

Učinak mišjeg citomegalovirusa na izražaj staničnih proteina za regulaciju endosomalne tubulacije

Miseta, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:257804>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-19**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



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

Marina Miseta

**Učinak mišjeg citomegalovirusa na izražaj staničnih
proteina za regulaciju endosomalne tubulacije**

Diplomski rad

Rijeka, 2021. godina

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Graduate programme
„Biotechnology in medicine“

Marina Miseta

**Effect of murine cytomegalovirus on cellular protein
expression for endosomal tubulation regulation**

Master's thesis

Rijeka, year 2021

Mentor rada: prof. dr. sc. Hana Mahmutefendić Lučin

Diplomski rad obranjen je dana 16.09.2021.

pred povjerenstvom:

1. Izv. prof. dr. sc. Antonija Jurak Begonja

2. Doc. dr. sc. Željka Maglica

3. Prof. dr. sc. Hana Mahmutefendić Lučin

Rad ima 31 stranicu, 10 slika i 30 literaturnih navoda

SAŽETAK/Summary

Citomegalovirus (CMV) u inficiranim stanicama uzrokuje opsežnu reorganizaciju sekretornih i endosomalnih membrana u svrhu stvaranja citoplazmatskog odjeljka za sklapanje viriona – cVAC (AC) (eng. *cytoplasmic viral assembly compartment*). Tijekom tog procesa, virus u stanici mijenja dinamiku i smještaj membranskih struktura djelujući na izražaj i aktivaciju regulatornih proteina koji se mobiliziraju na njihovu površinu. Rab10 GTPaza je jedan od mnogih takvih regulatornih proteina, a nalazimo ga na sučelju ranih endosoma, EE (eng. *early endosomes*) i endoplazmatskog reciklirajućeg odjeljka, ERC (eng. *endoplasmic recycling compartment*). U ovom diplomskom radu smo istražili učinak infekcije mišjim citomegalovirusom (MCMV) na izražaj i unutarstanični smještaj Rab10 i njegovih efektora, odnosno regulatora (Rab5, MICAL-L1, EHBP1, ACAP1, ACAP2, EHD1, EHD3) na inficiranim mišjim fibroblastima. Pokazali smo da se izražaj ispitivanih proteina ne mijenja tijekom infekcije, ali se Rab10 GTPaza i njegov efektor EHBP1 u kasnoj fazi infekcije nalaze nakupljeni u unutrašnjem dijelu AC (iAC). Prema tome, možemo zaključiti da MCMV infekcija uzrokuje reorganizaciju endosomalnih membrana na kojima se nalazi Rab10, ali ne mijenjajući njihov izražaj.

Cytomegalovirus (CMV) causes extensive reorganization of the secretory and endosomal membranes in infected cells with a purpose of cytoplasmic viral assembly compartments (cVAC/AC) formation. During that proces, CMV rearrange and change the dynamics of cellular membranes. One of the possible mechanisms involves targeting the expression of regulatory proteins that are activated and mobilized at surfaces of intracellular compartments. Rab10 GTPase represents one of many such proteins and can be found at the interface of early endosomes, EE and endoplasmic recycling compartment, ERC. In this thesis we have investigated the impact of infection with murine CMV (MCMV) on the Rab10 GTPase and its effectors and regulators (Rab5, MICAL-L1, EHBP1, ACAP1, ACAP2, EHD1, EHD3) expression and localization in the infected mouse fibroblasts. We have shown that their total expression do not change in the comparison with

uninfected cells, but Rab10, and its effector, EHBP1, can be found in pericentriolar clusters inside AC (iAC) in the late phase of infection. Therefore, we can conclude that MCMV infection cause reorganization of Rab10 positive membranes, but without influence on their total expression.

Ključne riječi / Keywords : citomegalovirus / cytomegalovirus; odjeljak za sklapanje virusnih čestica / viral assembly compartment; endosomi / endosomes; endosomalna tubulacija / endosomal tubulation; Rab10 GTPaza / Rab10 GTPase

ZAHVALE

Ovom prilikom bih htjela zahvaliti svojoj mentorici prof. dr. sc. Hani Mahmutefendić Lučin na ukazanom povjerenju i prilici za odrađivanje eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada na Odjelu za imunologiju, fiziologiju i patofiziologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. U svakom trenutku spremno je odgovarala na moje upite i bila dostupna za svaku nedoumicu. Hvala joj na podršci i ispunjenju titule „mentor“ u svakom smislu te riječi.

Bilo mi je apsolutno zadovoljstvo bar na kratko biti dio jednog banalno rečeno uigranog kolektiva gdje ne postoji osuda i svi su uvijek spremni pomoći. Boravak u ovom laboratoriju osim što me pripremio za daljnji rad i obrazovanje, usadio mi je želju za daljnjim istraživanjem. Zahvaljujem se, također i Igoru Štimcu koji je u svakom trenutku eksperimentalnih dijelova ovog rada objeručke pomagao da danas, ovaj diplomski rad, bude što jest.

Posebno bih se htjela zahvaliti mojim prijateljima koji su uvijek pomogli u stresnim situacijama i bili tu za mene kada je bilo potrebno Iva, Sara, Klara, Oton, Toni, Ivan, Mateja, Bobana, Antonija, Danijel i Ivan. Hvala im što su navijali za mene i jedva čekam vidjeti u kojem smjeru će svakoga od nas život odvesti.

Na kraju najveća zahvala ide mojim roditeljima mami Dijani i tati Borisu koji su objeručke prihvatili i omogućili da slijedim svoj san i bavim se znanošću. U svakom trenutku i u svakoj nedoumici bili su stup razuma i podrške, gurali me naprijed i nisu sumnjali ni trenutka. Bez njih i njihove žrtve ništa od ovoga ne bi bilo moguće.

Ovaj rad posvećujem svojim sestrama, Luciji i Miji, koje su najveće svijetlo mogega života i bezuvjetno čuvaju moja leđa, kao i ja njihova.

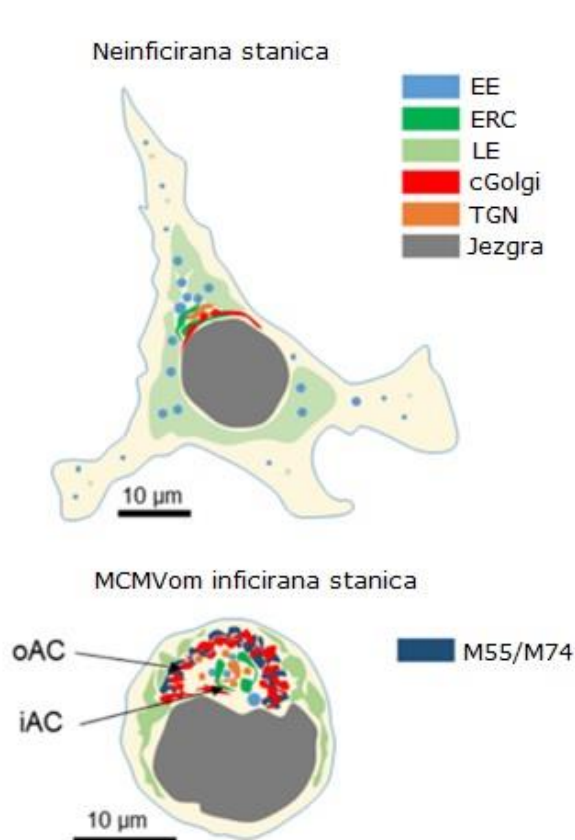
Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Replikacijski ciklus citomegalovirusa.....	1
1.2. Endosomalni sustav stanice	3
1.2.1. Endosomalno recikliranje	4
1.2.2. Rab10 interakom i uloga Rab10 GTPaze na sučelju ranih endosoma i endosomalnog reciklirajućeg odjeljka	5
2. CILJ RADA	7
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. Stanične kulture, virusi i uvjeti infekcije	8
3.2. Protutijela i reagensi	9
3.3. Imunofluorescencija, konfokalna mikroskopija i analiza slika	9
3.4. <i>Western Blot</i>	10
4. REZULTATI	12
4.1. Lokalizacija Rab10 GTPaze u stanici inficiranoj MCMVom nakon 40 sati infekcije	12
4.2. Analiza ukupnog izražaja Rab10 GTPaze u stanici tijekom 48h infekcije MCMVom ..	14
4.3. Izražaj regulatora i efektoru Rab10 GTPaze tijekom MCMV infekcije (Rab5, MICAL-L1, EHBP1, ACAP1/2 i EHD1/3)	15
4.3.1. Izražaj Rab5 i MICAL-L1 u MCMV infekciji	15
4.3.2. Primarni efektori Rab10 GTPaze EHBP1, ACAP1 i ACAP2	17
4.3.3. Sekundarni efektori Rab10 GTPaze EHD1 i EHD3	19
4.4. Izražaj EHBP1 u fibroblastima nakon 40h infekcije MCMVom	21
5. RASPRAVA	22
5.1. MCMV reorganizira endosomalne reciklirajuće membrane u unutrašnji dio AC (iAC) 22	
5.2. Značaj Rab10 i njegovih regulatora u stvaranju AC	23
6. ZAKLJUČAK	26
7. LITERATURA	27
8. POPIS SLIKA	30
9. ŽIVOTOPIS	Error! Bookmark not defined.

1. UVOD

1.1. Replikacijski ciklus citomegalovirusa

Citomegalovirus (CMV) je član obitelji β -herpesvirusa koji uzrokuje asimptomatske infekcije u većini populacije, ali u imunokompromitiranih osoba uzrokuje razna patološka stanja pa i smrtni ishod(1,2). Danas je poznato da CMV u stanici domaćina uzrokuje opsežnu reorganizaciju membranskog sustava sekretornog i endosomalnog puta koja dovodi do stvaranja citoplazmatskog odjeljka za sklapanje viriona –cVAC (eng. *cytoplasmic viral assembly compartment*), često nazvanog samo AC(3–6). U ACu se virusne kapside s tegumentnim proteinima omataju čime nastaju nove gotove virusne čestice. Nastajanje ACa omogućeno je reorganizacijom i pericentriolarnim nakupljanjem membranskih struktura nakon infekcije, koja počinje u ranoj fazi, a završava tijekom kasne faze infekcije, kada u zrelom ACu nalazimo i virusne proteine, uglavnom u njegovom vanjskom dijelu (slika 1)(3,5,7).

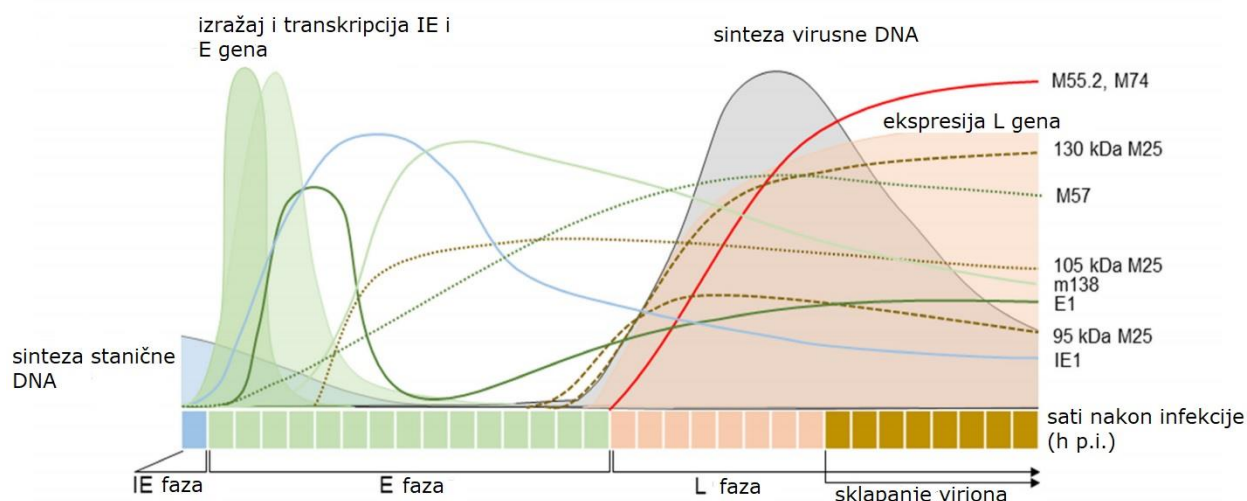


Slika 1 Shematski prikaz lokalizacije organela u neinficiranoj i MCMVom inficiranoj stanici mišjeg fibroblasta.

Gornja slika prikazuje 3 citoplazmatske zone u neinficiranoj stanici – kortikalna (svjetloroža), perinuklearna (zeleno) i jukstanuklearna (crveno). Donja slika prikazuje shematski prikaz citoplazmatskih zona u MCMVom inficiranoj stanici pri 48h p.i. M55/M74 su MCMV glikoproteini virusne ovojnice. cis-Golgi (cGolgi); vanjski AC, eng. *outer AC* (oAC); unutarnji AC, eng. *inner AC* (iAC). Preuzeto iz Lučin et al. Front Cell Dev Biol, 2020(8).

Područje vanjskog, prstenastog dijela ACa sastoji se od cis/medial-Golgija i glikoproteina virusne ovojnice te čini vanjski, oAC (eng. *outer AC*), a područje unutar prstena se naziva unutarnjim, iAC (eng. *inner AC*)(8). S druge strane, iAC se uglavnom sastoji od membranskih struktura porijeklom iz ranih endosoma (EE; eng. *early endosomes*), endoplazmatskog reciklirajućeg odjeljka (ERC; eng. *endoplasmic recycling compartment*) i trans Golgi mreže (TGN; eng. *trans Golgi network*)(8).

U istraživanju (pato)fiziologije CMV infekcije se kao model često koristi mišji citomegalovirus (MCMV) koji je sličan ljudskom citomegalovirusu (HCMV), ali ima brži stanični ciklus(9). Replikacija MCMVa događa se kroz ekspresiju virusnih gena koji su organizirani u tri faze: neposredno rana (IE, eng. *immediate early*), rana (E, eng. *early*) i kasna faza (L, eng. *late*)(slika 2)(10).



Slika 2 Vremenska raspodjela životnog ciklusa MCMV-a i kinetika izražaja MCMV gena koji kodiraju proteine ovojnice (M74) i tegumenta (M25) te proteine koji se izražavaju tijekom IE i E faze infekcije (M57). m138- gen za protein sa sličnim svojstvima kao Fc-receptor, a koji karakterizira ranu fazu infekcije. Preuzeto iz Lučin et al. Front Cell Dey Biol, 2020(8).

Neposredno rana faza infekcije (0-1h) karakterizirana je izražajem IE gena i proteina koji kontroliraju sintezu proteina rane (E) faze. Proteini rane faze potom kontroliraju replikaciju DNA virusa, modificiraju stanične proteine domaćina, kontroliraju imunosni odgovor te započinju program reorganizacije membranskih sustava(1). U ranoj fazi infekcije (6-16h)

počinje i formiranje ACa i stvaranje preteče odjeljka za sklapanje virusnih čestica (preAC) koji se, kako je ranije navedeno, sastoji od remodeliranih membrana na EE/ERC/TGN sučeljima. U konačnici, kasnu fazu infekcije (16-72h) karakterizira stvaranje zrelog ACa i otpuštanje prvih viriona(10).

1.2. Endosomalni sustav stanice

Endomembranski sustavi u stanici sastoje se od odjeljaka i membranskih domena koje imaju jedinstvenu kompoziciju. Homeostaza staničnih membrana može biti narušena uslijed raznih čimbenika kao što su poremećaji staničnog metabolizma, promjene osmolarnosti, disregulacija staničnog signaliranja, a narušena homeostaza također je i jedan od prvih znakova infekcije citomegalovirusom(7).

Nakon endocitoze u zdravoj stanici, internalizirane molekule ulaze u pre-rane endosome (preEE, eng. *pre-early endosomes*) odakle se usmjeravaju u rane endosome (EE). Iz ranih endosoma molekule se mogu reciklirati natrag na plazmatsku membranu (PM), usmjeriti u endosomalni reciklirajući odjeljak (ERC) ili u trans-Golgi mrežu (TGN) za retrogradni transport. S druge strane, mogu se usmjeriti i u degradaciju u kasne endosome (LE)(1,6,7,10).

Vremensko-prostorna dinamika endosomalnog prometovanja, kao i kontrola sudbine endocitiranih molekula (recikliranje ili degradacija) regulirana je citoplazmatskim proteinima. Oni se u aktivnom obliku nalaze vezani uz određene membranske domene gdje regrutiraju mrežu efektora kojima se kontrolira endosomalna dinamika (tubulacija, odcjepljivanje, promjena pH odjeljka i sl.)(1,7,11,12). Najvažniji regulatorni proteini pripadaju skupini malih GTPaza iz Rab (*Ras-related in brain*) i Arf (ADP-ribozilacijski faktori) obitelji(1,7,8,10). Rab proteini se najčešće u neaktivnom (GDP) obliku nalaze u otopini u citosolu, te se vežu za membrane endosomalnog sustava nakon što njihovi aktivatori postanu dostupni u procesu membranskog protoka. U većini slučajeva, na endosomalnim membranama Rab GTPaze se aktiviraju pomoću GEF (eng. *guanine-nucleotide exchange factor*) molekula u GTP oblik, a inaktiviraju se vezanjem GAPova (eng. *GTPase activating*

protein) koji posreduju hidrolizu GTPa, što za posljedicu ima otpuštanje Rab proteina s membrana. Time GEF molekule kontroliraju mjesto regrutiranja Rab proteina dok GAP proteini kontroliraju životni vijek aktivnog oblika Rab GTPaza na membrani(10). Bitno je napomenuti da su promijene na ERCu tijekom MCMV infekcije ukazale na perturbacije u kaskadama Rab GTPaza. Ova pojava sugerira da virus iskorištava ove kaskade za reorganizaciju ERCa, u jednom od najranijih koraka u sekvencijalnoj uspostavi ACa, a koje se očituju nakupljanjem Rab proteina i njihovih efektor(10).

1.2.1. Endosomalno recikliranje

Kao što je ranije navedeno, molekule se mogu reciklirati brzim recikliranjem iz EE, sporim recikliranjem iz ERCa ili retrogradnim transportom preko TGN(1,7,10). Recikliranje iz EE može se usmjeravati prema PM, ERCu i TGNu, a karakterizirano je tubulacijom membrana EEa, te stvaranjem tubularno-endosomalne mreže (TEN, eng. *tubular endosomal network*). Stvaranje tubula je posredovano proteinima s BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) domenom koja prepoznaje pozitivne kurvature/zakrivljenosti, kao što su SNX-BAR proteini, sindapin (PACS1/2) i ACAP-1 (eng. *Arf gap with Coil, Ankyrin repeat, and PH domain protein 1*)(1). Nadalje, pretpostavlja se kako i EHD1-4 (eng. *Eps15 Homology Domain*) proteini kao i dinamin-1, a vjerojatno i dinamin-2, sudjeluju u odcjepljivanju reciklirajućih tubula, odnosno nastanku reciklirajućih vezikula(1,13,14). Također, ulogu u tubulaciji i odcjepljivanju imaju i proteini EHBP1 i MICAL-L1 koji dolaze u interakcije sa Sindapinom-2(1,15,16).

Uloga proteina koji reguliraju reciklirajući sustav u stanici i biogenezu ACa (primjerice Rab10, Rab11, Ectin-1, Arf-6, Rab22A) još uvijek nije poznata. U ovom radu ćemo pokušati istražiti izražaj osnovnih proteina Rab10 interaktoma tijekom MCMV infekcije.

1.2.2. Rab10 interakom i uloga Rab10 GTPaze na sučelju ranih endosoma i endosomalnog reciklirajućeg odjeljka

Rab10 GTPaza je mali protein (23kDa) koji se vezuje za membrane na sučelju EE i ERCa te regulira prometovanje između ova dva odjeljka(1,8,17). U fiksiranim preparatima većine stanica, Rab10 je gotovo potpuno neuočljiv jer su vezikule na koje se regrutira kratkog životnog vijeka i brzo se kreću(17). Međutim, u stanicama inficiranim MCMVom, Rab10 se nakuplja na membranskim strukturama oko središta stanice te predstavlja jedan od najranijih pokazatelja razvoja E-preAC (eng. *early pre-assembly compartment*)(10).

U neinficiranoj stanici, primarni efektori Rab10 su EHBP1 i ACAP1/2. EHBP1 protein regrutira Rab10 na membranu endosoma, mobilizira aktin te potiče endosomalnu tubulaciju(1,15). S druge strane, ACAP1 protein posjeduje BAR domenu pomoću koje prepoznaje i potiče nastajanje pozitivnih membranskih zakrivljenosti, a zajedno s ACAP2 proteinom djeluje kao GAP za važnu molekulu koja regulira endosomalno recikliranje, malu GTPazu Arf6(1,18). Nadalje, kao sekundarni efektori Rab10 GTPaze, ali i mnogih drugih malih GTPaza koje reguliraju endosomalno prometovanje, djeluju EHD proteini kojih razlikujemo četiri vrste (EHD1-4). Iako obavljaju višestruke funkcije u stanici, njihova primarna zadaća je tubulacija, odcjepljivanje i regulacija stvaranja vezikula na EE/EE-ERC sučelju (slika 3)(1,16,19). Važna molekula koja se može vezivati s EHD1 i Sindapinom-2 je i MICAL-L1, koja također djeluje na tubulaciju membrana reciklirajućih endosoma i predstavlja još jedan indirektan efektor Rab10 proteina(1,16). Bitno je napomenuti da MICAL-L1, kao i EHBP1, može mobilizirati Rab10 na endosomalne membrane.

Rab10 se aktivira nakon regrutacije odgovarajućih GEF molekula, koje se mogu aktivirati na više načina. Tako, Rab5 GTPaza, inače jedna od najpoznatijih malih GTPaza koja se izražava na EE, a sudjeluje u sortiranju, fuziji i sazrijevanju EE, djeluje u povratnoj sprezi s Rab10. Tako Rab5 regrutira Rab10 GEF (DENND-4), čime ga aktivira, a Rab10 regrutira Rab5

[illegible]

Fiziologija membrana endosomalnog i sekretornog puta koja bi pomogla razumijevanju utjecaja CMVa na reorganizaciju staničnog sustava membrana nije još dovoljno rasvijetljena. Međutim, razumijevanje promjena u endosomalno-sekretornom sustavu u najranijim fazama infekcije kao i funkcije proteina uključenih u iste mogu nam pomoći razjašnjavanju djelovanja CMVa i njegove patologije u eukariotskim stanicama(7).

2. CILJ RADA

1. Utvrđivanje izražaja Rab10 GTPaze, kao i njegovih primarnih (ACAP1, ACAP2, EHBP1) i sekundarnih efektor (EHD1-4, MICAL-L1) u fazama MCMV infekcije (0h, 6h, 24h i 48h p.i.¹)
2. Utvrđivanje povezanosti MCMV infekcije na ekspresiju i lokalizaciju proteina za tubulaciju na sučelju EE i ERC.

¹p.i. – eng. *post infection*

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Stanične kulture, virusi i uvjeti infekcije

Sav eksperimentalni dio je napravljen na Balb 3T3 fibroblastima (American Type Culture Cell-Collection [ATCC], klon A31, ATCC CCL-163). S druge strane, mišji embrionalni fibroblasti (MEF) korišteni su za proizvodnju i titraciju virusa. Stanice su kultivirane na 37°C uz 5% CO₂ u DMEM u kojem je dodan 10% (5% za MEF) fetalni goveđi serum (eng. *fetal bovine serum*, FBS), 2 mM L-glutamin, 100 mg/mL streptomycin i 100 U/mL penicilin (svi reagensi iz Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY). Kada su se koristile za razmnožavanje, stanice su uzgajane u kulturi u 10 cm petrijevim zdjelicama i raseljene kada su bile 80-90% konfluentne. Proizvodnja zaliha virusa i infekcija stanica je izvedena po standardnoj proceduri(9). Stanice su inficirane s jedinicama 1 PFU (eng. *plaque forming units*, PFU) uz MOI (eng. *multiplicity of infection*, MOI) 10 (infekcija je bila pojačana centrifugiranjem, 2000 rpm 15 minuta, uz okretanje ploča kako bi se postigla jednolikost infekcije)(9).

U svrhu izbjegavanja nespecifičnog vezivanja protutijela na virusni FcR, a time i lažno pozitivni rezultati, korišten je rekombinantni virus Δm138-MCMV (ΔMC95.15) s delecijom fcr1 (m138) gena u svim infekcijama za imunofluorescentne metode(21). Za određivanje PFU u virusnim homogenatima nakon proizvodnje virusa korišten je divlji tip MCMVa (Strain Smith, ATCC VR-194).

3.2. Protutijela i reagensi

Korištena su sljedeća protutijela za označavanje endosomalnih odjeljaka: zečje monoklonalno IgG anti-Rab10 (kat.br. 8127; Cell Signaling Inc, Danvers, USA), zečje monoklonalno IgG anti-Rab5 (kat.br. 3547S ; Cell Signaling Inc, Danvers, USA), zečje anti-MICAL-L1 (kat.br. orb537847 ; Biorbyt, Cambridge, UK), zečje poliklonalno anti-EHBP1 (kat.br. NBP1-93614 ; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), zečje anti-ACAP1 (kat.br. orb29096 ; Biorbyt, Cambridge, UK), mišje monoklonalno anti-ACAP2 (kat.br. SC-376150 ; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA), zečje monoklonalno anti-EHD1 (kat.br. ab109311 ; Jackson Laboratory Bar Harbor, ME, USA) i zečje poliklonalno anti-EHD3 (kat.br. Ab103869 ; Abcam, Cambridge, UK). Protutijela za MCMV proteine su proizvedena na Sveučilištu u Rijeci, Centar za Proteomiku: mišje monoklonalno IgG2a anti m123/IE1 (klon IE1.01) i mišje monoklonalno IgG2a M55/gB (klon M55.02 za imunofluorescenciju). Sekundarna protutijela: AF⁴⁸⁸- i AF⁵⁹⁴- konjugirana protutijela za mišji IgG2a i zečji IgG su od Molecular Probes (Leiden, NL). DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) je od Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; (kat. br. D1306).

3.3. Imunofluorescencija, konfokalna mikroskopija i analiza slika

Stanice su uzgojene na pokrovnim stakalcima na mikrotitarskim pločicama od 24 jažice te su korištene za imunofluorescenciju kada su bile 60-70% konfluentne. Nakon fiksacije s 4% formaldehidom (20 min, sobna temperatura (RT)) i permeabilizacije s 1% Tween-20 (20min, 37°C), stanice su inkubirane s primarnim protutijelima (1h, RT), isprane 3 puta s PBSom i inkubirane s odgovarajućim fluorokrom konjugiranim sekundarnim protutijelima (1h, RT). Nakon ispiranja s PBSom, stanice su zatim uklopljene u Moviol (Fluka Chemicals, Selze, Germany)-DABCO (Sigma Chemical Co,

Steinheim, Germany) u PBSu koji sadrži 50% glicerola te su analizirane konfokalnom mikroskopijom.

Slikanje je izvedeno na Leica DMI8 invertnom konfokalnom mikroskopu (konfokalni dio: TCS SP8; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) koji je opremljen s UV (diode 405), Ar 488, DPSS 561 i He/Ne 633 laserima i 4 detektora (2 PMT i 2HyD). Korišteni su HC PLAPO CS2 (63x/1.40 oil) objektivi. Slike (515x515 piksela) su dobivene pomoću LAS (Leica Application Suite) X softvera (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) u sekvencijalnom načinu rada sa z-serijom od 0,5µm i faktorima zumiranja od 0,75x (veličina piksela 481,47 nm x 481,47 nm), 1,5x (veličina piksela 240,74 nm x 240,74 nm), 3x (veličina piksela 120,37 nm x 120,37 nm) i 6x (veličina piksela 60,18 nm x 60,18 nm). Slike su dobivene u kontroliranim postavkama parametara i izvezene u TIFF formatu.

3.4. Western Blot

Stanični lizati su pripremljeni u RIPA puferu za lizu zajedno sa proteaznim inhibitorima (kat.br. 11697498001, Roche Diagnostics GmbH, Unterhaching, Germany), proteini su separirani pomoću SDS-PAGE elektroforeze (Bio-Rad PowerPac Universal, Hercules, USA) i blotirani (Bio-Rad Trans-Blot Turbo Transfer System, Hercules, USA) na PVDF-P (polivinildendifluorid) WB membranu (Milipore) pri 25V, 1,0A, 25 min. Membrane su inkubirane s 1% reagensom za blokiranje (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 1h, a zatim 1h ili preko noći (4°C) s primarnim protutijelom. Primarna protutijela su isprana s 3 ciklusa ispiranja (TBS s 0,05% Tween-20, pH 7.5 [TBS-T pufer]) te su membrane zatim inkubirane sa sekundarnim protutijelima konjugiranim peroksidazom (POD) i razrijeđenima u TBS puferu (TBS + 0,5% reagens za blokiranje) 45-60 min, RT. Nakon toga su membrane ponovno isprane 3 puta s TBS-T puferom. Kemiluminiscentni signal je dobiven nakon inkubacije sa SignalFire (TM) Plus ECL Reagent ili Signal Fire (TM) Elite ECL Reagent (Cell Signaling, kat.br. 12630S, 12757P) 1min. Signal je detektiran na uređaju Transilluminator Alliance 4.7

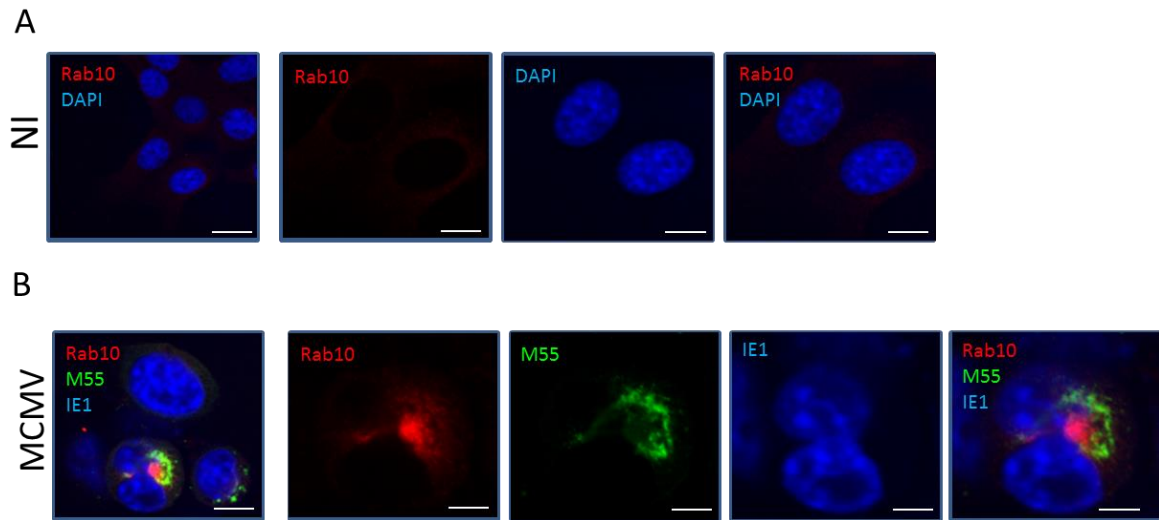
(Uvitec Ltd., Cambridge, UK). Mišji anti- β -aktin (Millipore, Bilerica, MA, USA) je korišten kao kontrola nanosa proteina.

4. REZULTATI

4.1. Lokalizacija Rab10 GTPaze u stanici inficiranoj MCMVom nakon 40 sati infekcije

Prethodna istraživanja su pokazala kako se Rab10 nalazi u staničnom citosolu, te na kratkoživućim organelama koje reguliraju EE-ERC transport. Kako se te organele vrlo brzo kreću, Rab10 je teško uočiti na fiksiranim preparatima neinficiranih staničnih kultura(17). Međutim u stanicama inficiranim MCMVom Rab10 se uočava u organiziranim staničnim membranama u pericentriolarnom iACu koji se vizualizira na kraju E faze MCMV infekcije(10). Tako se Rab10 u inficiranoj stanici može naći u spomenutim jukstanuklearnim nakupinama što sugerira kako je došlo do produljene maturacije i ekspanzije Rab10-kontroliranih membrana, te odgođenog sazrijevanja EE u ERC(8). Kako je ranije navedeno, iAC je u CMV infekciji obavijen prstenastim oACom kojega, osim remodeliranih membrana Golgija, čine i virusni proteini omotača, kao što su M55 (gB), M74 (gO), gH(8,22,23).

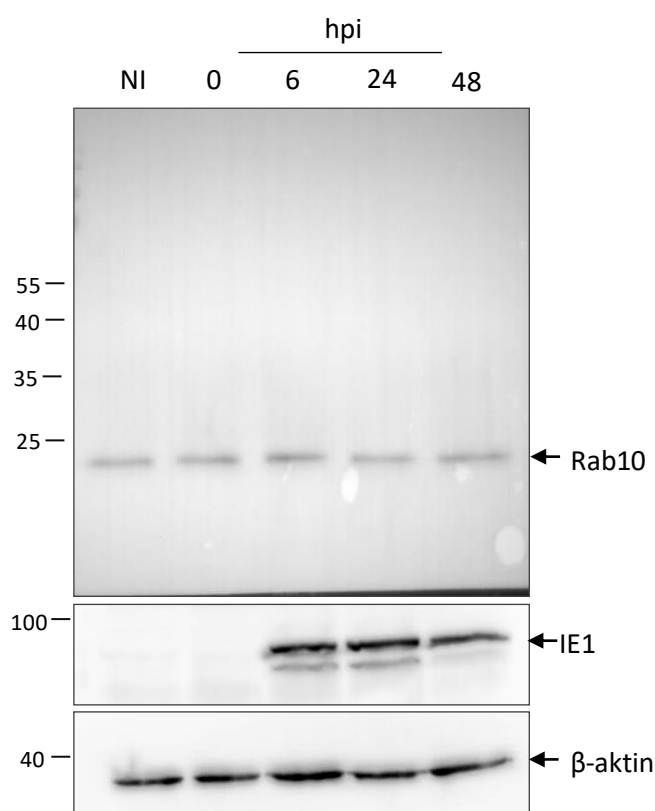
Lokalizaciju Rab10 GTPaze ispitali smo imunofluorescencijom na konfokalnom mikroskopu te smo potvrdili njegov smještaj u perinuklearnom agregatu unutar stanice inficirane MCMVom sukladno prethodnim istraživanjima (slika 4). U odnosu na neinficiranu stanicu, u stanici koja je inficirana MCMVom i nakon 40h infekcije vidljivi pericentriolarni agregati Rab10 proteina u unutarnjem dijelu ACa (iAC)(slika 4). M55 smo uočili nakupljenog u vanjskom dijelu AC-a (oAC)(slika 4) što je bilo i očekivano obzirom da se virusni proteini kasne faze infekcije smještaju u tom području(8).



Slika 4 Rab10 GTPaza u neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama. Balb 3T3 fibroblasti su uzgajani u staničnim kulturama na stakalcima. Jedan dio je ostavljen neinficiran (NI) (A), dok je drugi dio inficiran s Δ FcR-MCMV, PFU 1 (MOI 10) 40 sati (MCMV) (B). Nakon imunofluorescentnog obilježavanja: Rab10 (crveno), DAPI/IE1 (plavo) i M55 (zeleno), stanice su vizualizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta kod manjeg povećanja (prva slika u svakom retku) iznosi 20 μ m, a kod većeg povećanja 10 μ m.

4.2. Analiza ukupnog izražaja Rab10 GTPaze u stanici tijekom 48h infekcije MCMVom

Kao što je ranije pokazano, Rab10 se u fiksiranim preparatima nakon vizualizacije imunofluorescentnim metodama vrlo slabo vidi u neinficiranim stanicama, dok se nakon MCMV infekcije jasno uočava (slika 4)(8,17). Stoga smo metodom *western-blot*a, u staničnim lizatima neinficiranih stanica, kao i 0, 6, 24 i 48 hpi, ispitali da li se njegov ukupni izražaj mijenja. Bitno je napomenuti da 0 hpi predstavlja stanice koje su lizirane odmah nakon dodavanja virusa. U skladu s prethodnim istraživanjima(8) utvrdili smo kako se ukupna ekspresija Rab10 GTPaze ne mijenja tijekom 48h infekcije MCMVom (slika 5). Ovaj rezultat ukazuje da je pojačani signal u inficiranim stanicama, koji uočavamo imunofluorescencijom posljedica povećane mobilizacije Rab10 na stanične membrane, povećanog koncentriranja Rab10 pozitivnih membrana na jednom mjestu (pericentriolarno područje), ili oboje.



Slika 5 Izražaj Rab10 na MCMV inficiranim Balb3T3 fibroblastima. Stanični lizati Δ FcR-MCMV inficiranih i neinficiranih Balb 3T3 stanica dobiveni u naznačenim vremenima su separirani pomoću SDS-PAGEa, blotirani, inkubirani s odgovarajućim primarnim i sekundarnim protutijelima te vizualizirani kemiluminiscencijom. IE1 je korišten kao kontrola infekcije, a β -aktin kao kontrola nanosa.

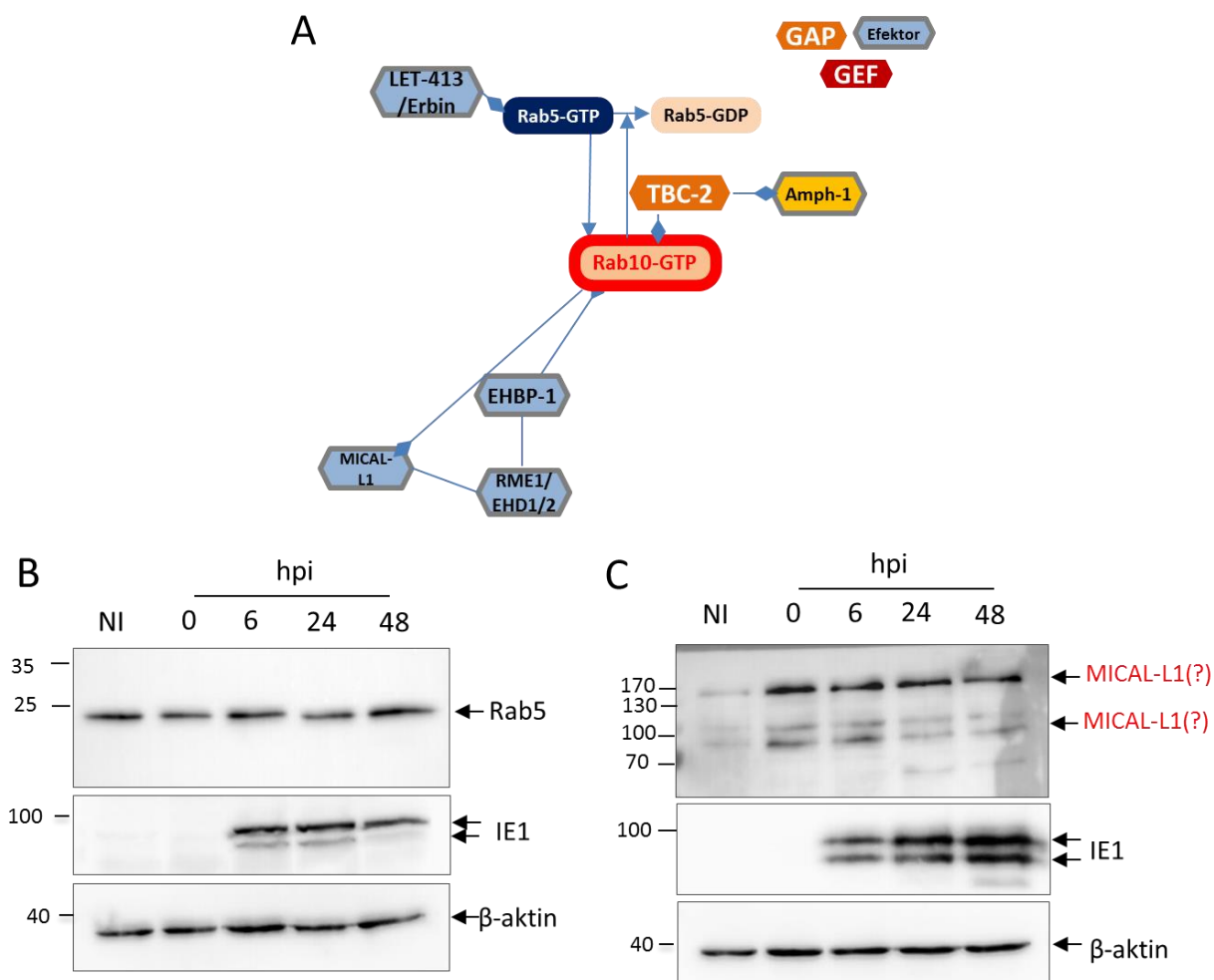
4.3. Izražaj regulatora i efektora Rab10 GTPaze tijekom MCMV infekcije (Rab5, MICAL-L1, EHBP1, ACAP1/2 i EHD1/3)

4.3.1. Izražaj Rab5 i MICAL-L1 u MCMV infekciji

Tri su poznata puta aktivacije Rab10 GTPaze. Prvi put podrazumijeva regrutaciju Rabina 8 (Rab10 i Rab8 GEF) od strane Rab11(24). Drugi put se odvija preko Rab5 GTPaze klasičnim kaskadnim putem regulacije(1). Općenito, kaskadni put regulacije aktivacije GTPaza podrazumijeva pravilo u kojem prethodna GTPaza aktivira onu nishodnu. U ovom slučaju Rab5 aktivira Rab10 mobilizacijom Rab10 GEFa (DENND-4). S druge strane, nishodna GTPaza inaktivira prethodnu u nizu. U ovom slučaju Rab10 inaktivira Rab5 mobilizacijom Rab5 GAPa (TBC-2) (slika 3)(10). Međutim, zanimljivo je da je objavljeno kako Rab5 može regrutirati TBC-4 koji djeluje kao GAP za Rab10, čime ga inaktivira. To dodatno komplicira i inače vrlo složenu sliku kontrole aktivacije endosomalnih regulatora, poput malih Rab i Arf GTPaza(1).

U konačnici, kao dio trećeg puta Rab10 aktivacije, protein Rab35 može regrutirati MICAL-L1, a MICAL-L1 dalje Rab10. Zanimljivo, MICAL-L1 je istovremeno i mobilizator i efektor proteina Rab10 (slika 3), a ranije je spomenuto kako je isti uključen u tubulaciju reciklirajućih endosoma.

Kako bismo ispitali da li se ukupni izražaj Rab5 i MICAL-L1 proteina mijenja unutar stanice inficirane MCMVom napravili smo *western-blot* analizu (slika 6).



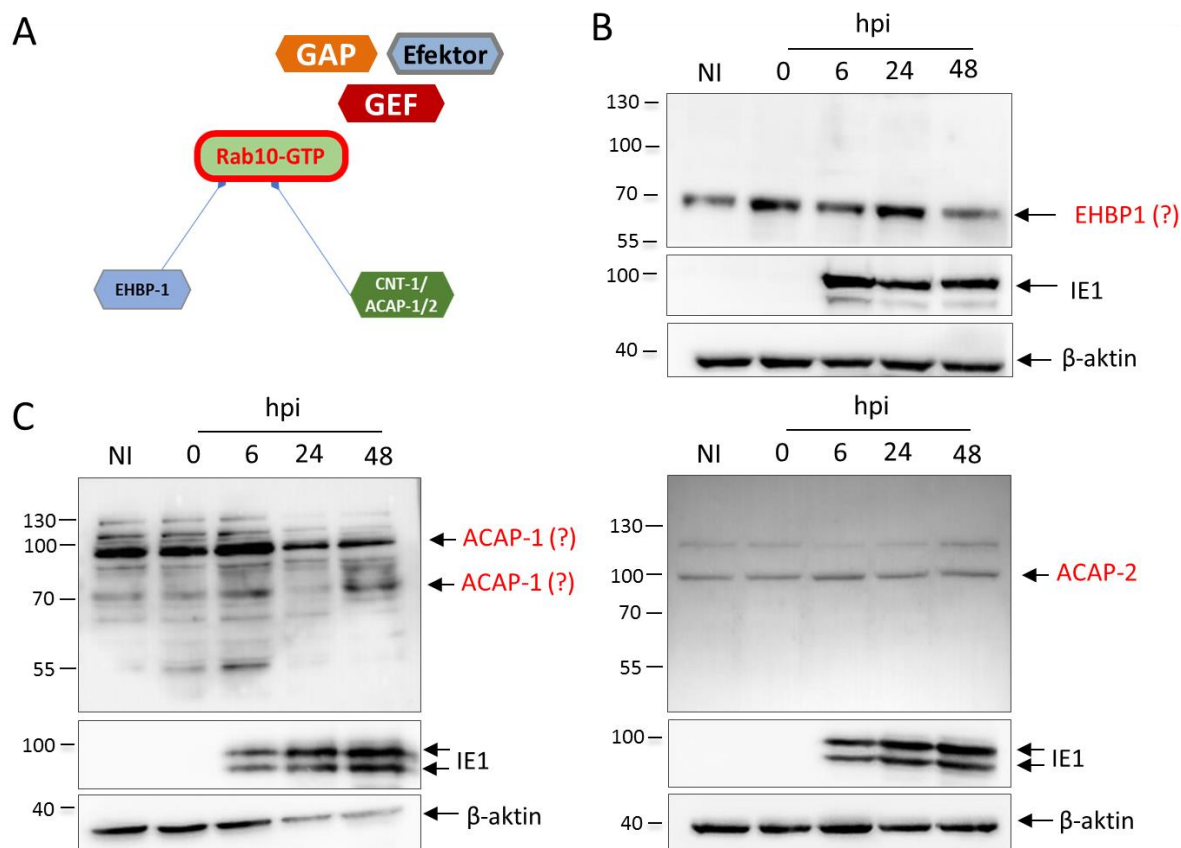
Slika 6 Izražaj Rab5 i MICAL-L1na MCMV inficiranim Balb3T3 fibroblastima. Shematski prikaz koji pokazuje interakcije Rab10, Rab5 i MICAL-L1 (A). Stanice su inficirane Δ FcR-MCMV, PFU 1 (MOI 10), te u naznačenim vremenima napravljeni su lizati. Nakon SDS-PAGE, blotiranja i inkubacije s odgovarajućim primarnim i sekundarnim protutijelima, Rab5 (25kDa) (B) odnosno MICAL-L1 (93kDa) (C) su vizualizirani kemiluminiscencijom. IE1 je korišten kao kontrola infekcije, a β -aktin kao kontrola nanosa proteina.

Tijekom 48-satne kinetike MCMV infekcije vidljivo je da ne dolazi do promjene izražaja Rab5 GTPaze, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima(8), ali niti MICAL-L1 (slika 6)(8). Ovaj rezultat ukazuje da povećano nakupljanje Rab10 i pojačan imunofluorescencijski signal najvjerojatnije nije posljedica povećane mobilizacije na membrane preko aktivnosti Rab5 GTPaze i MICAL-L1.

4.3.2. *Primarni efektori Rab10 GTPaze EHBP1, ACAP1 i ACAP2*

Kao izravni efektori Rab10 GTPaze djeluju EHBP1 te ACAP1/2 proteini (slike 3 i 7). EHBP1 regulira endosomalno recikliranje tako što se veže na endosome, mobilizira aktinski citoskelet te time posreduje endosomalnu tubulaciju. Međutim kako bi uspješno djelovao na tubuliranje endosoma potrebna mu je stimulacija pomoću Rab10 GTPaze (slika 7A)(15). ACAP1 protein utječe na stvaranje zakrivljenosti na endosomalnim membranama što potiče nastanak endosomalnih tubula(18).

Kako bismo utvrdili da li se izražaj ovih Rab10 efektoru u stanici mijenja tijekom 48h MCMV infekcije, napravljena je *western-blot* analiza EHBP1 i ACAP1/2 proteina (slika 7B i 7C).



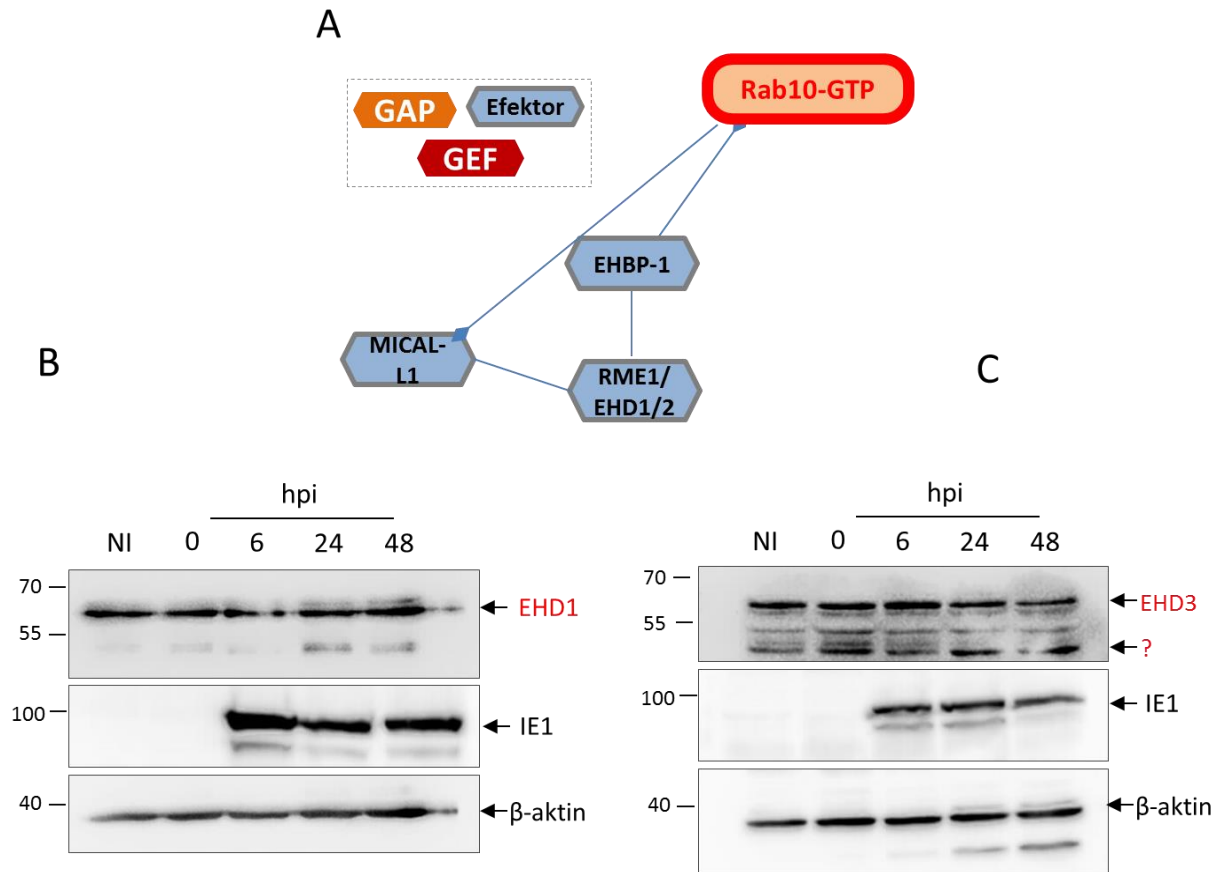
Slika 7 Izražaj EHBP1 i ACAP1/2 na MCMV inficiranim Balb373 fibroblastima. Shematski prikaz koji pokazuje Rab10 i njegove efekte ACAP1/2 i EHBP1 (A). Stanice su inficirane Δ FcR-MCMV, PFU 1 (MOI 10), te u naznačenim vremenima napravljeni su lizati. Nakon SDS-PAGE, blotiranja i inkubacije s odgovarajućim primarnim i sekundarnim protutijelima, EHBP1 (140 kDa) (B) odnosno ACAP1 (81 kDa) i ACAP2 (82 kDa) (C) su vizualizirani kemiluminiscencijom. IE1 je korišten kao kontrola infekcije, a β -aktin kao kontrola nanosa proteina.

Rezultati *western-blot* analize (slika 7B i 7C) ukazuju da se izražaj primarnih Rab10 efektor, EHBP1 i ACAP1/2 ne mijenja tijekom infekcije MCMVom. Međutim, obzirom da se EHBP1 i ACAP1 ne vizualiziraju na membrani na očekivanoj veličini (signal nakon detekcije EHBP1 protutijelom umjesto na 140kDa opetovano se uočava na 67kDa, a dominantni signal nakon detekcije ACAP1 na 120kDa umjesto na 81kDa), treba se dodatno još potvrditi specifičnost prepoznavanja, primjerice nakon *knock-down* eksperimenata sa specifičnom siRNA.

4.3.3. *Sekundarni efektori Rab10 GTPaze EHD1 i EHD3*

Poznato je da proteini EHD skupine (EHD1-4) često dolaze u interakcije s različitim citosolnim proteinima, primjerice Rab efektorima poput Rabenozina 5 (efektor Rab5) ili Rab11 FIP3 (efektor Rab11) nakon čega potiču endosomalnu tubulaciju i recikliranje vezikula(16). Međutim, pretpostavlja se da njihovo djelovanje može biti posredovano i EHBP1 molekulom, a time indirektno i preko Rab10 (slike 3 i 8A).

Iako se EHD proteini mogu mobilizirati na različite načine, od kojih mnogi i neovisno o Rab10, željeli smo vidjeti kakav je izražaj EHD1 i EHD3 proteina tijekom 48h infekcije MCMVom. Analiza lizata dobivenih u različitim vremenima tijekom 48h kinetike pokazuju da ne postoji značajnija razlika u izražaju (slike 8B i 8C).

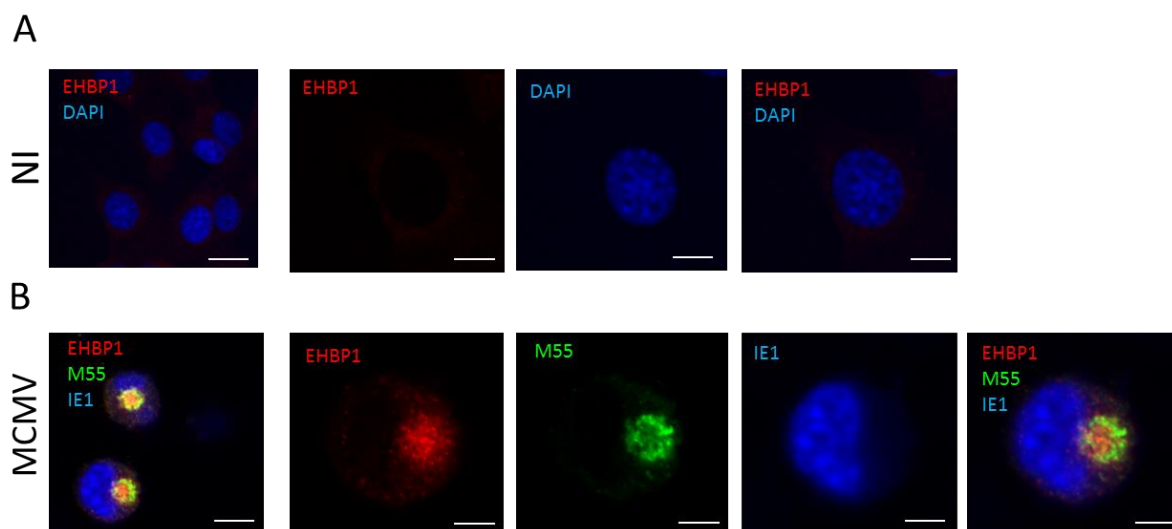


Slika 8 Izražaj EHD1 i EHD3 na MCMV inficiranim Balb373 fibroblastima. Shematski prikaz koji pokazuje Rab10 i njegove efekte EHD1 i EHD3 (A). Stanice su inficirane Δ FcR-MCMV, PFU 1 (MOI 10), te u naznačenim vremenima napravljeni su lizati. Nakon SDS-PAGE, blotiranja i inkubacije s odgovarajućim primarnim i sekundarnim protutijelima EHD1 (60 kDa) (B) odnosno EHD3 (62 kDa) (C) su vizualizirani kemiluminiscencijom. IE1 je korišten kao kontrola infekcije, a β -aktin kao kontrola nanosa proteina.

4.4. Izražaj EHBP1 u fibroblastima nakon 40h infekcije MCMVom

Ranije smo pokazali da se Rab10 molekule nakupljaju u pericentriolarnom dijelu MCMV inficirane stanice, u tzv. iAC. Stoga smo željeli potvrditi pretpostavku da se i primarni Rab10 efektor, EHBP1, nakuplja u istom području u inficiranoj stanici. Kako su protutijela koja prepoznaju i EHBP1 i Rab10 istog izotipa (kunićja), nismo bili u mogućnosti zajedno ih kolokalizirati, ali smo stoga imunofluorescencijom i konfokalnom mikroskopijom vizualizirali EHBP1 izražaj u kasnoj fazi MCMV infekcije jednako kao što je prethodno napravljeno za Rab10 (slika 4).

Na slici 10 je prikazan rezultat dobiven konfokalnom mikroskopijom na kojem se vidi da se EHBP1 također smješta u unutarnjem dijelu ACa odnosno u iACu dok se molekula virusnog omotača, M55/gB nalazi unutar vanjskog dijela ACa (oAC). Ovaj rezultat je u skladu s povećanim izražajem Rab10 u AC koji najvjerojatnije povećava mobilizaciju i svojih efektor, u ovom slučaju EHBP1, na reorganizirane endosomalne membrane u MCMV infekciji.



Slika 9 EHBP1 u neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama. Balb 3T3 fibroblasti su uzgajani u staničnim kulturama na stakalcima. Jedan dio je ostavljen neinficiran (NI) (A), dok je drugi dio inficiran s Δ FcR-MCMV, PFU 1 (MOI 10) 40 sati (MCMV) (B). Nakon imunofluorescentnog obilježavanja: EHBP1 (crveno), DAPI/IE1 (plavo) i M55 (zeleno) stanice su vizualizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta kod manjeg povećanja (prva slika u svakom retku) iznosi 20 μ m, a kod većeg povećanja 10 μ m.

5. RASPRAVA

Opsežna reorganizacija unutarstaničnih membrana nastaje kao posljedica MCMV infekcije, a događa se u svrhu nastanka odjeljka za sklapanje virusnih čestica (AC)(1,3–6) . U ovom radu smo istraživali membrane reciklirajućih odjeljaka, prvenstveno se fokusirajući na malu GTPazu Rab10, koja regulira prometovanje između EE/ERC odjeljaka, te njezine aktivatore i efektore: EHBP1, ACAP1, ACAP2, EHD1, EHD3, MICAL-L1 i Rab5. Rezultati dobiveni nakon *western-blot* analize (slike 5, 6, 7 i 8) i analize lokalizacije Rab10 i EHBP1 konfokalnom mikroskopijom (slike 4 i 9) ukazuju da MCMV uzrokuje reorganizaciju sučelja EE/ERC sučelja. To je najvjerojatnije posljedica narušavanja prostorno-vremenske dinamike prometovanja ovim odjeljcima uslijed remećenja ustaljenih regulacijskih petlji u kojima dolazi do aktivacije i inhibicije malih Rab i Arf GTPaza i njihovih efektor(1,8,11,25). Reorganizacija endosomalnog sučelja očituje se kao pericentriolarno nakupljanje proteina koji reguliraju protok internaliziranih molekula, prvenstveno između EE, ERC i TGN, čime nastaje odjeljak za sklapanje virusnih čestica (AC).

5.1. MCMV reorganizira endosomalne reciklirajuće membrane u unutrašnji dio AC (iAC)

Kao što je ranije navedeno, virusni odjeljak za sklapanje viriona (AC), kao i njegova preteča preAC sastoje se od reorganiziranog Golgija i drugih membranskih elemenata stanice (EE, ERC, TGN)(7,8,22,23). Membrane EE i ERC, zajedno sa svojim specifičnim proteinima – markerima, već se u ranoj fazi MCMV infekcije uočavaju nakupljeni u iAC(8). Po svemu sudeći, čini se kako rani genski produkti MCMVa remete mehanizme regrutiranja i regulatornih kaskada staničnih proteina koji sudjeluju u oblikovanju membranskog sustava stanice. U neinficiranoj stanici, normalno funkcioniranje ovih membranskih struktura kontrolirano je domaćinskim proteinima koji sudjeluju u prometovanju na EE/ERC sučelju(25,26).

Međutim, u MCMV infekciji funkcija ovih membrana je narušena, a recikliranje zakočeno(7,27). Naime, tada EE/ERC membrane postaju dio unutrašnjeg AC (iAC) i vjerojatno imaju neku ulogu u sekundarnom sklapanju virusa. Precizni mehanizmi koje virus koristi u tu svrhu još nisu poznati, ali za očekivati je da za potpunu funkciju virus treba mašineriju za fiziju viriona. Teoretski, nju posjeduju EE, koji sadrže –ESCRT kompleks (eng. *The endosomal Sorting Complexes Required for Transport*). Nalazimo ga u posebnim, degradirajućim domenama EE, a sastoji se od ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT- II i ESCRT- III kompleksa. U zdravoj stanici, njegovim djelovanjem dolazi do pupanja membrana u unutrašnjost endosoma, a u konačnici i oslobađanja intraluminalnih vezikula (ILV), koje postaju sastavni dio multivezikularnih endosoma (MVB)(26,28). Međutim, u uvjetima infekcije, moguće je da se kapsida obavića membranama ACa u kojoj se nalaze uklopljeni proteini ovojnice (kao M55/gB, M74/gO, gM, gN, gH)(7,27). Gotovi virioni bi potom pupali i otcjepljivali se iz ACa pomoću ESCRT kompleksa, te reciklirali prema staničnoj površini. Zanimljivo je da je Vps4 protein, inače sastavni dio ESCRT- III kompleksa koji je bitan, za fiziju vezikula u unutrašnjost EE odjeljaka, pokazan u AC u HCMV inficiranim fibroblastima(23). Ipak, niti EE, niti ERC, ne mogu samostalno djelovati na nastanak AC i otpuštanje gotovih viriona. Stoga vjerojatno membrane EE, ERC i TGN, ali i cis/medial-Golgija, djeluju zajednički u svrhu stvaranja funkcionalno tako kompleksne strukture kao AC.

5.2. Značaj Rab10 i njegovih regulatora u stvaranju AC

Kao što smo ranije naveli, Rab10, kao i većina njegovih regulatora i efektora se ne vidi u neinficiranim stanicama, što ukazuje na vrlo brzu dinamiku membrana na kojima djeluju. Nadalje, mnogi od njih se ne vežu stabilno niti uz jednu određenu membransku strukturu pa je upravo njihova lokalizacija u MCMV infekciji važna za određivanje razmjera utjecaja citomegalovirusa na reorganizaciju staničnih organela i tubulaciju(8). Analizom stanične lokalizacije Rab10 proteina i njegovog primarnog efektoru EHBP1 u kasnoj

fazi MCMV infekcije, odnosno 40h nakon infekcije, utvrđeno je nakupljanje ispitivanih proteina u obliku pericentriolarnog agregata u unutarnjem dijelu Aca (slike 4 i 10). Ovaj rezultat ukazuje na mogućnost da CMV infekcija utječe na cijelu kaskadu aktivacije Rab10 proteina kako bi virus preuzeo kontrolu nad ERC prometovanjem i tako uspostavio AC. Nadalje, nakupljanje EHBP1 i Rab10 bi moglo biti jednim od uzroka znatne tubulacije unutarnjih dijelova Aca obzirom da, u zdravoj stanici, imaju važnu ulogu u regulaciji pupanja membrana tijekom procesa recikliranja. Naime, virusom uzrokovana disfunkcija regulacije sazrijevanja EE, ali i endosomalnog recikliranja mogla bi dovesti do pretjerane aktivacije Rab10 proteina, te nakupljanja njegovih primarnih (EHBP1 i ACAP1/2) i sekundarnih efektor (EHD1-4 proteini)(7,8). Poznato je da ACAP1 protein potiče nastajanje pozitivnih zakrivljenosti što prethodi samoj tubulaciji i odvajanju tubula, EHBP1 mobilizira aktin i pupanje membrana, a EHD proteini također dovode do tubulacije(1,13–15). S druge strane, pokazano je da je za uspostavu Aca potrebno djelovanje citoskeleta, prvenstveno aktina i mikrotubula(3,29). Već smo napomenuli da, nakon regrutacije pomoću Rab10, mobilizaciju aktina u svrhu recikliranja membrana posreduje EHBP1(15), koji se nakuplja u unutrašnjosti iAC (slika 10).

Iako je logično za očekivati da virus mobilizira ove proteine kako bi potaknuo recikliranje gotovih virusnih čestica prema staničnoj površini, treba imati u vidu da je recikliranje staničnih proteina, kao što su transferin i MHC-I molekule, inhibirano u uvjetima infekcije(7,27). Prema tome, postavlja se pitanje kako virus remodelira stanične reciklirajuće membrane, a da istodobno omogući selektivno recikliranje viriona, ali i inhibiciju recikliranja staničnih glikoproteina.

Nadalje, iako smo, obzirom na pojačanje signala Rab10 i EHBP1 proteina konfokalnom mikroskopijom, očekivali porast njihovog ukupnog izražaja, *western-blot* analizom pokazali smo da se u infekciji, niti Rab10 i EHBP1 izražaj, kao ni izražaj Rab5 regulatora (Rab5, MICAL-L1) i efektor (ACAP1/2, EHD1 i EHD3) ne mijenja. Stoga je moguće da se ove molekule

pojačano mobiliziraju na membrane ili se signal pojačava jednostavno uslijed pojačanog pericentriolarnog koncentriranja.

Regulatorni sustav recikliranja na EE-ERC sučelju ovisi o mnogim staničnim molekulama Rab i Arf obitelji, između ostalog, o proteinima Rab10 i njegovim efektorima. Usprkos novim saznanjima, radi se o vrlo složenom sustavu i još uvijek ne postoji dovoljno dokaza o granici između pojedinih vrsta odjeljaka i detaljnom prijenosu molekula koje recikliraju između istih(25). Nadalje, molekule iz EE i ERC mogu proći do TGN i obrnuto što dostatno komplicira razumijevanje puteva recikliranja(30). Činjenica je da citomegalovirusna infekcija dovodi do velike reorganizacije svih ovih membrana i njihovog nakupljanja u pericentriolarnom području s ciljem replikacije i proizvodnje novih viriona. Razumijevanje same fiziologije virusne infekcije koje je osnova za razvijanje mogućih specifičnih terapija neće biti moguće bez rasvjetljavanja ovih procesa.

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu smo istražili kako infekcija mišjim citomegalovirusom djeluje na izražaj staničnih proteina koji reguliraju i posreduju tubulaciju unutarstaničnih membrana. (1) *Western-blot* analizom izražaja Rab10 GTPaze, njegovih regulatora (Rab5 i MICAL-L1), te primarnih i sekundarnih efektor (EHBP1, ACAP1/2, EHD1, EHD3) utvrdili smo kako se ekspresija niti jednog proteina ne mijenja tijekom 48h infekcije MCMVom već ostaje na razini kao u neinficiranim stanicama. (2) Konfokalnom mikroskopijom smo potvrdili i pokazali da Rab10 i njegov primarni efektor, EHBP1, postaju dio unutrašnjeg dijela odjeljka za sklapanje virusnih čestica (iAC) u kasnoj fazi MCMV infekcije.

Ovi rezultati ukazuju da za nakupljanje u iAC ispitivanih proteina koji sudjeluju u endosomalnom prometovanju i recikliranju nije nužno povećanje ukupnog izražaja već njihovo pericentriolarno koncentriranje koje nastaje kao posljedica reorganizacije EE-ERC membrana. Osim daljnjeg istraživanja utjecaja mišjeg citomegalovirusa na kompleksnu mrežu Rab10 interaktoma potrebno je potanje istražiti i samu konstrukciju endosomalnog prijenosa internaliziranih molekula na EE/ERC sučelju te bi ova otkrića potencijalno mogla doprinijeti razumijevanju fiziologije i biogeneze ERCa.

7. LITERATURA

1. Mahmutefendić Lučin. Istraživački projekti Reorganizacija sučelja između ranih endosoma i endosomalnog reciklirajućeg odjeljka u ranoj fazi infekcije citomegalovirusom CREERC Cjelina B – Projektni prijedlog. 2020;
2. Emery VC, Cope A V., Bowen EF, Gor D, Griffiths PD. The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J Exp Med*. 1999;190(2):177–82.
3. Sanchez V, Greis KD, Sztul E, Britt WJ. Accumulation of Virion Tegument and Envelope Proteins in a Stable Cytoplasmic Compartment during Human Cytomegalovirus Replication: Characterization of a Potential Site of Virus Assembly. *J Virol*. 2000;74(2):975–86.
4. Close WL, Anderson AN, Pellett PE. Betaherpesvirus virion assembly and egress. Vol. 1045, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018. 167–207 p.
5. Moorman NJ, Sharon-Friling R, Shenk T, Cristea IM. A targeted spatial-temporal proteomics approach implicates multiple cellular trafficking pathways in human cytomegalovirus virion maturation. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2010;9(5):851–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M900485-MCP200>
6. Karleuša L, Lučin HM, Zagorac GB, Lučin P. Cytoplasmic virion assembly compartment of betaherpesviruses. *Period Biol*. 2020;121–122(3–4):97–106.
7. Karleuša L, Mahmutefendić H, Tomaš MI, Zagorac GB, Lučin P. Landmarks of endosomal remodeling in the early phase of cytomegalovirus infection. *Virology*. 2018;515(October 2017):108–22.
8. Lučin P, Jug Vučko N, Karleuša L, Mahmutefendić Lučin H, Blagojević Zagorac G, Lisnić B, et al. Cytomegalovirus Generates Assembly Compartment in the Early Phase of Infection by Perturbation of Host-Cell Factors Recruitment at the Early Endosome/Endosomal Recycling Compartment/Trans-Golgi Interface. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8(September):1–24.
9. Brizić I, Lisnić B, Brune W, Hengel H, Jonjić S. Cytomegalovirus Infection: Mouse Model. *Curr Protoc Immunol*. 2018;122(1):e51.
10. Lučin P, Karleuša L, Zagorac GB, Lučin HM, Pavišić V, Vučko NJ, et al. Cytomegaloviruses exploit recycling rab proteins in the sequential establishment of the assembly compartment. *Front Cell Dev Biol*. 2018;6(DEC):4–11.
11. Martinez O, Goud B. Rab proteins. 1998;1404(December 1997).
12. Alenquer M, Amorim MJ. Exosome biogenesis, regulation, and function in viral infection. *Viruses*. 2015;7(9):5066–83.
13. Mesaki K, Tanabe K, Obayashi M, Oe N, Takei K. Fission of Tubular Endosomes Triggers Endosomal Acidification and Movement. 2011;6(5):10.

14. Jimah JR, Hinshaw JE. Structural Insights into the Mechanism of Dynamin Superfamily Proteins. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2018;1–17. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.11.003>
15. Wang P, Liu H, Wang Y, Liu O, Zhang J, Gleason A, et al. RAB-10 Promotes EHBP-1 Bridging of Filamentous Actin and Tubular Recycling Endosomes. *PLoS Genet*. 2016;12(6):1–28.
16. Giridharan SSP, Cai B, Vitale N, Naslavsky N, Caplan S. Cooperation of MICAL-L1, syndapin2, and phosphatidic acid in tubular recycling endosome biogenesis. *Mol Biol Cell*. 2013;24(11):1776–90.
17. M. Babbey C., Ahktar N. Wang E., Chih-Hsiung Chen C., D. Grant B. WDK. Rab10 Regulates Membrane Transport through Early Endosomes of Polarized Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Mol Biol Cell*. 2006;17(July):3156–75.
18. Pang X, Fan J, Zhang Y, Zhang K, Gao B, Ma J, et al. A PH domain in ACAP1 possesses key features of the BAR domain in promoting membrane curvature. *Dev Cell* [Internet]. 2014;31(1):73–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2014.08.020>
19. Grant BD, Caplan S. Mechanisms of EHD/RME-1 Protein Function in Endocytic Transport. 2009;9(12):2043–52.
20. Sasidharan N, Sumakovic M, Hannemann M, Hegermann J, Liewal JF, Olendrowitz C, et al. RAB-5 and RAB-10 cooperate to regulate neuropeptide release in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(46):18944–9.
21. Messerle M, Milotic I, Krmpotic A, Jonjic S, Pettenkofer-institut M Von. Virus Attenuation after Deletion of the Cytomegalovirus Fc Receptor Gene Is Not due to Antibody Control. 1998;72(2):1377–82.
22. Das S, Pellett PE. Spatial Relationships between Markers for Secretory and Endosomal Machinery in Human Cytomegalovirus-Infected Cells versus Those in Uninfected Cells. *J Virol*. 2011;85(12):5864–79.
23. Cepeda V, Esteban M, Fraile-ramos A. Human cytomegalovirus final envelopment on membranes containing both trans -Golgi network and endosomal markers. 2010;12(December 2009):386–404.
24. Hommaa Y, Fukudaa M. Rabi 8 regulates neurite outgrowth in both a GEF-activity-dependent and -independent manner. *Mol Biol Cell*. 2016;27:2107–2118.
25. Naslavsky N, Caplan S. The enigmatic endosome - Sorting the ins and outs of endocytic trafficking. *J Cell Sci*. 2018;131(13).
26. Cullen PJ, Steinberg F. To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(11):679–96.
27. Tomaš MI, Kučić N, Mahmutefendić H, Blagojević G, Lučin P. Murine Cytomegalovirus Perturbs Endosomal Trafficking of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules in the Early Phase of Infection. *J Virol*.

2010;84(21):11101–12.

28. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. EMBO J [Internet]. 2011;30(17):3481–500. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
29. Procter DJ, Banerjee A, Nukui M, Kruse K, Gaponenko V, Murphy EA, et al. The HCMV Assembly Compartment Is a Dynamic Golgi-Derived MTOC that Controls Nuclear Rotation and Virus Spread. Dev Cell [Internet]. 2018;45(1):83-100.e7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.03.010>
30. Saraste J, Prydz K. A New Look at the Functional Organization of the Golgi Ribbon. Front Cell Dev Biol. 2019;7(August).

8. POPIS SLIKA

- Slika 1 Shematski prikaz lokalizacije organela u neinficiranoj i MCMVom inficiranoj stanici mišjeg fibroblasta. Gornja slika prikazuje 3 citoplazmatske zone u neinficiranoj stanici – kortikalna (svjetlorozo), perinuklearna (zeleno) i jukstanuklearna (crveno). Donja slika prikazuje shematski prikaz citoplazmatskih zona u MCMVom inficiranoj stanici pri 48h p.i. M55/M74 su MCMV glikoproteini virusne ovojnice. cis-Golgy (cGolgi); vanjski AC, eng. *outer AC* (oAC); unutarnji AC, eng. *inner AC* (iAC). Preuzeto iz Lučin et al. Front Cell Dev Biol, 2020⁸. 1
- Slika 2 Vremenska raspodjela životnog ciklusa MCMV-a i kinetika izražaja MCMV gena koji kodiraju proteine ovojnice (M74) i tegumenta (M25) te proteine koji se izražavaju tijekom IE i E faze infekcije (M57). m138- gen za protein sa sličnim svojstvima kao Fc-receptor, a koji karakterizira ranu fazi infekcije. Preuzeto iz Lučin et al. Front Cell Dev Biol, 2020⁸. 2
- Slika 3 Interaktom GTPaze Rab10. Mreža djelovanja efektor, GAP-ova i GEF-ova na sučelju EE/ERC. EE-rani endosomi; ERC- endosomalni reciklirajući odjeljak. Detaljni opis nalazi se u tekstu. Preuzeto iz HRZZ projektnog prijedloga: IP-2020-02-2916¹. 6
- Slika 4 Analiza lokalizacije Rab10 GTPaze u stanici inficiranoj MCMV-om 40h p.i. Rab10 (crveno), DAPI (plavo), M55 (zeleno). Gornji stupac: neinficirane stanice slikane nakon 40h. Donji stupac: stanice inficirane Δ FcR-MCMV, PFU 1 (MOI 10) i slikane nakon 40h infekcije. Red veličine retka NI (neinficirane) je redom: 20 μ m (povećanje 1,5x), 10-10-10 μ m (povećanje 3x). Red veličine MCMV retka je redom: 10 μ m (povećanje 3x), 5-5-5-5 μ m (povećanje 6x). Korištena su odgovarajuća protutijela: DAPI (jezgra, IE1), Rab10 i M55.13
- Slika 5 Izražaj Rab10 (23kDa) na MCMV inficiranim Balb373 fibroblastima. Stanice su inficirane Δ FcR-MCMV, PFU 1 (MOI 10), te u naznačenim vremenima napravljeni su lizati. Nakon SDS-PAGE, blotiranja i inkubacije s odgovarajućim primarnim i sekundarnim protutijelima, IE1, β -aktin, te Rab10 su vizualizirani kemiluminiscencijom.14
- Slika 6 Izražaj Rab5 (25 kDa) i MICAL-L1 (93 kDa) na MCMV inficiranim Balb373 fibroblastima. (A) Shematski prikaz koji pokazuje Rab10 i njegove efektore Rab5 i MICAL-L1. (B,C) Stanice su inficirane Δ FcR-MCMV, PFU 1 (MOI 10), te u naznačenim vremenima napravljeni su lizati. Nakon SDS-PAGE, blotiranja i inkubacije s odgovarajućim primarnim i sekundarnim protutijelima, IE1, β -aktin, te Rab5 (B) odnosno MICAL-L1 (C) su vizualizirani kemiluminiscencijom.16

Slika 7 Izražaj EHBP1 (140 kDa) i ACAP1/2 (ACAP1 – 81 kDa, ACAP2 – 82 kDa) na MCMV inficiranim Balb373 fibroblastima. (A) Shematski prikaz koji pokazuje Rab10 i njegove efekte ACAP1/2 i EHBP1. (B,C) Stanice su inficirane Δ FcR-MCMV, PFU 1 (MOI 10), te u naznačenim vremenima napravljeni su lizati. Nakon SDS-PAGE, blotiranja i inkubacije s odgovarajućim primarnim i sekundarnim protutijelima, IE1, β -aktin, te EHBP1 (B) odnosno ACAP-1 i ACAP2 (C) su vizualizirani kemiluminiscencijom.....18

Slika 8 Izražaj EHD1 (60 kDa) i EHD3 (62 kDa) na MCMV inficiranim Balb373 fibroblastima. (A) Shematski prikaz koji pokazuje Rab10 i njegove efekte EHD1 i EHD3. (B,C) Stanice su inficirane Δ FcR-MCMV, PFU 1 (MOI 10), te u naznačenim vremenima napravljeni su lizati. Nakon SDS-PAGE, blotiranja i inkubacije s odgovarajućim primarnim i sekundarnim protutijelima, IE1, β -aktin, te EHD1 (B) odnosno EHD3 (C) su vizualizirani kemiluminiscencijom.20

Slika 10 Analiza lokalizacije EHBP1 u stanici inficiranoj MCMV-om 40h p.i. EHBP1 (crveno), DAPI (plavo), M55 (zeleno). Gornji stupac: neinficirane stanice slikane nakon 40h. Donji stupac: stanice inficirane Δ FcR-MCMV, PFU 1 (MOI 10) i slikane nakon 40h infekcije na konfokalnom mikroskopu. Red veličine retka NI (neinficirane) je redom: 20 μ m (povećanje 1,5x), 10-10-10 μ m (povećanje 3x). Red veličine MCMV retka je redom: 10 μ m (povećanje 3x), 5-5-5-5 μ m (povećanje 6x). Korištena su odgovarajuća protutijela: DAPI (jezgra, IE1), EHBP1 i M55.....21