internaliziranih molekula u EE odjeljcima (slika 68b) iz kojih one nisu mogle reciklirati ukoliko je LY i dalje bio prisutan u mediju. Naime, to bi značilo da je funkcija PI3K potrebna kako za recikliranje molekula iz EE odjeljaka, tako i za njihovu progresiju prema distalnijim endosomalnim odjeljcima. Zapažanje da je oko 30% internaliziranih MHC-I molekula moglo reciklirati unatoč prisutnosti LY294002 kako tijekom internalizacije, tako i tijekom recikliranja, upućuje na mogućnost da je dio molekula bio smješten u proksimalnijim odjeljcima od EE iz kojih molekule mogu reciklirati i to neovisno o PI3K, što je u skladu s prethodno dobivenim rezultatima (slika 54c, *pulse*). Nadalje, možemo uočiti da PI3K nema važnu ulogu u recikliranju molekula iz jukstanuklearnog dijela u kojem ih zarobi BFA nakon internalizacije, kao niti nishodno od njega, budući da se recikliranje obaju molekula iz tog odjeljka gotovo normalno odvijalo unatoč prisutnosti LY294002 (slike 69a i 69b). Isto tako logičan je i rezultat da je LY blokirao recikliranje Tf-a za oko 30% i konformiranih MHC-I molekula za oko 30% ukoliko se internalizacija istih odvijala u prisustvu AlF_4^- (slika 70a i 70b), koji dio internaliziranih molekula zaustavi sublazmalemalno (slika 59), budući da dio tih molekula mora proći kroz rane endosome, a u prisutnosti LY u njih dolazi ali iz njih ne može reciklirati niti dalje progredirati. Nadalje, AlF_4^- s manjom učinkovitošću blokirao je recikliranje kako Tf-a, tako i konformiranih MHC-I molekula ukoliko se internalizacija odvijala u prisustvu LY294002 u odnosu na recikliranje kada se internalizacija odvijala u mediju bez inhibitora (usp. slike 67 i 68), što upućuje na mogućnost da AlF_4^- blokira recikliranje molekula i u odjeljcima koji prethode ranim endosomima.

BFA je imao znatniji učinak na recikliranje i Tf-a i konformiranih MHC-I molekula u usporedbi s LY294002, te je recikliranje obaju molekula blokirao za oko 30% (slika 67a). Budući da bi BFA prema literaturi trebao blokirati recikliranje molekula iz JNRCa (140), ovaj rezultat bi upućivao na mogućnost da to ipak nije tako. Naime, budući da je najveći dio internaliziranog Tf-a smješten upravo jukstanuklearno (slika 67b), očekivan je jači učinak BFA na recikliranje Tf-a od onog koji je dobiven. Iako se konfokalnom mikroskopijom nakon recikliranja uočava retencija internaliziranog Tf-a u jukstanuklearnom području nakon BFA inhibicije (slika 67b), ipak je moguće da BFA ne blokira recikliranje Tf-a u potpunosti iz tog odjeljka, već da samo zaustavlja njegovu progresiju prema distalnijem dijelu jukstanuklearnog odjeljka (slika 67b). Prema tome, nije isključeno da se recikliranje molekula iz JNRCa može odvijati na najmanje dvije serijski povezane razine koje su regulirane različitim efektorskim molekulama. Na taj mogući ustroj JNRCa upućuje upravo rezultat prema kojem se recikliranje molekula iz BFA surogatnog odjeljka (odjeljak u kojem se

nakupljaju internalizirane molekule nakon BFA tretmana) i dalje odvija unatoč daljnjoj prisutnosti BFA u mediju, iako manje nego u kontroli (slika 69). Rezultat koji dodatno ide u prilog ovoj teoriji je i da AlF_4^- jače blokira recikliranje Tf-a, a naročito MHC-I molekula ukoliko se internalizacija istih odvijala u prisutnosti BFA. Naime, ukoliko se internalizacija odvijala u mediju bez inhibitora, AlF_4^- blokirao je recikliranje Tf-a za oko 60%, dok je na recikliranje konformiranih MHC-I molekula imao manji učinak i njihovo recikliranje blokirao za oko 40% (slika 67a). No, ukoliko su navedene molekule bile internalizirane u prisutnosti BFA, tada je AlF_4^- blokirao recikliranje Tf-a za oko 70%, a recikliranje konformiranih MHC-I za oko 50%, što upravo upućuje na mogućnost da AlF_4^- narušava recikliranje molekula i iz odjeljka u kojemu se nakupljaju molekule internalizirane u prisustvu BFA i nishodno od njega. Prema tome, možemo pretpostaviti da se BFA surogatni odjeljak nalazi proksimalnije od AlF_4^- surogatnog odjeljka. To još dodatno potvrđuju i rezultati prema kojima BFA vrlo slabo blokira recikliranje molekula iz AlF_4^- surogatnog odjeljka, dok je iz njega recikliranje gotovo u potpunosti onemogućeno uslijed prisutnosti AlF_4^- (slika 70).

Iz svega navedenog možemo zaključiti da je recikliranje internaliziranih konformiranih MHC-I molekula i Tf-a regulirano na nekoliko razina: pred-rani endosomi, rani endosomi, te jukstanuklearni odjeljak.

5.5. DEGRADACIJA MHC MOLEKULA I RAZREDA

Iz prijašnjih rezultata (slike 62-64) može se vidjeti da samo oko 30% internaliziranih konformiranih MHC-I molekula reciklira, dok nekonformirane MHC-I molekule nakon internalizacije ne podliježu procesu recikliranja. Vodeći se činjenicom da je konačna sudbina molekula nakon internalizacije ili recikliranje ili degradacija, željeli smo ispitati da li konformirane i nekonformirane MHC-I molekule podliježu degradaciji.

I konformirane i nekonformirane MHC-I molekule, neovisno o ispitivanom alelu, podliježu procesu degradacije, s razlikom da je kinetika degradacije nekonformiranih MHC -I molekula znatno brža od kinetike degradacije konformiranih MHC-I molekula, a ta razlika u brzini degradacije je naročito izražena u početnim vremenskim intervalima (do 4 sata). Kinetika degradacije konformiranih MHC -I molekula nije jednaka za sve alele. Konformirane HLA-B7 i HLA-G1 molekule imaju sporiju kinetiku degradacije od konformiranih HLA-Cw6, H2-L^d i MHC-I molekula na HeLa staničnoj liniji. Suprotno situaciji kod konformiranih

molekula, nekonformirane HLA-B7 molekule pokazuju najbržu kinetiku degradacije od svih ispitivanih alela nekonformiranih MHC-I molekula (slika 72).

Na ovaj rezultat bi mogla utjecati činjenica da će se oni aleli konformiranih MHC-I molekula koji pokazuju najveću nestabilnost u kiselom pH (slike 31-34), biti skloniji degradaciji, koja se odvija u kiselim endosomalnim odjeljcima. Nasuprot tome, nekonformirane MHC-I molekule pokazuju suprotan trend, moguće zbog toga što oni aleli koji ne pokazuju sklonost izražavanju u konformiranom obliku (na staničnoj površini) pokazuju veću sklonost degradaciji.

Prema gore navedenom možemo zaključiti da je brzina degradacije konformiranih MHC-I molekula obrnuto proporcionalna njihovoj stabilnosti, dok je brzina degradacije nekonformiranih MHC-I molekula upravo proporcionalna stabilnosti ispitivanog alela.

Degradacija molekula nakon internalizacije odvija se u lizosomima uslijed djelovanja lizosomalnih hidrolaza za čiju normalnu funkciju je neophodan kiseli pH (~4.5 - 5.0) kojeg smo narušili djelovanjem konkanamicina A.

KonA blokirao je degradaciju nekonformiranih MHC-I molekula (slika 73a). Budući da našim protokolom pratimo degradaciju molekula koje su u nultom vremenu bile prisutne na staničnoj površini, blokada degradacije uzrokovana konkanamicinom A mogla bi teoretski biti posljedica blokade endocitoze, kao i posljedica poremećenog endosomalnog transporta molekula uslijed narušenog endosomalnog pH gradijenta. No, budući da KonA nije imao značajnijeg učinka na internalizaciju nekonformiranih MHC-I molekula (slika 73b), te da je signal istih unutar stanice nakon internalizacije bio jači, možemo reći da je blokada degradacije posljedica onemogućenja progresije molekula u kasne endosomalne odjeljke. Tome u prilog govori i rezultat da nakon neutralizacije endosomalnih odjeljaka izostaje kolokalizacija nekonformiranih MHC-I molekula s Lamp-1 biljegom (slika 55).

KonA blokirao je i degradaciju konformiranih MHC-I molekula tijekom 2 sata, dok je nakon 4 sata inkubacije pokazao nešto slabiji učinak (slika 74a). KonA povećao je i ukupan broj konformiranih MHC-I molekula unutar stanice nakon internalizacije, dok je istovremeno usporio njihovu internalizaciju (uklanjanje molekula s površine) (slika 74b). Usporena internalizacija konformiranih MHC-I molekula u prisutnosti KonA, uz istovremeno povećan broj molekula unutar stanice, upućuje na mogućnost stimulacije recikliranja konformiranih MHC-I molekula u prisutnosti KonA. To je potom i izravno pokazano praćenjem recikliranja konformiranih MHC-I molekula u prisustvu KonA. Tako uočavamo da je KonA povećao

recikliranje internaliziranih konformiranih MHC-I molekula za 14% u periodu od 20 i 40 minuta, odnosno za 34% nakon 60 minuta praćenja recikliranja (slika 75a). Porast recikliranja konformiranih MHC-I molekula uz KonA nakon 60 minuta u odnosu na intervale od 20 i 40 minuta vjerojatno je posljedica učinka KonA na blokadu degradacije već recikliranih molekula, te je realnije njegov učinak na čisto recikliranje promatrati u periodu od 20 i 40 minuta kada još ne dolazi do degradacije recikliranih molekula. Odjeljci iz kojih KonA povećava recikliranje konformiranih MHC-I molekula su endosomalni odjeljci u kojima LY blokira endosomalno putovanje internaliziranih konformiranih MHC-I molekula (slika 75c), dok nema utjecaja na recikliranje konformiranih MHC-I molekula iz endosomalnih odjeljaka u kojima ih blokiraju BFA i AlF_4^- (slika 75c).

5.6. SMJEŠTAJ KONFORMIRANIH I NEKONFORMIRANIH MHC MOLEKULA I RAZREDA U MEMBRANSKIM MIKRODOMENAMA

Kao što je ranije navedeno (poglavlje 1.2.2.) stanična membrana se sastoji od organiziranih i neorganiziranih dijelova, a od organiziranih dijelova najbolje su upoznate klatrinske jamice i lipidne splavi (202, 203). Membranske molekule nisu nasumično raspoređene po staničnim membranama, već se nalaze u različitim membranskim mikrodomenama, kako na samoj površini tako i u njenoj unutrašnjosti. Jedan od značajnijih faktora koji bi mogao imati ulogu u usmjeravanju molekula u određenu mikrodomenu je konformacija molekule (227, 228). Lipidne splavi igraju važnu ulogu u sortiranju i prijenosu proteina, te staničnom signaliranju, a osim u izvanstaničnom sloju plazmatske membrane nalaze se također i u EE, RE, te trans-GA (147). Smještaj MHC-I molekula u lipidnim splavima ispitivan je primjenom činjenice da su splavi dobile ime prema svojstvu netopivosti u neionskim detergentima na 4 °C (DRMs- engl. *detergent resistant membranes*).

Konformirane MHC-I molekule i TfR u potpunosti se isperu s površine stanica ukoliko je stanica tretirana s Tx-100, dok nekonformirane MHC-I molekule ostaju na staničnoj površini i nakon tretmana s Tx-100 (slika 77). Iz toga možemo zaključiti da se konformirane MHC-I molekule na staničnoj površini, kao i TfR, nalaze u detergent-osjetljivim (DSMs- engl. *detergent sensitive membranes*), a nekonformirane MHC-I molekule u detergent-rezistentnim membranskim mikrodomenama. Nadalje, i u staničnoj unutrašnjosti TfR i konformirane MHC-I molekule nalaze se u DSMs, a GM_1 i nekonformirane MHC-I molekule u DRMs (slika 78).

Budući da postoje lipidne splavi kojima je glavna sastavnica kolesterol i lipidne splavi čija su glavna sastavnica sfingomijelini (229, 230), željeli smo ispitati kakav je sastav lipidnih splavi u kojima se nalaze nekonformirane MHC-I molekule, kako na površini tako i u unutrašnjosti stanice. U tu svrhu stanice smo tretirali ili s metil-β-ciklodekstrinom (MβCD) koji narušava homeostazu kolesterola ili s sfingomijelinazom (SM) koja dovodi do razgradnje sfingomijelina. Za očekivati je da će nakon tretmana s MβCD doći do ispiranja nekonformiranih MHC-I molekula ukoliko se one nalaze u lipidnim splavima čija je glavna sastavnica kolesterol, odnosno nakon tretmana s sfingomijelinazom do ispiranja nekonformiranih MHC-I molekula ukoliko se one nalaze u lipidnim splavima čija su glavna sastavnica sfingomijelini.

Nakon tretmana s MβCD Tx-100 ispire nekonformirane MHC-I molekule sa stanične površine za razliku od nekonformiranih MHC-I molekula smještenih unutar stanice koje su i nakon tretmana s MβCD rezistentne na detergent (slika 79). Nekonformirane MHC-I molekule smještene unutar stanice postale su osjetljive na detergent tek nakon što su stanice bile tretirane s sfingomijelinazom (slika 80). Iz toga možemo zaključiti da je za očuvanje integriteta lipidnih splavi u kojima se nalaze nekonformirane MHC-I molekule na staničnoj površini ključan kolesterol, dok su za lipidne splavi u kojima se nalaze nekonformirane MHC-I molekule unutar stanice ključni sfingomijelini.

Da je uistinu konformacija MHC-I molekula bitna odrednica smještaja u DRMs pokazuje i rezultat u kojem se, na staničnoj površini umjetno stvorene nekonformirane MHC-I molekule pomoću kiselog pH tretmana (slika 31), također smještaju u DRMs (slika 81).

Konformirane MHC-I molekule, za razliku od nekonformiranih MHC-I molekula nalaze se u DSMs, kako na staničnoj površini, tako i u njezinoj unutrašnjosti, a ta razlika u smještaju je upravo posljedica različite konformacije. Nekonformirane MHC-I molekule se na staničnoj površini nalaze u lipidnim splavima čiji integritet je primarno određen kolesterolom, a u staničnoj unutrašnjosti u lipidnim splavima primarno sfingomijelinskog sadržaja.

Endocitozni putovi konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula isprepliću se na razini ranih endosoma iz kojih se konformirane MHC-I molekule pretežito usmjeravaju u JNRC, dok nekonformirane MHC-I molekule odlaze u degradacijski put. Uzrok njihova različitog sortiranja mogao bi biti njihov različit smještaj u membranskim mikrodomenama. Iako endocitoza kako konformiranih, tako i nekonformiranih MHC-I molekula nije ovisna o dinaminu niti o kolesterolskom sastavu membrane, a ovisna je o Arf6 GTPazama, ne možemo biti sigurni da li na putu između stanične membrane i ranih endosoma konformirane i

nekonformirane MHC-I molekule koriste iste endosomalne prijenosnike. Slika 86 predstavlja shematski prikaz endocitoznog puta konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula

Slika 86. Endocitozni put MHC molekula I razreda i transferina

Slika 86. Endocitozni put MHC molekula I razreda i transferina.
Tf/TfR (transferin/transferinski receptor); CCV (vezikula obložena klatrinom); JNRC (jukstanuklearni reciklirajući odjeljak); KonA (konkanamicin A); BFA (brefeldin A). Zelene strelice predstavljaju stimulaciju, a crvene blokadu dijela endocitoznog puta naznačenim kemijskim inhibitorom.

5.7. DOPRINOS MATEMATIČKOG MODELIRANJA U KINETIČKIM STUDIJAMA ENDOCITOTIČKIH PROCESA MHC MOLEKULA I RAZREDA

Budući da se cijeli rad temelji na usporedbi internalizacije, odnosno endocitoze i recikliranja različitih konformacija MHC-I molekula, kinetički matematički model testirali smo na primjeru konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula. Svrha ovog

matematičkog modela endocitoze bila je opisati kinetiku putovanja molekula kroz stanicu, te izmjeriti stope procesa putovanja molekula između različitih staničnih odjeljaka. S obzirom da brzinu endocitoze ne možemo izravno mjeriti, najveći doprinos ovoga modela je upravo u mogućnosti procjene vrijednosti tog parametra.

Tijekom cijelog endocitoznog ciklusa, počevši od ulaska molekule u stanicu u trenutku t_0, odjeljci su definirani na temelju njihovog položaja na vremenskoj skali duž puta, te karakterizirani svojim svojstvima i stopama prijenosa koje su dane kao konstantne i izražene u zadanim vremenskim intervalima (najčešće u minutama). Pretpostavljeno je da proces prijenosa slijedi jednostavnu kinetiku prvoga reda, pa su stoga konstante direktno proporcionalne količini materijala dostupnog za prijenos. Ponekad se u literaturi radi jednostavnijeg izračuna neke od stopa definiraju kao brzine koje se određuju proizvoljno i ne ovise o ostalim parametrima sustava, odnosno dijelovi procesa opisuju se kao linearne funkcije (185, 188). Za razliku od toga, u našem modelu endocitoze niti jedan dio tog procesa nije opisan linearnim funkcijama, već su svi dijelovi zavisni o ostalim parametrima sustava. Primjerice, u navedenim modelima u literaturi (185, 188) stopa degradacije dana je kao apsolutni broj molekula/min koje se degradiraju, odnosno kao brzina, što bi značilo da se molekule jednakom brzinom degradiraju neovisno o vremenskom tijeku, odnosno da se degradacija odvija jednakom brzinom i onda kada molekula više nemamo u stanici niti na njenoj površini. Za razliku od toga u našem modelu degradacija traje isključivo do onog trenutka kada su sve molekule uništene, što je naravno puno realnija situacija.

Rezultati dobiveni korištenjem našega modela endocitoze pokazuju da konformirane MHC-I molekule pokazuju znatno veću sklonost recikliranju od nekonformiranih molekula čija je k_r zanemariva (slika 83, slika 84 i tablica 4). Imajući to u vidu, kao i veći k_x nekonformiranih MHC-I logičan je dobiven rezultat kojim konformirane MHC-I imaju duži poluživot, kako ukupan, tako i na staničnoj površini. Na kraju bitno je uočiti da je k_e sličan za obje konformacije, iako nešto veći za konformirane MHC-I molekule. Usporedbom s eksperimentalnim rezultatima, uočavamo da se vrijednosti dobivene ovim modelom izrazito poklapaju s eksperimentalnim mjerenjima. Naime, i naši eksperimentalni podatci također pokazuju da se degradacija nekonformiranih MHC-I molekula događa brže nego degradacija konformiranih molekula (slika 72), kao i da konformirane MHC-I molekule recikliraju, a nekonformirane ne (slika 62). Nadalje, iz matematičkog modela zaključujemo da je recikliralo ~ 250% konformiranih MHC-I molekula i taj rezultat pokazuje da se jedna molekula može reciklirati više puta (slika 83). To je u skladu s rezultatom dobivenim nakon praćenja

endosomalnog puta već recikliranih MHC-I molekula iz kojeg je vidljivo da se dio recikliranih i ponovno endocitiranih konformiranih MHC-I molekula nalazi u JNRCu ($TfR^+/Rab11^+$ odjeljku).

Razlika u kinetici internalizacije konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula je upravo u činjenici da samo konformirane MHC-I molekule značajnije podliježu procesu recikliranja.

6. ZAKLJUČCI

1. Raspodjela MHC-I molekula na staničnoj površini i u unutarstaničnim odjeljcima ovisi o njihovoj konformaciji i alelnoj stabilnosti. Stabilnije molekule više se izražavaju na staničnoj površini, a nestabilnije u unutarstaničnim odjeljcima. Konformirane MHC-I molekule nestabilnijih alela prelaze u nekonformirane oblike tijekom putovanja kroz kisele endosomalne odjeljke čime se povećava vjerojatnost da se u nekonformiranom obliku nađu i na staničnoj površini.

2. Kinetika konstitutivne internalizacije nekonformiranih MHC-I molekula je brža od kinetike konstitutivne internalizacije konformiranih MHC-I molekula što ukazuje na postojanje ili razlike u brzini (načinu) njihove endocitoze ili razlike u recikliranju.

3. Konformirane i nekonformirane MHC-I molekule se konstitutivno endocitiraju na način koji je neovisan o dinaminu i raspodjeli kolesterola unutar membrana, a ovisan o malim Rho GTPazama, najvjerojatnije o Arf6 GTPazi.
   Nasuprot tome, transferin se endocitira klatrinskom endocitozom, dok način endocitoze B podjedinice toksina kolere ovisi o ispitivanoj staničnoj liniji. Tako se B podjedinica toksina kolere na stanicama HeLa endocitira klatrinskom endocitozom, a na stanicama Balb 3T3 endocitozom koja je ovisna o raspodjeli kolesterola unutar membrana, odnosno kaveolarnom endocitozom.

4. Unutarstanična distribucija MHC molekula I razreda nakon internalizacije prvenstveno ovisi o konformaciji same molekule, a ne o ispitivanom alelu.

5. Endocitozni putovi konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula isprepliću se na razini ranih endosoma, gdje se ujedno događa njihovo sortiranje i razdvajanje koje se odvija mehanizmima ovisnim o djelovanju PI3K i kiselom endosomalnom pH.

6. Konformirane MHC-I molekule nakon internalizacije usmjeravaju se u reciklirajuće endosomalne odjeljke za razliku od nekonformiranih MHC-I molekula, no učinkovitost njihova recikliranja je manja od učinkovitosti recikliranja transferinskog receptora, odnosno transferina. B podjedinica toksina kolere se poput nekonformiranih MHC-I molekula ne usmjerava u recikliranje nakon internalizacije.

7. Recikliranje internaliziranih konformiranih MHC-I molekula i transferina odvija se na nekoliko razina u endosomalnom sustavu: prije ranih endosoma, na razini ranih endosoma, te na razini jukstanuklearnog odjeljka.

8. Brzina degradacije konformiranih MHC-I molekula sporija je od brzine degradacije nekonformiranih MHC-I molekula istoga alela. Konformirane MHC-I molekule stabilnijih alela sporije se degradiraju od konformiranih molekula nestabilnijih alela, dok je brzina degradacije nekonformiranih MHC-I molekula upravo proporcionalna stabilnosti ispitivanog alela.
9. Sortiranje konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula najvjerojatnije se temelji na njihovoj raspodjeli u različite membranske domene. Nekonformirane MHC-I molekule se za razliku od konformiranih MHC-I molekula nalaze u membranskim domenama otpornim na detergent, što upućuje da se nalaze u lipidnim splavima. Nekonformirane MHC-I molekule se na staničnoj površini nalaze u lipidnim splavima čiji integritet je primarno određen kolesterolom, a u staničnoj unutrašnjosti u lipidnim splavima primarno sfingomijelinskog sadržaja.
10. Primjenom matematičkog modeliranja utvrdili smo da razlika u kinetici internalizacije konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula nije posljedica različite brzine njihove endocitoze, već recikliranja kojem značajnije podliježu samo konformirane MHC-I molekule.

7. LITERATURA

1. Bishop NE. Dynamics of endosomal sorting. Int Rev Cytol 2003;232:1-57.
2. Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. Nat Rev Mol Cell Biol 2004;5:121-32.
3. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:603-12.
4. Dell'Angelica EC. Clathrin-binding proteins: got a motif? Join the network! Trends Cell Biol 2001;11:315-8.
5. Smart EJ, Graf GA, McNiven MA i sur. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. Mol Cell Biol 1999;19:7289-304.
6. Cavalli V, Corti M, Gruenberg J. Endocytosis and signaling cascades: a close encounter. FEBS Lett 2001;498:190-6.
7. Sweitzer SM, Hinshaw JE. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. Cell 1998;93:1021-9.
8. Magada´n JG, Barbieri MA, Mesa R, Stahl PD, Mayorga LS. Rab22a regulates the sorting of transferrin to recycling endosomes. Mol Cell Biol 2006;26:2595-614.
9. Puertollano R. Clathrin-mediated transport: assembly required. EMBO Rep 2004;5:942–6.
10. Torrisi MR, Lotti LV, Belleudi F i sur. Eps15 is recruited to the plasma membrane upon epidermal growth factor receptor activation and localizes to components of the endocytic pathway during receptor internalization. Mol Biol Cell 1999;10:417-34.
11. Abrami L, Liu S, Cosson P, Leppla SH, van der Goot FG. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. J Cell Biol 2003;160:321-8.
12. Sigismund S, Woelk T, Puri C i sur. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:2760-5.
13. Stoddart A, Dykstra ML, Brown BK, Song W, Pierce SK, Brodsky FM. Lipid rafts unite signaling cascades with clathrin to regulate BCR internalization. Immunity 2002;17:451-62.
14. Birklé S, Zeng G, Gao L, Yu RK, Aubry J. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. Biochimie 2003;85:455-63.
15. Arnaoutova I, Jackson CL, Al-Awar OS, Donaldson JG, Loh YP. Recycling of Raft-associated prohormone sorting receptor carboxypeptidase E requires interaction with ARF6. Mol Biol Cell 2003;14:4448-57.

16. Sharma P, Sabharanjak S, Mayor S. Endocytosis of lipid rafts: an identity crisis. Semin Cell Dev Biol 2002;13:205-14.
17. Madore N, Smith KL, Graham CH i sur. Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. EMBO J 1999;18:6917-26.
18. Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. Nat Cell Biol 2006;8:46-54.
19. Mayor S, Rao M. Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. Traffic 2004;5:211-2.
20. Sharma DK, Brown JC, Choudhury A i sur. Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. Mol Biol Cell 2004;15:3114-22.
21. Singh RD, Liu Y, Wheatley CL i sur. Caveolar endocytosis and microdomain association of a glycosphingolipid analog is dependent on its sphingosine stereochemistry. J Biol Chem 2006;281:30660-8.
22. Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. Dev Biol 2004;265:23-32.
23. Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. FEBS Lett 2008;582:2093-101.
24. Anderson RG, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW. Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. Science 1992;255:410-1.
25. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. Nature 2003;422:37-44.
26. Pelkmans L, Helenius A. Endocytosis via caveolae. Traffic 2002;3:311-20.
27. Matveev S, Li X, Everson W, Smart EJ. The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking. Adv Drug Deliv Rev 2001;49:237-50.
28. Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. Nat Cell Biol 2001;3:473-83.
29. Glenney JR Jr, Soppet D. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89:10517-21.
30. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. Cell 1992;68:673-82.
31. Schnitzer JE, Liu J, Oh P. Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. J Biol Chem 1995;270:14399-404.

32. Lisanti MP, Tang ZL, Sargiacomo M. Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein: implications for the biogenesis of caveolae. J Cell Biol 1993;123:595-604.
33. Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. J Cell Biol 1998;141:101-14.
34. Parton RG, Joggerst B, Simons K. Regulated internalization of caveolae. J Cell Biol 1994;127:1199-215.
35. Mayor S, Rothberg KG, Maxfield FR. Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. Science 1994;264:1948-51.
36. Carozzi AJ, Ikonen E, Lindsay MR, Parton RG. Role of cholesterol in developing T-tubules: analogous mechanisms for T-tubule and caveolae biogenesis. Traffic 2000;1:326-41.
37. Williams TM, Lisanti MP. The caveolin proteins. Genome Biol 2004;5:214.
38. Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. Pharmacol Rev 2002; 54:431-467.
39. Pfeffer SR. Caveolae on the move. Nat Cell Biol 2001;3:108-10.
40. Sandvig K, van Deurs B. Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. FEBS Lett 2002;529:49-53.
41. Torgersen ML, Skretting G, van Deurs B, Sandvig K. Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. J Cell Sci 2001;114:3737-47.
42. Murphy C, Saffrich R, Grummt M i sur. Endosome dynamics regulated by a Rho protein. Nature 1996;384:427-32.
43. Robertson D, Paterson HF, Adamson P, Hall A, Monaghan P. Ultrastructural localization of ras-related proteins using epitope-tagged plasmids. J Histochem Cytochem 1995;43:471-80.
44. Lamaze C, Chuang TH, Terlecky LJ, Bokoch GM, Schmid SL. Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. Nature 1996;382:177-9.
45. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. Nature 2002;420:629-35.
46. Lamaze C, Fujimoto LM, Yin HL, Schmid SL. The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. J Biol Chem 1997;272:20332-5.

47. Schmalzing G, Richter HP, Hansen A, Schwarz W, Just I, Aktories K. Involvement of the GTP binding protein Rho in constitutive endocytosis in Xenopus laevis oocytes. J Cell Biol 1995;130:1319-32.
48. Aktories K. Rho proteins: targets for bacterial toxins. Trends Microbiol 1997;5:282-8.
49. Lamaze C, Dujeancourt A, Baba T, Lo CG, Benmerah A, Dautry-Varsat A. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. Mol Cell 2001;7:661-71.
50. Kippert A, Trajkovic K, Rajendran L, Ries J, Simons M. Rho regulates membrane transport in the endocytic pathway to control plasma membrane specialization in oligodendroglial cells. J Neurosci 2007;27:3560-70.
51. Chadda R, Howes MT, Plowman SJ, Hancock JF, Parton RG, Mayor S. Cholesterol-sensitive Cdc42 activation regulates actin polymerization for endocytosis via the GEEC pathway. Traffic 2007;8:702-17.
52. Nevins AK, Thurmond DC. Caveolin-1 functions as a novel Cdc42 guanine nucleotide dissociation inhibitor in pancreatic beta-cells. J Biol Chem 2006;281:18961-72.
53. Izumi G, Sakisaka T, Baba T, Tanaka S, Morimoto K, Takai Y. Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments. J Cell Biol 2004;166:237-48.
54. Gauthier NC, Monzo P, Kaddai V, Doye A, Ricci V, Boquet P. Helicobacter pylori VacA cytotoxin: a probe for a clathrin-independent and Cdc42-dependent pinocytic pathway routed to late endosomes. Mol Biol Cell 2005;16:4852-66.
55. Llorente A, Rapak A, Schmid SL, van Deurs B, Sandvig K. Expression of mutant dynamin inhibits toxicity and transport of endocytosed ricin to the Golgi apparatus. J Cell Biol 1998;140:553-63.
56. D'Souza-Schorey C, Chavrier P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:347-58.
57. Naslavsky N, Weigert R, Donaldson JG. Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. Mol Biol Cell 2004;15:3542-52.
58. Donaldson JG. Arfs, phosphoinositides and membrane traffic. Biochem Soc Trans 2005;33:1276-8.
59. Kalia M, Kumari S, Chadda R, Hill MM, Parton RG, Mayor S. Arf6-independent GPI-anchored protein-enriched early endosomal compartments fuse with sorting endosomes

via a Rab5/phosphatidylinositol-3'-kinase-dependent machinery. Mol Biol Cell 2006;17:3689-704.

60. Hansen SH, Sandvig K, van Deurs B. Molecules internalized by clathrin-independent endocytosis are delivered to endosomes containing transferrin receptors. J Cell Biol 1993;123:89-97.
61. Inal J, Miot S, Schifferli JA. The complement inhibitor, CRIT, undergoes clathrin-dependent endocytosis. Exp Cell Res 2005;310:54-65.
62. Tulapurkar ME, Schäfer R, Hanck T i sur. Endocytosis mechanism of P2Y2 nucleotide receptor tagged with green fluorescent protein: clathrin and actin cytoskeleton dependence. Cell Mol Life Sci 2005;62:1388-99.
63. Yao D, Ehrlich M, Henis YI, Leof EB. Transforming growth factor-beta receptors interact with AP2 by direct binding to beta2 subunit. Mol Biol Cell 2002;13:4001-12.
64. Page E, Winterfield J, Goings G, Bastawrous A, Upshaw-Earley J. Water channel proteins in rat cardiac myocyte caveolae: osmolarity-dependent reversible internalization. Am J Physiol 1998;274:1988-2000.
65. Bustamante M, Roger F, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Martin PY, Feraille E. Regulatory volume increase is associated with p38 kinase-dependent actin cytoskeleton remodeling in rat kidney MTAL. Am J Physiol Renal Physiol 2003;285:336-47.
66. Liu J, Kesiry R, Periyasamy SM, Malhotra D, Xie Z, Shapiro JI. Ouabain induces endocytosis of plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 cells by a clathrin-dependent mechanism. Kidney Int 2004;66:227-41.
67. Idkowiak-Baldys J, Becker KP, Kitatani K, Hannun YA. Dynamic sequestration of the recycling compartment by classical protein kinase C. J Biol Chem 2006;281:22321-31.
68. Rajasekaran SA, Palmer LG, Quan K i sur. Na,K-ATPase beta-subunit is required for epithelial polarization, suppression of invasion, and cell motility. Mol Biol Cell 2001;12:279-95.
69. Eker P, Holm PK, van Deurs B, Sandvig K. Selective regulation of apical endocytosis in polarized Madin-Darby canine kidney cells by mastoparan and cAMP. J Biol Chem 1994;269:18607-15.
70. Suzuki KG, Fujiwara TK, Edidin M, Kusumi A. Dynamic recruitment of phospholipase C gamma at transiently immobilized GPI-anchored receptor clusters induces IP3-Ca2+ signaling: single-molecule tracking study 2. J Cell Biol 2007;177:731-42.

71. Walenga RW, Opas EE, Feinstein MB. Differential effects of calmodulin antagonists on phospholipases A2 and C in thrombin-stimulated platelets. J Biol Chem 1981;256:12523-8.
72. Traub LM. Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection. J Cell Biol 2003;163:203-8.
73. Wang J, Liu XJ. A G protein-coupled receptor kinase induces Xenopus oocyte maturation. J Biol Chem 2003;278:15809-14.
74. Sturrock A, Alexander J, Lamb J, Craven CM, Kaplan J. Characterization of a transferrin-independent uptake system for iron in HeLa cells. J Biol Chem 1990;265:3139-45.
75. Frost SC, Lane MD. Evidence for the involvement of vicinal sulfhydryl groups in insulin-activated hexose transport by 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem 1985;260:2646-52.
76. Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. Dev Cell 2006;10:839-50.
77. Thompson HM, McNiven MA. Discovery of a new 'dynasore'. Nat Chem Biol 2006;2:355-6.
78. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2005;45:89-118.
79. Sidaway JE, Davidson RG, McTaggart F i sur. Inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase reduce receptor-mediated endocytosis in opossum kidney cells. J Am Soc Nephrol 2004;15:2258-65.
80. Cordle A, Koenigsknecht-Talboo J, Wilkinson B, Limpert A, Landreth G. Mechanisms of statin-mediated inhibition of small G-protein function. J Biol Chem 2005;280:34202-9.
81. Kilsdonk EP, Yancey PG, Stoudt GW i sur. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. J Biol Chem 1995;270:17250-6.
82. Shigematsu S, Watson RT, Khan AH, Pessin JE. The adipocyte plasma membrane caveolin functional/structural organization is necessary for the efficient endocytosis of GLUT4. J Biol Chem 2003;278:10683-90.
83. Kanzaki M, Pessin JE. Caveolin-associated filamentous actin (Cav-actin) defines a novel F-actin structure in adipocytes. J Biol Chem 2002;277:25867-9.
84. Ros-Baro A, Lopez-Iglesias C, Peiro S i sur. Lipid rafts are required for GLUT4 internalization in adipose cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:12050-5.

85. Smart EJ, Anderson RG. Alterations in membrane cholesterol that affect structure and function of caveolae. Methods Enzymol 2002;353:131-9.
86. Harder T, Kellner R, Parton RG, Gruenberg J. Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. Mol Biol Cell 1997;8:533-45.
87. Peterson JR, Mitchison TJ. Small molecules, big impact: a history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. Chem Biol 2002;9:1275-85.
88. Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:404-14.
89. Merrifield CJ. Seeing is believing: imaging actin dynamics at single sites of endocytosis. Trends Cell Biol 2004;14:352-8.
90. Amyere M, Payrastre B, Krause U, Van Der Smissen P, Veithen A, Courtoy PJ. Constitutive macropinocytosis in oncogene-transformed fibroblasts depends on sequential permanent activation of phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C. Mol Biol Cell 2000;11:3453-67.
91. Jess TJ, Belham CM, Thomson FJ, Scott PH, Plevin RJ, Gould GW. Phosphatidylinositol 3'-kinase, but not p70 ribosomal S6 kinase, is involved in membrane protein recycling: wortmannin inhibits glucose transport and downregulates cell-surface transferrin receptor numbers independently of any effect on fluid-phase endocytosis in fibroblasts. Cell Signal 1996;8:297-304.
92. Ciesla WP Jr, Bobak DA. Clostridium difficile toxins A and B are cation-dependent UDP-glucose hydrolases with differing catalytic activities. J Biol Chem 1998;273:16021-6.
93. Aktories K. Bacterial toxins that target Rho proteins. J Clin Invest 1997;99:827-9.
94. Pelish HE, Peterson JR, Salvarezza SB i sur. Secramine inhibits Cdc42-dependent functions in cells and Cdc42 activation in vitro. Nat Chem Biol 2006;2:39-46.
95. Xu B, Pelish H, Kirchhausen T, Hammond GB. Large scale synthesis of the Cdc42 inhibitor secramine A and its inhibition of cell spreading. Org Biomol Chem 2006;4:4149-57.
96. Radhakrishna H, Klausner RD, Donaldson JG. Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase. J Cell Biol 1996;134:935-47.
97. Bussey H. Cell shape determination: a pivotal role for Rho. Science 1996;272:224-5.

98. Jovanovic OA, Brown FD, Donaldson JG. An effector domain mutant of Arf6 implicates phospholipase D in endosomal membrane recycling. Mol Biol Cell 2006;17:327-35.
99. Jackson TR, Brown FD, Nie Z, i sur. ACAPs are arf6 GTPase-activating proteins that function in the cell periphery. J Cell Biol 2000;151:627-38.
100. Klein S, Franco M, Chardin P, Luton F. AlFx affects the formation of focal complexes by stabilizing the Arf-GAP ASAP1 in a complex with Arf1. FEBS Lett 2005;579:5741-5.
101. Gruenberg J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. Nat Rev Mol Cell Biol 2001;2:721-30.
102. Rzomp KA, Scholtes LD, Briggs BJ, Whittaker GR, Scidmore MA. Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner. Infect Immun 2003;71:5855-70.
103. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. Nat Rev Mol Cell Biol 2001;2:107-17.
104. Vanlandingham PA, Ceresa BP. Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. J Biol Chem 2009;284:12110-24.
105. Kauppi M, Simonsen A, Bremnes B i sur. The small GTPase Rab22 interacts with EEA1 and controls endosomal membrane trafficking. J Cell Sci 2002;115:899-911.
106. Simpson JC, Griffiths G, Wessling-Resnick M, Fransen JA, Bennett H, Jones AT. A role for the small GTPase Rab21 in the early endocytic pathway. J Cell Sci 2004;117:6297-311.
107. Traub LM. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. Nat Rev Mol Cell Biol 2009;10:583-96.
108. Kirkham M, Fujita A, Chadda R i sur. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. J Cell Biol 2005;168:465-76.
109. Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR. Endocytosis. Physiol Rev 1997;77:759-803.
110. Sabharanjak S, Sharma P, Parton RG, Mayor S. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. Dev Cell 2002;2:411-23.
111. Lindmo K, Stenmark H. Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. J Cell Sci 2006;119:605-14.
112. Miaczynska M, Zerial M. Mosaic organization of the endocytic pathway. Exp Cell Res 2002;272:8-14.

113. van Dam EM, Robinson PJ. Ral: mediator of membrane trafficking. Int J Biochem Cell Biol 2006;38:1841-7.

114. Petiot A, Faure J, Stenmark H, Gruenberg J. PI3P signaling regulates receptor sorting but not transport in the endosomal pathway. J Cell Biol 2003;162:971-9.

115. Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD, Zerial M. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. Nature 1999;397:621-5.

116. McBride HM, Rybin V, Murphy C, Giner A, Teasdale R, Zerial M. Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. Cell 1999;98:377-86.

117. Gruenberg J, Stenmark H. The biogenesis of multivesicular endosomes. Nat Rev Mol Cell Biol 2004;5:317-23.

118. Mukherjee S, Soe TT, Maxfield FR. Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails. J Cell Biol 1999;144:1271-84.

119. Sönnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. J Cell Biol 2000;149:901-14.

120. Sharma DK, Choudhury A, Singh RD, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE. Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling. J Biol Chem 2003;278:7564-72.

121. Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. J Cell Sci 2000;113:3365-74.

122. Aniento F, Emans N, Griffiths G, Gruenberg J. Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. J Cell Biol 1993;123:1373-87.

123. van der Goot FG, Gruenberg J. Intra-endosomal membrane traffic. Trends Cell Biol 2006;16:514-21.

124. Piper RC, Luzio JP. Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. Traffic 2001;2:612-21.

125. Lebrand C, Corti M, Goodson H i sur. Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. EMBO J 2002;21:1289-300.

126. Mullins C, Bonifacino JS. The molecular machinery for lysosome biogenesis. Bioessays 2001;23:333-43.

127. Luzio JP, Poupon V, Lindsay MR, Mullock BM, Piper RC, Pryor PR. Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. Mol Membr Biol 2003;20:141-54.

128. Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. Lysosomes: fusion and function. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:622-32.

129. Storrie B, Desjardins M. The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? Bioessays 1996;18:895-903.

130. Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. J Cell Sci 2000;113:1515-24.

131. Bright NA, Gratian MJ, Luzio JP. Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells. Curr Biol 2005;15:360-5.

132. Nichols BJ, Kenworthy AK, Polishchuk RS i sur. Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. J Cell Biol 2001;153:529-41.

133. Pelkmans L, Püntener D, Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. Science 2002;296 :535-9.

134. Blagojevic G, Mahmutefendic H, Kucic N, Lucin P. Endocytic trafficking of Cholera Toxin in Balb 3T3 Cells. Croat Chem Acta 2008;81:191-202.

135. Nichols BJ. A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. Nat Cell Biol 2002;4:374-8.

136. Kumari S, Mayor S. ARF1 is directly involved in dynamin-independent endocytosis. Nat Cell Biol 2008;10:30-41.

137. Lundmark R, Doherty GJ, Howes MT i sur. The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway. Curr Biol 2008;18:1802-8.

138. Naslavsky N, Weigert R, Donaldson JG. Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. Mol Biol Cell 2003;14:417-31.

139. McCaffrey MW, Bielli A, Cantalupo G i sur. Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. FEBS Lett 2001;495:21-30.

140. van Dam EM, Broeke T, Jansen K, Spijkers P, Stoorvogel W. Endocytosed transferrin receptors recycle via distinct dynamin and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. J Biol Chem 2002;277:48876-83.

141. Weigert R, Yeung AC, Li J, Donaldson JG. Rab22a regulates the recycling of membrane proteins internalized independently of clathrin. Mol Biol Cell 2004;15:3758-70.

142. Barral DC, Cavallari M, McCormick PJ i sur. CD1a and MHC Class I Follow a Similar Endocytic Recycling Pathway. Traffic 2008;9:1446-57.

143. Tran D, Carpentier JL, Sawano F, Gorden P, Orci L. Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:7957-61.

144. Pfeffer S. Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. Cell 2003;112:507-17.

145. London E. How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. Biochim Biophys Acta 2005;1746:203-20.

146. Wiśniewska A, Draus J, Subczynski WK. Is a fluid-mosaic model of biological membranes fully relevant? Studies on lipid organization in model and biological membranes. Cell Mol Biol Lett 2003;8:147-59.

147. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol 2000;1 :31-9

148. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. Nature 1997;387:569-72.

149. Sedwick CE, Altman A. Ordered just so: lipid rafts and lymphocyte function. Sci STKE 2002;2002:RE2.

150. Zhang W, Trible RP, Samelson LE. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. Immunity 1998;9:239-46.

151. Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. Cell 1992;68:533-44.

152. Grommé M, Uytdehaag FG, Janssen H i sur. Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:10326-31.

153. Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. Annu Rev Immunol 1998;16:323-58

154. Nathenson SG, Uehara H, Ewenstein BM, Kindt TJ, Coligan JE. Primary structural: analysis of the transplantation antigens of the murine H-2 major histocompatibility complex. Annu Rev Biochem 1981;50:1025-52.

155. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature 1987;329:506-12

156. Grommé M, Neefjes J. Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. Mol Immunol 2002;39:181-202.

157. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the cell. New York, Grand Science:2002,1400.

158. Vassilakos A, Cohen-Doyle MF, Peterson PA, Jackson MR, Williams DB. The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. EMBO J 1996;15:1495-506

159. Grandea AG 3rd, Van Kaer L. Tapasin: an ER chaperone that controls MHC class I assembly with peptide. Trends Immunol 2001;22:194-9.

160. van Endert PM. Genes regulating MHC class I processing of antigen. Curr Opin Immunol 1999;11:82-8.

161. Harris MR, Yu YY, Kindle CS, Hansen TH, Solheim JC. Calreticulin and calnexin interact with different protein and glycan determinants during the assembly of MHC class I. J Immunol 1998;160:5404-9.

162. Peh CA, Laham N, Burrows SR, Zhu Y, McCluskey J. Distinct functions of tapasin revealed by polymorphism in MHC class I peptide loading. J Immunol 2000;164:292-9.

163. Yewdell JW, Reits E, Neefjes J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. Nat Rev Immunol 2003;3:952-61.

164. Madden DR. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. Annu Rev Immunol 1995;13:587-622.

165. Peppelenbosch MP, DeSmedt M, Pynaert G, van Deventer SJ, Grooten J. Macrophages present pinocytosed exogenous antigen via MHC class I whereas antigen ingested by receptor-mediated endocytosis is presented via MHC class II. J Immunol 2000;165:1984-91.

166. Liu T, Zhou X, Orvell C, Lederer E, Ljunggren HG, Jondal M. Heat-inactivated Sendai virus can enter multiple MHC class I processing pathways and generate cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. J Immunol. 1995 Apr 1;154(7):3147-55.

167. Norbury CC, Hewlett LJ, Prescott AR, Shastri N, Watts C. Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. Immunity 1995;3:783-91.

168. Reis e Sousa C, Germain RN. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous protein antigens by a subset of cells engaged in phagocytosis. J Exp Med 1995;182:841-51.
169. Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. Nature 1993;361:359-62.
170. Song R, Harding CV. Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. J Immunol 1996;156:4182-90.
171. Dasgupta JD, Watkins S, Slayter H, Yunis EJ. Receptor-like nature of class I HLA: endocytosis via coated pits. J Immunol 1988;141:2577-80.
172. Cook JR, Myers NB, Hansen TH. The mechanisms of peptide exchange and beta 2-microglobulin exchange on cell surface Ld and Kb molecules are noncooperative. J Immunol 1996;157:2256-61.
173. Hörig H, Young AC, Papadopoulos NJ, DiLorenzo TP, Nathenson SG. Binding of longer peptides to the H-2Kb heterodimer is restricted to peptides extended at their C terminus: refinement of the inherent MHC class I peptide binding criteria. J Immunol 1999;163:4434-41.
174. Allen RL, O'Callaghan CA, McMichael AJ, Bowness P. Cutting edge: HLA-B27 can form a novel beta 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. J Immunol 1999;162:5045-8.
175. Malik P, Klimovitsky P, Deng LW, Boyson JE, Strominger JL. Uniquely conformed peptide-containing beta 2-microglobulin-free heavy chains of HLA-B2705 on the cell surface. J Immunol 2002;169:4379-87.
176. Dangoria NS, DeLay ML, Kingsbury DJ i sur. HLA-B27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum. J Biol Chem 2002;277:23459-68.
177. Pickl WF, Majdic O, Kohl P i sur. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. J Immunol 1996;157:3850-9.
178. Bodnár A, Bacsó Z, Jenei A i sur. Class I HLA oligomerization at the surface of B cells is controlled by exogenous beta(2)-microglobulin: implications in activation of cytotoxic T lymphocytes. Int Immunol 2003;15:331-9.

179. Reid PA, Watts C. Cycling of cell-surface MHC glycoproteins through primaquine-sensitive intracellular compartments. Nature 1990;346:655-7.

180. Chiu I, Davis DM, Strominger JL. Trafficking of spontaneously endocytosed MHC proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:13944-9.

181. Capps GG, Van Kampen M, Ward CL, Zúñiga MC. Endocytosis of the class I major histocompatibility antigen via a phorbol myristate acetate-inducible pathway is a cell-specific phenomenon and requires the cytoplasmic domain. J Cell Biol 1989;108:1317-29

182. Mahmutefendic H, Blagojevic G, Kucic N, Lucin P. Constitutive internalization of murine MHC class I molecules. J Cell Physiol 2007;210:445-55.

183. Machy P, Truneh A, Gennaro D, Hoffstein S. Major histocompatibility complex class I molecules internalized via coated pits in T lymphocytes. Nature 1987;328:724-6.

184. Huet C, Ash JF, Singer SJ. The antibody-induced clustering and endocytosis of HLA antigens on cultured human fibroblasts. Cell 1980;21:429-38.

185. Koenig JA, Edwardson JM. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. Trends Pharmacol Sci 1997;18:276-87.

186. Waters CM, Oberg KC, Carpenter G, Overholser KA. Rate constants for binding, dissociation, and internalization of EGF: effect of receptor occupancy and ligand concentration. Biochemistry 1990;29:3563-9.

187. Starbuck C, Lauffenburger DA. Mathematical model for the effects of epidermal growth factor receptor trafficking dynamics on fibroblast proliferation responses. Biotechnol Prog 1992;8:132-43.

188. Zigmond SH, Sullivan SJ, Lauffenburger DA. Kinetic analysis of chemotactic peptide receptor modulation. J Cell Biol 1982;92:34-43

189. Tran TM, Ivanyi P, Hilgert I i sur. The epitope recognized by pan-HLA class I-reactive monoclonal antibody W6/32 and its relationship to unusual stability of the HLA-B27/beta2-microglobulin complex. Immunogenetics 2001;53:440-6.

190. Antalíková J, Simon M, Horovská L, Valentovicová J. Monoclonal antibody produced against bovine MHC class I antigens. Folia Biol (Praha) 2004;50:29-31.

191. Boyson JE, Erskine R, Whitman MC i sur. Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:16180-5.

192. Frumento G, Franchello S, Palmisano GL i sur. Melanomas and melanoma cell lines do not express HLA-G, and the expression cannot be induced by gammaIFN treatment. Tissue Antigens 2000;56:30-7.

193. Lie WR, Myers NB, Connolly JM, Gorka J, Lee DR, Hansen TH. The specific binding of peptide ligand to Ld class I major histocompatibility complex molecules determines their antigenic structure. J Exp Med 1991;173:449-59

194. Benham AM, Grommé M, Neefjes J. Allelic differences in the relationship between proteasome activity and MHC class I peptide loading. J Immunol 1998;161:83-9.

195. Johnson DR, Mook-Kanamori B. Dependence of elevated human leukocyte antigen class I molecule expression on increased heavy chain, light chain (beta 2-microglobulin), transporter associated with antigen processing, tapasin, and peptide. Biol Chem 2000;275:16643-9.

196. Mallet V, Pröll J, Solier C i sur. The full length HLA-G1 and no other alternative form of HLA-G is expressed at the cell surface of transfected cells. Hum Immunol 2000;61:212-24.

197. Bensussan A, Mansur IG, Mallet V i sur. Detection of membrane-bound HLA-G translated products with a specific monoclonal antibody. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:10292-6.

198. Balendiran GK, Solheim JC, Young AC, Hansen TH, Nathenson SG, Sacchettini JC. The three-dimensional structure of an H-2Ld-peptide complex explains the unique interaction of Ld with beta-2 microglobulin and peptide. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:6880-5.

199. Coscoy L, Ganem D. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:8051-6.

200. Weber M, Blair E, Simpson CV i sur. The chemokine receptor D6 constitutively traffics to and from the cell surface to internalize and degrade chemokines. Mol Biol Cell 2004;15:2492-508.

201. Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de Moerloose P, Parton RG, Gruenberg J. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. Nature 1998;392:193-7.

202. Smith CJ, Grigorieff N, Pearse BM. Clathrin coats at 21 A resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors. EMBO J 1998;17:4943-53.

203. Anderson RG, Jacobson K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. Science 2002;296:1821-5.

204. Dunbar PR, Ogg GS. Oligomeric MHC molecules and their homologues: state of the art. J Immunol Methods 2002;268:3-7.

205. Espmark JA, Ahlqvist-Roth L, Särne L, Persson A. Tissue typing of cells in culture. III. HLA antigens of established human cell lines. Attempts at typing by the mixed hemadsorption technique. Tissue Antigens 1978;11:279-86.

206. Tiwari N, Garbi N, Reinheckel T, Moldenhauer G, Hämmerling GJ, Momburg F. A transporter associated with antigen-processing independent vacuolar pathway for the MHC class I-mediated presentation of endogenous transmembrane proteins. J Immunol 2007;178:7932-42.

207. Davis DM, Reyburn HT, Pazmany L, Chiu I, Mandelboim O, Strominger JL. Impaired spontaneous endocytosis of HLA-G. Eur J Immunol 1997;27:2714-9.

208. Prieto-Sánchez RM, Berenjeno IM, Bustelo XR. Involvement of the Rho/Rac family member RhoG in caveolar endocytosis. Oncogene 2006;25:2961-73.

209. Fujinaga Y, Wolf AA, Rodighiero C i sur. Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to endoplasmic reticulm. Mol Biol Cell 2003;14:4783-93.

210. Shogomori H, Futerman AH. Cholesterol depletion by methyl-beta-cyclodextrin blocks cholera toxin transport from endosomes to the Golgi apparatus in hippocampal neurons. J Neurochem 2001;78:991-9.

211. Harris J, Werling D, Hope JC, Taylor G, Howard CJ. Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions. Trends Immunol 2002;23:158-64.

212. Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP. Role of caveolae and caveolins in health and disease. Physiol Rev 2004;84(4):1341-79.

213. Paleotti O, Macia E, Luton F i sur. The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. J Biol Chem 2005;280:21661-6.

214. Tanabe K, Torii T, Natsume W, Braesch-Andersen S, Watanabe T, Satake M. A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates clathrin-dependent endocytosis. Mol Biol Cell 2005;16:1617-28.

215. Antonny B. Membrane deformation by protein coats. Curr Opin Cell Biol 2006;18:386-94.

216. Grant BD, Donaldson JG. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. Nat Rev Mol Cell Biol 2009;10:597-608.

217. Chen J, Wang J, Meyers KR, Enns CA. Transferrin-directed internalization and cycling of transferrin receptor 2. Traffic 2009;10:1488-501.

218. Lencer WI, Saslowsky D. Raft trafficking of AB5 subunit bacterial toxins. Biochim Biophys Acta 2005;1746:314-21.

219. Saraste J, Goud B. Functional symmetry of endomembranes. Mol Biol Cell 2007;18:1430-6.

220. Davies BA, Lee JR, Oestreich AJ, Katzmann DJ. Membrane protein targeting to the MVB/lysosome. Chem Rev 2009;109:1575-86.

221. Lam SK, Tse YC, Robinson DG, Jiang L. Tracking down the elusive early endosome. Trends Plant Sci 2007;12:497-505.

222. Baumgartner M, Chaussepied M, Raposo G, Goud B, Langsley G. Accelerated recycling of transferrin receptor in Theileria-transformed B cells. Cell Microbiol 2005;7:637-44.

223. Barysch SV, Aggarwal S, Jahn R, Rizzoli SO. Sorting in early endosomes reveals connections to docking- and fusion-associated factors. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:9697-702.

224. Sobota JA, Bäck N, Eipper BA, Mains RE. Inhibitors of the V0 subunit of the vacuolar H+-ATPase prevent segregation of lysosomal- and secretory-pathway proteins. J Cell Sci 2009;122:3542-53.

225. Klein S, Franco M, Chardin P, Luton F. Role of the Arf6 GDP/GTP cycle and Arf6 GTPase-activating proteins in actin remodeling and intracellular transport. J Biol Chem 2006;281:12352-61.

226. Sheff D, Pelletier L, O'Connell CB, Warren G, Mellman I. Transferrin receptor recycling in the absence of perinuclear recycling endosomes. J Cell Biol 2002;156:797-804.

227. Sharma M, Pampinella F, Nemes C i sur. Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. J Cell Biol 2004;164:923-33.

228. Kiachopoulos S, Heske J, Tatzelt J, Winklhofer KF. Misfolding of the prion protein at the plasma membrane induces endocytosis, intracellular retention and degradation. Traffic 2004;5:426-36.

229. Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A, Simons K. Resistance of cell membranes to different detergents. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:5795-800.

230. Abi-Rizk G, Besson F. Interactions of Triton X-100 with sphingomyelin and phosphatidylcholine monolayers: influence of the cholesterol content. Colloids Surf B Biointerfaces 2008;66:163-7.

POPIS SKRAĆENICA

Stanični odjeljci

EE – rani endosomi (engl. *early endosomes*)

ER – endoplazmatska mrežica (engl. endoplasmatic reticulum)

ERC – endosomalni reciklirajući odjeljak (engl. *endosomal recycling compartment*)

GA – Golgijev aparat (engl. Golgi apparatus)

GEEC – endosomalni odjeljak u kojem se nakupljaju GPI-sidreni proteini (engl. *GPI-AP early enriched endosomal compartment*)

LE – kasni endosomi (engl. *late endosomes*)

MTOC – organizirajući centar mikrotubula (engl. *microtubule organizing center*)

MVB – multivezikulatna tjelešca (engl. *multivesicular bodies*)

PM – plazmatska membrana

SE – sortirajući endosomi (engl. *sorting endosomes*)

TGN – *trans* – Golgijev aparat (trans-Golgi apparatus)

Površinsk i glikoproteini i ostale (makro)molekule

APC – antigen predočna stanica (engl. *antigen presenting cell*)

CtxB – kolera toksin, podjedinica B (engl. cholera toxin B subunit)

GPI-AP – glikozil fosfatidil inozitol-sidreni proteini (engl. *glycosylphosphatydil inositol-anchored proteins*)

IFN – interferon

IL-2R – interleukin-2 receptor

LacCer – laktozil ceramid

LBPA – lizobisfosfatidna kiselina (engl. *lysobisphosphatydic acid*)

LDL – lipoprotein male gustoće (engl. low density lipoprotein)

MHC – molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*)

MPR - receptor manoza 6 fosfata (engl. *mannosa -6- phosphate receptor*)

PIK (PIP) – fosfatidil inozitol kinaza (fosfatidil inozitol fosfat (engl. *phosphatydil-inositol phosphate*)

SL – sfingolipid

TAP – prijenosnik povezan s antigenskim predočavanjem(engl. *transporter associated with antigen processing*)

TCR (BCR) – T (B) stanični receptor (engl. *T (B) cell receptor*)

Tf(R) – transferin(ski receptor) (engl. transferrin (*receptor*))

β_2-m - β_2-mikroglobulin

Inhibitori endocitoze i vezikularnog transporta

D - Dynasore

CHX – Cikloheksimid (Cycloheximide)

Kon A – Konkanamicin A (Concanamycin A)

CP - Klorpromazin (Chlorpromazin)

Cyt D – Citohalazin D (Cytochalasin D)

F - Filipin

Lat A – Latrunculin A (Latrunculin A)

Mon - Monenzin (Monensin)

Noc - Nokodazol (Nocodasol)

Membranske mikrodomene

DRM – membrane otporne na detergente (engl. *detergent resistant membrains*)

DSM – membrane topivive u detergentima (engl. *detergent soluble membrains*)

L_d - tekuća neuređena (neorganizirana) domena (engl. *liquid disordered domain*)

L_o – tekuća uređena (organizirana) domena (engl. *liquid ordered domain*)

Ostale kratice

EM – elektronska mikroskopija

mPt – monoklonsko protutijelo (engl. *monoclonal antibody*)

TM – transmembranski

ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME

Gordana Blagojević

DATUM I MJESTO ROĐENJA

01. listopada, 1977. godine, Rijeka

ZAPOSLENJE

Od 01.ožujka 2003. do 01.ožujka 2004. pripravnički staž u KBC-u Rijeka

Od 01.ožujka 2003. zaposlena na Zavodu za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Sveučilišta u Rijeci

ŠKOLOVANJE

1984. - 1992. Osnovna škola u Rijeci

1992. - 1996. Gimnazija «Andrija Mohorovičić» u Rijeci

1996. - 2002. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, smjer: opća medicina

2002. - 2004. Poslijediplomski znanstveni studij "Biomedicina" na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci

AKADEMSKI STUPNJEVI

25. listopada 2002. doktor medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

ZNANSTVENI STUPNJEVI

Od 01. ožujka 2003. znanstveni novak u istraživačkom zvanju asistent na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci - projekt br. 0062030 pod naslovom "Endocitoza površinskih glikoproteina, virusa i intracelularne bakterije", glavni istraživač prof. dr. sc. Pero Lučin; te od 01. siječnja 2007. projekt br. 062-0620238-0223 pod nazivom "Sortiranje MHC molekula I razreda na staničnoj membrani i endocitoznim odjeljcima", glavni istraživač prof. dr. sc. Pero Lučin

STRUČNO USAVRŠAVANJE:

Od 01.ožujka 2003. do 01.ožujka 2004. pripravnički staž u KBC-u Rijeka

A. ZNANSTVENA DJELATNOST

1. Znanstveni radovi:

1.1. Izvorni znanstveni radovi objavljeni u časopisima citiranim u tercijarnim publikacijama (znanstveni radovi u CC časopisima)

1. Mahmutefendić H, Blagojević G, Kučić N, Lučin P. Constitutive internalization of murine MHC class I molecules. J Cell Physiol 2007;210:445-455.
2. Blagojević G, Mahmutefendić H, Kučić N, Ilić Tomaš M, Lučin P. Endocytic trafficking of cholera toxin in Balb 3T3 cells. Croat Chem Acta 2008;88:191-202.

2. Znanstveni projekti

2.1. Aktivno sudjelovanje u realizaciji znanstvenih projekata

2.1.1. Znanstveni projekt prof. dr. sc. Pere Lučina br. 0062030 pod nazivom "Endocitoza površinskih glikoproteina, virusa i intracelularne bakterije" (prijavljen 2002. godine za financiranje od strane Ministarstva znanosti i tehnologije Republike Hrvatske).

2.1.2. Znanstveni projekt prof. dr. sc. Pere Lučina br. 062-0620238-0223 pod nazivom «Sortiranje MHC molekula I razreda na staničnoj membrani i endocitoznim odjeljcima» (od 01. siječnja 2007. godine)

2.1.3. Suradnik na međunarodnom projektu Embryo implantation control (EMBIC) funded by European Commission under the Framework 6, Contract No 512040 (LSHM-CT-2004-512040) od 01. listopada 2004.

3. Sažetci u zbornicima skupova

3.1. Sažetci u CC časopisima

1. Blagojević, Gordana; Mahmutefendić, Hana, Le Bouteiller, Philippe; Kučić, Natalia; Ilić Tomaš, Maja; Lučin, Pero. Internalization and intracellular localization of HLA molecules. *American Journal of Reproductive Immunology*/ Kenneth Beaman; Daniel Rukavina (ur.). Oxford: Blackwell Munksgaard, 2007. 433-434, Usmeno izlaganje.

2. Ilić Tomaš, Maja; Kučić; Natalia; Mahmutefendić, Hana; Blagojević, Gordana; Lučin, Pero. Murine cytomegalovirus clear MHC class I molecules from the cell surface of infected cell and retrieve them in the juxtanuclear pre-late endosomal compartment. *American Journal of Reproductive Immunology* / Kenneth Beaman, Daniel Rukavina (ur.). Oxford : Blackwell Munksgaard, 2007. 430-430, poster.

3. Mahmutefendić, Hana; Blagojević, Gordana; Kučić, Natalia; Ilić Tomaš, Maja; Lučin Pero. Fully conformed MHC class I molecules and empty Ld molecules follow different routes in the endocytic pathway. *American Journal of Reproductive Immunology* / Kenneth Beaman, Daniel Rukavina (ur.). Oxford : Blackwell Munksgaard, 2007. 432-432, poster.

3.2. Sažetci u zbornicima skupova (kongresna priopćenja)

4. Mahmutefendić, Hana; Kučić, Natalia; Blagojević, Gordana; Lučin, Pero. Spontaneous endocytosis of MHC class I molecules on P815 cells and murine embrional fibroblasts. *Abstract book FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference*. Dubrovnik-Cavtat, Croatia, May 21-27, 2004, p115, P186.

5. Blagojević, Gordana; Mahmutefendić, Hana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. The effect of inhibitors of endocytosis and vesicular transport on internalization of cholera toxin. *Abstract book FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference*. Dubrovnik-Cavtat, Croatia, May 21-27, 2004, p115, P176.

6. Blagojević, Gordana; Mahmutefendić, Hana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. Comparison of MHC class I molecules and Cholera toxin B subunit endocytic pathway(s). *The First EMBIC Summer School - Abstract book*, Malinska, Croatia, June 4-10, 2006, Abstract book, p 61.

7. Mahmutefendić, Hana; Blagojević, Gordana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. Nonconformed Ld molecules are sorted into lipid rafts for endocytosis. *The First EMBIC Summer School - Abstract book*, Malinska, Croatia, June 4-10, 2006, Abstract book, p 60.

8. Mahmutefendić, Hana; Blagojević, Gordana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. Nonconformed and misfolded MHC-I molecules are sorted into lipid rafts. *Abstract book* FEBS Special Meeting Cellular Signallinig, Dubrovnik, Croatia, May 26 - June 1, 2006, P180, p 240.

9. Blagojević, Gordana; Mahmutefendić, Hana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. Cholera toxin uses different trafficking pathways in Balb3T3 and HeLa cells. *Abstract book* FEBS

Special Meeting Cellular Signallinig, Dubrovnik, Croatia, May 26 - June 1, 2006, P174, p 234.

10. Kučić, Natalia; Mahmutefendić, Hana; Blagojević, Gordana; Lučin, Pero. Down-modulation of MHC-I molecules by MCMV virus to evade immune recognition. *Abstract book* FEBS Special Meeting Cellular Signallinig, Dubrovnik, Croatia, May 26 - June 1, 2006, P178, p 238.

11. Mahmutefendić, Hana; Blagojević, Gordana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. L^d molecules change their conformation in acid endosomal vesicles. *Abstract book-Second EMBIC summer school*, Pecs, Hungary , July 1^{st} -14^{th}, 2006, Oralna prezentacija, SP12, p 30.

12. Blagojević, Gordana; Mahmutefendić, Hana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. Endocytosis of HLA-G1 molecules in non-polarised cell line (J26). *Second EMBIC summer school - Abstract book*, Pecs, Hungary, July 1^{st} -14^{th}, 2006, Oralna prezentacija, SP9, p 28.

13. Mahmutefendić, Hana; Blagojević, Gordana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. MHC Class I molecules are recycled after their internalization, but their pathways are conformation dependent. 1^{st} Joint Meeting of European National Societies of Immunology and 16^{th} European Congress of Immunology, Paris, France, September 6-9, 2006, Abstract book, PA-2160.

14. Blagojević, Gordana; Mahmutefendić, Hana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. Intersection of endocytic pathway(s) of MHC Class I molecules and Cholera toxin B subunit. 1^{st} Joint Meeting of European National Societies of Immunology and 16^{th} European Congress of Immunology, Paris, France, September 6-9, 2006, Abstract book, PA-2159.

15. Kučić, Natalia; Mahmutefendić, Hana; Blagojević, Gordana; Lučin, Pero. "MCMV strategy to evade immune recognition is to down-modulate the expression of MHC-I molecules" 1^{st} Joint Meeting of European National Societies of Immunology and 16^{th} European Congress of Immunology, Paris, France, September 6-9, 2006 (Abstract book, PA-2039)

16. Blagojević, Gordana; Mahmutefendić, Hana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. Human and murine MHC Class I molecules change their conformation in acid endosomal compartments. 3^{rd} EMBIC Summer School, 3^{rd}-7^{th} September 2007 (Poster presentation, Abstract book, P16 p 39)

17. Mahmutefendić, Hana; Blagojević, Gordana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. Human and murine MHC Class I molecules change their conformation in acid endosomal compartments. 3rd EMBIC Summer School, 3rd-7th September 2007, Poster presentation, Abstract book, P16 p 39.

18. Mahmutefendić, Hana; Blagojević, Gordana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. Endosomal pathway of full and empty L^d molecules on nonpolarized P815 cell line. *Annual meeting 2003, Croatian Immunological Society*, Brijuni, October 17-19, 2003, Abstract book, oral presentation 6, P28, p 17.

19. Blagojević, Gordana; Mahmutefendić, Hana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. Endocytotic pathway of cholera toxin. *Annual meeting 2003, Croatian Immunological Society*, Brijuni, October 17-19, 2003, Abstract book, P3, p 31.

20. Mahmutefendić, Hana; Blagojević, Gordana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. Comparison of spontaneous and induced endocytosis of MHC class I molecules on P815 cells and murine embrional fibroblasts. *Annual meeting 2004, Croatian Immunological Society*, Opatija, October 08-10, 2004, Abstract book, poster presentation, P16, p 50.

21. Blagojević, Gordana; Mahmutefendić, Hana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. Intracellular trafficking of cholera toxin. *Annual meeting 2004, Croatian Immunological Society*, Opatija, October 08-10, 2004, Abstract book, poster presentation, P 14, p 48.

22. P. Lučin, H. Mahmutefendić, N. Kučić, and G. Blagojević. Sorting of nonconformed and misfolded MHC Class I molecules into lipid rafts. *Annual meeting 2004, Croatian Immunological Society*, Opatija, October 08-10, 2004, Abstract book, Invited lecture, p 21.

23. Mahmutefendić, Hana; Blagojević, Gordana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. Conformed and nonconformed MHC class I molecules are internalized by different mechanisms, but reach the same endocytotic compartments. *Annual meeting 2005., Croatian Immunological Society, Božava,* 29.09. - 02.10.2005., Abstract book, P54, p 81.

24. Blagojević, Gordana; Mahmutefendić, Hana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. Cholera toxin uses multiple trafficking pathways from plasma membrane to Golgi. *Annual meeting 2005., Croatian Immunological Society, Božava*, 29.09. - 02.10.2005., Abstract book, P53, p 80.

25. Mahmutefendić, Hana; Blagojević, Gordana; Kučić, Natalia; Lučin, Pero. Endocytic pathway of MHC class I molecules is conformation dependent. *Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology., Vodice, Croatia,* October 3-7, 2006., Abstract book, OP3, P38, p 69.

26. P. Lučin, H. Mahmutefendić, G. Blagojević, N. Kučić. Endocytosis and intracellular trafficking of MHC class I molecules. *Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology., Vodice, Croatia,* October 3-7, 2006.; Abstract book, L8, p 45.

27. Mahmutefendić, Hana; Blagojević, Gordana; Kučić, Natalia; Ilić Tomaš, Maja; Lučin, Pero. Conformation based protein sorting: partitioning of empty and full MHC class I molecules in the endosomal compartments. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, October 19-21, 2007., Rovinj, Croatia.

28. Ilić Tomaš, Maja; Kučić, Natalia; Mahmutefendić, Hana; Blagojević, Gordana; Lučin, Pero. Intracellular localization of MHC class I molecules in murine cytomegalovirus-infected cells, Annual Meeting of Croatian Immunological Society, October 19.- 21.2007., Rovinj-Crveni Otok, poster, Abstract book, p 59

29. Blagojević, Gordana; Mahmutefendić, Hana; Kučić, Natalia; Ilić Tomaš, Maja; Lučin, Pero. Characterization of HLA-CW6 endocytic pathway. Annual Meeting of Croatian Immunological Society, October 19.-21.2007., Rovinj-Crveni Otok, poster, Abstract book, p 54

30. Ilić Tomaš, Maja; Kučić, Natalia; Mahmutefendić, Hana; Blagojević, Gordana; Lučin, Pero. Murine cytomegalovirus arrests cell surface MHC class I molecules in the pre-late endosomal compartment during early stage of infection. Annual Meeting of Croatian Immunological Society, October 09.-12.2008., Šibenik, Croatia, Abstract book, P31, p 53.

3.3 . Znanstvene nagrade / priznanja

1. Nagrada za najbolju poster prezentaciju pod naslovom: "Endosomal pathway of full and empty L^d molecules on nonpolarized P815 cell line" (H. Mahmutefendić, N. Kučić, G. Blagojević, P. Lučin) na godišnjoj skupšini Hrvatskog imunološkog društva "*Annual meeting 2003, Croatian Immunological Society"*, October 17-19, 2003. Brijuni, Croatia.

2. Nagrada za najbolju poster prezentaciju pod naslovom: "Intracellular trafficking of cholera toxin" (G. Blagojević, H. Mahmutefendić, N. Kučić, P. Lučin "*Annual*

meeting 2004, Croatian Immunological Society", October 08-10, 2004. Opatija, Croatia.

3. Nagrada za najbolju poster prezentaciju pod naslovom: "Murine cytomegalovirus clear MHC class I molecules from the cell surface of infected cell and retrieve them in the juxtanuclear pre-late endosomal compartment" (M Ilic Tomas, N Kucic, H Mahmutefendic, G Blagojevic, P Lucin) na svjetskom kongresu reproduktivne imunologije "X. International Congress of Reproductive Immunology", June 10.-14.2007. Opatija, Croatia.

3.4. Sudjelovanje u organizaciji međunarodnih skupova i svjetskog kongresa

1. Član lokalnog organizacijskog odbora za organizaciju kongresa reproduktivne imunologije "*X. International Congress of Reproductive Immunology"* koji se održavao od 10.-14. srpnja 2007., Opatija, Hrvatska.

3.5 Pohađanje tečajeva, ljetnih škola i znanstvenih radionica

1. FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference. Dubrovnik-Cavtat, Croatia, May 21-27, 2004.
2. The first EMBIC Summer School, Malinska, Croatia, June, 04-10, 2005.
3. FEBS Special Meeting Cellular Signallinig, Dubrovnik, Croatia, May 26 - June 1, 2006.
4. The second EMBIC Summer School, Pecs, Hungary 01 -14, July , 2006.
5. The third EMBIC Summer School, Jenna, Germany, September, 03-07, 2007.

B. NASTAVNA DJELATNOST

1. Dodiplomska nastava

Od ožujka 2003. godine aktivno sudjelujem u nastavi i izvođenju seminara i vježbi iz predmeta Fiziologija, Imunologija, Neurofiziologija i Patofiziologija za studente sveučilišnih studija Opće medicine i Stomatologije, te predmeta Fiziologija s patofiziologijom za Studij diplomiranih sanitarnih inženjera na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Također sudjelujem u izvođenju nastave za stručne studije: Studiju fizioterapije, Studiju za medicinsko - laboratorijske inženjere, Studiju za inženjere medicinske radiologije i Studiju sestrinstva iz kolegija Fiziologija s patofiziologijom, Fiziologija, Patofiziologija i Imunologija. Od

akademske godine 2006./07. aktivno sudjelujem u mentorskom sustavu nastave, predviđenom "Bolonjskim procesom ".

C. STRUČNA DJELATNOST

Od ožujka 2003. godine sudjelujem u stručnom radu Zavoda, koji se provodi u suradnji s Kliničkim bolničkim centrom Rijeka u obliku stručnih usluga, konzultacija iz područja dijagnostike imunoloških bolesti.

D. ČLANSTVA

1. Članstva u stručnim i znanstvenim udruženjima:

1. Od 2003. godine član sam Hrvatskog imunološkog društva
2. Od 2003. godine član sam Hrvatskog društva fiziologa
3. Od 2004. godine član sam MENSA-e
4. Od 2004. godine član sam Sindikata znanosti i visokog obrazovanja