

Utjecaj mišjeg citomegalovirusa na biologiju membranskih proteina i ispoljavanje staničnog prionskog proteina PrPC

Cuissot, Corentin Pavao Andre

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:341038>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Corentin Pavao André CUISSOT

Utjecaj mišjeg citomegalovirusa na biologiju membranskih proteina i ispoljavanje staničnog
prionskog proteina PrP^C

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Corentin Pavao André CUISSOT

Utjecaj mišjeg citomegalovirusa na biologiju membranskih proteina i ispoljavanje staničnog
prionskog proteina PrP^C

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

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

Diplomski rad ocjenjen je dana 28.08.2020.

na Medicinskim fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc. dr. sc. Berislav Lisnić

2. Prof. dr. sc. Hana Mahmutefendić Lučin

3. Doc. dr. sc. Ilija Brizić

Rad sadrži 44 stranica, 6 slika, i 74 literaturnih navoda.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| Sadržaj..... | 0 |
| UVOD | 1 |
| Povijesni pregled otkrića prionskog proteina PrP ^C | 1 |
| Biologija staničnog prionskog proteina PrP ^C | 2 |
| Struktura proteina PrP ^C | 2 |
| Struktura i regulacija gena PRNP | 6 |
| Ekspresija i distribucija PrP ^C | 6 |
| Stanična lokalizacija | 7 |
| Endosomalni sustav stanice | 8 |
| Endocitoza..... | 8 |
| Endosomalni put | 9 |
| Unutar stanični transport, PrP ^C | 12 |
| Endocitoza i internalizacija PrP ^C | 13 |
| Uloga PrP ^C u imunosnom odgovoru | 15 |
| Utjecaj PrP ^C na signalne puteve unutar stanice | 16 |
| Citomegalovirusna infekcija i utjecaj na biologiju staničnog transporta. | 17 |
| Svrha rada..... | 19 |
| Materijali i postupci | 21 |
| Materijali | 21 |
| Stanična linija..... | 22 |

| | |
|--|----|
| Protutijela..... | 23 |
| Virus..... | 23 |
| Postupci | 23 |
| 1. Odmrzavanje i uzgoj stanica | 23 |
| 2. Infekcija stanica..... | 25 |
| 3. Fiksacija | 25 |
| 4. Bojanje za imunofluorescenciju | 25 |
| Rezultati | 26 |
| Priprema uzoraka i optimizacija bojanja PrP ^C | 26 |
| Endocitoza proteina PrP ^C | 28 |
| Uspostava bojanja s 4 boje | 29 |
| Rasprava | 30 |
| Zaključak..... | 33 |
| Sažetak | 33 |
| Summary | 34 |
| Reference..... | 36 |
| Životopis..... | 44 |

Popis skraćenica

PrP^C: Stanični celularni prionski protein

PrP: Prionski protein

PSE: Prenosive Spongiformne Encefalopatije

BSE: Goveda spongiformna encefalopatija

PRNP: gen koji kodira prionski protein

GPI: glikozilfosfatidil-inozitol

IDR: Intrinzično neodređena regija

Hsp: Protein toplinskog stresa

DRM: Membranske domene otporne na deterđente

AP: Adaptatorski protein

JRC: Juksta-nuklearni reciklirajući odjeljak

CtmPrP: transmembranski oblik prionskog proteina

HMS: hematopoetske matične stanice

TREG: T-regulatorne stanice

DC: dendritičke stanice

PKA: Protein kinaza A

CMV: Citomegalovirus

MCMV: Mišiji citomegalovirus

DMEM: Dulbeccov modificirani minimalni esencijalni medij

UVOD

Povijesni pregled otkrića prionskog proteina PrP^C

Stanični ili celularni prionski protein (*eng. Prion protein cellular, PrP^C*) otkriven je u istraživanjima o uzroku prionskih bolesti. Prionske bolesti su skupina bolesti koje su anatomsko-patološki definirane kao Prenosive Spongiformne Encefalopatije PSE (*eng. Transmissible Spongiform Encephalopathies, TSE*), koje karakterizira agregacija specifičnih proteina i posljedična neurodegeneracija.

Najstariji nama poznat opis prionskih bolesti najvjerojatnije je već u 5. stoljeću načinio Hipokrat s Kosa, otac medicine:

„Istina o tome je najbolje pokazana činjenicom da je stoka napadnuta tom bolešću, posebice ovce, koje su najčešće žrtve. Ako im otvorite glavu naći ćete jako vlažan mozak, pun vodene bolesti, i sa zlim mirisom, kroz to možete naučiti da nije bog nego bolest ona koja povređuje tijelo. Tako je i sa čovjekom (1).“

Skupinu prionskih bolesti možemo podijeliti na ljudske i životinjske.

Za čovječanstvo najvažniji životinjski tipovi bolesti su oni koji napadaju domaće životinje, u što ubrajamo ovčju tresavicu i goveđu spongiformnu encefalopatiju, (*eng. Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE*) u narodu poznatu pod imenom "bolest kravljeg ludila". U ljudske prionopatije ubrajamo Creutzfeld-Jacobovu bolest, Kuru i obiteljsku hereditarnu insomniu. Kuru bolest je opažena u prvoj polovici 20. stoljeća, a 1976. godine Daniel Carleton Gajdusek je dobio Nobelovu nagradu za dokazivanje prenosivosti Kuru bolesti s jedinke na jedinku. U svom radu 1967. godine utvrdio je infektivnost patološkog materijala tako što je injektirao u mozak čimpanze agregat iz mozga pripadnika kanibalskog plemena Fore, koji je umro od Kuru bolesti - što odgovara trećem Kochovom postulatu o infektivnim bolestima (2). Tada nije bila

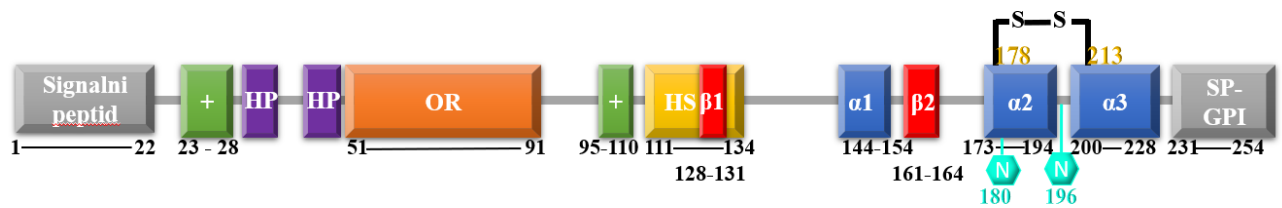
utvrđena priroda infektivnog materijala, a postojale su pretpostavke da se radi o atipičnom virusu.

Stanley B. Prusiner je 1982. godine utvrdio proteinsku prirodu infektivnog materijala (3) i izmislio riječ prion koja je izvedenica dvije riječi PRotein I INfekcija. Također je 1984. godine utvrdio redosljed aminokiselina iz mikro-heterogene proteinske frakcije 27-30 kDa produkta, koji je pokazivao obilježje ograničene proteolize te tako potvrdio proteinski element priona (4). Iste godine razvio je protutijelo na sekvencu 27-30 PrP i utvrdio postojanje staničnog proteina koji postoji u zdravom mozgu hrčka. Taj protein je nazvao glavni scrapie prion protein (5). Za svoja otkriće priona je nagrađen Nobelovom Nagradom 1997. godine. Bolest kravljeg ludila ili Bovina Spongiformna Encefalopatija je prepoznata 1985. godine i te godine je otkriven gen PRNP koji kodira za stanični prionski protein (6). Ubrzo je prepoznata uloga priona u drugim prionskim bolestima, zajednička priroda prionskih bolesti kao i postojanje jednog staničnog prionskog proteina, prisutnog u zdravim životinjama i ljudima, kasnije u ovom radu PrP^C.

Biologija staničnog prionskog proteina PrP^C

Struktura proteina PrP^C

Prionski protein je kodiran jedno-kopijskim genom, PRNP (7). Prije post-translacijskih modifikacija PrP^C ima 230 aminokiselina. Tijekom obrade, nakon cijepanja signalnog peptida od 22 aminokiselina, stanični prionski protein ima okosnicu od 210 aminokiselina, na koju se vezuju šećeri u procesu glikozilacije (8). Na slici 1 je shematski prikazana struktura PrP^C i različiti strukturni elementi.



Slika 1: Organizacija proteina PrP^C s pozicijama različitih domena proteina kod miša (*Mus musculus*). Crtež izrađen prema predlošku (7). +: Pozitivno nabijena domena, HP:

Heksapeptidni slijed, OR: Oktaponavljujući sljedovi, HS: hidrofobna srž, SPI-GPI: Signalni peptid-Glikozilfosfatidilinozitolskog sidra, N: mjesto glikozilacije, S_S: Disulfidni most

Tijekom post-translacijskih modifikacija PrP^C prima GPI-sidro, to jest molekulu glikozilfosfatidil-inozitola. Zrela molekula proteina PrP^C uglavnom se nalazi na površini stanice vezana upravo za GPI-sidro. Međutim, uočeni su i drugi oblici proteina, gotovo sve forme, od trans-membranskih proteina i solubilnih ektodomena koje se otpuštaju sa stanica pa do citoplazmatske forme i forme koja je prisutna u samoj jezgri stanica (9). Forma koja je za membranu učvršćena pomoću GPI-sidra je dominantna i, ukoliko nije drugačije navedeno, na nju će se referirati kratica PrP^C u ovom radu. Od staničnih membrana, PrP^C je dominantno ispoljen na vanjskoj, plazmatskoj membrani stanice.

PrP^C posjeduje N-terminalnu, NH₂-domenu koja je vrlo fleksibilna, nema definiranu i konstantnu strukturu, a veličine je otprilike 100 aminokiselina i C-terminalnu, COOH-domenu koja je globularna, dobro definirane i poznate trodimenzionalne strukture te također građena od približno 100 aminokiselina. C-terminalna, globularna domena se sastoji od 3 α uzvojnice na pozicijama: od 144. do 154. aminokiseline, 173. do 194. aminokiseline i 200. do 228. aminokiseline, dok su između umetnute vrlo kratke anti-paralelne β-naborane ploče koje grade aminokiseline 128.-131. i 161-164. Jedina disulfidna veza je prisutna između aminokiselina 178 i 213.

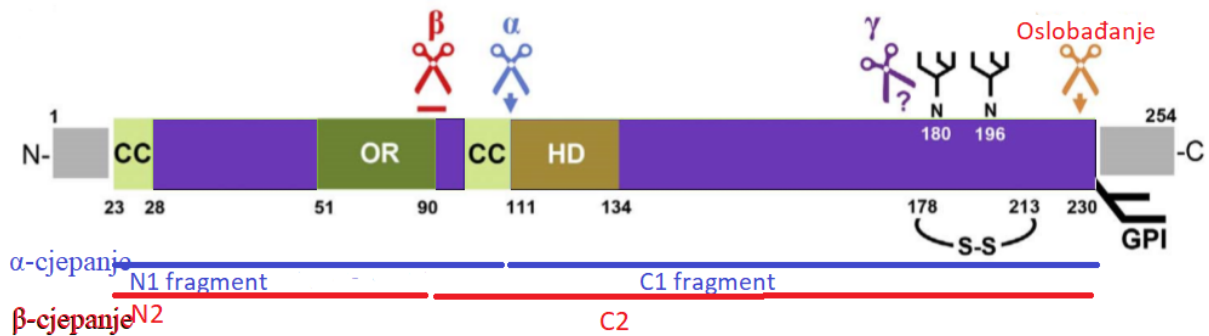
PrP^C ima dva lokusa za glikozilaciju koji se razlikuju ovisno o vrstama. Stanični prionski protein je prisutan u vodozemaca, gmazova, ptica i u sisavaca. Kad uspoređujemo strukturu PrP^C u različitim vrstama, primjećujemo kako je posebno visoka srodnost između C-terminalnih domena u svih vrsta što upućuje na njenu bitnu funkciju (10). N-terminalna domena je značajno različita među vrstama, jer je bogata intrinzično neuređenim regijama (*eng. Intrinsically disordered region, IDR*). To su regije proteina koje nemaju fiksnu tercijarnu strukturu već se njihova struktura mijenja i može poprimiti gotovo bilo koji oblik. Glikozilacijska mjesta u sisavaca odgovaraju onima u vodozemaca, gmazova i ptica što upućuje na funkcionalnu važnost glikozilacije (10). Razlike u brojčanoj poziciji glikozilacijskih mjesta između vrsta postoje i vjerojatno su posljedica insercijskih i delecijских mutacija koje ne mijenjaju značajno funkciju proteina.

PrP^C posjeduje 2 mjesta za glikozilaciju i većina prionskog proteina izoliranog iz tkiva je diglikozilirana (11). Glikozilacija proteina PrP^C promovira transport PrP^C do plazmatske membrane i povećava stabilnost te poluvijek proteina PrP^C. Obzirom na postojanje dva glikozilacijska mjesta, nastaju neglikozilirane, monoglikozilirane i diglikozilirane proteinske forme ovisno o varijabilnoj okupaciji asparaginskih ostataka na kojima se vrši N-glikozilacija, što su aminokiseline na pozicijama 181 i 187 u ljudi, a kod miševa 180 i 196. Sam sastav N-glikana koji su vezani na PrP^C može se također razlikovati od molekule do molekule, što vjerojatno najviše ovisi o mjestu u organizmu gdje se eksprimira protein. Obzirom da sama fiziološka funkcija proteina PrP^C nije do kraja razjašnjena, nije poznato niti utječe li različita glikozilacija proteina na njegovu funkciju. Različiti uzorci glikozilacije mijenjaju sposobnost vezanja različitih monoklonskih protutijela na protein PrP^C (12).

Dok prolazi kroz trans-Golgi odjeljak, manji dio proteina se također cijepa stvarajući fragmente PrP-N1 i PrP-C1 što se zove α -cijepanje. PrP-N1 fragment izlučuje se iz stanice dok PrP-C1 fragment ostaje vezan sa staničnu membranu. U patološkim stanjima i kao odgovor na

oksidativni stres, PrP^C se cijepa u blizini aminokiseline na poziciji 90 tvoreći fragmente PrP-N2 i PrP-C2 (13) što se zove i β-cijepanje. PrP^C se alternativno cijepa na neodređenom mjestu, između aminokiselina na pozicijama 170 i 200 što je označeno kao γ-cijepanje (14). Također, na površini stanice proteaze iz obitelji ADAM, vjerojatno ADAM10, ADAM17 i ADAM8 u mišićju cijepaju PrP^C između aminokiselina na pozicijama 228 i 229, oslobađajući fragment PrP^C-a od GPI-sidra (8).

Na slici 2 su sažeta različita cijepanja kao i mjesta na kojima se događaju te su prikazani različiti fragmenti koji nastaju prilikom tih cijepanja.



Slika 2: Mjesta cijepanja PrP^C i nastali fragmenti (8)

Na slici je shematski prikazan PrP^C. Škare predstavljaju mjesta cijepanja, razgranate strukture predstavljaju glikozilacijske motive. CC: Pozitivno nabijena domena, OR: Oktaponavljaajući slijed, HD: histind bogata domena, SS: Disulfidni most

Struktura i regulacija gena PRNP

Gen PRNP se nalazi na kratkom kraku (p) 20. kromosoma kod ljudi, počevši od 4 615 068 do 4 630 233 baznog para (15). Transkripcijom gena PRNP nastaje mRNA koja sadržava samo jedan kodirajući egzon, što ukazuje na to da raznovrsnost formi i funkcija proteina PrP^C nisu posljedica post-transkripcijskih, već post-translacijskih modifikacija.

Nekoliko stresora modulira ekspresiju gena PRNP (16), uključujući toplinski stres, koji potiče ekspresiju cijele skupine proteina koje nazivamo proteinima toplinskog stresa (eng. *heat shock proteins*, Hsp). U stanicama neuroblastoma, primijećeno je kako toplinski stres uvjetuje jaču ekspresiju i mRNA i proteina PrP^C, kao i proteina Hsp70 (13). Također u neuroblastomskim stanicama, hiperbarični kisik i hipoglikemija su pojačali ekspresiju PRNP i Hsp70 (17). PrP^C veže bakar. U staničnoj kulturi ljudskih trofoblata i stanica placente kao i *in vivo* u nekoliko linija miševa bakar i hipoksija mogu povećati ekspresiju PrP^C-a koji štiti stanice od nakupljanja Cu i stvaranja reaktivnih vrsta kisika u stanju oksidativnog stresa (18). PRNP je bio pojačano eksprimiran što se vidjelo na razini mRNA i samog PrP^C, u staničnim kulturama kortikalnih i hipokampalnih neurona te u staničnoj liniji PC12, kad su izložene bakru, no ne i u staničnoj liniji glioma C6 (19). Nadalje, uočena je povećana ekspresija PrP^C u mukozalnim stanicama pacijenata s *Helicobacter Pylori* gastritisom, dok je bila smanjena u upalnim bolestima kolona(20). U upalnim bolestima kože također je uočena pojačana ekspresija PrP^C u keratinocitima (21). Sve navedeno upućuje na njegovu moguću funkciju u regulaciji oksidativnog stresa. Obzirom da u svim istraživanjima nije bila kvantificirana i mRNA i protein, još je dvojbeno je li primijećena povećana koncentracija proteina PrP^C rezultat isključivo pojačane ekspresije gena ili primjerice smanjene razgradnje samog proteina PrP^C.

Ekspresija i distribucija PrP^C

Stanični prionski protein PrP^C je ubikvitarno prisutan u organizmu. PrP^C se snažno eksprimira u živčanom sustavu, međutim njegove razine nisu podjednake u različitim regijama mozga,

vrstama stanica i među neuronima drugačijeg neurokemijskog fenotipa, najviše se eksprimira u GABAergičnim neuronima (22,23). Osim u centralnom živčanom sustavu, PrP^C se snažno eksprimira u različitim stanicama imunološkog sustava, u koštanoj srži, krvi, također ga mnogo ima u testisima, očima, placenti i uterusu. Dok količina mRNA za većinu proteina dobro korelira s količinom proteina (22), kod prionskog proteina uočene su značajne razlike između razine ekspresije mRNA i jačine imuno-histokemijskog signala proteina u određenih stanica (23). Specifično, u dopaminergijskim neuronima substantia nigre, locus coeruleus, i olfaktornih glomerula negativnim na nalaz proteina PrP^C je utvrđena visoka količina PrP^C mRNA. Također u dubokim kortikalnim jezgrama svi su neuroni ekspimirali visoke razine mRNA, ali samo su interneuroni imali snažan signal na PrP^C (24). U radu iste grupe, koristeći slične tehnike u ne-živčanim tkivima i perifernim neuronima nisu uočene značajne razlike između količine mRNA i pripadajućeg proteina PrP^C, mogući razlog za to bi mogao biti da stanične linije imaju puno sporiju stopu internalizacije PrP^C nego li primarne kulture, što je dokazano (25). Očekivano, gdje imamo mRNA trebali bismo imati i protein, što ovdje nije slučaj. Takva situacija može upućivati na izrazito brzi stanični metabolizam priona u moždanim neuronima koji bi jako brzo uklonio PrP^C, vjerovatno preko cerebralnih granula (24). Također, PrP^C se pojačano ispoljava aktivacijom T stanica, monocita, i dentritičnih stanica, a intracelularnih PrP^C migrira na staničnu površinu nakon aktivacije (7). Količina proteina PrP^C i mRNA je smanjena za vrijeme diferencijacije stanica koštane srži u granulocitnu lozu.

Stanična lokalizacija

S izuzetkom manje zastupljenih transmembranskih i cijepanih oblika, PrP^C provodi veliku većinu životnog vijeka vezan za membranu putem GPI-sidra (26). Što se tiče njegovog smještaja na razini stanice, kao mnogi proteini vezani za GPI-sidro, PrP^C se asocira sa lipidnim splavima, koja su područja bogata kolesterolom i sfingomijelinom. Asociranost proteina s lipidnom splavi se utvrđuje tretiranjem membrane s ne-ionskim deterdžentom poput Triton X-

100 jer je uočeno da drugačiji lipidni sastav lipidnih splavi čini da ih deterdžent ne otopi, dok ostatak membrane bude otopljen. Ako se utvrdi da je jedan protein još uvijek vezan za membranu nakon tretiranja s ne-ionskim deterdžentom, onda se to smatra dokazom njegove asocijacije sa lipidnom splavi. PrP^C se nalazi vezan za membranske domene otporne na deterdžente (*eng. Detergent Resistant Membrane, DRM*), ali ne isključivo, jer iako njegovo postojanje unutar lipidnih splavi je nedvojbeno, otprilike 30-50% PrP^C bude otopljeno pri tretiranju s Triton X-100 (27). Općeprihvaćeno je kako su membranske splavi male (10-200 nm), heterogene, visoko dinamične domene bogate sterolima i sfingolipidima, koje mogu odijeliti stanične procese te biti stabilizirane protein-protein i protein-lipid interakcijama da bi stvorile veće platforme (28). Lipidne splavi predstavljaju kritične točke u mnogim staničnim procesima poput invazije patogena, regulacije proteina, slaganja lipida i staničnog signaliranja (29). Specifičnije, PrP^C se nalazi u vrsti lipidne splavi koja ima morfološki izgled jamice, takozvane obložene jamice ili klatrinom bogate domene dok se ostatak količine PrP^C nalazi u domeni membrane koja nije lipidna splav (27). Istraživanju provedeno na liniji limfoblastičnih stanica pokazalo je kako se molekule PrP^C koje se ne nalaze u lipidnim splavima, regrutiraju u njih po vezivanju protutijela na PrP^C (30).

Endosomalni sustav stanice

Endocitoza

Membrana i molekule koje su joj asocirane se za vrijeme života stanice neprestano internaliziraju i recikliraju. Postoji velika raznolikost u razmjerima korištenja i dinamici puteva endocitoze ovisno o vrstama stanica kao i o uvjetima u kojima stanice žive.

Internalizacija predstavlja gubitak molekula na površini stanične membrane kao neto rezultat kombiniranog utjecaja endocitoze (ulazak molekula u unutrašnjost stanice) i recikliranja (povratak endocitiranih molekula na površinu stanice). To znači da razmjer i brzina internalizacije ovisi o stopi endocitoze i o stopi recikliranja. Endocitozna aktivnost plazmatske

membrane može biti izrazito visoka pri čemu cijela površina stanice bude izmijenjena jednom do pet puta u sat vremena (31). Ako membranski protein ima veću stopu endocitoze, nego li recikliranja, višak proteina se nakuplja unutar stanice. Do smanjenja stope recikliranja, uslijed mijenjanja unutarstaničnog transporta, može doći primjerice za vrijeme virusne infekcije stanice.

Prilikom endocitoze, materijal koji treba unijeti u stanicu biva zaokružen odsječkom stanične membrane koji zatim pupa u stanicu i oblikuje vezikulu koja sadržava uneseni materijal. Pojedini dijelovi plazmatske membrane koncentriraju membranske proteine koji posjeduju specifične motive. Takve motive prepoznaju specijalizirani proteini, primjerice obitelj adaptorskih proteina (AP) (32), što dovodi do brze endocitoze prepoznatih proteina s mobilizacijom kompleksnog staničnog mehanizma u kojem klatrin obloži jamice iz kojih se generiraju vezikule obložene klatrinom. Mnogi proteini, na primjer transferinski receptor TfR i receptor za epidermalni faktor rasta EGFR se služe endocitozom ovisnoj o klatrinu (32).

Proteini koji ne podliježu ovom putu endocitoze i koji ne posjeduju uzorke za klatrin-ovisnu endocitozu unose se u stanicu klatrin-neovisnim nosačima koji se stvaraju na plazmatskoj membrani. Dio tih nosača je asociiran na protein kaveolin (kaveolin-ovisna endocitoza), dok se drugi dio povezuje sa Arf6 GTP-azama (Arf6-asociran put) ili cdc42 GTPazom (cdc42-ovisan put) (33).

Stvaranje deformacija membrane i razvitak endocitoznih jamica ovisi o lipidnom sastavu uključene regije membrane, efektorskim molekulama i asocijaciji citoskeleta.

Endosomalni put

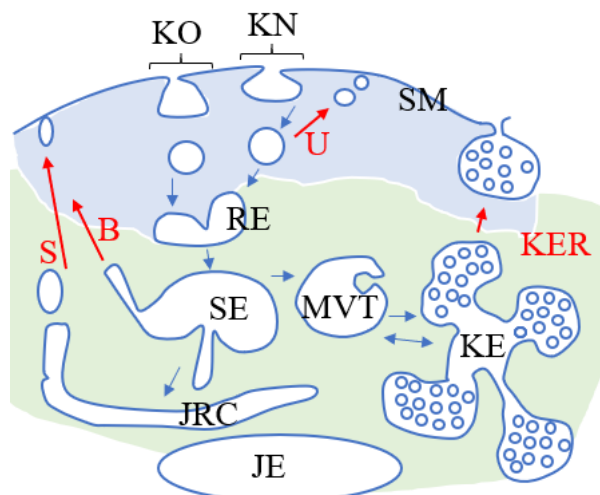
Prilikom endocitoze fosfolipidni sastav vezikula obloženih klatrinom se mijenja, povećava se udio fosfatidilinozitol 3-fosfata u njihovoj membrani. Vezikule vežu GTP-azu Rab5 i rani endosomalni antigen 1 (*eng. Early endosomal antigen 1* EEA1), potom se mikrotubuli vežu na

vezikule, za što je potreban Rab5, te vezikule postaju klasični rani endosomi (34). Netom prije stupnja ranog klasičnog endosoma počinje ubrzano recikliranje. Ubrzano recikliranje (*eng. Rapid recycling*) (35), događa se blizu površine stanice i zahtijeva aktinski citoskelet u procesu koji nije još sasvim razjašnjen. Klatrin-neovisni endocitozni prijenosnici sazrijevaju na poput klatrin-ovisnih prijenosnika osim što tijekom sazrijevanja, sudjeluju u procesu recikliranja stvaranjem reciklirajućih izdanaka koji poprimaju oblik cijevi (36). Rani endosomi koji su vezani za mikrotubule putuju dalje prema središtu stanice, a za to vrijeme primaju dodatne vezikule i kontinuirano stvaraju reciklirajuće domene koje vraćaju molekule natrag na površinu stanice. Taj put se zove brzi reciklirajući put (*eng. Fast recycling*) (37). Rab4 i Rab35 su molekule koje pospješuju stvaranje reciklirajućih domena i omogućuju posljedično stvaranje i otpuštanje reciklirajućih vezikula što pomaže brzom recikliranju. Konačno, kad rani endosomi dođu do središta stanice, većina membranskih proteina koje prenose odjeljuju se u endolizosomalnim domenama, koje sazrijevanjem daju kasne endosome. Ostatak se prenosi u endosomalne odjeljke tubularnog oblika koji su koncentrirani oko središta stanice i nazivaju se juksta-nuklearni reciklirajući odjeljak (*eng. Juxtannuclear recycling compartment JRC*). Molekule se recikliraju polako nazad od JRC do plazmatske membrane (34). Vežanje Rab 11 za rane endosome uzrokuje njihovu pretvorbu u mrežu reciklirajućih tubula i pomaže sporom recikliranju. Kasni endosomi prenešene molekule dostavljaju lizosomima za razgradnju. Međutim, još uvijek je moguće da molekula pređe u kasni endosomalni put recikliranja (*eng. Late-endosomal recycling pathway, lerp*). Samo 5 % plazmatske membrane se *de novo* sintetizira svakog sata, dok se, u isto vrijeme, endocitozom unosi u stanicu količina membrane koja odgovara 1 do 5 puta površini cijele stanice. To znači da se velika većina unesene membrane mora reciklirati (31).

Zbog kompleksnosti endosomalnog sustava i regulatorne mreže, stanični putevi koje molekule koriste moraju se utvrditi za svaku molekulu zasebno. No, nekoliko puteva je dobro razjašnjeno

pa mogu služiti za istraživanje puteva drugih molekula. Primjerice, receptori na površini stanice koji posjeduju specifični motiv koji može vezati AP-2 kompleks se konstitutivno unose u stanicu klatrin-obloženim vezikulama što omogućuje njihovo recikliranje brzim reciklirajućim putem. Jedan primjer je transferinski receptor koji kad je vezan za svoj ligand transferin, koristi klatrin-ovisan put pa se zatim reciklira brzim i sporim reciklirajućim endosomalnim putevima (38). Receptor za epidermalni faktor rasta koji je vezan za epidermalni faktorom rasta reciklira kasnim endosomalnim putem recikliranja, a kad nije vezan za ligand, reciklira brzim endosomalnim reciklirajućim putem (39).

Unutarstanični prijenos proteina s GPI-sidrom je ovisan o maloj GTP-azi, cdc42. Proteini s GPI-sidrom, neovisno o tome u kojoj su smješteni mikro-domeni, to jest jesu li u lipidnoj splavi ili ne, internaliziraju cdc42-ovisnim putem i bivaju smješteni u posebni endosomalni odjeljak koji je bogat GPI-vezanim proteinima (*eng: GPI-AP Enriched Endosomal Compartment GEEC*). Zatim se prenose u JRC i recikliraju natrag na površinu stanične membrane sporim reciklirajućim putem. Također je pokazano da deplecija kolesterolom, uobičajena metoda inhibicije sinteze lipidnih splavi, smanjuje stvaranje GEEC (40).



Slika 3: Pregled endosomalnog sustava

Na slici je djelomično prikazana dio stanice i sažet unutarstanični transport te odjeljci koji sudjeluju u njemu. Unutarstanični putevi koji internaliziraju materijal s površine su prikazani plavom strelicom, dok su reciklirajući putevi prikazani crvenim strelicama. Crvenim slovima su označeni U: Ubrzani reciklirajući put; B: Brzi reciklirajući put; KER: Kasni endosomalni reciklirajući put; S: Spori reciklirajući put. Crnim slovima su označeni KO: Klatrin-ovisna endocitoza; KN: Klatrin-neovisna endocitoza; SM: Stanična membrana; RE: Rani endosom; SE: Sortirajući endosom; MVT: Multivezikularno tijelo; KE: Kasni endosom; JRC: Jukstaklearni reciklirajući odjeljak; JE: Jezgra stanice

Unutar stanični transport, PrP^C

PrP^C se prilikom sinteze poput drugih membranskih proteina translocira u endoplazmatski retikulum zahvaljujući signalnom peptidu koji se nalazi na NH₂ kraju. Signalni peptid se zatim cijepa unutar lumena endoplazmatskog retikuluma. Na taj način započinje sintetiziranje sva tri oblika PrP^C-a u endoplazmatskom retikulumu. Glavni oblik koji predstavlja većinu PrP^C sinteze in vivo se modificira dodavanjem GPI sidra, dok se druga dva oblika, transmembranski proteini -COOH transmembranski oblik ^CtmPrP i -NH₂ transmembranski oblik ^NtmPrP, umeću u membranu zahvaljujući hidrofobnoj regiji između aminokiselina 110-134 (41).

Fiziološka uloga transmembranskih oblika je nepoznata. Međutim transgenični miševi koji eksprimiraju samo ^CtmPrP razvijaju neurološku bolest koja nalikuje na neurotoksičnost u nekim prionskim bolestima. Gomilanje ^CtmPrP-a u Golgijevom aparatu, i njegova posljedična disfunkcija bi mogli biti uzrok neuropatologije (42). Upravo transmembranska domena ^CtmPrP-a sadrži vezno mjesto gdje se protein hop/STI1 (Hsp70 kod sisavaca) veže na PrP.

Značaj promjenjivih količina PrP^C u citosolu, koje se uobičajeno nalazi nakon inhibicije razgradnje putem proteasoma ili hiperindukcije PRNP, ali i kod pojedinih normalnih stanica

poput cerebelarnih neurona, nije razjašnjena. No, u kulturi ljudskih neurona, citosolni PrP^C nije toksičan i može imati dapače i anti-apoptotička svojstva u procesu stanične smrti posredovane Bax proteinom (43). Kod ljudi koji imaju mutaciju uslijed koje izostaje translokacija proteina PrP^C u citosol, izgubljena je njegova anti-apoptotična funkcija (44). Kada je mutirani tip proteina umjetno eksprimiran u citosolu, kod mutanata koji su prije pokazivali nedostatnu anti-Bax aktivnost, vraćene su anti-apoptotične funkcije mutanata, što je bilo dokaz da je gubitak funkcije bio uzrokovan izostankom translokacije u citosol.

Glikozilacijski motivi PrP^C također utječu na njegov stanični promet i biofizičke osobine. Miševi koji su eksprimirali mutiranu verziju PrP^C-a koji je neglikoziliran pokazali su akumulaciju proteina u Golgijevom aparatu. (45).

Endocitoza i internalizacija PrP^C

Kao i drugi proteini vezani za GPI sidro, PrP^C se internalizira u unutarstanične odjeljke. Kokošji PrP^C koji je transfektiran u neuroblastomsku staničnu liniju N2a ciklički internalizira u endosomalni odjeljak pa zatim ponovno na površinu stanice s poluvremenom ($t_{1/2}$) od 20-30 minuta (46). Endogeni PrP^C u senzornim neuronima internalizira sličnom brzinom kao i transferinski receptor koji ima $t_{1/2}$ od 3-5 min (27). Isto istraživanje je pokazalo da se 25% obilježenog PrP^C u N2a stanicama internaliziralo nakon 10 min, što je sporija kinetika nego kod senzornih neurona.

U staničnoj kulturi stanica N2a koje su hiper-eksprimirale nefunkcionalni ili jako slabo funkcionalni dinamin došlo je do akumulacije PrP^C na vanjskoj strani stanične membrane. Dinamin je ključni protein endocitoze jer njegova polimerizacija, ovisna o GTPaznoj aktivnosti, dovodi do odvajanja membranskih uvučenja u unutrašnjost stanice. To dokazuje da je potrebna aktivnost dinamina za internalizaciju PrP^C koji je ispoljen na površini stanica (47). Dokazana je i smanjena endocitoza PrP^C za 70% u staničnoj kulturi N2a tako što se izložilo stanice hiper-

osmotskom mediju, što je mogući eksperimentalni način inhibicije klatrinsko-ovisne endocitoze. Nedostatak klatrina je bio potvrđen u tim stanicama (48). Također se pokazalo da prisutnost pentozan sulfata u mediju, tvari koja je poznata po svojim anti-virusnim svojstvima, povećava endocitozu PrP^C (49). No PrP^C nema transmembranskih domena koje bi mogle biti u interakciji s klatrinskim adaptatorskim proteinima, što je indikacija da postoji posredni protein koji bi bio u interakciji s klatrinskim adaptatorskim proteinima i PrP^C-om. Osim što se PrP^C internalizira sličnom brzinom kao i transferin, protein kod kojeg je poznata uloga klatrin ovisne endocitoze, njegova internalizacija je inhibirana u prisutnosti Cu²⁺ Tyrphostin A23, tvari koja inhibira endocitozu transferina (50).

1992. godine dokazana je lokalizacija PrP^C u lipidnim splavima (51), 1996. godine je lokaliziran u kaveola-sličnim domenama (52). Sama prisutnost PrP^C-a unutar DRM je ranije smatrana kao dokaz njegove internalizacije kaveolama (27), jer, u pravilu, endocitoza ovisna u klatrinu se događa izvan lipidnih splavi (53). Pokazalo se da PrP^C koji je lokaliziran u kaveola-sličnim domenama, prije svoje internalizacije kod N2a i kod senzornih neurona, brzo napušta te domene i ulazi u obložene jamice, što bi objasnilo njegovu ovisnost o klatrinskim putevima ali i lokalizaciju u DRM (27). Suprotno, u drugim istraživanjima uočen je izostanak kaveolina kod N2a stanica, jer nije bilo detektiranog signala nakon imunofluorescentnog bojanja kaveolina (48,54). Međutim u N2a stanicama u kojima je količina klatrina bila umanjena zbog siRNK interferencije, što se provjerilo odsutnošću internalizacije transferina, nije nađeno značajno smanjenje internalizacije PrP^C-a, bilo u prisutnosti Cu²⁺ ili kad ga nije bilo. Nadalje, kod inhibicije kaveolin-ovisnog endocitoznog puta filipinom ili nistatinom, internalizacija PrP^C je bila značajno blokirana dok internalizacija transferina nije bila inhibirana. Internalizirani PrP^C je bio kolokaliziran s drugim proteinima za koje je već bilo poznato da se internaliziraju klatrin-neovisnim putem Arf6, Cholera toxin-B, CD98, i MHC I (55).

Manja frakcija PrP^C proteina se u fiziološkim uvjetima cijepa oko 110. aminokiseline. Dokazano je da se COOH-ostatak, vezan za GPI sidro, ne internalizira (46). Dokazano je da se hibridni protein koji se sastoji od N-terminalne domene proteina PrP^C-i dijela proteina Thy-1, koji je sličan COOH-ostatku PrP^C-a i koji se internalizira putem ovisnom o klatrinu internalizira slično kao nativni PrP^C, a ne kao nativni Thy-1. To dokazuje da je NH₂ terminalna domena PrP^C-a ključna i odgovorna za njegovu internalizaciju u stanicu (27). Također, u tom istraživanju je pokazano da supstitucijom triju aminokiselina sekvence NH₂-KKRPKP, mutirani protein uopće nije internalizirao (27). Upravo ova sekvencija je vrlo moguće vezno mjesto za protean sulfat, koji povećava endocitozu PrP^C-a (46), a sve to upućuje na to da su polianionski glikani dio mehanizma endocitoze PrP^C.

Uloga PrP^C u imunosnom odgovoru

PrP^C se može naći u mnogim tkivima i stanicama vezanim za imunost. PrP^C se nalazi u mikroglijalnim stanicama (56), no nije utvrđeno je li njegova ekspresija vezana za M1 inflamatorni podtip mikroglije koji luči TNF- α , IL-1 β , i IL-6 ili pak M2 podtip mikroglije koji luči imuno-supresivne citokine IL-10 i TGF- β . Međutim, uočeno je kod PrP^C knockout miševa manje lučenje protu-upalnog citokina IL-10 u LPS-induciranoj kroničnoj upali, što upućuje na vjerojatnu pozitivnu ulogu PrP^C u M2 mikroglijama (57).

Matične stanice su smještene u posebnom regulatornom mikro-okolišu ili niši gdje im je pružena podrška za preživljavanje i zadržavanje sposobnosti diferencijacije u mnoge tipove stanica te zaštita ne samo od citotoksičnog učinka vanjskih faktora, već i od vlastitog imunološkog sustava. Testis, dlačni folikuli i placenta svi posjeduju matične stanice i imunosupresivni okoliš te se smatraju imunopriviligiranim mjestima. PrP^C je snažno eksprimiran u živčanim i ne-živčanim populacijama matičnih stanica, uključujući hematopoetske matične stanice (HMS). T-regulatorne stanice štite HMS i pružaju imunopriviligiranost putem IL-10 i drugih čimbenika (58). Činjenica kako se PrP^C eksprimira

u visokim razinama i kod nezrelih HMS i kod TREG ukazuje kako bi mogao igrati ulogu u međudjelovanju tih stanica. Diferencijacijom u stanice granulocitne loze, HMS značajno smanjuju ekspresiju PrP^C, a diferencijacijom u stanice limfocitne ili monocitne loze održavaju ekspresiju PrP^C konstantnom. Od limfocitnih stanica T-stanice i NK-stanice imaju puno veće razine PrP^C od B-limfocita, što se može povezati s opažanjem da B-stanice nisu inhibirane u imunoprivilegiranim mjestima.

Vrlo snažan dokaz uloge PrP^C u imunološkim reakcijama je njegova lokalizacija u imunološkim sinapsama, poput one potaknute antigenom između dendritičke stanice (DC) i T-stanice. Stanice DC bez PrP^C su puno manje aktivirale T-stanice, dok izostanak PrP^C u T-stanicama nije promijenio stanični odgovor potaknut antigenom (59). Zaključci ovih istraživanja su bili da je PrP^C negativni regulator signalizacije receptora T-stanica te da PrP^C mijenja upalnu reakciju u neuronima.

Utjecaj PrP^C na signalne puteve unutar stanice

Signalni putevi putem kojih PrP^C doprinosi utišavanju imunološke reakcije nisu dovoljno istraženi. No, vrlo vjerojatno se njihov doprinos preklapa s bolje istraženom ulogom PrP^C u cito-protektivnoj signalizaciji. Obzirom da je protein PrP^C u najvećoj mjeri vezan na površinu stanice putem GPI-sidra, signaliranje ovisi o njegovoj mogućnosti uključenja u makromolekularne komplekse na staničnoj površini. Vanstanični ko-šaperon STI1 je identificiran kao ligand proteina PrP^C i dokazano je snažni induktor PrP^C-ovisne signalizacije (60). STI1-PrP^C interakcija štiti retinalne i hipokampalne neurone od kemijski inducirane apoptoze, u oba slučaja preko cAMP-ovisne protein kinaze A (PKA). Neuro-protektivno djelovanje ovog para je potpomognuto regrutiranjem mTOR kompleksa i inaktivacijom GSK3β kinaze (61), čija prekomjerna aktivnost šteti neuronima. Nadalje, astrociti mogu lučiti STI1, što je u skladu s njihovom imunosupresivnom djelatnošću u centralnom živčanom sustavu (62). Zanimljivo je da astrociti mogu otpustiti STI1 kao odgovor na nedostatak kisika ili glukoze i na taj način bi

mogli pokrenuti neuroprotektivne signale preko PrP^C. STII je induciran u ishemičnoj moždanoj ozljedi i sudjeluje u oporavku sa PrP^C-om (63). STII-PrP^C protektivna signalizacija događa se i u placenti, jednom drugom važnom imunoprivilegiranom mjestu (64). Također, vezanje STII za PrP^C potiče samo-obnavljanje živčanih matičnih stanica (65).

Kod imunoloških stanica PrP^C se ispoljava na površini limfocita, a nakon aktivacije pojačano se eksprimira. PrP^C je dio signalnog kompleksa uključenog u aktivaciju T-stanica (66). Metodom imunoprecipitacije je utvrđeno kako dolazi da udruženja PrP^C i signalizirajuće tirozin kinaze Fyn, i, da je u aktiviranim T-stanicama, PrP^C bio kolokaliziran s proteinom ZAP-70 (*eng: Zeta chain-associated protein kinase 70*), koji je u središtu T-stanične receptorske signalizacije (66). Nakon blokiranja PrP^C s PRNP siRNA u limfocitima, uočena je pojačana aktivacija ZAP-70 (67).

Citomegalovirusna infekcija i utjecaj na biologiju staničnog transporta.

Herpesviridae je velika obitelj virusa koji uzrokuju bolest u čovjeka i u mnogim sisavcima. Obilježja herpesvirusne obitelji su sveprisutnost, latencija, neizlječivost, reaktivacija, „tiha“ infekcija i oportunistične infekcije. Nakon početne kraće faze primarne infekcije, koja u imunološki zdravih osoba uglavnom prođe nedijagnosticirano, herpesvirusi uzrokuju latentne infekcije, a njihova sposobnost skrivanja od imunološkog sustava organizma domaćina omogućuje im da se kasnije reaktiviraju. Među herpesvirusima, citomegalovirusi (CMV) imaju najveći broj gena koji mijenjaju urođenu i adaptivnu imunološku reakciju domaćina. Većina virusnih proteina citomegalovirusa ima upravo takvu ulogu (68).

Mišji citomegalovirus (MCMV) je herpesvirus iz podporodice *betaherpesviridae*, sadrži dvolančanu DNK, kapsidu i virusni omotač u kojem se ističu glikoproteinski šiljci. Citomegalovirusi su specifični za vrstu, tako je virusu MCMV-a isključivi domaćin miš. Dijametar viriona je oko 150-200 nm. Patološki gledano, infekcija dovodi do sistemske

viremije. Glavna mjesta virusne replikacije su žlijezde slinovnice, jetra, slezena, nadbubrežne žlijezde, limfni čvorovi, bubrezi, pluća, crijeva i pankreas (69).

Mikroskopski se vide intra-nuklearne inkluzije, moguće je povećanje stanica, kao i stanice koje sadržavaju više jezgri. U citoplazmi se mogu vidjeti bazofilna citoplazmatska inkluzijska tjelešca i često nekroza. Produktivna infekcija završava smrću stanice.

Da bi izbjegli nadzor imunskog sustava domaćina, herpesvirusi su razvili raznolike mehanizme koji im omogućuju jedinstvenu sposobnost cjeloživotnog preživljavanja u inficiranim domaćinima u obliku latentne infekcije sa sposobnošću reaktivacije kad je imunski sustav oslabljen. Ovi mehanizmi se temelje na sintezi proizvoda virusnih gena koji specifično zaustavljaju sintezu ili unutarstanični transport različitih efektorskih molekula nespecifičnog i specifičnog imunskog odgovora (70). Svi članovi herpesvirusne obitelji mogu na neki način mijenjati sve ili neke efektorske funkcije imunskog odgovora. Ta promjena imunskog odgovora je u značajnom broju slučajeva uzrokovana smanjenjem broja molekula na plazmatskoj membrani inficirane stanice koje sudjeluju u imunskom prepoznavanju, bilo da se radi o inficiranoj stanici pojedinog organa ili inficiranoj stanici koja je uključena u samo imunsko prepoznavanje, kao što su antigen-predočavajuće stanice. Molekularni ciljevi virusnih proteina su često molekule poput molekula MHC I koje predočuju viralne antigene glavnim efektorskim stanicama sa specifičnom imunošću (stanice CD8⁺ T, stanice CD4⁺ T), ili molekule koje predstavljaju ligande za aktivaciju urođenog imunskog sustava, primjerice stanica NK. Ukratko, citomegalovirusi aktivno sprječavaju predočavanje antigena limfocitima CD8⁺ i CD4⁺ T i aktivaciju stanica NK sprečavanjem površinskog ispoljavanja liganada za receptore na površini tih stanica (71). Molekularni mehanizmi putem kojih virusni produkti djeluju na svoje mete, uglavnom proteine stanica domaćina, su vrlo raznoliki i uključuju gotovo sve razine stanične mašinerije, s konačnim rezultatom – izostanak ispoljavanja molekula na površini stanica koje bi mogle ugroziti virus. Određene molekule zadužene za imunsko

prepoznavanje ometene su u sazrijevanju u najranijim stupnjevima 3D-strukturiranja ili je zaustavljen njihov unutarstanični transport za vrijeme biosinteze. CMV remeti mnoge stanične procese, pogotovo vezikularni sustav (71). Pojedini virusni produkti mogu smanjiti ispoljavanje svojih proteina-meta na površinu stanica mijenjajući svojstva njihove specifične endocitoze ili određenih endocitoznih puteva proteina plazmatske membrane.

Svrha rada

Suprotno očekivanjima, obzirom da je PrP^C evolucijski sačuvan i visokokonzerviran među vrstama, postojeći sojevi knock-out miševa za gen PRNP ne izražavaju jasne promjene u fenotipu. Iz istog razloga ključna fiziološka uloga staničnog prionskog proteina niti danas nije postala jasna. Jedna od hipoteza je kako bi njegova uloga mogla biti izraženija prilikom izlaganja organizma stresu, i to ne isključivo u vidu protektivnog učinka na stanice putem utjecaja na puteve stanične smrti, već da bi PrP^C ulogu mogao imati i u kontroli imunskih reakcija. Jedan od prijedloga koji za sada ima značajniju potkrijepljenost eksperimentalnim dokazima je smirivanje upalnih procesa u imunoso privilegiranim mjestima. Činjenica je da miševi bez funkcionalnog PrP^C imaju puno teži tijek bolesti u modelima multiple skleroze i ishemijske ozljede.

Istraživanje citomegalovirusne infekcije, koja za najznačajniju posljedicu po čovjeka ima potencijalno pogubni utjecaj na razvoj mozga djece tijekom trudnoće, je ekspertiza Centra za Proteomiku i šireg Medicinskog Fakulteta u Rijeci i njegovih istraživača koji su sudjelovali u izradi ovog diplomskog rada. Obzirom da mozak predstavlja par excellence primjer imunoso privilegiranog mjesta, njihova namjera je u budućem periodu ispitati utjecaj proteina PrP^C na tijek imunološkog odgovora i oštećenja organa uslijed citomegalovirusne infekcije.

Svrha ovog rada bila je uspostaviti metodu za vizualizaciju i praćenje proteina PrP^C ispoljenog na plazmatskoj membrani neuralnih stanica. Naime, iako do danas receptor za PrP^C na stanicama imunološkog sustava nije karakteriziran, zna se da neke stanice, poput makrofaga i stanica NK, reagiraju na količinu proteina PrP^C na površini stanice. Dodatni zadaci sastojali su se u uspostavljanju infekcije mišje stanične linije neuralnih stanica mišjim citomegalovirusom, obzirom da takva vrsta stanične kulture još u laboratoriju nije bila korištena za analizu citomegalovirusne infekcije stanice. Konačno, zadatak je bio uspostaviti analizu novim mikroskopom koji je upravo instaliran u Centru za Proteomiku. Novopristigli mikroskop koji se koristio za analizu je bio Leica TCS SP8. Mikroskop ima četiri fluorescentna kanala pokrivena s 4 detektora, 2 klasična (PMT) i 2 visoke osjetljivosti (GaAsp = Hybrid = HyD) detektora. Korišteni su laseri s ekscitacijskim linijama: diode 405 nm (UV laser), Ar laser 488 nm, DPSS laser 561 nm i HeNe laser 633 nm.

U ovom istraživanju odlučili smo se koristiti linijom neuroblastomskih stanica N2a jer služe kao modelne stanične linije za istraživanje fiziologije PrP^C. N2a stanice uvijek sintetiziraju PrP^C, ali mijenjaju njegov unutarstanični prijenos u različitim situacijama, na primjer u odgovoru na povećanu koncentraciju bakra kad dolazi do veće internalizacije PrP^C. Unutarstanični prijenos PrP^C mogao bi biti promijenjen u infekciji MCMV-om, jer su prethodno uočene promjene endosomalnih puteva stanice tim virusom.

Novi konfokalni mikroskop Medicinskog Fakulteta u Rijeci Leica TCS SP8 omogućuje praćenje istovremeno većeg broja fluorofova, što je iskorišteno u ovom radu da bi se moglo promatrati moguću kolokalizaciju PrP^C-a s Adaptorskim Proteinom 1 (AP1) koji je inače uključen u prijenos između trans-Golgijske mreže, endosoma i plazmatske membrane, a u okviru ovog rada služi za obilježavanje staničnog odjeljka koji se stvara u CMV infekciji zbog ometanja endosomalnog prijenosa u stanici. Također će se koristiti biljeg jezgre zbog lakšeg snalaženja i biljeg virusne infekcije.

Rezultati ovog istraživanja bi mogli biti važni i za shvaćanje unutarstaničnog prijenosa PrP^C, primjerice njegovo gomilanje u AP1-pozitivnom odjeljku bi moglo ukazati na specifične puteve koje koristi u unutarstaničnom prijenosu. Promijenjeno ispoljavanje PrP^C na površini stanice bi moglo značiti da je uključen u imunološkoj reakciji stanica i organizma na infekciju CMV-om.

Materijali i postupci

Materijali

- **Ledeno hladan metanol (-20°C)**
- **10% Dulbeccov modificirani minimalni esencijalni medij (DMEM)**
Medij DMEM (GIBCO), 10% Fetal Calf Serum, 100 µg/ml streptomycin sulfat, 100 U/ml penicilin, 2 mM L-glutamin, 1mM Sodium Pyruvate, NEAA, 1,5g/L NaHCO₃
- **Fosfatima puferirana fiziološka otopina (PBS), pH 7.2**
8 g/l natrijev klorid, 0,2 g/l kalijev klorid, 2,9 g/l natrijev hidrogen fosfat-12-hidrat, 0,2 g/l kalijev dihidrogen fosfat
- **Medij za smrzavanje stanica**
70% medij RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium), 20% FCS, 10% DMSO (dimetilsulfoksid koji je krioprotektant)
- **Tripansko modriilo 0,8mM**
- **Mowiol, sredstvo za uklapanje**
- **Pročišćena voda**
- **Etanol 70%**
- **Paraform**

- **Triton X-100**
- **Petrijeve posude srednje veličine (promjer 83 mm), sterilne**
- **Ploča s dvanaest bunarčića**
- **Stakalca okrugla, sterilna**
- **Mikroskopsko staklo**
- **Pipeta**
- **Parafilm**
- **Laboratorijska staničevina**
- **Mikropipete različitih veličina**
- **Konfokalni mikroskop Leica TCS SP8**
- **Hladnjak, +4°C, -20°C**
- **Inkubator SANYO 37,0 °C, 5,0% CO₂**
- **Mrežica za stanice₂ veličina pora 100µm**
- **Optički mikroskop, Motic AE20**
- **Protočni citometar DB FACS AriaTM Ilu**
- **Centrifuga, velika, Thermo Electron Corporation Jouan Cr4i**
- **Centrifuga, mala, Hettich Zentrifugen ROTINA 380 R**

Stanična linija

- **Neuro 2A, N2a neuroblastoma**

N2a stanična linija su stanice neuroblastoma iz mišjeg mozga. Morfološki imaju neuronalni i ameboidni izgled. Stanice su adherente. Poznato je da mogu biti inficirane sa različitim virusima uključujući citomegalovirus, Svjetska Zdravstvena Organizacija preporučuje njihovo korištenje za dijagnozu virusa bjesnoće (72). Također je dokazano da kod stanične linije N2a endocitoza je neovisna o kaveolinu ali može koristiti klatrin ovisne puteve (27).

Protutijela

anti-PrP, D18 1mg/mL, razrjeđenje 1:200.

anti IE1, IE1.01 protutijelo, 1mg/ml, proizvedeno u Centru za proteomiku, razrjeđenje 1:100

anti AP1, anti-mouse γ 1-adaptin, Santa Cruz Biotechnology, razrjeđenje 1:100

FITC anti-human IgG, Jackson ImmunoResearch, razrjeđenje 1:100

APC anti-mouse IgG, F(ab')₂, Santa Cruz Biotechnology, razrjeđenje 1:200

TRITC anti-rabbit IgG, F(ab')₂, Santa Cruz Biotechnology, razrjeđenje 1:100

DAPI (1:1000)

Virus

FSH, rekombinantni mišji citomegalovirus, mutant Δ m138/fcr-1 (Crnkovic-Mertens et al., 1998)

Postupci

1. Odmrzavanje i uzgoj stanica

Stanice se čuvaju na -80°C u mediju za smrzavanje (10%-tni DMSO [dimetilsulfoksid], 20% FCS, 70% RPMI), koji je inače toksičan za stanice na sobnoj temperaturi. Prilikom odmrzavanja, alikvot stanica je zagrijan u vodenoj kupelji na 37°C te je potom ispran s 30 ml DMEM medija, kako bi se uklonio medij za smrzavanje. Stanice su centrifugirane na 1200 rpm 5 minuta, na sobnoj temperaturi.

Sav rad sa stanicama mora se odvijati u sterilnoj komori da bi spriječili kontaminacije. Nakon centrifugiranja i odlaganja supernatanta u otpad, talog stanica koji je nastao resuspendiran je u 10 mL 10%DMEM-a prethodno zagrijanog na 37°C.

Zatim su stanice prebačene u Petrijevu posudu promjera 10 cm te u inkubator na 37°C, 5%CO₂.

Prilikom kultivacije i brojanja adherentnih stanica za pokus iste je potrebno resuspendirati. Stanice se resuspendiraju s mlazom medija uz pomoć pipete obzirom da se slabo drže podloge. Alternativna je tretiranje s 1mL tripsina nekoliko minuta na 37°C, 5%CO₂.

Prije nasadivanja stanice se moraju brojiti da bi se mogla izračunati koncentracija po mL vijabilnih stanica i zatim volumen otopine sa stanicama koji će biti potreban za naseljavanje, u Petrijevu posudu. Prije brojenja, stanice se boje tripanskim modrilom koje boji samo mrtve stanice čime se provjeri vijabilnost stanica. Bojenje sa tripanskim modrilom se odvija u alikvotu gdje se miješa 25µL stanične kulture s 200µL tripanskog modrila. Stanice su pobrojane u Neubauerovoj komorici, prvo, stavljena je kap otopine s obojenim stanicama u otvorenu komoricu. Nakon toga je pažljivo komorica pokrivena sa stakalcem i pritisnuta da bi se potom kapilaritetom komorica ispunila otopinom. Zatim je komorica namještena na stalak mikroskopa, pripremljen je objektiv 10X i upaljeno je pozadinsko osvjetljenje. Zbog toga što radimo s velikim stanicama korišteni su veliki kvadrati koji su na uglovima Neubauerove komorice. Zbog veće preciznosti žive stanice pobrojane su u dva kvadrata od kojih svaki sadrži 16 kvadratića pa je zatim izračunat prosjek. Površina jednog kvadrata na uglu Neubauerove komorice je 1 mm² a visina komorice je 0,1mm kad se pomnoži prosjek zbroja stanica sa 10000 dobije se koncentracija stanica po mL u uzorku. U našem slučaju, obzirom na razrjeđenje 25µL stanične kulture s 200µL tripanskog modrila, dobiveni prosjek je pomnožen s 90 000 kako bismo dobili broj živih stanica u 1 mL originalne sterilne otopine.

Stanice se potom nasade na stakalca koja će biti uronjena u bunarčiće u ploči s dvanaest bunarčića (*eng. 12 well plate*).

Pažljivo spustimo stakalca pincetom na dno svakog bunarčića i dodajemo volumen otopine sa stanicama koji smo odredili mikropipetom i zatim dodajemo pipetom do ukupnog volumena od 1mL DMEM. Ploča se pokrije poklopcem i stavi u inkubator. Za neinficirane stanične kulture stavljali smo u prosjeku 75 000 stanica, a za inficirane uzorke 150 000.

2. Infekcija stanica

Prije infekcije izračunat je volumen potreban za infekciju stanica ovisno o titru virusa.

U slučaju stanica N2a isprobali smo nekoliko mogućih omjera stanica i virusa i odlučili se za infektivnu količinu od 3 PFU/stanici (*eng. plack forming unit*). Originalna otopina FSH, rekombinantnog mišjeg citomegalovirusa, mutanta $\Delta m138/fcr-1$, bila je koncentracije 2×10^6 PFU/ml.

Koristili smo 3PFU/stanici, što pomnoženo s 150 000 stanica/bunarčiću čini ukupno 4.5×10^5 PFU virusa po jednom bunarčiću ploče s 12 bunarčića. Za pospješivanje infekcije i uniformiranje početka infekcije u stanicama se ploče centrifugiraju na 2100 rpm 30 minuta.

Trenutak kad je centrifuga završila smatra se ishodišnom točkom infekcije nakon čega se stanice inkubiraju na 37°C tijekom 20h.

3. Fiksacija

Stanice se fiksiraju uz pomoć ledeno hladnog metanola (-20°C) tako što se stakalca izvade iz DMEM medija i urone direktno u metanol koji je netom prije izvađen iz zamrzivača i stavljen u bunarčiće u novoj ploči (700 μ L po bunarčiću). Metanol se aspirira i zamjenjuje s 1mL PBS-a kako bi se isprao fiksativ. Stakalca se ispiru dva puta ukupno s PBS-om nakon fiksacije. Alternativno, stanice su fiksirane pomoću 2.5% otopine paraformaldehida tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi i permeabilizirane putem detergenta Triton X-100 (0.1%, 7 min, sobna temperatura).

4. Bojanje za imunofluorescenciju

Pripremaju se mokre komore u Petrijevim posudama promjera 15 cm tako što se ovlaži staničevina (celulozna vata) i postavi na dnu Petrijeve posude, bez nabora. Na ovlaženu staničevinu se postavi parafilm s prethodno označenim pozicijama stakalca (crtana rešetka).

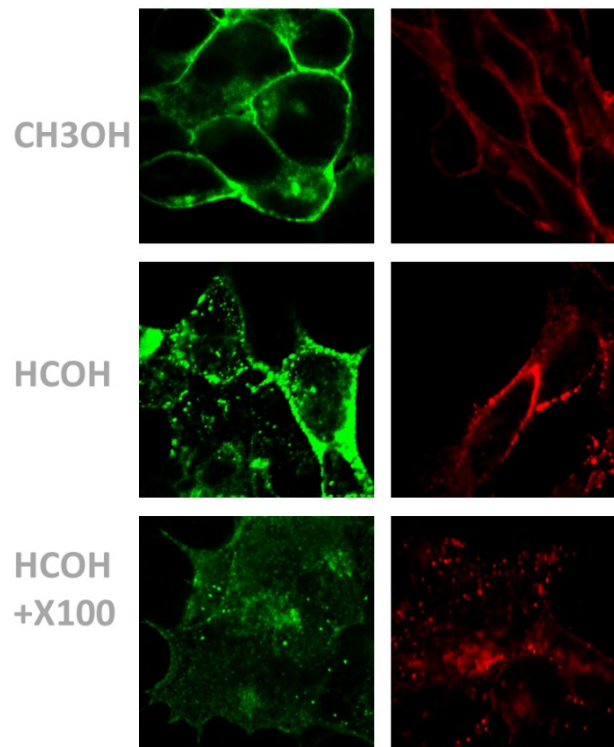
Različita protutijela su bila korištena u ovom radu, i rabe se u specifičnim koncentracijama, odnosno razrjeđenjima za svako protutijelo. Pripremljene su zajedničke ukupne količine protutijela za sve uzorke (tzv. master miksovi protutijela) kako bi se postigao jednakomjeran učinak bojanja. Na parafilmu je na označena mjesta stavljena kapljica otopine s protutijelima (30-50 μ L) i zatim pokrivena sa stakalcem na način da strana na kojoj su stanice „gleda prema dolje“ to jest da bude u kontaktu s otopinom protutijela. Nakon što se postave sva željena stakalca, zatvori se posuda i inkubira na sobnoj temperaturi u mraku 30 min. Stanice se ispiru na stakalcima, 2 puta u PBS-u te se postupak ponavlja u vlažnoj komorici za fluorescentno obilježena sekundarna protutijela pri čemu se stanice ponovno inkubiraju pola sata u mraku na sobnoj temperaturi, kako bi se izbjeglo blijedenje fluorofora. Nakon toga se uklapaju na predmetna mikroskopska stakla pomoću uklapajućeg sredstva Mowiola.

Rezultati

Priprema uzoraka i optimizacija bojanja PrP^C

Kako bismo unaprijedili analizu površinskih proteina u inficiranim stanicama cilj je bio uspostaviti bojanje s 4 neovisne fluorescentne boje, tzv. fluorofore. Pri tome se u jednoj fluorofori namjerava prikazati jezgre (putem interkalatora DAPI) radi lakšeg snalaženja u uzorku, a u drugoj boji se namjerava prikazati marker virusne infekcije, u trećoj boji marker staničnog odjeljka, a u četvrtoj boji protein od interesa. Obzirom da se u Centru za proteomiku trenutno počelo istraživati biologiju proteina PrP^C odlučeno je kako će ovaj protein biti kandidat za trenutni protein od interesa u uzorku. Iz tog razloga prvo se pristupilo uspostavi bojenja proteina PrPC u uzorku putem primarnog protutijela i dva različita sekundarna protutijela, odnosno dva protutijela koja na sebi nose različite fluorofore kako bismo utvrdili koje bojenje daje bolji signal. Istovremeno, pristupilo se fiksaciji stanica putem tri različita fiksacijska sredstva, metanolom, paraformaldehidom te paraformaldehidom praćenim

Tritonom X-100 kako bismo odredili optimalne parametre pripreme uzorka za dani ciljani protein (slika 4).

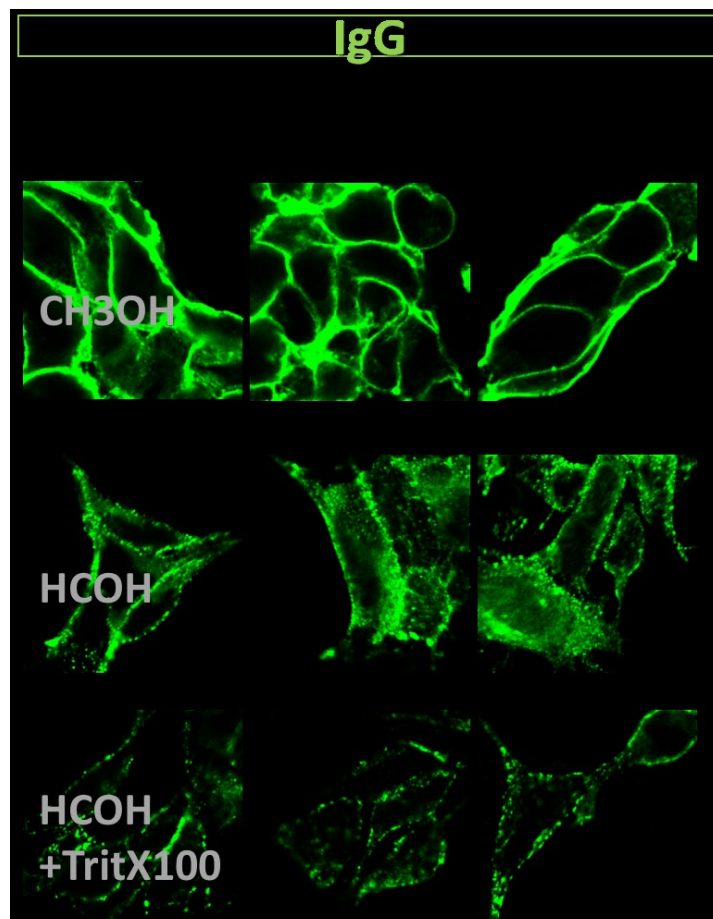


Slika 4: Usporedba signala dobivenog bojanjem stanica N2a pomoću primarnog protutijela koje prepoznaje PrP^C i dvaju sekundarnih protutijela obilježenih fluoroforima FITC (lijevo) i TRITC (desno). Fiksacija s ledeno hladnim metanolom, paraformaldehidom i paraformaldehidom s Tritonom X-100. CH3OH: metanol; HCOH: paraformaldehid; X-100: Triton X-100.

Na slici 4 vidimo da je signal sekundarnog protutijela obilježenog FITC fluoroforom intenzivniji od signala protutijela obilježenog TRITC fluoroforom. Signali se također razlikuju ovisno o parametrima fiksacije. Uz korištenje metanola se bolje vidi PrP^C na plazmatskoj membrani dok ja slabije vidljiv onaj koji se nalazi unutar vezikula. Na plazmatskoj membrani nema značajnije razlike u jačini signala između fiksacije sa paraformaldehidom ili metanolom. Može se uočiti da je signal s površine stanice slabiji, ali još uvijek prisutan u slučaju tretmana s Tritonom X-100, pri čemu unutarstanični dio PrP^C postane vidljiv.

Endocitoza proteina PrP^C

Obzirom da konačna svrha optimizacije postupka uključuje praćenje endocitoze molekula proteina koje se nalaze na staničnoj membrani, sljedeće smo ispitali stabilnost molekule PrP^C, tj. njenu endocitozu sa stanične membrane tijekom nekoliko različitih vremenskih točaka. Pri tome smo također ponovili nekoliko različitih postupaka pripreme stanica obzirom na moguću endocitozu proteina u stanicu te na njegov signal prilikom internalizacije. Protein PrP^C smo obilježili na površini stanica većom količinom specifičnog protutijela. Postupak smo proveli na ledu i u otopini PBS kako bismo spriječili endocitozu za vrijeme obilježavanja. Na slici 5 vidimo kako se radi o vrlo stabilnom proteinu jer je kroz 6 sati signal fluorofore kojom je obilježeno protutijelo na PrP^C samo malo izgubio na intenzitetu.



Slika 5: Usporedba signala proteina PrP^C obilježenog na površini stanice protutijelom, u tri vremenske točke: 0, 2 i 6 sati (h) nakon obilježavanja. Stanice su fiksirane na tri načina:

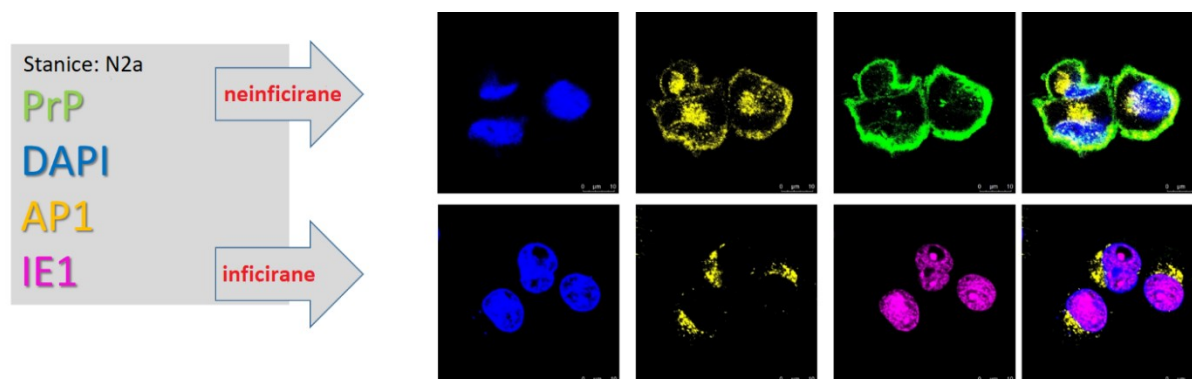
metanolom, paraformaldehidom, paraformaldehidom i Tritonom X-100. CH₃OH: metanol; HCOH: paraformaldehid; TritX100: Triton X-100.

Zbog toga što je signal sekundarnog protutijela obilježenog FITC fluoroforom bio najjači, odlučili smo njega koristiti u bojanju sa četiri boje. Cilj našeg istraživanja je pratiti površinski PrP^C tako da smo odlučili ne koristiti Triton X-100 u uspostavi bojanja s četiri boje.

Uspostava bojanja s 4 boje

Temeljem gornjih rezultata utvrdili smo kako je PrP^C dobar kandidat za optimizaciju protokola praćenja površinskih molekula, odnosno povećanja broja parametara koji se mogu pratiti u uzorku putem novog konfokalnog mikroskopa Leica TCS SP8. Pristupili smo uvođenju ostalih fluorofora. Kao prvu u spektru fluorofora odlučili smo koristiti DAPI. DAPI ili 4',6-diamidino-2-fenilindol je fluorescentna boja koja se snažno veže za adenin-timidin bogate regije DNK i može bojati fiksirane i žive stanice iako slabije dopire u žive stanice. DAPI je moguće pobuditi UV laserom na valnoj duljini 405 i smatramo ga plavim fluoroforom te ćemo signal nastao na mjestima gdje se nalazi DAPI prikazivati plavo. Obzirom na dosadašnje rezultate, fluoroforu kojom obilježavamo PrP^C odlučili smo zadržati zelenom (fluorofora FITC). Za treću boju, marker staničnog odjeljka, odlučili smo se koristiti bojanje odjeljka AP1 (adaptor protein 1). AP1 odjeljak bit će identificiran putem zečjeg primarnog protutijela praćenog sekundarnim protutijelom obilježenim tzv. narančastom fluoroforom TRITC, koju ćemo prikazivati žuto. Konačno, za četvrtu fluoroforu, kojom ćemo identificirati u uzorku one stanice koje su inficirane mišjim citomegalovirusom odlučili smo koristiti protutijelo na protein mišjeg citomegalovirusa imena IE1. Taj se protein nalazi u jezgri, a obilježili smo ga sekundarnim protutijelima konjugiranim s crveno-ljubičastom fluoroforom APC koju smo odlučili prikazati ružičasto.

Na slici 6 može se vidjeti da sve četiri fluorofore daju snažne signale što ukazuje na uspješno bojanje. Time je svrha rada postignuta, uspostavljeno je bojanje uzorka putem nove metode koja omogućava praćenje 4 različita parametra u uzorku.



Slika 6: Kolokalizacija signala proteina PrP^C (zeleno), DNK (plavo), AP1 (žuto) i IE1 (ružičasto) kod neinficiranih i inficiranih stanica. PrP^C: stanični prionski protein; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol; AP1: Adaptorski protein 1; IE1, : protein citomegalovirusa IE1

Rasprava

Svrha ovog rada bila je uspostaviti metodu za vizualizaciju i praćenje proteina PrP^C ispoljenog na plazmatskoj membrani neuralnih stanica. Iz tog razloga pristupilo se pripremi stanične kulture putem tri različita fiksacijska sredstva, metanolom, paraformaldehidom te paraformaldehidom praćenim Tritonom X-100 i putem dva različita sekundarna protutijela, kako bismo odredili optimalne parametre pripreme uzorka (slike 4 i 5). Nakon tretmana s detergentom Tritonom X-100, signal PrP^C oslabio je na površini stanice u značajnoj mjeri. Obzirom na slabljenje signala s površine stanice, vjerojatno uslijed otapanja domena membrane u kojima se nalazi PrP^C, unutarstanični dio postaje bolje vidljiv kad se koristi Triton X-100 uz paraformaldehid. Može se uočiti da je signal s površine stanice slabiji, ali još uvijek prisutan u odnosu na fiksaciju bez tretmana s Tritonom X-100, što je za očekivati ukoliko se značajni dio

PrP^C nalazi izvan lipidnih splavi. Rezultat potvrđuje opažanja nekih istraživača da PrP^C nije samo prisutan unutar lipidnih splavi, već i u drugim dijelovima membrane.

Iz rezultata koji se mogu očitati na slici 5, vidljivo je da signal PrP^C na površini N2A stanica ostaje stabilan i kako nije značajno oslabio kroz 6 sati. To znači da nije došlo do značajnog oslobađanja PrP^C u međustaničje preko prethodno spomenutih mehanizama α , β i γ cijepanja ili otpuštanja zbog djelovanja enzima porodice ADAM. Nadalje, obzirom da je opisano brzo recikliranje PrP^C u stanicama N2a, možemo zaključiti ili da je kompleks protutijela s PrP^C učvrstio PrP^C na samoj plazmatskoj membrani, kako je opisano u nekim studijama, ili da je korišten put recikliranja u kojem je protutijelo ostalo vezano za samu molekulu PrP^C što upućuje na odjeljke bliže plazmatskoj membrani u kojima pH nije značajno snižen i ne uzrokuje otpuštanje protutijela.

Opažanja da PrP^C može potaknuti različite signalne puteve dovelo je do pitanja o mehanizmu interakcije između PrP^C i ostatka staničnog ustroja signalizacije. Nije poznat način na koji bi PrP^C, kad bi funkcionirao kao samostalan stanični receptor, prenosio signal unutar stanice jer ne posjeduje u svom najučestalijem fiziološkom obliku transmembransku domenu koja bi mogla prenijeti signal u citosol. Druge receptorske molekule koje također ne posjeduju transmembransku domenu su vrlo rijetke, ali poznate. Na primjer urokinazni receptor ne posjeduje transmembransku domenu i njegova endocitoza se provodi pomoću receptora za lipoproteine male gustoće (*eng: Low Density Lipoprotein Receptor LDLR*) (73) što pokazuje da protein koji nema transmembransku domenu može imati receptorsku funkciju. Dok se ne otkrije specifični način na koji se PrP^C internalizira teško je u cijelosti opisati fiziologiju ovog proteina.

Mišji citomegalovirus preko svojih virusnih proteina mijenja endosomalni sustav stanice. Proteini se pri tome mogu ukloniti s površine stanice, na primjer kao kod djelovanja enzima iz ADAM obitelji, ostati nepromijenjeni na površinu stanice, ili biti internalizirani putem endocitoze i dospjeti u jedan od endosomalnih puteva. Naime, pokazano je inhibitorno

djelovanje MCMV na brzi reciklirajući put, spori reciklirajući put i kasni-endosomalni reciklirajući put (71). Nije pronađena literatura koja bi pokazala da MCMV djeluje na ubrzani put recikliranja. Obzirom da se nalazi u lipidnim splavima i posjeduje GPI-sidro, PrP^C svakako spada u kategoriju proteina koji bi se mogli služiti ubrzanom tipom recikliranja. Asocijacija PrP^C-a s klatrin-neovisnim prijenosnicama u nekoliko istraživanja (27) dodatno upućuje na tu mogućnost. Novije spoznaje o internalizaciji proteina vezanih za GPI-sidro cdc42 ovisnim putem i njihovom ubrzanom recikliranju također upućuje na hipotezu da PrP^C koristi ubrzani put recikliranja. Obzirom da je prisutnost proteina PrP^C dokazana u različitim staničnim putevima endocitoze, a MCMV djeluje na cijeli spektar puteva unutar stanice, mogućnost međudjelovanja proteina virusa i proteina PrP^C predstavlja kompleksno istraživačko pitanje.

Za uspostavu metode istovremenog praćenja četiri parametra u stanici putem konfokalne imunofluorescentne analize trebalo je izabrati jedan marker staničnog odjeljka. Odlučili smo koristiti bojanje odjeljka AP1. Naime, u nedavnom radu objavljenom od strane Centra za proteomiku utvrđeno je kako MCMV putem virusnog proteina kodiranog genom m154 zadržava cijeli niz molekula u AP1 pozitivnom odjeljku AP1 (74). Stoga smo smatrali da bi eventualno poklapanje signala AP1 odjeljka sa signalom PrP^C moglo upućivati da je i ovaj ciljani protein zahvaćen sličnim mehanizmom. Obzirom da nismo pronašli značajno preklapanje signala proteina PrP^C sa signalom AP1 pozitivnog odjeljka (slika 6), zaključili smo kako se spomenuti mehanizam m154-posredovanog djelovanja na stanične molekule vjerojatno ne odnosi na ciljnu molekulu PrP^C.

Zaključak

Stanični prionski protein je važan sudionik fiziologije organizma, no istovremeno predstavlja preteču proteinskih agregata u prionskim bolestima. Razumijevanje fiziologije prionskog proteina moglo bi doprinijeti liječenju prijenosnih spongiformnih encefalopatija, ali i drugih patoloških procesa kao što su virusne infekcije, u takozvanim imunoso privilegiranim mjestima.

U ovom radu, protutijela na protein PrP^C, na citomegalovirusni protein IE1 i na protein staničnog sustava sortiranja AP1 su se uspješno vezala za svoja ciljna mjesta. Uspostavljena je metoda istodobnog bojanja stanica s navedena tri protutijela obilježena različitim fluoroforama te s četvrtom bojom, koja označava poziciju DNA-interkalatora DAPI. Praćenje četiri fluorescentna signala u uzorku inficiranih stanica uz upotrebu konfokalne analize je novo-uspostavljena metoda na Medicinskom Fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Time je uspostavljena funkcionalnost novonabavljenog mikroskopa Leica TCS SP8 te postavljeni preduvjeti za analizu proteina PrP^C u inficiranim stanicama i organima.

Sažetak

Stanični prionski protein PrP^C otkriven je u istraživanjima o uzroku prionopatija, koje karakterizira agregacija specifičnih proteina i posljedična neurodegeneracija. PrP^C posjeduje dva mjesta za glikozilaciju i većina prionskog proteina izoliranog iz tkiva je diglikozilirana. Glikozilacija PrP^C promovira transport PrP^C do plazmatske membrane. S izuzetkom manje zastupljenih transmembranskih i cijepanih oblika, PrP^C provodi veliku većinu životnog vijeka vezan za membranu putem GPI-sidra. Najveću količinu proteina PrP^C nalazimo u imunoso privilegiranim mjestima, poput mozga, oka i placente te u imunoso sustavu.

Kako bi izbjegli nadzor imunskog sustava domaćina, herpesvirusi su razvili raznolike mehanizme koji im omogućuju jedinstvenu sposobnost cjeloživotnog preživljavanja u inficiranim domaćinima u obliku latentne infekcije sa sposobnošću reaktivacije kad je imunski sustav oslabljen. Dio mehanizama se temelji na sintezi proizvoda virusnih gena koji specifično zaustavljaju sintezu ili unutarstanični transport različitih efektorskih molekula imunskog odgovora. Mišji citomegalovirus (MCMV), član obitelji herpesvirusa, dokazano mijenja reciklirajuće unutarstanične transportne puteve da bi smanjio ispoljavanje molekula bitnih za imunsku reakciju na površini stanica.

Svrha ovog rada bila je uspostaviti metodu za vizualizaciju i praćenje proteina PrP^C ispoljenog na plazmatskoj membrani neuralnih stanica te uspostaviti metodu istovremenog praćenja četiri parametra u stanici putem konfokalne imunofluorescentne analize. Stanice neuroblastoma, N2A, bile su uzgojene, potom inficirane s virusom MCMV i zatim analizirane istovremeno na četiri parametara, putem četiri fluorofore, koje su bile marker za PrP^C, jezgru, MCMV infekciju te stanični odjeljak, pri čemu je odabran AP1 pozitivan odjeljak. PrP^C nije kolokalizirao s AP1 pozitivnim odjeljkom te vjerojatno MCMV ne utječe na njegov unutarstanični prijenos putem AP1 pozitivnog odjeljka.

PrP^C ; MCMV; protutijela; fluorofore; unutarstanični transport; imunske reakcije; imunoprivilegirana mjesta; stres; α , β i γ cijepanje; ubrzano recikliranje

Summary

Cellular prion protein (PrP^C) was discovered during research into the causes of prionopathies characterized by aggregation of specific proteins and subsequent neurodegeneration. PrP^C possesses two glycosylation sites, and most tissue-isolated prion proteins are diglycosylated.

PrP^C glycosylation stimulates the transport of PrP^C to the plasma membrane. With the exception of the less common transmembrane and split forms, PrP^C spends most of its lifetime bound to a membrane with a GPI anchor.

PrP^C is most expressed in immunoprivileged sites, such as the brain, eye, and placenta, and in the immune system.

To avoid controlling the host's immune system, herpesviruses have developed various mechanisms that allow them to survive in infected hosts in the form of a latent infection with the ability to reactivate when the immune system is weakened. Several mechanisms are based on the synthesis of products of viral genes that specifically stop the synthesis or intracellular transport of various effector molecules of nonspecific and specific immune response. MCMV has been shown to alter the recycling of intracellular transport pathways to reduce the expression of molecules important for the immune response at the cell surface.

The purpose of this study was to establish a method for visualization and monitoring of PrP^C protein expressed on the plasma membrane of neural cells and to establish a method for simultaneous monitoring of four parameters in the cell by confocal immunofluorescence analysis. Neuroblastoma cells N2A were cultured, then infected with MCMV virus, and then analyzed simultaneously for four parameters, using 4 fluorophores, which were a marker for PrP^C, nucleus, MCMV infection, and AP1. PrP^C did not colocalize with the AP1 positive compartment and probably MCMV does not affect its intracellular sorting via the AP1 positive compartment.

PrP^C; MCMV; antibodies; fluorophores; intracellular transport; immune reaction; immunoprivileged sites; stress; α , β and γ -cleavage; rapid recycling

Reference

1. McAlister V. Sacred disease of our times: Failure of the infectious disease model of spongiform encephalopathy. Sv. 28, *Clinical and Investigative Medicine*. 2005. str. 101–4.
2. Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. Transmission and Passage of Experimental ‘Kuru’ to Chimpanzees. *Science* (80-). 13. siječanj 1967.;155(3759):212–4.
3. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* (80-). 1982.;216(4542):136–44.
4. Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood LE. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell*. 1984.;38(1):127–34.
5. Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Molecular Characteristics of the Major Scrapie Prion Protein. *Biochemistry*. 1984.;23(25):5898–906.
6. Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SBH, Aebersold R, i ostali. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*. 1985.;40(4):735–46.
7. Bakkebø MK, Mouillet-Richard S, Espenes A, Goldmann W, Tatzelt J, Tranulis MA. The cellular prion protein: A player in immunological quiescence. Sv. 6, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2015. str. 450.
8. Linsenmeier L, Altmeppen HC, Wetzel S, Mohammadi B, Saftig P, Glatzel M. Diverse functions of the prion protein – Does proteolytic processing hold the key? Sv. 1864, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V.; 2017. str. 2128–37.
9. Altmeppen HC, Prox J, Krasemann S, Puig B, Kruszewski K, Dohler F, i ostali. The sheddase ADAM10 is a potent modulator of prion disease. *Elife*. 02. svibanj 2015.;2015(4):1–50.
10. Calzolari L, Lysek DA, Pérez DR, Güntert P, Wüthrich K. Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18. siječanj 2005.;102(3):651–5.

11. Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A, i ostali. Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys*. 1989.;274(1):1–13.
12. Beringue V, Mallinson G, Kaisar M, Tayebi M, Sattar Z, Jackson G, i ostali. Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain*. 01. rujanj 2003.;126(9):2065–73.
13. Shyu WC, Kao MC, Chou WY, Hsu YD, Soong BW. Heat shock modulates prion protein expression in human NT-2 cells. *Neuroreport*. 20. ožujak 2000.;11(4):771–4.
14. Lewis V, Johanssen VA, Crouch PJ, Klug GM, Hooper NM, Collins SJ. Prion protein „gamma-cleavage“: Characterizing a novel endoproteolytic processing event. *Cell Mol Life Sci*. 01. veljača 2016.;73(3):667–83.
15. EMBL-EBI. Gene: PRNP (ENSG00000171867) - Summary - Homo sapiens - Ensembl genome browser 89 [Internet]. 2017 [citirano 23. lipanj 2020.]. Dostupno na: http://may2017.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000171867;r=20:4686236-4701590
16. Zeng L, Zou W, Wang G. Cellular prion protein (PrPC) and its role in stress responses. *Int J Clin Exp Med*. 30. svibanj 2015.;8(5):8042–50.
17. Shyu WC, Lin SZ, Saeki K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Onodera T, i ostali. Hyperbaric Oxygen Enhances the Expression of Prion Protein and Heat Shock Protein 70 in a Mouse Neuroblastoma Cell Line. *Cell Mol Neurobiol*. travanj 2004.;24(2):257–68.
18. Alfaidy N, Chauvet S, Donadio-Andrei S, Salomon A, Saoudi Y, Richaud P, i ostali. Prion protein expression and functional importance in developmental angiogenesis: Role in oxidative stress and copper homeostasis. *Antioxidants Redox Signal*. 01. veljača 2013.;18(4):400–11.
19. Varela-Nallar L, Toledo EM, Larrondo LF, Cabral ALB, Martins VR, Inestrosa NC. Induction of cellular prion protein gene expression by copper in neurons. *Am J Physiol - Cell Physiol*.

- siječanj 2006.;290(1).
20. Pammer J, Cross HS, Frobert Y, Tschachler E, Oberhuber G. The pattern of prion-related protein expression in the gastrointestinal tract. *Virchows Arch.* 2000.;436(5):466–72.
 21. Pammer J, Weninger W, Tschachler E. Human keratinocytes express cellular prion-related protein in vitro and during inflammatory skin diseases. *Am J Pathol.* 1998.;153(5):1353–8.
 22. Linden R, Martins VR, Prado MAM, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. Sv. 88, *Physiological Reviews.* American Physiological Society; 2008. str. 673–728.
 23. Brown HR, Goller NL, Rudelli RD, Merz GS, Wolfe GC, Wisniewski HM, i ostali. The mRNA encoding the scrapie agent protein is present in a variety of non-neuronal cells. *Acta Neuropathol.* svibanj 1990.;80(1):1–6.
 24. Ford MJ, Burton LJ, Li H, Graham CH, Frobert Y, Grassi J, i ostali. A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. *Neuroscience.* 30. svibanj 2002.;111(3):533–51.
 25. Parizek P, Roeckl C, Weber J, Flechsig E, Aguzzi A, Raeber AJ. Similar Turnover and Shedding of the Cellular Prion Protein in Primary Lymphoid and Neuronal Cells. *J Biol Chem.* 30. studeni 2001.;276(48):44627–32.
 26. Taylor DR, Hooper NM. The prion protein and lipid rafts (Review). *Mol Membr Biol.* 09. siječanj 2006.;23(1):89–99.
 27. Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, i ostali. The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J.* 15. srpanj 2003.;22(14):3591–601.
 28. Pike LJ. Rafts defined: A report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J Lipid Res.* 24. srpanj 2006.;47(7):1597–8.
 29. Mattei V, Garofalo T, Misasi R, Gizzi C, Mascellino MT, Dolo V, i ostali. Association of

- cellular prion protein with gangliosides in plasma membrane microdomains of neural and lymphocytic cells. *Neurochem Res.* kolovoz 2002.;27(7–8):743–9.
30. Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Blättler T, Aguzzi A, Freyssinet JM. Modulation of signal transduction through the cellular prion protein is linked to its incorporation in lipid rafts. *Cell Mol Life Sci.* prosinac 2004.;61(23):2998–3007.
 31. Steinman RM, Mellman IS, Muller WA, Cohn ZA. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. Sv. 96, *Journal of Cell Biology.* J Cell Biol; 1983. str. 1–27.
 32. McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. Sv. 12, *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* Nature Publishing Group; 2011. str. 517–33.
 33. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. Sv. 8, *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* Nature Publishing Group; 2007. str. 603–12.
 34. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J.* 31. kolovoz 2011.;30(17):3481–500.
 35. Hao M, Maxfield FR. Characterization of rapid membrane internalization and recycling. *J Biol Chem.* 19. svibanj 2000.;275(20):15279–86.
 36. Sandvig K, Pust S, Skotland T, van Deurs B. Clathrin-independent endocytosis: Mechanisms and function. Sv. 23, *Current Opinion in Cell Biology.* Curr Opin Cell Biol; 2011. str. 413–20.
 37. Grant BD, Donaldson JG. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. Sv. 10, *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* Nature Publishing Group; 2009. str. 597–608.
 38. Benmerah A, Lamaze C. Clathrin-coated pits: Vive la différence? *Traffic.* kolovoz 2007.;8(8):970–82.
 39. Sorkin A, Goh LK. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. Sv. 315, *Experimental Cell Research.* Academic Press Inc.; 2009. str. 683–96.
 40. Sabharanjak S, Sharma P, Parton RG, Mayor S. GPI-anchored proteins are delivered to

- recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell*. 2002.;2(4):411–23.
41. Hegde RS, Mastrianni JA, Scott MR, DeFea KA, Tremblay P, Torchia M, i ostali. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* (80-). 06. veljača 1998.;279(5352):827–34.
 42. Stewart RS, Piccardo P, Ghetti B, Harris DA. Neurodegenerative illness in transgenic mice expressing a transmembrane form of the prion protein. *J Neurosci*. 30. ožujak 2005.;25(13):3469–77.
 43. Roucou X, Guo Q, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc AC. Cytosolic Prion Protein Is Not Toxic and Protects against Bax-mediated Cell Death in Human Primary Neurons. *J Biol Chem*. 17. listopad 2003.;278(42):40877–81.
 44. Jodoin J, Laroche-Pierre S, Goodyer CG, LeBlanc AC. Defective retrotranslocation causes loss of anti-bax function in human familial prion protein mutants. *J Neurosci*. 09. svibanj 2007.;27(19):5081–91.
 45. Cancellotti E, Wiseman F, Tuzi NL, Baybutt H, Monaghan P, Aitchison L, i ostali. Altered glycosylated PrP proteins can have different neuronal trafficking in brain but do not acquire scrapie-like properties. *J Biol Chem*. 30. prosinac 2005.;280(52):42909–18.
 46. Shyng L, Huber MT, Harris DA. A Prion Protein Cycles between the Cell Surface and an Endocytic Compartment in Cultured Neuroblastoma Cells*. Sv. 268, *Journal of Biological Chemistry and Molecular Biology Inc*. 1993.
 47. Magalhães AC, Silva JA, Lee KS, Martins VR, Prado H VF, Ferguson SSG, i ostali. Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J Biol Chem*. 06. rujan 2002.;277(36):33311–8.
 48. Shyng SL, Heuser JE, Harris DA. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol*. lipanj 1994.;125(6):1239–50.

49. Shyng SL, Lehmann S, Moulder KL, Harris DA. Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrPC, in cultured cells. *J Biol Chem*. 15. prosinac 1995.;270(50):30221–9.
50. Taylor DR, Watt NT, Perera WSS, Hooper NM. Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci*. 01. studeni 2005.;118(21):5141–53.
51. Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*. 07. veljača 1992.;68(3):533–44.
52. Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, i ostali. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10. prosinac 1996.;93(25):14945–9.
53. Basturea GN. Endocytosis. *Mater Methods*. 04. travanj 2019.;9.
54. Marella M, Lehmann S, Grassi J, Chabry J. Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J Biol Chem*. 12. srpanj 2002.;277(28):25457–64.
55. Kang YS, Zhao X, Lovaas J, Eisenberg E, Greene LE. Clathrin-independent internalization of normal cellular prion protein in neuroblastoma cells is associated with the Arf6 pathway. *J Cell Sci*. 15. studeni 2009.;122(22):4062–9.
56. Brown DR, Besinger A, Herms JW, Kretzschmar HA. Microglial expression of the prion protein. *Neuroreport*. 11. svibanj 1998.;9(7):1425–9.
57. Liu J, Zhao D, Liu C, Ding T, Yang L, Yin X, i ostali. Prion Protein Participates in the Protection of Mice from Lipopolysaccharide Infection by Regulating the Inflammatory Process. *J Mol Neurosci*. 20. svibanj 2014.;55(1):279–87.
58. Fujisaki J, Wu J, Carlson AL, Silberstein L, Putheti P, Larocca R, i ostali. In vivo imaging of T reg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature*. 08. lipanj

- 2011.;474(7350):216–20.
59. Ballerini C, Gourdain P, Bachy V, Blanchard N, Levavasseur E, Grégoire S, i ostali. Functional Implication of Cellular Prion Protein in Antigen-Driven Interactions between T Cells and Dendritic Cells. *J Immunol.* 15. lipanj 2006.;176(12):7254–62.
 60. Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, De Souza SJ, Mercadante AF, Veiga SS, i ostali. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat Med.* prosinac 1997.;3(12):1376–82.
 61. Hernandez-Rapp J, Martin-Lannerée S, Hirsch TZ, Pradines E, Alleaume-Butaux A, Schneider B, i ostali. A PrPC -caveolin-Lyn complex negatively controls neuronal GSK3 β and serotonin 1B receptor. *Sci Rep.* 01. travanj 2015.;4.
 62. Beraldo FH, Soares IN, Goncalves DF, Fan J, Thomas AA, Santos TG, i ostali. Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. *FASEB J.* rujanj 2013.;27(9):3594–607.
 63. Lee S Da, Lai TW, Lin SZ, Lin CH, Hsu YH, Li CY, i ostali. Role of stress-inducible protein-1 in recruitment of bone marrow derived cells into the ischemic brains. *EMBO Mol Med.* kolovoz 2013.;5(8):1227–46.
 64. Makzhami S, Passet B, Halliez S, Castille J, Moazami-Goudarzi K, Duchesne A, i ostali. The prion protein family: A view from the placenta. Sv. 2, *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* Frontiers Media S.A.; 2014.
 65. Santos TG, Silva IR, Costa-Silva B, Lepique AP, Martins VR, Lopes MH. Enhanced Neural Progenitor/Stem Cells Self-Renewal via the Interaction of Stress-Inducible Protein 1 with the Prion Protein. *Stem Cells.* 01. srpanj 2011.;29(7):1126–36.
 66. Mattei V, Garofalo T, Misasi R, Circella A, Manganelli V, Lucania G, i ostali. Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. *FEBS Lett.* 27. veljača 2004.;560(1–3):14–8.

67. Hu W, Nessler S, Hemmer B, Eagar TN, Kane LP, Leliveld SR, i ostali. Pharmacological prion protein silencing accelerates central nervous system autoimmune disease via T cell receptor signalling. *Brain*. veljača 2010.;133(2):375–88.
68. Varani S, Landini M. Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. *Herpesviridae*. 2011.;2(1):6.
69. University of Missouri - Comparative Medicine Program. Murine Cytomegalovirus (MCMV)-Diseases of Research Animals [Internet]. [citirano 20. lipanj 2020.]. Dostupno na: <http://dora.missouri.edu/mouse/murine-cytomegalovirus-mcmv/>
70. Hansen TH, Bouvier M. MHC class I antigen presentation: Learning from viral evasion strategies. Sv. 9, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2009. str. 503–13.
71. Lučin P, Mahmutefendić H, Blagojević Zagorac G, Ilić Tomaš M. Cytomegalovirus immune evasion by perturbation of endosomal trafficking. Sv. 12, *Cellular and Molecular Immunology*. Chinese Soc Immunology; 2015. str. 154–69.
72. Dacheux L, Bourhy H. Tests diagnostiques de la rage chez l'homme. *Rev Sci Tech*. 01. kolovoz 2018.;37(2):581–93.
73. Van Der Kaaden ME, Rijken DC, Kruijt JK, Van Berkel TJC, Kuiper J. The role of the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in the plasma clearance and liver uptake of recombinant single-chain urokinase-type plasminogen activator in rats. *Thromb Haemost*. 1997.;77(4):710–7.
74. Geljic IS, Brlic PK, Angulo G, Brizic I, Lisnic B, Jenus T, i ostali. Cytomegalovirus protein m154 perturbs the adaptor protein-1 compartment mediating broad-spectrum immune evasion. *Elife*. 01. siječanj 2020.;9.

Životopis

Corentin Pavao André Cuissot rođen je 27.09.1996., osnovno obrazovanje je stekao u Parizu, gimnaziju je pohađao u Zagrebu (XV Gimnazija I.B. program) i Novom Sadu (e-Gimnazija) tako da je završio hrvatsku, međunarodnu (IB) i srpsku maturu, položio je SAT iz Biologije, Kemije i Fizike. Državni prvak je francuskog 2013. godine. Prvi put je zaposlen kao radnik u farmi u Roscoff, Francuskoj 2012. godine, nekoliko jeseni je radio na berbi grožđa u vinogradima pokrajine Champagne, 2015. godine je preveo film Sinjska Alka s hrvatskog na francuski za HRT pa ga zatim sinkronizirao na francuskom, radio je nekoliko prijevoda s engleskog na francuski kako crtanih filmova tako i holivudskih filmova za kompaniju Ullman Films. Corentin Cuissot tečno govori i piše francuski, engleski i hrvatski jezik, dok pasivno vlada ruskim jezikom.

2010. godine obavezni radni staž je proveo u Muséum National d'Histoire Naturelle u Antropološkom Odsjeku, 2015. je bio na kratkom stažu u laboratoriju prof. dr. sc. Pierre-Marie Lledo u Institut Pasteur u Parizu, dok je 2018. godine bio pasivni sudionik na kongresu Praktična znanja za studente u Splitu.

Corentin Cuissot je općenito informatički pismen i dobro se služi programima Microsoft Office. 2016. godine od HPS-a je stekao zvanje Mlađeg Alpinističkog Pripravnika.