Endocitozni put MHC molekula I. razreda u stanicama inficiranim mišjim citomegalovirusom

Ilić Tomaš, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2011

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:188:931788

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

MAJA ILIĆ TOMAŠ

ENDOCITOZNI PUT MHC MOLEKULA I. RAZREDA U STANICAMA INFICIRANIM MIŠJIM CITOMEGALOVIRUSOM

Doktorska disertacija

Rijeka, 2011.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Pero Lučin

Doktorska disertacija obranjena je dana 11. veljače 2011. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Stipan Jonjić
2. Doc. dr. sc. Alenka Gagro
3. Prof. dr. sc. Maja Abram
4. Prof. dr. sc. Pero Lučin

Rad ima 188 listova, 79 slika i 5 tablica.

UDK klasifikacija _____

Rad je u cijelosti izrađen na Zavodu za fiziologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Istraživanja su dio znanstvenog projekta br. 062-0620238-0223 pod nazivom "Sortiranje MHC molekula I razreda na staničnoj membrani i endocitoznim odjeljcima" kojeg od 01. siječnja 2007. godine financira Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, glavni istraživač prof. dr. sc. Pero Lučin.

Zahvale

*Veliko hvala **prof. dr. sc. Peri Lučinu,** mojem mentoru, na ukazanom povjerenju, strpljenju i prenesenom znanju kroz sve godine mojeg znanstvenog rada i razvoja.*

*Zahvaljujem se **Natalii** na pruženom znanju i savjetima.*

*Veliko hvala **Hani** na dobronamjernim primjedbama i sugestijama usmjerenim na podizanju znanstvene razine rada.*

*Veliko hvala **Gogi i Hrvoju** na našim razgovorima koji su bili najljepša strana ovoga rada.*

*Veliko hvala **gđi. Jeleni Đirlić** na velikoj pomoći prilikom rada u laboratoriju.*

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

*Neizrecivo hvala **mojim roditeljima** na bezuvjetnoj ljubavi i podršci tijekom cijelog života i povjerenju koje imaju u mene.*

*Na kraju, neizrecivo hvala **suprugu Kristijanu** na njegovoj bezgraničnoj potpori, razumijevanju i ljubavi.*

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Prvenstveni cilj ovoga rada bila je uspostava modela za praćenje putovanja MHC molekula I. razreda, ali i ostalih površinskih molekula, u neinficiranim stanicama i u stanicama inficiranim MCMV divljim-tipom ili različitim mutantama virusa MCMV kojima nedostaje/ju geni čija je funkcija u literaturi opiasana. Poznato je da se MHC-I molekule puno brže uklanjaju sa površine inficirane stanice nego sa površine neinficirane stanice, upravo je stoga mjerena kinetika uklanjanja površinskih MHC-I molekula. Također su istražena načela ulaska MHC-I molekula u put recikliranja te njihov ulazak u degradacijski put, odnosno u kasne endosome.

Materijal i metode: U pokusima smo koristili staničnu liniju mišjih embrionalnih fibroblasta (MEF-a). U istraživanjima smo koristili neinficirane i inficirane stanice te određivali možebitne razlike. Slijedeće rekombinante virusa MCMV su korištene: Δm138-MCMV (ΔMC95.15) s delecijom *fcr1* (m138) gena , Δie1-MCMV s delecijom egzona 4 *ie1* gena, Δie2-MCMV s delecijom *ie2* (m128) gena, Δie3-MCMV s delecijom *ie3* gena, Δm4m6m152-MCMV s delecijom tri poznata imunoinvaziva koji utječu na sazrijevanje MHC-I molekula te MCMV divlji-tip, koji je kao i gotovo sve MCMV-delecijske mutante proizvedene i umnažan na kulturi MEF porijeklom iz BALB/c miševa. Δie3-MCMV uzgajan je na komplementarnoj NIH3T3 BAM25 staničnoj liniji. U svrhu praćenja MHC-I molekula koristili smo monoklonska protutijela (mPt): MA-215 za konformirane K^d i 34-5-8S za konformirane D^d. Transferinski receptor (TfR) smo pratili pomoću mPt R17, a molekule GM_1 pomoću obilježene podjedinice B kolera toksina. Kako bismo utvrdili koji su putovi uključeni u ulazak molekula u stanicu, endosomalno putovanje, recikliranje i degradaciju, koristili smo različite kemijske inhibitore. Kinetiku internalizacije pratili smo protočnom citometrijom, a unutarstanično putovanje konfokalnom mikroskopijom koristeći princip površinskog vezivanja odgovarajućeg mPt i njegovog praćenja nakon određene kinetike internalizacije. Internalizirane molekule kolokalizirali smo međusobno, te s određenim endosomalnim markerima. Recikliranje molekula pratili smo pomoću dva različita protokola metodom protočne citometrije i konfokalne mikroskopije. U cilju identifikacije sudbine površinskih proteina, koristili smo metode površinske biotinilacije, imunoprecipitacije, elektroforeze na poliakrilamidnim gelovima (SDS-PAGE), Western-blota i kemiluminiscencije.

Rezultati: Obrazac izražaja MHC-I molekula kako na površini tako i u unutrašnjosti stanice mijenja se u uvjetima MCMV-infekcije. MHC-I molekule nishodno se reguliraju s površine inficirane stanice procesom koji nije isključivo za njih specifičan, potom se nakupljaju u

hibridnom odjeljku koji je pozitivan na mnogobrojne biljege unutarstaničnih endosomalnih putova ili odjeljaka (EEA-1^+, TfR, GM130). MHC-I molekule internaliziraju se brže u inficiranim nego u neinficiranim stanicama putem koji je neovisan o dinaminu. Niti jedan od ispitivanih kemijskih inhibitora endocitoze (klorpromazin, imipramin, filipin i AlF_4^-) nije značajnije blokirao internalizaciju MHC-I molekula. Nishodna regulacija MHC-I molekula s površine inficirane stanice je proces 5-6 puta brži od konstitutivne internalizacije te je najvjerojatnije induciran virusnim proteinima. MCMV usmjerava MHC-I molekule nakon internalizacije sa površine stanice, u odjeljak u kojem ih i nakuplja. Internalizirane MHC-I molekule nalaze se u mjehurićima koji ne mogu otpustiti EEA-1 odnosno rane endosomalne membrane, što bi bio jedan od razloga njihovog odgođenog ulaska u endolizosomalni put u proces degradacije. Iz odjeljka koji se formira u MCMV-inficiranim stanicama u kojem se nakupljaju mnogobrojne internalizirane molekule moguće je recikliranje, ali je kapacitet recikliranja smanjen. Retencijski odjeljak sadrži većinom membrane ranih endosoma s obzirom da samo mali dio molekula može reciklirati pri 16 °C i uz prisustvo LY294002, što su karakteristike jukstanuklearnog reciklirajućeg odjeljka. Najvjerojatniji uzrok promjene recikliranja u MCMV-inficiranim stanicama je smanjenje ukupne količine Rab11 molekule te smanjenje mogućnosti stvaranja reciklirajućh membranskih domena. Ulazak u put degradacije za mnoge je molekule odgođen u MCMV-inficiranim stanicama neovisno o njihovu putu ulaska u stanicu te je otežano formiranje endolizosomalnih mebrana. U MCMV-inficiranim stanicama dolazi do promjena u izražavanju pojedinih molekula Rab. Razina Rab5 u inficiranim stanicama ne smanjuje se poput ostalih molekula Rab, te dolazi do otežane pretvorbe Rab5 u Rab7, kao i do smanjenja razine Rab7 u inficiranim stanicama, što za posljedicu ima odgođeno odvođenje molekula u put degradacije. Za nishodnu regulaciju MHC-I molekula s površine inficirane stanice odgovoran je ili ie3 gen ili oni geni koji su pod kontrolom ie3 gena. m06/gp48 protein odgovoran je za usmjeravanje kako novo-sintetiziranih tako i internaliziranih MHC-I molekula u proces degradacije.

Zaključak: Endosomalno remodeliranje je mehanizam evoluirao u svrhu MCMV morfogeneze u inficiranih stanica, jer ne utječe samo na MHC-I molekule, nego i na druge endocitirane molekule koje koriste različite endosomalne putove. Ovo remodeliranje se nadopunjuje blokiranjem izlaza MHC-I molekula iz sekretnog puta što dovodi do ubrzanog gubitka MHC-I molekula s površine stanice u ranim razdobljima infekcije.

Ključne riječi: Endocitoza; MEF stanična linija, MHC molekule I. razreda; Mišji citomegalovirus.

SUMMARY

Objectives: The aim of this study was to establish experimental model that will enable us to follow constitutive internalization of MHC class I. molecules and other cell surface expressed molecules in uninfected or in the cell infected with either MCMV wild-type or with different MCMV deletion mutant. It is well known that MHC-I molecules are downregulated with higher rate from infected cell than from uninfected cell, so we measured the kinetics of MHC-I molecules downregulation. Additionally, we investigated the principles of MHC-I molecules endocytosis, their recycling pathway and also MHC-I molecules entrance in degradation pathway respectively, in late endosomes.

Material and methods: Experiments were performed on murine embrional fibroblasts (MEFs). In our experiment we used uninfected and cell infected with numerous MCMV: Δm138-MCMV (ΔMC95.15) with the deletion of the *fcr1* (m138) gene, Δie1-MCMV with the deletion of exon 4 *ie1* gene, Δie2-MCMV with the deletion of the *ie2* (m128) gene, Δie3-MCMV with the deletion of the *ie3* gene, Δm4m6m152-MCMV with deletion of three well known immunoevasins that affect MHC-I molecules maturation. The MCMV wild-type and MCMV deletion mutants were propagated on BALB/c MEFs. The Δie3-MCMV was grown on the complementing cell line NIH3T3 BAM25. In order to follow MHC-I molecules, we have used a monoclonal antibodies (mAbs): MA-215 for conformed K^d molecules and 34-5-8S for conformed D^d molecules. Transferrin receptor (TfR) was followed by mAb R17, and GM_1 molecules with labeled cholera toxin B subunits. In order to determine which pathways are involved in endocytosis, endosomal trafficking, recycling and degradation of these molecules, we used different chemical inhibitors of endocytosis. 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 two 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.

Results: The pattern of MHC-I molecules expression on the cell surface and intracellular was changing during the infection. MHC-I molecules were downregulated from the surface of infected cell with process that is not specific for them since the other cell surface expressed molecules have also been downregulated. After their downregulation MHC-I molecules were

accumulated in hybrid compartment which is positive on various markers of endosomal pathways and compartments (EEA-1^+, TfR, GM130). Kinetics of MHC-I molecules internalization were significantly faster in infected cells than in uninfected cells following the pathway that is dynamin independent. Neither of the tested chemical inhibitors (chlorpromazine, imipramin, filipin and AlF_4^-) did not block internalization of MHC-I molecules. Downregulation of cell surface expressed MHC-I molecules is process that is 5-6 times faster than constitutive internalization and it is probably induced with viral proteins. MCMV directs after internalization from the cell surface MHC-I molecules in the retention compartment. Internalized MHC-I^+ vesicles are unable to release EEA-1 respectively early endosomal membrane what could clarify their delayed entry into endolysosomal route in the process of degradation. In MCMV-infected cells many of the internalized molecules have been accumulated in the retention compartment from which recycling was possible although the capacity of the recycling was reduced. Retention compartment contains most of the membrane of early endosomes since only small amount of the molecules was capable to recycle on 16 °C even in the presence of LY294002, which are the characteristics juxtanuclear recycling compartment. The most likely cause of changes in the recycling of MCMV-infected cells was reduction of the total amount of Rab11 molecules that decreased the possibility of creating recycling membrane domains. Degradation pathway has been affected in MCMV-infected cells for numerous molecules regardless to their pathway of entry into the cell. Besides the amount of the Rab11 molecules in MCV-infected cells the level of other Rab molecules was altered. The level of Rab5 in infected cells didn't decrease like other Rab molecules, leading to the difficult conversion of Rab5 to Rab7, as well as a reduction in the level of Rab7 in infected cells, resulting in a delayed removal of molecules in the degradation pathway. The function that rapidly down-regulate cell surface MHC-I is either related to the effect of ie3 protein or viral early function that are under ie3 regulation. m06/gp48 protein redirects both newly synthesized and internalized MHC-I molecules in the process of degradation.

Conclusion: Endosomal remodeling is a mechanism evolved for the purpose of MCMV morphogenesis in infected cell since it does not affect only MHC-I molecules, but also all endocytosed cargo that uses sorting endosomal route. This remodeling, however, supplements the block of MHC-I export from the secretory pathway leading to the accelerated loss of MHC-I from the cell surface in the early phase of infection.

Key words: Endocytosis; MEF cell line; MHC class I. molecules; Mouse cytomegalovirus.

SADRŽAJ

1. UVOD (PRIKAZ PODRUČJA) 1
1.1. Endocitoza 1
1.1.1. Fagocitoza 2
1.1.2. Makropinocitoza 2
1.1.3. Mikropinocitoza 3
1.1.3.1. Klatrin-ovisna endocitoza 3
1.1.3.2. Klatrin-neovisna endocitoza 4
1.1.3.2.1. Endocitoza neovisna o klatrinu, a ovisna o dinaminu 4
1.1.3.2.1.1. Kaveolarna endocitoza 4
1.1.3.2.1.2. Endocitoza ovisna o RhoA GTPazi 5
1.1.3.2.2. Endocitoza neovisna o klatrinu i neovisna o dinaminu 6
1.1.3.2.2.1. Endocitoza regulirana Cdc42 GTPazom 6
1.1.3.2.2.2. Endocitoza regulirana Arf6 GTPazom 7
1.1.3.3. Masovna (bulk) endocitoza 8
1.1.4. Inhibitori endocitoze 9
1.2. Vezikularni transport 10
1.2.1. Endosomalni odjeljci 10
1.2.1.1. Molekule Rab 10
1.2.1.1.1. Lokalizacija i funkcija molekula Rab 12
1.2.1.2. Sortirajući endosomi 14
1.2.1.3. Recikliranje endocitiranih molekula 16
1.2.1.4. Uloga trans-Golgi mreže 19
1.2.1.5. Kasni endosomi, lizosomi i degradacija 20
1.2.2. Inhibitori vezikularnog transporta 27
1.2.3. Membranske mikrodomene 27
1.2.3.1. Lipidne splavi 28
1.3. MHC molekule I. razreda 29
1.3.1. Građa MHC molekula I. razreda 29
1.3.2. Sinteza MHC molekula I. razreda 30
1.3.2.1. Klasičan put sinteze MHC molekula I. razreda 30

1.3.2.2. Alternativni put aktivacije MHC molekula I. razreda 32
1.3.2.2.1. Put ovisan o TAP kompleksu.....33
1.3.2.2.2. Put neovisan o TAP kompleksu.....33
1.3.2.2.3. TAP inhibitori 35
1.3.3. Konformacije MHC molekula I. razreda.....35
1.3.3.1. Konformirane MHC molekule I. razreda.....35
1.3.3.2. Nekonformirane MHC molekule I. razreda.....36
1.3.4. Konstitutivna endocitoza MHC molekula I. razreda 37
1.4. Virusi.....37
1.4.1. Mišji citomegalovirus 38
1.4.1.1. Struktura mišjeg citomegalovirusa 38
1.4.1.2. Izražavanje gena mišjeg citomegalovirusa 40
1.4.1.3. Uplitanje mišjeg citomegalovirusa u imunološki odgovor 42
1.4.2. Učinak različitih virusa na izraženost MHC molekula I. razreda.....43
1.4.2.1. Učinak Papilloma virusa na izraženost MHC molekula I. razreda.....43
1.4.2.2. Učinak Coxsackievirusa na izraženost MHC molekula I. razreda.....43
1.4.2.3. Učinak virusa humane imunodeficijencije na izraženost MHC molekula I. razreda 44
1.4.2.4. Učinak Herpes simplex virusa na izraženost MHC molekula I. razreda 44
1.4.2.5. Učinak humanog citomegalovirusa na izraženost MHC molekula I. razreda 44
1.4.2.6. Učinak mišjeg citomegalovirusa na izraženost MHC molekula I. razreda 46
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....49
3. MATERIJAL I METODE.....50
3.1. Laboratorijske životinje.....50
3.2. Materijal 50
3.2.1. Kemikalije.....50
3.2.2. Mediji i puferi 52
3.2.3. Laboratorijsko posuđe.....53
3.2.4. Monoklonska i poliklonska protutijela 54
3.2.4.1. Protutijela koja prepoznaju određene konformacije MHC molekula I. razreda 54

3.2.4.2. Protutijela koja prepoznaju određene virusne proteine.....55
3.2.4.3. Biljezi endocitoznih putova 55
3.2.4.4. Biljezi endocitoznih odjeljaka.....56
3.2.4.5. Sekundarna poliklonska protutijela.....56
3.2.5. Stanične linije.....56
3.3. Metode.....57
3.3.1. Priprema monoklonskih protutijela.....57
3.3.1.1. Održavanje hibridoma.....57
3.3.1.2. Priprema monoklonskih protutijela iz supernatanata kulture 57
3.3.1.3. Proizvodnja ascitesa.....57
3.3.2. Priprema mišjeg embrionalnog fibroblasta (MEF) 57
3.3.3. Uzgoj staničnih linija 58
3.3.3.1. Uzgoj adherentnih stanica.....58
3.3.3.2. Uzgoj neadherentnih stanica 58
3.3.4. Mišji citomagalovirus 58
3.3.4.1. Proizvodnja i umnažanje virusa 58
3.3.4.2. Određivanje titra virusa (test virusnih plakova).....59
3.3.4.3. Inficiranje stanica MCMV virusom 59
3.3.5. Ispitivanje izražaja MHC molekula I. razreda na staničnoj površini i u unutrašnjosti stanice u neinficiranim i inficiranim uvjetima metodom indirektne imunofluorescencije.....60
3.3.5.1. Određivanje površinskog izražaja MHC molekula I. razreda protočnom citometrijom.....60
3.3.5.2. Ispitivanje površinskog izražaja MHC molekula I. razreda konfokalnom mikroskopijom.....61
3.3.6. Utvrđivanje obrasca izražaja MHC molekula I. razreda i njihova kolokalizacija s biljezima endosomalnih odjeljaka.....61
3.3.7. Praćenje endocitoze i endocitoznog puta ispitivanih molekula 62
3.3.7.1. Protočna citometrija 62
3.*3.7.1.1. Praćenje spontane internalizacije uslijed djelovanja cikloheksimida* 62
3.*3.7.1.2. Praćenje spontane internalizacije nakon površinskog vezivanja monoklonskog protutijela ili liganda* 62
3.3.7.2. Konfokalna mikroskopija.....63

3.*3.7.2.1. Praćenje kontinuirane internalizacije* 63
3.*3.7.2.2. Praćenje pulse-chase internalizacije* 63
3.3.8. Imunoprecipitacija (praćenje degradacije molekula) 63
3.3.8.1. Biotinilacija površinskih proteina 63
3.3.8.2. Imunoprecipitacija monoklonskim protutijelima 64
3.3.8.3. Gel-elektroforeza 64
3.3.8.4. Elektroblot proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu 64
3.3.8.5. Kemiluminiscencija 64
3.3.9. Praćenje recikliranja molekula 64
3.3.9.1. Protokol recikliranja A 64
3.3.9.2. Protokol recikliranja B 65
4. REZULTATI 66
4.1. Izražaj i lokalizacija različitih površinskih molekula 66
4.1.1. Izražaj MHC molekula I. razreda na staničnoj površini 66
4.1.2. Unutarstanični izražaj i lokalizacija MHC molekula I. razreda 68
4.1.2.1. Obrazac unutarstanične raspodjele MHC molekula I. razreda 68
4.1.2.2. Međusobna kolokalizacija MHC molekula I. razreda u MCMV-inficiranim stanicama 69
4.1.2.3. Kolokalizacija MHC molekula I. razreda sa biljezima endosomalnih putova 69
4.1.2.4. Kolokalizacija MHC molekula I. razreda sa biljezima endosomalnih odjeljaka 71
4.1.2.5. Kolokalizacija MHC molekula I. razreda sa biljezima endosomalnih odjeljaka nakon tretiranja stanica sa nokodazolom 73
4.1.3. Površinski izražaj različitih staničnih molekula u uvjetima infekcije 74
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 nekih kontrolnih molekula 78

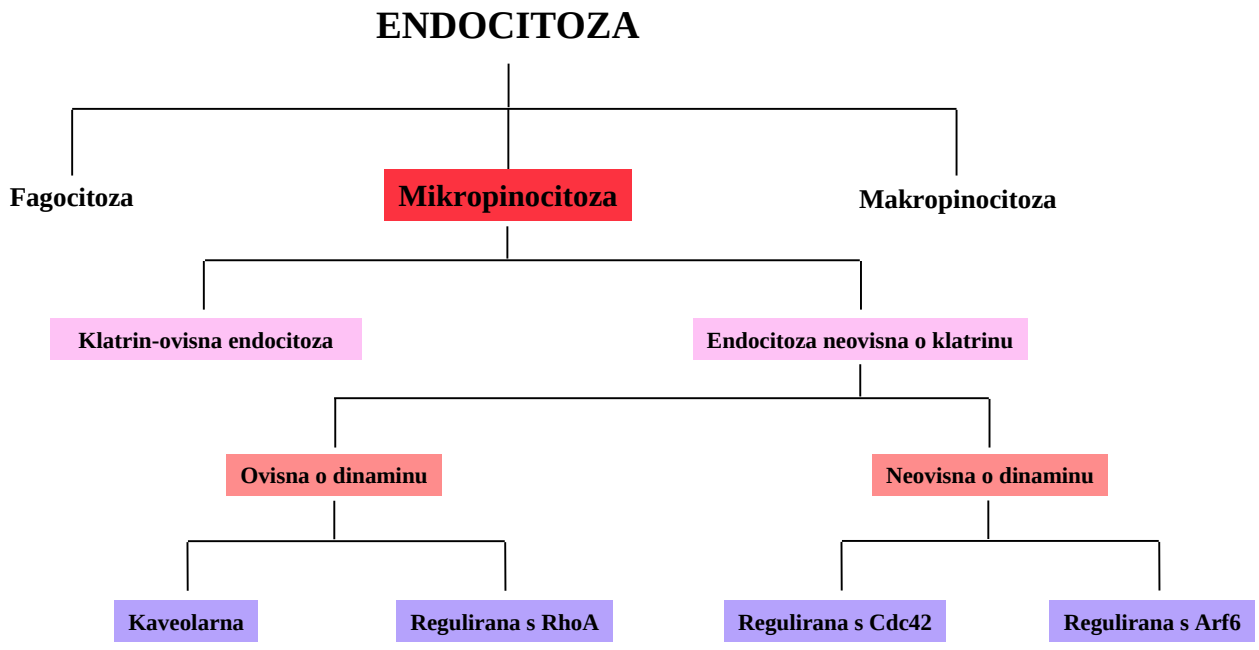
4.2.2. Utjecaj različitih inhibitora na internalizaciju MHC molekula I. razreda....79
4.2.2.1. Utjecaj inhibitora klatrinske endocitoze na internalizaciju MHC molekula I. razreda 79
4.3. Vezikularni transport MHC molekula I. razreda.....82
4.3.1. Obrazac unutarstanične raspodjele internaliziranih MHC molekula I. razreda 82
4.3.2. Obrazac unutarstanične raspodjele internaliziranih kontrolnih molekula ...84
4.3.3. Usporedna internalizacija MHC molekula I. razreda na MCMV-inficiranim stanicama.....86
4.3.4. Usporedba unutarstaničnog putovanja MHC molekula I. razreda i transferinskog receptora na MCMV-inficiranim stanicama 86
4.3.5. Usporedba kinetike internalizacije transferina na neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama.....89
4.3.6. Usporedba unutarstaničnog putovanja MHC molekula I. razreda i B podjedinice toksina kolere na MCMV-inficiranim stanicama 90
4.3.7. Uloga ranih (sortirajućih) endosoma u unutarstaničnom putovanju MHC molekula I. razreda na MCMV-inficiranim stanicama.....93
4.3.8. Uloga Golgijeve mreže u unutarstaničnom putovanju MHC molekula I. razreda na MCMV-inficiranim stanicama.....97
4.3.9. Uloga kasnih endosomalnih odjeljaka u unutarstaničnom putovanju MHC molekula I. razreda na MCMV-inficiranim stanicama.....99
4.3.10. Unutarstanično putovanje različitih površinskih molekula u MCMV-inficiranim stanicama.....106
4.4. Recikliranje MHC molekula I. razreda.....110
4.4.1. Usporedba recikliranja MHC molekula I. razreda na neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama 110
4.4.2. Usporedba recikliranja transferina na neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama.....112
4.4.3. Usporedba recikliranja MHC molekula I. razreda i TfR na MCMV-inficiranim stanicama.....113
4.4.4. Učinak kemijskih inhibitora i temperature na recikliranje internaliziranih molekula na MCMV-inficiranim stanicama.....114
4.4.4.1. Učinak različite temperature na recikliranje internaliziranih molekula na MCMV-inficiranim stanicama 114

4.4.4.2. Učinak kemijskog inhibitora BFA na recikliranje internaliziranih molekula na MCMV-inficiranim stanicama 117
4.4.4.3. Učinak kemijskog inhibitora LY294002 na recikliranje internaliziranih molekula na MCMV-inficiranim stanicama 119
4.4.4.4. Učinak sinergističkog djelovanja kemijskih inhibitora BFA, LY294002 i temperature 16 °C na recikliranje internaliziranih molekula na MCMV-inficiranim stanicama 121
4.5. Degradacija MHC molekula I. razreda 123
4.5.1. Kinetika degradacije MHC molekula I. razreda 123
4.5.2. Kinetika degradacije B podjedinice toksina kolere (CTxB) i epidermalnog faktora rasta (EGF-a) 124
4.5.3. Učinak lizosomotropnih tvari na degradaciju MHC molekula I. razreda 127
4.5.4. Opis puta degradacije u neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama ... 128
4.6. Utjecaj molekula obitelji Rab na endocitozni put MHC molekula I. razreda 130
4.7. Učinak različitih mutanti mišjeg citomegalovirusa na endocitozni put MHC molekula I. razreda 134
4.7.1. Učinak neposredno ranih (IE), ranih (E) i kasnih (L) gena na MHC molekule I. razreda 134
4.7.1.1. Učinak neposredno ranih (IE), ranih (E) i kasnih (L) gena na nishodnu regulaciju MHC molekule I. razreda sa stanične površine 134
4.7.1.2. Učinak neposredno ranih (IE) i ranih (E) gena na endocitozni put MHC molekule I. razreda 137
4.7.2. Učinak m04, m06 i m152 gena na MHC molekula I. razreda 139
4.7.2.1. Učinak m04, m06 i m152 gena na sekretorni i endocitozni put MHC molekule I. razreda 139
4.7.2.2. m06 gen i endocitozni put MHC molekule I. razreda 141
5. RASPRAVA 145
6. ZAKLJUČCI 161
7. LITERATURA 163
Popis skraćenica 181
Životopis 183

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Endocitoza

Stanična membrana je dinamička struktura čija je osnovna funkcija odvajanje kemijski različitog unutarstaničnog miljea (citoplazme) od izvanstaničnog okoliša reguliranjem i koordiniranjem ulaza i izlaza malih i velikih molekula. Esencijalne male molekule, kao što su aminokiseline, šećeri i ioni, mogu proći kroz staničnu membranu uz pomoć aktivnosti integralnih membranskih proteinskih pumpi ili kanala dok velike molekule ulaze pomoću mjehurića vezanih uz membranu, koji nastaju po invaginaciji i odvajanju (engl. pinching-off) dijela stanične membrane u procesu nazvanom endocitoza.



Slika 1. Podjela endocitoze.
Endocitoza se može podijeliti na fagocitozu, makropinocitozu i mikropinocitozu (endocitozu u užem smislu). Mikropinocitoza se dalje dijeli s obzirom na proteine koji su potrebni za odvijanje pojedinog endocitoznog puta (prilagođeno prema referenci 1).

U višestaničnih organizama, različiti endocitozni putovi su čvrsto povezani te reguliraju sve aspekte međustanične komunikacije. Endocitoza se razlikuje ovisno o vrsti transportiranih molekula, odvija se kroz više mehanizama, ali je osnovna podjela u tri kategorije: fagocitozu, makropinocitozu te na mikropinocitozu. Mikropinocitoza je zapravo endocitoza u užem smislu riječi koja se dalje može podijeliti na endocitozu ovisnu o klatrinu i na endocitozu neovisnu o klatrinu (slika 1).

1.1.1. Fagocitoza

Fagocitoza se odvija na specijaliziranim stanicama kao što su makrofazi, monociti i neutrofili koji imaju sposobnost čišćenja velikih patogena poput bakterija, kvasaca ili ostataka mrtvih stanica, arterijskih depozita masti itd. To je aktivni i visoko regulirani proces koji uključuje specifične receptore na površini stanice i signalnu kaskadu Rho obitelj GTPaza. U slučaju patogena na površini stanice stvaraju se produžeci membrane koji se obavijaju oko bakterije i "gutaju je". Potom dolazi do aktivacije staničnog upalnog odgovora, da bi se kada je bakterija jednom u fagosomu, onemogućila njena baktericidna "oružja" poput kiselina, slobodnih kisikovih radikala i kiselih hidrolaza. Prerađeni bakterijski peptidi prezentiraju se na površini makrofaga i izazivaju imunološki odgovor. Fagocitoza je vrlo važna i u elimiranju apoptotičkih stanica, mrtvog tkiva, ali i u razvoju stanica. Tada su uključeni receptori na makrofazima, koji aktiviraju neke druge Rho GTPaze, ali pritom ne izazivaju upalni odgovor. Može se zaključiti da postoji više načina fagocitoze, koji ovise o čestici koja će se ingestirati i receptoru koji prepoznaje česticu.

1.1.2. Makropinocitoza

Makropinocitoza je proces koji se odvija na površini mnogih vrsta stanica kao što su makrofazi, dendritične stanice i fibroblasti. Svima njima je zajedničko da im membrane posjeduju izrazitu sposobnost nabiranja. Makropinocitoza je inducirana faktorima rasta, forbol- esterima koji aktiviraju protein kinazu C (engl. protein kinase C; PKC) (2). Ovisna je o aktivnosti fosfoinozitol-3-kinaze (engl. phosphoinositol-3-kinase; PI3K). Signalna kaskada uključuje Rho obitelj GTPaza, te potiče aktivaciju aktinskog citoskeleta u vidu formiranja izdanaka na membrani (3). Takvi izdanci hvataju čestice pri čemu se omotaju oko čestice, ali se s njom ne odvajaju prema unutarstaničnom dijelu, za razliku od fagocitoze, nego se stapaju s membranom.

Mjehurići ili vakuole oblikovane na ovaj način nazivaju se makropinosomima. Makropinosomi su relativno veliki, 1-5μm u promjeru (4), uglavnom se međusobno spajaju. Makropinosomi se vrlo brzo pomiču prema centru stanice i opstaju u njoj tijekom 5-20 min (5). Molekule internalizirane u obliku makropinosoma mogu ulaziti kako u rane tako i u kasne endosome. Makropinocitoza se može specifično blokirati tvarima koje inhibiraju ili aktivnost Na^+/H^+ izmjenjivača (amilorid) ili aktivnost PI3 kinaze (wortmannin) (6).

1.1.3. Mikropinocitoza

1.1.3.1. Klatrin-ovisna endocitoza

Među svim endocitoznim putevima, klatrin-ovisni put daleko je najbolje okarakteriziran. Ovim putem u stanicu konstitutivno ulaze neophodne prehrambene tvari (npr. engl. low density lipoprotein; LDL, transferin; Tf), a potaknuto mogu i signalne molekule (npr. epidermalni growth factor; EGFR) (6). Da bi se molekula endocitirala moraju postojati adapterski proteini, koji prepoznaju određene signalne dijelove u citoplazmatskom dijelu membranskog receptora. Najčešći adapter je adapterski protein 2 (AP-2), čija podjedinica μ2 prepoznaje tirozinski motiv (YXΨΦ), dileucinski motiv i NpxY motiv receptora lipoproteina niske gustoće (engl. low-density lipoprotein receptor; LDLR). Postoje još i drugi adapterski proteini poput: disabled-2 (Dab2) koji prepoznaje NpxY motiv LDLR-a, epsin i Eps15 koji prepoznaju ubikvitinirani dio proteina koji se endocitira (7). Tijekom internalizacije, adapteri vežu membranske transportne proteini (engl. cargo proteins) za klatrin, koncentrirajući ih u klatrinskim obložnim jamicama (engl. clathrin coated pits; CCP). CCP se invaginiraju u citoplazmu, otkidaju se od stanične membrane uz pomoć GTPaze dinamina koja se oligomerizira u prstenove oko vrata invaginirajuće obložene jamice te formiraju klatrin obložne mjehuriće (engl. clathrin coated vesicle; CCV) (80-120 nm u promjeru) (3). U ovom procesu sudjeluje i nekoliko pomoćnih proteina (amfifizini, sinaptojanin, sindapin, endofilin) (8). 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 (fosfatidil inozitol; PI) 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 (9).

1.1.3.2. Klatrin-neovisna endocitoza

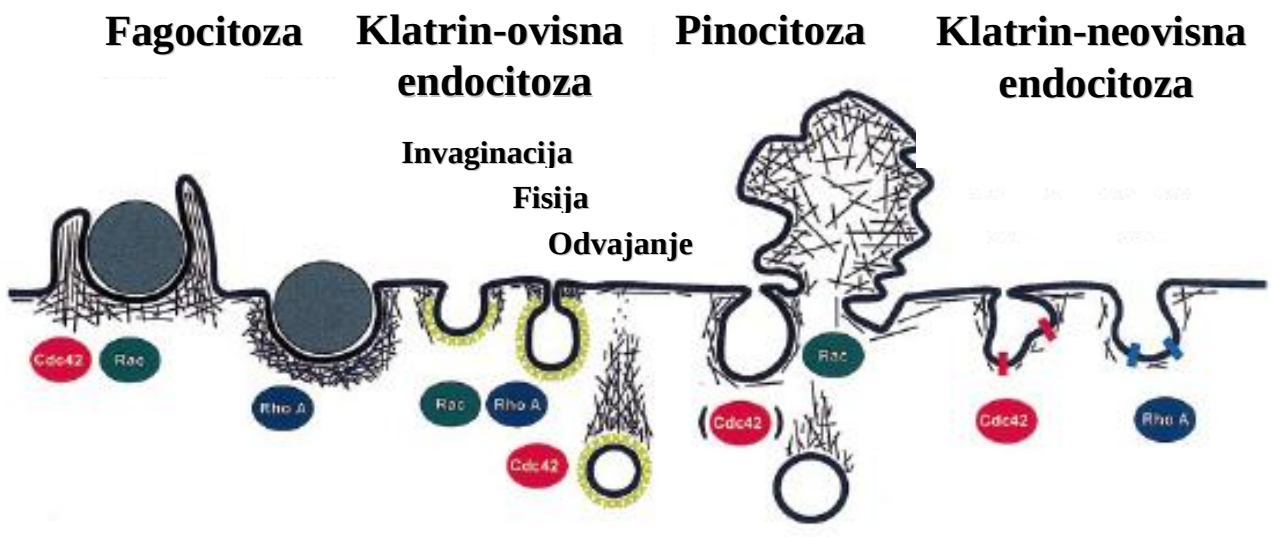
1.1.3.2.1. Endocitoza neovisna o klatrinu, a ovisna o dinaminu

1.1.3.2.1.1. Kaveolarna endocitoza

Kaveole su specifičan tip lipidnih splavi, koji se od drugih tipova razlikuju u dva aspekta. Prvo, kaveole su jedinstveni prikaz morfologije u obliku plosnatih uvrnuća (50-80 nm u promjeru) stanične membrane, drugo, sadrže velike količine proteina kaveolina, koji je odgovoran za njihovo stvaranje. Kaveolin je dimerni palmitilirani protein, težine 21/22kDa koji postoji u vidu tri izoforme. Kaveolin-1 i kaveolin-2 nađeni su uglavnom u ne-mišićnim stanicama, dok se kaveolin-3 nalazi u poprečnoprugastim i glatkim mišićnim stanicama (10). Osim što se može naći na staničnoj membrani, kaveolin se nalazi i u trans-Golgiju (engl. trans-Golgi network; TGN) te u kaveosomima (11, 12). Kaveolin stvara oligomere s kolesterolom i glikosfingolipidima, umeće se u unutarnji sloj stanične membrane i međusobno se povezujući stvara prugast kaveolinski omotač na površini membranskih uvrnuća (13). Molekule internalizirane kaveolarnom endocitozom vrlo često ulaze u klasične endosomalne odjeljke, no postoje i zasebni odjeljci karakteristični upravo za tu vrstu endocitoze. Jedan takav odjeljak predstavljaju kaveosomi. To su rane organele u koje ulaze molekule odmah nakon kaveolarnog mehanizma internalizacije (CTxB, SV40, unakrsno vezani glikofosfatidilinozitol usidreni proteini (engl. glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins; GPI-sidreni proteini). Kaveosomi su pozitivni na kaveolin-1 i neutralnog su pH (11, 14, 15). Nakon kaveosoma, materijal se može prenijeti u endoplazmatsku mrežicu (engl. endoplazmatic reticulum; ER) (npr.SV40) (16), ali i u rane endosome (engl. early endosomes; EE) te vjerojatno u još nedovoljno karakterizirane odjeljke – koji su kaveolin negativni, a u koje ulaze GPI prije dolaska u Golgijev aparat (17). Potocitoza, koja obuhvaća direktnu difuziju malih molekula u citoplazmu nakon povezivanja s kaveolama, predložena je za alternativni put kaveolama posredovanog unosa molekula bez membranske internalizacije (18). Poput klatrin-ovisne endocitoze, kaveolarna endocitoza ovisna je o GTPazi dinaminu (19, 20) i nešto je sporija od klatrin-ovisne endocitoze ($t_{1/2}$ > 20 min). Toksin kolere jedna je od najbolje istraženih molekula koja ulazi u stanicu mehanizmom kaveolarne endocitoze. To je pentavalentni toksin koji se vezuje za glikolipid GM_1 prije endocitoze (21, 22, 23).

1.1.3.2.1.2. Endocitoza ovisna o Rho A GTPazi

Velika obitelj malih GTPaza sadrži oko 80 članova. S obzirom na funkciju mogu se podijeliti u šest podobitelji: Ras, Ran, Rad, Rab, Arf i Rho. Rho GTPaze igraju središnju ulogu u dinamičkoj regulaciji aktinskog citoskeleta te na taj način kontroliraju staničnu morfolgiju, motilitet i adheziju. Regulacija endocitoznih puteva, uključujući fagocitozu, transcitozu i pinocitozu čini se glavnom funkcijom Rho GTPaza (24). Najbolje istražene Rho GTPaze zasigurno su RhoA, Rac1 i Cdc42 (slika 2).



Slika 2. Rho GTPaze.
Sumarni prikaz poznatih i predloženih mjesta djelovanja Rho GTPaza u procesu internalizacije molekula sa stanične membrane (prilagođeno prema referenci 24).

Interleukin 2 receptor (IL-2R) nalazi se na aktiviranim limfocitima te se sastoji od tri podjedinice α, β i γ. β podjedinica IL-2R-a (IL-2R-β) prvi je otkriveni receptor koji slijedi klatrin-kaveole-neovisni put endocitoze (25). Nalazi se u membranskim domenama koje su neosjetljive na deterđente (engl. detergent resistant membrane; DRM) te se internalizira putem ovisnim o lipidnim splavima čak i bez prethodne aktivacije. Kada se IL-2 veže na IL-2R povećava se internalizacija ovog kompleksa. U slučaju Eps15-negativne mutante (adapter u klatrin-ovisnoj endocitozi), internalizacijski proces nije poremećen što govori u prilog tome da je ovaj put neovisan o klatrinu. Ovisan je o dinaminu, kao i o aktiviranoj RhoA GTPazi. Suprotno tome, aktivirana RhoA GTPaza inhibira internalizaciju transferinskog receptora (TfR-a) za koji se zna da ulazi u stanicu klatrin-ovisnim putem (25). Na koji način doprinosi

kaveole-neovisnoj endocitozi nije poznato. Naime, zna se da se aktivirane RhoA i Rac GTPaze nalaze u kaveolama. Pretpostavlja se da na dva načina reguliraju kaveolarnu endocitozu. Prvi je taj da povećavaju ukupan broj kaveola (26), a drugi da inhibiraju internalizaciju onemogućavajući odvajanje kaveola od stanične membrane. Imunoglobulin E receptor (IgER) smješten je u lipidnim splavima te se poput IL-2R-a internalizira putem koji je dinamin ovisan, a klatrin i kaveole neovisan (27, 28) tj. putem ovisnim o RhoA GTPazi.

1.1.3.2.2. Endocitoza neovisna o klatrinu i neovisna o dinaminu

1.1.3.2.2.1. Endocitoza regulirana Cdc42 GTPazom

Najmanje do sada istražen endocitozni put zasigurno je onaj koji uključuje malu Cdc42 GTPazu. GPI-sidreni proteini internaliziraju se u tubularne elemente (28-40nm u promjeru) koji se ne kolokaliziraju niti sa kaveolinom ni sa ranim endosomalnim antigenom 1 (engl. early endosomal antigen 1; EEA1), a u potpunosti su odvojeni i od transferinskog puta. Ovi primarni prijenosni mjehurići, koje su prvo otkrili Kirkham i suradnici uz pomoć elektronske mikroskopije (29), prvobitno su nazvani klatrin-neovisnim mjehurićama. Zna se da se ti mjehurići usmjeravaju u odjeljak nazvan GEEC (engl. GPI-anchored proteins early endosomal compartment). GEEC je negativan na različite biljege poput Rab4, Rab5 i Tf (30). Rho GTPaza Cdc42 igra najvažniju ulogu u GEEC posredovanoj endocitozi koja je klatrin-neovisna, kaveole-neovisna, RhoA-neovisna i dinamin-neovisna (31). Ovim putem, osim GPI proteina endocitiraju se fluid fazni biljezi, B podjedinica toksina kolere i SV40 (32, 33). Iz GEEC-a, GPI slijede put recikliranja preko endocitičkog reciklirajućeg odjeljka (engl. Endocytic recycling compartment; ERC), ali ove molekule se 3-4 puta sporije recikliraju nego TfR (31). Inhibicija Cdc42 GTPaze dovodi do smanjenja fluid faznog unosa, a GPI proteini se usmjeravaju u klatrin-ovisni endocitozni put. GEEC put se može inhibirati inkubacijom s regulatorima aktinske polimerizacije, poput latrunkulina A, citohalazina D i jaspankinolida (34).

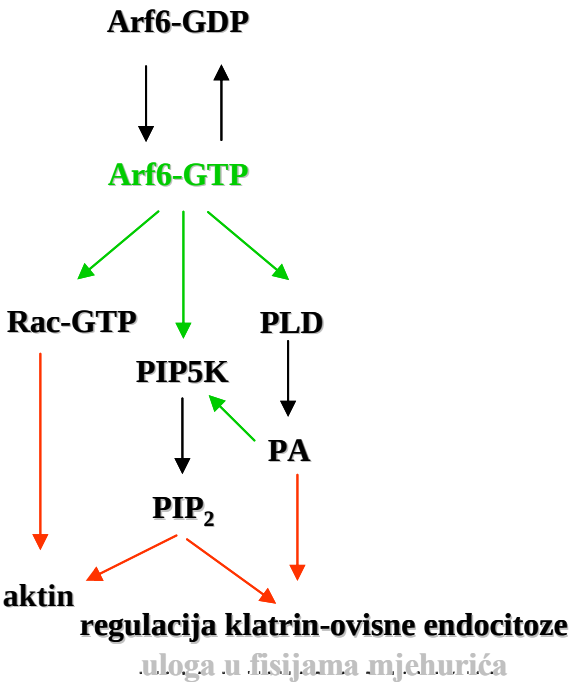
1.1.3.2.2.2. Endocitoza regulirana Arf6 GTPazom

Arf6 član je Arf obitelji malih GTPaza. U suprotnosti od Arf1, koji je prvenstveno lokaliziran u Golgijevom aparatu, Arf6 uobičajeno funkcionira na granici između stanične membrane i endosomalnih struktura te je uključen u nekoliko endocitoznih događaja (35, 36). Arf6 aktivira fosfolipazu D (engl. phospholipase D; PLD) koja potiče izravno stvaranje fosfatidične kiseline (engl. phosphatidic acid; PA) i neizravno diacil glicerola (DAG) koji utječu na biofizička svojstva membrane u smislu nastanka zakrivljenja, što značajno utječe na endocitozne procese, posebice recikliranje (slika 3). Poznato je da preko aktivacije Rac-GTP-a, a i aktivacije fosfatidilinozitol 4-fosfat-5-kinaze (PIP5K), Arf6 ima važnu ulogu u remodeliranju aktinskog citoskeleta (slika 3).

Arf6 ima ulogu u klatrin-ovisnoj endocitozi, egzocitozi, klatrin-kaveole-neovisnoj endocitozi te u recikliranju (35, 36). Ovim putem internaliziraju se α podjedinica IL-2R-a (IL-2R- α), molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti I. razreda (engl. mayor histocompatibility complex; MHC-I) (MHC-I molekule), GPI-sidreni proteini, E-kadherin, integrini β1, M2 muskarinski acetilkolinski receptor, metabotropni glutamatni receptor 7 i drugi (6).

Nakon što se jednom stvori $Arf6^{+}$ mjehurić, on se vrlo brzo nakon internalizacije može ponovno spojiti sa staničnom membranom te na taj način omogućiti recikliranje endocitiranih molekula. 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.

Kao što je rečeno u prethodnom odlomku, GPI proteini internaliziraju se GEEC ovisnim putem koji je neovisan o Arf6 GTPazi, na staničnoj liniji jajnika kineskog hrčka (engl. Chinese Hmaster Ovary, CHO) (30). Na HeLa staničnoj liniji situacija je drugačija, GPI proteini internaliziraju se putem ovisnim o Arf6. Najbolji dokaz za to je blokada GEEC ovisne internalizacije inhibitorom aluminij fluoridom (AlF_4^-). Tretiranje HeLa stanica s AlF_4^- nema utjecaj na internalizaciju GPI proteina ili fluid faznih markera. Suprotno tome, tretiranjem CHO stanica one pokazuju značajnu inhibiciju internalizacije navedenih molekula. Stanice CHO koje imaju ektopično izražen Arf6 i tretirane su s AlF_4^-, pokazuju internalizaciju GPI proteina ili fluid faznih biljega, što ukazuje na njihovo preusmjeravanje na Arf6 put. To govori u prilog tome da se ova dva puta značajno isprepliću.



Slika 3. Učinak Arf6 GTPaze na endocitozni put. Arf6 GTPaza aktivira Rac-GTP, PLD i PIP5K. Posljedično dolazi do remodeliranja aktinskog citoskeleta i reguliranja klatrin-ovisne endocitoze (prilagođeno prema referenci 35).

1.1.3.3. Masovna (bulk) endocitoza

Postoji još jedan način endocitoze, putem kojeg u stanicu masivno ulaze mnogobrojne molekule, poput površinskih receptora, kao i neke manje molekule, ali vrlo malo se zna o samom mehanizmu njihova ulaska. Ono što se zna je da je to pinocitozni put neovisan o klatrinu, lipidnim splavima i dinaminu (37). Otpuštanje neurotransmitera ovisi u spajanju malih sinaptičkih mjehurića (engl. synaptic vesicles; SVs) sa staničnom membranom neurona. Postoji više načina putem kojeg se SV mogu internalizirati. Jedan od njih zasigurno je bulk endocitoza ovisna o aktivnosti (engl. activity dependent bulk endocytosis; ADBE) (38), koja se javlja tijekom izrazito intenzivne stimulacije centralnog živčanog sistema zbog svojeg velikog kapaciteta prijenosa. ADBE predstavlja fluid fazni unos SV u živčanu stanicu (39). Ovim načinom u stanicu ulaze fluid fazni biljeg peroksidaza (peroksidaza iz hrena; engl. horseradish peroxidase; HRP) (37, 40, 41), dekstran (39), boja lucifer žuta (engl. lucifer yellow) (42), a također i konformirane MHC-I molekule (37, 40 ,41).

1.1.4. Inhibitori endocitoze

Tablica 1. Inhibitori endocitoze.

VRSTA ENDOCITOZE	INHIBITOR	MEHANIZAM DJELOVANJA	REFERENCA
Klatrin-ovisna endocitoza	Klorpromazin i Imipramin	aktivira AP-2 receptor i na neobložnim endosomalnim odjeljcima te time na njima potiče stvaranje klatrinskih rešetki onemogućavajući sklapanje klatrinskog omotača na površini stanice	43, 44
	Uklanjanje unutarstaničnog K^+	dolazi do gubitka klatrinskih rešetki povezanih sa staničnom membranom i nestanka klatrinskih mjehurića	45
	Hipertonična otopina	dolazi do gubitka klatrinskih rešetki povezanih sa staničnom membranom i nestanka klatrinskih mjehurića	45, 46
	Kiseli tretman	remeti vezivanje klatrina i adaptorskih molekula ili mijenja strukturu samog klatrina	45
	Wortmannin	inhibira sva tri do sada poznata razreda PI3K	47
Klatrin-neovisna endocitoza	Filipin	vezuje sterol i dovodi do spljoštavanja kaveole i razgradnje kaveolarnih invaginacija	48
	Nistatin	vezuje sterol i dovodi do spljoštavanja kaveole i razgradnje kaveolarnih invaginacija	48
	β-cikodekstrin	specifično uklanja kolesterol sa stanične membrane	49
	Aluminij fluorid	aktivira Arf6 GTPazu koja postaje stalno aktivna, inhibira recikliranje	50

1.2. Vezikularni transport

Vezikularni transport podrazumijeva unutarstanični prijenos molekula. Te molekule se najčešće prenose različitim mjehurićima koji se razlikuju po svojoj veličini, obliku i biljezima koje nose na svojoj površini. Oni mogu odvoditi novosintetizirane molekule prema staničnoj membrani (sekretorni put), ili usmjeravati internalizirane molekule (endocitozni put). Primarna funkcija endocitoznog sustava je sortiranje internaliziranih liganada i receptora za različite destinacije. Navedene molekule mogu imati trostruku sudbinu: reciklirati natrag na staničnu membranu, usmjeravati se u degradaciju ili putovati natrag prema Golgijevu aparatu. Iako se molekule mogu endocitirati na različite načine, koje smo prethodno opisali, većina tih molekula putuje odjeljcima koji su dio glavnog endocitoznog puta, ili se nakon prolaska kroz specifične endocitozne putove, endocitozni mjehurići na kraju ipak usmjeruju u njega. Patogeni poput virusa također koriste endocitičko sortiranje za inficiranje stanice (51).

Klatrinskim putem, ili kako ga neki još nazivaju glavnim putem, ponajviše putuju molekule endocitirane klatrin-ovisnom endocitozom. Pored tih molekula, u ove se odjeljke usmjeravaju i molekule endocitirane drugim mehanizmima. Bez obzira na način endocitoze sve molekule se moraju sortirati. Sortiranje se odvija u sortirajućim endosomima. Iz njega molekule ili recikliraju natrag na staničnu membranu (transferin, engl. low density lipoprotein receptor; LDLR) ili se usmjeravaju u kasne endosome i lizosome za degradaciju (LDL, EGF, engl. mannose 6 phosphate receptor; M6PR). Kasni endosomi (engl. late endosome; LE) mogu služiti i kao još jedno sortirajuće mjesto jer iz njih molekule mogu biti usmjerene ili u retrogradni put prema Golgijevom aparatu ili se mogu egzocitirati. S obzirom da postoje mnogi unutarstanični odjeljci, njihovo razlikovanje moguće je uz pomoć specifičnih biljega na njihovoj površini.

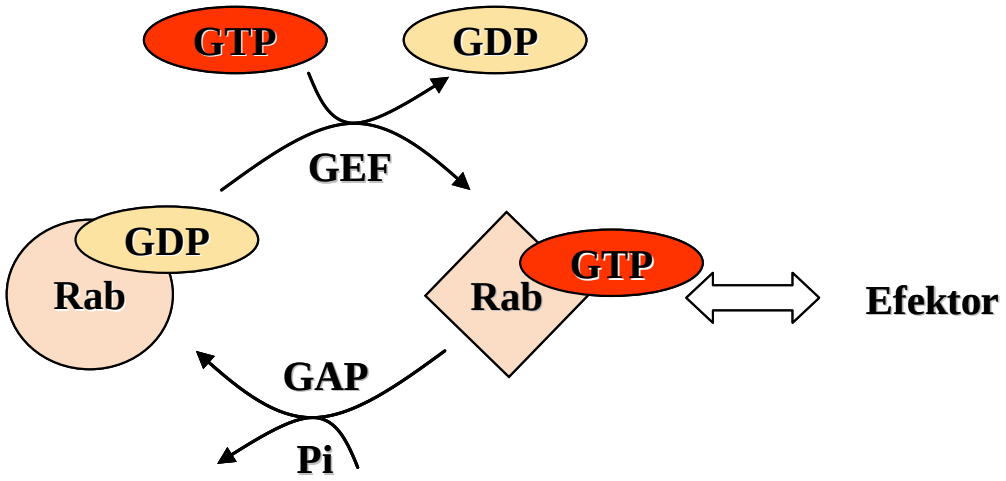
1.2.1. Endosomalni odjeljci

1.2.1.1. Molekule Rab

Unutarstanični odjeljci osobina su eukariotskih stanica. Svaki odjeljak ima karakteristična strukturalna, biokemijska i funkcionalna obilježja koja omogućuju kontinuirani protok proteina i membrana duž egzocitoznog i endocitoznog puta. Podjela na endosomalne odjeljke danas se najčešće vrši prema biljezima koji se nalaze na njihovoj površini (citoplazmatskoj), a od kojih su najpoznatije molekule Rab (52). Nedavne analize sekvencioniranog humanog genoma pokazale su da postoji čak 60 različitih članova ove

velike obitelji (53). Molekule Rab su male GTPaze koje sudjeluju u stvaranju prijenosnih mjehurića, njihovoj pokretljivosti te međusobnom usmjeravanju i spajanju (fuziji) (54).

Radi lakšeg klasificiranja Rab molekule podijeljene su u deset podobitelji, redom to su Rab_1, Rab_3, Rab_4, Rab_5, Rab_6, Rab_8, Rab_{11}, Rab_{22}, Rab_{27} i Rab_{40} (55), a sve se razlikuju u svom karboksilnom kraju. Rab GTPaze funkcioniraju kao molekularne sklopke, od gvanin-trifosfat (GTP) vezanog ili gvanin-difosfat (GDP) vezanog stanja. Navedeno prespajanje kontroliraju gvanin nukleotid zamjenski čimbenici (engl. guanine nucleotide exchange factors; GEFs), koji potiču vezanje GTP-a i GTPaza-aktivirajućeg proteina (engl. GTPase activating protein; GAP), koji potom ubrzava hidrolizu vezanog GTP-a u GDP (slika 4).



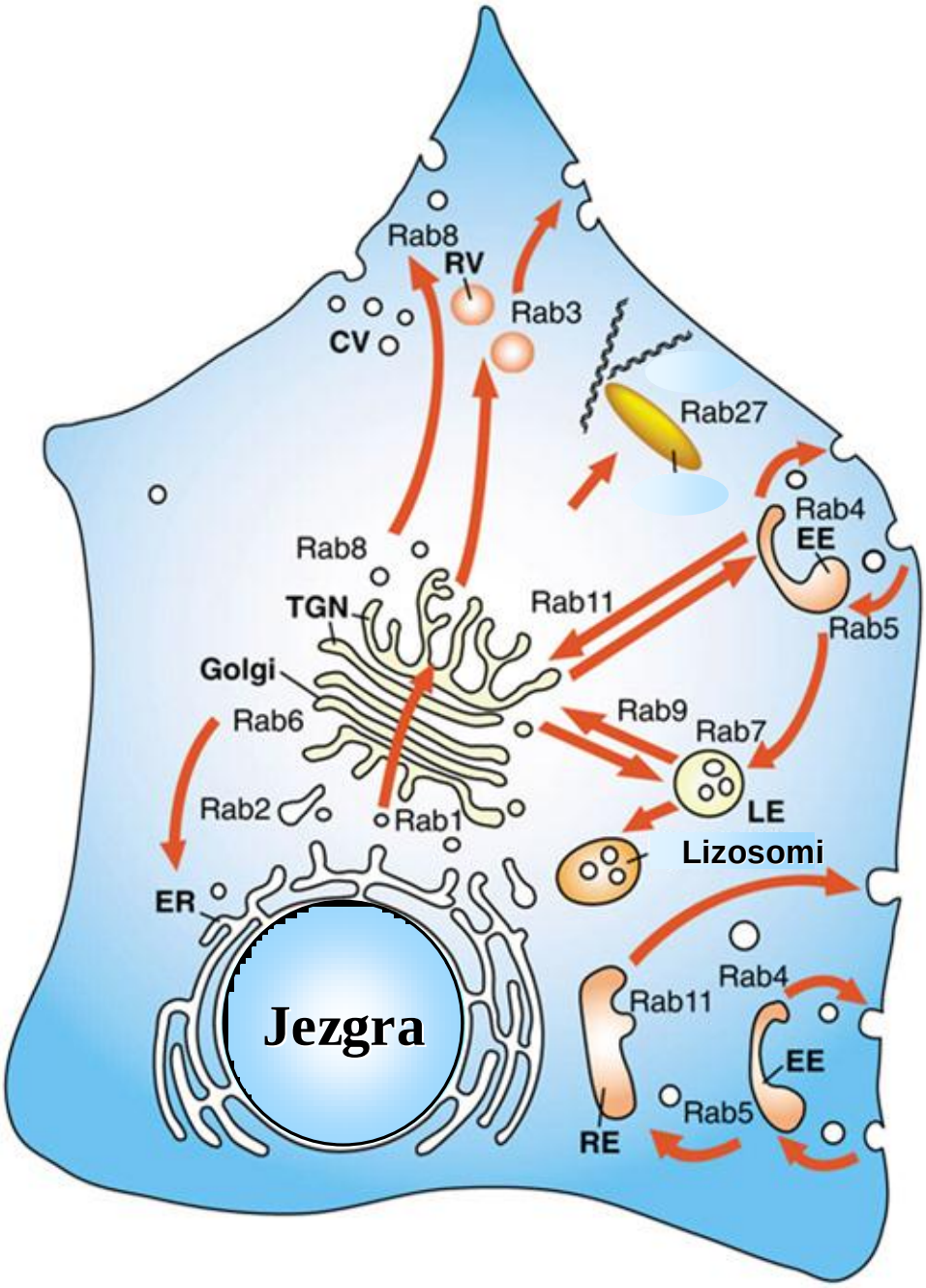
Slika 4. Ciklus Rab GTPaza.

Rab GTPaze se izmjenjuju između GDP- i GTP- vezanog oblika, koji imaju različite konformacije. Pretvaranje iz GDP- u GTP-vezani oblik uzrokovan je razmjenom nukleotida, koji katalizira GEF. Do pretvaranja GTP- natrag u GDP-vezani oblik dolazi pomoću GAP-a. GTP- vezan oblik stupa u interakciju s efektorskim molekulama. Pi, molekula anorganskog fosfata (prilagođeno prema referenci 55).

1.2.1.1.1. Lokalizacija i funkcija molekula Rab

Različita membranska lokalizacija molekula Rab ovisi o poslije-translacijskoj modifikaciji cisteinskog motiva na samom karboksilnom kraju (CXXX, CC, CXC, CCXX ili CCXXX), gdje je X bilo koja aminokiselina), s jednom ili više hidrofobnih geranilgeranil grupa. Ova poslije-translacijska modifikacija zahtijeva početno prepoznavanje novo-sintetiziranih proteina Rab od strane Rab pratećeg proteina (engl. Rab escort protein; REP), koji predstavlja Rab proteine geranilgeranil transferazi. REP potom funkcionira kao šaperon koji drži hidrofobni, geranilgeranilirani Rab topiv i dostavlja ga odgovarajućim membranama (56). Pretpostavlja se da postoji nekakav membranski receptor koji prepoznaje REP-specifični Rab kompleks, međutim do sada još nije otkriven.

Rab4, Rab5 i Rab11 lokalizirani su u ranim endosomima (EE) i posjeduju različite funkcije (slika 5). Rab5 molekula i njegov efektor rani endosomalni antigen 1 (EEA1), zajedno sa *SNARE* proteinima, zaduženi za procese homotipske, te heterotipske fuzije između primarnih ranih endosoma i EE. Tijekom homotipske fuzije neprekidno se od novonastalih endosoma odvajaju mjehurići koji se usmjeravaju u recikliranje (pozitivni na Rab4), dok se u unutrašnjosti koncentrira materijal koji je uglavnom predviđen za degradaciju. Rab4 i Rab11 igraju važnu ulogu tijekom odvajanja molekula koje recikliraju (57). Rab4 ima ulogu u transportu molekula iz EE u reciklirajuće endosome (engl. recycling endosome, RE) ili u recikliranju molekula iz EE natrag na staničnu membranu. Rab4 i Rab5 funkcioniraju (uzastopno) jedan za drugim. Povećani izražaj Rab5 molekule povećava fluid-fazni unos i receptorom posredovanu endocitozu te veličinu ranih endosoma, sugerirajući da Rab5 regulira klatrin-ovisnu endocitozu i transport u rane endosome (58, 59). S druge strane, povećani izražaj Rab4 ne dovodi do promjena u kinetici endocitoze, ali smanjuje dinamičku ravnotežu (engl. steady state) fluid faznih biljega (dekstran) te potiče nagomilavanje TfR-a na staničnoj površini (60), što govori u prilog teoriji da sudjeluje u recikliranju. Ipak, puno važniji regulator recikliranja je Rab11 molekula koja se nalazi u reciklirajućem odjeljku (RE) i u TGN-u (slika 5). Često s Rab11 je u istim procesima udružena i Rab8 molekula (61, 62).



Slika 5. Lokalizacija molekula Rab.

U biosintetskom putu proteini se prenose iz endoplazmatske mrežice (ER) kroz Golgijevu mrežu na staničnu površinu. U TGN-u dolaze ili konstitutivni sekretorni mjehurići (engl. constitutive secretory vesicles; CV) ili regulirane sekretorne granule (engl. regulated secretory granules/vesicles; RV). Internalizirane molekule ulaze u EE, te se usmjeravaju prema RE ili prema LE odnosno lizososmima. Lokalizacija određenih proteina Rab u membranama endosomalnih odjeljaka kao i u transportu molekula prikazana je strelicama (prilagođeno prema referenci 55).

Rab4 nije nađen u kasnim endosomima (LE) ni ne kolokalizira se sa Rab7 (63), što govori u prilog tome da je njegovo glavno mjesto djelovanja prije kasnih odjeljaka (slika 5). Za razliku od Rab4, Rab5 ima doticaja sa kasnim odjeljcima. U jednom trenutku događa se konverzija Rab molekula, te se Rab5 otpušta, a istodobno se vezuje Rab7. Upravo tada postojeći je odjeljak pozitivan i na Rab5 i na Rab7 i to je takozvani konvertirajući odjeljak (slika 8). Rab7 ima ulogu u kasnom endocitoznom putu, regulira transport od EE prema LE te njegov povećani izražaj pogađa, kao što je i očekivano, samo degradaciju, dok stopa internalizacije i recikliranja ostaju nepromijenjene (64). Rab7 sudjeluje i u biogenezi lizosoma (58, 65). Rab9 molekula također se nalazi u kasnim odjeljcima te ima ulogu u transportu iz LE u TGN (slika 5) (66). Neki patogeni mogu manipulirati molekulama Rab u zaraženim stanicama. *Trypanosoma cruzi* kao uzročnik Chagasove bolesti, smanjuje izražaj Rab7, Rab9 i EEA1, dok ne mijenja izražaj Rab5 molekule (67). *Leishmania donovani* usporava vezivanje Rab7 (68). *Salmonella typhimurium*, također zaobilazi normalni endocitozni put manipulirajući izražajem molekula Rab. Njeni fagosomi zadržavaju Rab5 i Rab18, ali su neosjetljivi na vezivanje Rab7 i Rab9, izbjegavajući lizosomalnu fuziju (69).

1.2.1.2. Sortirajući endosomi

Rani endosomi (EE) poznati su još i kao sortirajući endosomi. To su tubulo mjehurićaste strukture smještene na periferiji stanice. pH im iznosi oko 6 i vrlo je bitan za njihovu sposobnost sortiranja molekula ili u reciklirajući ili u degradacijski put (70). Niski pH u samom lumenu EE dovodi do odvajanja liganada od njihovih receptora i miješanja sa internaliziranim otopljenim molekulama. Odvajanje od receptora predstavlja prvi korak u endocitoznom sortiranju. Tijekom 5-10 minuta EE primaju endocitirani materijal, potom se translociraju duž mikrotubula, prestaju se spajati sa novo endocitiranim molekulama, vežu na sebe kisele hidrolaze i postaju sve kiseliji. To je proces sazrijevanja ili *maturacije*. Poluvrijeme života sortirajućih endosoma je otprilike 8 minuta. Kao posljedica maturacije sortirajućih endosoma, otopljene molekule kao i dio membranskih proteina i lipida prenose se u LE bez da uistinu napuste lumen organele (71).

Rab 5 je mala regulatorna GTPaza koja je povezana sa sortirajućim endosomima i sudjeluje u spajanju endosomalnih membrana (72). Fuzija endocitoznog mjehurića sa EE ili EE međusobno ovisi o Rab5 molekuli. Ova molekula na sebe veže fosfoinozitid 3-kinazu (engl. phosphoinositide 3-kinase; PI3K) koja stvara fosfoinozitid 3-fosfat (engl. phosphoinositide 3-phosphate; 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 (73). Postoje dvije različite vrste EE. 35% čine $Rab5^+$ endosomi koji ili brzo (rapidno) maturiraju akumulirajući Rab7 molekulu u vremenu od 30 sekundi ili su već pozitivni na Rab7; ostatak od 65% čine sporo maturirajući $Rab5^+$ endosomi koji ne akumuliraju Rab7 niti nakon 100 sekundi. Bez obzira o kojim EE se radi, u svima se vidi kolokalizacija Rab5 s EEA-1.

Sazrijevanje EE je u korelaciji s njihovom mobilnošću duž mikrotubula. Brzo maturirajuća populacija ranih endosoma pokazuje znatnu pokretljivost duž mikrotubula, dok sporo maturirajuća populacija je uglavnom stacionarna i ne ovisi o mikrotubulima. Tretiranjem stanica s nokodazolom, inhibitorom koji raskida mikrotubularnu mrežu, smanjuje se pokretljivost brzo maturirajućih na onu sporo maturirajućih. Iako su do sada sva istraživanja bila usmjerena na razumijevanje sortiranja unutar ranih endosoma, ipak fundamentalno ostaje pitanje da li postoji pre-rano endosomalno sortiranje. Ligandi predodređeni za degradaciju prvenstveno se nalaze u manjoj populaciji dinamičnih ranih endosoma, dok ligandi preodređeni za recikliranje, poput transferina, ulaze neselektivno u sve rane endosome, ali uglavnom se nalaze u većoj populaciji statičkih, sporo maturirajućih ranih endosoma. Ovo pre-rano endosomalno sortiranje počinje na staničnoj membrani i ovisi o kompoziciji i motilitetu endocitoznog mjehurića (74). Praćenje virusne čestice *influenza virusa*, obilježene pH-osjetljivom bojom (75), pokazalo je da se inicijalni korak kiseljenja (acidifikacije) podudara s ulaskom virusne čestice u $Rab5^+$ endosome, te da se ista prije toga nije spojila s niti jednim kiselim endosomom. Također, tretiranje stanica s amonijevim kloridom, koji povisuje pH endosoma, nije utjecalo na različito sortiranje LDL-a i transferina u dinamičku odnosno statičku populaciju ranih endosoma (74), indicirajući da je pre-rano endosomalno sortiranje neovisno o pH, za razliku od procesa sortiranja unutar EE.

Iako se LDL, EGF, transferin i virus influenze internaliziraju klatrin-ovisnom endocitozom, potreba za adapterskim proteinima je različita. Do sada se pretpostavljalo da je za endocitozu svih ovih molekule bitan AP-2. Kada je onesposobljena funkcija AP-2 (AP-2 knockdown), unos transferina je bio blokiran, dok je isti ostao nepromijenjen za LDL, EGF i virus influenze. To upućuje na postojanje drugih adapterskih proteina, ali i na moguću korelaciju između adapterskih proteina i pre-rano endosomalnog sortiranja. Molekule kojima nije potreban AP-2 nalaze se u dinamičkoj populaciji, dok one kojima je isti potreban u statičkoj populaciji ranih endosoma. U AP-2 knockdown uvjetima izrazito se smanjuje broj statičkih ranih endosoma, ostavljajući broj dinamičkih nepromijenjen, ali povećavajući njihov relativni udio, što potvrđuje teoriju da su dinamički rani endosomi AP-2 neovisni.

Osim $Rab5^+$ domena (dijelova) ranih endosoma, postoji još $Rab4^+$ i $Rab11^+$ domena. Rab4 ima važnu ulogu u regulaciji recikliranja iz EE u reciklirajuću odjeljak RC ili direktno natrag na staničnu membranu. Prvenstveno regulira recikliranje transferina. Pojačani izražaj Rab4 u stanici dovodi do morfološkog povećanja odjeljka u kojemu se nalazi TfR za kojega se zna da reciklira. Rab11 ima ulogu u kontroli recikliranja, ali ne iz ranih endosoma nego iz perinuklearnog reciklirajućug odjeljka.

1.2.1.3. Recikliranje endocitiranih molekula

Recikliranje podrazumijeva dolazak endocitiranih molekula natrag na staničnu membranu. Recikliranje je važno za održavanje odgovarajućeg sastava različitih staničnih organela te za povratak esencijalnih molekula sa specifičnom funkcijom u iste. Postoje različite razine recikliranja. Molekule endocitirane putem ovisnim o Arf6 mogu reciklirati izravno iz $Arf6^+$ mjehurića prije njihova stapanja u rani endosom (76, 77). Ove se molekule iznimno brzo vraćaju na staničnu površinu (engl. *rapid recycling*) što zahtijeva očuvan integritet aktinskog citoskeleta. Brzo recikliranje (engl. *fast recycling)* nešto je sporije od prethodnog, odvija se iz ranih endosoma (78, 79). Potom slijedi znatno sporije recikliranje (engl. *slow recycling*), a događa se iz kasnih ranih endosoma i iz jukstanuklearnog reciklirajućeg odjeljka (78, 79, 80) i za njegovo odvijanje potrebna je aktivnost malih GTPaza Rab11 i Rab22a. Posljednje, kasno recikliranje (engl. *late recycling*) ili egzocitoza, odnosi se na povratak proteina na staničnu površinu iz kasnih endosoma (81). Do sada je ipak najviše istraženo brzo i sporo recikliranje. Brzo recikliranje naziva se još i perifernim recikliranjem ovisno je o temperaturi i aktivnosti PI3K. PI3K inhibitori wortmannin (W) i Ly294002 (LY) reduciraju recikliranje. LY je revrzibilni inhibitor PI3K, izrazito je stabilan u mediju, ne utječe na ulazak TfR-a u rane endosome, nego ga zadržava u njima. Nema nikakvog utjecaja na sporo recikliranje. W je ireverzibilni inhibitor PI3K, PI4K i kinaze lakog lanca miozina, nestabilan je u vodenom mediju, smanjuje efikasnost recikliranja TfR-a. U nekim istraživanjima navodi se da inhibitori PI3K mogu raskinuti vezu između Rab5 i EEA1, ali je njihovo vezivanje uglavnom neosjetljivo na ove inhibitore. Recikliranje iz ranih endosoma može se blokirati djelovanjem temperature od 16°C, ali se na taj način blokira i daljnje putovanje molekula iz ranih endosoma prema reciklirajućem odjeljku. Endocitički reciklirajući odjeljak (engl. endocytic recycling compartment, ERC) tubularna je stanična organela, pH 6.4-6.5, promjera 60nm povezana s mikrotubulima. kojem je karakterističan biljeg Rab11, ali je također pozitivan i na Rab4 (57). Rab11 ima važnu ulogu u recikliranju iz

ERC-a, jer kada je oštećena funkcija Rab11, molekule ostaju zarobljene u ERC-u. Distribucija ERC-a varira među staničnim linijama. U većini stanica, ERC tubuli su zgusnuti oko mikrotubuli-organizirajućeg centra (engl. microtubule-organizing centre, MTOC), dok su u nekim stanicama raspoređeni difuzno po citoplazmi. Kinetika recikliranja iz ERC-a ne ovisi o njegovoj distribuciji. Sporo ili centralno recikliranje može se inhibirati djelovanjem brefeldina A (BFA). Njegova prvenstvena uloga je u blokadi formiranja ERC-a, ali vrlo mali učinak ima na promjenu učestalosti recikliranja transferina. Najprihvatljivije objašnjenje je da kada se blokira recikliranje iz ERC-a (najvjerojatnije jer se ne formira odjeljak), gotovo se sve molekule usmjeravaju u put recikliranja ovisan o PI3K. Stoga možemo zaključiti da BFA i LY imaju izrazito jaki sinergistički učinak na recikliranje, jer je tada u potpunosti blokirano i periferno i centralno recikliranje (82).

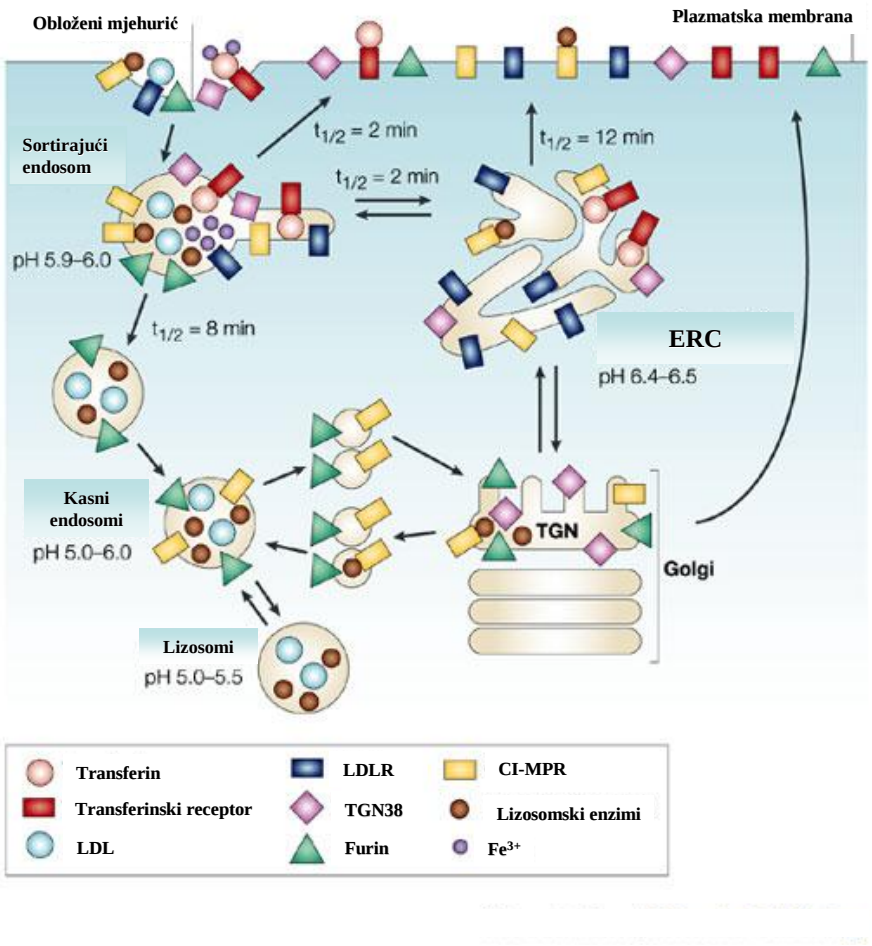
Mnogobrojne molekule su do sada ispitivane i uspostavilo se da recikliraju (slika 6). Neke od njih su:

1. TfR
    - reciklira i perifernim i centralnim mehanizmom
    - izlaz iz sortirajućih endosoma T½ < 2 minute
    - izlaz iz ERC-a T½ oko 10 minuta

2. TGN38
    - engl. trans-Golgi network 38
    - predominantno se nalazi u trans-Golgiju
    - 10% se u steady state nalazi na staničnoj površini
    - 80% TGN38 iz ERC-a reciklira kinetikom sličnom TfR-a
    - mora reciklirati više puta nego se sav prenese sa stanične membrane u trans-Golgi
    - stopa recikliranja je puno brža nego izlazak TGN38 iz trans-Golgija na membranu što mu i omogućuje ovakvu steady state distribuciju

3. GLUT4

- inzulinom regulirani glukoza prijenosnik 4
- nalazi se u masnim i mišićnim stanicama
- u prisustvu inzulina GLUT4 se nalazi u odjeljcima koji su TfR^+
- u odsustvu inzulina GLUT4 se prenosi iz ERC u inzulin-regulirane odjeljke (engl. insulin-regulated compartment, IRC)
- IRC su TfR^-



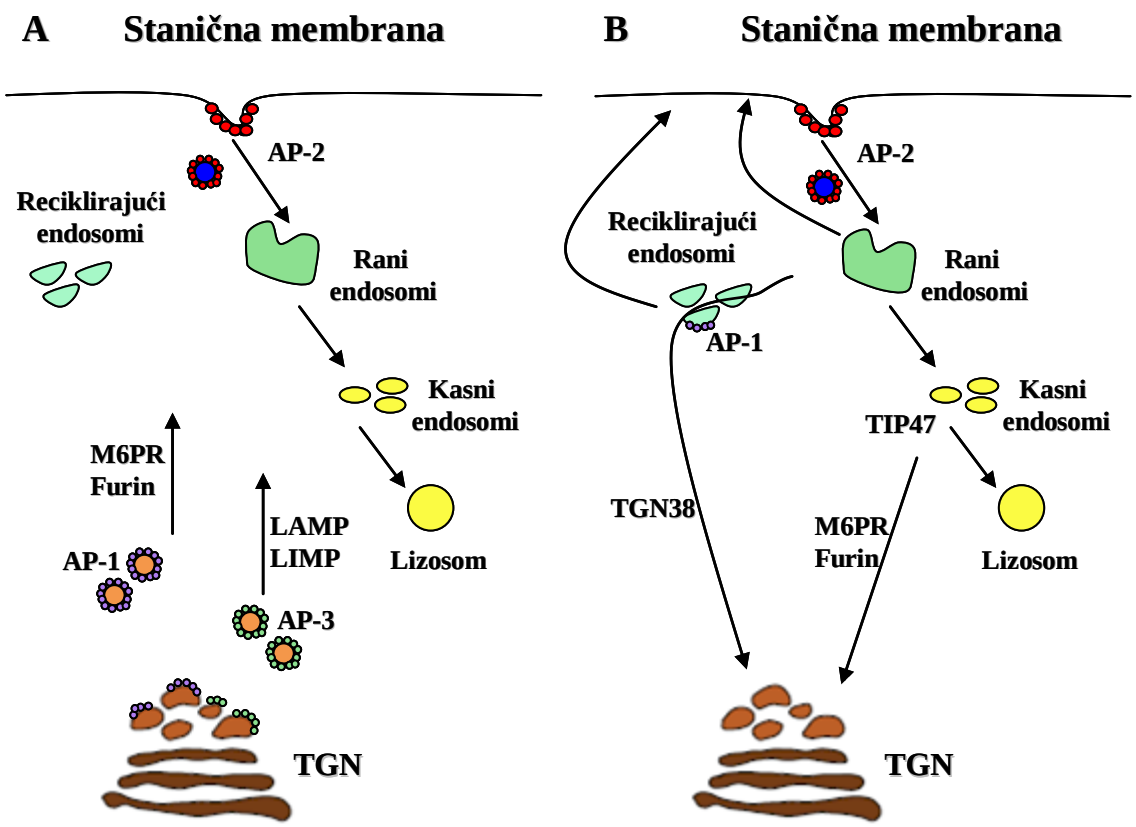
Slika 6. Poslije-endocitozni putovi internaliziranih molekula.

TfR veže svoj ligand Tf, LDLR veže LDL te CI-6MPR vezuje lizosomalne enzime. Svi ovi membranski proteini se koncentriraju u klatrinskim mjehurićima te se inicijalno odvode u sortirajuće endosome poput furina i TGN38. Od tamo odlaze u ERC ili u kasne endosome odnosno lizosome. Iz ERC molekule se mogu usmjeravati ili u TGN ili natrag na staničnu membranu. Iz TGN odlaze u kasne endosome ili lizosome. $t_{1/2}$ vrijednost su okvirne i ovise o tipu stanica (prilagođeno prema referenci 71).

1.2.1.4. Uloga trans-Golgi mreže

Kao što je već navedeno, molekule iz ERC-a mogu putovati ili natrag na staničnu membranu ili u TGN pomoću specifičnih proteina Rab11 i Eps15. Transport u bilo kojem smjeru pogođen je kada se promijeni aktivnost nekog od tih proteina. Ipak, treba naglasiti, vjerojatno postoji nekoliko ruta kojima molekule iz endosomalnog puta ulaze u TGN.

TGN je glavna sortirajuća postaja biosintetskog puta, gdje se novo-sintetizirani solubilni i transmembranski proteini, kao i lipidi, sortiraju te transportiraju na različita unutarstanična odredišta: na staničnu membranu, u sekretorne mjehuriće endokrinih stanica ili u endosomalni sistem. Bez obzira gdje se molekule usmjeravaju, potrebna im je pomoć citoskeletnih elemenata, prvenstveno mikrotubula. Nekoliko transmembranskih proteina koristi se kao biljege sortiranja unutar TGN-a. Postoje dvije skupine takvih proteina. Prvu skupinu čine proteini koji su u dinamičkoj ravnoteži između TGN-a, endosoma i stanične membrane te prolaze nekoliko ciklusa proteinskog sortiranja (83). Najvažniji predstavnici su manoza 6-fosfat receptori (M6PR). U TGN-u, M6PR-i sortiraju novosintetizirane solubilne lizosomalne hidrolaze, koje se zatim usmjeravaju u kasne endosome. Tu se hidrolaze odvajaju od svojih receptora M6PR-i i odlaze u lizosome. M6PR se iz endosoma recikliraju natrag u TGN (slika 6). Endoproteaza furin i TGN38 slijede sličan uzorak kompleksnog transporta (slika 6). Adapterski protein, AP-1A, koji se nalazi u TGN-u posreduju transport M6PR i furina u endosome. Također posreduje transport TGN38 natrag u TGN. U retrogradnom transportu M6PR sudjeluje mala GTPaza Rab9 i njezina efektorska molekula TIP47 (engl tail-interacting protein of 47 kDa). Rab9 je povezan kako s kasnim endosomima tako i s mjehurićima koji pupaju iz kasnih endosoma i spajaju se s TGN-om. Na taj način sudjeluje u retrogradnom transportu M6PR-a. Drugu skupinu čine transmembranski proteini koji se sortiraju u TGN-u, ali ne recikliraju natrag u njega. Najvažniji predstavnici su membranski lizosomalni glikoproteini LAMP i LIMP. Oni odlaze u endosomalne odjeljke putem ovisnim o adapterskom proteinu AP-3A i potom se transportiraju u lizosome. Dakle, AP-3A ima ulogu usmjeravanja molekula iz TGN-a u lizosome, ali i iz endosoma u lizosome (84).



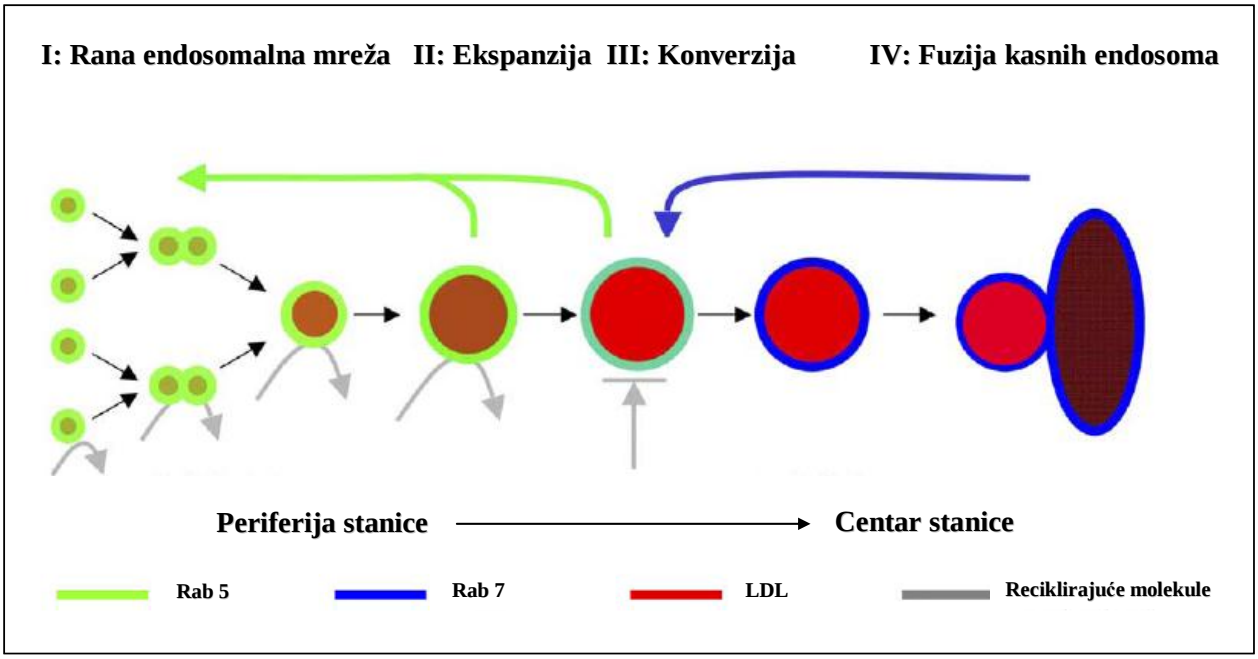
Slika 7. Anterogradni i retrogradni transport u trans-Golgijevoj mreži.

U anterogradnom transportu AP-1 i AP-3 posreduju u prijenosu molekula u endosomalne odjeljke. Iz TGNa M6PR i furin ulaze u endosome AP-1 ovisnim putem, a LAMP i LIMP AP-3 ovisnim putem koji se potom prenose u lizosome (A). U retrogradnom prijenosu dolazi do povratka proteina iz endosomalnih odjeljaka natrag u TGN ili iz reciklirajućih endosoma (TGN38) ili iz kasnih endosoma (M6PR i furin). Recikliranje iz ranih/reciklirajućih endosoma posredovano je AP-1, a recikliranje M6PR-a iz kasnih endosoma TIP47 (B) (prilagođeno prema referenci 84).

1.2.1.5. Kasni endosomi, lizosomi i degradacija

Molekule se nakon endocitoze mogu između ostalog, usmjeravati u degradaciju te postaju sastavni dio kasnih endosoma nakon njihove maturacije iz ranih endosoma. Vezikule koje služe kao prijenosnici između ova dva odjeljka su multivezikularna tjelešca (engl. multivesicular bodies; MVBs), poznate još i kao endosomalne prijenosne vezikule (engl. endosomal carrier vesicle; ECV) (85). Osim iz EE, u ove endosome mogu doći i molekule direktno iz TGN-a. LE su prelizosomalne endocitozne organele definirane prema vremenu koje je potrebno da se endocitirane molekule transportiraju u njih. Iako vrijeme transporta može varirati između tipova stanica i između stanica u kulturi i u tkivu, LE se obično pune 4-

30 min nakon endocitoznog unosa u stanicama sisavaca. Gledano elektronskim mikroskopom, LE su visokopolimorfne strukture s cisternalnim, tubularnim i multivezikularnim dijelovima koji su više sferični u odnosu na EE te su uglavnom smješteni jukstanuklearno, u neposrednoj blizini mikrotubuli- organizirajućeg centra (engl. microtubule organizing center; MTOC). Za razliku od EE, imaju izgled multivezikularnih tijela. Oni se razlikuju od EE svojim nižim luminalnim pH, različitim proteinskim sastavom i povezanošću s različitim malim GTPazama iz obitelji Rab, a od lizosoma jer su bogati s manoza 6-fosfat receptorom (M6PR-om), koje lizosomi uopće nemaju. Molekule se iz LE mogu usmjeravati u lizosome na degradaciju, reciklirati u TGN (TGN38, M6PR) pomoću Rab9 proteina ili se u specifičnim stanicama transportirati natrag na staničnu membranu ili se egzocitozom izbaciti iz stanice u vanstaničnu tekućinu (86). LE imaju na svojoj površini izražene lizosom-povezane membranske proteine 1 i 2 (engl. lysosome-associated membrane proteins 1 and 2; LAMP-1 LAMP-2), kao i lizosomi; proteine koji se nalaze isključivo u njihovim graničnim vanjskim membranama. U svojim unutarnjim membranama sadrže velike količine lizobisfosfatidne kiseline (engl. lysobisphosphatidic acdi; LBPA). LBPA se nalazi u velikim količinama upravo u LE, ali nije prisutna u ostalim staničnim odjeljcima (87). Za sazrijevanje LE vodeću ulogu ima Rab7. Već je prije navedeno da prilikom sazrijevanja endosoma dolazi do stvaranja konvertirajućeg endosoma koji predstavlja jedna stadij razvoja prema LE. Njegove karakteristike su postepeno gubljenje Rab5 te postepeno dobivanje Rab7 (88) (slika 8).



Slika 8. Model dinamike ranih endosoma u kasne endosome.

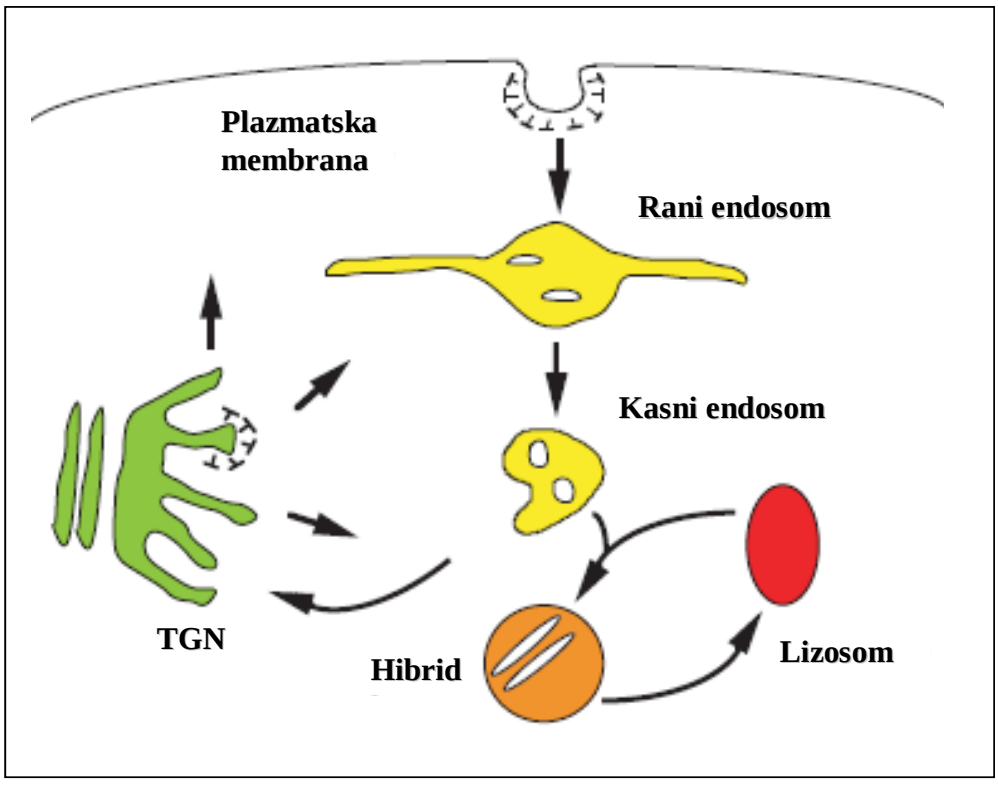
Sazrijevanje ranih endosoma u kasne endosoma odvija se u stanici pomoću postepene pretvorbe Rab5 u Rab7 molekulu (prilagođeno prema referenci 88).

Molekule koje se usmjeravaju u kasne endosome:

1. EGF i EGFR
    - engl. epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor
    - skupa se internaliziraju mehanizmom klatrin-ovisne endocitoze
    - kao kompleks se usmjeravaju u kasne endosome i lizosome u proces degradacije
2. LDL
    - engl. low density lipoprotein
    - ligand koji se vezuje za LDLR
    - zajedno s njim u stanicu ulazi mehanizmom klatrin-ovisne endocitoze
    - LDLR se reciklira (jednako kao i TfR), dok se LDL usmjerava u LE i lizosome
    - degradira se (89)
3. M6PR
    - oko 80% internaliziranog M6PR se prenosi u TGN odakle putuje u kasne endosome iz kojih se može vratiti u TGN ili reciklirati natrag na staničnu površinu

- vezuje lizosomalne enzime i prenosi ih iz TGN-a u LE

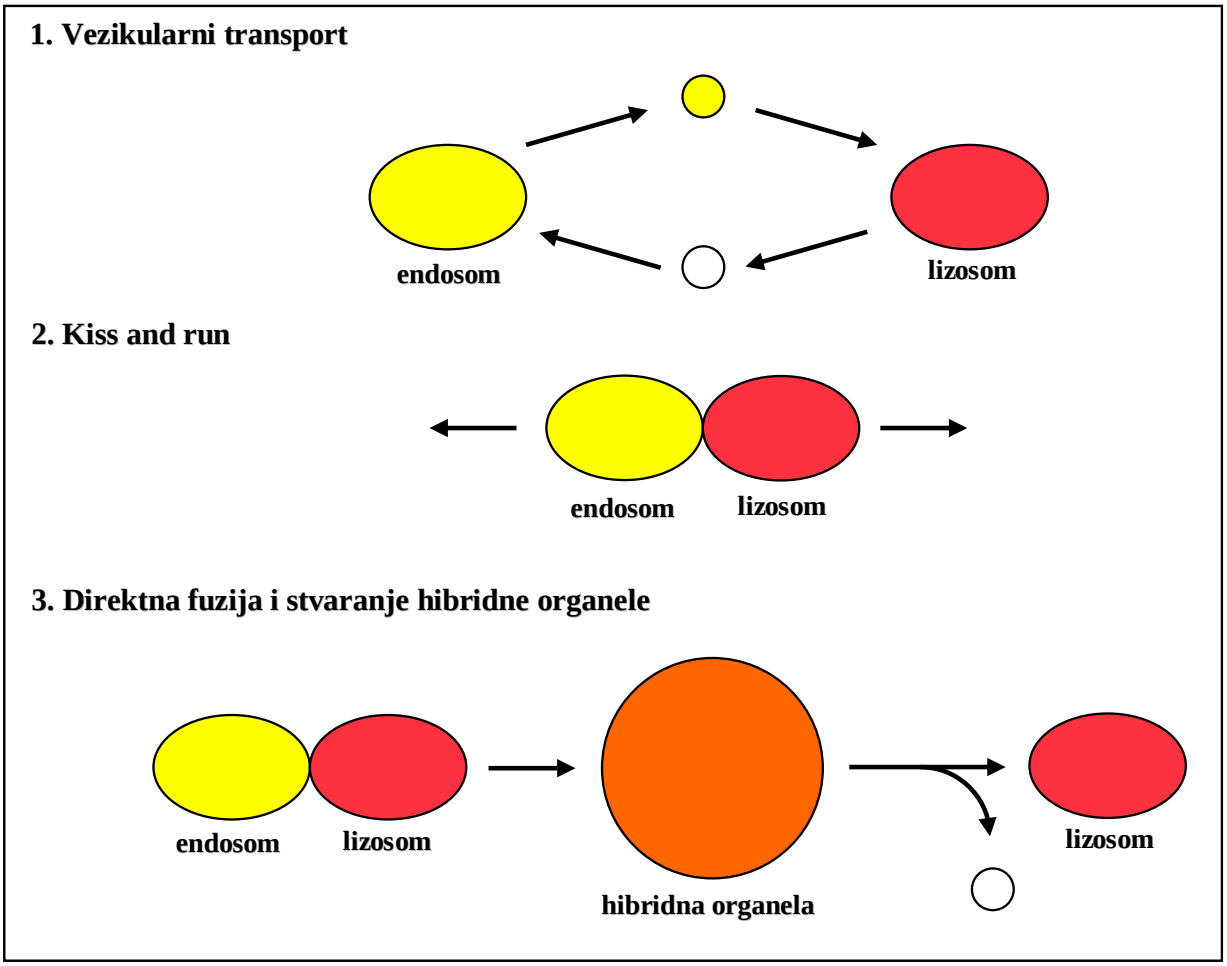
Nakon što su se molekule preodređene za degradaciju usmjerile u kasne endosome slijedi njihov transport prema lizosomima (slika 9). Lizosomi su unutarstanične organele, promjera do 0.5μm, sadrže mnogobrojne hidrolitičke enzime koji su optimalno aktivni pri kiselom pH. Uobičajeno se smatraju terminalnim degradacijskim odjeljkom endocitoznog puta. Mogu činiti 0.5-5% volumena stanice te se poput kasnih endosoma koncentriraju oko mikrotubuli-organizirajućeg centra (MTOC-a). Da bi ih se razlikovalo od kasnih endosoma potrebno je prisustvo lizosomalnih integralnih membranskih proteina (engl. lysosomal integral membrane proteins; LIMPs), lizosomalnih kiselih hidrolaza te odsustvo M6PR-a kao i odsustvo reciklirajućih površinskih staničnih receptora.



Slika 9. Model endocitoznog transporta u lizosome.
Nakon što su se molekule preodređene za degradaciju usmjerile u kasne endosome slijedi njihov transport prema lizosomima uz prethodno stvaranje hibridne organele (prilagođeno prema referenci 90).

Istraživanje prijenosa endocitiranih molekula iz LE u lizosome ometa činjenica da su mnoge makromolekula razgrađene vrlo brzo nakon što dođu u doticaj s degradacijskim okolišem u LE. Stoga je predloženo nekoliko teorija koja opisuju mehanizam prijenosa. Prema prvoj teoriji, vezikularnoj teoriji, od LE se odvajaju mjehurići koji sadrže materijal koji je usmjeren

u degradaciju i taj materijal prenose do lizosoma. Druga teorija, "kiss-and-run", predlaže kontinuirano ponavljanje fuzije i fisije između LE i lizosoma. To je model prema kojemu dolazi do fuzije LE i lizosoma ("kiss"), izmjene materijala između ta dva odjeljka te se LE ponovno odvaja ("run") od lizosoma i putuje natrag kako bi preuzeo novi materijal. Posljednja, treća teorija predlaže tzv. hibridni model prema kojemu dolazi do direktne i kompletne fuzije LE i lizosoma te nastanka kasni endosomi-lizosomi hibridne organele. Hibridna organela sadrži komponente kako LE (M6PR), tako i lizosoma (katepsin L) i promjera je do 0.96μm. Lizosomi se nakon toga reformiraju putem uklanjanja kasnih endosomalnih komponenti (slika 9 i 10).



Slika 10. Teorije prijenosa endocitiranog materijala iz kasnih endosoma u lizosome.
Objašnjenje u tekstu (prilagođeno prema referenci 90).

Elektronska mikroskopija pokazala je da je najvjerojatnija teorija fuzije koja se odvija u tri koraka (slika 11).

1.Povezivanje

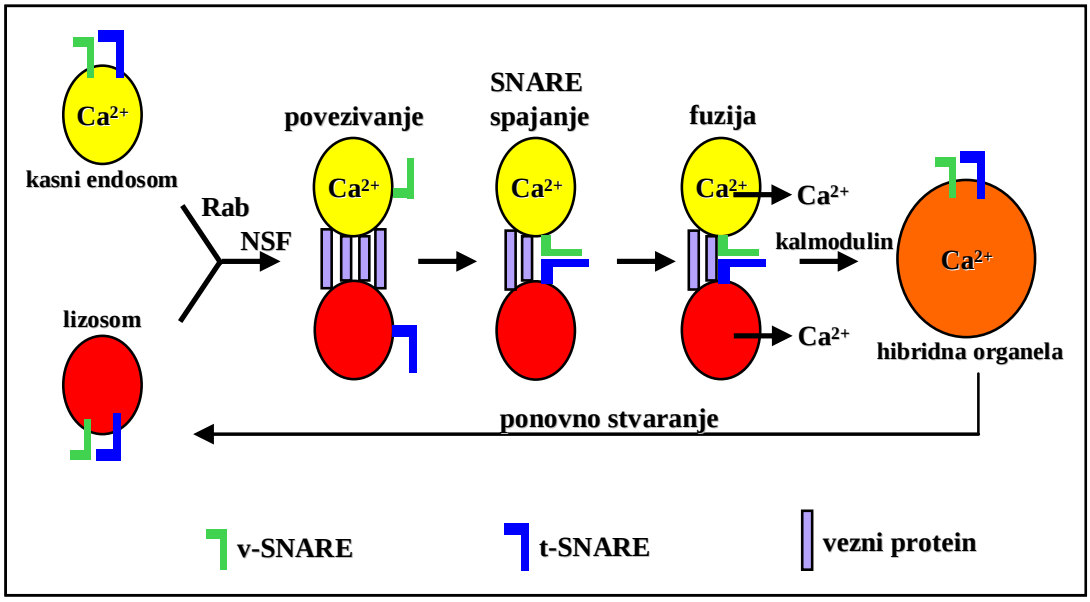
- između dviju organela stvaraju se veze na udaljenosti > 25 nm
- potreban je Rab7 protein

2. SNARE spajanje (assembly)

- SNARE kompleks (SNAP receptor; SNAP = soluble NSF attachment proteins; NSF = N-ethylmaleimide sensitive factor)
- spajanje v-SNARE (engl. vesicle SNARE) kompleksa za kasni endosom
- spajanje t-SNARE (engl. target organelle SNARE) kompleksa za lizosom

3. Fuzija

- Ca^{2+} posredovana fuzija fosfolipidnih dvosloja koja zahtijeva izlazak Ca^{2+} iz stanice za što je potreban kalmodulin



Slika 11. Mehanizam fuzije kasni endosom-lizosom.

Povezivanje kasnog endosoma i lizosoma uz pomoć proteina prethodi SNARE spajanju i fuziji za koju je neophodno otpuštanje Ca^{2+} iz lumena staničnih organela (prilagođeno prema referenci 90).

Do sada najbolje razjašnjen mehanizam koji odvodi proteine u degradaciju, bilo iz biosintetskog ili endocitoznog puta je njihova ubikvitinizacija. Vezivanje ubikvitina za protein jako korelira s njegovom degradacijom. Ubikvitinizacija ne pomaže samo u uništavanju oštećenog proteina, nego, u stanicama sisiavaca, i u regulaciji izražaja različitih površinskih

staničnih receptora poput EGFR-a, receptora za faktor rasta trombocita (engl. platelet-derived growth factor receptor; PDGFR) i receptora za interleukin 1 (engl. interleukin 1 receptor; IL-1R). Ova modifikacija proteina odgovorna je za njihovo sortiranje u lumenu novostvorenih MVB. Proces sortiranja odvija se prije fuzije LE i lizosoma. Posredovan je citoplazmatskim endosomalnim sortirajućim kompleksima potrebnim za transport (engl. endosomal sorting complexes required for transport; ESCRT) te njihovim pridruženim proteinima (engl. ESCRT-associated proteins) (91). MHC-I molekule imaju u svom citoplazmatskom repu dva do tri lizina. Upravo vezivanje ubikvitina na lizin početni je signal za odvođenje MHC-I molekula u proces degradacije (92).

Tablica 2. Sumarna tablica obilježja različitih endosoma.

	Rani endosomi			
Obilježja	**Sortirajući**	**Reciklirajući**	**MVBs**	**Kasni endosomi**
Lokalizacija	periferno	periferno do perinuklarno	difuzno u citoplazmi	perinuklearno
Morfologija	tubulo-vezikularna	tubularna	sferična	tubulo-vezikularna
pH u lumenu	6.2	6.5	5.5	5.5
GTP-vezujući protein	Rab4 Arf6, Rab5	Rab11	–	Rab7, Rab9
Receptori i drugi membranski proteini	TfR		–	M6PR

Detaljan opis obilježja pojedinih endosomalnih struktura (prilagođeno prema referenci 93).

1.2.2. Inhibitori vezikularnog transporta

Tablica 3. Inhibitori vezikularnog transporta

INHIBITOR	UČINAK	MEHANIZAM DJELOVANJA	REFERENCA
Brefeldin A	narušava integritet Golgijevog aparata, čime njegov sadržaj prelazi u ER	uzrokuje brzu preraspodjelu β-KOP i γ-adaptina iz GA, ali vjerojatno još i nekih drugih proteina	94
Nokodazol	uzrokuje sporo raspršivanje GA; sprječava prijenos iz EE u LE, te dovodi do nakupljanja u ECV (ovisno o vrsti stanice)	depolimerizira mikrotubule	95
Amonij klorid	sprječava degradaciju	povećava pH u endosomima	96
Laktacistin	inhibira degradiju	Inhibira proteasomalne enzime	97
Leupeptin	inhibira degradaciju	inhibira serinske i cisteinske proteaze u lizosomima	97

endosomalni prijenosni mjehurić (engl. endosomal carrier vesicle; ECV), kompleks obložnih proteina-KOP.

1.2.3. Membranske mikrodomene

Domene predstavljaju omeđena područja membrane koja se svojim posebnim fizikalnim obilježjima razlikuju od ostalih dijelova. To su dinamičke strukture u koje molekule ulaze, ali i iz kojih izlaze prema određenim pravilima ravnajući se prvenstveno prema odgovarajućim protein-proteinskim i protein-lipidnim međudjelovanjima (98).

Lipidi su vrlo važan sastavni dio membrane, kako stanične, tako i one unutarstaničnih organela te upravo njihov sastav i raspored određuju stupanj njezine uređenosti. Membrana eukariota posjeduje >500 različitih vrsta lipida (neutralni glicerolipidi, glicerofosfolipidi, ceramidi, glikosfingolipidi i sfingomijelini), a vrlo važna lipidna komponenta u staničnoj membrani je kolesterol (ergosterol u kvasca). Ovisno o njihovoj organiziranosti možemo govoriti o membranskim organiziranim (lipidne splavi) i neorganiziranim dijelovima.

1.2.3.1. Lipidne splavi

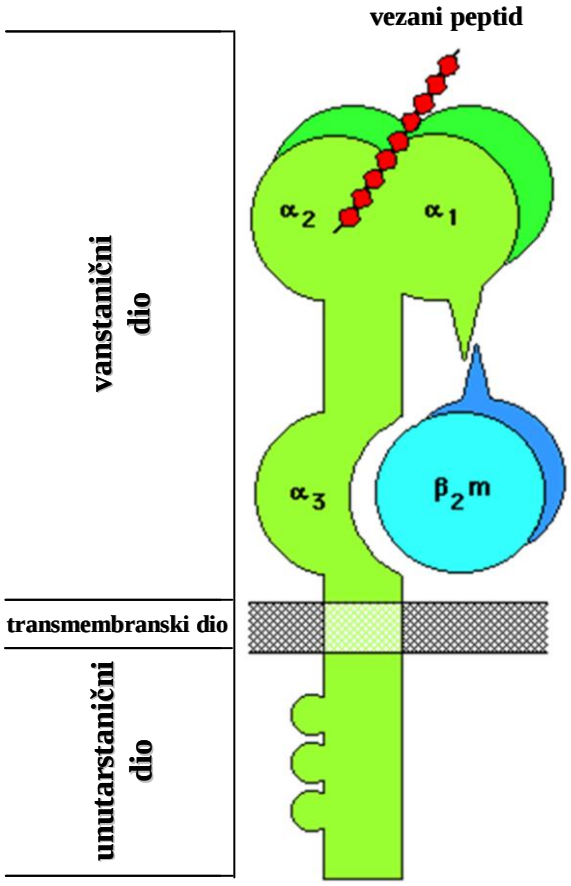
Lipidne splavi se često definiraju kao dio dobro organiziranih membranskih mikrodomena koje se sastoje od koncentriranog kolesterola, saturiranih lipida i što je najvažnije različitih signalnih proteina kao što su GPI-usidreni proteini, receptori za faktore rasta, integrini, G proteini, Src obitelj kinaza itd. (99). Osim u vanstaničnom sloju stanične membrane, nalaze se u ranim endosomima, reciklirajućim endosomima te TGN-u (100). Lipidne splavi se u naravi sastoje od lipidnog i nelipidnog (primarno proteinskog dijela). Lipidni dio čine fosfolipidi sa zasićenim acilnim ostacima, kolesterol, glikosfingolipidi i sfingomijelin te ceramid. Nelipidni dio čine proteini trajno smješteni u lipidnim splavima (101) (kaveolini, flotilini/reggie, raftilin, sinaptofizin, prominin) i proteini djelomično ili privremeno smješteni u lipidnim splavima (101) poput CD44 (102), MHC-II molekula (103), visokoafinitetnog receptora IgE (FcεRI), staničnih receptora T- i B- limfocita (TCR i BCR) (104). Mnoge metode su razvijene u svrhu istraživanja i vizualiziranja lipidnih splavi. Korištenje neionskih deterđenata, kolokalizacija s biljezima lipidnih splavi, uklanjanje kolesterola, imunofluorescentne tehnike (*engl. fluorescence resonance energy transfer*; FRET i engl. *fluorescence recovery after photobleaching; FRAP*), elektronska mikroskopija, spektroskopske metode samo su neke od metoda. Od neionskih deterđenata najčešće se koriste Triton X-100 (TxT-100), Tween 20%, Brij58 i drugi. Lipidne splavi netopljive su u neionskim deteđentima zbog jakih lipid-lipid veza, nalaze se u deterđent-rezistentnim membranskim mikrodomenama (engl. detergent-resistant membrane, DRM). Pokušavaju se vizualizirati, primarno pomoću konfokalne mikroskopije kolokalizacijom s odgovarajućim biljezima (npr. GM_1 koji se detektira nakon vezivanja toksina kolere, ili Gb3 nakon vezivanja shiga toksina te protutijela na aneksine i flotiline kao biljege lipidnih splavi s citoplazmatske strane) (105). Kolesterol je važan za održavanje integriteta lipidnih splavi, stoga njegovo uklanjanje za posljedicu ima poremećaj integriteta. Također može doći i do promjene u staničnoj morfologiji, egzocitozi i prijenosu te do dezintegracije aktinskog citoskeleta, što rezultira velikim brojem pleotropnih učinaka (106). Tvari koje se koriste u uklanjanju kolesterola su ciklodekstrini, statini i polieni antibiotici (107). Ciklodekstrini uklanjaju kolesterol, statini inhibiraju sintezu kolesterola, dok polieni antibiotici stvaraju komplekse sa sterolima. Vjeruje se da lipidne splavi funkcioniraju kao lipidna platforma, a endocitoza koja se odvija unutar njih služi kao negativni regulator signalnih događaja.

1.3. MHC molekule I. razreda

Različiti mikroorganizmi nakon ulaska u stanicu domaćina pronalaze mnogobrojne načine kojima pokušavaju izbjeći imunološki odgovor. Stanice pak, kako bi ukazale na prisutnost stranih organizama, na svojoj površini predočavaju njihove peptide u sklopu molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. mayor histocompatibility complex; MHC) u procesu antigenskog procesiranja i predočavanja. MHC molekule dijele se u dva razreda, I. razred i II. razred (108). MHC-I molekule izražene su na površini većine stanica s jezgrom. Imaju sposobnost vezivanja endogenih antigena koje potom izažavaju na površini stanice predočavajući ih citotoksičnim $CD8^+$ limfocitima T (CTL). Također sudjeluju u staničnom prepoznavanju od strane prirodno-ubilačkih stanica (engl. Natural Killer; NK). S druge strane, MHC-II molekule predočavaju egzogene petidne dijelove, a nalaze se na antigen predočnim stanicama koje aktiviraju imunološki sustav, prvenstveno pomagačkim $CD4^+$ limfocitima T.

1.3.1. Građa MHC molekula I. razreda

MHC-I molekule normalno su izražene kao heterotrimerni kompleksi. Sastoje se od glikoziliranog transmembranskog teškog lanca (engl. heavy chain; HC) (45 kDa) na koji su nekovalentno vezani β_2-mikroglobulin (β_2-m) (12 kDa) i kratki peptid od 8 do 10 aminokiselina (109). Teški lanac sastoji se od tri domene (α1-α3) od oko 90 aminokiselina, jednog hidrofobnog transmembranskog segmenta i kratkog citoplazmatskog repa od oko 30-40 aminokiselina (slika 12). Domene α1 i α2 sastoje se od dvije α-uzvojnice postavljene na plohi od 8 β–nabranih ploča, stvarajući utor za vezivanje peptida koji sadrži džepove u koje se smještaju određeni aminokiselinski postranični lanci, nazvani 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 vanstanične domene su u dodiru s β_2-m, a većina antigenskih determinanti se nalazi u domenama α1 i α2. Peptid postaje integralni dio strukture MHC-I molekule i igra važnu ulogu u sastavljanju, stabilnosti, i prijenosu MHC-I molekula (110).



Slika 12. Građa MHC molekula I razreda.

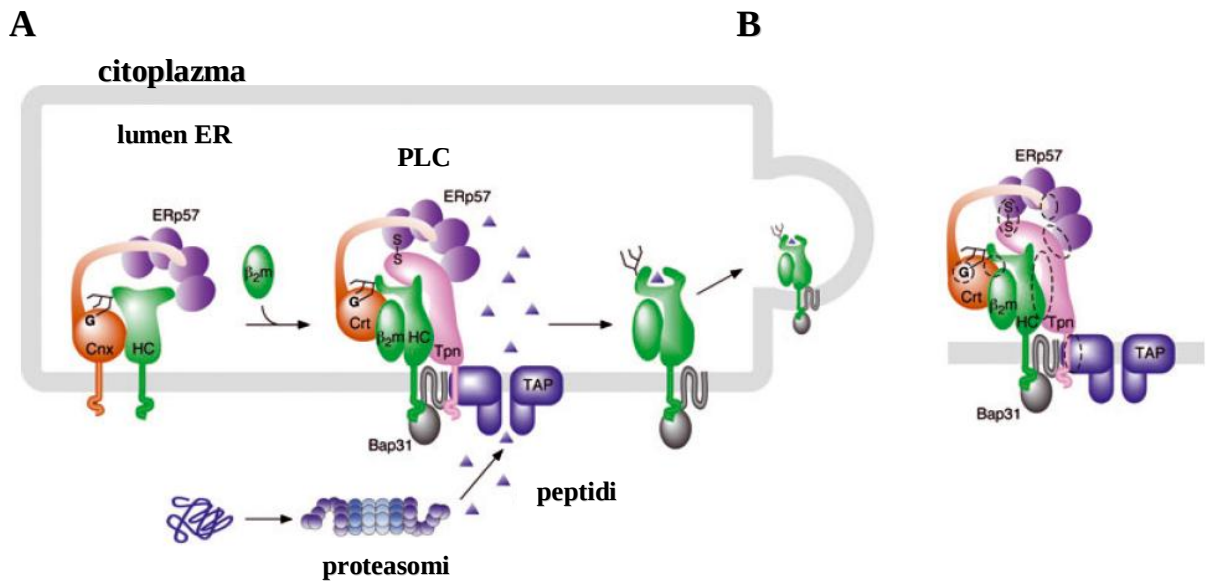
MHC-I molekule normalno su heterotrimerni kompleksi koji se sastoje od transmembranskog teškog lanca, α_2-mikroglobulina i peptida (prilagođeno prema referenci 111).

1.3.2. Sinteza MHC molekula I. razreda

1.3.2.1. Klasičan put sinteze MHC molekula I. razreda

Vrlo bitna činjenica za funkcioniranje i stabilnost MHC-I molekula njihova je izvanredna sposobnost vezivanja raznolikog niza peptida s visokim afinitetom, koja onemogućuje njegovo odvajanje duž sekretornog puta ili tijekom produljenog prikazivanja na površini stanice. MHC-I molekule uglavnom predočavaju peptide endogenog porijekla koji su prvenstveno porijeklom iz citosolnih i jezgrinih proteina, a nastaju djelovanjem multikatalitičkog proteinaznog kompleksa – proteasoma. Sklapanje MHC-I molekula kao i kontrola njihove kvalitete odvija se u ER-u. Novo sintetizirani teški lanac (HC) vezuje se na šaperon kalneksin (engl. calnexin; Cnx) i njemu pridruženi ERp57. Cnx ima ulogu u

zadržavanju teških lanaca u ER-u, njihovu svijanju te stvaranju disulfidnih mostova i poticanju vezivanja s β_2m. Nakon vezanja β_2m, većina HC-β_2m heterodimera je nestabilna što zahtijeva ulazak u peptid utovarni kompleks (engl. peptide loading complex; PLC), gdje se postiže stabilnost, ali i vezivanje peptidnog liganda visokim afinitetom. PLC kompleks sastoji se od teškog lanca, β_2m, ERp57, kalretikulina (engl. calreticulin; Crt), šaperona tapasina (engl. tapasin; Tpn) i TAP kompleksa (engl. transporter associated with antigen processing; TAP). Tapasin je šaperonska molekula, koja posjeduje neovisna vezna mjesta za prazne MHC-I molekule (domene α_2 i α_3), kao i za TAP (112), te između njih stvara fizičku vezu. TAP kao heterodimer, sastoji se od dvije TAP1 i TAP2 podjedinice koje u njegovoj membrani stvaraju poru, koja služi za prijenos peptida iz citosola u unutrašnjost endoplazmatske mrežice. Takvim koncentriranjem MHC-I molekula uz TAP kompleks povećava se vjerojatnost da će peptid susresti praznu MHC-I molekulu, te zadržava nepotpuno sklopljene MHC-I molekule u endoplazmatskoj mrežici. Nadalje, vezivanjem α domene teškoga lanca, tapasin održava mjesto za vezanje peptida prazne MHC-I molekule u nestabilnoj "otvorenoj" konformaciji. Osim toga, smatra se da bi mogao imati ključnu ulogu u stabilizaciji i transformaciji praznih MHC-I molekula u stanje koje vezuje peptid. Peptidi koji se vežu na MHC-I molekule nastaju degradacijom poliubikvitiniliranih proteina na proteasomima. Nakon razgradnje na proteasomima, peptidi se prenose u ER pomoću TAP kompleksa. Najučinkovitije se prenose peptidi veličine 8-10 aminokiselina, nastali cijepanjem pomoću ER-aminopeptidaza. Kada peptidi uđu u ER, tamo ih čekaju podjedinice MHC-I molekula; teški lanac i β_2-m. Nakon vezivanja peptida dolazi do promjene konformacije MHC-I molekula. S obzirom da citoplazmatskom repu većine MHC-I molekula nedostaje anterogradni prijenosni signal, njihovo otpuštanje iz ER-a uključuje vezivanje molekule Bap31 koja ulazi u interakciju sa teškim lancem i tapasinom. Potom se oslobađaju, samo stabilno konformirane trimolekularne MHC-I molekule iz PLC kompleksa, pakiraju u COPII mjehuriće i otpuštaju iz ER-a. Potom odlaze do Golgijeve mreže (gdje se dovršava N-vezana glikozilacija) te se prenose do stanične površine gdje mogu predočiti antigenski peptid (slika 13). Nasuprot tome, nepotpuno sklopljeni kompleksi se translokacijom prenose u citoplazmu te se degradiraju na proteasomima (113).



Slika 13. Unutarstanično sklapanje i kontrola kvalitete MHC-I molekula.

A) Novosintetizirani teški lanac MHC-I molekule inicijalno se veže za šaperon kalneksin te dolazi do posljedičnog vezivanja β_2m. Potom se formira PLC kompleks koji se sastoji od teškog lanca, β_2m, ERp57, kalretikulina, šaperona tapasina i TAP kompleksa. B) Interakcije koje stabiliziraju PLC kompleks. Tapasin stvara mnogobrojne kontakte unutar PLC kompleksa: transmembranska interakcija sa TAP-om, na dva mjesta sa teškim lancem MHC-I molekula te interakcije sa ERp57 i Bap31 (prilagođeno prema referenci 109).

1.3.2.2. Alternativni put aktivacije MHC molekula I. razreda

Većina MHC-I molekula predočavaju antigene endogenog porijekla, prethodno opisanim načinom, međutim postoji mogućnost predočavanja i antigena egzogenog porijekla. U tom procesu prvenstveno sudjeluju antigen-predočne stanice (engl. antigen presenting cells; APCs). Pretpostavka je da je makropinocitoza glavni put predočavanja egzogenog peptida MHC-I molekulama, dok endocitoza posredovana receptorom pretpostavlja predočavanje istog peptida MHC-II molekulama u makrofazima (114).

Razlikuju se dva osnovna mehanizma predočavanja egzogenog peptida MHC-I molekulama:

1. Put ovisan o TAP kompleksu
2. Put neovisan o TAP kompleksu

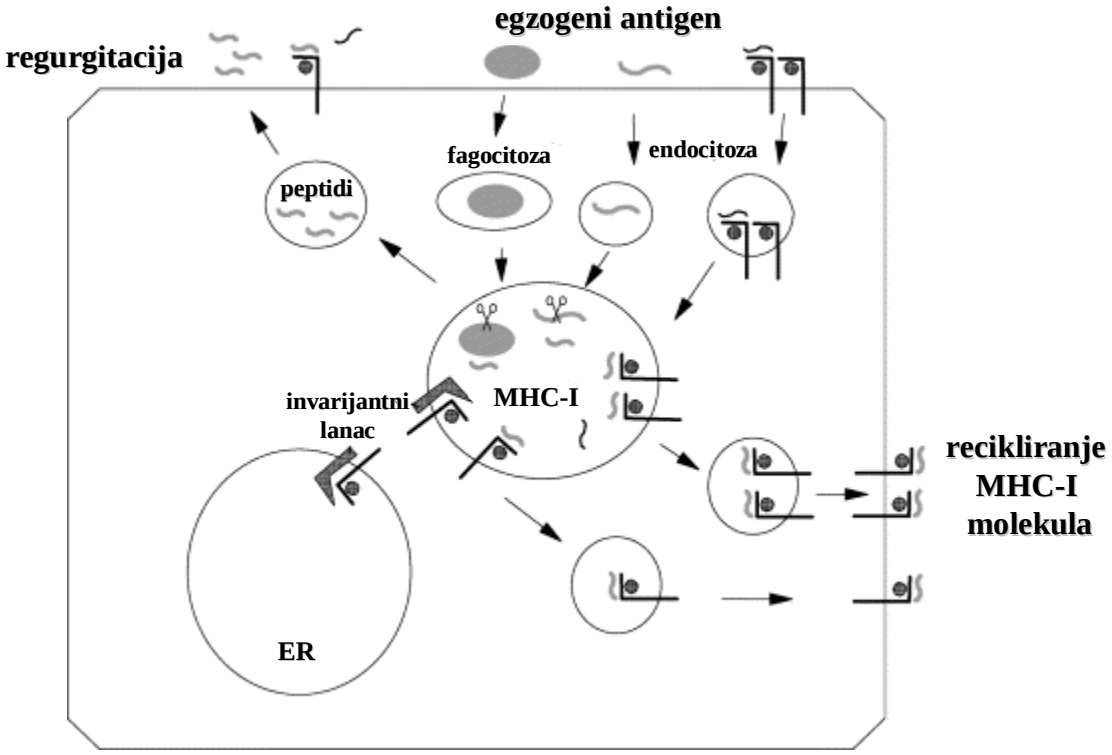
1.3.2.2.1. Put ovisan o TAP kompleksu

Ovaj put slijede oni egzogeni peptidi koji u osnovi ne nastaju u endosomalnim/lizosomalnim odjeljcima, a za njihov nastanak potrebna je aktivnost TAP kompleksa i proteasoma (slika 13). Stoga se pretpostavlja da nedirnuti odlomci peptida ili fagocitirani egzogeni antigeni dospijevaju u citosol, degradiraju se na proteasomima, potom ulaze u ER te nastavljaju klasični put stvaranja zrelih MHC-I molekula (115).
Različite tvari iz endosomalnih i fagosomalnih odjeljaka mogu prijeći u citosol bez narušavanja integriteta membrane odjeljka, ali i kao posljedica prevelike fagocitoze i gubitka integriteta membrane fagolizosoma.

1.3.2.2.2. Put neovisan o TAP kompleksu

Iako je put ovisan o TAP kompleksu dominantni izvor kompleksa MHC-I molekula i peptida na površini stanice, postojanje alternativnog puta poznato je preko nekoliko desetljeća. Postoji do sada opisana tri načina predočavanja egzogenih antigena citotoksičnim $CD8^+$ limfocitima T u odsutnosti TAP kompleksa. Egzogeni antigen se degradira u kiselim endosomalnim odjeljcima uz pomoć proteaza koje su aktivne pri niskom pH. Ovakav način predočavanja inhibira se pomoću lizosomotropnih tvari koje ili blokiraju endosomalno zakiseljavanje (klorokin, amonij-klorid) ili inhibiraju kisele proteaze (leupeptin) što još jednom upućuje na činjenicu da se ovdje prerada antigena odvija u endosomalnim/lizosomalnim odjeljcima. Prvi način navodi da peptidi koji nastaju u endosomalnim odjeljcima, mogu se izbaciti u vanstaničnu tekućinu (engl. regurgitation) nakon čega slijedi njihovo ponovno vezivanje za MHC-I molekule ili na površini iste ili susjedne stanice (slika 14). Pretpostavka je da se peptid za njih može vezati iz razloga jer su one prazne (nemaju do sada za sebe vezani peptid) ili imaju vezani peptid, ali sa vrlo slabim afinitetom. Ovaj proces je značajan za makrofage koji fagocitiraju komplekse, primjerice HbsAg agregate ili su stimulirani IFN-γ i inficirani *S. typhimurium* (116, 117). Drugi način je punjenje MHC-I molekula unutar samih endosomalnih odjeljaka. Novo-sintetizirane MHC-I molekule dosežu ovaj odjeljak direktnim prijenosom iz ER-a, procesom koji bi mogao uključivati povezivanje s invarijantnim lancem (118) (slika 14). Treći način je vezivanje peptida za MHC-I molekule koje su stigle u endosomalne odjeljke kao posljedica vlastite internalizacije. Pretpostavka je da su internalizirane MHC-I molekule već napunjene peptidom, ali da se pri niskom pH peptid odvaja iz tog kompleksa, dopuštajući izmjenu s drugim peptidima prisutnim u endosomima, što je potvrđeno pokusima *in vitro* (118). Nakon

peptidne izmjene ove MHC-I molekule najvjerojatnije recikliraju natrag na staničnu površinu (slika 14).



Slika 14. Alternativni TAP neovisan put aktivacije MHC molekula I. razreda.

Egzogeni peptid se može vezati na MHC-I molekule procesom regurgitacije (a), dospijećem novosintetiziranih MHC-I molekula u endosomalne odjeljke (b), nakon internalizacije u kiselim endosomalnim odjeljcima (c) ili ulaskom u ER na način neovisan o TAP kompleksu (d) (prilagođeno prema referenci 118).

Sve to dovodi do pitanja mehanizama vezivanja peptida, odnosno β_2-m, za teški lanac MHC-I molekula. Naime, poznato je da tijekom klasičnog puta vrlo važnu ulogu imaju razne šaperonske molekule koje djeluju prvenstveno u endoplazmatskoj mrežici, a one su najvjerojatnije odsutne tijekom alternativnih načina; pogotovo neovisnih o TAP kompleksu. Smatra se da se vezivanje β_2-m na teški lanac najvjerojatnije događa u procesu peptidne izmjene (119). Tom procesu bi bile podložnije one MHC-I molekule koje vezuju β_2-m slabijim afinitetom, primjerice molekule L^d, ali niti drugi aleli ne mogu biti isključeni. Vezivanje peptida, s druge strane, upućuje na mogućnost njegovog vezivanja na 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.

1.3.2.2.3. TAP inhibitori

Virusi su razvili nekoliko mehanizama kojim interferiraju sa antigenskom prezentacijom u sklopu MHC-I molekula sa svrhom izbjegavanja imunološkog odgovora. Njihovi proteini, pogotovo proteini izraženi u najranijoj fazi, mogu blokirati aktivnost TAP-a ili inhibirati vezivanje peptida. Kada su snižene razine TAP-a u kasnijim fazama infekcije, TAP neovisni epitopi su jedini prezentirani na površini inficirane stanice.

Nedavno su dizajnirani kemijski TAP inhibitori. Kada govorimo o njihovoj strukturi to su veliki peptidi koji se mogu vezati za TAP, ali ne mogu biti preneseni uz pomoć TAP-a. Interakcija sa peptidom je reverzibilna. S obzirom da ovi inhibitori ulaze u kompeticiju sa normalnim peptidom za TAP vezivanje, mehanizam njihova vezivanja najvjerojatnije je vrlo sličan. Daljnji uvid u molekularne mehanizme TAP inaktivacije trebao bi olakšati dizajn TAP inhibitora koji mogu biti korisni kao imunosupresivni agenti u transplantaciji tkiva ili organa, ali i u liječenju autoimunih bolesti povezanih sa MHC-I molekulama (118).

1.3.3. Konformacija MHC molekula I. razreda

1.3.3.1. Konformirane MHC molekule I. razreda

MHC-I molekule koje smo ranije opisali, odnosno stabilni trimolekularni kompleksi, su konformirane ili pune molekule, a kao takve ih prepoznaju citotoksični $CD8^+$ limfociti T. Ipak, i konformirane MHC-I molekule međusobno pokazuju neke razlike koje se primarno očituju u poluživotu i kinetici dolaska na staničnu membranu. Razlike mogu postojati kako među lokusima, tako i između različitih alela istog lokusa.

Teške lance MHC-I molekula u ljudi kodiraju geni na 6. kromosomu raspoređeni u osnovna tri lokusa: HLA -A, -B i -C. HLA lokusi su viskoko polimorfni, te postoji više od 80 alela za HLA-A, 180 za HLA-B i 40 za HLA-C.

Mišje MHC-I molekule kodirane su na 17. kromosomu na lokusima H-2K, -D i -L, a najpoznatiji haplotipovi su -d, -k, -b i -q. Haplotip $H\text{-}2^d$, koji se prisutan u miševa soja BALB/c, sadrži tri vrste MHC-I molekula označene kao K^d, D^d i L^d, koje djeluju kao klasični transplantacijski antigeni (120).

Stanice izražavaju više alelnih oblika MHC-I molekula koje se međusobno razlikuju obzirom na stopu sinteze, unutarstaničnu raspodjelu te prema stabilnosti na staničnoj površini. Poluživot na staničnoj površini je prvenstveno određen stabilnošću trimolekularnog kompleksa. Tako su primjerice mišje molekule K^b i D^b znatno stabilnije nego molekule L^d. Naime, treba im znatno kraće vrijeme da dođu do stanične membrane na kojoj se dulje i zadržavaju.

1.3.3.2. Nekonformirane MHC molekule I. razreda

Nekonformirane ili prazne MHC-I molekule općenito se ne izražavaju na staničnoj površini. Naime, čak i ako dođu do nje, za razliku od konformiranih molekula koje imaju dugo vrijeme poluživota (12h, pa i >24h), vrlo brzo se degradiraju ili pune peptidom koji se nalazi u njihovom okolišu. Ipak, ako su prisutne na staničnoj membrani nekonformirane MHC-I molekule mogu se izražavati u nekoliko oblika: kao nestabilni kompleks teškog lanca, β_2-m i peptida vezanog slabim afinitetom, kao teški lanac vezan samo s β_2m ili samo s peptidom, odnosno samo kao teški lanac (121, 122, 123, 124, 125). Obzirom da heterodimer (teški lanac s β_2m ili peptidom) predstavlja izuzetno kratko živući oblik, kada se govori o nekonformiranim molekulama najčešće se govori o praznoj konformaciji, te se ova dva pojma često koriste kao sinonimi. Još nije jasno da li se svi aleli na površini stanice mogu naći u svim navedenim oblicima. Nastanak nekonformiranih MHC-I molekula proces je koji nije u potpunosti razjašnjen, a pretpostavlja se da MHC-I molekule mogu nastati kako tijekom biosintetskog puta izbjegavanjem kontrole na izlasku iz ER-a, tako i u endocitoznom putu raspadom pravilno svijenih MHC-I molekula. Biokemijskom analizom je pokazano da su ove molekule na površini stanice izražene kao potpuno glikozilirane zrele molekule, koje su fosforilirane na tirozinima i posjeduju kinaznu aktivnost (126).

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 (127), a pokazano je da stvaranje ovih kompleksa ima svrhu kako bi i nekonformirane molekule bile prepoznate od strane citotoksičnih $CD8^+$ limfocita T (128).

1.3.4. Konstitutivna endocitoza MHC molekula I. razreda

Teški lanac MHC-I molekula posjeduje kratku citoplazmatsku domenu kojoj nedostaje aminokiselinska sortirajuća sekvenca neophodna za klatrin- i adaptorski protein- ovisnu endocitozu. Mnogo godina se vjerovalo da MHC-I molekule ne ulaze u stanicu endocitozom nego ostaju na staničnoj površini. Ipak, pokazano je da MHC-I molekule ulaze u stanicu procesom koji je neovisan o klatrinu i dinaminu, a ovisan o Arf6 GTP veznom proteinu. Nakon endocitoze, mjehurići s MHC-I molekulama ulaze u $Arf6^+$ tubularne strukture koje su bogate fosfatidil-inozitol 4,5 bifosfatom (engl. phosphatidyl-inositol 4,5 bisphosphate; PIP_2). Bogatstvo sa PIP_2 proizlazi iz činjenice, da konstitutivno aktivni oblik Arf6, Q67L, aktivira fosfoinozitid kinazu (engl. phosphoinositide kinase; PIK) koja stvara velike količine PIP_2. MHC-I molekule se zatim usmjeravaju prema $Rab5^+EEA\text{-}1^+$ ranim endosomima.. Da bi moglo doći do spajanja s PI3P bogatim ranim endosomima Arf6 se mora inaktivirati, a PIP_2 metabolizirati. Na taj način endocitirane MHC-I molekule postaju dio glavnog (klatrinskog) endocitoznog puta te se mogu usmjeriti prema kasnim odjeljcima i degradacijskom putu ili u reciklirajući put prema staničnoj površini. MHC-I molekule mogu reciklirati iz $Arf6^+$ reciklirajućeg odjeljka, ili prijeći iz $Arf6^+$ endosoma u klasični jukstanuklearni reciklirajući odjeljak (Tf^+ i $Rab11^+$) te na taj način reciklirati.

1.4. Virusi

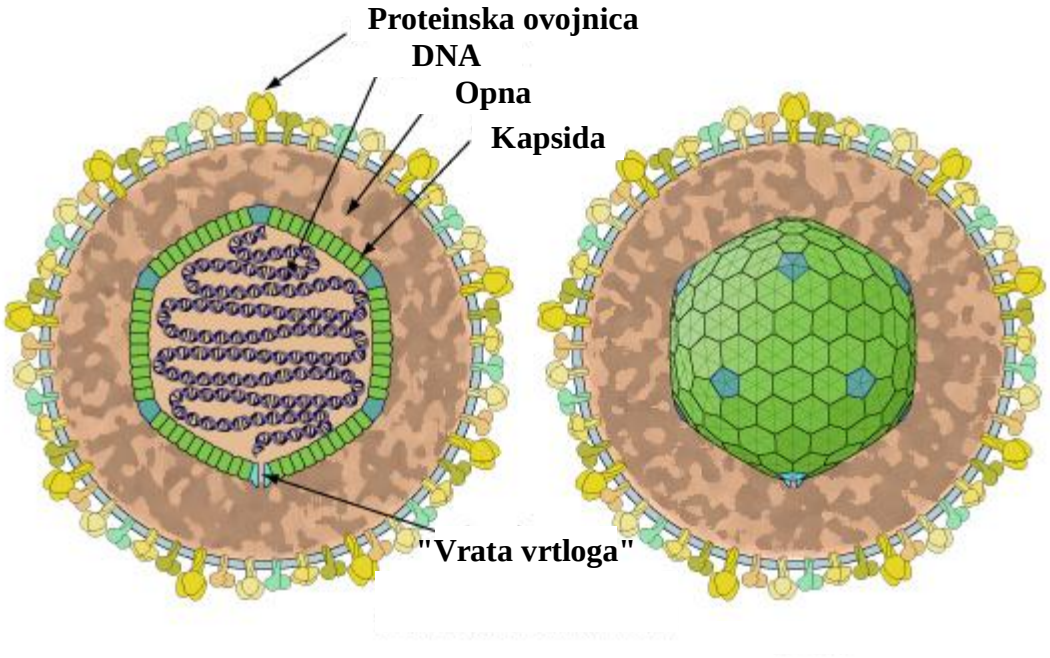
Relativno mali genomi i visoka stopa replikacije omogućuju virusima i bakterijama veliki broj mutacija, što predstavlja kontinuirani izazov za domaćinov imunološki sustav. Virusi, kao ne slobodno-živeći (engl. free-living) organizmi ovisni su o metaboličkim funkcijama njihova domaćina. Virusi iskorištavaju svoj brzi životni ciklus u vidu mutacija, što im omogućuje izbjegavanje imunološkog odgovora domaćina. Domaćinov imunološki sustav evoluira i sazrijeva te oplemenjuje vlastiti repertoar imunološkog odgovora. Ipak, virusi mogu to kontrolirati do određenog stupnja, odgovarajući razvojem nove mutante. Ovaj evolucijski propis vrijedi za sve parazite, ali i za sve domaćine.

1.4.1. Mišji citomegalovirus

1.4.1.1. Struktura mišjeg citomegalovirusa

Obitelj *herpesvirusa*, koji uključuje *α, β i γ-herpesvirinae*, služi kao najbolji primjer velikih DNA virusa, koji imaju dobro razvijenu imunoinvazivnu strategiju. Humani citomegalovirus (engl. human cytomegalovirus; HCMV), na koji je seropozitivno 50% do 90% populacije (129), ne uzrokuje kliničku bolest u zdravih ljudi, ali je sposoban izazvati tešku i fatalnu infekciju u osoba oboljelih od neke druge infektivne bolesti ili u imunokompromitiranih bolesnika (osobe sa transplantacijom organa, u oboljelih od SIDA-e, novorođenčadi). Mišji citomegalovirus (engl. mouse cytomegalovirus; MCMV), služi kao eksperimentalni model za izučavanje različitih patoloških stanja izazvanih infekcijom HCMV-a.

Kompletan virion prosječnog je promjera 200 nm, a čini ga oko 30 strukturnih proteina. Građen je od kapside koju oblikuju 162 kapsomere, a sadrži linearnu DNA. Na kapsidi postoje tzv. "vrata vrtloga" (lat. portal vertex) koje označava mjesto kroz koje se DNA izbacuje. Izbacivanje DNA u korelaciji je sa cijepanjem malih portalnih proteina. Kapsida je okružena slojevima proteina unutarnje virusne opne (engl. tegument). Vanjska virusna ovojnica (engl. envelope) predstavlja lipidni dvosloj te sadrži desetak ili više virusnih glikoproteina, od kojih nekoliko igraju vrlo važnu ulogu u virusnom ulazu u stanicu domaćina (Slika 15). Glikoprotein B (gB) odgovoran je za ulazak virusa u stanicu procesom fuzije, ali i za prijenos virusa iz jedne stanice u drugu međustaničnim kontaktom, što ima za posljedicu oblikovanje sincicija inficiranih stanica. Vjerojatni receptor za gB na staničnoj membrani domaćina je heparan sulfat proteoglikan (HSPG), mada se pretpostavlja da se veže i za EGFR kao i za neke integrine te potiče ulazak virusa u stanicu. Glikoprotein H (gH) također ima ulogu u ulasku virusa u stanicu procesom fuzije, a njegov receptor je glikoprotein veličine 92.5 kDa (130, 131).



Slika 15. Građa citomegalovirusa.

Proteinska ovojnica, sferična do pleomorfna, 150-200 nm u promjeru. Kpsida se sastoji od 162 kapsomere i okružena je amorfnom opnom. Vrata vrtloga (lat. portal vertex) mjesto kroz koje se DNA uzvojnica izbacuje. Glikoproteinski kompleks uklopljeni su u lipidni sloj ovojnice (prilagođeno prema referenci 132).

Herpesvirusi slijede različite puteve ulaska u inficiranu stanicu. Primjerice, MCMV ulazi u fibroblaste direktnom fuzijom sa staničnom membranom, međutim može ući i procesom endocitoze u endotelne, ali i u epitelne stanice mrežnice. Sam proces replikacije virusa u stanici podijeljen je u više stadija:

1. virus se vezuju za receptore na površini stanice domaćina
2. ulazak u stanicu endocitozom ili fuzijom sa staničnom membranom
3. odbacivanje virusne ovojnice i ulazak kapside kroz jezgrine pore gdje se virusna DNA ubacuje u jezgru
4. prepisivanje (transkripcija) neposredno ranih gena koja potiče transkripciju ranih gena
5. transkripcija rane virusne mRNA uz pomoć domaćinove polimeraze II, prijenos u citoplazmu i prevođenje (translacija) u rane proteine
6. rani proteini se uključuju u replikaciju virusne DNA te se prenose natrag u jezgru
7. sinteze mnogostrukih kopija virusne DNA uz pomoć virusne DNA-ovisne DNA polimeraze
8. transkripcija kasne virusne mRNA uz pomoć domaćinove polimeraze II, prijenos u citoplazmu i translacija u kasne proteine
9. kasni proteini su ili strukturalni ili jezgrini te se prenose natrag u jezgru

10. sklapanje (engl. assembly) virusa i pupanje kroz unutarnju lamelu jezgrine membrane koja je promijenjena zbog umetanja glikoproteina herpesvirusa, prijenos kroz Golgijevu mrežu i konačno puštanje na staničnu membranu

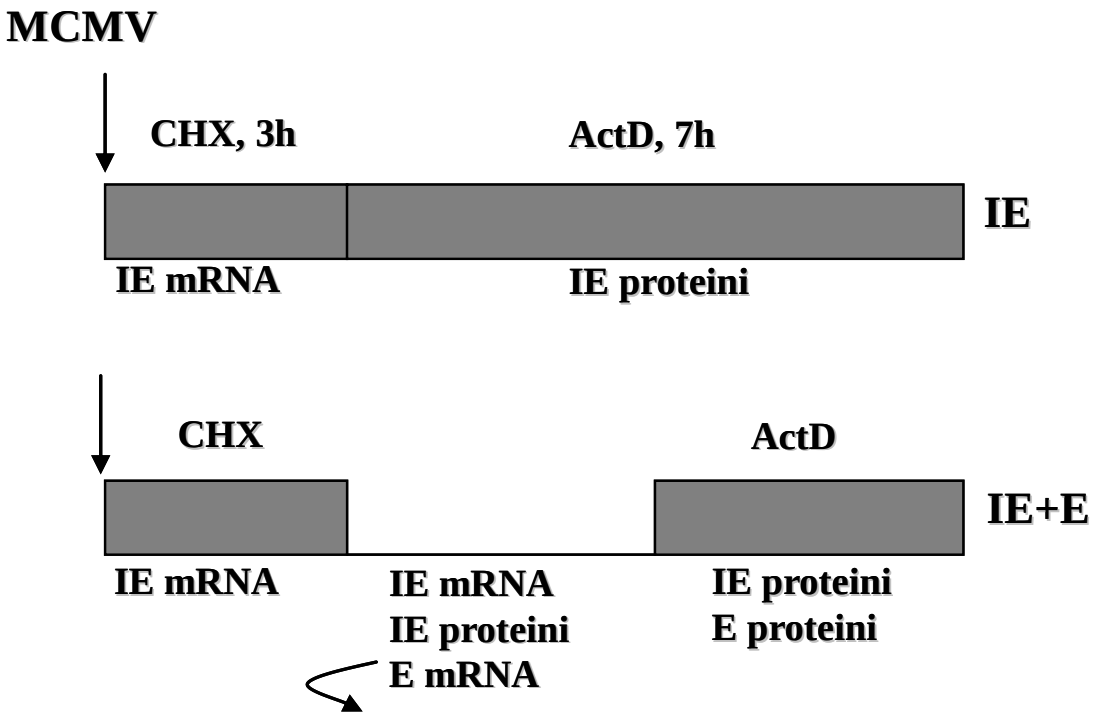
Specifično, ne-esencijalni MCMV geni služe kao model za izučavanje T-staničnog i NK-staničnog prepoznavanja. MCMV izaziva akutnu, perzistentnu i latentnu infekciju u miša (133). Posjeduje genom veličine 230 kb, a organiziran je na taj način da mu centralni dio čine geni koji su odgovorni za njegovu replikaciju. Ovaj dio virusnog genoma je očuvan, bez obzira na različite vrste. Završeci virusnog genoma pokazuju polimorfizam te se sastoje od dva seta gena čija je funkcija izbjegavanje imunološkog odgovora. Na lijevoj strani genoma su geni obitelji *m02*, koji se sastoje od *m02* do *m16*, kao i od jednog člana obitelji *m145*, *m17* gena, dok se na desnoj strani genoma nalaze geni obitelji *m145*, prvenstveno *m145*, *m144*, *m146*, *m150* do *m155*, *m157* i *m158* (134). Posebno obilježje *m145* obitelji gena MCMV-a je to što mogu poprimiti izgled (engl. fold) MHC-I molekula unatoč tome što nemaju značajne sekvence slične onima MHC-I molekula (135). MCMV posjeduje i *m138* gen koji kodira protein koji je funkcionalni homolog staničnom Fc receptoru (136).

1.4.1.2. Izražavanje gena mišjeg citomegalovirusa

Izražaj gena tijekom replikacijskog ciklusa citomegalovirusa, kao i u cijeloj obitelji herpesvirusa, regulirana je kaskadnim putem (137), te se može podijeliti u tri razdoblja. Prvo je najranije (engl. Immediate Early; IE) razdoblje, koje započinje prepisivanjem neposredno ranih (engl. Immediate Early; IE ili α) gena neposredno nakon infekcije i traje oko 2 sata. Prepisivanje IE gena odvija se uz pomoć stanične RNA polimeraze II i ne ovisi o "de novo" sintezi virusnih proteina stoga se može odvijati i u prisutnosti inhibitora sinteze proteina. Postoje tri IE gena (IE1, IE2, IE3). Strukturne organizacije regije glavnih IE gena MCMV-a i HCMV-a, pokazuju vrlo velike sličnosti (138). Kompleksna regulatorna sekvenca, glavni IE pojačivač promotor (engl. major IE enhancer promoter; MIEP), kontrolira prepisivanje IE gena. Pet egzona je kodirano nizvodno od MIEP. Prva tri egzona su spojeni na bilo egzon 4, koji kontrolira IE1 prijepis, ili egzon 5, koji kontrolira prijepis IE2. U MCMV-u, proizvod izražavanja IE1 gena je fosfoprotein od 89-kDa (pp89) (139, 140), koji regulira izražaj gena ranog i nekih gena kasnog razdoblja. IE1 gen ima važnu ulogu u izazivanju akutne infekcije, ali je njegov značaj i u samoj virulenciji koja se značajno smanjuje sa delecijom IE1 gena (141). IE3 gen kodira protein od 88-kDa (142) te je esencijalan za rast virusa, jer se vidjelo da MCMV IE3-deficijentne mutante imaju u potpunosti defektnu replikaciju. IE2 gen kodira

protein od 43-kDa, međutim njegova uloga još uvijek je nepoznata (143) te se zna da MCMV nema nikakvog očitog homologa u genomu HCMV-a, za razliku od IE1 MCMV-a čiji je homolog IE1 HCMV, a MCMV IE3 ima svog homologa u IE2 HCMV-a.

Virusni proteini sintetizirani u IE razdoblju, aktiviraju prepisivanje ranih (engl. Early; E ili β) gena u ranom (engl. Early; E) razdoblju, koje traje od 2. do 14. sata nakon infekcije i u kojem dolazi do prepisivanja duž cijelog genoma, te se pojavljuju proteini koji imaju različite funkcije. Najizraženiji protein ovog razdoblja proizvod je gena E1 koji kodira protein od 36 i 38-kDa. Tijekom ovog razdoblja izražava se i virusni Fc receptor-1 (FcR-1) gen kodirajući glikoproteine od 86 do 88-kDa (gp86/88) i 105-kDa (gp105), čija je sposobnost vezanja za Fc fragment imunoglobulina G (IgG) (144). Rano razdoblje završava sa početkom umnažanja virusne DNA, kada započinje kasno (engl. Late; L) razdoblje koje traje do 24 sata nakon infekcije. Tada se izražavaju kasni (engl. Late; L ili γ) geni, umnaža se virusna DNA, prepisuju se strukturni glikoproteini i oblikuju se virioni. Tretiranjem stanica s DNA polimeraza inhibitorima ograničava se virusna replikacija na IE i E razdoblje. Kada se stanica tretira cikloheksimidom (CHX-om), koji je inhibitor proteinske sinteze odnosno blokator translacije, pa se potom zamijeni sa aktinomicinom D (ActD), blokatorom transkripcije, virusna se replikacija ograničava na IE razdoblje, te se tada sintetiziraju isključivo IE proteini (slika 16). S druge strane ako se stanicama tretiranim sa CHX isti nakon određenog vremena ukloni, tada nakon IE razdoblja se omogućava ulazak virusne replikacije u E razdoblje, te se u tom slučaju izražavaju i IE i E proteini (slika 16). Ovim putem se mogu pratiti učinci pojedinih skupina gena iz različitih razdoblja virusne replikacije (145).



Slika 16. Utjecaj cikloheksimida i aktinomicina D na izražavanje gena mišjeg citomegalovirusa.
Infekcija stanice sa MCMV-om u prisutnosti inhibitora sinteze proteina cikloheksimida (CHX) tijekom 3 sata, rezultira povećanom transkripcijom IE gena. Potom se CHX zamijeni aktinomicinom D (ActD), inhibitorom transkripcije, te dolazi do translacije IE mRNA u IE proteine. Nakon uklanjanja CHX, sinteza IE proteina aktivira transkripciju E gena sve dok se stanicama ne doda ActD. Translacija E mRNA vodi ka sintezi E proteina (prilagođeno prema referenci 78).

1.4.1.3 Uplitanje mišjeg citomegalovirusa u imunološki odgovor

Nekoliko važnih funkcija vezanih uz strategiju izbjegavanja imunološkog odgovora, MCMV duguje pripadnicima obitelji *m145* gena. Neke od tih strategija su aktivacija NK stanica i rušenje (engl. subvert) složenog procesa antigenske prezentacije (146, 147). Iako se za *m144* kaže da je MHC-I-nalik molekula, mehanizmi njegovih bioloških učinaka još uvijek su nerazjašnjeni. Mutanta MCMV-a s delecijom *m144* gena je slabije virulentna tijekom akutne infekcije, a kao uzrok tome navodi se promijenjen tj. smanjen broj NK stanica domaćina (148). Izražaj *m144* kako na humanim (149) tako i na mišjim stanicama (150) dovodi do otpornosti na citotoksičnost posredovanu NK stanicama. Pretpostavka je da se *m144* veže na inhibitorni NK stanični receptor. Ipak do danas ova hipoteza nije potvrđena.
Stanice izložene različitim vrstama stresa, kao što su visoka temperatura, onkogena transformacija ili virusna infekcija pokazuju povišenu razinu liganda koji služe u aktivaciji

NK staničnog receptora NKG2D, poput Rae1 (5 izoformi), H60 i MULT-1 (151). Međutim MCMV geni *m138, m145, m152* i *m155* imaju antagonistički učinak na površinski izražaj navedenih molekula. *m157* se može vezati na inhibitorni receptor NK stanica (135, 152) te na taj način manipulirati imunološkim odgovorom. Svi ovi podaci ukazuju da se virus vrlo brzo prilagođava na pritiske od strane domaćina i njegova imunološkog sustava.

1.4.2. Učinak različitih virusa na izraženost MHC molekula I. razreda

1.4.2.1. Učinak Papilloma virusa na izraženost MHC molekula I. razreda

Papilloma virusi su mali DNA tumorski virusi koji inficiraju mukozni epitel u kojem se početna infekcija vidi u obliku benigne hiperproliferativne lezije (153). Glavni njegov onkoprotein E5, maleni hidrofobni peptid, izražen je tijekom ranih stadija infekcije te mu se izražaj povećava proporcionalno sa progresijom lezije. E5 onkoprotein smješta se u membrane ER i Golgijeva kompleksa stanice domaćina. Uloga mu je trostruka: smanjuje transkripciju i povećava degradaciju teškog lanca MHC-I molekula te nepovratno inhibira transport MHC-I molekula prema staničnoj površini zadržavajući ih u Golgijevom aparatu (154).

1.4.2.2. Učinak Coxsackievirusa na izraženost MHC molekula I. razreda

Coxsackievirusi su mali RNA virusi koji unatoč svom malom genomu mogu manipulirati imunološkim odgovorom domaćina. Najvažniji njegovi ne strukturalni proteini su redom 2B, 2BC i 3A (155). 3a protein narušava strukturu Golgijeva kompleksa, inhibira transport novosintetiziranih MHC-I molekula iz ER-a u Golgi kompleks te inhibira izlučivanje antivirusnih citokina (156, 157). 2B i 2BC proteini blokiraju transport kroz Golgi kompleks remeteći homeostazu Ca^{++} iona. 2B i 2BC također ushodno reguliraju endocitozu, rapidno uklanjajući MHC-I molekule sa stanične površine (158, 159). Sve tri molekule skupa čine inficirane stanice nevidljive za citotoksične $CD8^{+}$ limfocite T, te ih čine i nedodirljivima za mnoge antivirusne efektorske molekule.

1.4.2.3. Učinak virusa humane imunodeficijencije na izraženost MHC molekula I. razreda

Nef, regulatorni protein virusa humane imunodeficijencije (engl. **H**uman **I**mmunodificiency **V**irus; HIV) nishodno regulira površinski izražaj MHC-I molekula i CD4 (engl. cluster of differentiation 4) molekula na limfocitima T, ubrzavajući njihovu endocitozu (160). Nef potiče nakupljanje endocitiranih MHC-I molekula u TGN-u, gdje se one vežu sa adapterskim proteinom AP-1. Sposobnost Nef-a da se veže za adapterski protein AP-2 omogućuje mu nishodnu regulaciju CD4 molekula ubrzavajući njihovu endocitozu, te potom redistribuciju u LE i lizosome (161). Do sada nisu utvrđeni njegovi eventualni učinci na sintezu CD4 molekula ili na prolaz CD4 molekula duž egzocitoznog puta (162, 163). Međutim postoje razlike u potaknutoj endocitozi ovih dviju molekula. Klatrin-ovisnom endocitozom CD4 molekule ulaze u stanicu, dok se MHC-I molekule internaliziraju putem neovisnim o klatrinu, a ovisnim o Arf6 molekuli (164, 165). U prilog tome govori činjenica da nishodna regulacija MHC-I molekula inducirana proteinom Nef, nije pogođena u stanicama mutante K44A (dinamin nema sposobnost vezanja GTPa), dok je inhibirana internalizacija CD4 molekule (166). Ovo sugerira da nishodna regulacija MHC-I molekule uključuje klatrin-neovisnu internalizaciju.

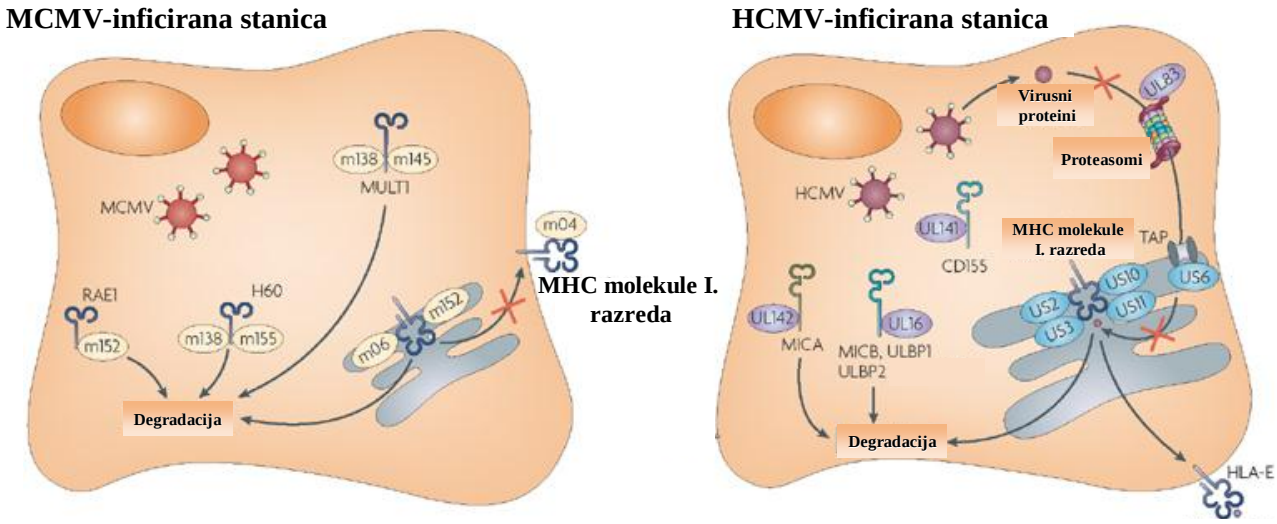
1.4.2.4. Učinak Herpes simplex virusa na izraženost MHC molekula I. razreda

Herpes simplex virusi (HSV), tip 1 i 2, kodiraju neposredno rani protein ICP47 koji blokira prijenos MHC-I molekula iz endoplazmatske mrežice i omogućuje inficiranim stanicama otporn na lizu posredovanu citotoksičnim $CD8^+$ limfocitima T. ICP47 je citoplazmatski polipeptid, sastavljen od 87 aminokiselina, koji se veže za TAP, te uzrokuje inhibiciju vezivanja i prijenosa peptida iz citoplazme u endoplazmatsku mrežicu.

1.4.2.5. Učinak humanog citomegalovirusa na izraženost MHC molekula I. razreda

Humani citomegalovirus (HCMV) koristi izrazito kompleksnu strategiju u prevenciji antigenske prezentacije u sklopu MHC-I molekula. Vrlo rani gen (engl. immediate early gene, IE) se ne prezentira limfocitima T u prisutnosti proteina matriksa pp65, upućujući na antigen-specifični mehanizam (167). Prevencija antigenske prezentacije u sklopu MHC-I molekula posredovana je putem jedinstvene kratke (engl. unique short, US) regije (168). Do sada je otkriveno nekoliko glikoproteina koji neovisno jedan o drugome modificiraju

unutarstanični transport MHC-I molekula. US2 i US11 glikoproteini potiču rapidni eksport teškog lanca (HC) MHC-I molekula iz ER-a u citosol gdje se teški lanac degradira na proteasomima (169, 170) (slika 17). US3 glikoprotein se veže na β-mikroglobulin kompleksa MHC-I molekula te ga kao takvog zadržava predominantno u ER-u, nedozvoljavajući transport MHC-I molekula natrag na staničnu površinu (171, 172) (slika 17). Virusni peptidi se generalno ili razgrađuju na proteasomima ili se translociraju u ER gdje se spajaju sa praznim MHC-I molekulama, koje se sastoje od HC i β-mikroglobulina. Peptidna translokacija odvija se uz pomoć transportera povezanih sa antigenskom preradom (engl. **T**ransporters associated with **A**ntigen **P**rocessing; TAP). US6 glikoprotein prevenira TAP-om posredovanu translokaciju (173, 174, 175). US2 i US3 glikoproteini posreduju i nishodnu regulaciju MHC-II molekula sa stanične površine.



Slika 17. Učinak Herpes simplex virusa na izražaj MHC molekula I. razreda.

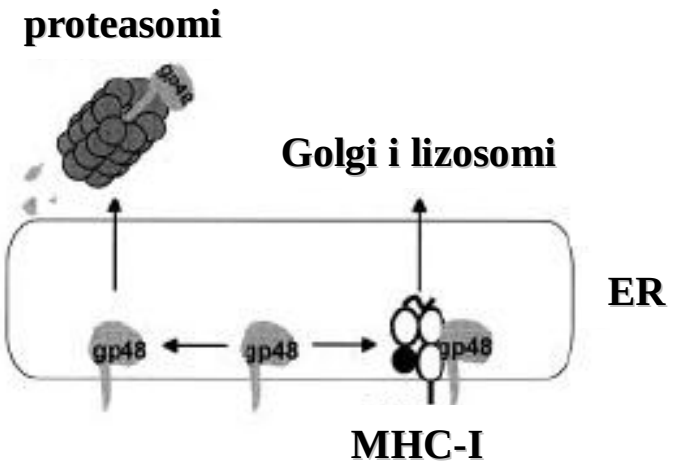
HCMV i MCMV kodiraju različite proteine koji imaju učinak na MHC-I molekule. MHC-I molekule uklanjaju sa površine stanice, zadržavaju u endoplazmatskoj mrežici ili ih pak odvode u degradaciju (prilagođeno prema referenci 176).

1.4.2.6. Učinak mišjeg citomegalovirusa na izraženost MHC molekula I. razreda

MCMV također kodira nekoliko proteina čija je meta antigenska prezentacija u sklopu MHC-I molekula. Tri proteina nemaju nikakve sličnosti sa MHC-I molekulama, dok četvrti *m152* ima sličnosti sa aminokiselinskim sekvencama MHC-I molekula. Takve molekule nazvane su virusni proteini koji interferiraju sa antigenskom prezentacijom (engl. **V**iral proteins that **I**nterfere vith antigen **Pr**esentation; VIPRs), da bi se razlučili od gena čija je uloga u izbjegavanju imunološkog odgovora (engl. immunoevasion genes). *m04* i *m06* geni kodiraju glikoprotein34 (gp34) i glikoprotein48 (gp48) koji na različite načine djeluju na putovanje MHC-I molekula. Rane studije ukazivale su da *m04* inhibira lizu MCMV-inficiranih stanica posredstvom citotoksičnih $CD8^+$ limfocita T (CTL) (177), blokirajući prepoznavanje MHC-I molekula i staničnog receptora limfocita T (TCR-a).

m04 je smatran negativnim regulatorom antigenske prezentacije (178). Nedavno su provedena nova opsežna "*in vitro* i *in vivo*" istraživanja o *m04*, te se *m04* sada smatra pozitivnim regulatorom antigenske prezentacije. m04/gp34 povezuje se sa MHC-I molekulama u ER-u te se kao kompleks prenosi na staničnu površinu gdje i dalje ostaje povezan (179). Tip I transmembranski glikoprotein gp48 kodiran *m06* genom, upliće se u put antigenske prezentacije posredovane MHC-I molekulama (80). Postoje dvije populacije gp48 glikoproteina (180). Prva se veže za pravilno omotan β2-mikroglobulin (β2m)-povezan sa MHC-I molekulama u ER-u i odvodi ga kroz Golgijevu mrežu u lizosome, gdje se gp48-MHC-I molekule kompleks degradira (slika 18). *m06*/gp48 posjeduje u svom citoplazmatskom repu di-leucinski motiv koji mu olakšava vezivanje na adapterske proteine AP-1A i AP-3A koji se usmjeravaju u lizosomalni put. Drugu populaciju predstavlja nevezani gp48 koji se degradira na proteasomima (slika 18). Da bi ispunio svoju funkciju gp48 mora biti izražen u izobilju te se povezati sa što je više moguće MHC-I molekula. Prema dosadašnjim saznanjima *m06*/gp48 gen daleko je najučinkovitiji regulatorni mehanizam izražaja MHC-I molekula u infekciji mišjim citomegalovirusom. *m04* i *m06* geni pripadaju *m02* obitelji gena MCMV-a. Ostalim genima iz ove obitelji još uvijek nije otkrivena funkcija. *m152* gene, koji pripada obitelji *m145* gena, kodira glikoprotein40 (gp40) prvi je opisani gen koji ima ulogu u izbjegavanju imunološkog odgovora. Prvobitna opažanja pokazala su blok u antigenskoj prezentaciji IE proteina pp89 tijekom rane infekcije MCMV-a kada su rani geni već izraženi, specifičnim klonovima citotoksičnih $CD8^+$ limfocita T (181, 182). Daljnje studije otkrile su da virus blokira antigensku prezentaciju zadržavajući tri-molekularni MHC-I molekule kompleks u ER/cis-Golgi odjeljku (engl. endoplazmatic reticulum Golgi

intermediate compartment; ERGIC) (78). Za navedeno je ključan *m152* koji se nalazi na desnoj strani genoma, unutar HindIII E područja (144). *m152* je odgovoran za nishodnu regulaciju MHC-I molekula (183), potičući zadržavanje MHC-I molekula unutar stanice u ERGIC-u (184).



Slika 18. Shematski model degradacijskog puta vezanog i slobodnog gp48.
gp48 prebacuje se u ER, savija i glikozilira. U ER-u gp48 se može vezati za β2-vezani teški lanac MHC-I molekula te se kroz Golgi prenosi potom u lizosome. gp48 koji se ne veže sa MHC-I molekulama te ostaje slobodan, degradira se na proteasomima te zaobilazi Golgi i lizosome (prilagođeno prema referenci 180).

Biološke posljedice djelovanja navedenih gena nisu do kraja razjašnjene. Stoga su metodom homologne rekombinacije konstruirani rekombinantni virusi s delecijom jednog ili više gena. *m04*, *m06* i *m152* imaju različitu učinkovitost na MHC-I molekule (185). Stanice inficirane s delecijskom mutantom *m04/m06* MCMV-a izbjegavaju CTL stimulaciju i lizu. Izražaj samo *m152* gena dovoljan je za blokadu antigenske prezentacije. Ipak, kada se *m04* izražava u kombinaciji sa *m152*, inficirana stanica je prijemljiva za CTL posredovanu lizu, sugerirajući da *m04* obnavlja antigensku prezentaciju prateći povratak MHC-I molekula natrag na staničnu površinu. Kada su stanice inficirane da divljim tipom (engl. wild-type) MCMV-a koji ima izražene *m04*, *m06* i *m152*, iste su bile sposobne izbjeći CTL posredovani odgovor. Iz navedenog se može zaključiti da *m06* poništava pozitivnu regulaciju *m04* i omogućuje izbjegavanje imunološkog odgovora (76).

Svi navedeni učinci u konačnici dovode do smanjenja površinskog izražaja MHC-I molekula te imaju zajedničku karakteristiku da se mogu spriječiti ako se stanice prije infekcije tretiraju sa IFN-γ. IFN-γ nema utjecaj niti na izražaj ranih virusnih gena ni direktno na njihov učinak

na MHC-I molekule. IFN-γ izrazito stimulira sintezu MHC-I molekula, čime se iste stvaraju u suvišku, te neke od njih uspiju izbjeći virusnim proteinima te na taj način osiguravaju adekvatnu prezentaciju virusnih peptida na površini stanice (186). Na taj način bi IFN-γ mogao djelovati u obrani stanice od virusne infekcije.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U ovom nam je radu prvenstveni cilj bio uspostava modela za praćenje putovanja MHC-I molekula, ali i ostalih površinskih molekula, u neinficiranim stanicama i u stanicama inficiranim mišjim citomegalovirusom (MCMV-om), mjerenje kinetike uklanjanja molekula sa stanične površine, praćenje puta recikliranja MHC-I molekula te njihov ulazak u degradacijski put, odnosno u kasne endosome. Transport molekula od stanične membrane kroz različite endosomalne odjeljke pratiti ćemo kolokalizacijom MHC-I molekula sa biljezima endosomalnih odjeljaka. S obzirom, da se MHC-I molekule puno brže uklanjaju sa površine inficirane stanice nego sa površine neinficirane stanice istražit ćemo da li se one u stanici zadržavaju prije nego se usmjere prema putu recikliranja ili degradacije. Nadalje, istražit ćemo istodobno endosomalno putovanje endocitiranih MHC-I molekula sa proteinima koji koriste druge putove endocitoze (TfR/Tf, EGF/EGFR, CD44, LAMP, B pojedinica toksina kolere i dekstran/albumin). Također, pratiti ćemo put MHC-I molekula u stanicama inficiranim mutantama MCMV-a virusa kojima nedostaje/ju geni u područjima koja sadrže gene m04, m06 i m152 gena, odgovornim za narušavanje putovanja MHC-I molekula u sekretornom putu.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. LABORATORIJSKE ŽIVOTINJE

U pokusima su korišteni miševi genetski čistih sojeva BALB/c 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

Aktinomicin D (Actinomycin D; ActD), 01815, Fluka, Njemačka

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

Foskarnet, P6801, 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

RPMI 1640 medium, 074-01800, Gibco, SAD

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, $1x10^5$ U/L, penicilin 0,1 g/L, streptomicin sulfat, 0,05 g/L,gentamicin-sulfat i 5-10% fetalni goveđi serum (FCS).

Kompletan MEM medij

(medij za uzgoj mišjih embrionalnih fibroblasta)

Medij MEM, 2 mM L-glutamin, $1x10^5$ U/L penicilin, 0.1 g/L streptomicin-sulfat, 0,05 g/L gentamicin-sulfat i, 3% fetalni goveđi serum (FCS).

Kompletan D-MEM medij

(medij za uzgoj imortaliziranih 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).

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

Ependorf epruvete od 0,5; 1,5 i 2 ml, Eppendorf

Epruvete za FACS, Becton-Dickinson, San Jose, SAD

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 slijedeća mPt specifična za određenu konformaciju molekula:

Protu -D^d (klon 34-5-8S) mišje IgG_{2a} protutijelo

Protu -D^d (klon 34-2-12s) mišje IgG_{2a} protutijelo

Protu -K^d (klon MA-215) mišje IgG_{2b} protutijelo

Protu -K^d (klon SF-1.1.1.) mišje IgG_{2a} protutijelo

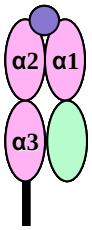
Protu -L^d (α_2) (klon 30-5-7S) mišje IgG_{2a} protutijelo

Protu -L^d (α_3) (klon 28-14 8S) mišje IgG_{2a} protutijelo

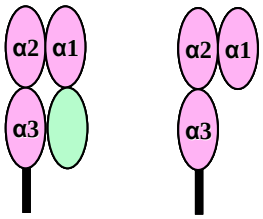
Tablica 4. Monoklonska protutijela protiv MHC molekula I. razreda.

Protutijelo	Molekule koje prepoznaje	Izotip
34-5-8S	α_2 domena konformiranih mišjih MHC-I molekula (alel d lokusa D)	mišje IgG_{2a} protutijelo
34-12-2S	konformirane mišje MHC-I molekule (alel d lokusa D)	mišje IgG_{2a} protutijelo
MA-215	konformirane mišje MHC-I molekule (alel d lokusa K)	mišje IgG_{2b} protutijelo
SF-1.1.1.	konformirane mišje MHC-I molekule (alel d lokusa K)	mišje IgG_{2a} protutijelo
30-5-7S	α_2 domena konformiranih mišjih MHC-I molekula (alel d lokusa L)	mišje IgG_{2a} protutijelo
28-14-8S	α_3 domena konformiranih mišjih MHC-I molekula (alel d lokusa L)	mišje IgG_{2a} protutijelo

KONFORMIRANE (PUNE) MHC-I MOLEKULE



NATIVNE NEKONFORMIRANE (PRAZNE) MHC-I MOLEKULE



Slika 19. Konformacije MHC molekula I. razreda.

MHC-I molekule mogu se naći u dva osnovna oblika: konformirane (pune) MHC-I molekule koje su sastavljene od teškog lanca (prikazano ružičasto), β_2-m (prikazano zeleno) i peptida (prikazano ljubičasto), te kao nekonformirane MHC-I molekule koje su sastavljene samo od teškoga lanca (prikazano ružičasto) na koji ponekad može biti vezan β_2-m (prikazano zeleno) (prilagođeno prema referencama 121, 122, 123, 124).

3.2.4.2. Protutijela koja prepoznaju određene virusne proteine

Protu-IE1 (klon croma-101); mišje IgG_1 protutijelo

Protu-E1 (klon croma-103); mišje IgG_{2a} protutijelo

Protu-m06 (klon croma-229); mišje IgG_1 protutijelo

3.2.4.3. 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

3.2.4.4. Biljezi endocitoznih odjeljaka

Protu-EEA-1, poliklonsko pileće protutijelo; Zymed, 40-5700

Protu-GS28, poliklonsko mišje IgG_{2a} protutijelo; Transduction Laboratories, 611185

Protu-Rab5b, poliklonsko kunićje protutijelo; Santa Cruz, sc-598

Protu-Rab7, poliklonsko kunićje protutijelo; Santa Cruz, sc-10767

Protu-Rab9, poliklonsko kunićje protutijelo; Santa Cruz, sc-28573

Protu-Rab11, poliklonsko kunićje protutijelo; Santa Cruz, sc-9020

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

3.2.4.5. Sekundarna poliklonska protutijela

Protu-kunićji IgG Alexa 488; Molecular Probes, A11008

Protu-kunićji IgG Alexa 555; Molecular Probes, A21429

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

Protu-kunićja peroksidaza; Santa Cruz, sc-2357

Streptavidin Alexa 488; Molecular Probes, S11223

3.2.5. Stanične linije

Ispitivanje je vršeno na staničnoj liniji koja na svojoj površini, te u unutrašnjosti izražava različite MHC-I molekule, te na staničnoj liniji koja ne izražava MHC-I molekule, kako je prikazano u tablici 5.

Tablica 5. Korištene stanične linije.

Stanična linija	Opis	Izražaj MHC molekula I. razreda
MEF	Mišji embrionalni fibroblast	K^d, D^d, L^d
NIH3T3m06	NIH3T3 transficirane sa m06	NEMA

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. Priprema mišjeg embrionalnog fibroblasta (MEF)

Mišji embrionalni fibroblasti (MEF) izolirani su iz dva tjedna starih mišjih fetusa. Skotne mišice su žrtvovane 17.-18. dana skotnosti, a fetusi sterilno izvađeni iz uterusa. Nakon što su im odstranjeni utrobni organi, fetusi su usitnjeni i podvrgnuti enzimskoj digestiji tripsinom na temperaturi od 37 °C tijekom 90 minuta, uz neprekidno miješanje na magnetskoj mješalici. Tako dobiveni homogenat propustili smo kroz metalnu mrežicu čime smo odstranili nerazgrađene dijelove, te dobivenu suspenziju stanica isprali dodatkom 3% MEM medija. Broj živih stanica za daljnji uzgoj utvrdili smo njihovim brojenjem u otopini s tripanskim modrilom i $25x10^6$ stanica naselili po jednoj Petrijevoj posudi (promjera 15 cm). Slijedećeg

dana stanicama smo promijenili medij i time odstranili eritrocite i neadherentne stanice. Nakon 3 dana rasta u staničnoj kulturi, MEF smo tripsinizirali i smrznuli po $5x10^6$ stanica/ml na temperaturu -80 °C.

3.3.3. Uzgoj staničnih linija

3.3.3.1. Uzgoj adherentnih stanica

Adherentne stanice (fibroblasti) uzgajane su u plastičnim Petrijevim posudama s medijem MEM (MEF) ili D-MEM (NIH 3T3), 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. Stanična linija NIH 3T3ΔFcR dobivena je iz Swiss mišjih embrija i transficirana genom za FcR mišjeg citomegalovirusa.

3.3.3.2. Uzgoj neadherentnih stanica

Neadherentne stanice (stanice hibridoma) uzgajane su u mediju RPMI 1640, u plastičnim bočicama (flaskovima) 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.

3.3.4. Mišji citomegalovirus

Slijedeće rekombinante MCMV-a virusa su korištene: Δm138-MCMV (ΔMC95.15) sa delecijom *fcr1* (m138) gena (136), Δie1-MCMV s delecijom egzona 4 *ie1* gena (141), Δie2-MCMV s delecijom *ie2* (m128) gena (137), Δie3-MCMV s delecijom *ie3* gena (188) te Δm4m6m152-MCMV s delecijom tri poznata imunoinvaziva koji utječu na sazrijevanje MHC-I molekula (189). MCMV divlji-tip (engl. MCMV wild-type; MCMV wt) Smith soja podrijetlom iz American Type Culture Collection (ATC, VR-194, Rockwille, MD) kao i MCMV delecijske mutante proizvedene su i umnažane na kulturi mišjih embrionalnih fibroblasta (MEF) porijeklom iz BALB/c miševa. Δie3-MCMV uzgajan je na komplementarnoj NIH3T3 BAM25 staničnoj liniji (188).

3.3.4.1.Proizvodnja i umnažanje virusa

MEF stanice smo inficirali s MCMV-om u dozi od 0,01 PFU/stanici, te inkubirali na 37 °C kroz 4-5 dana. Zatim smo pokupili supernatant te ga centrifugirali na 200 x g tijekom 10 minuta i nadtalog ultracentrifugirali na 72000 x g tijekom 90 minuta na 4 °C pri čemu se

virus istaložio. Virusni talog smo pročišćavali sedimentacijom kroz sloj 15% sukroze i ultracentrifugiranjem (25000 x g, 90 minuta na 4 °C). Virusni talog smo otopili u PBS i profiltirali kroz filter od 45µm i alikvote virusa (25µl) do upotrebe čuvali na -80 °C. Titar virusa određivali smo testom virusnih plakova.

3.3.4.2. Određivanje titra virusa (test virusnih plakova)

Titar virusa određivali smo na MEF stanicama porijeklom iz BALB/c miševa testom virusnih plakova (engl. virus plaque assay). Na pripremljene ploče za staničnu kulturu od 48 rupica obložene MEF stanicama u količini od $5x10^4$ stanica/rupici, dodali smo prethodno pripremljene stanične homogenizate koje smo razrijedili 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 i 10^6 puta te razrijeđenja nanijeli u duplikatu. Stanične homogenizate smo pripremili inkubiranjem stanica u prisustvu inhibitora i inficiranih virusom tijekom 24 sata, a potom smrzavanih i odmrzavanih 3 puta. Neposredno prije nanošenja razrijeđenih staničnih homogenizata, s MEF stanica smo posisali višak medija u kojem su kultivirane. Ploče smo inkubirali 30 minuta na 37 °C, a potom vrtili 30 minuta na 800 x g i ponovno vratili 30 minuta u inkubator. Potom smo sadržaj rupice prelili s viskoznim metil-celuloznim medijem koji omogućuje samo horizontalno širenje virusa među stanicama. Nakon 3-4 dana inkubacije u uvjetima temperature od 37 °C, 5% CO_2 i 90% vlažnosti, pomoću invertnog mikroskopa prebrojali smo virusne plakove (čistine) u pojedinim rupicama. Svaka čistina odgovarala je jednoj infektivnoj jedinici virusa ili virusnoj čestici (engl. plaque forming unit; PFU). Uzimajući u obzir razrijeđenja homogenizata u kojem smo brojali virusne plakove mogli smo izračunati broj virusnih čestica u pojedinom staničnom uzorku i usporediti djelovanje pojedinih inhibitora na produkciju virusnih čestica u stanici.

3.3.4.3.Inficiranje stanica MCMV virusom

Adherentne stanice pripremljene u plastičnim Petrijevim posudama ili mikrotitarskim pločama, inficirane su dodavanjem Smith soja MCMV-a ili različitih mutanti MCMV-a odgovarajućeg broja PFU (0.5-1.0) po stanici u hladan medij za kulturu stanica. Nakon 30 minuta inkubacije stanica s virusom (37 °C, 5% CO_2), posude su centrifugirane na 2000 okretaja (centrifuga Beckman) tijekom idućih 40 minuta, čime se postiglo povećanje učinkovitosti infekcije za oko 10-20 puta. Po završetku centrifugiranja stanice su dalje inkubirane u CO_2 inkubatoru na 37 °C i od tada se mjerilo vrijeme inkubacije inficiranih stanica.

3.3.5. Ispitivanje izražaja MHC molekula I. razreda na staničnoj površini i u unutrašnjosti stanice u neinficiranim i inficiranim uvjetima metodom indirektne imunofluorescencije

3.3.5.1. Određivanje površinskog izražaja MHC molekula I. razreda protočnom citometrijom

Adherirane neinficirane i inficirane (na prethodno opisan način) stanice inkubirane na plastičnim Petrijevim posudama odvojene su od podloge kratkom tripsinizacijom. Djelovanje tripsina zaustavljeno je dodavanjem desetorostrukog većeg volumena medija s 3% 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 (engl. mean fluorescence intensity; MFI) ili postotka izražaja tijekom ispitivanog vremenskog razdoblja. Postotak početnog izražaja predstavlja omjer MFI u ispitivanom (vrijeme nakon infekcije) i nultom (neinficirani uvjeti) vremenu pokusa, dok postotak izražaja predstavlja omjer MFI

vrijednosti tretiranih i netretiranih stanica (pH, inhibitori...) bilo u neinficiranim ili inficiranim uvjetima. Srednji intenzitet fluorescencije u datom vremenu uvijek je bio umanjen za odgovarajuću vrijednost analogne negativne kontrole u koju je dodano samo sekundarno protutijelo.

3.3.5.2. Ispitivanje površinskog izražaja MHC molekula I. razreda konfokalnom mikroskopijom

Adherentne neinficirane i inficirane 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 30 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 3% 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.

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

Obrazac unutarstaničnog izražaja MHC-I molekula praćen je konfokalnom mikroskopijom na neinficiranim ili inficiranim stanicama. 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 3.3.5.2.).

3.3.7. 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. Sva ispitivanja vršena su kako na neinficiranim tako i na inficiranim stanicama.

3.3.7.1. Protočna citometrija

3.3.7.1.1. Praćenje spontane internalizacije uslijed 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.

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

Jedan dio stanica ostao je neinficiran, dok smo drugi inficirali sa MCMV-om tijekom 4 sata. Nakon kultivacije u mediju 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 (za inficirane stanice to je 4 sata nakon infekcije), 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.

Kinetički model za analizu stope internalizacije temelji se na parametrima sličnim onima koji se koriste za TfR (190). Od $t_{1/2}$ vrijednosti izračunali smo konstantu brzine prvog reda za internalizaciju (ki), koja je jednaka $\ln(2)/ t_{1/2}$.

3.3.7.2. Konfokalna mikroskopija

3.3.7.2.1. Praćenje kontinuirane internalizacije

Protokol je modificiran prema već ranije opisanom (191). Jedan dio stanica ostao je neinficiran, dok smo drugi inficirali sa MCMV-om tijekom 4 sata. 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; 60 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.

3.3.7.2.2. Praćenje pulse-chase internalizacije

Protokol je također modifikacija ranije opisanog protokola (191). Jedan dio stanica ostao je neinficiran, dok smo drugi inficirali sa MCMV-om tijekom 4 sata. Stanice su potom 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.

3.3.8. Imunoprecipitacija (praćenje degradacije molekula)

3.3.8.1. Biotinilacija površinskih proteina

Neinficirane i inficirane 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.

3.3.8.2. Imunoprecipitacija monoklonskim protutijelima

Lizati površinski biotinom obilježenih neinficiranih i inficiranih 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.

3.3.8.3. 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).

3.3.8.4. 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.

3.3.8.5. 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.

3.3.9. Praćenje recikliranja molekula

3.3.9.1. Protokol recikliranja A

Protokol je prilagođen prema protokolu opisanom u referenci 82. Ukratko, stanicama je dodan Tf obilježen fluorescentnom bojom, te je dozvoljena njegova internalizacija kroz određeni period. 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. Dio Tf-a koji reciklira gubi se iz

stanice, te je smanjenje intenziteta fluorescencije mjera recikliranja Tf-a. 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.

3.3.9.2. Protokol recikliranja B

Protokol je prilagođen prema protokolu opisanom u referenci 192. 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 na 37 °C. 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 na 37 °C ili 16 °C. 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 MHC-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.

4. REZULTATI

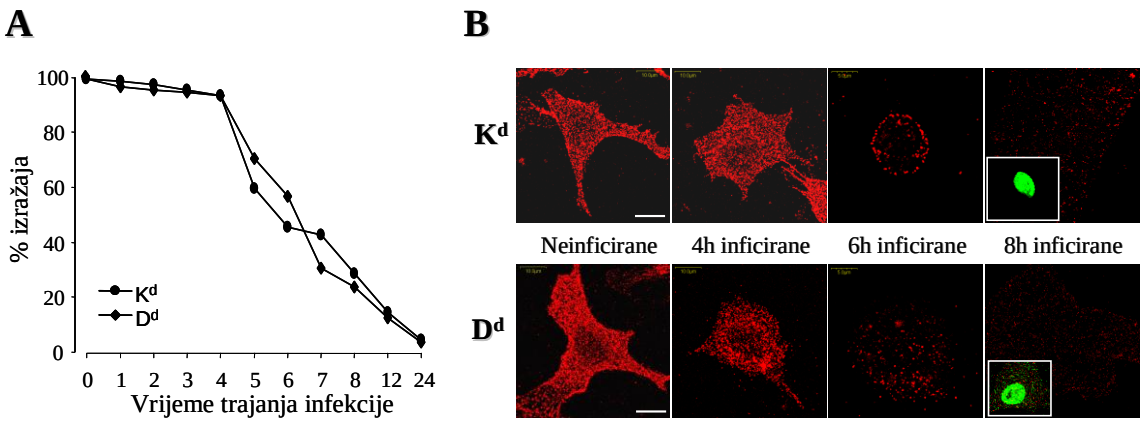
4.1. IZRAŽAJ I LOKALIZACIJA RAZLIČITIH POVRŠINSKIH MOLEKULA

U ovom radu prikazani su rezultati istraživanja mehanizama endocitoze, internalizacije, recikliranja i degradacije površinskih, staničnih molekula na neinficiranim stanicama kao i na stanicama koje su inficirane mišjim citomegalovirusom (MCMV-om). S obzirom na postojanje mnogobrojnih vrsta endocitoze, pratili smo putovanje njihovih pojedinih predstavnika. Korištene su mišje MHC-I molekule haplotipa $H2^d$, i to u obliku stabilnih, trimolekularnih kompleksa (pune molekule K^d i D^d) te CD44 za praćenje klatrin-neovisne, Arf6 ovisne endocitoze. TfR i LAMP za klatrin-ovisnu endocizozu i proces recikliranja, za kaveolarnu/Cdc42-ovisan put B podjedinica toksina kolere (CTxB) te dekstran i albumin za praćenje fluid-fazne endocitoze.

Za istraživanje smo koristili primarne embrionalne mišje fibroblaste (MEF), koji su visoko osjetljivi na infekciju s MCMV-om. S obzirom da MCMV kodira protein koji m138 snažno veže Fc fragment imunoglobulina, i time može uzrokovati nespecifične interakcije pri korištenju mPt, koristili smo za infekciju Δm138-MCMV (ΔMC95.15) s delecijom m138/fcr-1 gena (136). Stopa infekcije veća je od 90%, što smo potvrdili detekcijom unutarstaničnog izražaja proteina najranije faze (engl. immediate early 1, IE1).

4.1.1. Izražaj MHC molekula I. razreda na staničnoj površini

Površinski izražaj konformiranih MHC-I molekula haplotipa $H2^d$ praćen je metodom indirektne imunofluorescencije na nepermeabiliziranim neinficiranim ili inficiranim MEF stanicama metodama protočne citometrije ili konfokalne mikroskopije. Za vizualizaciju ispitivanih molekula koristili smo monoklonskih protutijela (mPt) MA-215 za K^d (193), odnosno 34-5-8S protutijela za D^d molekule (194).



Slika 20. Izražaj MHC molekula I. razreda na staničnoj površini na neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama.

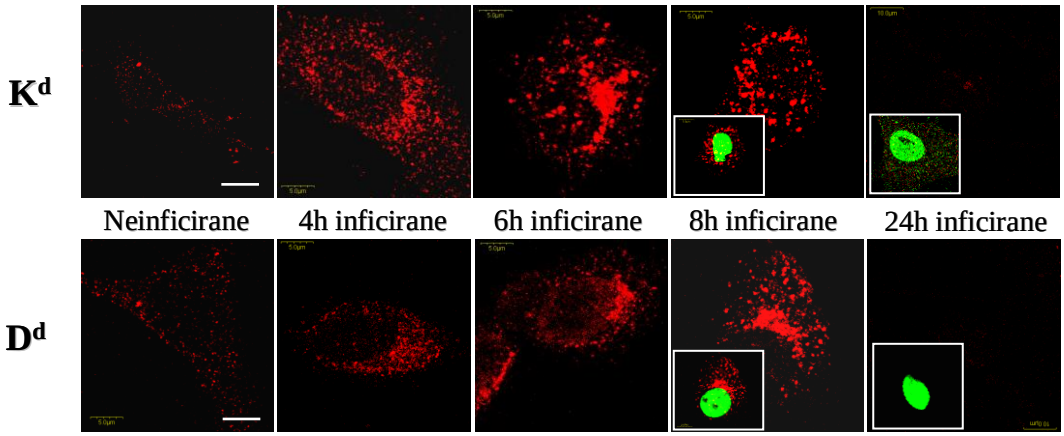
Površinski izražaj MHC-I molekula (K^d i D^d molekula na MEF staničnoj liniji) na neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama prikazan je metodom protočne citometrije (A), te konfokalne mikroskopije (B) bez permeabilizacije stanične membrane. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

U uvjetima ustaljenog stanja (engl. *steady state*) MHC-I molekule dobro su izražene na površini neinficirane MEF stanične linije bez obzira o kojem alelu se radi; K^d ili D^d (slika 20A). Unutar prvih 5 sati nakon infekcije (5 p.i.), MCMV nije značajnije utjecao na razinu MHC-I molekula na staničnoj površini, što se vidi kao 5-10% smanjene početnog izražaja. Nakon 5 sati infekcije (5 p.i.), oba alela K^d i D^d počinju brzo nestajati, odnosno nishodno se reguliraju (engl. down-regulation) sa stanične površine sa stopom od otprilike 25-30% po satu, da bi gotovo u potpunosti nestali 24 sata nakon infekcije (slika 20A). Isto je vidljivo i konfokalnom mikroskopijom, gdje se K^d i D^d dobro izražavaju na neinficiranim, pa čak i na 4 sata inficiranim fibroblastima. Uočava se jak gubitak njihovog izražaja 6 sati nakon infekcije, da bi ih se nakon 8 sati jedva vidjelo na obrisima stanične membrane (slika 20B). Kako bismo potvrdili da su ove stanice uistinu inficirane koristili smo IE1 kao marker infekcije koji difuzno boji jezgru inficirane stanice u najranijoj fazi (slika 20B-zelena fluorescencija mali prozor).

4.1.2. Unutarstanični izražaj i lokalizacija MHC molekula I. razreda

4.1.2.1. Obrazac unutarstanične raspodjele MHC molekula I. razreda

Nakon što smo vidjeli da se MHC-I molekule nishodno reguliraju sa stanične površine u uvjetima infekcije citomegalovirusom, zapitali smo se kakav je njihov obrazac raspodjele unutar stanice.

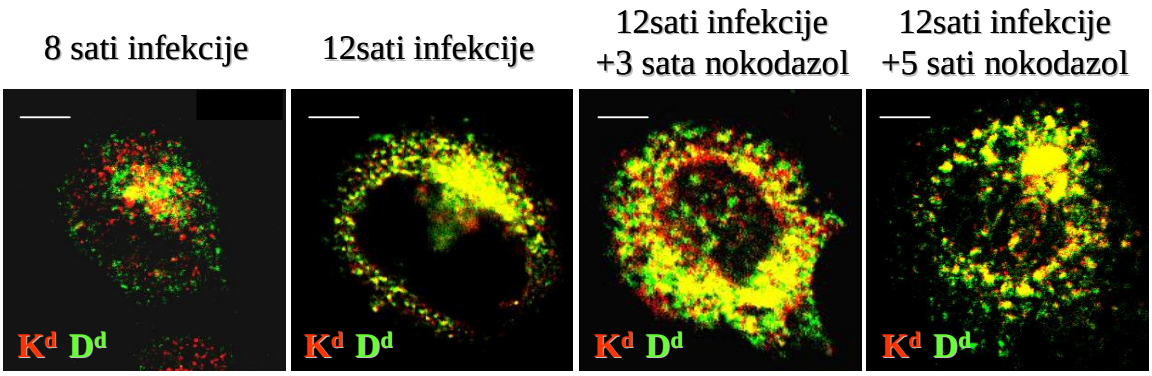


Slika 21. Obrazac unutarstanične raspodjele MHC molekula I. razreda na neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama.

Unutastanični obrazac raspodjele MHC-I molekula (K^d i D^d molekula na MEF staničnoj liniji) na neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama. prikazan je metodom konfokalne mikroskopije. Stanice su fiksirane i permeabilizirane te obilježene odgovarajućim mPt na MHC-I molekule te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Neinficirane stanice zadržavaju većinu svojih K^d i D^d molekula na staničnoj površini i samo mali dio njih vidljiv je u obliku unutarstaničnih vezikularnih struktura. MHC-I molekule nastale u endoplazmatskoj mrežici najvjerojatnije su raspršene u širokom području ER-a te zbog toga nije jasna slika vezikularnog oblika (slika 21- neinficirane stanice). U inficiranim stanicama, MHC-I molekule, već nakon 4 sata infekcije pokazuju tendenciju ka jukstanuklearnom nakupljanju, a nakon 6 sati jasno je vidljiva gusta vezikularna i vezikulo-cjevasta struktura u jukstanuklearnom području oko staničnog centra koja ostaje i nakon 8 sati infekcije (slika 21- inficirane stanice). Da se uistinu radi o području oko same jezgre dokazuje da je nakupljanje upravo oko područja koje se boji zeleno, a to je jezgra stanice (slika 21- zelena fluorescencija mali prozor). Nakupljanje ostaje i 12 sati po infekciji (nije prikazano). Ipak, 24 sata po infekciji MHC-I molekule nisu više vidljive unutar stanice u niti jednom obliku što ukazuje da su vjerojatno ušle u proces degradacije (slika 21).

4.1.2.2. Međusobna kolokalizacija MHC molekula I. razreda u MCMV-inficiranim stanicama



Slika 22. Međusobna kolokalizacija MHC molekula I. razreda u ustaljenom stanju na MCMV-inficiranim stanicama.

Kolokalizacija K^d i D^d molekula na MCMV-inficiranim stanicama sa ili bez prisustva nokodazola (6.6 Mm) prikazana je metodom konfokalne mikroskopije sa permeabilizacijom stanične membrane. 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.

Bez obzira o kojem vremenu nakon infekcije se radi, dva alela K^d i D^d se međusobno kolokaliziraju kao i nakon tretiranja stanica sa nokodazolom, tvari koja uzrokuje oštećenje mikrotubularne mreže (slika 22).

4.1.2.3. Kolokalizacija MHC molekula I. razreda sa biljezima endosomalnih putova

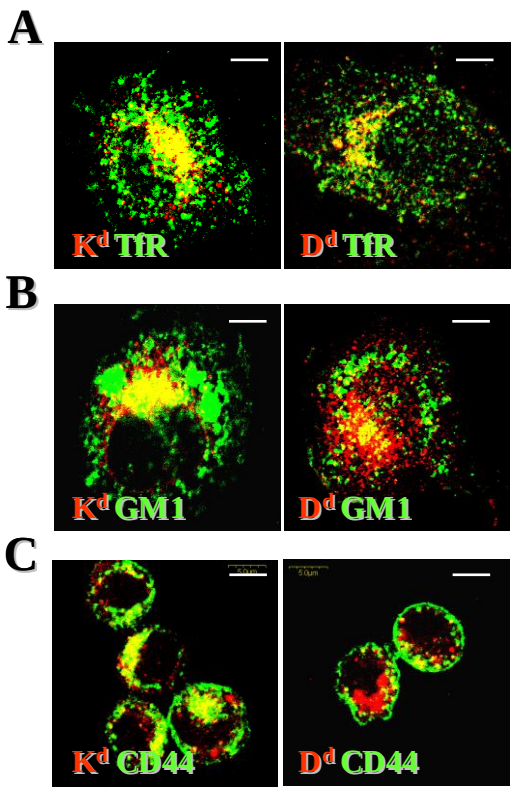
Kao što je prikazano u prethodnom odjeljku MHC-I molekule nishodno se reguliraju sa stanične površine i nakupljaju u području oko jezgre u uvjetima infekcije izazvane citomegalovirusom. Kako bismo točno odredili njihovu lokalizaciju kolokalizirali smo ih sa biljezima endosomalnih putova odnosno odjeljaka.

Neke se molekule, poput transferinskog receptora (TfR-a) i gangliozida GM1 koriste kao biljezi endocitoznih putova s obzirom da se usmjeravaju u određeni dio endocitoznog puta ili se nagomilavaju u nekom unutarstaničnom odjeljku. TfR se nalazi većim svojim dijelom u citoplazmi stanice (oko 80%), a vrlo mali postotak se nalazi na površini stanice. Unutarstanični dio TfR-a uglavnom se odnosi na reciklirajuće endosome iako ga ima i u ranim endosomima (EE). MHC-I molekule kolokaliziraju se sa TfR-om, 8 sati nakon infekcije bez obzira o kojem alelu se radi (slika 23A). Najviše izražen stupanj kolokalizacije izražen je u

jukstanuklearnoim području; gdje se TfR prikazuje u obliku velikih gustih vezikula, za razliku od MHC-I molekula koje su u obliku vezikulo-cjevastih struktura. Takva kolokalizacija nas upućuje na to da se MHC-I molekule nalaze u reciklirajućim endosomima. Dio TfR-a koji je raspršeniji u citoplazmi se ne kolokalizira sa MHC-I molekulama.

Gangliozid GM1, biljeg je lipidnih splavi koje su dobile ime po svojoj neosjetljivosti na deterđente (engl. detergent resistant membrane; DRM), biljeg je kasnih odjeljaka, ali isto tako služi kao receptor za internalizaciju CTxB za koju se zna da ulazi u stanicu procesom kaveolarne endocitoze. S obzirom da je poznato da se u neinficiranim uvjetima MHC-I molekule ne nalaze u lipidnim splavima (40), odnosno da se nalaze u deterđent osjetljivim domenama (engl. detergent sensitive membrane; DSM) tj. ne kolokaliziraju se sa GM1 htjeli smo vidjeti da li je ista takva njihova unutarstanična raspodjela u uvjetima infekcije. Kao što je prikazano, MHC-I molekule kolokaliziraju se sa GM1 u jukstanuklearnom području, 8 sati po infekciji (slika 23B), što nas upućuje da virus manipulira različitim molekulama kao i putovima.

CD44 molekula je adhezijska molekula izražena na površini mnogih stanica. Poput MHC-I molekula ulazi u stanicu klatrin-neovisnom endocitozom te kao što je vidljivo se nakuplja u unutrašnjosti stanice. 8 sati nakon infekcije kolokiziraju se K^d i D^d molekule sa CD44 (slika 23C).



Slika 23. Unutarstanična kolokalizacija ustaljenog stanja MHC molekula I. razreda sa biljezima endosomalnih putova; TfR, GM1 i CD44 na MCMV-inficiranim stanicama.

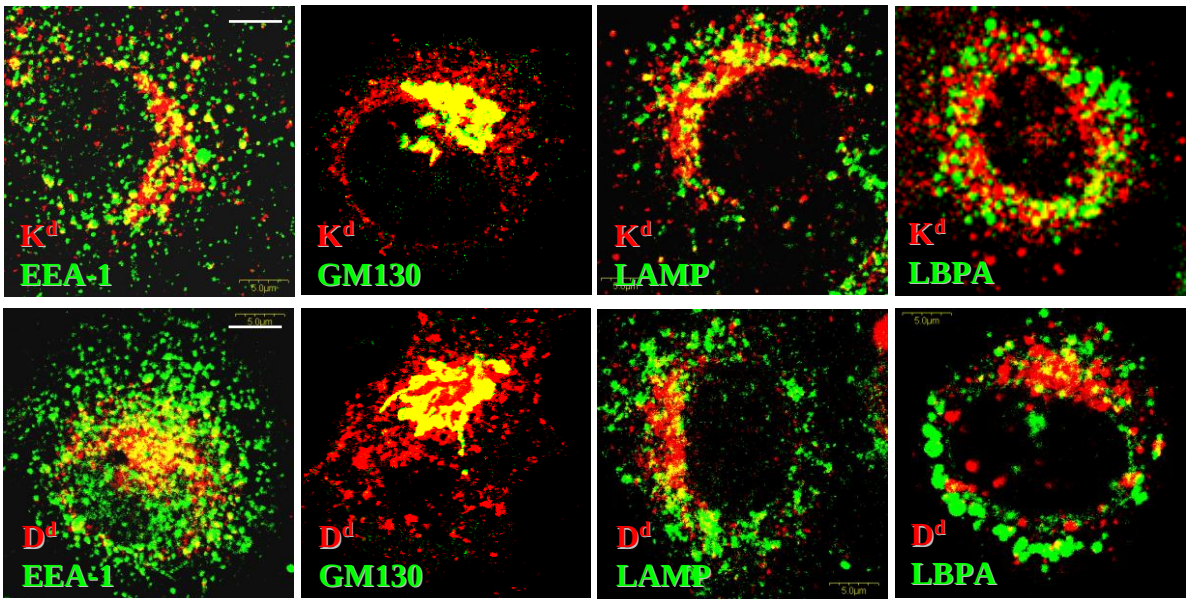
Kolokalizacija MHC-I molekula (crvena fluorescencija) nakon 8 sati infekcije, sa TfR (zelena fluorescencija) (A), CTxB (B) koji obilježava molekulu GM1 (zelena fluorescencija) odnosno CD44 (zelena fluorescencija) u ustaljenom stanju. Stanice su prije fiksacije i permeabilizacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

4.1.2.4. Kolokalizacija MHC molekula I. razreda sa biljezima endosomalnih odjeljaka

U prethodnom odjeljku korišteni su biljezi endosomalnih putova. Nadalje smo odredili lokalizaciju MHC-I molekula, 8 sati nakon infekcije u ustaljenom stanju, kolokalizirajući ih sa biljezima endosomalnih odjeljaka.

Rani ili sortirajući endosomi (EE) raspršeni su difuzno po citoplazmi te na svojoj površini imaju rani endosomalni antigen (EEA-1). Kao što slika 24 prikazuje, K^d i D^d molekule kolokaliziraju se sa EEA-1, što ukazuje na njihovu prisutnost u EE. GM130 najčešće je korišten biljeg Golgijeva aparata, točnije cis-Golgija. Oba alela kolokaliziraju se sa GM130, iako postoji dio molekula koji je izvan cis-Golgija. U odjeljke u koje se usmjeravaju molekule za degradaciju, generalno ubrajamo kasne endosome (LE) i lizosome. Ovi odjeljci imaju na

površini lizosom pridruženi membranski protein (engl. l*ysosomal*-associated membrane protein 1; LAMP1*)*, dok se na površini LE nalazi i LBPA. MHC-I molekule kolokaliziraju se parcijalno i sa LAMP-om i sa LBPA što upućuje da se nalaze u LE i lizosomima (slika 24). S obzirom da je kolokalizacija rađena 8 sati po infekciji, te da se MHC-I molekule kolokaliziraju sa svim biljezima, postoji mogućnost da u inficiranim stanicama dolazi do stvaranja nekog novog odjeljka ili međuodjeljka u kojem se nakuplaju MHC-I molekule, a koji ima obilježja svih navedenih unutarstaničnih endosoma.

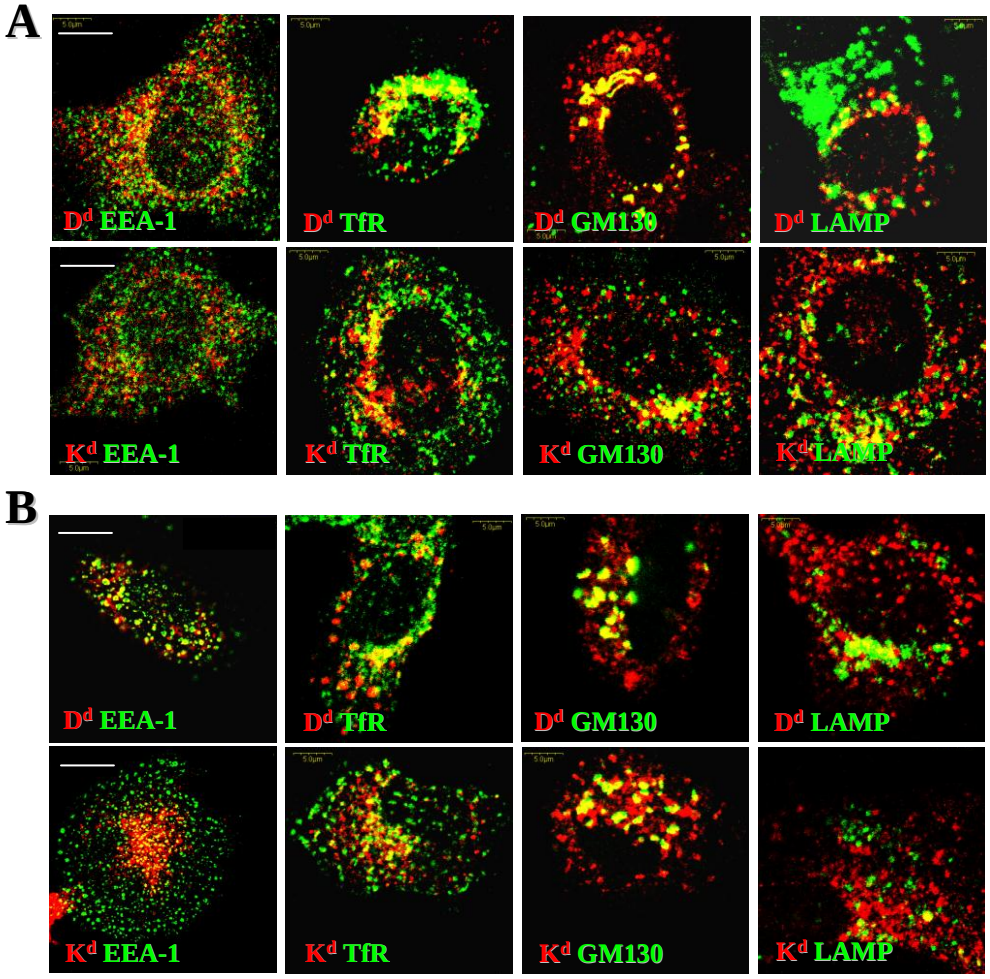


Slika 24. Unutarstanična kolokalizacija ustaljenog stanja MHC molekula I. razreda sa biljezima endosomalnih odjeljaka na MCMV-inficiranim stanicama.

Kolokalizacija ustaljenog stanja MHC-I molekula (crvena fluorescencija) nakon 8 sati infekcije, sa biljezima odjeljaka (zelena fluorescencija). Stanice su prije fiksacije i permeabilizacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

4.1.2.5. Kolokalizacija MHC molekula I. razreda sa biljezima endosomalnih odjeljaka nakon tretiranja stanica sa nokodazolom

Nokodazol, tvar koja raspršuje mikrotubularnu mrežu korištena je u svrhu utvrđivanja, da li je nakupljanje MHC-I molekula u stanici ovisno o mikrotubularnoj mreži.



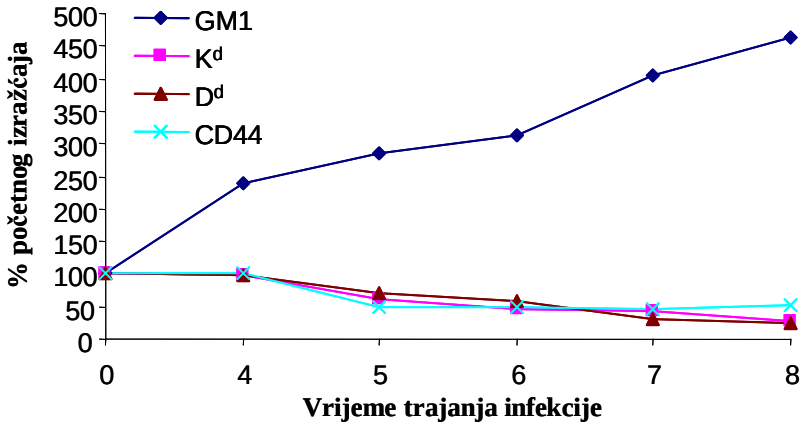
Slika 25. Učinak inhibitora na unutarstaničnu kolokalizaciju ustaljenog stanja MHC molekula I. razreda sa biljezima endosomalnih odjeljaka na MCMV-inficiranim stanicama.

Nakon 8 sati infekcije, promatran je učinak nokodazola tijekom 3h (A) i 5h (B) na kolokalizaciju MHC-I molekula (crvena fluorescencija), sa biljezima odjeljaka (zelena fluorescencija) u ustaljenom stanju. Stanice su prije fiksacije i permeabilizacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Stanice su prvo inficirane tijekom 8 sati te su potom tretirane tijekom 3 ili 5 sati nokodazolom. Nakon tretmana došlo je do raspršivanja nakupljenih molekula, što upućuje na činjenicu da je njihovo nakupljanje ovisno o mikrotubularnoj mreži, kao i Golgijeve mreže. MHC-I molekule se i dalje kolokaliziraju sa transferinskim receptorom. Također, mjehurići koji sadrže MHC-I molekule i dalje su pozitivni na EEA-1 i na GM130. što može upućivati da ti mjehurići ne mogu otpuštati EEA-1^{+} membrane, te da su zarobljene negdje u području Golgijeve mreže. Nakon 8 sati infekcije i tretmana nokodazolom MHC-I molekule se ne kolokaliziraju ili se vrlo malo kolokaliziraju sa LAMP biljegom što može ukazivati da se MHC-I molekule puno kasnije usmjeravaju u kasne odjeljke na proces degradacije (slika 25).

4.1.3. Površinski izražaj različitih staničnih molekula u uvjetima infekcije

U stanicama inficiranim sa MCMV-om, osim što dolazi do nishodne regulacije MHC-I molekula, također dolazi do takvog učinka na CD44 adhezijsku molekulu. GM1 molekula se u infekciji ushodno regulira što bi moglo upućivati da virus utječe i na biofiziku membrana u smislu promjene strukture istih (slika 26).



Slika 26. Površinski izražaj MHC molekula I. razreda, GM1 i CD44 nakon 8 sati infekcije.
Površinski izražaj MHC-I molekula (K^d i D^d molekula), GM1 i CD44 na neinficiranim i 8 sati MCMV inficiranim stanicama prikazan je metodom protočne citometrije.

4.2. INTERNALIZACIJA MHC MOLEKULA I. RAZREDA

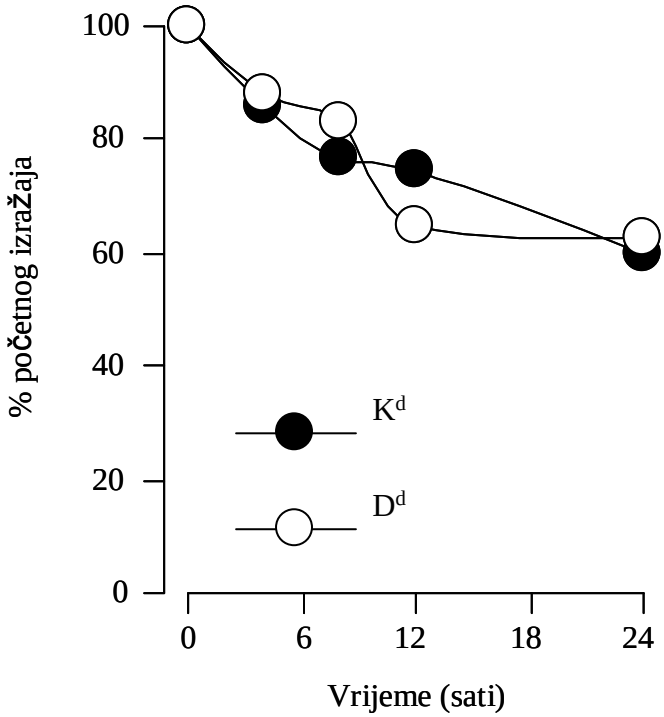
Internalizacija je proces kojim se površinske molekule uklanjaju sa stanične površine. Ona je posljedica *endocitoze*, odnosno ulaska molekula u stanicu, te *recikliranja*, povratka endocitiranih molekula natrag na staničnu površinu. Stoga nam praćenje nestanka molekula sa stanične površine ne govori o kinetici endocitoze, već o kinetici njihove internalizacije. Naime, endocitozu ne možemo direktno pratiti. Internalizaciju MHC-I molekula usporedili smo s internalizacijom kontrolnih molekula; 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 (CHX), 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-I molekula stanice smo tretirali s CHX-om u koncentraciji 15 μg/mL kako bismo zaustavili dotok novo-sintetiziranih molekula na staničnu površinu, te bili u mogućnosti s nje pratiti nestanak postojećih molekula. Kao što slika 27 prikazuje, kinetika spontane internalizacije MHC-I molekula relativno je spori proces te se iste izražavaju i 24 sata nakon tretmana; otprilike 60% početnog izražaja.

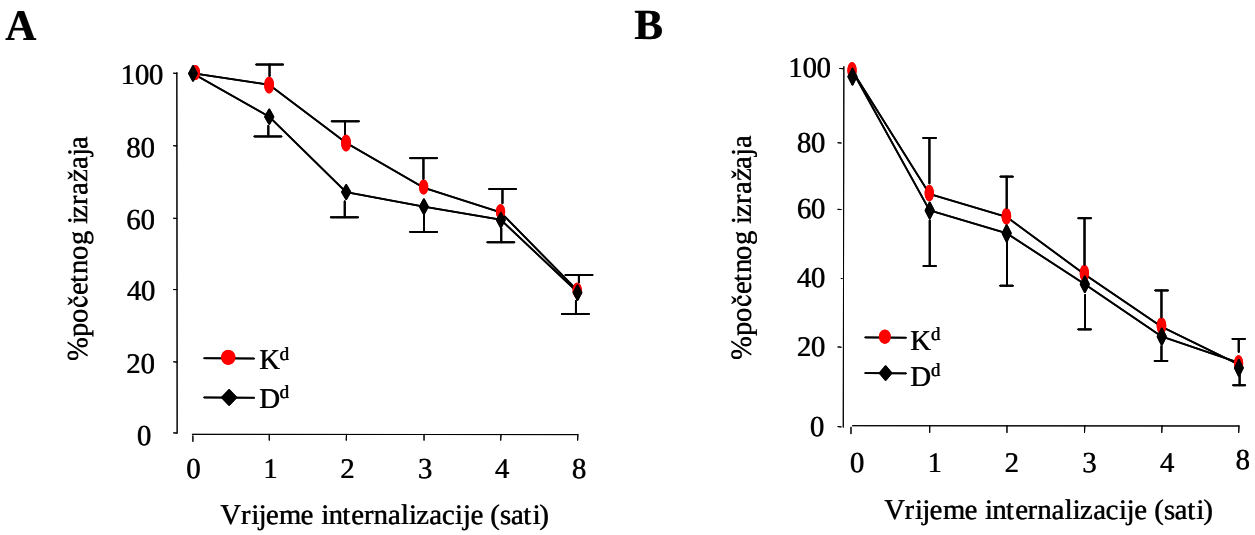


Slika 27. Kinetika spontane internalizacije MHC molekula I. razreda na MEF staničnoj liniji uslijed djelovanja cikloheksimida.

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.

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

Kinetiku spontane internalizacije MHC-I molekula pratili smo i nakon površinskog obilježavanja odgovarajućim mPt na neinficiranim i inficiranim stanicama. Neinficirane stanice, kao i 4 sata inficirane stanice inkubirane su 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 metodom protočne citometrije.



Slika 28. Kinetika spontane internalizacije MHC molekula I. razreda na MCMV-inficiranim stanicama u različitim vremenskim intervalima nakon površinskog vezivanja mPt.

Neinficirane i 4 sata inficirane površinski su 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 (neinficirane stanice) pomnožen sa 100, ± standardna devijacija (n=9).

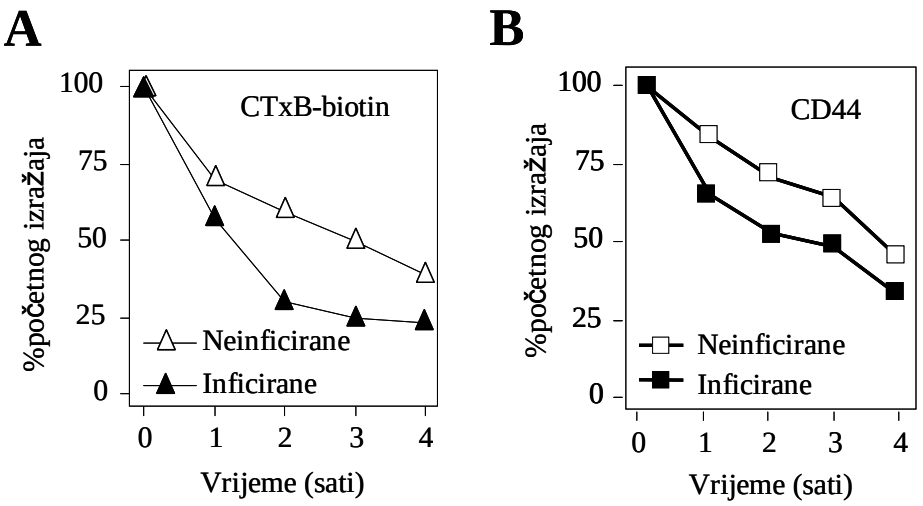
Kao što slika 28 prikazuje, međusobna kinetika internalizacije alela D^d i K^d molekula vrlo je slična bez obzira radi li se o neinficiranim ili inficiranim stanicama. Kinetika internalizacije u MCMV-inficiranim stanicama, odvija se prosječnom konstantnom stopom (eng. average internalization rate constant; k_i) od 0.315 h^{-1} za D^d i 0.33 h^{-1} za K^d ($t_{1/2}$ ~ 2 sata). Ovo je značajno brže nego u neinficiranim stanicama: prosječna k_i ovdje iznosi 0.05776 h^{-1} za D^d ($t_{1/2}$ ~ 12 sati) i 0.077 h^{-1} za K^d ($t_{1/2}$ ~ 9 sati). 4 sata nakon internalizacije otprilike 20% MHC-I molekula ostalo je na staničnoj površini inficiranih stanica. Moguća disocijacija mPt i bijeg MHC-I kompleksa od otkrivanja testiran je u svakoj vremenskoj točci dodatkom primarnog mPt. Dodatno bojenje ne povećava fluorescentni signal za više od 2% što upućuje na činjenicu da se vrlo malo, ako i postoje, MHC-I molekule mogu naći nevezane s mPt na površini stanice, čak i nakon četiri sata inkubacije.

Kinetiku internalizacije MHC-I molekula izazvanu virusom (Slika 28B) usporedili smo s kinetikom spontane internalizacije koju smo izazvali pomoću cikloheksimida (Slika 27) iz čega je jasno vidljivo da je internalizacija MHC-I molekula izazvana virusnim proteinima aktivan proces koji se odvija vrlo brzo te da po svojim karakteristikama slijedi načelo potaknute endocitoze izazvane ligandom. Iako je stopa internalizacije 4 do 6 puta brži proces

u MCMV-inficiranim nego u neinficiranim stanicama, ipak je manja u odnosu na stopu internalizacije molekula koje u stanicu ulaze klatrin-ovisnom endocitozom (slika 37). Rezultati sugeriraju da se MHC-I molekule uklanjaju sa površine MCMV-inficiranih stanica procesom neovisnim o klatrinu.

4.2.1.3. Usporedba kinetike internalizacije MHC molekula I. razreda s kinetikom internalizacije nekih kontrolnih molekula

Kinetiku internalizacija B podjedinice toksina kolere i CD44 adhezijske molekule pratili smo na MEF staničnoj liniji u neinficiranim i MCMV-inficiranim uvjetima, te je usporedili s kinetikom internalizacije MHC-I molekula.



Slika 29. Kinetika internalizacije B podjedinice toksina kolere i CD44 molekule.

Neinficiranim i 4 sata inficiranim stanicama dodan je CtxB-biotin (A) ili CD44 (IM7) (B) tijekom 1 sata na 4 °C, stanice su isprane u čistom mediju, te su inkubirane na 37 °C. 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.

Kinetika internalizacije CTxB-biotina kao i CD44 molekule brža je na inficiranim stanicama u odnosu na neinficirane stanice. Ukoliko kinetiku internalizacije ovih kontrolnih molekula uspoređujemo s kinetikom internalizacije MHC-I molekula tada možemo zamijetiti da je trend kinetike CTxB-biotina kao i CD44 molekule vrlo sličan trendu kinetike internalizacije MHC-I molekula u neinficiranim odnosno inficiranim uvjetima (slike 29A i 29B). Sve to upućuje na

činjenicu da je kinetika internalizacije u uvjetima citomegalovirusne infekcije daleko brža nego u neinficiranim uvjetima bez obzira o kojoj površinskoj molekuli se radi.

4.2.2. Utjecaj različitih inhibitora na internalizaciju MHC molekula I. razreda

Kako bi utvrdili koji endocitozni put koriste MHC-I molekule prilikom ulaska u inficiranu stanicu, stanice smo tretirali paletom kemijskih inhibitora endocitoze te smo pomoću protočne citometrije pratili njihov površinski izražaj nakon površinskog vezivanja mPt. U svim pokusima stanice su dodatno, prije početka pokusa, bile pretretirane inhibitorima koji su bili prisutni u mediju tijekom cijelog vremena. Kod korištenja inhibitora, vodili smo računa o vijabilnosti stanica koja je iznosila 85-95%, a tijekom analize nisu uzete u obzir nevijabilne stanice.

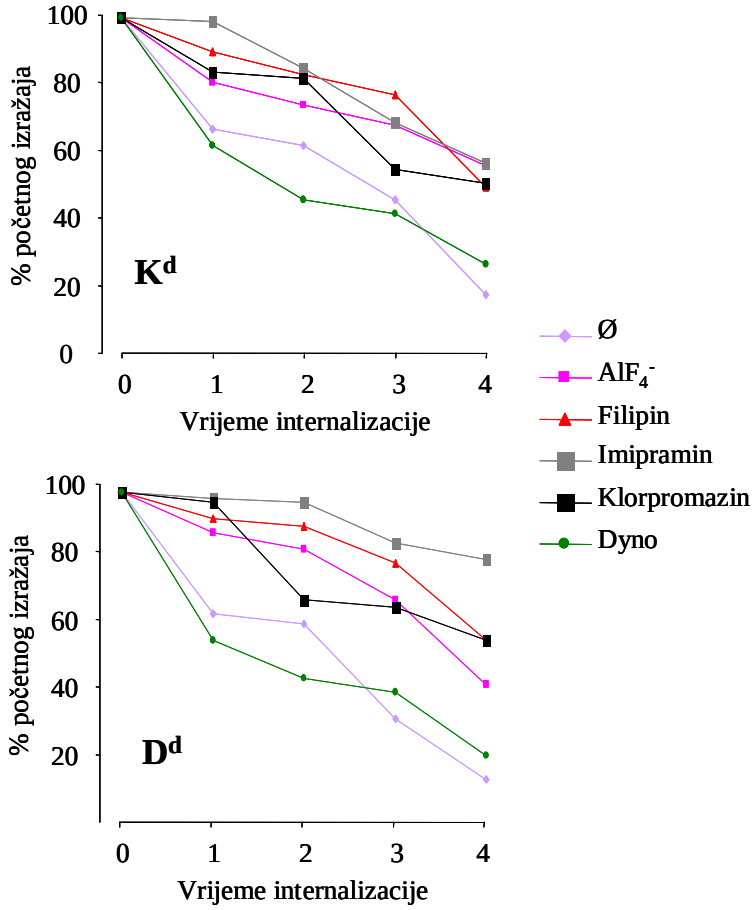
4.2.2.1. Utjecaj različitih inhibitora endocitoze na internalizaciju MHC molekula I. razreda

S obzirom da je klatrin-ovisna endocitoza zasigurno najbolje istraženi mehanizam endocitoze, te da ga koriste mnoge molekule za ulazak u stanicu, željeli smo ispitati da li i MHC-I molekule 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 klatrin-ovisnu endocitozu (195, 196, 197), te *Dynasore* (D), tvar koja blokira dinamin GTPazu (198, 199), molekulu koja je neophodna za odvijanje klatrin-ovisne endocitoze. Imipramin (I) je također inhibitor klatrin-ovisne endocitoze. Aktivira AP-2 receptor na neobložnim endosomalnim odjeljcima, te time na njima potiče stvaranje klatrinskih rešetki onemogućavajući sklapanje klatrinskog omotača na površini stanice.

Filipin (F) je kemijski inhibitor koji izmjenom kolesterolskog sastava stanične membrane utječu na mehanizam odvijanja endocitoznih putova ovisnih o lipidnim splavima (200, 201); kaveolarne endocitoze, te endocitoze neovisne o klatrinu i dinaminu (endocitoza ovisna o Cdc42 GTPazi ili ovisna o Arf6 GTPazi.

Aluminij fluorid (AlF_4^-) je poznat kao aktivator Arf6 GTPaze (202) za kojeg je pokazano da ima važnu ulogu u internalizaciji MHC-I molekula (30, 36, 40, 203). 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, ometa njenu normalnu funkciju na način da je akutno aktivira, te dovodi do stvaranja membranskih izbočenja koje ostaju imobilizirane u subplazmalematskom području (204, 205). Kako bi ispitali tu činjenicu,

stanice smo tretirali s AlF_4^- te pratili kinetiku internalizacije MHC-I molekula, uspoređujući je s kinetikom na netretiranim stanicama.



Slika 30. Učinak različitih inhibiotra na internalizaciju MHC molekula I. razreda u MCMV-inficiranim stanicama.

Dijelu stanica u predtretmanu dodan je neki od inhibitora: AlF_4^- (30mM NaF + 50 µM $AlCl_3$), filipin (1.2 µg/mL), imipramin (17.5 µg/mL), klorpromazinom (7,5 µg/mL) i Dynasore-a (D, 80µM), dok je dio ostao netretiran kao kontrola. Nakon toga stanice su inficirane tijekom 4 sata. Stanice su potom površinski obilježene protu-MHC-I mPt tijekom 1 sata na 4 °C. Potom je dozvoljena internaliazacija na 37 °C, te je površinski izražaj analiziran protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao omjer MFI vrijednosti nakon određenog vremena internalizacije i MFI vrijednosti nultog vremena pomnožen sa 100.

Važno je napomenuti da niti jedan od navedenih inhibitora nije uzrokovao značajniju promjenu početnog površinskog izražaja ispitivanih molekula.

Dynasore nije značajno utjecao internalizaciju MHC-I molekula u odnosu na kontrolu ($p>0.05$) iz čega možemo zaključiti da internalizacija MHC-I molekula neovisno o

ispitivanom alelu nije ovisna o klatrinu i dinaminu (slika 30). Pod utjecajem klorpromazina i imipramina došlo je do neznatnog smanjenja internalizacije MHC-I molekula, što bi potvrđivalo naše prethodne rezultate da je internalizacija MHC-I molekula neovisna o klatrinu. Inhibitor kaveolarne endocitoze filipin također je doveo do malih promjena u stopi internalizacije baš poput AlF_4^- (slika 30). Iz svega ovoga možemo zaključiti da niti jedan od inhibitora nije značajnije djelovao na internalizaciju MHC-I molekula (statistički značajnost $p>0.05$). Navedeni inhibitori imali su vrlo mali ili gotovo nikakav učinak na internalizaciju kontrolnih molekula (CTxB, CD44), što dovodi u pitanje učinkovitost inhibitora (nije prikazano). Ipak, ono što sigurno možemo zaključiti o načinu ulaska MHC-I molekula ulaze u stanicu je slijedeće: MHC-I molekule ulaze u stanicu putem neovisnim o dinaminu te s obzirom na stopu internalizaciju i putem neovisnim o klatrinu.

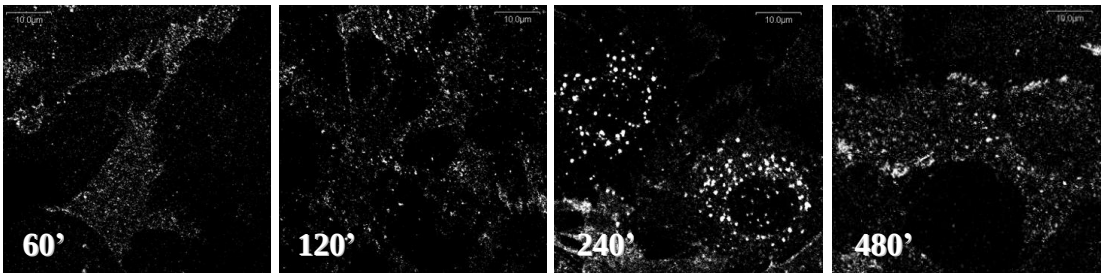
Moguće je da u infekciji dolazi do perturbiranja različitih endocitoznih putova te da virus iskorištava onaj koji mu nije apsolutno ničim blokiran ili da virus jednostavno nekim svojim proteinima nadjačava djelovanje inhibitora.

4.3. VEZIKULARNI TRANSPORT MHC MOLEKULA I. RAZREDA

Nakon internalizacije, MHC-I molekule prolaze kroz mnogobrojne unutarstanične odjeljke na putu do svog konačnog odredišta. Kako bi ispitali koji sve endosomalni odjeljci sudjeluju tijekom njihova unutarstaničnog putovanja, te da li MHC-I molekule koriste isti unutarstanični put u neinficiranim i inficiranim uvjetima, u različitim vremenima kolokalizirali smo internalizirane MHC-I molekule međusobno, te svaki alel s biljezima određenih unutarstaničnih putova ili odjeljaka.

4.3.1. Obrazac unutarstanične raspodjele internaliziranih MHC molekula I. razreda

Unutarstanično putovanje MHC-I molekula moguće je pratiti nakon površinskog obilježavanja s odgovarajućim mPt i to metodom indirektne imunofluorescencije pomoću konfokalnog mikroskopa. U tu svrhu, neinficirane ili 4 sata inficirane stanice inkubirane su 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.

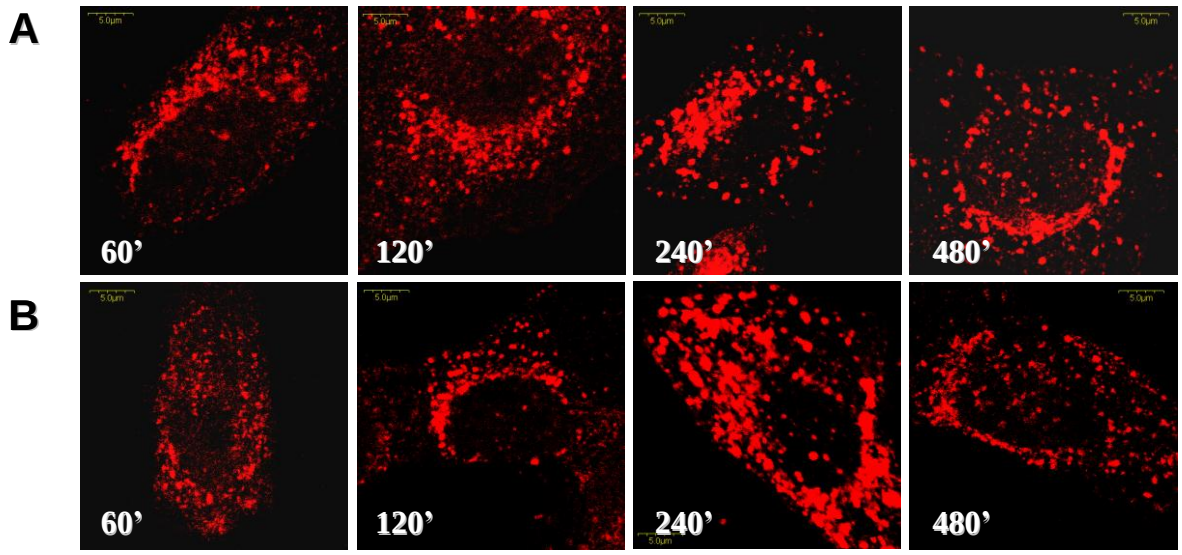


Slika 31. Unutarstanična distribucija K^d molekula na neinficiranim stanicama nakon internalizacije.
Neinficirane stanice su površinski obilježene odgovarajućim mPt na K^d molekule, te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Isti obrazac internalizacije vrijedi za oba alela, K^d i D^d. Jedan i dva sata nakon internalizacije, MHC-I molekule se gotovo niti ne vide u neinficiranim stanicama, što upućuje ili na smanjenu stopu internalizacije ili na njihovo ubrzano usmjeravanje u degradaciju (slika 31,

60' i 120'). U većini neinficiranih stanica internalizirane MHC-I molekule se ne koncrentriraju u jukstanuklearnom području niti se nakupljaju u vezikulu-tubularnim strukturama (slika 31, 240' i 480'). To nam govori da se u neinficiranim MEF stanicama ustaljeno stanje (eng. steady state) recirkulirajućih MHC-I molekula uspostavlja već nakon jednog sata internalizacije te da produžena internalizacija od 8 sati, nije dovela do nakupljanja MHC-I molekula u stanici, kao ni do stvaranja tzv. retencijskog odjeljka (slike 32A i 32B, 240' i 480').

Jedan sat nakon internalizacije u inficiranim stanicama, MHC-I molekule nalaze se raspršeno u citoplazmatskim mjehurićima, koji se u nekim stanicama koncentriraju u perinuklearnom području (slike 32A i 32B, 60'). Dva sata, a pogotovo nakon četiri i osam sati internalizacije, većina MHC-I molekula nakuplja su u velikim perinuklearnim mjehurićima koji se koncentriraju oko jukstanuklearnog područja (slike 32A i 32B, 120', 240' i 480'). Mjesto nakupljanja internaliziranih MHC-I molekula u inficiranim stanicama naziva se retencijski odjeljak.



Slika 13. Unutarstanična distribucija MHC molekula I. razreda na inficiranim stanicama nakon internalizacije.

Stanice su inficirane tijekom 4 sata, potom su površinski obilježene odgovarajućim mPt, K^d (A) i D^d (B), te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. 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.

Iako neki od internaliziranih mjehurića mogu imati vezikulo-tubulasti izgled, internalizirane MHC-I molekule ipak nisu srasle u jukstanuklearno tubulo-vezikularne endosome, strukturu koja je tipična za internalizaciju transferinskog receptora (slika 33, TfR).

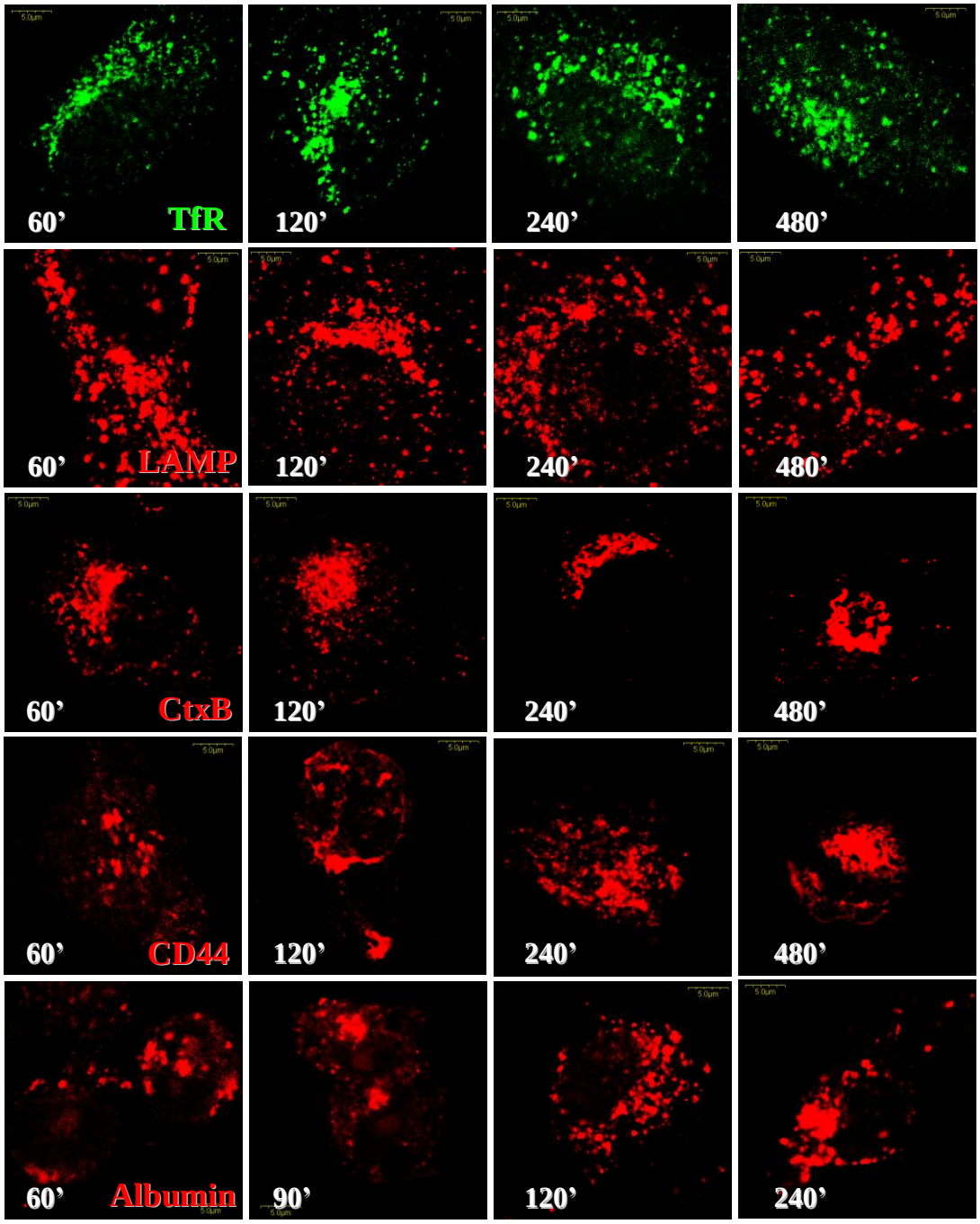
4.3.2. Obrazac unutarstanične raspodjele internaliziranih kontrolnih molekula

Prethodno smo prikazali veliku razliku u internalizaciji MHC-I molekula između neinficiranih i inficiranih stanica; stopa internalizacije, nakupljanje MHC-I molekula u stanici te stvaranje retencijskog odjeljka. S obzirom na te činjenice potrebno je vidjeti da li u inficiranim stanicama dolazi do nakupljanja i internaliziranih molekula drugih endocitoznih putova koji ne dijele put sa MHC-I molekulama. Kao kontrolne molekule koristili smo slijedeće: klatrin-ovisna endocitoza te (TfR i LAMP), kaveolarna/Cdc42-ovisna endocitoza (CTxB i CD44) i za fluid-faznu endocitozu (albumin).

Kao i u prethodnom pokusu, stanice su praćene tijekom različitih vremena internalizacije. Vrijeme internalizacije albumina nešto se razlikuje od drugih iz razloga što albumin je molekula koja ulazi fluid fazom u stanicu bez prethodnog vezivanja, te se kao takva vrlo brzo usmjerava u degradaciju, pa postoji mogućnost njene brze razgradnje.

MCMV manipulira endocitoznim putem MHC-I molekula u vidu njihovog nakupljanja u stanici (slika 32). Međutim nije samo pogođen njihov put. Kao što slika 33 prikazuje, u MCMV inficiranim stanicama dolazi do nakupljanja svih kontrolnih molekula. One se nakupljaju u jukstanuklearnom području, u vidu malenih mjehurića, ali i vezikulo-tubularnih struktura. Nešto slabije nakupljanja karakterizirano je za albumin. Za albumin je poznato da vrlo brzo ulazi u put degradacije, što bi ovdje upućivalo na činjenicu da je, s obzirom da se albumin ipak nakuplja, ulazak u degradacijski put vrlo vjerojatno odgođen.

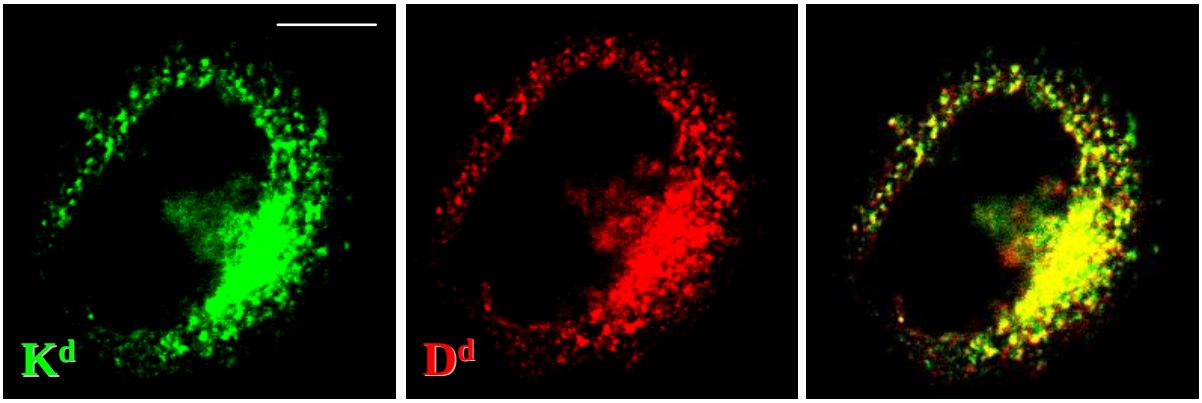
Dakle, sve internalizirane molekule pokazuje tendenciju ka nakupljanju u perinuklearnom retencijskom odjeljku ukazujući na nespecifičnost navedenog fenomena u MCMV-inficiranim stanicama s obzirom da isti nije rezerviran isključivo za MHC-I molekule.



Slika 33. Unutarstanična distribucija kontrolnih molekula na inficiranim stanicama nakon internalizacije. Stanice su inficirane tijekom 4 sata, potom su površinski obilježene odgovarajućim mPt, te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. 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. Usporedna internalizacija MHC molekula I. razreda na MCMV inficiranim stanicama

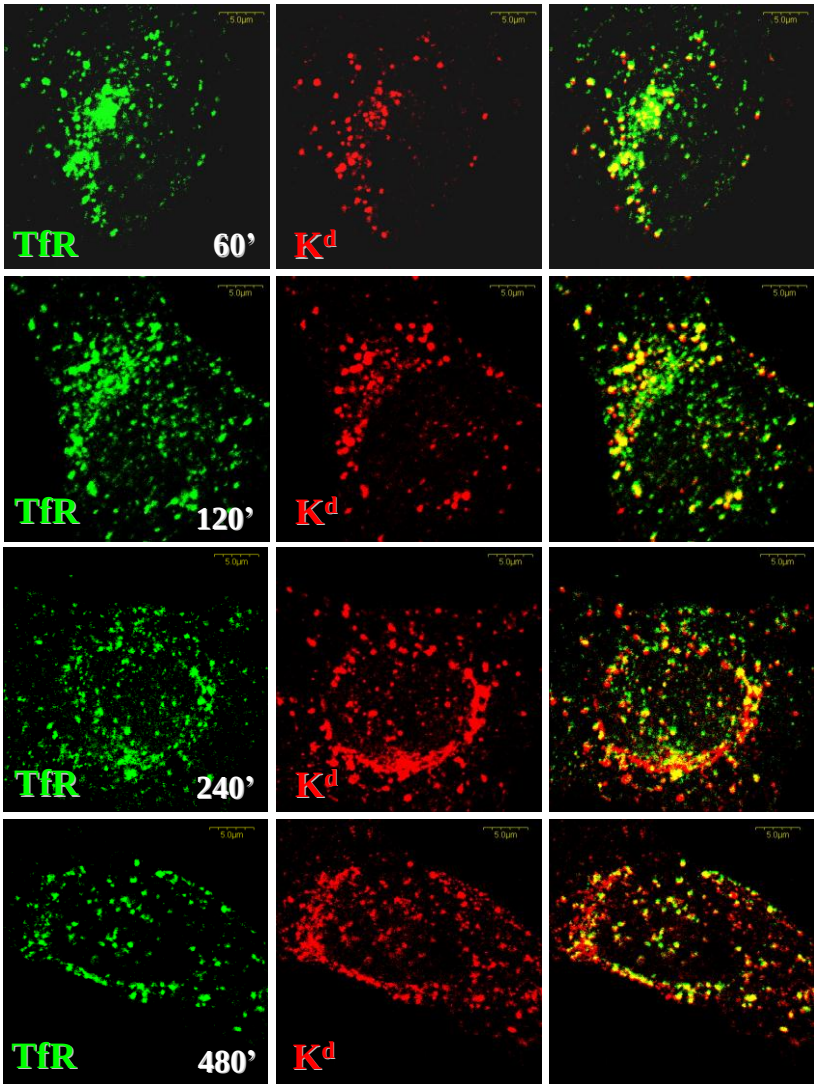
Kako bi potvrdili da se uistinu unutar endocitoznog puta dva alela MHC-I molekula, K^d i D^d, različito ne sortiraju, kolokalizirali smo ih međusobno nakon internalizacije. Kao što je vidljivo K^d i D^d, se u potpunosti kolokaliziraju, što znači da postoje zajednički endosomalni odjeljci u kojima se isprepliće njihovo unutarstanično putovanje (slika 34).



Slika 34. Kolokalizacija K^d i D^d nakon usporedne internalizacije u MCMV-inficiranim stanicama.
Stanice su površinski obilježene odgovarajućim mPt na K^d molekulu i mPt na D^d molekulu te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom 4 sata. 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.

4.3.4. Usporedba unutarstaničnog putovanja MHC molekula I. razreda i transferinskog receptora na MCMV inficiranim stanicama

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, pratili smo usporednu internalizaciju MHC-I molekula s internaliziranim TfR-om kako bi ustanovili da li se MHC-I molekule nalaze u sklopu puta recikliranja.

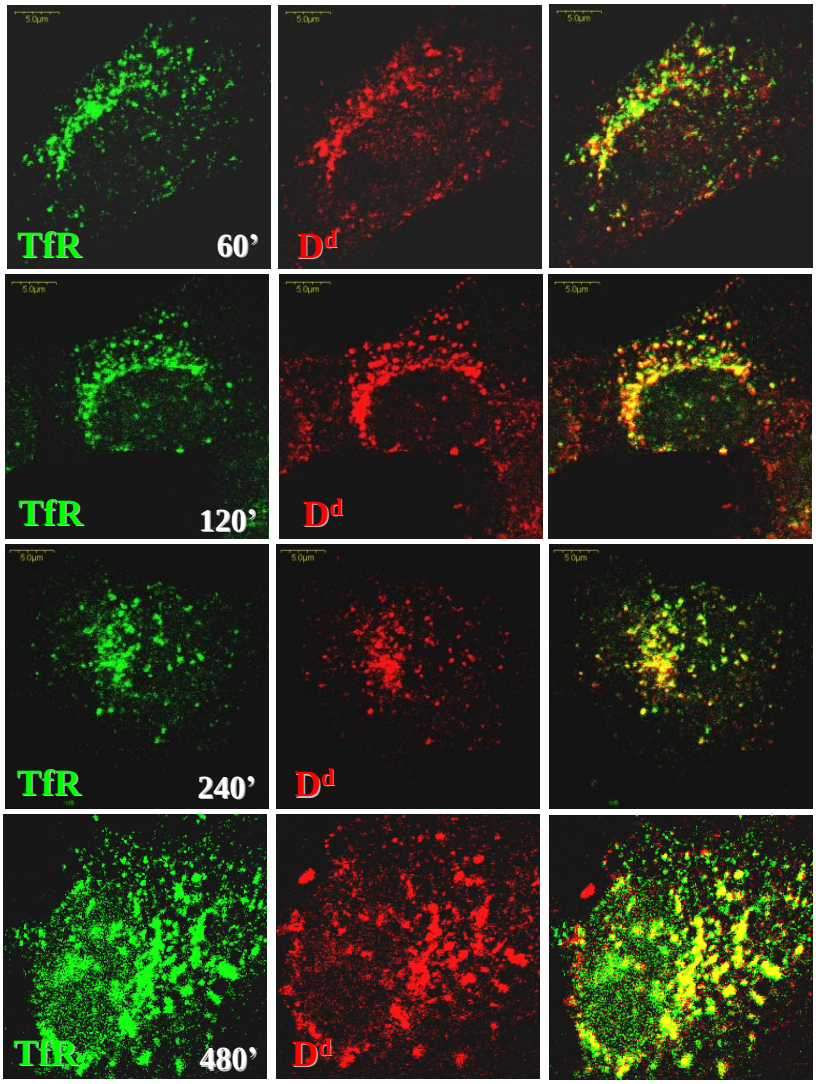


Slika 35. Kolokalizacija K^d i transferinskog receptora (TfR) nakon usporedne internalizacije u MCMV-inficiranim stanicama.

Stanice su površinski obilježene odgovarajućim mPt na K^d molekulu i mPt na TfR te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. 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 jednog sata usporedne internalizacije MHC-I molekule se kao i TfR vide u obliku mjehurića te se kolokaliziraju difuzno po citoplazmi (slike 35 i 36, 60'). Nakon 2 sata internalizacije molekule se također kolokaliziraju, D^d i TfR ne više toliko difuzno u citoplazmi već perinuklearno (slika 36, 120'), dok se K^d i TfR više kolokaliziraju u citoplazmi (slika 35, 120'). Nakon 4 sata, kao i nakon 8 sati internalizacije vidljiva je jasna jukstanuklearna kolokalizacija (slike 35 i 36, 240' i 480'). Možemo zaključiti da se MHC-I molekule, neovisno o alelu, tijekom internalizacije u velikoj mjeri kolokaliziraju s

internaliziranim TfR-om, a kolokalizacija je najizraženija u jukstanuklearnoj regiji. Taj nam rezultat ukazuje na činjenicu da konformirane MHC-I molekule nakon internalizacije slijede put sličan putu kojim u stanicu ulazi TfR.

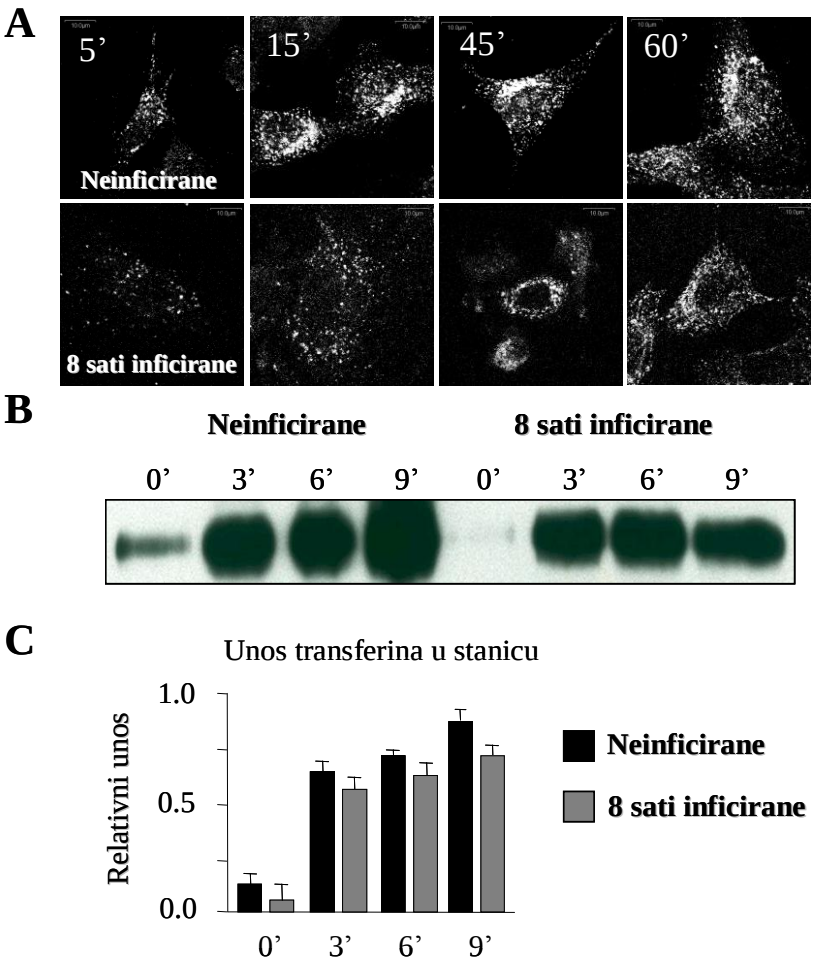


Slika 36. Kolokalizacija D^d i transferinskog receptora (TfR-a) nakon usporedne internalizacije u MCMV-inficiranim stanicama.

Stanice su površinski obilježene odgovarajućim mPt na D^d molekulu i mPt na TfR te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. 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.

4.3.5. Usporedba kinetike internalizacije transferina na neinficiranim i MCMV inficiranim stanicama

S obzirom da smo vidjeli da MHC-I molekule prate iste put kao i Tf (slike 16 i 17), pratili smo kinetiku internalizacije Tf-a kako bismo ustanovili da li i kod Tf-a dolazi do nekakvih promjena u stopi internalizacije u ovisnosti o neinficiranim odnosno MCMV inficiranim uvjetima.



Slika 37. Internalizacija transferina u neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama.

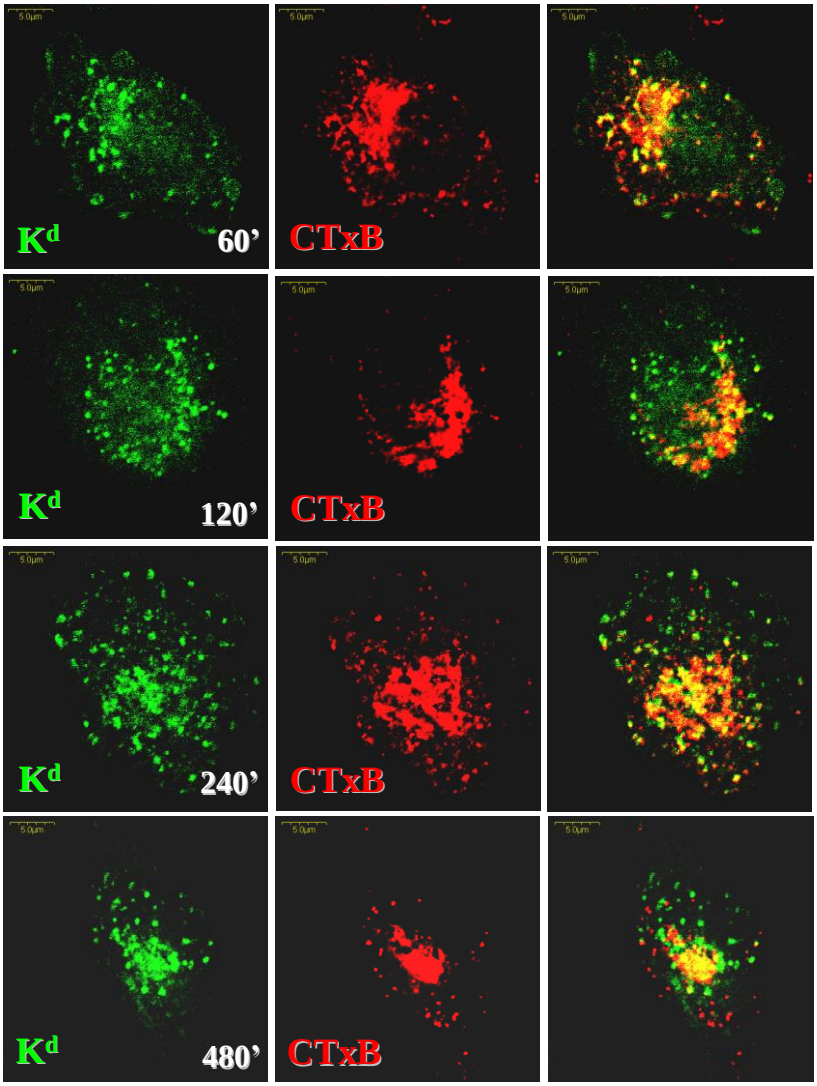
Neinficirane i 8 sati inficirane stanice su površinski obilježene mPt transferin AlexaFluor 555 te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula, te analizirane konfokalnom mikroskopijom (A). Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm. Neinficirane i 8 sati inficirane stanice su površinski obilježene mPt transferin-biotinom te inkubirane na 37 °C. Nakon naznačenih vremenskih intervala jednak broj stanica je razoren u 1% NP40 puferu. Svi uzorci su potom razdvojeni na SDS-PAGE elektroforezi i blotirani, a molekule vizualizirane pomoći SA-POD i kemiluminiscencije (B). Nakon vizualizacije izvršena je kvantifikacija internalizacije transferina (C).

U neinficiranim i 8 sati inficiranim stanicama 5 minuta nakon internalizacije vidimo vrlo malo internaliziranog Tf-a koji se uglavnom nalazi difuzno po citoplazmi, stoga mu je i signal fluorescencija izrazito mali (slika 37A, 5') U neinficiranim stanicama, transferin se vrlo brzo internalizira u jukstanuklearnim reciklirajućim endosomima već nakon 15 minuta (slika 37A, inficirane 15') te se može detektirati nakon 60 minuta (slika 37A, inficirane 60') te čak nakon 18 sati internalizacije (nije prikazano). U suprotnosti, jukstanuklearno nakupljanje internaliziranog transferina je odgođeno u inficiranim stanicama, te do nakupljanja dolazi tek nakon 60 minuta internalizacije (slika 37A, neinficirane 60'). Ovi rezultati upućuju da u MCMV-inficiranim stanicama dolazi do promjena u unutarstaničnom putovanju Tf-a. S obzirom da je stopa unos Tf-a u neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama vrlo slična (slike 37B i 37C), zaključili smo da je klatrin-ovisna endocitoza funkcionalna u MCMV-inficiranim stanicama.

4.3.6. Usporedba unutarstaničnog putovanja MHC molekula I. razreda i B podjedinice toksina kolere na MCMV-inficiranim stanicama

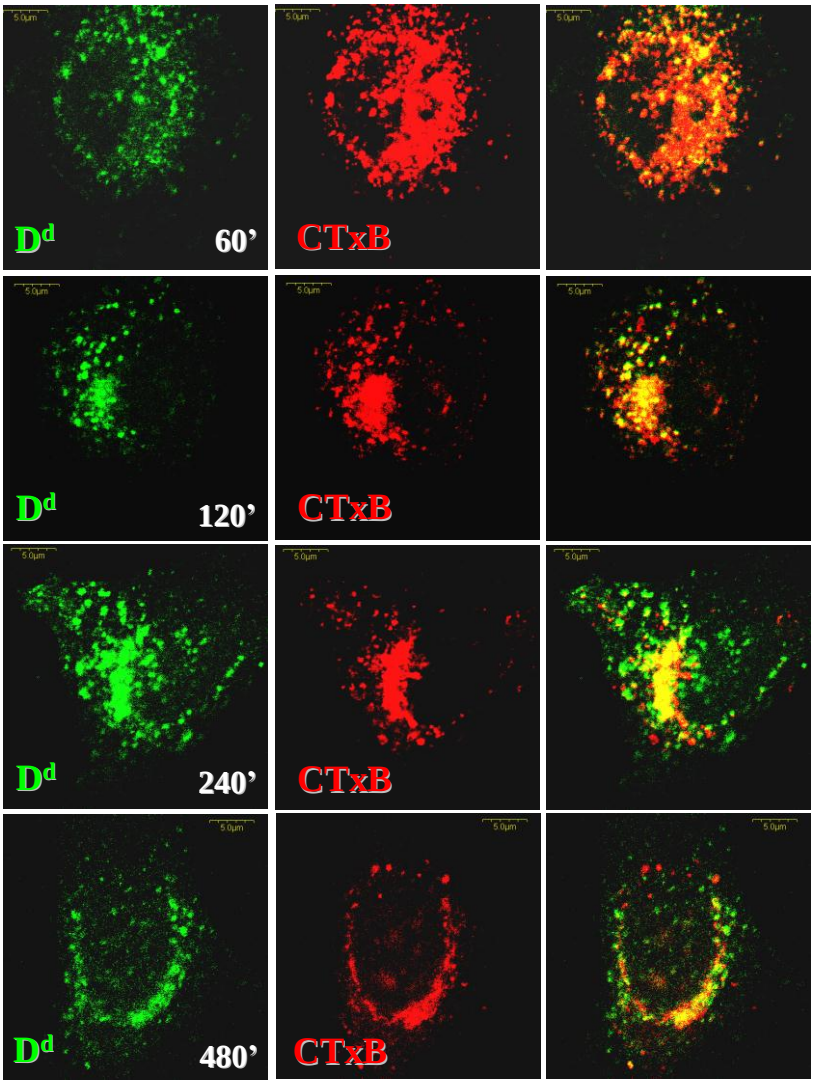
Budući da smo ranije pokazali da je internalizacija CTxB ubrzana (slika 29A), te da se CTxB (slika 33) također nakuplja u MCMV-inficiranim stanicama, željeli smo ispitati da li je njeno endosomalno putovanje nakon internalizacije slično onome MHC-I molekula. Kako bismo to ispitali pratili smo usporednu internalizaciju CTxB i MHC-I molekula tijekom različitog vremena. Pri usporednoj internalizaciji CTxB i K^d molekula vidljiva je njihova kolokalzacija nakon jednog i dva sata internalizacije (slika 38, 60' i 120'). Ista je ipak nešto više izražena nakon 2 sata internalizacije. Nakon 4 sata kao i nakon 8 sati internalizacije kolokalizacija je veća s obzirom da je sada nakupljanje K^d molekula jače izraženo (slika 38, 240' i 480'). Isti obrazac kolokalizacije slijedi i drugi alel MHC-I molekula, D^d molekule (slika 39).

Ipak treba napomenuti da je obrazac internalizirane CTxB malo drugačiji od obrasca internaliziranih MHC-I molekula. CTxB nakon internalizacije pokazuje stvaranje jedne kompaktne strukture, tubulo-vezikularne, dok se MHC-I molekule više prikazuju kao veliki mjehurići. Postoje različiti obrasci internalizacije odnosno nakupljanja CTxB u stanici (nije prikazano) dok je uzorak nakupljanja MHC-I molekula identičan u svim stanicama s obzirom na vrijeme trajanja internalizacije.



Slika 38. Kolokalizacija K^d i B podjedinice toksina kolere (CTxB) nakon usporedne internalizacije u MCMV- inficiranim stanicama.

Stanice su površinski obilježene odgovarajućim mPt na D^d molekulu i mPt na CTxB te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. 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

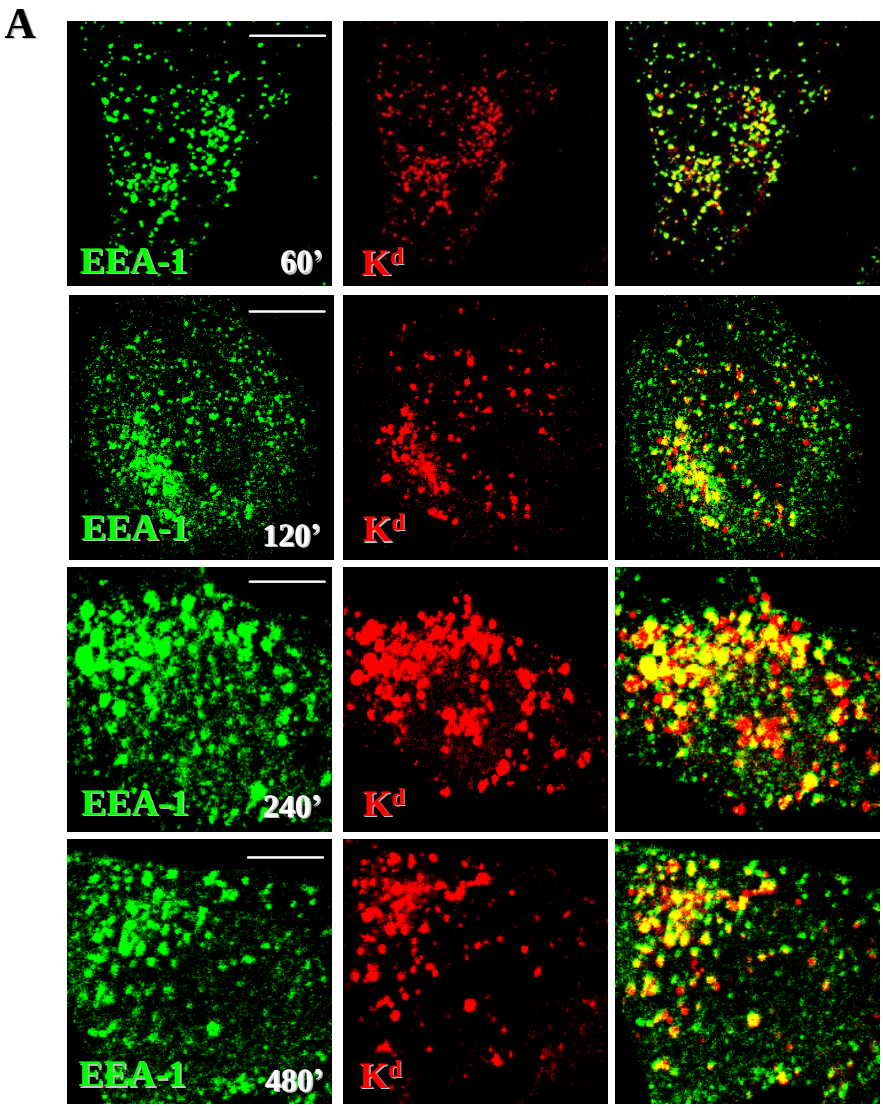


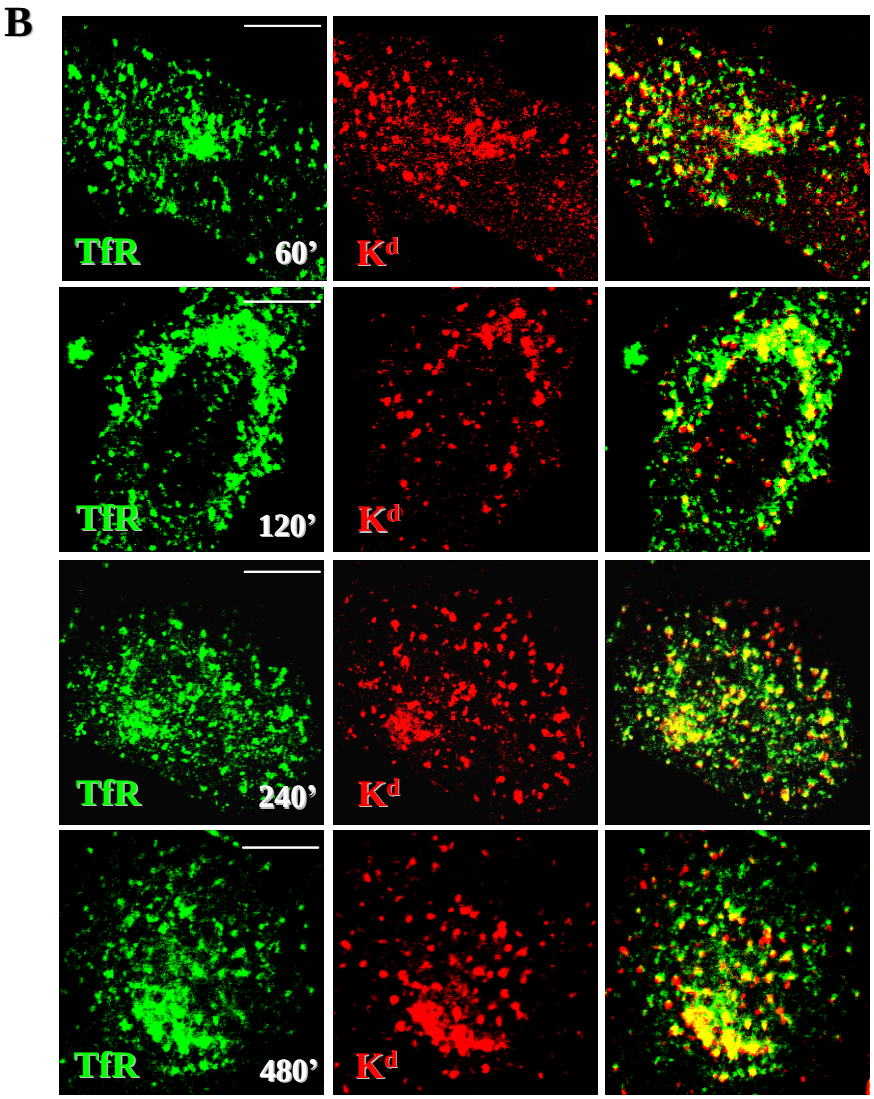
Slika 39. Kolokalizacija D^d i B podjedinice toksina kolere (CTxB) nakon usporedne internalizacije u MCMV- inficiranim stanicama.

Stanice su površinski obilježene odgovarajućim mPt na D^d molekulu i mPt na CTxB te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. 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

4.3.7. Uloga ranih (sortirajućih) endosoma u unutarstaničnom putovanju MHC molekula I. razreda na MCMV-inficiranim stanicama

Kolokalizacija usporedne internalizacije MHC-I molekula sa tranferinskim receptorom u perinuklearnom području, kao i na periferiji stanice, upućuje na postojanje endosomalnog odjeljka u kojem se isprepliću unutarstanični putovi MHC-I molekula i transferina tijekom njihova putovanja sa stanične membrane prema konačnom odredištu. Kako bismo utvrdili da li se možda radi o EE, kolokalizirali smo internalizirane MHC-I molekule sa ustaljenim stanjem TfR-a i EEA-1. Obje molekule se koriste kao biljezi EE.



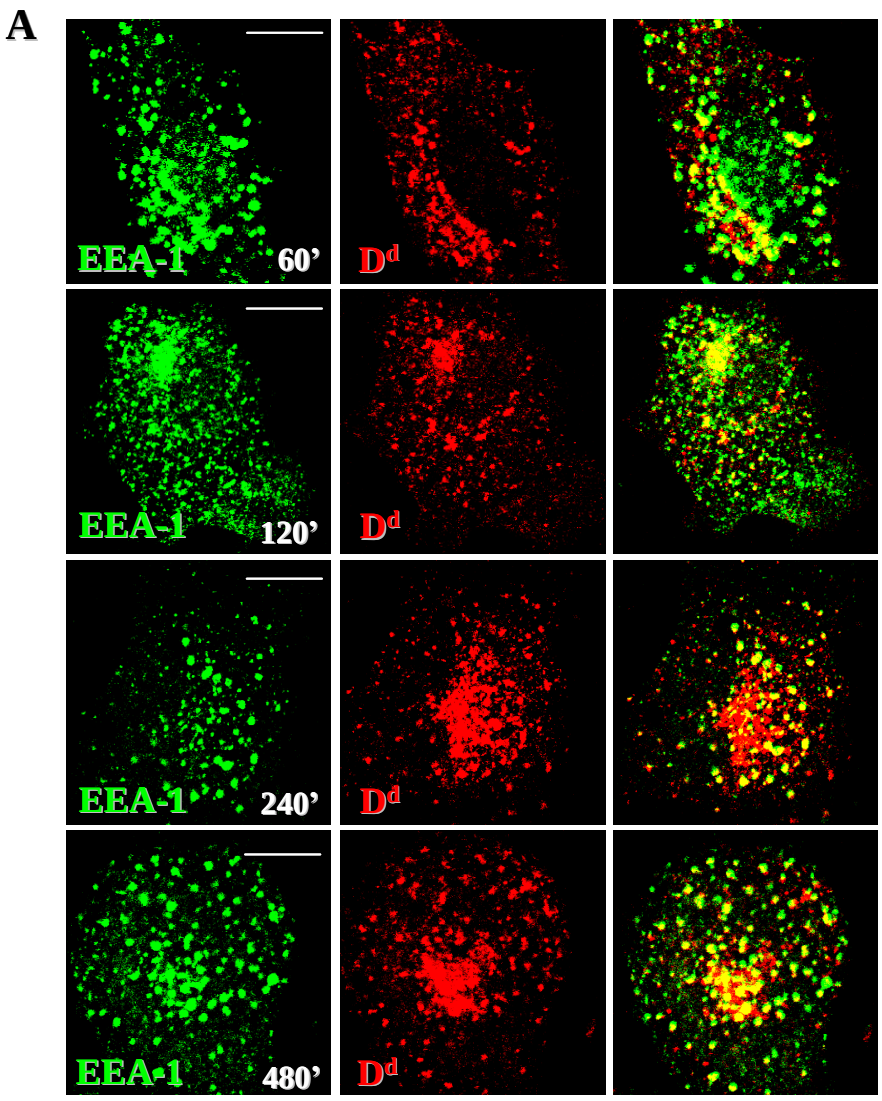


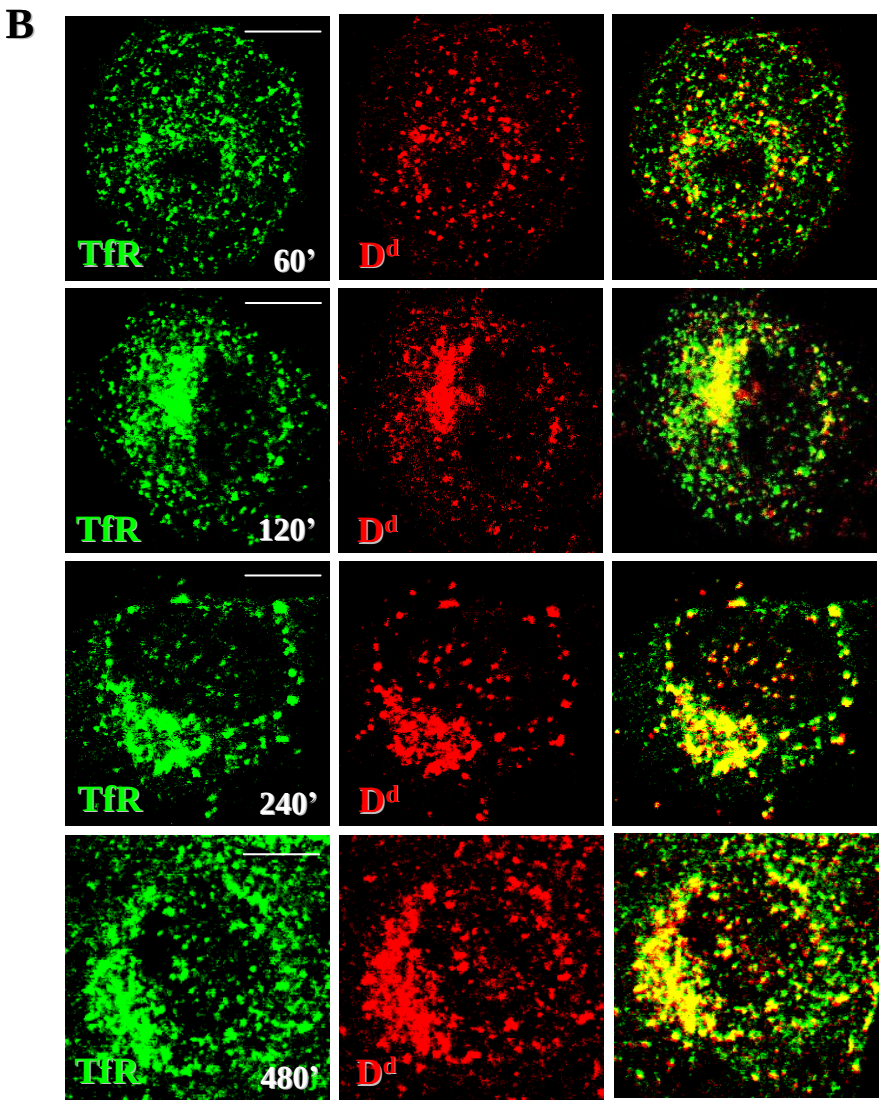
Slika 40. Kolokalizacija K^d molekule s ranim endosomalnim odjeljcima nakon internalizacije u MCMV- inficiranim stanicama.

Stanice su inficirane tijekom 4 sata te su površinski obilježene odgovarajućim mPt na K^d molekulu te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. Stanice su zatim fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano ili protu-EEA-1 Pt (A) ili protu-TfR Pt (B). 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.

Tijekom cijelog perioda internalizacije (60'- 480', počevši od 4. sata nakon infekcije), K^d molekule ostaju u velikim mjehurićima, koji imaju tendenciju nakupljanja u jukstanuklearnom području, te se izuzetno jako kolokaliziraju s $EEA\text{-}1^+$ odjeljcima (rani endosomi) (slika 40A), iako postoje neke K^d molekule koje nisu ujedno i $EEA\text{-}1^+$. Također, internalizirane K^d molekule kolokaliziraju se i sa ustaljenim stanjem TfR-a (slika 40B), što ukazuje na činjenicu

da K^d molekule ostaju u endocitoznom putu TfR-a, odnosno u sortirajući endosomi-reciklirajućem putu.





Slika 41. Kolokalizacija D^d molekule s ranim endosomalnim odjeljcima nakon internalizacije u MCMV- inficiranim stanicama.

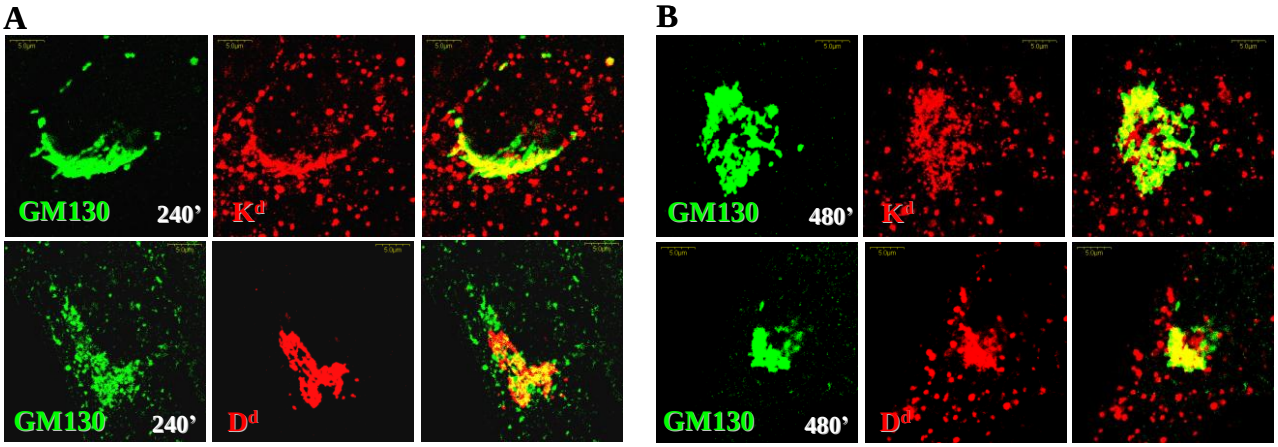
Stanice su inficirane tijekom 4 sata te su površinski obilježene odgovarajućim mPt na D^d molekulu te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. Stanice su zatim fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano ili protu-EEA-1 Pt (A) ili protu-TfR Pt (B). Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

S obzirom da se tokom cijelog perioda internalizacije K^d i D^d kolokaliziraju (slika 34), za očekivati je bilo da će se i D^d molekule kolokalizirati se sa EEA-1 i ustaljenim stanjem TfR-a (slike 41A i 41B).

4.3.8. Uloga Golgijeve mreže u unutarstaničnom putovanju MHC molekula I. razreda na MCMV-inficiranim stanicama

Internalizirane molekule se sa stanične površine usmjeravaju u spori i brzi put recikliranja te prema kasnim endosomima i lizosomima za konačnu degradaciju. Međutim postoji i alternativni put koji uključuje njihov prijenos u TGN (206) pomoću specifičnih proteina. TGN je glavna sortirajuća postaja biosintetskog puta, ali i mjesto interakcije sa endocitoznim putem.

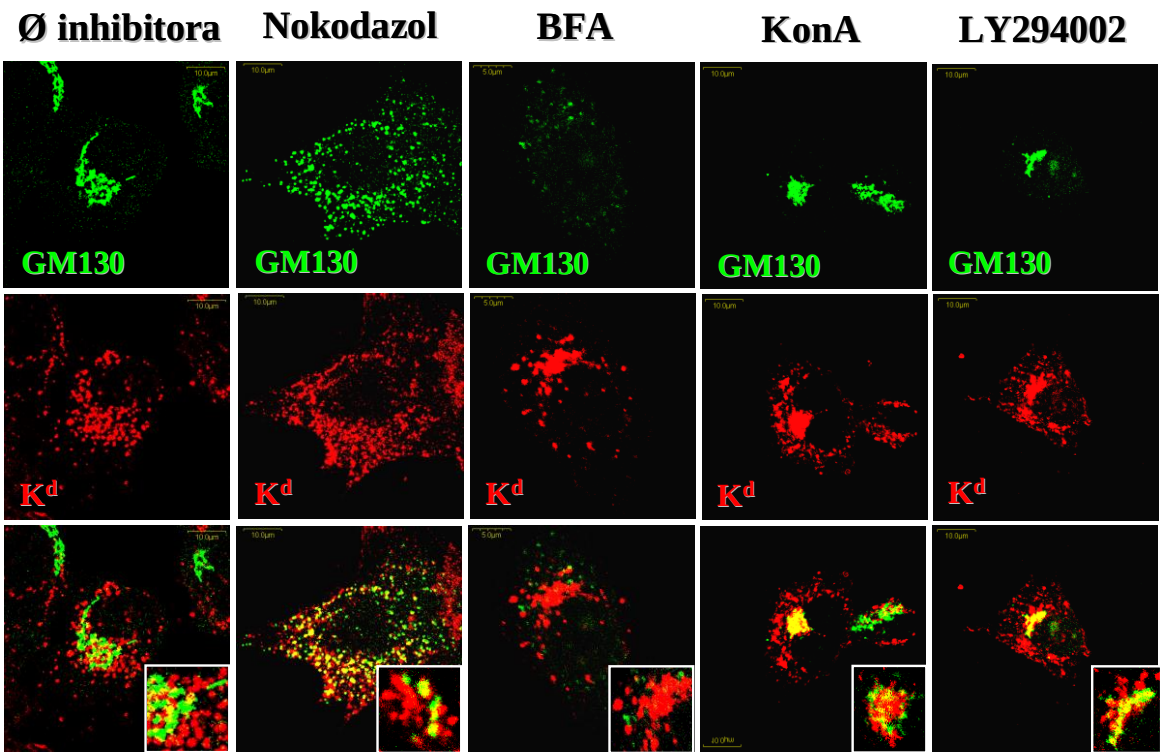
S obzirom da smo vidjeli da se novo-sintetizirane MHC-I molekule kolokaliziraju sa biljegom Golgijeve mreže (GM130) (slika 24), pretpostavili smo da se možda i površinske internalizirane MHC-I molekule kolokaliziraju sa istim biljegom.



Slika 42. Kolokalizacija MHC molekula I. razreda s biljegom Golgije mreže nakon internalizacije u MCMV- inficiranim stanicama.

Stanice su inficirane tijekom 4 sata te su površinski obilježene odgovarajućim mPt na K^d i D^d molekule te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom 240 minuta (A) ili 480 minuta (B). Stanice su zatim fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano protu-GM130. Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Površinske MHC-I molekule nakon 4 sata (slika 42A) i 8 sati (slika 42B) internalizacije, prolaze kroz rane endosome, te se usmjeravaju u Golgijevu mrežu, što potvrđuje njihova kolokalizacija sa GM130. Moguće je da se na ovom mjestu susreću sa novo-sintetiziranim MHC-I molekulama koje su ovdje došle iz endoplazmatske mrežice odnosno iz biosintetskog puta.



Slika 43. Kolokalizacija internaliziranih MHC molekula I. razreda s biljegom Golgijeve mreže nakon tretiranja stanica nokodazolom, BFA, KonA i LY294002 u MCMV- inficiranim stanicama.

Stanice su inficirane tijekom 4 sata te su površinski obilježene odgovarajućim mPt na K^d molekule te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom 240 minuta. Stanice su potom tijekom 60 minuta bile tretirane s nokodazol (4 μM), brefeldinom A (BFA, 10 μg/mL), konkanamicinom A (KonA, 50 nM), LY294002 (100 μM) ili su ostavljene netretirane. Stanice su zatim fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano protu-GM130. Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

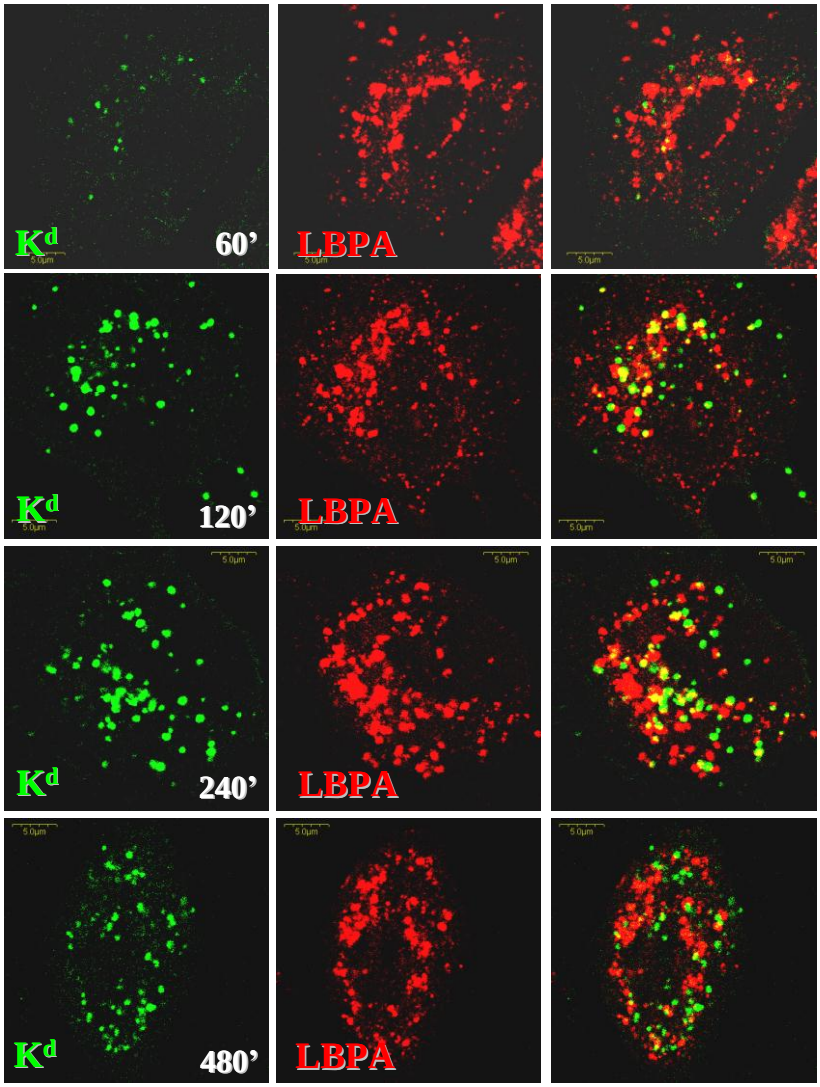
Kako bi potvrdili da se mjehurići bogati sa MHC-I molekulama uistinu spajaju sa Golgijevim membranama, tretirali smo stanice nokodazolom. Nokodazol uzrokuje prekidanje mikrotubularne mreže, te su se $MHC\text{-}I^+$ membrane baš kao i Golgijeve membrane, raspršile difuzno po citoplazmi u isključivo mjehurićaste strukture, ukazujući da su MHC-I zadržavajući endosomi povezani sa mikrotubulima (slika 43, Nokodazol). Potom smo stanice tretirali brefaldinom A (BFA), tvari koja remeti strukturu Golgijeve mreže, te uzrokuje njegovo spajanje sa endoplazmatskom mrežicom. Tretiranje stanica sa BFA, u koncentraciji koja raspršuje Golgi, nije dovelo i do raspršivanja jukstanuklearnih mjehurića sa MHC-I molekulama (slika 43, BFA), što upućuje na činjenicu da se MHC-I retencijske membrane ne spajaju sa Golgijevim membranama i da za njihovu morfogenezu nisu potrebni BFA osjetljive unutarstanične strukture.

Budući da pH vrijednost ranih endosoma (EE) iznosi od 6.0 do 6.5, odnosno teži kiselom, željeli smo ispitati da li narušavanje pH gradijenta ima utjecaj na sortiranje molekula, odnosno na njihovo usmjeravanje prema Golgijevoj mreži. Stoga smo stanice tretirali sa konkanamicinom (KonA), kemijskim inhibitorom H-ATPaze, ali i tvari koja uzrokuje tubulaciju EE. Kao što je i očekivano, narušavanjem pH gradijenta EE pomoću KonA u inficiranim stanicama uzrokovalo je tubulaciju MHC-I^+ jukstanuklearnog odjeljka te njihovo razdvajanje od perifernih endosoma. Ipak, MHC-I molekule ostale su i dalje povezane sa cisternama Golgijeve mreže (slika 43, KonA). Sličan rezultat je vidljiv i nakon inhibicije PI3K sa LY294002 (slika 43, LY294002), tvari koja uzrokuje tubulaciju cijelog endosomalnog sustava. Svi ovi rezultati upućuju na činjenicu da se MHC-I molekule zadržavaju u inficiranoj stanici u jukstanuklearnim EE koji najvjerojatnije imaju smanjenu sposobnost sazrijevanja u tubularni reciklirajući odjeljak.

4.3.9. Uloga kasnih endosomalnih odjeljaka u unutarstaničnom putovanju MHC molekula I. razreda na MCMV-inficiranim stanicama

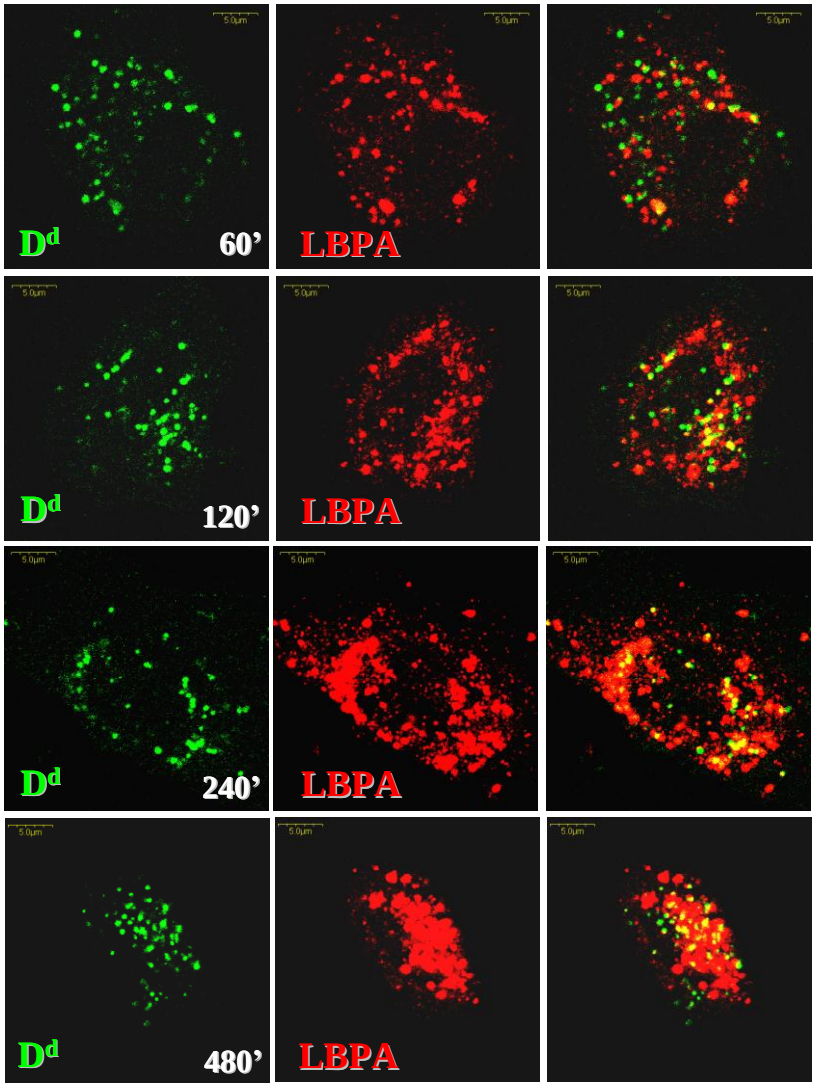
Kako bi ispitali da li nakon internalizacije MHC-I molekule dolaze u kasne endosomalne odjeljke, odnosno da li slijede put degradacije, kolokalizirali smo ih sa biljezima kasnih endosoma-LBPA i gangliozidom M1 (GM1). LBPA je molekula koja se nalazi isključivo u luminalnim membranama kasnih endosoma i time nam omogućava precizniju lokalizaciju u tzv. ranijim degradacijskim odjeljcima. GM1 se poput LBPA nalazi u luminalnoj membrani kasnih endosoma.

Nakon 60 minuta ili 120 minuta internalizacije niti K^d (slika 44) niti D^d (slika 45) molekule ne kolokaliziraju se sa biljegom kasnih endosomalnih odjeljaka-LBPA. No nakon 240 minuta ili 480 minuta postoji vrlo mala kolokalizacija sa LBPA. To opažanje upućuje na mogućnost da MHC-I molekule ipak mogu doći u kasne endosomalne odjeljke, no da je njihov dolazak ili usporen ili odgođen.



Slika 44. Kolokalizacija K^d molekule s $LBPA^+$ kasnim endosomima nakon internalizacije u MCMV-inficiranim stanicama.

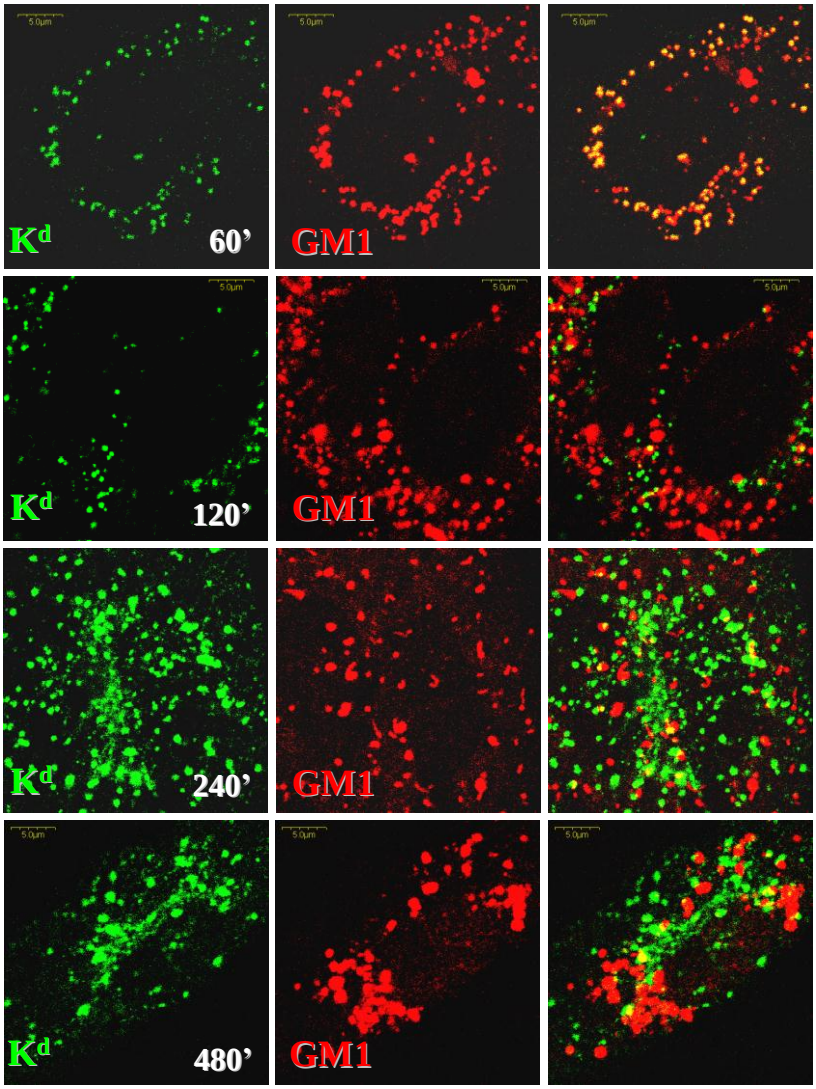
Stanice su inficirane tijekom 4 sata te su površinski obilježene odgovarajućim mPt na K^d molekulu te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. Stanice su zatim fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano protu-LBPA Pt . Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.



Slika 45. Kolokalizacija D^d molekule s $LBPA^+$ kasnim endosomima nakon internalizacije u MCMV-inficiranim stanicama.

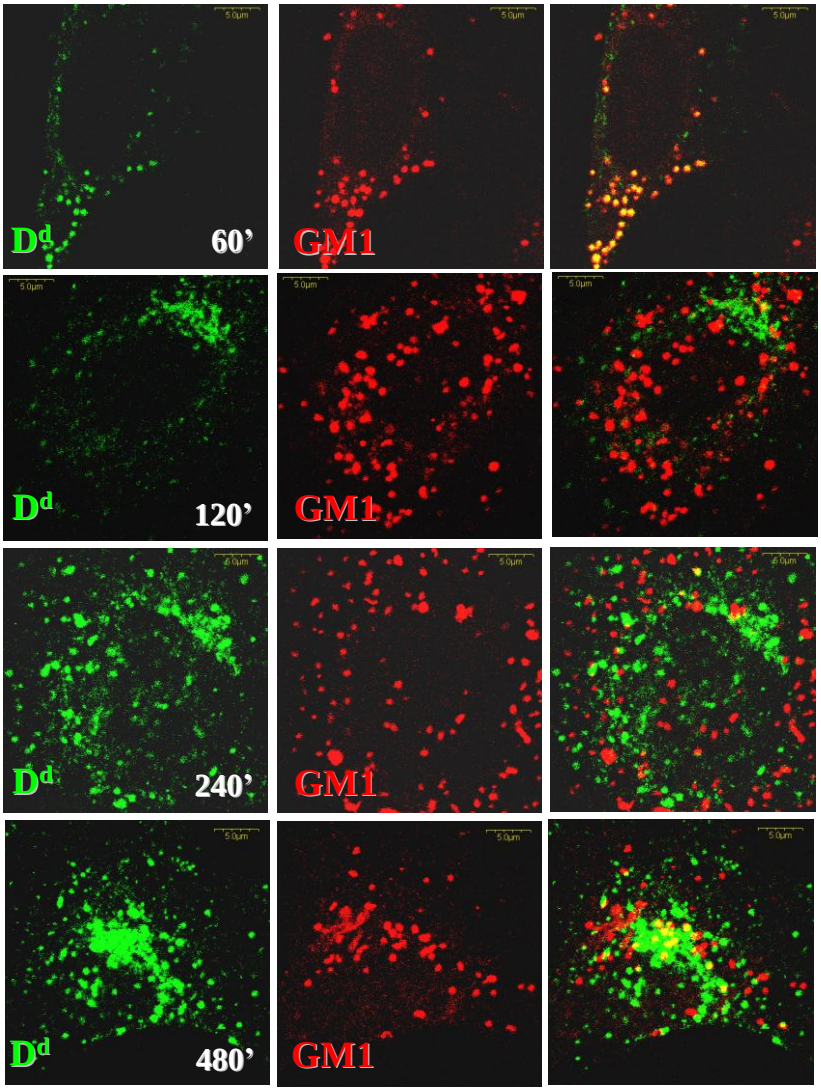
Stanice su inficirane tijekom 4 sata te su površinski obilježene odgovarajućim mPt na D^d molekulu te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. Stanice su zatim fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano protu-LBPA Pt . Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Da bi potvrdili opažanje da MHC-I molekule u vrlo maloj količini dolaze u kasne endosome (LE), napravili smo dodatnu kolokalizaciju MHC-I molekula sa GM1, kako bismo uklonili sumnju na rezultat ne kolokalizacije.



Slika 46. Kolokalizacija K^d molekule s $GM1^+$ kasnim endosomima nakon internalizacije u MCMV-inficiranim stanicama.

Stanice su inficirane tijekom 4 sata te su površinski obilježene odgovarajućim mPt na K^d molekulu te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. Stanice su zatim fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano protu-GM1 Pt . Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

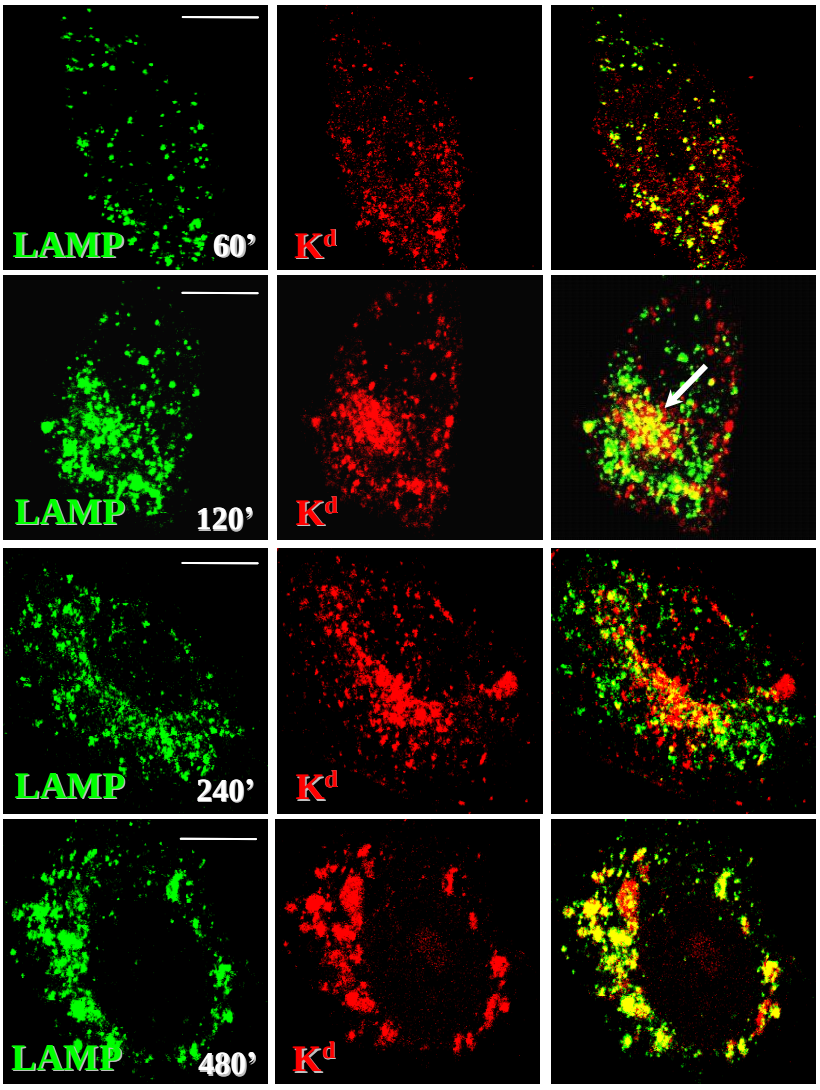


Slika 47. Kolokalizacija D^d molekule s $GM1^+$ kasnim endosomima nakon internalizacije u MCMV-inficiranim stanicama.

Stanice su inficirane tijekom 4 sata te su površinski obilježene odgovarajućim mPt na D^d molekulu te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. Stanice su zatim fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano protu-GM1 Pt . Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

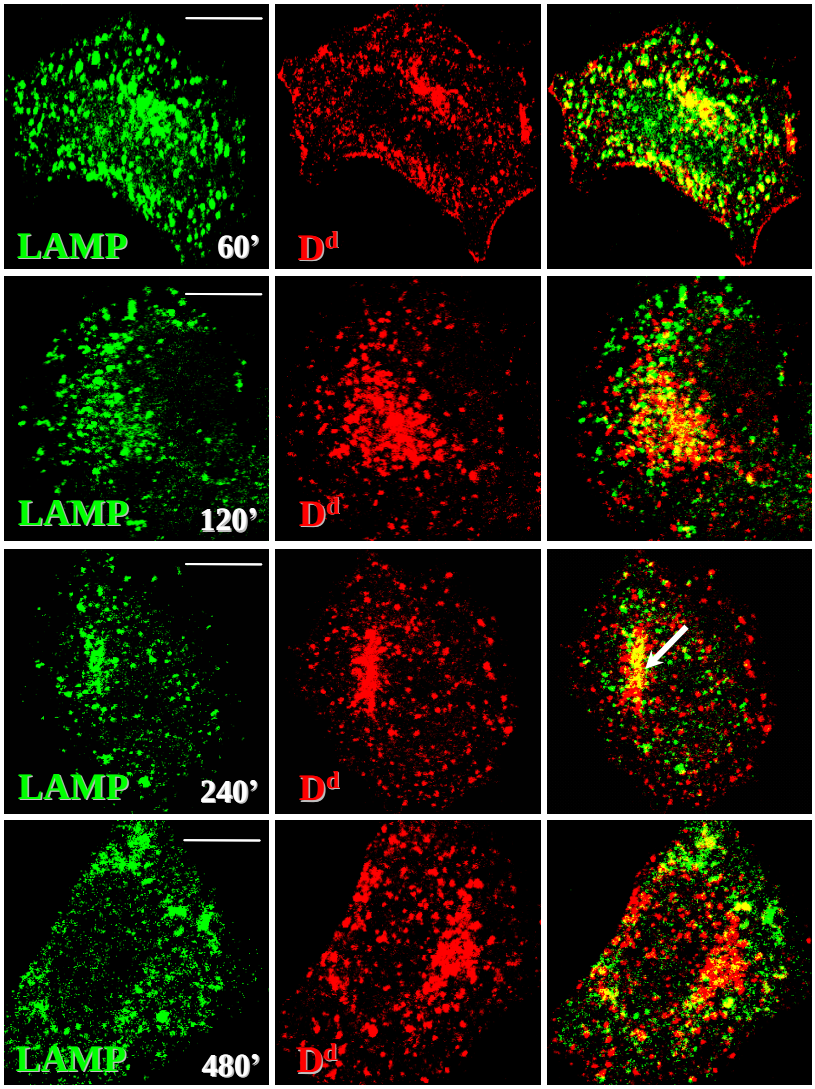
Kao što je i očekivano MHC-I molekule se nisu kolokalizirale sa GM1, neovisno o kojem ispitivanom alelu se radi (slike 46 i 47), što opet govori u prilog činjenici da se one zadržavaju u stanici u odjeljku koji se nalazi prije kasnih odjeljaka, ali isto tako govori i o njihovom odgođenom ulasku u put degradacije s obzirom da znamo da 24 sata nakon infekcije MHC-I molekule su u velikom postotku degradirane (slika 21).

Internalizirane MHC-I molekule kolokalizirali smo i s LAMP$^+$ odjeljcima (granične vanjske membrane kasnih endosoma). LAMP je kasni endosomalni protein koji recirkulira između stanične mambrane i LE.



Slika 48. Kolokalizacija K^d molekule s LAMP$^+$ endosomima (lizosomima) nakon internalizacije u MCMV-inficiranim stanicama.

Stanice su inficirane tijekom 4 sata te su površinski obilježene odgovarajućim mPt na K^d molekulu te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. Stanice su zatim fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano protu-LAMP Pt . Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm. Kolokalizacija u perinuklearnom dijelu prikazana je strelicom.



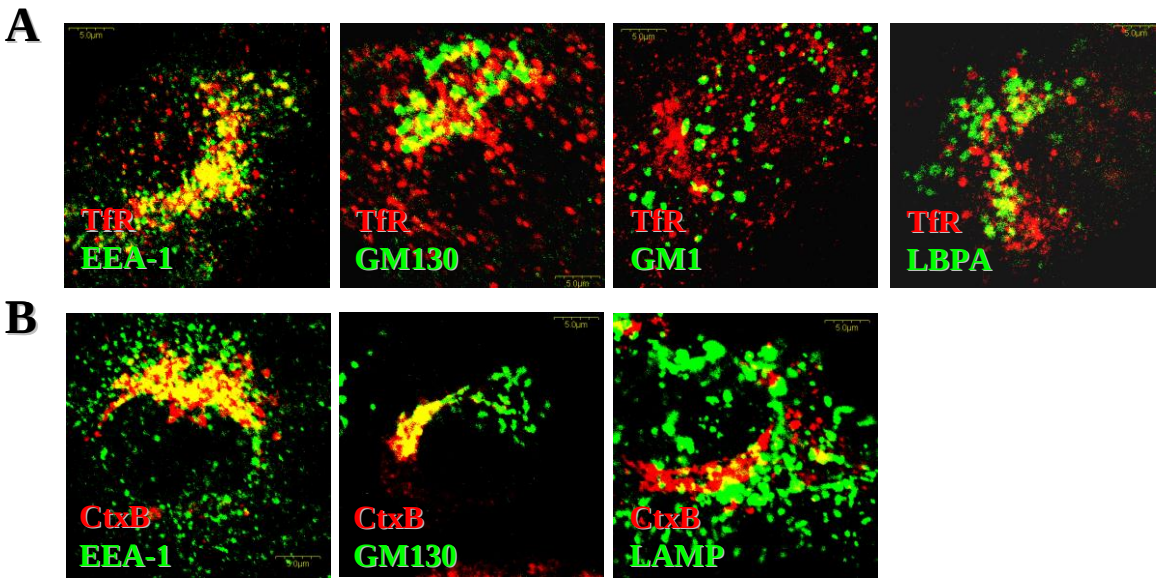
Slika 49. Kolokalizacija D^d molekule s $LAMP^+$ endosomima (lizosomima) nakon internalizacije u MCMV-inficiranim stanicama.

Stanice su inficirane tijekom 4 sata te su površinski obilježene odgovarajućim mPt na D^d molekulu te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. Stanice su zatim fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano protu-LAMP Pt . Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm. Kolokalizacija u perinuklearnom dijelu prikazana je strelicom.

Internalizirane MHC-I molekule neovisno o alelu parcijalno se kolokaliziraju sa LAMP biljegom (slika 48 i 49). Najveći stupanj kolokalizacije izražen je u perinuklearnom dijelu (slika 48 i 49, strelica), što upućuje na činjenicu da internalizirane MHC-I molekule imaju sposobnost dosezanja graničnih vanjskih membrana kasnih endosoma.

4.3.10. Unutarstanično putovanje različitih površinskih molekula u MCMV-inficiranim stanicama

Ranije smo pokazali da MHC-I molekule nakon internalizacije ulaze u EE te ostaju u internalizacijskom putu TfR-a, potom se usmjeravaju u područje Golgijeve mreže, gdje se i nakupljaju te zatim otežano ulaze u LE. S obzirom da se prilikom usporedne internalizacije MHC-I molekule kolokaliziraju kako s internaliziranim TfR-om tako i s internaliziranom CTxB, željeli smo ispitati cijeli unutarstanični put navedenih molekula.



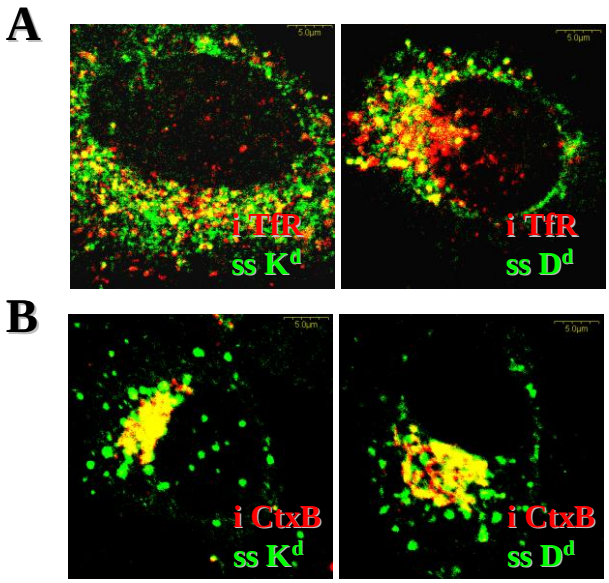
Slika 50. Kolokalizacija TfR-a i B podjedinice toksina kolere (CTxB) s biljezima endosomalnih odjeljaka nakon 4 sata internalizacije u MCMV-inficiranim stanicama.

Stanice su inficirane tijekom 4 sata te su površinski obilježene odgovarajućim mPt na TfR ili CTxB molekulu te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom četiri sata. Stanice su zatim fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano protutijelo na biljege endosomalnih odjeljaka: protu-EEA-1, protu-GM130, protu-LBPA, protu-GM1 i protu-LAMP Pt. 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.

Tijekom svog putovanja nakon internalizacije sa stanične površine TfR ulazi u EE, kolokalizirajući se s EEA-1, kao CTxB (slike 50A i 50B, EEA-1). Obje molekule potom nastavljaju svoj put usmjeravajući se prema području Golgije mreže gdje se kolokaliziraju sa GM130 (slike 50A i 50B, GM130). Normalan put internalizacije je zatim putovanje prema LE, odnosno ulazak u put degradacije. TfR se ne kolokalizira sa GM1, a vrlo malo se kolokalizira sa LBPA, što upućuje na činjenicu da on ili ne odlazi u degradaciju (što je i očekivano s obzirom da je to molekula koja ulazi u put recikliranja) ili ulazi u put degradacije

otežano, baš kao i MHC-I molekule (slika 50A, GM1 i LBPA). CTxB u neinficiranim stanicama ulazi u kasne endosome 90 minuta nakon internalizacije (207). Kao što je vidljivo iz slike 31B, CTxB nakon četiri sata internalizacije se vrlo malo kolokalizira sa biljegom LE LAMP-om, što ukazuje na njen otežani odnosno odgođeni ulazak u put degradacije. Ista činjenice uočena je i za MHC-I molekule.

S obzirom da TfR i CTxB najvjerojatnije imaju vrlo sličan put kao i MHC-I molekule u inficiranim stanicama, zapitali smo se da li iste molekule ulaze u odjeljak koji je u ustaljenom stanju pozitivan na akumulirane MHC-I molekule. Stoga smo kolokalizirali internalizirani TfR i CTxB sa "steady state" K^d i D^d molekula.

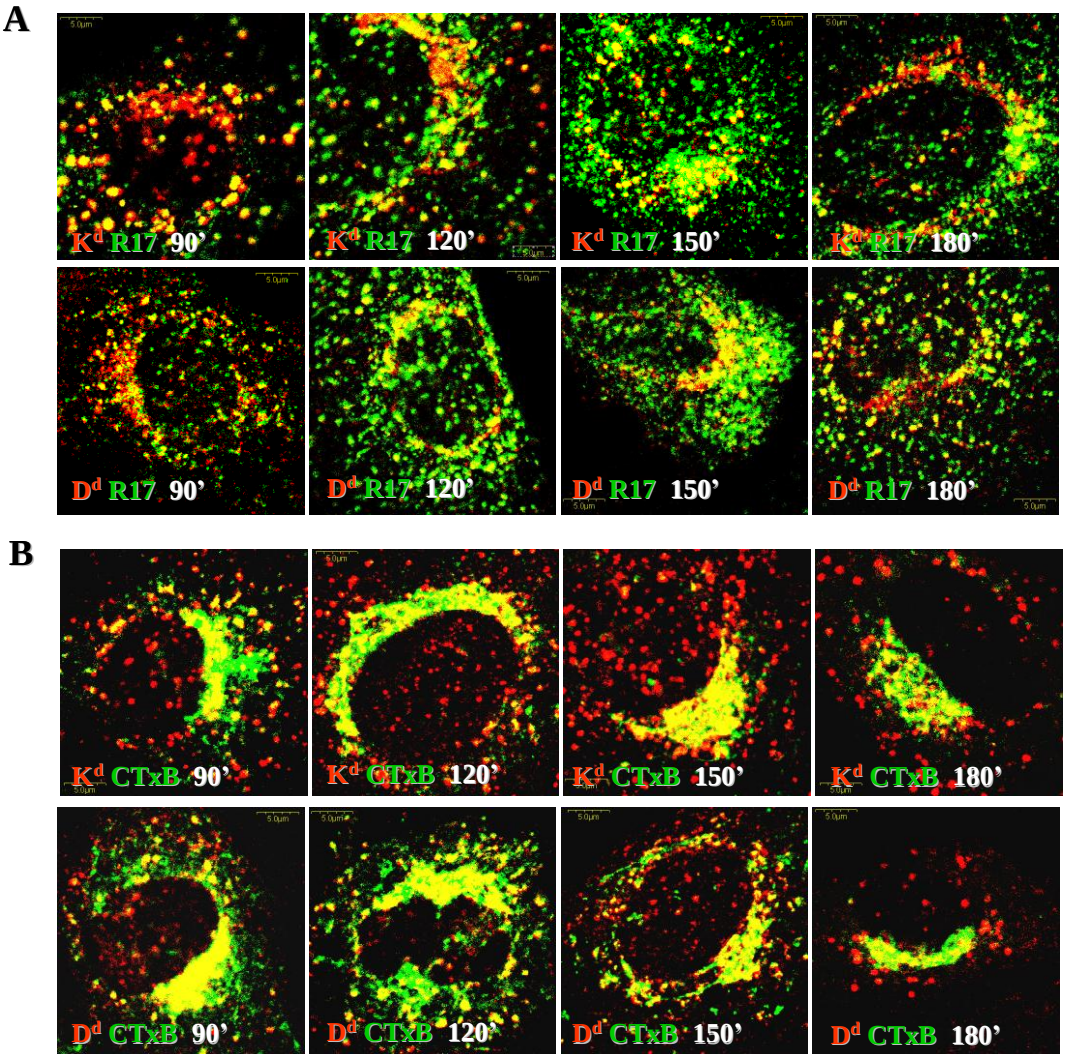


Slika 51. Kolokalizacija internaliziranog TfR-a i B podjedinice toksina kolere (CTxB) s ustaljenim stanjem ("steady state") MHC molekula I. razreda MCMV-inficiranim stanicama.

Stanice su inficirane tijekom 4 sata te su površinski obilježene odgovarajućim mPt na TfR ili CTxB molekulu te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom četiri sata. Stanice su zatim fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano protutijelo na K^d i D^d molekulu. 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.

Internalizirane kontrolne molekule četiri sata nakon internalizacije ulaze u MHC-I^+ mjehuriće, što je vidljivo iz njihove međusobne kolokalizacije (slike 51A i 51B), ali ti mjehurići sadrže i internalizirane i novo-sintetizirane MHC-I molekule.

S obzirom da četiri sata nakon internalizacije TfR i CTxB ulaze u MHC-I^+ mjehuriće, zapitali smo se da li je to onaj isti odjeljak u koji ulaze i internalizirane površinske MHC-I molekule.



Slika 52. Kolokalizacija internaliziranog TfR-a i B podjedinice toksina kolere (CTxB) s prethodno četiri sata internaliziranim MHC molekula I. razreda MCMV-inficiranim stanicama.

Stanice su inficirane tijekom 4 sata te su površinski obilježene odgovarajućim mPt na K^d ili D^d te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom četiri sata. Potom su stanice obilježene odgovarajućim mPt na TfR ili CTxB te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. Stanice su prije fiksacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula, te su potom fiksirane i permeabilizirane. Stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Stoga smo prvo internalizirali MHC-I molekule i nakupili ih u stanici u novo-stvorenom unutarstaničnom odjeljku (retencijskom odjeljku), te pratili dostupnost i protočnost tog odjeljka za TfR i CTxB u različitim vremenima.

Kao što je vidljivo bez obzira na dodatno vrijeme internalizacije obje molekule ulaze u odjeljak u kojem se zadržavaju internalizirane površinske MHC-I molekule (slike 52A i 52B).

MCMV najvjerojatnije usmjerava internalizirane sve površinske molekule, bez obzira kojim putem ulaze u stanicu, u odjeljak u kojem se zadržavaju i MHC-I molekule, što zapravo znači da virus manipulira različitim putovima endocitoze.

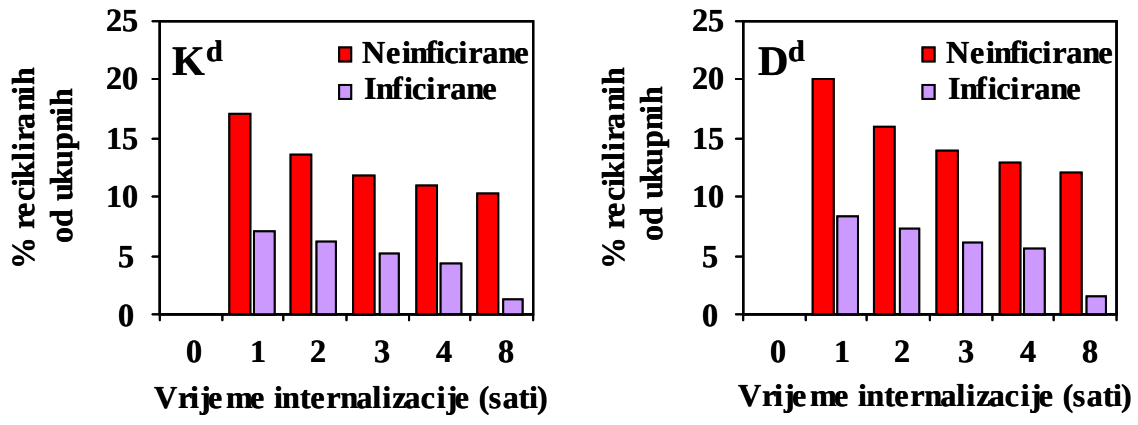
4.4. RECIKLIRANJE MHC MOLEKULA I. RAZREDA

U prethodnom odjeljku smo s jedne strane ispitivali lokalizaciju internaliziranih površinskih molekula u endosomalnim odjeljcima, a s druge stane međusobno uspoređivali njihove endocitozne putove. S obzirom da se zna da je konačna sudbina molekule nakon internalizacije ili recikliranje i/ili degradacija, sada ćemo proučavati recikliranje MHC-I molekula. Najbolja kontrolna molekula za istraživanje recikliranja zasigurno je Tf i njegov receptor, TfR. 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.

4.4.1. Usporedba recikliranja MHC molekula I. razreda na neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama

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. Detaljniji opis protokola recikliranja nalazi se u poglavlju *Materijal i metode.*

Vidjeli smo da se MHC-I molekule nakon internalizacije usmjeravaju ka odjeljku u perinuklearnom području, gdje se i nakupljaju. U taj novostvoreni odjeljak (retencijski odjeljak) pristižu i druge površinske molekule nakon internalizacije. S obzirom da rezultati ukazuju na otežani, odnosno odgođeni ulazak molekula u put degradacije iz odjeljka nakupljanja, zapitali smo se kakav je ulazak u put recikliranja. Stoga smo prvo usporedili recikliranje MHC-I molekula na neinficiranim i inficiranim stanicama.



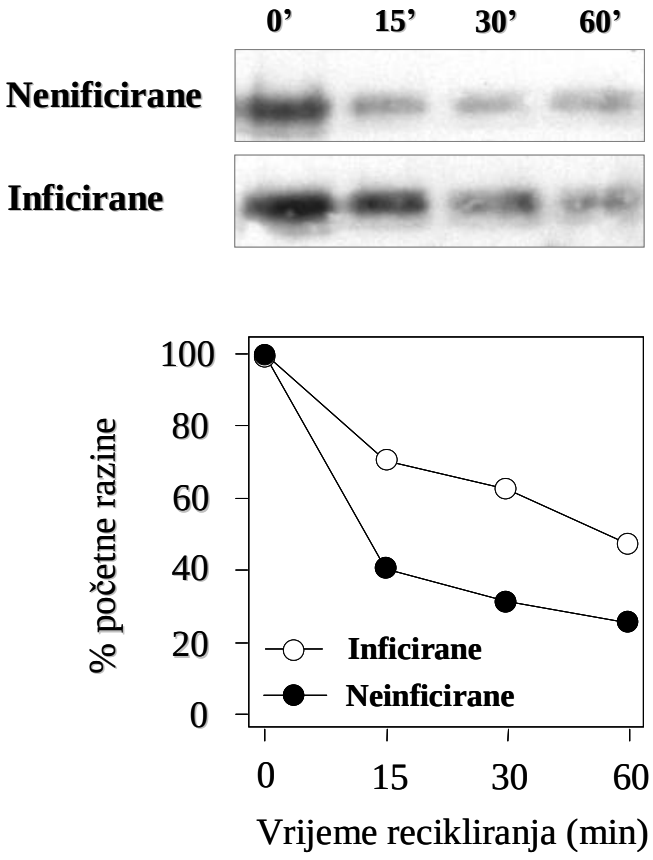
Slika 53. Dinamika recikliranja MHC molekula I. razreda na neinficiranim i inficiranim stanicama.

Neinficirane i 4 sata inficirane stanice, površinski su obilježene mPt na oba alela, K^d i D^d, MHC-I molekula, te internalizirane tijekom naznačenog vremena (u satima), nakon čega je recikliranje molekula praćeno tijekom 60 minuta prema protokolu recikliranja B (Materijal i metode). Prikazan je reprezentativan rezultat od 5 različitih eksperimenata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti postotaka početnog izražaja koji predstavlja omjer MFI vrijednosti u ispitivanom i nultom vremenu pomnožen sa 100.

Oba ispitivana alela, K^d i D^d, MHC-I molekula podliježu procesu recikliranja tijekom 60 minuta nakon različitih vremena internalizacije (slika 53). Recikliranje u neinficiranim uvjetima puno je jače izraženo nego u uvjetima MCMV infekcije. Nakon 1 sata internalizacije otprilike 20% MHC-I molekula reciklira tijekom 60 minuta u neinficiranim stanicama, naspram 7% u inficiranim stanicama. S obzirom da je proces internalizacije 4-6 puta brži u inficiranim stanicama (slika 28), tijekom duljeg vremena više internaliziranih molekula se nakuplja unutar stanice, što zapravo sugerira da je stvaranje reciklirajućih domena ograničeno. Produljena internalizacija nije povisila efikasnost recikliranja niti u neinficiranim ni u inficiranim stanicama (slika 53). Kapacitet recikliranja, dakle određuju komponente reciklirajućeg aparata stanice, a ne količina internaliziranih molekula. 8 sati nakon internalizacije (12 sati nakon infekcije), recikliranje se gotovo ne može detektirati u inficiranim stanicama, iako se MHC-I molekule u tom trenutku još uvijek nalaze nakupljene u stanici (slike 32A i 32B), što sugerira da je stvaranje reciklirajućih domena napušteno u kasnijim razdobljima infekcije.

4.4.2. Usporedba recikliranja transferina na neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama

Tf i njegov receptor, TfR, dvije su molekule na kojima je istraživanje recikliranja zasigurno dalo najviše rezultata. Stoga smo ispitali kakvo je recikliranje Tf-a na neinficiranim i inficiranim stanicama. Metodom protočne citometrije nismo uspjele detektirati dovoljnu količinu Tf-a i TfR-a na površini stanice, stoga smo recikliranje testirali Western blotom.

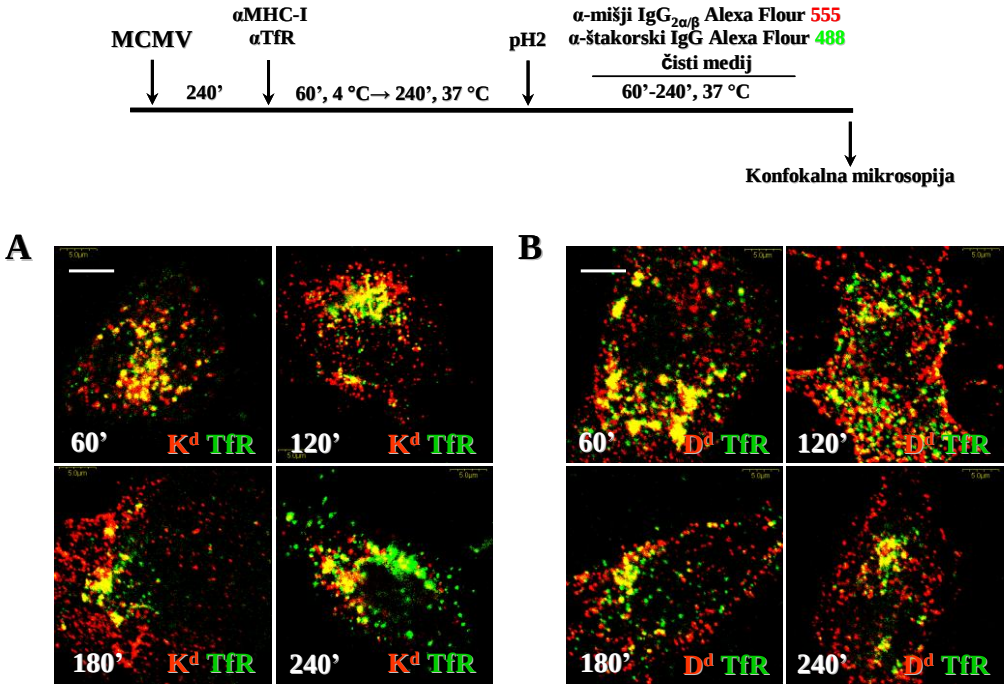


Slika 54. Dinamika recikliranja transferina na neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama.
Neinficiranim i 8 sata inficiranim stanicama, dodan je u medij Tf-biotin, te su stanice inkubirane na 37 °C u mediju tijekom 30 minuta. Stanice su potom kratkotrajno zakiseljene kako bi se uklonio višak ne internaliziranog Tf-a, te opet inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena. Nakon naznačenih vremenskih intervala jednak broj stanica je razoren u 1% NP40 puferu. Svi uzorci su potom razdvojeni na SDS-PAGE elektroforezi i blotirani, a molekule vizualizirane pomoći SA-POD i kemiluminiscencije. Nakon vizualizacije izvršena je kvantifikacija recikliranja transferina (graf) denzitometrijom, a rezultat je prikazan kao postotak od početne vrijednosti (0 minuta), što je u ovom slučaju bila količina Tf-biotina nakon 30 minuta internalizacije (protokol recikliranja A).

U neinficiranim stanicama, internalizirani Tf se vrlo brzo reciklira, što je rezultiralo njegovim gubitkom iz stanice sa $t_{1/2}$~10 min (slika 54, neinficirane). U suprotnosti, u inficiranim stanicama, gubitak Tf-a iz stanice je odgođen ($t_{1/2}$~ 45 min) (slika 54, inficirane). Ovaj rezultat sugerira da je uistinu stvaranje reciklirajućih domena poremećeno u MCMV-inficiranim stanicama.

4.4.3. Usporedba recikliranja MHC molekula I. razreda i TfR-a na MCMV-inficiranim stanicama

Recikliranje MHC-I molekula i Tf-a, smanjeno je uvjetima infekcije u odnosu na neinficirane uvjete. Kako bi vidjeli da li obje molekule prate isti put recikliranja, pratili smo njihovo usporedno recikliranje iz odjeljka nakupljanja, nakon usporedne internalizacije od 4 sata.



Slika 55. Obrazac usporednog recikliranja MHC molekula I. razreda i TfR-a na MCMV-inficiranim stanicama.

Četiri sata inficirane stanice, površinski su obilježene mPt na oba alela, K^d (A) ili D^d (B), te mPt na TfR, te su stanice inkubirane na 37 °C u mediju tijekom 240 minuta, nakon čega je usporedno recikliranje molekula praćeno tijekom naznačenog vremena prema protokolu recikliranja prikazanom na slici. Stanice su potom fiksirane i permeabilizirane, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Usporedna internalizacija, pa potom usporedno recikliranje MHC-I molekula i TfR-a, pokazuje da obje molekule mogu reciklirati. Nakon 60 minuta recikliranja vidljivo je da se MHC-I molekule i TfR recikliraju te da se nalaze skupa što nam govori njihova kolokalizacija (slike 55A i 55B, 60'). Nakon duljeg vremena inkubacije na 37 °C, molekule i dalje skupa recikliraju i kolokaliziraju se, ali je uočljivije nešto slabije recikliranje (slike 55A i 55B, 120', 180' i 240'). Razlog tome najvjerojatnije je smanjenje kapaciteta recikliranja, s obzirom da se već radi o relativno kasnijim vremenima infekcije (11-13 sat nakon infekcije), kada je napušteno stvaranja reciklirajućih membranskih domena.

4.4.4. Učinak kemijskih inhibitora i temperature na recikliranje internaliziranih molekula na MCMV-inficiranim stanicama

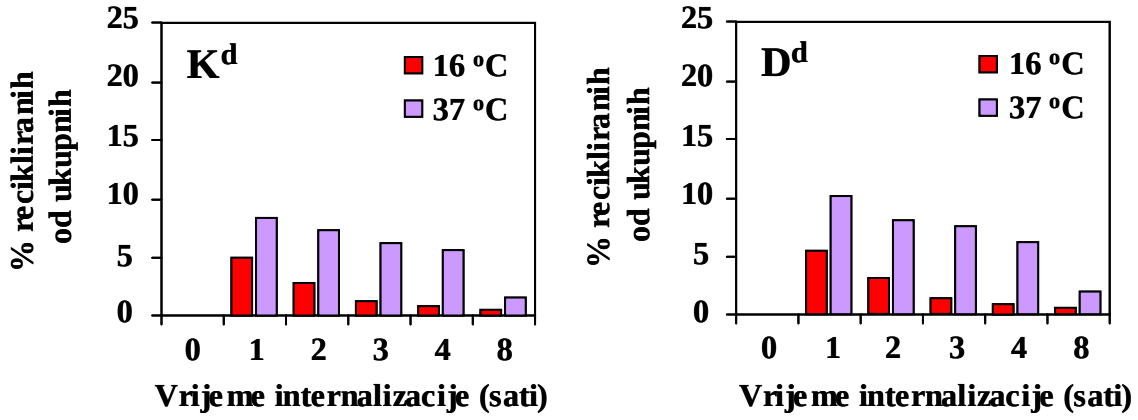
Kako bi ispitali koji su endosomalni odjeljci uključeni u proces recikliranja MHC-I molekula i TfR-a, nakon internalizacije u čistom mediju, recikliranje navedenih molekula pratili smo u prisustvu kemijskih inhibitora. Od kemijskih inhibitora korišteni su: LY (100 μM) kao blokator PI3K koja je potrebna za recikliranje molekula na nivou EE, BFA (10 μg/ml) koji putem blokade GEF-ova blokira recikliranje na nivou jukstanuklearnog reciklirajućeg odjeljka (JNRC), te BFA i LY u kombinaciji kako bi se blokirala oba poznata puta recikliranja. Također, pratili smo kakav utjecaj na recikliranje ovih molekula ima i promjena temperature. Do sada prikazana recikliranja odvijala su se na 37 °C nakon internalizacije isto na 37 °C. Kako bi mogli razlikovati internalizirane od recikliranih MHC-I molekula, proveli smo testiranje recikliranja na 16 °C nakon internalizacije na 37 °C. Vrijednost temperature od 16 °C je vrijednost kod koje je izlaženje molekula iz EE u reciklirajuće endosome inhibirano.

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%.

4.4.4.1. Učinak različite temperature na recikliranje internaliziranih molekula na MCMV-inficiranim stanicama

MHC-I molekule internalizirane su tijekom različitih vremena, a potom je dopušteno recikliranje na temperaturi 16 °C i 37 °C kako bi vidjeli da li recikliranje u uvjetima infekcije pogođeno promjenama temperature. Nakon internalizacije, dio internaliziranih MHC-I molekula sposoban je reciklirati na 16 ^{o}C (slika 56), što je karakteristika reciklirajućih

domena JNRC-a, a ne EE. S obzirom da postotak recikliranih molekula iznosi najviše 10% od ukupnih molekula, to znači da samo dio odjeljka u kojem se MHC-I molekule nakupljaju ima karakteristike JNRC-a, a veći dio ima karakteristike EE. To sugerira i činjenica da su MHC-I^+ mjehurići tijekom cijelog perioda internalizacije pozitivni na EEA-1.

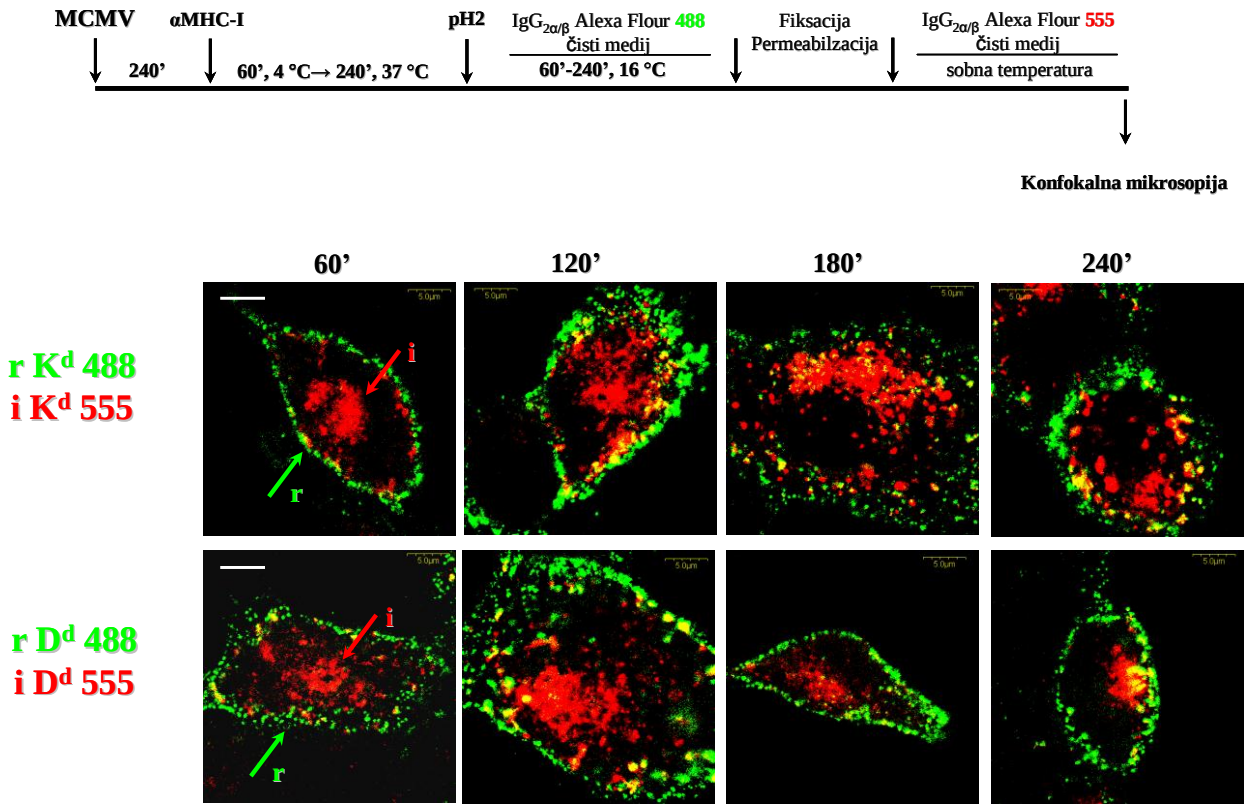


Slika 56. Dinamika recikliranja MHC molekula I. razreda pri temperaturi od 16 °C ili 37 °C na MCMV-Inficiranim stanicama.

Neinficirane i 4 sata inficirane stanice, površinski su obilježene mPt na oba alela, K^d i D^d, MHC-I molekula, te internalizirane tijekom naznačenog vremena (u satima), nakon čega je recikliranje molekula praćeno tijekom 60 minuta, pri temperaturi od 16 °C ili 37 °C prema protokolu recikliranja (Materijal i metode). Prikazan je reprezentativan rezultat od 5 različitih eksperimenata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti postotaka početnog izražaja koji predstavlja omjer MFI vrijednosti u ispitivanom i nultom vremenu pomnožen sa 100.

Kako bi potvrdili činjenicu da većina reciklirajućih domena odjeljka nakupljanja ima uistinu karakteristike EE, napravljeno je tesiranje recikliranja nakon 4 sata internalizacije, u vremenu kada je već formiran odjeljak nakupljanja, te je potom dozvoljeno recikliranje na 16 °C tijekom različitog vremena.

Na 16 ^oC samo mali dio internaliziranih MHC-I molekula reciklirao je unutar 240 minuta, a većina internaliziranih MHC-I molekula ostala je i dalje nakupljena u jukstanuklearnom odjeljku (slika 57). Na 16 ^oC rani endosomalni promet je inhibiran te su endocitirane molekule, uključujući i one reciklirane pa endocitirane MHC-I molekule, zarobljene u subplazmalemalnim mjehurićima, što omogućuje da razlikujemo reciklirane (r) od internaliziranih (i) MHC-I molekula (slika 57). Produženo recikliranje na 16 ^oC nije rezultiralo pražnjenjem odjeljaka nakupljanja, upućujući na činjenicu da reciklirajuće domene odjeljka imaju karakteristike EE.

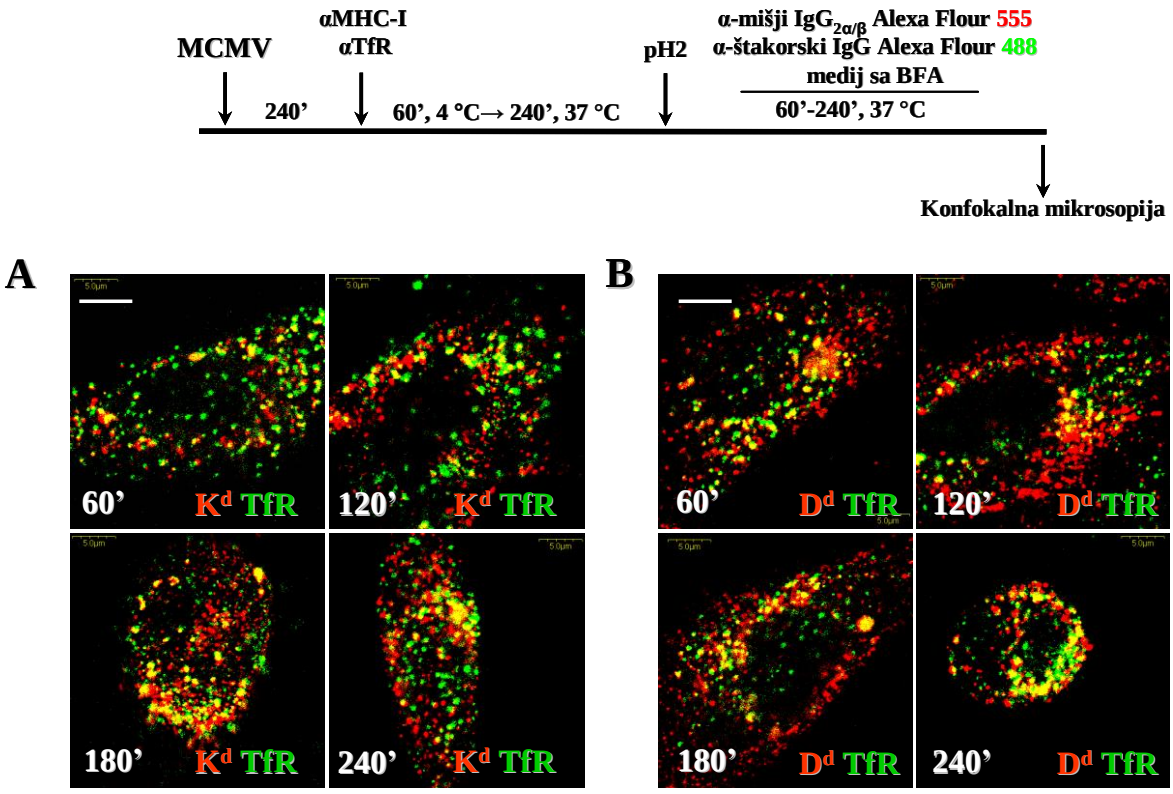


Slika 57. Obrazac recikliranja MHC molekula I. razreda pri temperaturi od 16 °C na MCMV-inficiranim stanicama.

Četiri sata inficirane stanice, površinski su obilježene mPt na oba alela, K^d i D^d, MHC-I molekula, te internalizirane (i, crvena fluorescencija) tijekom 240 minuta, nakon čega je recikliranje (r, zelena fluorescencija) molekula na 16 °C praćeno prema na slici navedenom protokolu. Stanice su potom fiksirane i permeabilizirane, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

4.4.4.2. Učinak kemijskog inhibitora BFA na recikliranje internaliziranih molekula na MCMV-inficiranim stanicama

S obzirom da odjeljak nakupljanja ima uglavnom karakteristike EE, utjecaj BFA koji inhibira sporo centralno recikliranje iz jukstanuklearnih endosoma, nije očekivan.

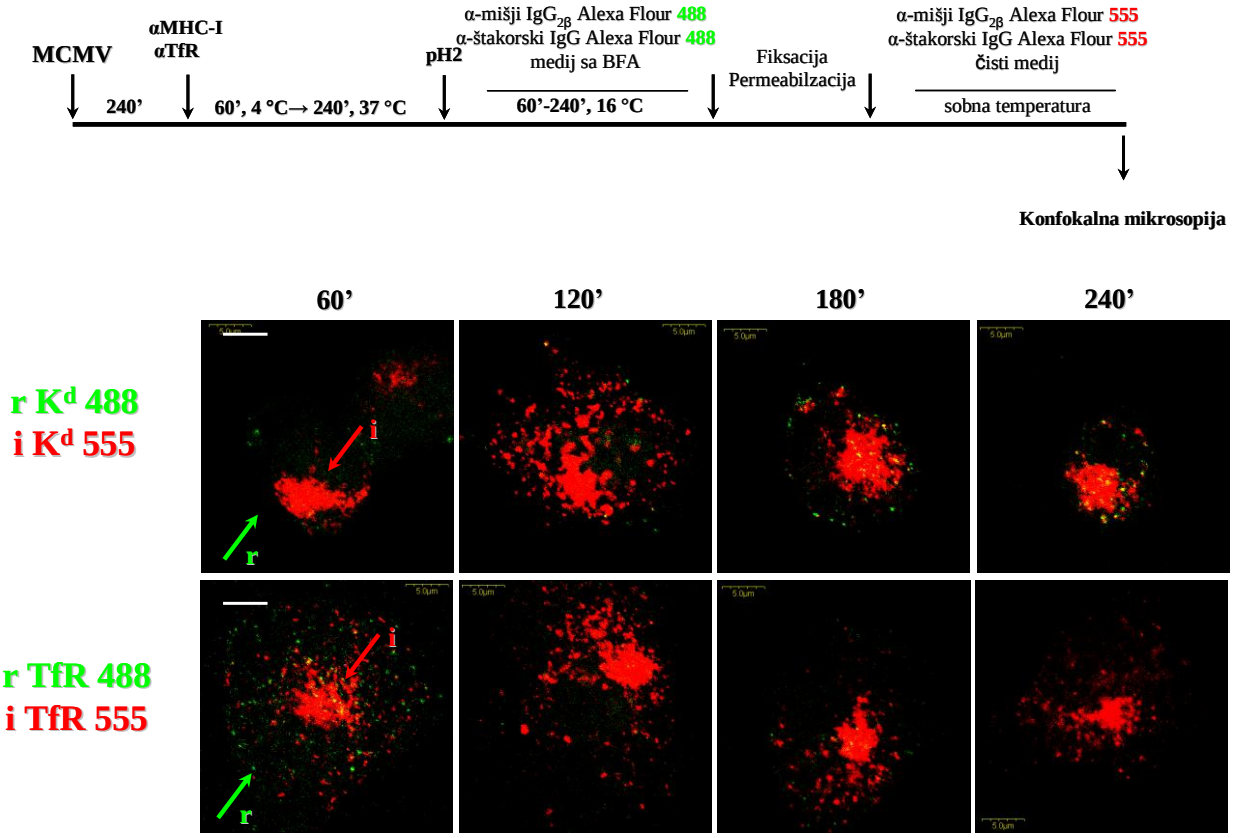


Slika 58. Obrazac usporednog recikliranja MHC molekula I. razreda i TfR-a na MCMV-inficiranim stanicama u prisustvu BFA.

Četiri sata inficirane stanice, površinski su obilježene mPt na oba alela, K^d (A) ili D^d (B), te mPt na TfR, te su stanice inkubirane na 37 °C u mediju tijekom 240 minuta, nakon čega je praćeno usporedno recikliranje molekula u prisustvo BFA tijekom naznačenog vremena prema protokolu recikliranja prikazanom na slici. Stanice su potom fiksirane i permeabilizirane, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

BFA, kao što je i očekivano nije blokirao usporedno recikliranje niti MHC-I molekula ni TfR-a iz odjeljka nakupljanja (slike 58A i 58B), što još jednom potvrđuje činjenicu da se ovdje radi o reciklirajućim domenama sa karakteristikama EE. Ako je istina da najveći dio odjeljka nakupljanja internaliziranih molekula ima karakteristike EE, a samo mali dio reciklirajućih

jukstanuklearnih endosoma, tada bi sinergistički učinak BFA i temperature od 16 °C trebao najviše inhibirati recikliranje, s obzirom da su sada pogođena oba puta recikliranja.



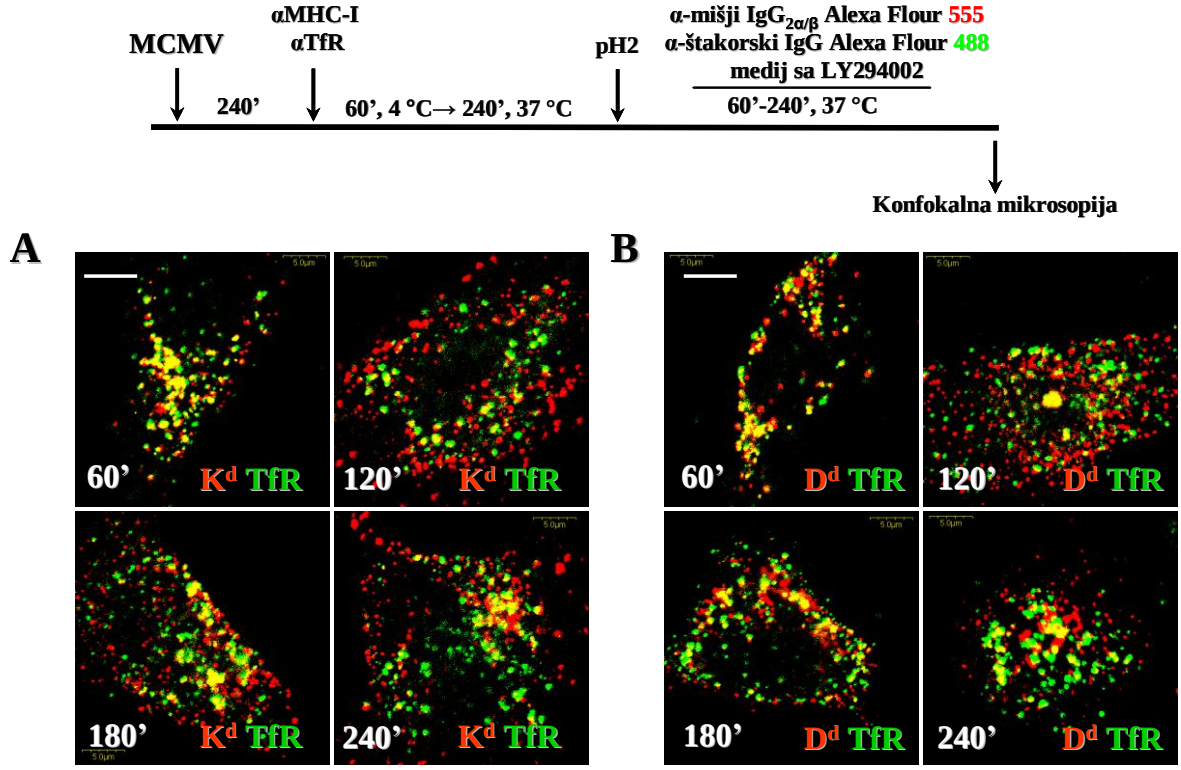
Slika 59. Obrazac recikliranja MHC molekula I. razreda i TfR-a u prustvu BFA pri temperaturi od 16 °C na inficiranim stanicama.

Četiri sata inficirane stanice, površinski su obilježene mPt na K^d ili TfR, te internalizirane (i, crvena fluorescencija) tijekom 240 minuta, nakon čega je praćeno recikliranje molekula (r, zelena fluorescencija) u prisustvu BFA na 16 °C prema na slici navedenom protokolu. Stanice su potom fiksirane i permeabilizirane, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Kao što je vidljivo gotovo da i nema recikliranih molekula (slika 59, strelica r), dok je odjeljak nakupljanja prepun internaliziranih (slika 59, strelica i) molekula, kako sa MHC-I molekulama tako i sa molekulama TfR-a.

4.4.4.3. Učinak kemijskog inhibitora LY294002 na recikliranje internaliziranih molekula na MCMV-inficiranim stanicama

LY294002 kao reverzibilni inhibitor PI3K, ima utjecaj na periferno recikliranje iz EE, dok na recikliranje iz jukstanuklearnog reciklirajućeg odjeljka nema nikakav utjecaj.

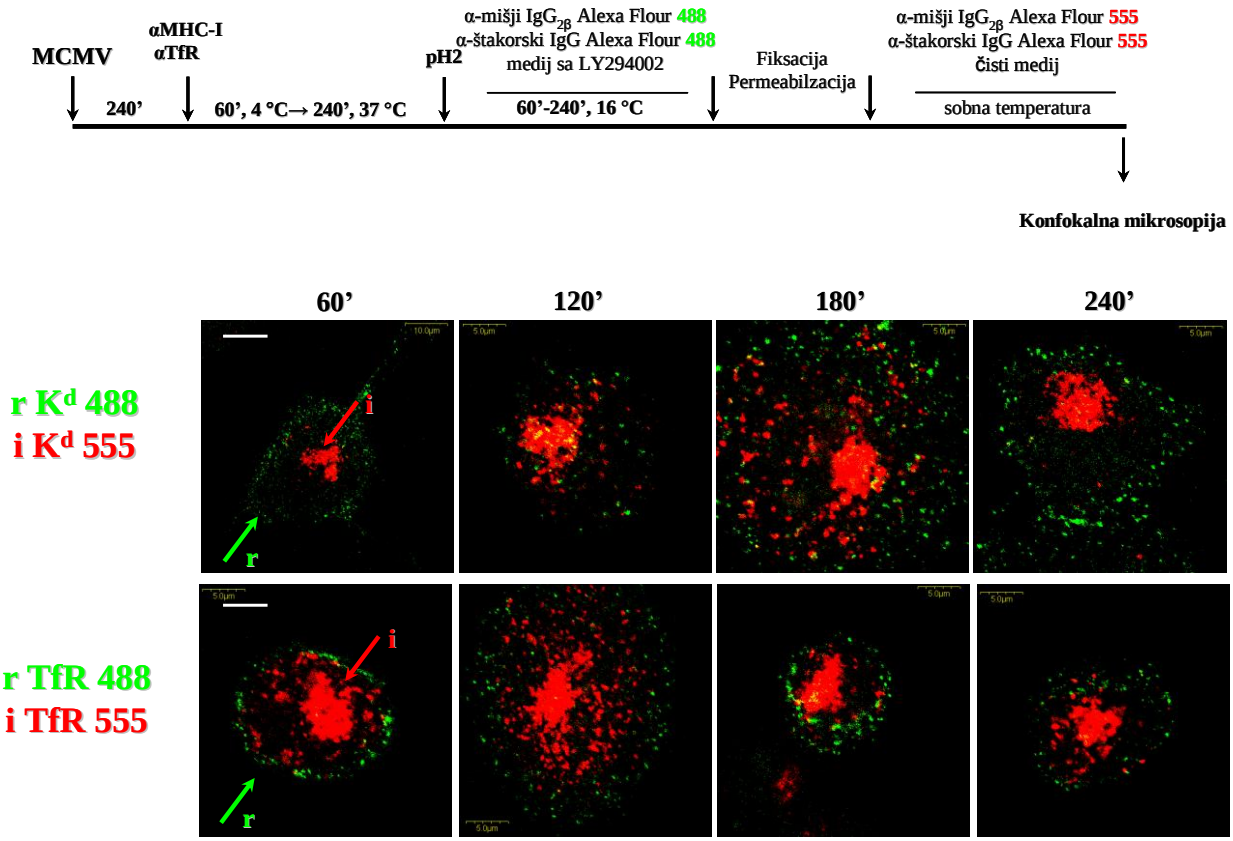


Slika 60. Obrazac usporednog recikliranja MHC molekula I. razreda i TfR-a na MCMV-inficiranim stanicama u prisustvu LY294002.

Četiri sata inficirane stanice, površinski su obilježene mPt na oba alela, K^d (A) ili D^d (B), te mPt na TfR, te su stanice inkubirane na 37 °C u mediju tijekom 240 minuta, nakon čega je praćeno usporedno recikliranje molekula u prisustvo LY294002 tijekom naznačenog vremena prema protokolu recikliranja prikazanom na slici. Stanice su potom fiksirane i permeabilizirane, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

LY294002 nije blokirao recikliranje niti MHC-I molekula niti TfR-a (slika 60). S obzirom da ipak jedan dio membrana u odjeljku ima karakteristike reciklirajućih jukstanuklearnih membrana, za pretpostaviti je da su ovdje reciklirale one MHC-I molekule kao i molekule TfR-a koje se nalaze upravo u tim dijelovima odjeljka nakupljanja. Također treba napomenuti da je LY294002 reveribilni inhibitor, pa je moguće da je došlo do njegove potrošnje. Ako je istina da najveći dio odjeljka nakupljanja internaliziranih molekula ima karakteristike EE, tada

bi sinergistički učinak LY294002 i temperature od 16 °C trebao imati velik učinak na recikliranje, dok bi jedan dio molekula mogao i dalje reciklirati.

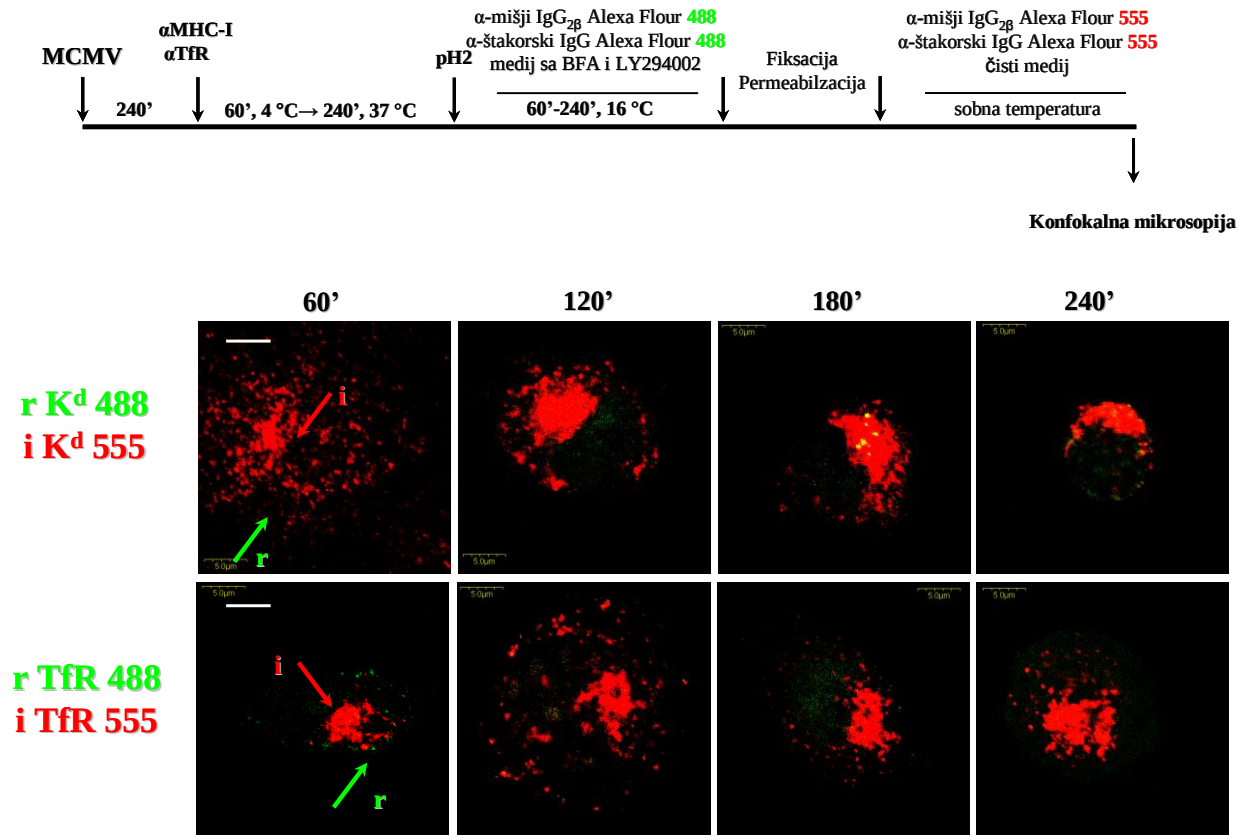


Slika 61. Obrazac recikliranja MHC molekula I. razreda i TfR-a u prustvu LY294002 pri temperaturi od 16 °C na MCMV-inficiranim stanicama.

Četiri sata inficirane stanice, površinski su obilježene mPt na K^d ili TfR, te internalizirane (i, crvena fluorescencija) tijekom 240 minuta, nakon čega je praćeno recikliranje molekula (r, zelena fluorescencija) u prisustvu LY294002 na 16 °C prema na slici navedenom protokolu. Stanice su potom fiksirane i permeabilizirane, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Sinergistički LY294002 i temperature od 16 °C djelovao je na inhibiciju recikliranja MHC-I molekula i TfR-a (slika 61). Možemo uočiti zelene mjehuriće (slika 61, strelica r) smještene subplazmalemalno, koji su ovdje došli recikliranjem iz odjeljka nakupljanja i to onog dijela koji nema karakteristike ranih endosoma. Većina internaliziranih molekula (slika 61, strelica i) nalazi se i dalje nakupljena jukstanuklearno, bez mogućnosti ulaska u put recikliranja.

4.4.4.4. Učinak sinergističkog djelovanja kemijskih inhibitora BFA, LY294002 i temperature 16 °C na recikliranje internaliziranih molekula na MCMV-inficiranim stanicama



Slika 62. Obrazac recikliranja MHC molekula I. razreda i TfR-a u prustvu BFA i LY294002 pri temperaturi od 16 °C na MCMV-inficiranim stanicama.

Četiri sata inficirane stanice, površinski su obilježene mPt na K^d ili TfR, te internalizirane (i, crvena fluorescencija) tijekom 240 minuta, nakon čega je praćeno recikliranje molekula (r, zelena fluorescencija) u prisustvu BFA i LY294002 na 16 °C prema na slici navedenom protokolu. Stanice su potom fiksirane i permeabilizirane, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 µm. Debljina snimka (z) = 0,5 µm.

Nakon što su MHC-I molekule ili molekule TfR-a internalizirane tijekom 240 minuta, iste nisu bile u mogućnosti reciklirati iz odjeljka nakupljanja, s obzirom da je recikliranje provedeno u prisustvu BFA, LY294002 i 16 °C. Na taj način inhibirani su svi poznati putovi recikliranja, te je odjeljak ostao neispražnjen (slika 62, strelica i), pa ne možemo detektirati niti jedan mjehurić sa recikliranim molekulama (slika 62, strelica r).

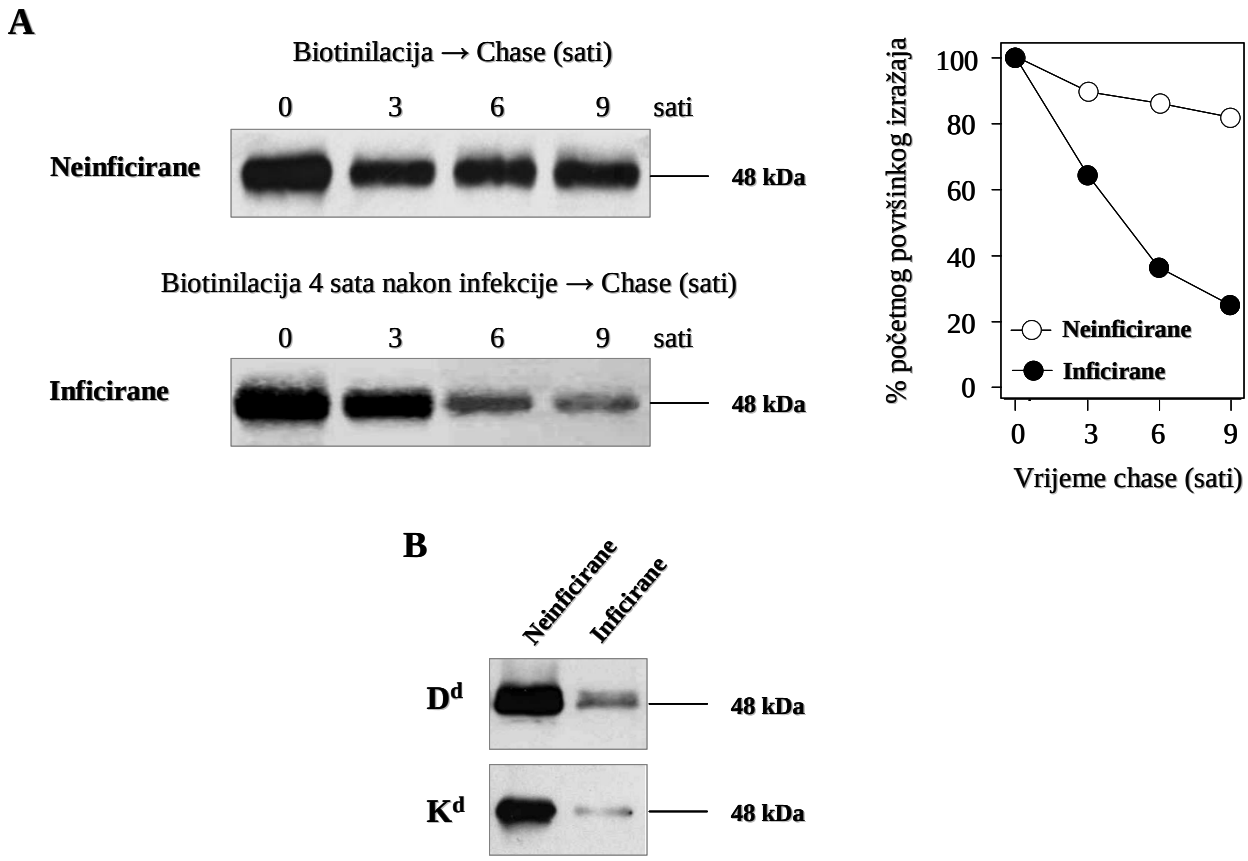
4.5. DEGRADACIJA MHC MOLEKULA I. RAZREDA

Najčešći alternativni put recikliranju je put degradacije, odnosno razgradnja u kiselim endosomalnim odjeljcima: kasnim endosomima i lizosomima. Već je prije navedeno da je konačna sudbina internalizirane molekule ili recikliranje ili degradacija. S obzirom da je internalizacija brža, a recikliranje smanjeno u inficiranim stanicama u odnosu na neinficirane stanice, željeli smo ispitati da li je i put degradacije promijenjen u stanicama inficiranim virusom.

4.5.1. Kinetika degradacije MHC molekula I. razreda

Da bi ispitali da li se i kojom se brzinom MHC-I molekule degradiraju, površinski smo ih obilježili biotinom. Obilježavanje je napravljeno na neinficiranim stanicama i 4 sata inficiranim stanicama, u trenutku kada su MHC-I molekule još uvijek izražene na površini stanice. Potom smo stanice inkubirali na 37 °C u različitim vremenskim intervalima, te nakon imunoprecipitacije pratili njihovo nestajanje, odnosno degradaciju. Uspoređivana je degradacija MHC-I molekula na neinficiranim i inficiranim stanicama.

MHC-I molekule, neovisno o ispitivanom alelu, podliježu procesu degradacije. U neinficiranim stanicama (slika 63A), biotinilirane K^d (i D^d, nije prikazano) ostaju u stanici tijekom dugog razdoblja ($t_{1/2}$~12 sati), sa stopom degradacije od ~0.06 sat^{-1} (slika 63A, graf), koja je vrlo slična stopi internalizacije (slika 28). U inficiranim stanicama, biotinilirane MHC-I molekule degradiraju se brže nego u neinficiranim stanicama (slika 63A) te se vrlo malo biotiniliranih D^d i K^d može naći u stanici 20 sati nakon infekcije (slika 63B). Stopa degradacije K^d molekula u inficiranim stanicama iznosi ~0.17 sat^{-1} (slika 63A, graf), što je značajno brže nego u neinficiranim stanicama, ali ipak iznosi svega polovinu vlastite stope internalizacije (~0.315 sat^{-1}) (slika 28). Ovaj rezultat sugerira da nakon brzog uklanjanja sa stanične površine i nakupljanja u ranom endosomalnom odjeljku, MHC-I molekule imaju ograničen ulazak u put degradacije u inficiranim stanicama.

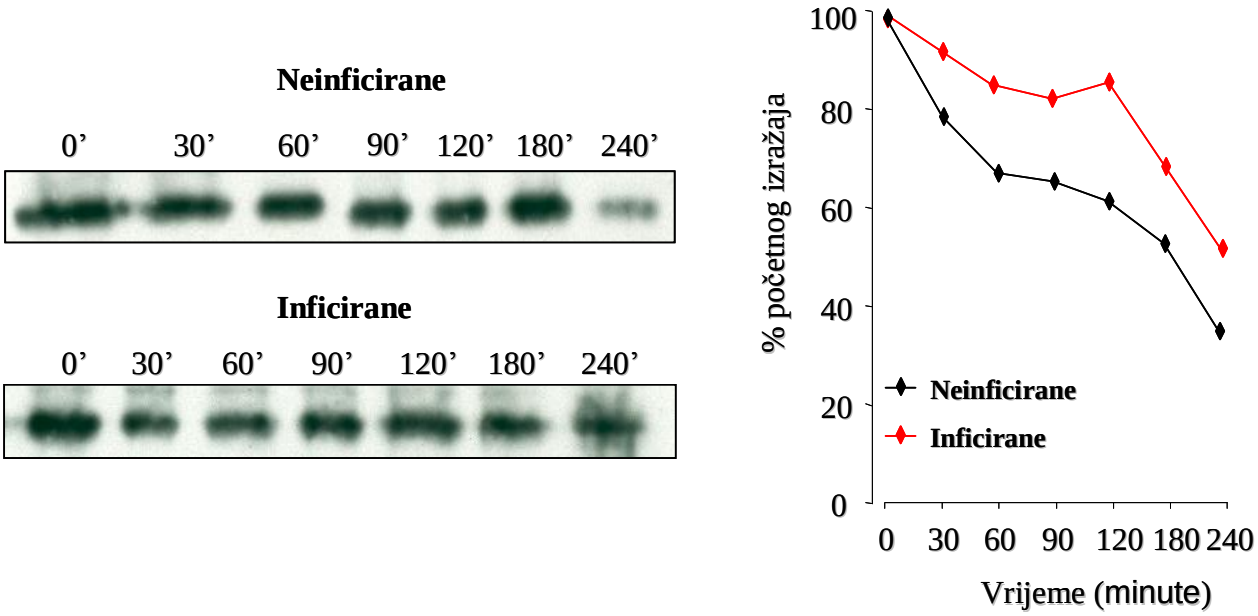


Slika 63. Kinetika degradacije MHC molekula I. razreda na neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama.

Neinficirane i 4 sata inficirane stanice površinski su biotinilirane, te su potom inkubirane u svježem mediju. Nakon naznačenih vremenskih intervala jednak broj stanica je razoren u 1% NP40 puferu, te je iz njega imunoprecipitirana K^d MHC-I molekula. Nakon imunoprecipitacije (IP), svi uzorci su razdvojeni na SDS-PAGE elektroforezi i blotirani, a molekule vizualizirane pomoću SA-POD i kemiluminiscencije. Nakon vizualizacije izvršena je kvantifikacija degradacije K^d molekula (graf) denzitometrijom, a rezultat je prikazan kao postotak od početne vrijednosti (0 sati), što je u ovom slučaju bila količina K^d molekula odmah po biotinilaciji (A). Imunoprecipitacija K^d i D^d molekula na neinficiranim i 20 sati inficiranim stanicama (B).

4.5.2. Kinetika degradacije B podjedinice toksina kolere (CTxB) i epidermalnog faktora rasta (EGF-a)

Kako bi vidjeli da li je smanjenje degradacije u inficiranim stanicama u odnosu na neinficirane stanice specifično samo za MHC-I molekule, pratili smo kinetike degradacija B podjedinice toksina kolere (CTxB) i epidermalnog faktora rasta (eng. epidermal growth factor; EGF-a).

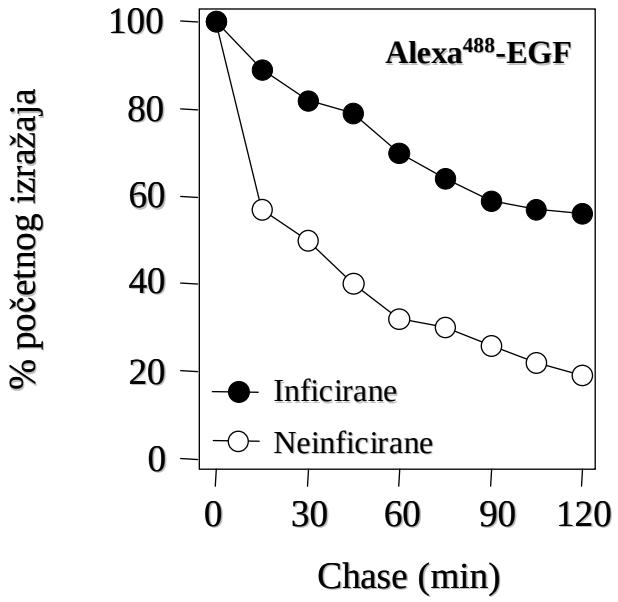


Slika 64. Kinetika degradacije B podjedinice toksina kolere (CTxB) na neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama.

Neinficirane i 8 sata inficirane stanice površinski su obilježene odgovarajućim mPt, CTxB-biotinom, te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom navedenog vremena. Nakon naznačenih vremenskih intervala jednak broj stanica je razoren u 1% NP40 puferu. Svi uzorci su razdvojeni na SDS-PAGE elektroforezi i blotirani, a molekule vizualizirane pomoću SA-POD i kemiluminiscencije. Nakon vizualizacije izvršena je kvantifikacija degradacije CTxB molekule (graf) denzitometrijom, a rezultat je prikazan kao postotak od početne vrijednosti , što je u ovom slučaju bila količina CTxB odmah po obilježavanju prututijelom.

Budući da je poznato da CTxB nakon internalizacije kaveolarnim putem ne ulazi u put recikliranja, već se usmjerava u degradaciju, ispitali smo kinetiku degradacije CTxB nakon internalizacije na neinficiranim i inficiranim stanicama. Vidimo da u slučaju CTxB, degradacija je proces koji se brže odvija u neinficiranim nego u inficiranim stanicama (slika 64). Nakon 240 minuta internalizacije degradira se oko 70% CTxB na neinficiranim stanicama, dok se na inficiranim stanicama degradira u istom vremenu 50% (slika 64, graf). Ovi rezultati upućuju na sporiju degradaciju CTxB u inficiranim stanicama, a s obzirom da CTxB ne ulazi u put recikliranja očito je njezin ulazak u put degradacije malo odgođen. To dodatno sugerira i činjenica da se CTxB brže internalizira (slika 29A), ne reciklira, a sporije degradira (slika 64) u inficiranim stanicama što znači da se ona zadržava negdje u inficiranoj stanici, a to smo potvrdili njenim nakupljanjem u jukstanuklearnom odjeljku zajedno sa MHC-I molekulama (slike 38 i 39) nakon internalizacije.

EGF je molekula koja se nakon internalizacije klatrin-ovisnim putem sa stanične površine usmjerava u put degradacije, stoga je dobar biljeg za praćenja istoga puta.



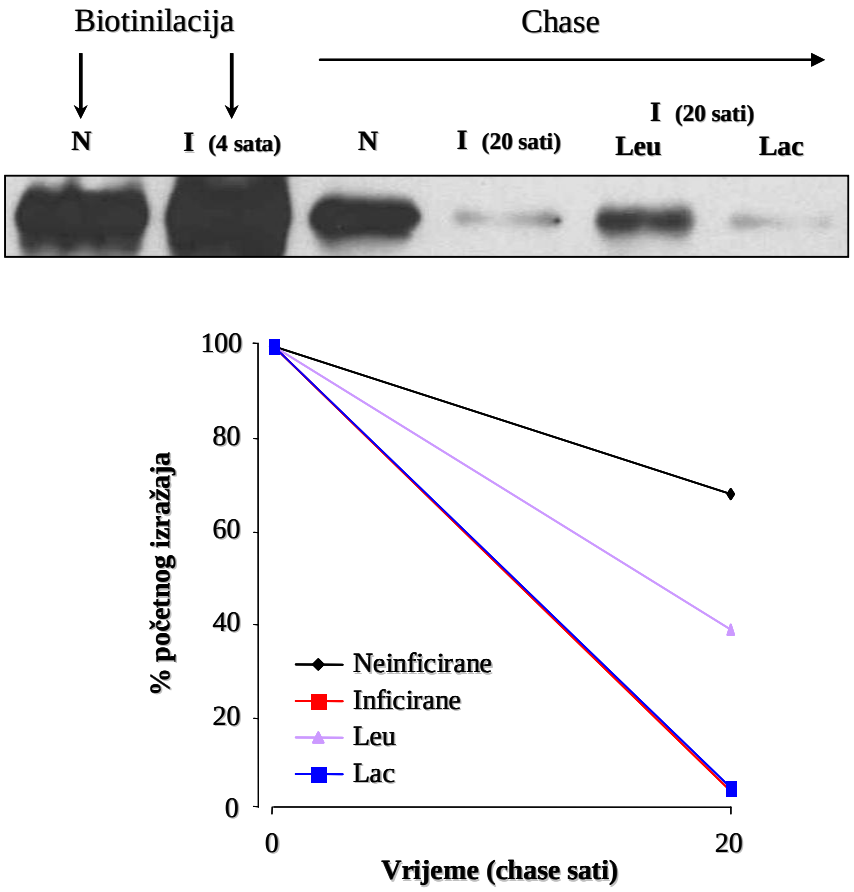
Slika 65. Kinetika degradacije epidermalnog faktora rasta (EGF-a) na neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama.

Neinficirane i 8 sata inficirane stanice površinski su obilježene odgovarajućim mPt, EGF Alexa Flour^{488}, te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom 60 minuta. Stanice su potom kratkotrajno zakiseljene kako bi se isprao višak neinternaliziranog protutijela sa površine stanice, te ponovno inkubirane na 37 °C u mediju tijekom naznačenog vremena (chase). Unutarstanični izražaj analiziran je protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao omjer MFI vrijednosti nakon određenog vremena chasae i MFI vrijednosti nultog vremena (60 minuta početne internalizacije) pomnožen sa 100.

Nakon površinskog vezivanja dozvoljena je internalizacija EGF molekule da bi se omogućilo dovoljno nakupljanje EGF-a u stanici kako bi mogli pratiti kinetiku degradacije. Gubitak EGF-a iz inficirane stanice puno je sporiji ($t_{1/2}$ >2 sata) nego iz neinficirane stanice ($t_{1/2}$ of 30 min) (slika 65). To još jednom sugerira na opservaciju da je degradacija odgođena odnosno usporena u uvjetima infekcije, te da je put degradacije pogođen za mnoge molekule neovisno u njihovom putu ulaska u stanicu. U slučaju EGF-a radi se o klatrin-ovisnoj endocitozi.

4.5.3. Učinak lizosomotropnih tvari na degradaciju MHC molekula I. razreda

Degradacija molekula nakon internalizacije odvija se u lizosomima ili na proteasomima uslijed djelovanja kiselih hidrolaza za čiju je normalnu funkciju neophodan kiseli pH. Kako bi ustanovili gdje se odvija degradacija MHC-I molekula, stanice smo tretirali s leupeptinom (Leu; 2,3 µg/ml) koji inhibira većinu lizosomalnih enzima koji su potrebni za degradaciju ili s laktacistinom (engl. lactacystin; Lac; 1 µl/ml) koji inhibira proteasome. Nakon površinske biotinilacije pratili smo kinetiku degradacije MHC-I molekula.



Slika 66. Učinak leupeptina i laktacistina na degradaciju MHC molekula I. razreda

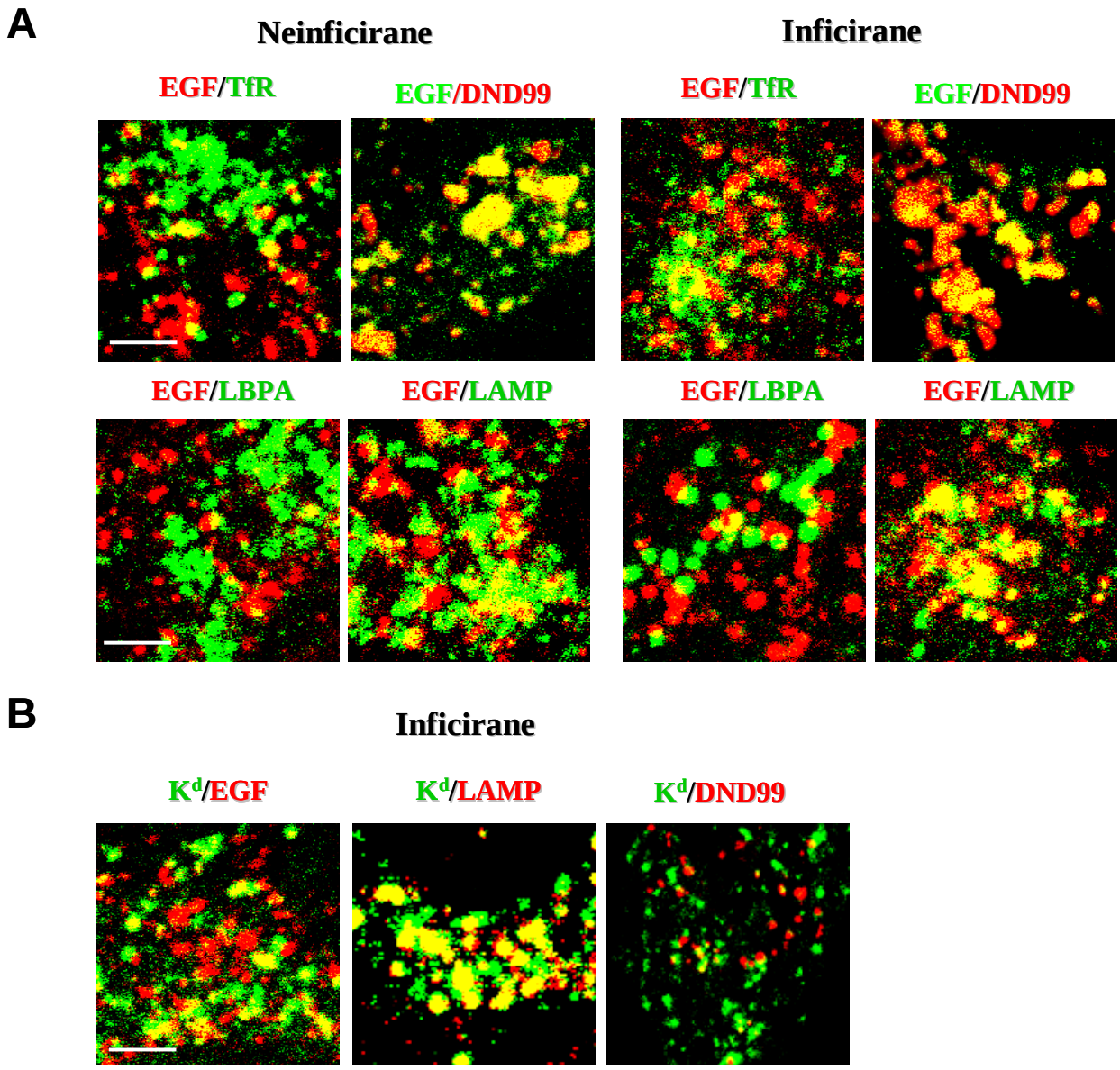
Neinficirane (N) i 4 sata inficirane (I) stanice površinski su biotinilirane, te su potom inkubirane bez inhibitora, ili uz Leu ili uz Lac. Nakon 20 sati chase jednak broj stanica je razoren u 1% NP40 puferu, te je iz njega imunoprecipitirana K^d MHC-I molekula. Nakon imunoprecipitacije (IP), svi uzorci su razdvojeni na SDS-PAGE elektroforezi i blotirani, a molekula vizualizirane pomoću SA-POD i kemiluminiscencije. Nakon vizualizacije izvršena je kvantifikacija degradacije K^d molekula (graf) denzitometrijom, a rezultat je prikazan kao postotak od početne vrijednosti (0 sati), što je u ovom slučaju bila količina K^d molekula odmah po biotinilaciji.

Lac nije blokirao degradaciju K^d (i D^d, nije prikazano) molekula (slika 66, Lac), dok je Leu blokirao degradaciju za nekih 40% u odnosu na netretirane inficirane stanice. Ipak degradacija u prisustvu Leu još uvijek je brža nego u neinficiranim stanicama, ali daleko sporija nego vlastita internalizacija, stoga se MHC-I molekule zadržavaju u stanici (slika 66, Leu). Iz toga možemo zaključiti da se degradacija MHC-I molekula odvija u lizosomima, a ne na proteasomima s obzirom da Lac nije imao nikakav učinak na blokadu degradacije.

4.5.4. Opis puta degradacije u neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama

Kako bismo opisali točan put degradacije u inficiranim stanicama koristili smo molekule koje ulaze u stanicu klatrin-ovisnom endocitozom. Tim putem molekule se nakon internalizacije usmjeravaju u put recikliranja ili u put degradacije prema LE. Putovanje prema LE odvija se pomoću dinamičkih (EGF) ili statičkih (MHC-I molekule, LAMP) ranih endosoma (74).

Na neinficiranim i 8 sati inficiranim stanicama praćena je kolokalizacija internaliziranog EGF-a s biljezima unutarstaničnih odjeljaka ili njegova usporedna internalizacija s MHC-I molekulama (K^d) i DND99 koji ulazi u kisele odjeljke i boji ih crveno. U inficiranim stanicama internalizirani EGF raspršio se unutar stanice u TfR^-, $LAMP^+$ i $DND99^+$ perinuklearne mjehuriće isto kao i u neinficiranim stanicama (slika 67A), ali se nije kolokalizirao sa usporedno internaliziranim K^d molekulama (slika 67B). Ovo sugerira da MCMV ne mijenja stvaranje dinamičkih ranih endosoma te da se odjeljak u kojem se nakupljaju MHC-I molekule ne stvara iz dinamičkih ranih endosoma. Iako je EGF sposoban ulaziti u LBPA odjeljke (mala kolokalizacija) (slika 67A, LBPA inficirane) ipak je njegova degradacija usporena u odnosu na neinficirane stanice (slika 65), što govori o odgođenom ulasku molekula iz dinamičnih endosoma u LE. Mala frakcija internaliziranog EGF-a koja stigne u jukstanuklearno područje inficirane stanice kolokalizira sa sa internaliziranim TfR-om i K^d molekulama (slika 67B), što odgovara činjenici da se jedan dio EGF-a normalno nalazi i u statičkoj populaciji ranih endosoma (74). Ova tvrdnja poduprta je činjenicom da se nakon usporedne internalizacije, kolokaliziraju K^d i LAMP-om, koji oboje putuju statičkim ranim endosomima. I internalizirane K^d i internalizirani LAMP, molekule su koje se nalaze u istim mjehurićima (slika 67B, K^d/LAMP), što bi značilo da se MHC-I molekule zadržavaju i nakupljaju u statičkim ranim endosomima sa smanjenim kapacitetom progresije prema LE.



Slika 67. Kolokalizacija internalizacije EGF molekule sa biljezima unutarstaničnih odjeljka na neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama. Usporedna internalizacija K^d molekule sa EGF-om, LAMP-om i DND99 u MCMV-inficiranim stanicama.

Neinficirane i 8 sati inficirane stanice površinski su obilježene odgovarajućim mPt na EGF, te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom 60 minuta (A). 8 sati inficirane stanice površinski su obilježene odgovarajućim mPt na K^d, EGF, LAMP ili DND99, te je praćena njihova usporedna internalizacija (B). Stanice su prije fiksacije i permeabilizacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 2 µm. Debljina snimka (z) = 0,5 µm.

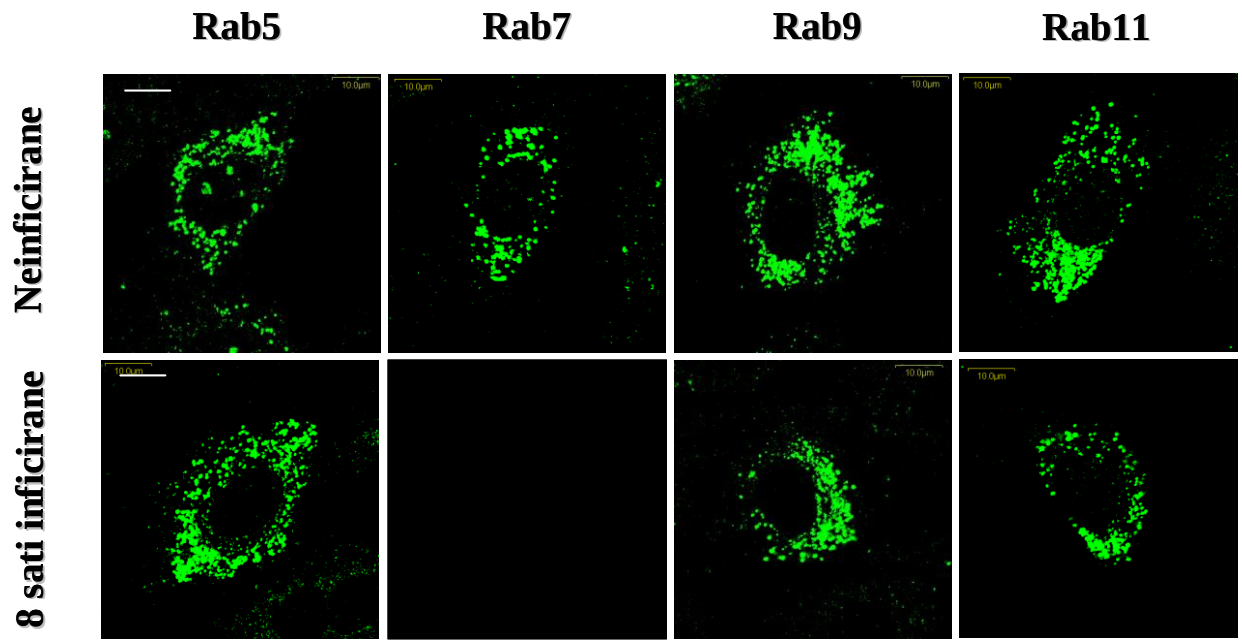
4.6. UTJECAJ MOLEKULA RAB OBITELJI NA ENDOCITOZNI PUT MHC MOLEKULA I. RAZREDA

Prateći endocitozni put MHC-I molekula u inficiranim uvjetima, vidjeli smo da su tijekom cijelog perioda internalizacije mjehurići sa MHC-I molekulama EEA-1^+ što upućuje na mogućnost otežanog otpuštanja ranih endosomalnih membrana. Molekule se potom usmjeravaju prema Golgijevom području (kolokaliziraju se sa GM130), u put recikliranja (kolokaliziraju se sa TfR-om) ili se usmjeravaju prema kasnim endosomima (parcijalno se kolokaliziraju sa LBPA ili LAMP-om). Međutim svi ti putovi su narušeni u uvjetima infekcije: MHC-I molekule pojačano se nakupljaju u Golgijevom području, smanjeno recikliraju te odgođeno ulaze u degradaciju.

Za sva događanja u stanici ili za neko od navedenih usmjeravanja molekula nakon internalizacije sa stanične površine potrebno je kako prisustvo tako i pretvorba malih GTPaza iz obitelji Rab molekula.

Sazrijevanje sortirajućih domena EE zahtijeva aktivnost malih GTPaza obitelji Rab. Rab konverzija, označava zamjenu Rab5 molekule na sortirajućim endosomima sa Rab7 molekulom što vodi ka stvaranju endolizosomalnih domena. S obzirom da je ulazak u put degradacije odgođen, moguće je da u uvjetima virusne infekcije upravo dolazi do poremećaja u navedenoj konverziji. Rab11 molekula esencijalna je u domenama reciklirajućih endosoma, te je moguće da dolazi do smanjenja njene ukupne količine u inficiranim stanicama što bi za posljedicu imalo smanjenje recikliranja. I konačno, Rab9 usmjerava internalizirane molekule prema Golgijevom području, te je moguće povećanje njegove količine u inficiranim stanicama kako bi se omogućilo nakupljanje internaliziranih molekula upravo u ovom području.

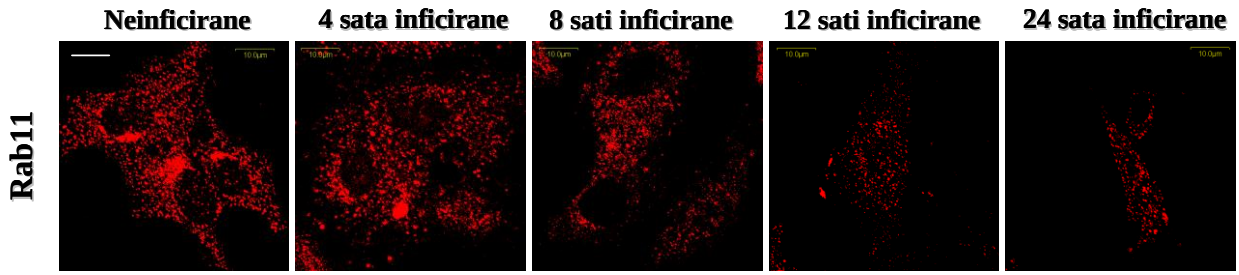
Stoga, poremećeno rano endosomalno sazrijevanje u MCMV-inficiranim stanicama može biti posljedica promijenjenog funkcioniranja Rab molekula. Kako bi potvrdili navedenu tezu, određivali smo izražaj Rab molekula u MCMV-inficiranim stanicama metodom konfokalne mikroskopije ili Western-blot analizom te usporedili sa izražajem u neinficiranim stanicama.



Slika 68. Unutarstanični izražaj Rab molekula na neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama.
Neinficirane i 8 sati inficirane stanice su fiksirane i permeabilizirane. Potom su obilježene odgovarajućim mPt na Rab5, Rab7, Rab9 i Rab11 molekule, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

S obzirom da smo vidjeli da su MHC-I molekule stalno EEA-1^{+} za očekivati je da će razina Rab5 molekule biti neznatno promijenjena i u infekciji. Vidimo da razina Rab5 (slika 68) nije značajno promijenjena nakon infekcije, dok je razina signala imunofluorescencije izrazito reducirana za Rab7 i Rab11, gotovo da 8 sati nakon infekcije niti nema signala Rab7 molekule (slika 68). Upravo takva razina Rab7 molekule, koji usmjerava molekule nakon internalizacije u put degradacije može biti razlog odgođenog ulaska molekula u kasne endosome ili lizosome. Također u uvodnom dijelu je izloženo da se u stanici događa konverzija Rab5 u Rab7 molekulu, a kao što vidimo razina Rab5 gotovo da je nakon 8 sati infekcije ista kao i u neinficiranim stanicama, što sugerira da je konverzija Rab molekula pogođena u infekciji. Izražaj Rab9 je neznatno smanjen, što nije dovoljno da bi se inhibiralo usmjeravanje molekula u Golgijevo područje.

S obzirom da je Rab11 molekula koja ima vodeću ulogu u recikliranju, a vidjeli smo da se recikliranje značajnije smanjuje u većim vremenima infekcije (pogotovo od 13. sata nadalje), detaljnije smo ispitali njezin izražaj kroz dulja razdoblja infekcije.



Slika 69. Unutarstanični izražaj Rab11 na neinficiranim i inficiranim stanicama.

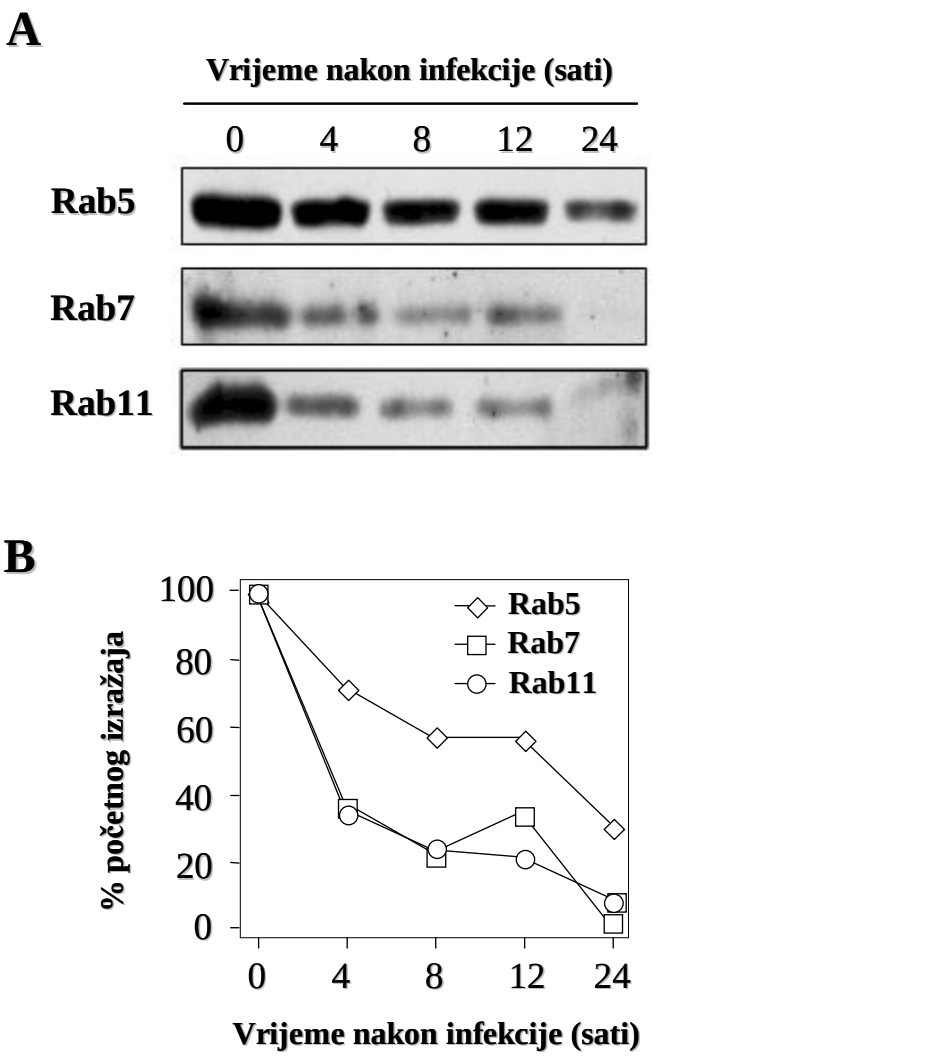
Neinficirane, 4 sata, 8 sati, 12 sati i 24 sata inficirane stanice su fiksirane i permeabilizirane. Potom su obilježene odgovarajućim mPt na Rab11 molekulu, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Signal imunofluorescencije Rab11 postepeno pada 4 sata nakon infekcije, te je potom prisutno značajnije smanjenje signala na 8. satu, a gotovo da nemamo signala nakon 12 ili 24 sata infekcije (slika 69), sugerirajući da je upravo promjena izražaja Rab11 molekule odgovorna za smanjenje recikliranja molekula nakon internalizacije.

Također potrebno je bilo potvrditi da je smanjenje razine izražaja Rab molekula posljedica smanjene stanične razine molekule, a ne rezultat citoplazmatske disperzije imunofluorescentnog signala. Kako bi navedenu tezu potvrdili testirali smo izražaj Rab molekula Western blot analizom.

Western blot analiza potvrdila je da je smanjenje izražaja Rab molekula upravo posljedica smanjenja stanične razine molekule (slike 70A i 70B). Četiri sata nakon infekcije razina izražaja Rab5 pada na 75%, a razina Rab7 i 11 na 35% vrijednosti neinficirane stanice (slika 70B). Sa progresijom infekcije sve Rab molekule nastavljaju padati. Rab7 i Rab11 pali su na 20% kontrolne vrijednosti 8 sati nakon infekcije, te su gotovo ne mogu detektirati 24 sata nakon infekcije (slika 70B).

Ovi rezultati ukazuju da su tromo endocitozno putovanje, smanjeno recikliranje te odgođena, ali smanjena degradacija, kao i zadržavanje internaliziranih molekula u odjeljku nakupljanja, posljedica nedovoljne stanične mašinerije obitelji Rab molekula koja je odgovorna za segregaciju membrana u endosomalnom sustavu.



Slika 70. Izražaj Rab molekula na neinficiranim i inficiranim stanicama.

Nakon naznačenih vremenskih intervala jednak broj stanica je razoren u 1% NP40 puferu. Svi uzorci su potom razdvojeni na SDS-PAGE elektroforezi i blotirani, zatim je obilježeni odgovarajućim mPt na Rab5, Rab7 i Rab11, a molekule vizualizirane pomoći SA-POD i kemiluminiscencije. Nakon vizualizacije izvršena je kvantifikacija izražaja denzitometrijom (graf), a rezultat je prikazan kao postotak od početne vrijednosti (0 minuta), što je u ovom slučaju bila količina pojedine Rab molekule u neinficiranim stanicama.

4.7. UČINAK RAZLIČITIH MUTANTI MIŠJEG CITOMEGALOVIRUSA NA ENDOCITOZNI PUT MHC MOLEKULA I. RAZREDA

Kako bi ispitali koji od virusnih gena MCMV-a su odgovorni za učinak nishodne regulacije kao i za promjene endocitznog puta MHC-I molekula uključili smo u istraživanje različite virusne mutante MCMV-a kojima nedostaje/ju odgovarajući gen/i.

4.7.1. Učinak neposredno ranih (IE), ranih (E) i kasnih (L) gena na izražaj MHC molekula I. razreda

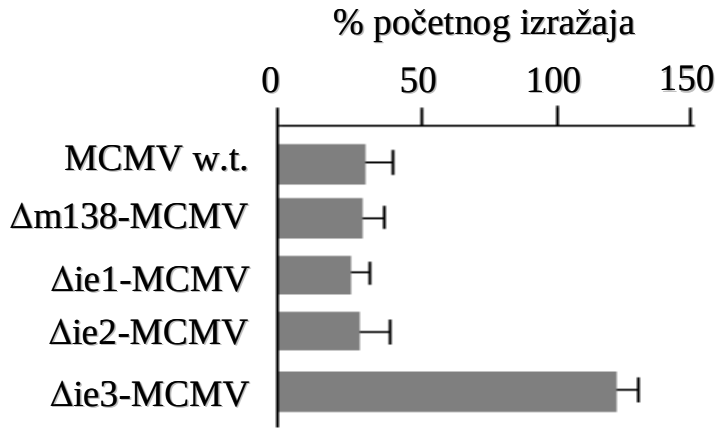
4.7.1.1. Učinak neposredno ranih (IE), ranih (E) i kasnih (L) gena na nishodnu regulaciju MHC molekula I. razreda sa stanične površine

Izražavanje gena MCMV-a može se podijeliti u 3 razdoblja: IE, E i L razdoblje kako je već navedeno u uvodnom dijelu. Kada se stanica tretira sa cikloheksimidom (CHX-om), koji je inhibitor proteinske sinteze odnosno blokator translacije, pa se potom zamijeni sa aktinomicinom D (ActD), blokatorom transkripcije, virusna se replikacija ograničava na IE razdoblje, te se tada sintetiziraju isključivo IE proteini. S druge strane ako se stanicama tretiranim sa CHX isti nakon određenog vremena ukloni, tada nakon IE razdoblja se omogućava ulazak virusne replikacije u E razdoblje, te se u tom slučaju izražavaju i IE i E proteini. Tretiranje stanica sa DNA polimeraza inhibitorima ograničava se virusna replikacija na IE i E razdoblje. Ovim putem se mogu pratiti učinci pojedinih skupina gena iz različitih razdoblja virusne replikacije.

Kako bi vidjeli da li je neki od IE gena odgovoran za nishodnu regulaciju MHC-I molekula inficirali smo stanice upravo tim mutantama virusa. Stanice su inficirane tijekom 8 sati redom sa: MCMV-w.t. (wild type) koji ima sve virusne gene, Δm138-MCMV (nedostaje mu gen koji kodira FcR, te se na taj način sprječava nespecifično vezivanje protutijela), Δie1-MCMV (nedostaje mu ie1 gen), Δie2-MCMV (nedostaje mu ie2 gen) te sa Δie3-MCMV (nedostaje mu ie3 gen).

Gubitak K^d (i D^d, nije prikazano) molekula sa površine stanice bio je vrlo sličan prilikom infekcije mutantama virusa kojima nedostaje ie1 ili ie2 onome u infekciji sa MCMV-w.t. ili Δm138-MCMV (slika 71). Ipak, nakon infekcije stanica sa Δie3-MCMV, izražaj K^d molekula na površini stanice čak je narastao, odnosno došlo je do njegove ushodne regulacije (slika 71, Δie3-MCMV), sugerirajući da je sposobnost vrlo brze nishodne regulacije MHC-I molekula

sa površine stanice povezana ili sa učinkom ie3 gena ili sa ranim genima koji su pod njegovom regulacijom.

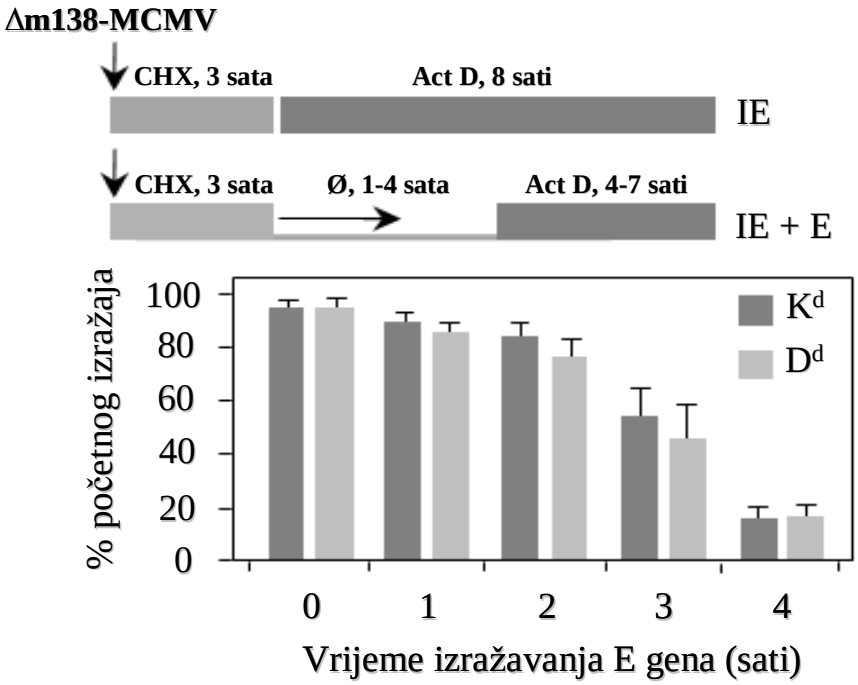


Slika 71. Izražaj K^d molekula na površini stanice inficirane različitim mutantama virusa MCMV-a.
Stanice su tijekom 8 sati inficirane sa različitim mutantama virusa MCMV-a, potom su neinficirane i inficirane stanice obilježene odgovarajućim mPt na K^d molekulu. Površinski izražaj prikazan je metodom protočne citometrije. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti postotaka početnog izražaja (u ovom slučaju to su neinficirane stanice) koji predstavlja omjer MFI vrijednosti u ispitivanom i nultom vremenu pomnožen sa 100.

Da bi dodatno potvrdili da li su za nishodnu regulaciju odgovorni IE, E ili pak L virusni geni, stanice smo tretirali CHX-om nakon čega je slijedilo ili tretiranje sa Act D ili je stanicama dodan samo čisti medij. Također smo stanice izložili djelovanju foskarneta koji inhibira replikaciju virusne DNA, kako bi ispitali ulogu L gena u nishodnoj regulaciji MHC-I molekula.

Promjena izražaja MHC-I molekula sa površine inficirane stanice koja je prvo tretirana 3 sata sa CHX-om, potom 8 sati sa Act D, u uvjetima pojačanog izražaja IE gena, upućuje na činjenicu da niti produkti niti transkripti IE gena koji se javljaju tijekom IE razdoblja ne utječu na nishodnu regulaciju MHC-I molekula sa površine stanice (slika 72). Ipak, kada je CHX zamijenjen čistim medijem (medijem bez inhibitora) prije tretiranja stanice sa Act D (postupak koji ograničava replikaciju virusa na E razdoblje i kada su E geni pojačano izraženi), izražaj MHC-I molekula na površini stanice značajno se smanjio (slika 72). Obzirom da virusnih E geni koji blokiraju promet u sekretornom putu zahtijevaju samo 30 minuta izražaja E gena (78, 208), ti podaci pokazuju da se virusni mehanizmi nishodne

regulacije ne odnose na djelovanje prvog seta E gena nego na E gene koji se nešto kasnije izražavaju (tzv. drugi set E gena).

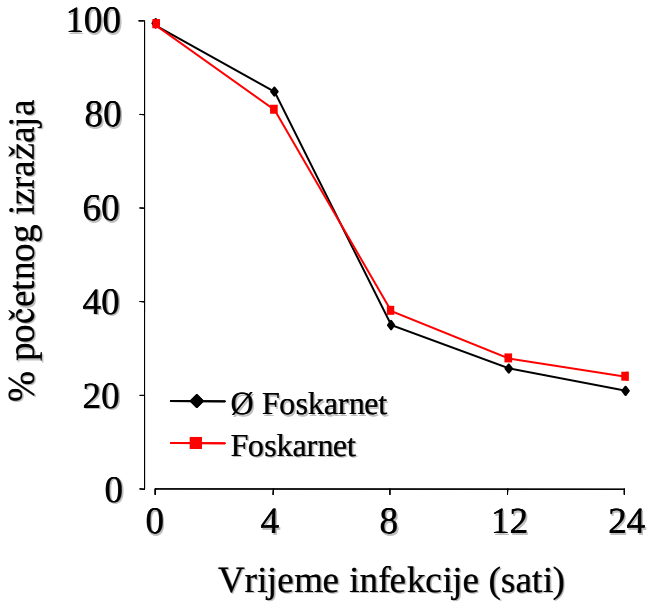


Slika 72. Učinak cikloheksimida (CHX-a) i aktinomicina D (Act D) na izražaj MHC molekula I. razreda na površini inficirane stanice.

Stanice su inficirane u prisustvu CHX-a tijekom 3 sata, nakon čega im je dodan medij bez inhibitora pa potom Act D ili im je medij sa CHX zamijenjen onim sa Act D. Stanice su potom obilježene odgovarajućim mPt na MHC-I molekule. Površinski izražaj prikazan je metodom protočne citometrije. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti postotaka početnog izražaja (u ovom slučaju to su inficirane netretirane stanice) koji predstavlja omjer MFI vrijednosti u ispitivanom i nultom vremenu pomnožen sa 100.

Sada smo pokazali da E geni izazivaju nishodnu regulaciju MHC-I molekula, te je potrebno još istražiti da li na promjenu izražaja MHC-I molekula na površini stanice utječu i L geni. Stoga smo stanice inficirali u prisustvu foskarneta. Foskarnet je supstanca koja inhibira replikaciju virusne DNA te ograničava replikaciju virusa na IE i E razdoblje.

MHC-I molekule (D^d nije prikazana) nishodno su regulirane sa površine inficirane stanice u kojoj je replikacije virusne DNA blokirana foskarnetom kao i u netretiranoj inficiranoj stanici (slika 73). Iz toga možemo zaključiti da mehanizam kojim se virus upliće u izražaj MHC-I molekula na zahtijeva funkciju virusne DNA i izražavanje L gena.

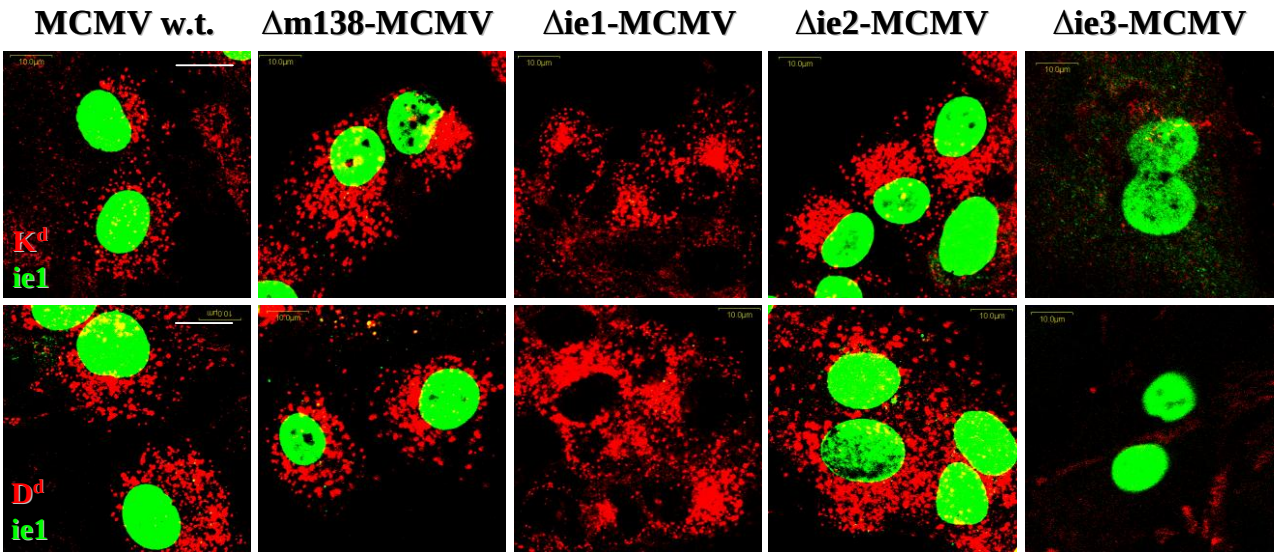


Slika 73. Učinak foskarneta na izražaj K^d molekula na površini inficirane stanice.
Stanice su inficirane bez prisustva ili u prisustvu foskarneta (160μM) tijekom navedenog vremena, potom su obilježene odgovarajućim mPt na K^d molekule. Površinski izražaj prikazan je metodom protočne citometrije. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti postotaka početnog izražaja (u ovom slučaju to su netretirane ili tretirane foskarnetom neinficirane stanice) koji predstavlja omjer MFI vrijednosti u ispitivanom i nultom vremenu pomnožen sa 100.

4.7.1.2. Učinak neposredno ranih (IE) i ranih (E) gena na endocitozni put MHC molekula I. razreda

Kao što je prikazano na nishodnu regulaciju MHC-I molekula sa stanične površine utječu najviše E geni, odnosno tzv. drugi set E gena. Da bismo ispitali da li je obrazac internalizacije MHC-I molekula isti bez obzira koji virusni gen nedostaje inficirali smo stanice sa prije navedenim virusnim mutantama.

Nakon infekcije obilježili smo unutarstanični virusni IE1 protein pp89 (CRO101), da bismo potvrdili kako infekciju stanice tako i obrazac pojedine virusne mutante.
pp89 (ie1) protein je protein koji se izražava u najranijem razdoblju infekcije i koji se prikazuje u stanici kao difuzno obojenje jezgre inficirane stanice (slika 74).



Slika 74. Unutarstanična distribucija MHC molekula I. razreda nakon internalizacije u stanicama inficiranim različitim mutantama virusa MCMV-a.

Stanice su inficirane različitim mutantama MCMV-a tijekom 4 sata, potom su površinski obilježene odgovarajućim mPt, K^d i D^d (crvena fluorescencija), te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom četiri sata. Stanice su prije fiksacije i permeabilizacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula potom je dodano odgovarajuće mPt na ie1 (CRO101) protein (zelena fluorescencija), te su stanice analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Kod svih mutanti imamo prisutan ie1 protein odnosno obojenu jezgru osim kod mutante kojoj nedostaje navedeni gen. Međutim, i u tim stanicama obrazac internalizacije MHC-I molekula je isti kao i kod MCMV w.t., Δm138-MCMV ili Δie2-MCMV (slika 74). MHC-I molekule se nakon četiri sata internalizacije nakupljaju u perinuklearnom području, što potvrđuje njihova lokalizacija neposredno uz difuzno zeleno obojanu jezgru (slika 74). Kada je stanica inficirana sa Δie3-MCMV, jezgra se difuzno boji (ie1 je prisutan), ali nemamo nakupljanje MHC-I molekula odnosno MHC-I molekule niti ne vidimo unutar stanice (slika 74). Ovaj rezultat se nadovezuje na sliku 71 (Δie3-MCMV) gdje vidimo da ne dolazi do nishodne već do ushodne regulacije MHC-I molekula na površini inficirane stanice. Za pretpostaviti je da se smanjuje stopa internalizacije, pa manji broj MHC-I molekula ulazi u stanicu te zbog raspršenosti signala ne možemo iste detektirati unutar stanice. S obzirom da se u stanicama kada nema ie3 ne izražavaju niti E geni, dodatno sugerira da su za promjene kako izražaja tako i unutarstaničnog puta MHC-I molekula odgovorni E geni.

4.7.2. Učinak m04, m06 i m152 gena na MHC molekule I. razreda

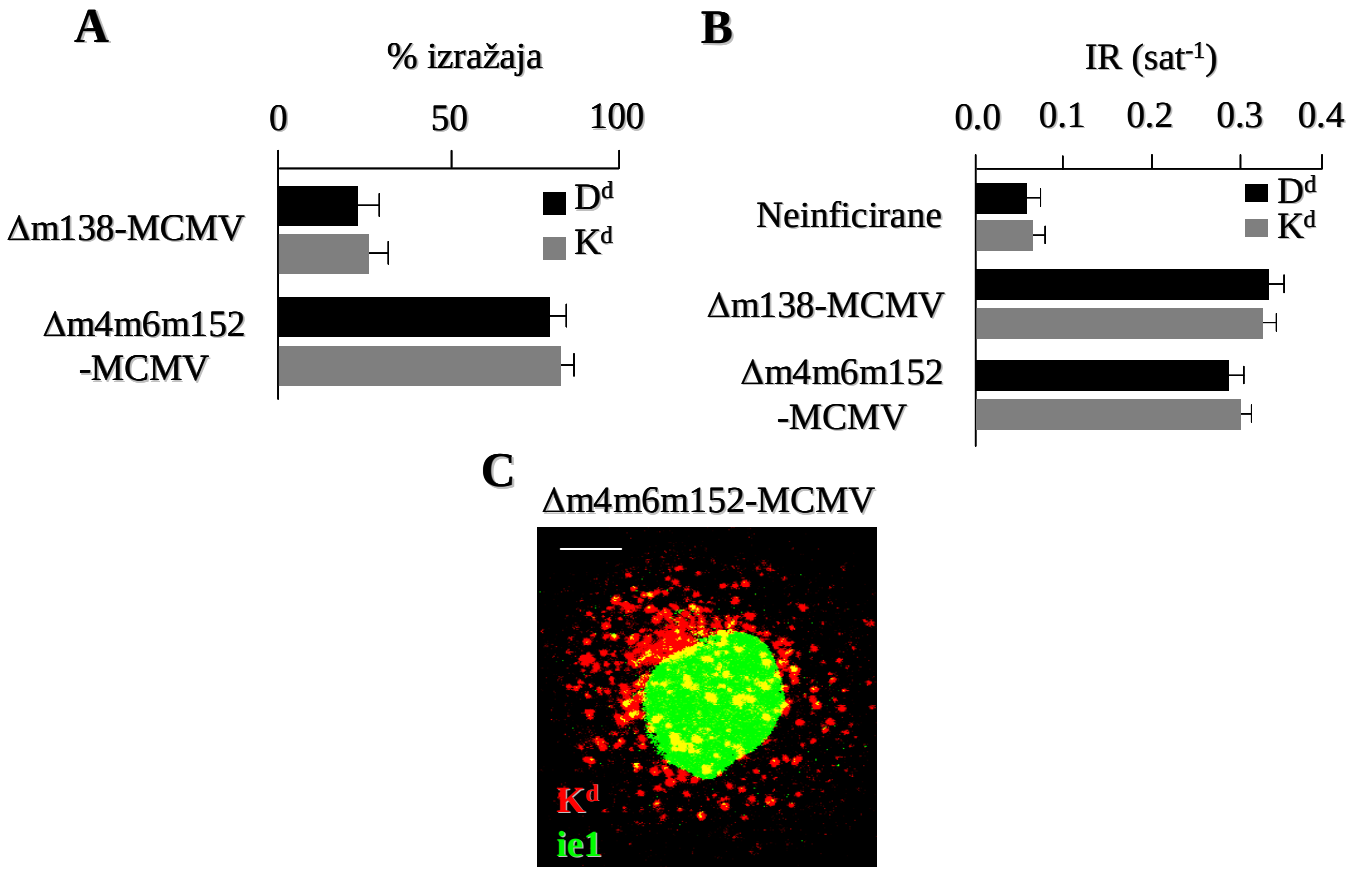
4.7.2.1. Učinak m04, m06 i m152 gena na sekretorni i endocitzni put MHC molekula I. razreda

Značajan dio genoma MCMV-a kodira gene koji mogu preuređivati stanične funkcije, uključujući putovanje MHC-I molekula duž sekretornog puta. Najbolje do sada istraženi geni zasigurno su geni m04, m06 i m152. Ovi proteini se izražavaju i postaju aktivni vrlo rano u infekciji (u IE razdoblju), te ulaze u interakciju sa putovanjem MHC-I molekula duž sekretornog puta što rezultira njihovom nishodnom regulacijom sa stanične površine.

Kako bismo ispitali učinak ovih gena na formiranje perinuklearnog odjeljka u kojem se zadržavaju MHC-I molekule, inficirali smo stanice sa Δm4m6m152-MCMV za koju je poznato da ne uzrokuje nishodnu regulaciju MHC-I molekula.

Površinski izražaj oba alela MHC-I molekula (K^d i D^d) smanjen je na 80% početne vrijednosti nakon 12 sati infekcije u stanicama inficiranim Δm4m6m152-MCMV, za razliku od smanjenja na 25% u stanicama inficiranim Δm138-MCMV (slika 75A), sugerirajući uključenost ova tri gena u nishodnu regulaciju MHC-I molekula. Iako MHC-I molekule nisu nishodno regulirane nakon infekcije sa Δm4m6m152-MCMV, MHC-I molekule se internaliziraju s povišenom stopom internalizacije u odnosu na neinficirane stanice, ali sa stopom internalizacije sličnoj onoj u stanicama inficiranim MCMV-w.t. (nije prikazano) ili u stanicama inficiranim Δm138-MCMV (slika 75B). Internalizirane MHC-I molekule nakon četiri sata internalizacije, nakupljaju se u perinukleranim endosomima (slika 75C) baš kao i u stanicama inficiranim drugim virusnim mutantama (slika 74).

Ovi rezultati sugeriraju na činjenicu da MCMV kodira genske produkte koji se upliću u endosomalno putovanje MHC-I molekula, ali da bez svoja poznata tri gena m04, m06 i m152 nije sposoban nishodno regulirati MHC-I molekule s površine stanice u nedostatku njihovog transportnog bloka duž sekretornom putu.

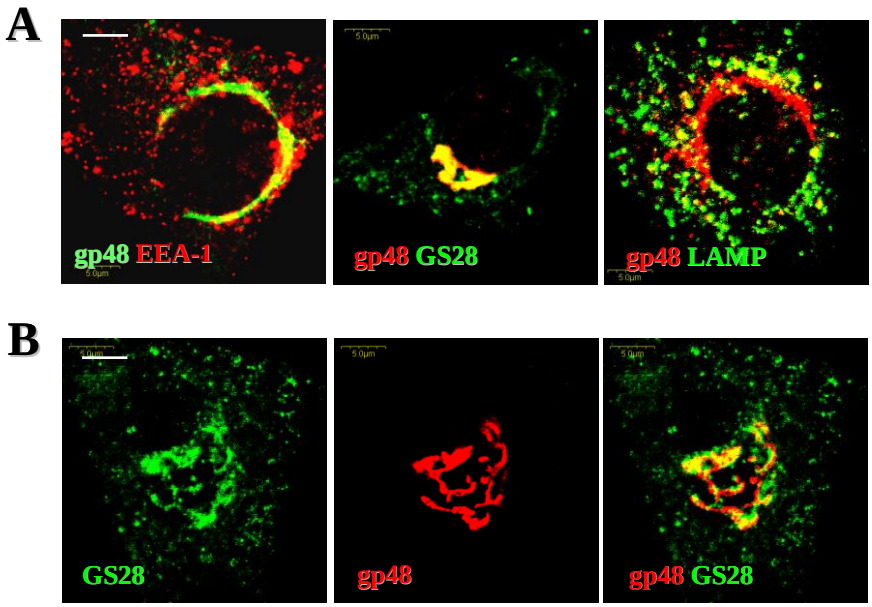


Slika 75. Učinak m04, m06 i m152 gena na putovanje MHC molekula I. razreda.

Stanice koje su inficirane različitim mutantama MCMV-a tijekom 12 sati , površinski su obilježene odgovarajućim mPt, K^d i D^d (A). Neinficirane i stanice koje su inficirane različitim mutantama MCMV tijekom 4 sata, površinski su obilježene odgovarajućim mPt, K^d i D^d, te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom četiri sata (B). Rezultati (A i B) su prikazani kao srednje vrijednosti postotaka početnog izražaja koji predstavlja omjer MFI vrijednosti u ispitivanom i nultom vremenu pomnožen sa 100. Stanice koje su inficirane sa Δm4m6m152-MCMV tijekom 4 sata, površinski su obilježene odgovarajućim mPt na K^d, te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom četiri sata (C). Stanice su prije fiksacije i permeabilizacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula potom je dodano odgovarajuće mPt na pp89 (ie1) protein (zelena fluorescencija), te su stanice analizirane konfokalnom mikroskopijom (C). Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

4.7.2.2. m06 gen i endocitozni put MHC molekula I. razreda

m06 gen kodira protein gp48 čija je funkcija odvođenje novo-sintetiziranih MHC-I molekula u proces degradacije. S obzirom da smo vidjeli da je ulazak u put degradacije odgođen, te da se internalizirane površinske molekule nakupljaju u odjeljku koji se nalazi jukstanuklearno oko područja Golgijeve mreže, željeli smo ispitati da li m06/gp48 utječe i na internalizirane MHC-I molekule. Da bismo ispitivali eventualnu ulogu m06/gp48, potrebno je bilo odrediti njegovu lokalizaciju unutar stanice.



Slika 76. Unutarstanična kolokalizacija m06/gp48 proteina sa biljezima endosomalnih odjeljaka na MCMV-

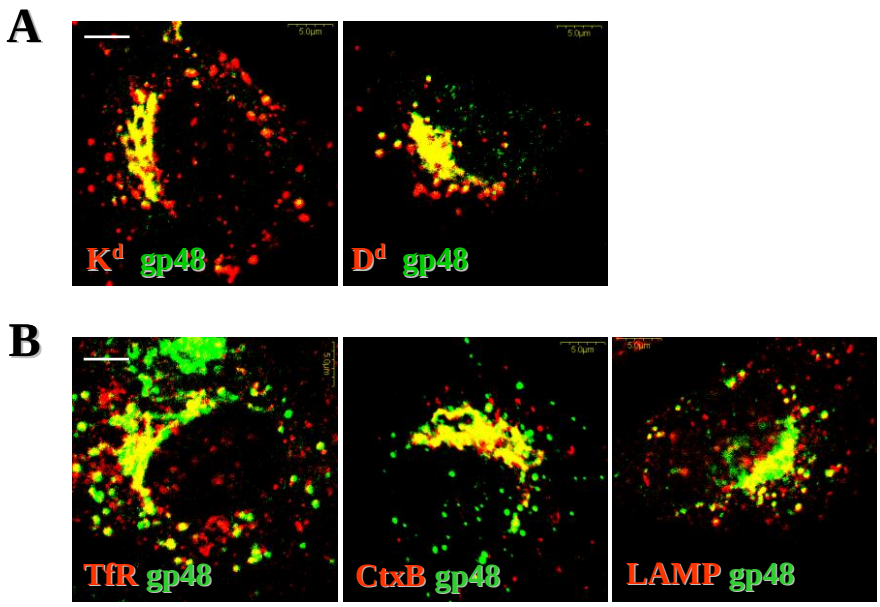
inficiranim MEF stanicama ili na transficiranim NIH3T3m06 stanicama.

Kolokalizacija m06/gp48 proteina (CR0229, zelena/crvena fluorescencija) sa biljezima odjeljaka (zelena/crvena fluorescencija) na MEF stanicama inficiranim tijekom 8 sati (A) ili na NIH3T3m06 transficiranim stanicama (B). Stanice su prije fiksacije i permeabilizacije kratkotrajno zakiseljene radi bolje detekcije unutarstaničnih molekula, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

m06/gp48 protein koji se izražava u unutrašnjosti 8 sati inficirane stanice ima izgled polumjeseca koji se lokalizira u blizini jezgre. Vrlo malo se kolokalizira sa biljegom EE (EEA-1), a uopće se ne kolokalizira sa biljegom LE/lizosoma (LAMP) (slika 76A). Ipak, m06/gp48 protein kolokalizira se gotovo u potpunosti sa GS28, biljegom Golgijevog područja (slika 76A). Kako bismo potvrdili da je m06/gp48 uistinu u $GS28^{+}$ području, kolokalizirali

smo ga sa GS28, ali u transficiranim NIH3T3m06 stanicama, te dobili njihovu potpunu kolokalizaciju (slika 76B).

Internalizirane MHC-I molekule, ali i druge molekule nakon internalizacije nakupljaju se u području Golgijeve mreže (slika 43), a kako se m06/gp48 protein kolokalizira sa biljegom Golgijeve mreže htjeli smo ispitati da li se različite molekule nakon internalizacije kolokaliziraju i sa m06/gp48 proteinom.



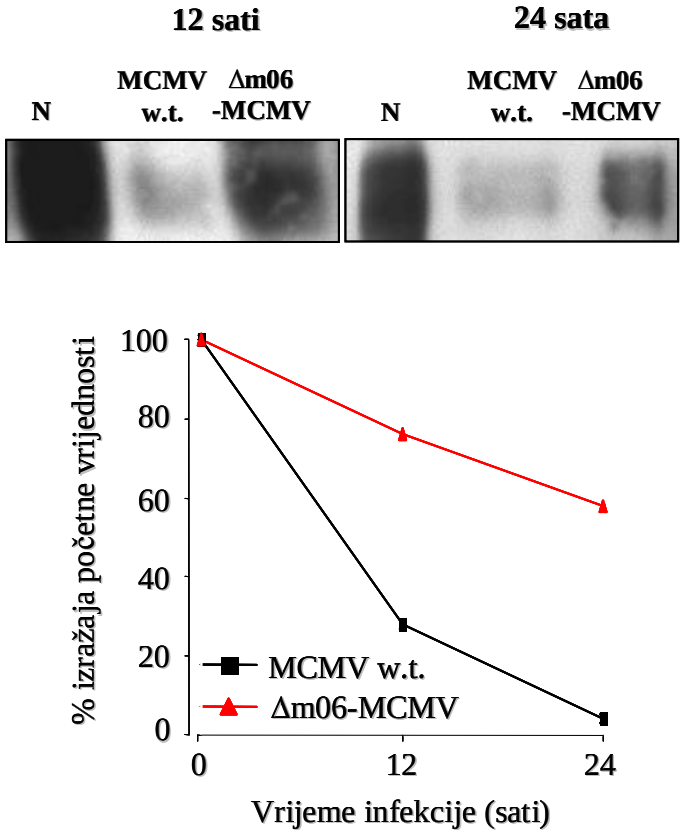
Slika 77. Kolokalizacija različitih površinskih molekula sa m06/gp48 proteinom nakon internalizacije u MCMV- inficiranim stanicama.

Stanice su inficirane tijekom 4 sata te su površinski obilježene odgovarajućim mPt na MHC-I molekule (A), TfR, CTxB ili na LAMP (B) te inkubirane na 37 °C u mediju tijekom 4 sata. Stanice su zatim fiksirane, permeabilizirane i zatim je dodano protu-m06/gp48 (CRO229). 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.

Poznato je da se m06/gp48 protein veže na novo-sintetizirane MHC-I molekule te ih odvodi u degradaciju. Stoga smo se zapitali da li ima utjecaj i na površinske MHC-I molekule nakon njihova ulaska u stanicu. MHC-I molekule se nakon internalizacije gotovo u potpunosti kolokaliziraju sa m06/gp48 proteinom (slika 77A), baš kao i internalizirani TfR, CTxB ili LAMP molekula (slika 77B). Moguće je da se m06/gp48 protein veže za molekule nakon internalizacije sa površine stanice, te ih tada usmjerava prema degradaciji. Za pretpostaviti je da do njihovog povezivanja ipak dolazi unutar stanice s obzirom da nismo uspjeli detektirati

m06/gp48 protein na površini stanice niti metodom protočne citometrije niti konfokalnom mikroskopijom.

S obzirom da je vodeća uloga m06/gp48 proteina upravo u degradaciji MHC-I molekula, ispitali smo učinak njegovog nedostatka na degradaciju MHC-I molekula.



Slika 78. Učinak m06/gp48 proteina na degradaciju K^d molekula.

Stanice su inficirane sa MCMV-w.t. ili sa Δm4m6m152-MCMV. Jednak broj neinficiranih (N) i inficiranih stanica je nakon naznačenih vremenskih intervala razoren u 1% NP40 puferu, te je iz njega imunoprecipitirana K^d MHC-I molekula. Nakon imunoprecipitacije (IP), svi uzorci su razdvojeni na SDS-PAGE elektroforezi i blotirani, a molekule vizualizirane pomoću SA-POD i kemiluminiscencije. Nakon vizualizacije izvršena je kvantifikacija degradacije K^d molekula (graf) denzitometrijom, a rezultat je prikazan kao postotak od početne vrijednosti (0 sati), što je u ovom slučaju bila količina K^d molekula u neinficiranim stanicama.

U stanicama koje su bile inficirane MCMV-w.t., MHC-I molekule su se brzo degradirale. Nakon 12 sati infekcije degradiralo se njih 70%, a nakon 24 sata infekcije 90% od početne vrijednosti, što odgovara vrijednosti od 100% u neinficiranim stanicama (0 sati) (slika 78). Stanice koje su inficirane virusom kojemu nedostaje m06 gen (Δm06-MCMV), pokazuju znatno sporiju degradaciju. Nakon 12 sati infekcije degradiralo se 20%, a nakon 24 sata 40% MHC-I molekula (slika 78). Dakle, m06/gp48 protein igra krucijalnu ulogu u degradaciji MHC-I molekula. Osim što usmjerava novo-sintetizirane MHC-I molekule u degradaciju, m06/gp48 protein ima učinak i na internalizirane MHC-I molekule sa kojima se najvjerojatnije veže neposredno po internalizaciji unutar stanice te u kompleksu s njima putuje u odjeljak u kojem se nakupljaju i iz kojeg se kasnije usmjeravaju prema degradaciji, ali sa odgodom.

5. RASPRAVA

U ovom radu prikazani su rezultati istraživanja mehanizama endocitoze, internalizacije, recikliranja i degradacije površinskih, staničnih molekula na neinficiranim stanicama kao i na stanicama inficiranim mišjim citomegalovirusom (MCMV-om).

Dobro je poznato da se MHC-I molekule izražavaju na površini gotovo svih stanica kao trimolekularni stabilni kompleksi koji se sastoje od teškog lanca, β2-mikroglobulina i peptida. MHC-I molekule zauzimaju vodeću ulogu u imunološkom sustavu jer se pomoću njih prerađeni virusni peptidi izražavaju na površini stanice te se pokreće kaskadna reakcija imunološkog odgovora domaćina. Poput drugih virusa i MCMV kodira proteine kojima nastoji blokirati ili oslabjeti imunološki odgovor. MCMV kodira dva proteina koja direktno ulaze u interakciju sa novo-sintetiziranim MHC-I molekulama i blokiraju njihov izlazak prema staničnoj površini iz sekretornog puta. Protein m152 zadržava MHC-I komplekse u ERGIC-u, dok protein m06 preusmjerava one MHC-I molekule koje napuste ER iz Golgijeve mreže u kasne endosome u proces brze degradacije. Naime, uzimajući u obzir strogu kontrolu kvalitete na izlasku iz ER-a čime se dopušta progresija samo onih pravilno svijenih konformiranih MHC-I molekula, dok se nekonformirane MHC-I molekule zadržavaju, moguće je da m06 i m152 imaju nadzor nad različitim konformacijskim oblicima MHC-I molekula. Ovi proteini su izraženi i postaju aktivni vrlo rano u infekciji (2 sata po infekciji). Njihov neto učinak dovodi do smanjenog izražaja MHC-I molekula na staničnoj membrani zbog spriječenog punjenja stanične površine MHC-I molekulama koje potječu iz sekretornog puta, ali i zbog gubitka MHC-I molekula sa površine stanice, kao rezultat konstitutivnog endocitoznog unosa. Nadalje, oba ova proteina su potrebna za nishodnu regulaciju MHC-I molekula sa stanične površine u MCMV-inficiranoj stanici.

U uvjetima ustaljenog stanja (engl. steady state) MHC-I molekule dobro se izražavaju na površini neinficirane stanice, te se rapidni gubitak sa površine primjećuje 5 sati nakon infekcije i odvija se stopom od 25-30% po satu (slika 20A). Nakon što se nishodno reguliraju sa površine inficirane stanice, MHC-I molekule pokazuju tendenciju ka jukstanuklearnom nakupljanju u obliku velikih mjehurića (slika 21-inficirane stanice). Za razliku od inficiranih stanica, u neinficiranim stanicama ne dolazi do nakupljanja MHC-I molekula igdje u stanici. To može upućivati da one ili vrlo brzo recikliraju ili se brzo usmjeravaju u put degradacije pa se niti ne stignu nakupiti u blizini jezgre. Postavlja se pitanje: koja bi općenito bila funkcija remećenja tih procesa? MCMV vjerojatno nastoji poremetiti oba procesa kako bi onemogućio

povratak MHC-I molekula natrag na staničnu površinu ili kako bi pak osigurao da stanica ne ostane bez MHC-I molekula te na taj način bude prepoznata od strane imunološkog sustava odnosno NK stanica.

Učinak MCMV-a na izražaj MHC-I molekula na površini stanice nije specifičan samo za ove molekule. Naime, MCMV utječe i na površinski izražaj kako GM1 molekule koju ushodno regulira tako i na CD44 molekulu koju nishodno regulira poput MHC-I molekula (slika 26). Sa kojom svrhom se MCMV upliće u izražaj različitih molekula nije poznato, ali je moguće da na taj način prilagođava stanicu i mehanizme koji se odvijaju unutar stanice sebi sa svrhom vlastitog preživljavanja.

Na unutarstaničnoj razini, oba ispitana alela MHC-I molekula se međusobno kolokaliziraju (slika 22). U ustaljenom stanju MHC-I molekule se nakupljaju unutar stanice u odjeljku koji poprima oblik polumjeseca i koji je pozitivan na mnoge biljege unutarstaničnih odjeljaka. Moguće je da u inficiranoj stanici dolazi do formiranja nekog novog hibridnog velikog odjeljka koji je pozitivan na EEA-1, GM130, LBPA i parcijalno na LAMP (slika 24). Osim toga, ovaj odjeljak je pozitivan i na TfR za kojeg znamo da se nalazi u ranim i u reciklirajućim endosomima (slika 23A). Moguće je da zbog stvaranja novog odjeljka dolazi do preusmjeravanja molekula sa stanične površine upravo u taj odjeljak te na taj način dolazi do preklapanja različitih endocitoznih puteva.

Prema tome, možemo zaključiti da se obrazac izražaja MHC-I molekula kako na površini tako i u unutrašnjosti stanice mijenja u uvjetima MCMV infekcije. MHC-I molekule se nishodno reguliraju sa površine inficirane stanice procesom koji nije specifičan samo za MHC-I molekule. MHC-I molekule se potom nakupljaju u hibridnom odjeljku koji je pozitivan na mnogobrojne biljege unutarstaničnih endosoma.

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. Praćenje endocitoze tj. direktnog ulaska molekula u stanicu za sada nije moguće stoga smo endocitozne puteve ispitivali praćenjem internalizacije molekula koje su karakteristične za pojedine endocitozne putove. U našim istraživanjima internalizaciju molekula pratili smo metodama konfokalne mikroskopije i protočne citometrije nakon površinskog obilježavanja protutijelom. Kako bismo potvrdili da se rezultati dobiveni ovim modelom mogu ponovit i u drugim uvjetima, gubitak površinskog izražaja molekula pratili smo i nakon blokade proteinske sinteze, tj. uz tretman s cikloheksimidom (slika 27). Obzirom da se rezultati dobiveni obima protokolima u osnovi podudaraju (slike 27 i 28, neinficirane), u daljnjim pokusima primjenjivali smo protokol koji

koristi praćenje molekula nakon površinskog vezivanja protutijela, a koji se i inače često primjenjuje u literaturi (191).

U neinficiranim stanicama kinetika spontane internalizacije relativno je spori proces, te se nakon 4 sata internalizacije, internaliziralo oko 50% MHC-I molekula (slika 28A). S druge strane, u inficiranim stanicama u istom se razdoblju internaliziralo oko 80% MHC-I molekula (slika 28B). 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 MHC-I molekula u inficiranim u odnosu na neinficirane stanice teoretski može biti posljedica ili brže endocitoze ili manjeg recikliranja MHC-I molekula u inficiranim u odnosu na neinficirane stanice. Ipak, konstitutivni endocitozni unos ne može objasniti rapidni gubitak MHC-I molekula sa stanične površine MCMV-inficirane stanice koji se odvija između 5. i 6 sata po infekciji, s obzirom da je to spori proces koji se u normalnim neinficiranim fibroblastima odvija sa stopom od ~ 6-8% po satu. Nishodna regulacija MHC-I molekula u inficiranim stanicama ima stopu od ~ 33% po satu, što je zapravo 5-6 puta brže nego proces konstitutivne internalizacije, ali je ipak manja u odnosu na stopu internalizacije molekula koje u stanicu ulaze klatrin-ovisnom endocitozom (slika 37). Rezultati sugeriraju da se MHC-I molekule uklanjaju sa površine MCMV-inficiranih stanica procesom neovisnim o klatrinu. Ovo se najvjerojatnije postiže poremećajem ranog endosomalnog prometovanja bez direktne interakcije MCMV gena (immunoevasins) sa MHC-I molekulama. U MCMV-inficiranim stanicama, konstitutivno internalizirane MHC-I molekule usmjeravaju se i zadržavaju u ranoj endosomalnoj sortirajućoj stanici sa smanjenom mogućnošću recikliranja i endolizosomalnog prometovanja. Smanjeni izražaj Rab proteina doprinosi remodeliranju membrana sortirajućih endosoma što upućuje na činjenicu da MCMV ovo postiže ciljajući male Rab GTPaze (slika 68) koje predstavljaju središnje elemente prometovanje molekula. U uvjetima kada je spriječen izlazak MHC-I molekula iz sekretornog puta uz pomoć djelovanja dobro poznatih imunoinvazivnih gena (m06 i m152) dolazi do ubrzanog njihova gubitka sa površine stanice.

MCMV osim što ima utjecaj na površinski izražaj GM1 i CD44 molekule ima utjecaj i na njihovu internalizaciju. Kinetike internalizacija obje ove molekule daleko su brže u inficiranim nego u neinficiranim stanicama (slike 29A i 29B) te pokazuju isti trend kao i kinetika internalizacije MHC-I molekula u neinficiranim tj. u inficiranim uvjetima.

Ipak, kako bi ispitali da li je razlika u kinetici internalizacije molekula sa stanične površine između neinficiranih i inficiranih stanica posljedica drugačijeg mehanizma njihove endocitoze, ispitali smo učinak različitih kemijskih inhibitora na njihovu endocitozu. Logično

je očekivati da će oni inhibitori koji blokiraju endocitozu ispitivane molekule proporcionalno smanjiti i njezinu internalizaciju.

Da bi ispitali da li se radi o klatrin-ovisnom endocitoznom putu, stanice smo tretirali s klorpromazinom, inhibitorom za kojeg je poznato da dovodeći do gubitka klatrina i AP-2 adaptorskog kompleksa sa stanične površine i do njihovog artificijelnog udruživanja unutar stanice uzrokuje blokadu endocitoze ovisne o klatrinu, te imipraminom.

Pod utjecajem klorpromazina i imipramina primjećuje se neznatno smanjenje internalizacije MHC-I molekula (slika 30), što bi potvrđivalo naše prethodne rezultate da je internalizacija MHC-I molekula neovisna o klatrinu. Vodeći se činjenicom da je za normalno odvijanje klatrin-ovsine endocitoze, uz klatrin nužno i prisustvo dinamina, ispitali smo i učinak *Dyanasore-a*, tvari koja specifično blokira dinamin GTPazu, na kinetiku internalizacije MHC-I molekula. Dynasore nije značajnije utjecao na internalizaciju MHC-I molekula pa smo zaključili da dinamin nije nužan za odvijanje internalizacije MHC-I molekula (slika 30). Kao kontrolu učinkovitosti klorpromazina i *Dyansore-a* u blokadi klatrin-ovisne endocitoze, njihovo djelovanje testirali smo na internalizaciji transferina, molekule za koju je poznato da neovisno o staničnoj liniji, klatrin-ovisnu endocitozu koristi kao osnovni put ulaska u stanicu. Važno je napomenuti da internalizacija Tf-a u dužim vremenskim periodima (120 minuta) nije bila onemogućena, te da je dio Tf-a ipak uspio ući u stanicu (nije prikazano). Razlog tome bi mogao biti u činjenici da se transferin prebacio na neki zamjenski endocitozni put ili inhibitor nije u potpunosti djelovao. Naime, u literaturi nije pokazano da ovaj inhibitor blokira internalizaciju transferina kroz dulji vremenski period. Iako rezultati dobiveni nakon djelovanja *Dynasore-a* pokazuju da je endocitoza MHC-I molekula neovisna o mehanizmu koji zahtjeva prisustvo dinamina, 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, te stoga osim kaveolarne može narušiti i druge vrste endocitoze koje ovise o prisustvu kolesterola, primjerice Cdc42 ovisan endocitozni put. Nadalje, filipin na klatrin-ovisnu endocitozu ne bi trebao imati učinka. Također smo stanice tretirali AlF_4^- koji je poznat kao aktivator Arf6 GTPaze), te je tijekom tretmana s AlF_4^- Arf6 GTPaza stalno aktivna (Arf6-GTP). Nakon tretiranja stanica filipinom (slika 30) i AlF_4^- (slika 30) dobili smo male promjene u stopi internalizacije MHC-I molekula. Iz svega ovoga možemo zaključiti da niti jedan od inhibitora nije značajnije djelovao na internalizaciju MHC-I molekula (statistički značajnost $p>0.05$). Moguće je da u infekciji dolazi do perturbiranja različitih endocitoznih putova te da virus iskorištava onaj koji mu nije

apsolutno ničim blokiran ili da virus jednostavno nekim svojim proteinima nadjačava djelovanje inhibitora.

Prema tome, možemo zaključiti da se MHC-I molekule internaliziraju brže u inficiranim nego u neinficiranim stanicama putem koji je neovisan o dinaminu i klatrinu. Nishodna regulacija MHC-I molekula sa površine inficirane stanice je proces 5-6 puta brži od konstitutivne internalizacije te je najvjerojatnije induciran virusnim proteinima.

Nakon endocitoze odnosno ulaska u stanicu, molekule prolaze kroz mnogobrojne unutarstanične odjeljke na putu do svog konačnog odredišta, koji predstavlja ili recikliranje preko recklirajućih odjeljaka ili degradaciju u lizosomima odnosno na proteasomima. 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.

Kako bi ispitali koji sve endosomalni odjeljci sudjeluju tijekom njihova unutarstaničnog putovanja, te da li MHC-I molekule koriste isti ili različiti put u neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama, kolokalizirali smo internalizirane molekule međusobno, te svaki alel MHC-I molekula sa biljezima određenih unutarstaničnih odjeljaka. Također smo pratili usporednu internalizaciju MHC-I molekula sa kontrolnim molekulama TfR (koji se usmjerava u recikliranje) i CTxB (koja se usmjerava u degradaciju).

U neinficiranim stanicama 60 i 120 minuta nakon internalizacije, MHC-I molekule se gotovo niti ne vide, a povećanjem vremena internalizacije iste se niti ne vide niti se nakupljaju unutar stanice (slika 31), što bi upućivalo na smanjenje stope internalizacije, na veliku stopu recikliranja ili na ubrzanu degradaciju. U inficiranim stanicama, 60 minuta nakon internalizacije MHC-I molekule se nalaze u mjehurićima koji su raspršeni po citoplazmi, a 120 minuta te pogotovo nakon 240 i 480 minuta internalizacije, većina se MHC-I molekula nakuplja u velikim mjehurićima jukstanuklearnog područja (slike 32A i 32B). Bitno je napomenuti da obrazac internaliziranih MHC-I molekula tijekom 240 minuta u inficiranim stanicama dosta podsjeća na sliku dobivenu u ustaljenom stanju već nakon 6 sati infekcije (slika 21). Nakupljanje unutar stanice može biti posljedica ili smanjenog recikliranja ili smanjene degradacije.

Kako bi potvrdili da li je ovakva distribucija molekula nakon internalizacije tipična samo za MHC-I molekule, pratili smo internalizaciju još nekih molekula izraženih na površini stanice. MCMV manipulira putovima ne samo MHC-I molekula već i putovima TfR, LAMP, CTxB, CD44 i albumina (slika 33). Bez obzira o kojoj internaliziranoj molekuli se radi, sve se one nakupljaju u jukstanuklearnom području inficirane stanice (slika 33).

Da bi bili sigurni da se ove molekule nakupljaju u istom odjeljku kao i internalizirane MHC-I molekule, pratili smo usporednu internalizaciju MHC-I molekula sa TfR ili CTxB. Kaveolarnim putem u stanicu ulazi CTxB. Praćenjem njene usporedne internalizacije sa MHC-I molekulama, vidimo da se one tijekom cijelog perioda internalizacije kolokaliziraju (slike 38 i 39), što znači da u MCMV-inficiranim stanicama dolazi do preklapanja različitih endocitoznih putova.

Budući da obrazac unutarstaničnog izražaja MHC-I molekula nakon internalizacije podsjeća na obrazac transferina/transferinskog receptora (slika 33) kolokalizirali smo MHC-I molekule s transferinskim receptorom tijekom njihove usporedne internalizacije (slike 35 i 36). Bez obzira o kojem alelu MHC-I molekula se radi, MHC-I molekule se kolokaliziraju sa TfR tijekom cijelog perioda internalizacije (slike 35 i 36), što bi značilo da MHC-I molekule nakon internalizacije slijede put sličan onome Tf-a odnosno TfR-a. Ako one slijedi isti odnosno sličan put velika je vjerojatnost da dolazi do promjena i u prometovanju Tf-a u inficiranim stanicama u odnosu na neinficirane stanice. Tf uistinu smanjeno ulazi u inficiranu stanicu s obzirom da je njegovo jukstanuklearno nakupljanje uočljivo tek nakon 60 minuta internalizacije naspram 15 minuta internalizacije u neinficiranim stanicama (slika 37A). Iz toga smo zaključili da je u MCMV-inficiranim stanicama klatrin-ovisna endocitoza smanjena (slika 37 B). Tijekom cijelog perioda internalizacije oba alela MHC-I molekula kolokaliziraju se sa biljezima ranih endosoma, EEA-1 i ustaljenim stanjem TfR-a (slike 40 i 41), što bi moglo upućivati na njihovo otežano ili onemogućeno otpuštanje ranih endosomalnih membrana. Molekule se potom usmjeravaju prema Golgijevom području. Baš kao i novo-sintetizirane MHC-I molekule tako se i internalizirane MHC-I molekule kolokaliziraju sa GM130, markerom Golgijeve mreže (slike 42A i 42B). Mjehurići koji se zadržavaju isprepleteni su sa Golgijevom mrežom, i za razliku od Golgija koji se raspršri nakon BFA tretmana (slika 43, BFA), imaju tendenciju spajanja u pericentriolarnom području te pokazuju tubulaciju, što su zapravo karakteristike pericentriolarnih reciklirajućih endosomalnih membrana. BFA uzrokuje tubulaciju endosomalnih reciklirajućih, ali ne i EEA-1 sortirajućih domena. Nakon tretiranja stanica sa Kon A (slika 43, Kon A) ili sa LY294002 (slika 43, LY294002) dolazi do tubulacije MHC-I^+ jukstanuklearnog odjeljka. Stoga, s obzirom na efekt BFA i LY na odjeljak u kojem se zadržavaju internalizirane molekule, možemo zaključiti u kojoj se domeni MHC-I kompleksi zadržavaju. Kon A, specifični inhibitor V-ATPaze, interferira sa putovanjem molekula u sekretornom i endocitoznom putu te dovodi do nakupljanja molekula iz oba puta u Kon A-induciranim mjehurićastim agregatima. Kon A također može interferirati sa stvaranjem BFA ovisnog odjeljka. Možemo zaključiti da MCMV

ne samo da oponaša učinak BFA kao što je spomenuto prije, već oponaša i učinak Kon A. Također, odjeljak u kojem se zadržavaju internalizirane molekule povezan je sa mikrotubulima, s obzirom da smo tretiranjem stanica nokodazolom raspršili kako Golgijevu mrežu tako i mjehuriće sa MHC-I molekulama (slika 43, nokodazol).

Internalizirane molekule se iz Golgijevog područja u neinficiranim stanicama usmjeravaju u kasne endosomalne odjeljke, koji su LBPA i GM1 pozitivni. U inficiranim stanicama, nakon 60 ili 120 minuta internalizacije MHC-I molekule ne ulaze u $LBPA^+$ ili $GM1^+$ odjeljke (slike 44, 45, 46 i 47). Tek nakon 240 odnosno nakon 480 minuta internalizacije, mogu se naći neke MHC-I molekule koje se kolokaliziraju sa LBPA (slike 44 i 45), što bi sugeriralo da MHC-I molekule mogu ući u put degradacije, no njihov ulazak u taj put je usporen odnosno odgođen. Internalizirane MHC-I molekule parcijalno se kolokaliziraju i sa LAMP biljegom pokazujući najveći stupanj kolokalizacije u perinuklearnom dijelu (slike 48 i 49), što ukazuje da internalizirane MHC-I molekule imaju sposobnost dosezanja graničnih vanjskih membrana kasnih endosoma odnosno lizosoma. Razlog slabom detektiranju MHC-I molekula u kasnim endosomalnim odjeljcima može biti uvjetovan činjenicom da se MHC-I molekule nakon što dođu u te odjeljke u njima vrlo brzo razgrađuju.

Prema tome, možemo zaključiti da MCMV usmjerava MHC-I molekule nakon internalizacije sa površine stanice, u odjeljak u kojem ih i nakuplja. Internalizirane MHC-I molekule nalaze se u mjehurićima koji ne mogu otpustiti EEA-1 odnosno rane endosomalne membrane, što bi bio jedan od razloga njihovog odgođenog ulaska u endolizosomalni put u proces degradacije (parcijalna kolokalizacija sa LBPA i LAMP-om).

S obzirom da se zna da je konačna sudbina molekule nakon internalizacije ili recikliranje i/ili degradacija, u ovom radu istraživano je i recikliranje molekula. Dok brzinu endocitoze MHC-I molekula teško možemo odrediti, recikliranje možemo dosta pouzdano mjeriti. Recikliranje MHC-I molekula omogućeno je i u neinficiranim i u inficiranim uvjetima, sa razlikom što je recikliranje puno jače izraženo u neinficiranim stanicama. Nakon 1 sata internalizacije 20% molekula izreciklira u neinficiranim, a svega 7% u inficiranim stanicama (slika 53). Produljeno vrijeme trajanja internalizacije nije povisilo efikasnost recikliranja (slika 53), već su se molekule počele nakupljati u stanici (slika 32). Sposobnost i kapacitet recikliranja očito je određen komponentama reciklirajućeg aparata, a ne količinom pristiglih molekula.

S obzirom da su najbolje istražena recikliranja Tf-a i TfR-a mi smo ih uključili u naše istraživanje. Poznato je da Tf prolazi kroz rane endosome na svom putu prema jukstanuklearnom reciklirajućem odjeljku (JNRC). Izražaj Tf-a i TfR-a na površini kako neinficirane tako i inficirane stanice nismo uspjeli detektirati metodom protočne citometrije.

Uzrok tome može biti u činjenici da se Tf i TfR nalaze na površini stanice u malenim mjehurićastim uvrnućima membrane te da je njihov signal izrazito raspršen na površini stanice. Kako bi bolje vizualizirali internalizirani Tf, molekule smo internalizirali uz kontinuirano prisustvo mPt u mediju. 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 onemogućuje njegovu detekciju 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.

Recikliranje Tf-a praćeno je metodom njegovog gubitka iz stanice prema protokolu recikliranja A. Tf smo internalizirali tijekom 30 minuta, potom smo uklonili višak Tf-a sa površine stanice i pratili njegovo recikliranje kao gubitak signala iz stanice. Tf vrlo brzo izgubi iz neinficirane stanice ($t_{1/2}$~ 10 minuta), dok je njegov gubitak iz inficirane stanice usporen ($t_{1/2}$~ 45 minuta) (slika 54). To ukazuje da je kapacitet recikliranja smanjen za sve molekule te da nije specifičan samo za MHC-I molekule.

Ako MHC-I molekule nakon internalizacije ostaju u istom putu kao Tf i TfR te poput njih zadržavaju sposobnost recikliranja, za očekivati je onda da recikliraju iz istih domena kao Tf i TfR te da se njihovi putovi recikliranja preklapaju. Uistinu bez obzira na vrijeme trajanja recikliranja ove se molekule cijelo vrijeme kolokaliziraju (slika 55).

Obzirom da se molekule nakon internalizacije nakupljaju u tzv. retencijskom odjeljku te iz njega mogu reciklirati na 37 °C, promatrali smo učinak kemijskih inhibitora i promjene temperature na recikliranje iz odjeljka. Iz ovog odjeljka moguće je recikliranje na 16 °C (slika 56), što je karakteristika jukstanuklearnog reciklirajućeg odjeljka, a ne ranih endosoma. Međutim kako je postotak molekula koje su reciklirale na 16 °C najviše 10% to upućuje da ipak veći dio odjeljka sadrži membrane ranih endosoma. Kako se produljivanjem vremena recikliranja na 16 °C odjeljak nije uspio isprazniti od nakupljenih internaliziranih molekula (slika 57), dodatno smo potvrdili tezu da je većina membrana uistinu ranog endosomalnog porijekla. Recikliranje se također odvija i nakon inhibiranja aktivnosti PI3K tretiranjem stanica inhibitorom LY294002, dakle u uvjetima kada je onemogućeno recikliranje iz ranih endosoma, što dokazuje da jedan dio membrana u odjeljku ima karakteristike reciklirajućih jukstanuklearnih membrana (slika 60). Recikliranje iz odjeljka jedino je u potpunosti bilo moguće inhibirati sinergističkim djelovanjem BFA, koji inhibira recikliranje iz jukstanuklearnog reciklirajućeg odjeljka i temperature od 16 °C s obzirom da su oba puta recikliranja tada bila onemogućena (slika 59).

Dakle, u neinficiranim fibroblastima većina endocitiranih MHC-I molekula reciklira natrag na staničnu površinu u različitim stadijima ranog endosomalnog sazrijevanja, uključujući i njihov ulazak u jukstanuklearni tubulovezikularni reciklirajući odjeljak, zajedno sa internaliziranim Tf-om. U MCMV-inficiranim fibroblastima MHC-I molekule se zadržavaju u $EEA1^+$ sortirajućim endosomima te imaju smanjen kapacitet recikliranja. Smanjena razina Rab11 (slika 69) u MCMV-inficiranim stanicama može dovesti do odgođenog formiranja reciklirajućih domena te može objasniti zadržavanje internaliziranih MHC-I molekula u perinuklearnim sortirajućim endosomima.

Prema tome, možemo zaključiti da je u MCMV-inficiranim stanicama recikliranje moguće, ali je smanjen kapacitet recikliranja. Iz odjeljka u kojem se nakupljaju mnogobrojne internalizirane molekule moguće je recikliranje. Retencijski odjeljak sadrži većinom membrane ranih endosoma s obzirom da samo mali dio molekula može reciklirati pri 16 °C i uz prisustvo LY294002, što su karakteristike jukstanuklearnog reciklirajućeg odjeljka. Najvjerojatniji uzrok promjene recikliranja u MCMV-inficiranim stanicama je smanjenje ukupne količine Rab11 molekule te smanjenje mogućnosti stvaranja reciklirajućh membranskih domena.

Ipak, naši rezultati upućuju na činjenicu da su događaji koji slijede neposredno nakon endocitoze, a ovise o formiranju pojedinih membranskih domena, pogođeni u MCMV-inficiranim stanicama. Putovanje Tf-a prema jukstanuklearnoj lokalizaciji kao i recikliranje inhibirano je, a TfR/Tf se zadržavaju u istim perinuklearnim mjehurićima kao i MHC-I molekule (slika 52). CTxB se također akumulira u istom odjeljku (slika 52) te može biti preusmjerena u reciklirajući put, iako CTxB normalno ne reciklira u neinficiranim stanicama (207). Dio internaliziranih CD44 molekula, za koje se zna da u neinficiranim stanicama zaobilaze $EEA1^+$ endosome i direktno se usmjeravaju u reciklirajuće tubule (209), kao i albumin, koji ulazi u stanicu fluid fazom, preusmjeravaju se u zadržavajući odjeljak (retention compartment).

Dakle, u odjeljak nakupljanja dolazi i internalizirana CTxB koja putuje normalno prema Golgiju (slika 38 i 39), kao i internalizirani LAMP, protein kasnih endosoma koji putuje prema njima, što upućuje na njihovu lokalizaciju na kraju Golgi-endolizosomalnog puta. Zakašnjeli dolazak LAMP-a u kasne endosome i odgođena degradacija MHC-I molekula upućuju na smanjenu stopu protoka membrana od zadržavajućih mjehurića prema kasnim endosomima (slika 63). Osim što je poremećena degradacija MHC-I molekula, poremećena je i degradacija molekula koje su za nju predodređene. Degradacija molekula, CTxB (slika 64) koja ulazi u stanicu kaveolarnim putem i EGF-a (slika 65) koji ulazi u stanicu klatrin-ovisnim

putem znatno je sporija odnosno smanjena u inficiranim stanicama u odnosu na neinficirane stanice.

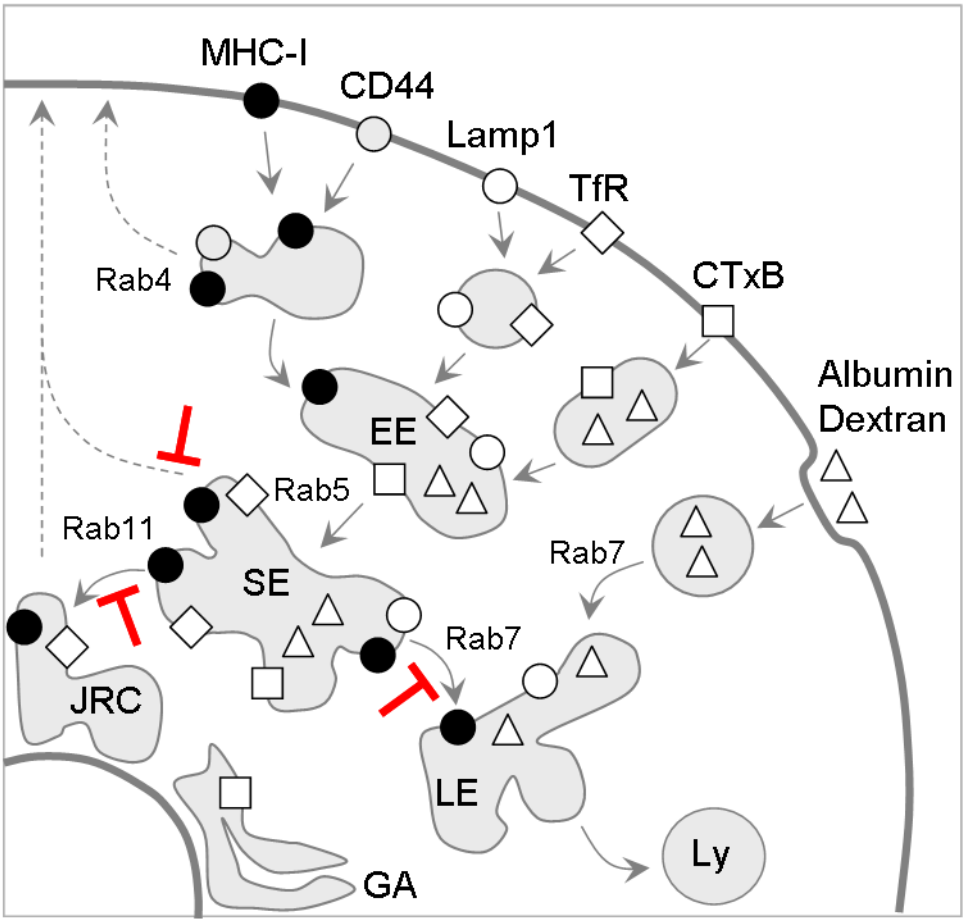
Naši rezultati ukazuju da MCMV infekcija remodelira endocitozno putovanje u različitim stadijima ranog endosomalnog puta. Najznačajnije remodeliranje izraženo je u vidu stvaranja perinuklearne zadržavajuće strukture (engl. perinuclear retention compartment; PRC).

PRC ima karakteristike sortirajućih ranih endosoma u njihovoj završnom stadiju sazrijevanja: lokalizacija, mjehurićasti izgled, povezanost sa EEA1, dostupnost molekulama koje se endocitiraju sa stanične membrane za koje se zna da ulaze u sortirajuće endosome (TfR, Tf, CTxB, LAMP), povezanost sa mikrotubulima i sklonost tubulaciji nakon BFA i Ly294002 tretmana. Perinuklearni zadržavajući odjeljak (PRC) predstavlja srednji stadij u sazrijevanju ranih endosoma tj. stadij remodeliranja njihovih endosomalnih $EEA1^{+}Rab5^{+}$ membrana u reciklirajuće i endolizosomalne domene proces za koji je potrebna Rab pretvorba. Vidjeli smo da je pretvorba Rab molekula u reciklirajuće domene i nastajanje Rab11 molekule izrazito smanjeno (slika 69 i 70) što za posljedicu ima smanjenje recikliranja. Molekule koje su predodređene za degradaciju putuju sa periferije prema centru stanice gdje se i događa zamjena Rab5 sa Rab7 molekulom. Zamjena Rab5 sa Rab7 odvija se u tzv. konvertirajućem endosomu. Samo neke Rab5 molekule mogu biti izuzete iz ove zamjene. Mjehurići sa internaliziranim molekulama tijekom cijelog perioda internalizacije su $EEA1^{+}$, a vjerojatan razlog je u činjenici da oni ne mogu otpustiti rane endosomalne membrane zbog smanjenje pretvorbe Rab5 u Rab7. Naše istraživanje je pokazalo da u MCMV-inficiranim stanicama razina Rab7 je izrazito niska, gotovo da se ne može detektirati 24 sata nakon infekcije (slika 70). S druge strane, razina Rab5 pokazuje tendenciju pada u inficiranim stanicama, ali puno sporijom kinetikom, tako da je nakon 24 sata infekcije razina Rab5 oko 40% (slika 70). Poremećaj u zamjeni Rab5 u Rab7 može biti razlog odgođenog odvođenja molekula u degradaciju s obzirom da glavnu ulogu u tom procesu ima Rab7 kojeg u inficiranim stanicama ima vrlo malo. Internalizirane molekule ne mogu niti otpustiti rane endosomalne mebrane jer su one najvjerojatnije cijelo vrijeme $Rab5^{+}$. U MCMV-inficiranim stanicama mjehurići koji su $EEA1^{+}$ putuju prema staničnom centru, ali u konačnici oni taj EEA1 ne mogu izgubiti jer ne dolazi do pretvorbe Rab5 u Rab7 te je formiranje endolizosomalnih domena odgođeno (arrested).

Konvertirajući endosom je dostupan i za male količine internaliziranog TfR-a, ali recikliranje iz ovog odjeljka je nemoguće (88). Stoga molekule koje stignu u konvertirajući endosom ne mogu iz njega izaći recikliranjem. Odjeljak u kojem se nakupljaju internalizirane molekule u inficiranim stanicama vrlo je sličan konvertirajućem odjeljku, jedina razlika je u recikliranju.

Molekule koje su se internalizirale i zadržale u odjeljku nakupljanja zadržavaju sposobnost recikliranja, ali je ona smanjena. MCMV najvjerojatnije posjeduje sposobnost da uspori stvaranje konvertirajućeg endosoma i na taj način dodatno odgodi degradaciju molekula.

Prema tome, možemo zaključiti da je put degradacije za mnoge molekule pogođen u MCMV-inficiranim stanicama, neovisno o njihovu putu ulaska u stanicu, te je otežano formiranje endolizosomalnih mebrana. U MCMV-inficiranim stanicama dolazi do promjena u izražavanju pojedinih Rab molekula. Razina Rab5 u inficiranim stanicama ne smanjuje se poput ostalih Rab molekula, te dolazi do otežane pretvorbe Rab5 u Rab7, kao i do smanjenja razine Rab7 u inficiranim stanicama, što za posljedicu ima odgođeno odvođenje molekula u put degradacije.



Slika 79. Sumarni prikaz glavnih endocitoznih putova i mjesta unutar stanice koja su pogođena MCMV infekcijom.

Molekule koje su izražene na površini stanice mogu se konstitutivno internaliziratii klatrin-neovisnim putem (MHC-I molekule i CD44), klatrin-ovisnim putem (TfR i LAMP), kaveolarnim putem (CTxB) ili fluid-faznim putem (albumin i dekstran). Internalizirane molekule nakupljaju se u različitim endocitoznim mjehurićima prije nego se spoje sa $EEA1^+$ ranim endosomima (EE). CD44 se usmjerava u tubularni reciklirajući odjeljak prije spajanja sa $EEA1^+$ ranim endosomima, a fluid-fazne molekule se usmjeravaju u kasne endosome (LE). EE sazrijevaju u sortirajuće endosome (SE) u kojima Rab pretvorba dovodi do sazrijavanja membranskih domena: Rab5→Rab11 stvara reciklirajuće domene, Rab5→Rab9 stvara endocitozne nosače koji se usmjeravaju prema Golgijevu aparatu (GA) i Rab5→Rab7 stvara endolizosomalne domene koji naknadno sazrijevaju u LE. Recikliranje (označeno isprekidanim strelicama) je omogućeno iz ranih odjeljaka u konstitutivnom putu, iz SE te iz jukstanuklearnog reciklirajućeg odjeljka (engl. juxtanuclear recycling compartment; JRC). MCMV, smanjujući razinu Rab molekula, reorganizira endosomalno putovanje dovodeći do jukstanuklearnog nakupljanja MHC-I molekula zajedno sa drugim molekulama u jukstanuklearnom odjeljku nakupljanja koji sporo sazrijeva u JRC ili u LE.

U MCMV-inficiranim stanicama dolazi do nishodne regulacije MHC-I molekula sa svrhom izbjegavanja imunološkog odgovora domaćina te do promjenama u njihovom endocitoznom putu. Mnogobrojni geni do sada su bili istraživani u svrhu otkrivanja onih gena koji su odgovorni za smanjenje izražaja MHC-I molekula na površini stanice. S obzirom da je poznato da se izražavanje MCMV gena može podijeliti u IE, E i L razdoblje, djelovanjem različitih tvari virusna se replikacija može ograničiti na pojedino razdoblje.

Jedino inficiranjem stanica mutantom Δie3-MCMV-a nije se uspjelo izazvati nishodnu regulaciju MHC-I molekula već naprotiv, došlo je do ushodne regulacije MHC-I molekula (slika 71, Δie3-MCMV). Rezultat sugerira da je nishodna regulacija MHC-I molekula pod ingerencijom ie3 gena ili E gena koji su pod kontrolom ie3 gena. Ova opažanja su u skladu sa onima opisanim u literaturi da su upravo E geni dogovorni za nishodnu regulaciju MHC-I molekula (145).Također, u istim stanicama ne dolazi niti do jukstanukleranog nakupljanja internaliziranih MHC-I molekula (slika 74, Δie3-MCMV).

Selektivni izražaj E gena postiže se primjenom protokola koji je do sada opisan u mnogim studijama prvenstveno u cilju karakterizacije ranog razdoblja infekcije MCMV (181). Protokol je bolje prilagođen virusima koji imaju kraći ciklus replikacije poput MCMV-a za razliku od humanog CMV-a koji ima dulji ciklus replikacije. Dakle, dobro je poznato da 3 sata djelovanja CHX-a koju slijedi 3-4 sata djelovanja Act D dovodi do pojačanog izražavanja IE gena. Nakon uklanjanja CHX-a, sinteza IE proteina aktivira transkripciju E gena sve do trenutka dodavanja Act D i blokiranja transkripcije. Ovaj "prozor" transkripcije ranih gena omogućuje selektivni izražaj ranih gena. U uvjetima pojačanog izražavanje samo IE gena nije došlo do nishodne regulacije MHC-I molekula sa površine stanice (slika 72). U slučaju kada je dozvoljeno izražavanja IE i E gena izražaj MHC-I molekula na površini stanice značajno se smanjio u ovisnosti koliko dugo je bila omogućena transkripcija E gena (slika 72). Iz toga zaključujemo da su E geni odgovorni za nishodnu regulaciju MHC-I molekula. Replikacija virusne DNA događa se u kasnom razdoblju u vrijeme kada se izražavaju L geni. Ekperiment u kojem smo stanice tretirali foskarnetom i njime inhibirali replikaciju virusne DNA, pokazuju da inhibicija replikacije virusne DNA nema nikakvog učinka na kinetiku nishodne regulacije MHC-I molekula te da mehanizam odgovoran za nishodnu regulaciju ne zahtijeva izražavanje L gena (slika 73). Sve u svemu, vjerujemo da su navedeni pokusi jasno opisali doprinos MCMV-a IE i E gena u pojavi relativno brze nishodne regulacije MHC-I molekula sa površine inficirane stanice.

Prema tome, možemo zaključiti da su za nishodnu regulaciju MHC-I molekula sa površine inficirane stanice odgovorni prvenstveno E geni odnosno oni geni koji su pod kontrolom ie3 gena.

m06 gen koji kodira gp48 protein najučinkovitiji je regulatorni mehanizam izražaja MHC-I molekula na površini MCMV-inficirane stanice (76). Poznato je da postoje dvije populacije gp48 proteina. Kompleksi gp48 i novo-sintetiziranih MHC-I molekula koji se transportiraju u lizosome u proces degradacije i nevezani gp48 koji se degradira na citolitičkim proteasomima (180). S obzirom da MCMV odvodi u degradaciju i one MHC-I molekule koje su se internalizirale sa površine stanice, moguće je da je njihovo usmjeravanje u degradacijski proces pod utjecajem m06/gp48. m06/gp48 nalazi se u Golgijevom području na MEF MCMV inficiranim stanicama (slika 76A, GS28), što je dodatno potvrđeno njegovom kolokalizacijom sa biljegom Golgijeve mreže na NIH3T3m06 transficiranim stanicama (slika 76B). Kako internalizirane MHC-I molekule dolaze u ovo područje logično je bilo za očekivati da će se barem djelomično kolokalizirati sa m06/gp48. MHC-I molekule se tijekom cijelog perioda inetrnalizacije kolokaliziraju sa m06/gp48 (slika 77A), baš kao i internalizirani TfR, CTxB ili LAMP molekula (slika 77B). Pretpostavka je da do povezivanje m06/gp48 i internaliziranih molekula dolazi unutar stanice s obzirom da nismo uspjeli detektirati m06/gp48 na površini stanice. Stanice koje su inficirane Δm06-MCMV pokazuju znatno sporiju degradaciju te se otprilike 50% manje MHC-I molekula u njima degradira ako usporedimo ovu degradaciju sa degradacijom u MCMV w.t. inficiranim stanicama (slika 78).

Prema tome, možemo zaključiti da je najvjerojatnije m06/gp48 protein odgovoran za usmjeravanje kako novo-sintetiziranih tako i internaliziranih MHC-I molekula u proces degradacije. Učinak nije specifičan s obzirom da se m06/gp48 kolokalizira i sa internaliziranim TfR, CTxB i LAMP molekulom.

Nedavno je izviješteno da kontinuirana aktivacije protein kinaze C (PKC) dovodi do formiranja endosomalnog odjeljka u jukstanuklearnom području, nazvanog pericentrion, koji ima funkciju odvajanja membranskih reciklirajućih komponenti, ali ne i komponenti i biljega endolizosomalnog puta. Iako, perinuklearni endosomalni odjeljak koji se stvara u inficiranim stanicama ima sličnosti sa pericentrionom, u njemu se sekvestriraju molekule koje putuju prema kasnim endosomima (EGF, LAMP i albumin). Inhibitori PKC nisu doveli do raspršivanja zadržavajućeg odjeljka (nije prikazano). Iako je PKC esencijalna za rano razdoblje replikacije MCMV i može se aktivirati tijekom infekcije herpesvirusima, mala je

vjerojatnost da je remodeliranje ranog endosomalnog puta u inficiranim stanicama posljedica konstantne aktivacije PKC.

Slični učinci na promjene u putovanju MHC-I molekula opisane su i za Nef, rani gen virusa HIV-a, koji smanjuje izražaj MHC-I molekula na površini stanice povećavajući stopu njihove internalizacije (160). Za postizanje nishodne regulacije MHC-I molekula, Nef ne koristi klatrin-ovisnu endocitozu, već povećava internalizaciju MHC-I molekula klatrin-neovisnim Arf6-ovisnim putem koje potom nakuplja u perinuklearnom području koje se preklapa sa membranama trans-Golgijevog područja. Ipak, čini se da Nef ne ulazi u direktnu interakciju sa Arf6 molekulama već nespecifično perturbira rutu koju koriste MHC-I molekule, uključujući i promjenu u morfologiji i funkciji endosomalnog reciklirajućeg odjeljka (210).

Interferiranje MCMV-a sa endocitoznim putovanjem MHC-I molekula može se shvatiti kao oblik njegova preživljavanja unutar stanice odnosno unutar kasnih endosoma. Zadržavajući MHC-I molekule koje su došle sa površine stanice, MCMV može spriječiti ne samo izlazak novo-sintetiziranih MHC-I molekula koje su povezana sa virusnim peptidima na površinu stanice već i punjenje peptidom u egzogenom putu.

Izmjena peptida događa se u kasnim endosomima i MHC-I molekule napunjene virusnim peptidima mogu biti prezentirane na površini stanice procesom egzocitoze. Stoga je vrlo važno da MCMV sprječava progresiju MHC-I molekula iz ranih endosoma u kasne endosome. Ovo se može postići zadržavanjem MHC-I molekula unutar stanice bez direktne interakcije virusnih proteina sa MHC-I molekulama. Zajedno sa blokiranjem izlaska MHC-I molekula iz sekretornog puta, ovo je najvjerojatniji način razoružavanja antigenske prezentacije odnosno imunološkog sustava.

Svi rezultati sugeriraju, da se upečatljiv učinak MCMV-a na izražaj MHC-I molekula na površini stanice odvija u ranom razdoblju infekcije, odnosno da već vrlo rano u infekciji dolazi do endosomalnog remodeliranja. Vrlo je odvažno spekulirati da se remodeliranje događa u svrhu evolucije MCMV morfogeneze te da se remodeliranje staničnih funkcija događa mnogo prije replikacije virusne DNA. Ovo je potkrijepljeno nedavnim opažanjima da reciklirajući endosomalni odjeljak ima ulogu u razvoju humanog CMV-a (211). Razumijevanjem morfogeneze zadržavajućeg odjeljka možemo dobiti uvid u najranije događaje koji sudjeluju u njegovom stvaranju. Također, razumijevanje mehanizama kojima se u tzv. retencijskom odjeljku zadržavaju molekule koje u stanicu ulaze klatrin-ovisnim ili klatrin-neovisnim putem može doprinijeti razumijevanju molekularnih i mehanističkih događaja koji imaju vodeću ulogu u endosomalnom sazrijevanju i formiranju kako reciklirajućih tako i kasnih endosoma. Ovi mehanizmi nisu još dovoljno istraženi, a

istraživanje virusa može nam omogućiti da nam sam MCMV pokaže osnovne principe koji pokreću endosomalno sazrijevanje u normalnoj neinficiranoj stanici.

6. ZAKLJUČCI

1. Obrazac izražaja MHC-I molekula kako na površini tako i u unutrašnjosti stanice mijenja se u uvjetima MCMV infekcije. MHC-I molekule se nishodno reguliraju sa površine inficirane stanice procesom koji nije specifičan samo za MHC-I molekule. MHC-I molekule se potom nakupljaju u hibridnom odjeljku koji je pozitivan na mnogobrojne biljege unutarstaničnih endosoma.
2. MHC-I molekule internaliziraju se brže u inficiranim nego u neinficiranim stanicama putem koji je neovisan o dinaminu i klatrinu. Nishodna regulacija MHC-I molekula sa površine inficirane stanice je proces 5-6 puta brži od konstitutivne internalizacije te je najvjerojatnije induciran virusnim proteinima.
3. MCMV usmjerava MHC-I molekule nakon internalizacije sa površine stanice, u odjeljak u kojem ih i nakuplja. Internalizirane MHC-I molekule nalaze se u mjehurićima koji ne mogu otpustiti EEA-1 odnosno rane endosomalne membrane, što bi bio jedan od razloga njihovog odgođenog ulaska u endolizosomalni put u proces degradacije.
4. Iz odjeljka koji se formira u MCMV-inficiranim stanica u kojem se nakupljaju mnogobrojne internalizirane molekule moguće je recikliranje, ali je kapacitet recikliranja smanjen. Retencijski odjeljak sadrži većinom membrane ranih endosoma s obzirom da samo mali dio molekula može reciklirati pri 16 °C i uz prisustvo LY294002, što su karakteristike jukstanuklearnog reciklirajućeg odjeljka. Najvjerojatniji uzrok promjene recikliranja u MCMV-inficiranim stanicama je smanjenje ukupne količine Rab11 molekule te smanjenje mogućnosti stvaranja reciklirajuć membranskih domena.
5. Put degradacije za mnoge je molekule pogođen u MCMV-inficiranim stanicama neovisno o njihovu putu ulaska u stanicu te je otežano formiranje endolizosomalnih mebrana. U MCMV-inficiranim stanicama dolazi do promjena u izražavanju pojedinih Rab molekula. Razina Rab5 u inficiranim stanicama ne smanjuje se poput ostalih Rab molekula, te dolazi do otežane pretvorbe Rab5 u Rab7, kao i do smanjenja razine Rab7 u inficiranim stanicama, što za posljedicu ima odgođeno odvođenje molekula u put degradacije.
6. Za nishodnu regulaciju MHC-I molekula sa površine inficirane stanice odgovorni su prvenstveno E geni odnosno oni geni koji su pod kontrolom ie3 gena.

7. m06/gp48 protein odgovoran je za usmjeravanje kako novo-sintetiziranih tako i internaliziranih MHC-I molekula u proces degradacije. Učinak nije specifičan s obzirom da se m06/gp48 kolokalizira i sa internaliziranim TfR, CTxB i LAMP molekulom.

7. LITERATURA

1. Bishop NE. Dynamics of endosomal sorting. Int Rev Cytol 2003;232:1-57.
2. Swanson JA. Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. J Cell Sci 1989;94:135-42.
3. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. Nature 2003;422:37-44. Review.
4. Racoosin EL, Swanson JA. Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. Cell Biol 1993;121:1011-20.
5. Swanson JA, Watts C. Macropinocytosis. Trends Cell Biol 1995;5:424-8.
6. Gong Q, Huntsman C, Ma D. Clathrin-independent internalization and recycling. J Cell Mol Med 2008;12:126-44.
7. Owen DJ, Collins BM, Evans PR. Adaptors for clathrin coats: structure and function. Annu Rev Cell Dev Biol 2004;20:153-91. Review.
8. 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.
9. Cavalli V, Corti M, Gruenberg J. Endocytosis and signaling cascades: a close encounter. FEBS Lett 2001;498:190-6.
10. Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:185-94. Review.
11. Pfeffer S. Caveolae on the move. Nat Cell Biol 2001;3:108-10.
12. Sandvig K, van Deurs B. Transport of protein toxins into cell: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. FEBS Lett 2002;529:49-53.
13. 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.
14. 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.
15. Pelkmans L, Puntener D, Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. Science 2002;296:535-39.

16. Norkin LC. Simian virus 40 infection via MHC class I molecules and caveolae. Immunol Rev 1999;168:13-22. Review.
17. Nichols BJ. A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. Nat Cell Biol 2002;4:374-8.
18. Kurzchalia TV, Parton RG. Membrane microdomains and caveolae. Curr Opin Cell Biol 1999;11:424-31. Review.
19. Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. Dynamin-mediated internalization of caveolae. J Cell Biol 1998;141:85-99.
20. 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.
21. Spangler BD. Structure and function of the cholera toxin and the related Escherichia coli heat-labile enterotoxin. J Histochem Cytochem 1999;47:1005-14
22. Harder T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K. Domain Structure of the Plasma Membrane Revealed by Patching of Membrane Components. J Cell Biol 1998;141:929-42.
23. Spiegel S, Kassis S, Wilchek M, Fishman PH. Direct visualization of redistribution and capping of fluorescent gangliosides on lymphocytes. J Cell Biol 1984; 99:1575-81.
24. Ellis S, Mellor H. Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases. Trends Cell Biol 2000;10:85-8. Review.
25. 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.
26. Senda T, Horiguchi Y, Umemoto M, Sugimoto N, Matsuda M. Bordetella bronchiseptica dermonecrotizing toxin, which activates a small GTP-binding protein rho, induces membrane organelle proliferation and caveolae formation. Exp Cell Res 1997;230:163-8.
27. Sauvonnet N, Dujeancourt A, Dautry-Varsat A. Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammac cytokine receptor. J Cell Biol 2005;168:155-63.

28. Fattakhova G, Masilamani M, Borrego F, Gilfillan AM, Metcalfe DD, Coligan JE. The high-affinity immunoglobulin-E receptor (FcepsilonRI) is endocytosed by an AP-2/clathrin-independent, dynamin-dependent mechanism. Traffic 2006;7:673-85.
29. Kirkham M, Parton RG. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. Biochim Biophys Acta 2005;1746:349-63. Review.
30. 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.
31. 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;4:411-23.
32. Damm EM, Pelkmans L, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Kurzchalia T, Helenius A. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. J Cell Biol 2005;168:477–88.
33. Kirkham M, Fujita A, Chadda R I sur. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. J Cell Biol 2005;168:465-76.
34. 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.
35. Donaldson JG. Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. J Biol Chem 2003;278:41573-6. Review.
36. D'Souza-Schorey C, Chavrier P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:347-58. Review.
37. Damke H, Baba T, van der Bliek AM, Schmid SL. Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. J Cell Biol 1995;131:69-80.
38. Cousin MA. Activity-dependent bulk synaptic vesicle endocytosis - a fast, high capacity membrane retrieval mechanism. Mol Neurobiol 2009;39:185-9. Review.
39. Clayton EL, Anggono V, Smillie KJ, Chau N, Robinson PJ, Cousin MA. The phospho-dependent dynamin-syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. J Neurosci 2009;29:7706-17.

40. Naslavsky N, Weigert R, Donaldson JG. Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. Mol Biol Cell 2004;15:3542-52.
41. 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.
42. Oda T, Wu HC. Cerulenin inhibits the cytotoxicity of ricin, modeccin, Pseudomonas toxin, and diphtheria toxin in brefeldin A-resistant cell lines. J Biol Chem 1993;268:12596-602.
43. Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. J Cell Biol 1993;123:1107-17.
44. Seaman MN, Ball CL, Robinson MS. Targeting and mistargeting of plasma membrane adaptors in vitro. J Cell Biol 1993;123:1093-105.
45. 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.
46. Heuser JE, Anderson RG. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. J Cell Biol 1989;108:389-400.
47. Ireton K, Payrastre B, Chap H i sur. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. Science 1996;274:780-2.
48. 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.
49. Neufeld EB, Cooney AD, Pitha J, Dawidowicz EA, Dwyer NK. Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ. Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. J Biol Chem 1996;271:21604-13.
50. van Deurs B, von Bulow F, Vilhardt F, Holm PK, Sandvig K. Destabilization of plasma membrane structure by prevention of actin polymerization. Microtubule-dependent tubulation of the plasma membrane. J Cell Sci 1996;109:1655-65.
51. Pelkmans L, Helenius A. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. Curr Opin Cell Biol 2003;15:414-22. Review.

52. 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.
53. Bock JB, Matern HT, Peden AA, Scheller RH. A genomic perspective on membrane compartment organization. Nature 2001;409:839-41.
54. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. Nat Rev Mol Cell Biol 2001;2:107-17. Review.
55. Stenmark H, Olkkonen VM. The Rab GTPase family. Genome Biol 2001;2:REVIEWS3007.
56. Alexandrov K, Horiuchi H, Steele-Mortimer O, Seabra MC, Zerial M. Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. EMBO J 1994;13:5262-73.
57. Miaczynska M, Zerial M. Mosaic organization of the endocytic pathway. Exp Cell Res 2002;272:8-14.
58. Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. Cell 1992;70:715-28.
59. Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O, Lütcke A, Gruenberg J, Zerial M. Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. EMBO J 1994;13:1287-96.
60. van der Sluijs P, Hull M, Webster P, Mâle P, Goud B, Mellman I. The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. Cell 1992;70:729-40.
61. Ang AL, Fölsch H, Koivisto UM, Pypaert M, Mellman I. The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. J Cell Biol 2003;163:339-50.
62. Chen W, Feng Y, Chen D, Wandinger-Ness A. Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. Mol Biol Cell 1998;9:3241-57.
63. Bottger G, Nagelkerken B, van der Sluijs P. Rab4 and Rab7 define distinct nonoverlapping endosomal compartments. J Biol Chem 1996;271:29191-7.
64. McCaffrey MW, Bielli A, Cantalupo G I sur. Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. FEBS Lett 2001;495:21-30.

65. Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B. Rab7: a key to lysosome biogenesis. Mol Biol Cell 2000;11:467-80.
66. Lombardi D, Soldati T, Riederer MA, Goda Y, Zerial M, Pfeffer SR. Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. EMBO J 1993;12:677-82.
67. Batista DG, Silva CF, Mota RA i sur. Trypanosoma cruzi modulates the expression of Rabs and alters the endocytosis in mouse cardiomyocytes in vitro. J Histochem Cytochem 2006;54:605-14.
68. Scianimanico S, Desrosiers M, Dermine JF, Méresse S, Descoteaux A, Desjardins M. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by Leishmania donovani promastigotes. Cell Microbiol 1999;1:19-32.
69. Hashim S, Mukherjee K, Raje M, Basu SK, Mukhopadhyay A. Live Salmonella modulate expression of Rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosomes. J Biol Chem 2000;275:16281-8.
70. Mellman I, Fuchs R, Helenius A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. Annu Rev Biochem 1986;55:663-700. Review.
71. Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. Nat Rev Mol Cell Biol 2004;2:121-32.
72. Woodman PG. Biogenesis of the sorting endosome: the role of Rab5. Traffic 2000;1:695-701. Review.
73. Lindmo K, Stenmark H. Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. J Cell Sci 2006;119:605-14.
74. Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. Cell 2006;124:997-1009.
75. Lakadamyali M, Rust MJ, Babcock HP, Zhuang X. Visualizing infection of individual influenza viruses. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:9280-5.
76. Holtappels R, Gillert-Marien D, Thomas D i sur. Cytomegalovirus encodes a positive regulator of antigen presentation. J Virol 2006;80:7613–24.
77. 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.

78. Del Val M, Hengel H, Häcker H i sur. Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. J Exp Med 1992;176**:**729–38.
79. Hengel H, Reusch U, Gutermann A i sur. Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse. Immunol Rev 1999;168:167–76.
80. Reusch U, Muranyi W, Lučin P, Burgert HG, Hengel H, Koszinowski UH. A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. EMBO J 1999;18:1081–91.
81. Mahmutefendić H, Blagojević G, Kučić N, Lučin P. Constitutive internalization of murine MHC class I molecules. J Cell Physiol 2007;210:445-55.
82. van Dam EM, Ten 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.
83. Rohn WM, Rouillé Y, Waguri S, Hoflack B. Bi-directional trafficking between the trans-Golgi network and the endosomal/lysosomal system. J Cell Sci 2000;113:2093-101.
84. Reusch U, Bernhard O, Koszinowski U, Schu P. AP-1A and AP-3A lysosomal sorting functions. Traffic 2002;3:752-61.
85. Gruenberg J, Stenmark H. The biogenesis of multivesicular endosomes. Nat Rev Mol Cell Biol 2004;5:317-23.
86. Sobo K, Le Blanc I, Luyet PP i sur. Late endosomal cholesterol accumulation leads to impaired intra-endosomal trafficking. PLoS One. 2007;2:e851.
87. Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Malevanets A, Saftig P, Grinstein S. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. EMBO J 2007;26:313-24.
88. Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. Cell 2005;122:735-49.
89. Dunn KW, Maxfield FR. Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. J Cell Biol 1992;117:301-10.
90. 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. Review.

91. Piper RC, Luzio JP. Ubiquitin-dependent sorting of integral membrane proteins for degradation in lysosomes. Curr Opin Cell Biol 2007;19:459-65. Review.
92. Duncan LM, Piper S, Dodd RB i sur. Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. EMBO J 2006;25:1635-45.
93. Gruenberg J, Maxfield FR. Membrane transport in the endocytic pathway. Curr Opin Cell Biol 1995;7:552-63. Review.
94. Robinson MS, Kreis TE. Recruitment of coat proteins onto Golgi membranes in intact and permeabilized cells: effects of brefeldin A and G protein activators. Cell 1992;69:129-38.
95. Yang W, Storrie B. Scattered Golgi elements during microtubule disruption are initially enriched in trans Golgi proteins. Mol Biol Cell 1998;9:191-207.
96. Dietrich J, Kastrup J, Nielsen BL, Odum N, Geisler C. Regulation and function of the CD3gamma DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. J Cell Biol 1997;138:271-81.
97. Couet J, Sar S, Jolivet A, Hai MT, Milgrom E, Misrahi M. Shedding of human thyrotropin receptor ectodomain. Involvement of a matrix metalloprotease. J Biol Chem 1996;271:4545-52.
98. Pfeffer S. Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. Cell 2003;112:507-17.
99. Laude AJ, Prior IA. Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. Mol Membr Biol 2004;21:193-205. Review.
100. Simons K, Toomre D, Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol 2000**;**1**:**31–39.
101. Lucero HA, Robbins PW. Lipid rafts–protein association and the regulation of protein activity. Arch Bioch Bioph 2004;426:208-24.
102. Oliferenko S, Paiha K, Harder T i sur. Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. J Cell Biol 1999;146;834-54.
103. Goebel J, Forrest K, Flynn D, Rao R, Roszman TL. Lipid rafts, major histocompatibility complex, and immune regulation. Hum Immunol 2002;63:813-20.
104. Sedwick CE, Altman A. Ordered just so: lipid rafts and lymphocyte function. Sci STKE 2002;122:RE2.
105. Rajendran L, Simons K. Lipid rafts and membrane dynamics. J Cell Sci 2005;18:1099-102.

106. Lai EC. Lipid rafts make for slippery platforms. J Cell Biol 2003;162:365-70.
107. 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.
108. Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. Nature 1991;349:669-76.
109. Donaldson JG, Williams DB. Intracellular assembly and trafficking of MHC class I molecules. Traffic 2009;10:1745-52. Review.
110. 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.
111. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the cell. New York, Grand Science:2002,1400.
112. Grandea AG 3rd, Van Kaer L. Tapasin: an ER chaperone that controls MHC class I assembly with peptide. Trends Immunol 2001;22:194-9.
113. Hughes EA, Hammond C i Cresswell P. Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94**:**1896–1901.
114. 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.
115. 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;154**:**3147–55.
116. Schnabl E, Stockinger H, Majdic O i sur. Activated human T lymphocytes express MHC class I heavy chains not associated with beta 2-microglobulin. J Exp Med 1990;171: 1431–42.
117. Carven GJ, Chitta S, Hilgert i sur. Monoclonal antibodies specific for the empty conformation of HLA-DR1 reveal aspects of the conformational change associated with peptide binding. J Biol Chem 2004;279:16561–70.

118. Grommé M, Neefies J. Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. Mol Immunol 2002;39:181-202.
119. Cook JR, Myers NB, Hansen TH. The mechanisms of peptide exchange and β_2-microglobulin exchange on cell surface L^d and K^b molecules are noncooperative. J Immunol 1996;157:2256-61.
120. Madden DR. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. Annu Rev Immunol 1995;13:587-622.
121. Hansen T, Balendiran G, Solheim J, Ostrov D, Nathenson S. Structural features of MHC class I molecules that might facilitate alternative pathways of presentation. Immunol Today 2000;21:83-8.
122. Balendiran GK, Solheim JC, Young AC, Hansen TH, Nathenson SG, Sacchettini JC. The three-dimensional structure of an H-2L^d-peptide complex explains the unique interaction of L^d with β_2-microglobulin and peptide. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:6880-5.
123. Thor G, Sepulveda H, Chada S, Dutton RW. Monoclonal antibody that distinguishes between a phosphorylated, beta 2-microglobulin-associated, and a free, nonphosphorylated, chain of MHC class I. J Immunol 1993;151:211-24.
124. 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.
125. Burshtyn DN, Barber BH. Dynamics of peptide binding to purified antibody-bound H-2D^b and H-2D^b beta2-m complexes. J Immunol 1993**;**151**:**3082-93.
126. Pickl WF, Holter W, Stockl J, Majdic O, Knapp W. Expression of beta 2-microglobulin-free HLA class I alpha-chains on activated T cells requires internalization of HLA class I heterodimers. Immunology 1996;88:104-9.
127. Matko J, Bushkin Y, Wei T, Edidin M. Clustering of class I HLA molecules on the surfaces of activated and transformed human cells. J Immunol 1994;152:3353-60.
128. Bodnár A, Bacsó Z, Jenei A i sur. Class I HLA oligomerization at the surface of B cells is controlled by exogenous ß$_2$-microglobulin: implications in activation of cytotoxic T lymphocytes. Int Immunol 2003;15:331-39.

129. Sissons JG, Carmichael AJ, McKinney N, Sinclair JH, Wills MR. Human cytomegalovirus and immunopathology. Springer Semin Immunopathol 2002;24:169-85. Review.
130. Rapp M, Lucin P, Messerle M, Loh LC, Koszinowski UH. Expression of the murine cytomegalovirus glycoprotein H by recombinant vaccinia virus. J Gen Virol 1994;75:183-8.
131. Taylor HP, Cooper NR. The human cytomegalovirus receptor on fibroblasts is a 30-kilodalton membrane protein. J Virol 1990;64:2484-90.
132. Preuzeto sa http://www.expasy.org/viralzone/.
133. Sweet C. The pathogenicity of cytomegalovirus. FEMS Microbiol Rev 1999;23(4):457-82.
134. Rawlinson WD, Farrell HE, Barrell BG. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. J Virol 1996;70:8833-49.
135. Smith HR, Heusel JW, Mehta IK i sur. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:8826-31.
136. Crnković-Mertens I, Messerle M, Milotić I i sur. Virus attenuation after deletion of the cytomegalovirus Fc receptor gene is not due to antibody control. J Virol 1998;72:1377-82.
137. Mocarski ES. Cytomegaloviruses and their replication, 1996 p. 2447–2492. ***In*** B. N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley, Fields virology, Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
138. Stenberg RM. The human cytomegalovirus major immediate-early gene. Intervirology 1996;39:343–49.
139. Keil GM, Ebeling-Keil A, Koszinowski UH. Immediate-early genes of murine cytomegalovirus: location, transcripts, and translation products. J Virol 1987;61:526–33.
140. Keil GM, Ebeling-Keil A, Koszinowski UH. Sequence and structural organization of murine cytomegalovirus immediate-early gene 1. J Virol 1987;61:1901–8.
141. Ghazal P, Visser AE, Gustems M i sur. Elimination of ie1 significantly attenuates murine cytomegalovirus virulence but does not alter replicative capacity in cell culture. J Virol 2005;79:7182-94.
142. Messerle M, Buhler B, Keil GM, Koszinowski UH. Structural organization, expression, and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early gene 3. J Virol 1992;66:27–36.

143. Cardin RD, Abenes GB, Stoddart CA, Mocarski ES. Murine cytomegalovirus IE2, an activator of gene expression, is dispensable for growth and latency in mice. Virology 1995;209:236-41.
144. Thäle R, Lucin P, Schneider K, Eggers M, Koszinowski UH. Identification and expression of a murine cytomegalovirus early gene coding for an Fc receptor. J Virol 1994;68:7757-65.
145. Campbell AE, Slater JS, Cavanaugh VJ, Stenberg RM. An early event in murine cytomegalovirus replication inhibits presentation of cellular antigens to cytotoxic T lymphocytes. J Virol 1992;66:3011-7.
146. Lodoen MB, Lanier LL. Viral modulation of NK cell immunity. Nat Rev Microbiol 2005;3:59-69. Review.
147. Pinto AK, Hill AB. Viral interference with antigen presentation to CD8+ T cells: lessons from cytomegalovirus. Viral Immunol 2005;18:434-44. Review.
148. Farrell HE, Vally H, Lynch DM i sur. Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. Nature 1997;386:510-4.
149. Kubota A, Kubota S, Farrell HE, Davis-Poynter N, Takei F. Inhibition of NK cells by murine CMV-encoded class I MHC homologue m144. Cell Immunol 1999;191:145-51.
150. Cretney E, Degli-Esposti MA, Densley EH, Farrell HE, Davis-Poynter NJ, Smyth MJ. m144, a murine cytomegalovirus (MCMV)-encoded major histocompatibility complex class I homologue, confers tumor resistance to natural killer cell-mediated rejection. J Exp Med 1999;190:435-44.
151. Cerwenka A, Lanier LL. NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. Tissue Antigens 2003;61:335-43. Review.
152. Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. Science 2002;296:1323-6.
153. Tindle RW. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. Curr Opin Immunol 1996;8:643-50. Review.

154. Marchetti B, Ashrafi GH, Dornan ES, Araibi EH, Ellis SA, Campo MS. The E5 protein of BPV-4 interacts with the heavy chain of MHC class I and irreversibly retains the MHC complex in the Golgi apparatus. Oncogene 2006;25:2254-63.
155. Cornell CT, Kiosses WB, Harkins S, Whitton JL. Coxsackievirus B3 proteins directionally complement each other to downregulate surface major histocompatibility complex class I. J Virol 2007;81:6785-97.
156. Deitz SB, Dodd DA, Cooper S, Parham P, Kirkegaard K. MHC I-dependent antigen presentation is inhibited by poliovirus protein 3A. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:13790-5.
157. Dodd DA, Giddings TH Jr, Kirkegaard K. Poliovirus 3A protein limits interleukin-6 (IL-6), IL-8, and beta interferon secretion during viral infection. J Virol 2001;75:8158-65.
158. de Jong AS, Visch HJ, de Mattia F i sur. The coxsackievirus 2B protein increases efflux of ions from the endoplasmic reticulum and Golgi, thereby inhibiting protein trafficking through the Golgi. J Biol Chem 2006;281:14144-50.
159. van Kuppeveld FJ, de Jong AS, Melchers WJ, Willems PH. Enterovirus protein 2B po(u)res out the calcium: a viral strategy to survive? Trends Microbiol 2005;13:41-4. Review.
160. Greenberg ME, Iafrate AJ, Skowronski J. The SH3 domain-binding surface and an acidic motif in HIV-1 Nef regulate trafficking of class I MHC complexes. EMBO J 1998;17:2777-89.
161. Piguet V, Gu F, Foti M i sur. Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes. Cell 1999;97:63-73.
162. Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. Cell 1994;76:853-64.
163. Rhee SS, Marsh JW. Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced down-modulation of CD4 is due to rapid internalization and degradation of surface CD4. J Virol 1994;68:5156-63.

164. Piguet V, Wan L, Borel C i sur. HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes. Nat Cell Biol 2000;2:163-7.
165. Blagoveshchenskaya AD, Thomas L, Feliciangeli SF, Hung CH, Thomas G. HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. Cell 2002;111:853-66.
166. Le Gall S, Buseyne F, Trocha A, Walker BD, Heard JM, Schwartz O. Distinct trafficking pathways mediate Nef-induced and clathrin-dependent major histocompatibility complex class I down-regulation. J Virol 2000;74:9256-66.
167. Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B, Greenberg PD. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. Nature 1996;383:720-2.
168. Jones TR, Hanson LK, Sun L, Slater JS, Stenberg RM, Campbell AE. Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. J Virol 1995;69:4830-41.
169. Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. Cell 1996;84:769-79.
170. Wiertz EJ, Tortorella D, Bogyo M i sur. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. Nature 1996;384:432-8.
171. Jones TR, Wiertz EJ, Sun L, Fish KN, Nelson JA, Ploegh HL. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:11327-33.
172. Ahn K, Angulo A, Ghazal P, Peterson PA, Yang Y, Früh K. Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:10990-5.
173. Ahn K, Gruhler A, Galocha B i sur. The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. Immunity 1997;6:613-21.

174. Hengel H, Koopmann JO, Flohr T i sur. A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. Immunity 1997;6:623-32.
175. Lehner PJ, Karttunen JT, Wilkinson GW, Cresswell P. The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:6904-9.
176. Lanier LL. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. Nat Rev Immunol 2008;8:259-68. Review.
177. Kavanagh DG, Gold MC, Wagner M, Koszinowski UH, Hill AB. The multiple immune-evasion genes of murine cytomegalovirus are not redundant: m4 and m152 inhibit antigen presentation in a complementary and cooperative fashion. J Exp Med 2001;194:967-78.
178. Lilley BN, Ploegh HL. Viral modulation of antigen presentation: manipulation of cellular targets in the ER and beyond. Immunol Rev 2005;207:126-44. Review.
179. Kleijnen MF, Huppa JB, Lučin P i sur. A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. EMBO J 1997;16:685–94.
180. Bubeck A, Reusch U, Wagner M i sur. The glycoprotein gp48 of murine cytomegalovirusL proteasome-dependent cytosolic dislocation and degradation. J Biol Chem 2002;277:2216-24.
181. del Val M, Hengel H, Häcker H i sur. Presentation of CMV immediate-early antigen to cytolytic T lymphocytes is selectively prevented by viral genes expressed in the early phase. J Exp Med 1992;176:729-38.
182. Reddehase MJ, Rothbard JB, Koszinowski UH. A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. Nature 1989;337:651-3.
183. Ziegler H, Thäle R, Lučin P i sur. A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. Immunity 1997;6:57–66.
184. Ziegler H, Muranyi W, Burgert HG, Kremmer E, Koszinowski UH. The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes the retention of MHC class I molecules. EMBO J 2000;19:870-81.

185. Pinto AK, Munks MW, Koszinowski UH, Hill AB. Coordinated function of murine cytomegalovirus genes completely inhibits CTL lysis. J Immunol 2006;177:3225-34.
186. Hengel H, Lucin P, Jonjić S, Ruppert T, Koszinowski UH. Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape. J Virol 1994;68:289-97.
187. Ménard C, Wagner M, Ruzsics Z i sur. Role of murine cytomegalovirus US22 gene family members in replication in macrophages. J Virol 2003;77:5557-70.
188. Angulo A, Ghazal P, Messerle M. The major immediate-early gene ie3 of mouse cytomegalovirus is essential for viral growth. J Virol 2000;74:11129-36.
189. Wagner M, Gutermann A, Podlech J, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Major histocompatibility complex class I allele-specific cooperative and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus. J Exp Med 2002;196:805-16.
190. Ciechanover A, Schwartz AL, Dautry-Varsat A, Lodish HF. Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. Effect of lysosomotropic agents. J Biol Chem 1983;258:9681-9.
191. Coscoy L, Ganen 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 USA 2000;97:8051–6.
192. Smith CJ, Grigorieff N, Pearse BM. Clathrin coats at 21Å resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors. EMBO J 1998;17:4943-53.
193. Lie WR, Myers NB, Connolly JM, Gorka J, Lee DR, Hansen TH. The specific binding of peptide ligand to L^d class I major histocompatibility complex molecules determines thheir antigenic structure. J Exp Med 1991;173:449-59.
194. Ozato K, Mayer NM, Sachs DH. Monoclonal antibodies to mouse major histocompatibility complex antigens. Transplantation 1982;34:113-20.
195. 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.
196. 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.

197. Traub LM. Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection. J Cell Biol 2003;163:203-8.
198. 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.
199. Thompson HM, McNiven MA. Discovery of a new 'dynasore'. Nat Chem Biol 2006;2:355-6.
200. Kilsdonk EP, Yancey PG, Stoudt GW i sur. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. J Biol Chem 1995;270:17250-6.
201. Ros-Baro A, Lopez-Iglesias C, Peiro S i sur. Lipid rafts are required for GLUT4 internalization in adipose cells. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:12050-5.
202. 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.
203. Donaldson JG. Arfs, phosphoinositides and membrane traffic. Biochem Soc Trans 2005;33:1276-8.
204. 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.
205. 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.
206. Gruenberg J. Lipids in endocytic membrane transport and sorting. Curr Opin Cell Biol 2003;15:382-8.
207. Blagojevic G, Mahmutefendic H, Kucic N, Ilic Tomas M, Lucin P. Endocytic trafficking of Cholera Toxin in Balb 3T3 Cells. Croat Chem Acta 2008;81:191-202.
208. Thäle R, Szepan U, Hengel H, Geginat G, Lucin P, Koszinowski UH. Identification of the mouse cytomegalovirus genomic region affecting major histocompatibility complex class I molecule transport. J Virol 1995;69:6098-105.
209. Eyster CA, Higginson JD, Huebner R i sur. Discovery of new cargo proteins that enter cells through clathrin-independent endocytosis. Traffic 2009;10:590-9.
210. Madrid R, Janvier K, Hitchin D i sur. Nef-induced alteration of the early/recycling endosomal compartment correlates with enhancement of HIV-1 infectivity. J Biol Chem 2005;280:5032-44.

211. Krzyzaniak MA, Mach M, Britt WJ. HCMV-encoded glycoprotein M (UL100) interacts with Rab11 effector protein FIP4. Traffic 2009;10:1439-57.

POPIS SKRAĆENICA

Stanični odjeljci

EE – rani endosomi (engl. *early endosomes*)

ER – endoplazmatska mrežica (engl. endoplasmatic reticulum)

GA – Golgijev aparat (engl. Golgi apparatus)

GEEC – endosomalni odjeljak u kojem se nakupljaju GPI-sidreni proteini (engl. *GPI-AP early enriched endosomal compartment*)

JRC – jukstanuklearni reciklirajući odjeljak (engl. *juxtanuclear recycling compartment*)

LE – kasni endosomi (engl. *late endosomes*)

MTOC – organizirajući centar mikrotubula (engl. *microtubule organizing center*)

MVB – multivezikulatna tjelešca (engl. *multivesicular bodies*)

SE – sortirajući endosomi (engl. *sorting endosomes*)

TGN – *trans* – Golgijeva mrežaaparat (trans-Golgi network)

Virusi

MCMV – mišji citomegalovirus (engl. Murine cytomegalovirus)

HCMV – humani citomegalovirus (engl. Human cytomegalovirus)

Površinsk i glikoproteini i ostale (makro)molekule

AP – adapterski protein (engl. *adapter protein*)

CtxB – kolera toksin, podjedinica B (engl. cholera toxin B subunit)

EGF(R) – epidermalni faktor rasta (receptor) (engl. *epidermal growth factor* (*receptor*))

GPI-AP – glikozil fosfatidil inozitol-sidreni proteini (engl. *glycosylphosphatydil inositol-anchored proteins*)

IFN – interferon

IL-2R – interleukin-2 receptor

LAMP – lizosom-povezani membranski protein (engl. *lysosome-associated membrane proteins*)

LBPA – lizobisfosfatidna kiselina (engl. *lysobisphosphatydic acid*)

LDL – lipoprotein male gustoće (engl. low density lipoprotein)

MHC – molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*)

M6PR - receptor manoza 6 fosfata (engl. *mannosa -6- phosphate receptor*)

PIK (PIP) – fosfatidil inozitol kinaza (fosfatidil inozitol fosfat (engl. *phosphatydil-inositol phosphate*)

PKC – protein kinaza C (engl. *protein kinase C*)

TAP – prijenosnik povezan s antigenskim predočavanjem(engl. *transporter associated with antigen processing*)

TCR – T stanični receptor (engl. *T cell receptor*)

Tf(R) – transferin(ski receptor) (engl. transferrin (*receptor*))

β_2-m - β_2-mikroglobulin

Inhibitori endocitoze i vezikularnog transporta

ActD- Aktinomicin D (Actinomycin D)

BFA – brefeldin A

CHX – Cikloheksimid (Cycloheximide)

CP - Klorpromazin (Chlorpromazin)

D - Dynasore

Kon A – Konkanamicin A (Concanamycin A)

Noc - Nokodazol (Nocodasol)

Membranske mikrodomene

DRM – membrane otporne na detergente (engl. *detergent resistant membrains*)

DSM – membrane topivive u detergentima (engl. *detergent soluble membrains*)

Ostale kratice

EM – elektronska mikroskopija

mPt – monoklonsko protutijelo (engl. *monoclonal antibody*)

ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME:

Maja Ilić Tomaš

DATUM I MJESTO ROĐENJA:

03. rujna 1979. Rijeka

ADRESA:

Krasica 298
51224 Krasica

RADNA MJESTA:

Od 11.listopada 2004. do 11.listopada 2005. pripravnički staž u KBC-u Rijeka
Od 1.svibnja.2006. zaposlena na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog Fakulteta u Rijeci u svojstvu znanstvenog novaka

ŠKOLOVANJE:

1986. – 1994. osnovna škola "Vežica" Rijeka
1994.- 1998. Prva sušačka hrvatska gimnazija
1998.- 2004. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, studij medicine
2004. –2009. poslijediplomski znanstveni studij " Biomedicina" na Medicinskom fakultetu u Rijeci

AKADEMSKI STUPNJEVI:

9.lipnja 2004. Doktor medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

ZNANSTVENI STUPNJEVI:

Od 1.svibnja 2006. znanstveni novak na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

STRUČNO USAVRŠAVANJE:

Od 11.listopada 2004. do 11.listopada 2005. pripravnički staž u Kliničkom bolničkom centru Rijeka

14. prosinca 2005. položen stručni ispit

A. ZNANSTVENA DJELATNOST

1. Znanstveni radovi

1.1. Izvorni znanstveni radovi objavljeni u časopisu citiranom u tercijarnim publikacijama (CC radovi)

1. Blagojevic G, Mahmutefendic H, Kucic N, Ilic Tomas M, Lucin P.: Endocytic trafficking of Cholera Toxin in Balb 3T3 Cells. Croat Chem Acta 2008;81:191-202.
2. Orlic ZC, Turk T, Sincic BM, Stimac D, Cvijanovic O, Maric I, Tomas MI, Jurisic Erzen D, Licul V, Bobinac D: How Activity of Inflammatory Bowel Disease Influence Bone Loss. J Clin Densitom. 2010;13:36-42.
3. Tomas MI, Kucic N, Mahmutefendic H, Blagojevic G, Lucin P.: Murine Cytomegalovirus Perturbs Endosomal Trafficking of MHC Class I Molecules in the early phase of infection J Virol. 2010;84:11101-12.
4. Mahmutefendić H, Blagojević G, Tomaš MI, Kučić N, Lučin P.: Segregation of open Major Histocompatibility Class I conformers at the plasma membrane and during endosomal trafficking reveals conformation-based sorting in the endosomal system. Int J Biochem Cell Biol. 2010; (u tisku)

2. Znanstveni projekti

2.1. Aktivno sudjelovanje u realizaciji znanstvenih projekata

2.1.1. "Sortiranje MHC molekula I razreda na staničnoj membrani i endocitoznim odjeljcima" (br. 0620238-0223) glavnog istraživača prof. dr. sc. Pere Lučina. Projekt financira Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske

3. Sudjelovanje na znanstvenim skupovima

3.1. Sudjelovanje na međunarodnim skupovima

1. Brankica Mijandrušić Sinčić, Margita Belušić Gobić, Mirna Juretić, Dražen Kovač, Maja Ilić, Andrica Lekić, Robert Cerović, Davor Štimac: Clinical relevance of CD-68 positive cells in normal buccal mucosa in patients with inflammatory bowel disease, Falk Symposium 154, June 9.-10.2006. Moscow, Russia, Abstract book, p.11
2. B. Mijandrusic-Sincic, M. Ilic-Tomas, D. Kovac, M. Juretic, M. Belusic-Gobic, A. Lekic, R. Cerovic, D. Stimac: CD-68 positive cells in bucal mucosa as diagnostic marker for IBD, European Crohn's and Colitis Organisation Congress, March 1.-3. 2007. Innsbruck, Austria, The International Journal of Crohn's and Colitis /Vol.1/no.1,2007/ p.7
3. M Ilic Tomas, N Kucic, H Mahmutefendic, G Blagojevic, P Lucin: Murine cytomegalovirus clear MHC class I molecules from the cell surface of infected cell and retrieve them in the juxtanuclear pre-late endosomal compartment, X. International Congress of Reproductive Immunology, June 10.-14.2007. Opatija, Croatia, The American Journal of Reproductive Immunology /Vol.57/no.6,2007/ p.430
4. H Mahmutefendic, G Blagojevic, N Kucic, M Ilic Tomas, P Lucin: Fully conformed MHC class I molecules and empty L^d molecules follow different routes in the endocytic pathway, X. International Congress of Reproductive Immunology, June 10.-14.2007. Opatija, Croatia, The American Journal of Reproductive Immunology /Vol.57/no.6,2007/ p.432
5. G Blagojevic, H Mahmutefendic, P Le Bouteiller, N Kucic, M Ilic Tomas, P Lucin: Internalization and intracellular localization of HLA molecules, X. International Congress of Reproductive Immunology, June 10.-14.2007. Opatija, Croatia, The American Journal of Reproductive Immunology /Vol.57/no.6,2007/ p.433
6. H. Mahmutefendic, G. Blagojevic, P. Le Bouteiller, N. Kucic, M. Ilic Tomas, P. Lucin: Human and Murine MHC class I molecules change their conformation in acid endosomal compratments, The third EMBIC summer school, September 3.-7.2007., Jena, Germany, Abstarct book, p.39

3.2. Sudjelovanje na domaćim skupovima

1. Crnčević-Orlić Ž., Turk T., Sinčić-Mijandrušić B., Ilić M., Jurišić-Eržen D., Štimac D: Duljina perioda aktivne bolesti i remisija kao prediktori smanjenja gustoće koštane mase u pacijenata sa upalnim bolestima crijeva, 3. Hrvatski kongres o osteoporozi, 21.-24. travnja 2005., Šibenik, poster, Abstract book
2. Maja Ilić Tomaš, Natalia Kučić, Hana Mahmutefendić, Gordana Blagojević, Pero Lučin: 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
3. Gordana Blagojević, Mahmutefendić H, Le Bouteiller P, Kučić N, Ilić Tomaš M, Lučin P: Characterization of HLA-CW6 endocytic pathway, Annual Meeting of Croatian Immunological Society, October 19.-21.2007., Rovinj-Crveni Otok, poster, Abstract book, p.54
4. Hana Mahmutefendić, Gordana Blagojević, Natalia Kučić, Maja Ilić Tomaš, Pero Lučin: Conformation based protein sorting: partitioning of empty and full MHC class I molecules in the endosomal compartments, Annual Meeting of Croatian Immunological Society, October 19.-21.2007., Rovinj-Crveni Otok, poster, Abstract book, p.20
5. 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, poster, Abstract book, p.53
6. Brankica Mijandrušić Sinčić, Maja Ilić Tomaš, Mirna Juretić, Margita Belušić Gobić, Dražen Kovač, Andrica Lekić, Robert Cerović, Davor Štimac: Clinical relevance of CD-68 positive cells in normal buccal mucosa in patients with inflammatory bowel disease, 10 th congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, September 15-18.2010., Opatija, p.129
7. Ilić Tomaš Maja, Kučić Natalia, Mahmutefendić Hana, Blagojević Gordana, Lučin Pero: Murine Cytomegalovirus Perturbs Endosomal Trafficking of MHC Class I Molecules in the Early Phase of Infection, 10 th congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, September 15-18.2010., Opatija, p.111

8. Kučić Natalia, Ilić Tomaš Maja, Mahmutefendić Hana, Blagojević Gordana, Lučin Pero: MCMV interference with disposal endocytic pathway of cell-surface MHC-I molecules at early stage of infection, 10 th congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, September 15-18.2010., Opatija, p.73

3.3. Znanstvene nagrade / priznanja

1. 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. Znanstvena radionica pod naslovom: fluorescentna i konfokalna mikroskopija na Carl-Zeiss mikroskopu održani u Zagrebu 03.2007.god.
2. Znanstvena radionica pod naslovom: "Balkan Flow User's meeting" održana u Rovinju-Crveni otok od 29. rujna- 01. listopada 2008.god.

B. NASTAVNA DJELATNOST

1. Demonstrature

1999.- 2004. god. demonstrator na Zavodu za Biologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci
2004.god. demonstrator na Katedri za anesteziologiju i reanimatologiju

2. Dodiplomska nastava

Od svibnja 2006. 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 lipnja 2006. 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

Članstva u stručnim i znanstvenim udruženjima:

1. Od lipnja 2006. godine član sam Hrvatskog imunološkog društva
2. Od 2006. godine član sam Sindikata znanosti i visokog obrazovanja
3. Od 2006. godine član sam Hrvatske liječničke komore
4. Od 2006. godine član sam Hrvatskog liječničkog zbora

E. STIPENDIJE I NAGRADE

1. Od 1998. do 2004.god. Državna stipendija Ministarstva znanosti i tehnologije
2. srpanj 2005. stipendija od Zaklade Sveučilišta u Rijeci na ime dijela školarine za poslijediplomski studij ″Biomedicina″ na Medicinskom fakultetu u Rijeci.

G. STUDENTSKE AKTIVNOSTI

1. Profesionalna studentska razmjena u " Instituto di Clinica Medica" u Messini- Italija na odjelu kardiologije u razdoblju od 16.07.2002.-12.08.2002.

F. OSTALO

1. Certifikat iz engleskog jezika- University of Cambridge, level B2
2. Certifikat o poznavanju rada na računalu- ECDL