

Sortiranje konformiranih i nekonformiranih glikoproteina u membranske mikrodomene

Mahmutefendić Lučin, Hana

Doctoral thesis / Disertacija

2007

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:188:247599>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET**

Hana Mahmutefendić

**SORTIRANJE KONFORMIRANIH I NEKONFORMIRANIH
GLIKOPROTEINA U MEMBRANSKE MIKRODOMENE**

Doktorska disertacija

612 014 : 57 112 25 (1043.3)
577.112.25 : 612 0147(0432)

Rijeka, 2007.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Pero Lučin

Doktorska disertacija je obranjena dana 05. 07. 2007. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci,
pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Krešimir Pavelić
2. Prof. dr. sc. Ivica Pavić
3. Prof. dr. sc. Siniša Volarević
4. Prof. dr. sc. Pero Lučin

Rad ima 223 lista, 110 slika i 5 tablica.

UDK klasifikacija: 612.014:612.398.145.3(043)

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

Svom mentoru **prof. dr. sc. Peri Lučinu** zahvaljujem što mi je, sposobnošću da vidi nevidljivo, te da od teško mogućeg stvara lako ostvarivo, otvorio vrata u jedan skriven, ali iznimno zanimljiv i poseban svijet stanica i molekula. Otkrivanje dinamike, lepršave ljepote, ali i čudljive logike njihova života mi predstavlja zadovoljstvo jer sam na tom putu nesputano vođena, čime mi je pružena mogućnost da se znanstveno izražavam slobodno i bez ograničenja.

Zahvaljujem se članicama svoje grupe: **Nataliji, Gogi, i Maji**. Nataliji, jer sam se uz nju naučila prvim koracima u znanstvenom i laboratorijskom radu, te osjetila prvu sreću zajedničkog otkrivanja; te Gogi kao osobi na koju se mogu osloniti, ne samo u znanstvenom, već i u ljudskom pogledu, a koja mi svojim mi kvalitetama pomaže da i sama radim bolje i djelujem potpunije.

Zahvaljujem se **akademiku Danielu Rukavini** na pruženom povjerenju, podršci, te doprinosu na mom znanstvenom putu.

Hvala **gđi. Nini Godnič** na pomoći, te korisnim savjetima i uputama.

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

Neizrecivo hvala **mojoj obitelji**. Jer su uvijek uz mene, jer ne vole površnost, jer mi daju snagu, jer znaju što volim i omogućavaju mi da to i ostvarim, i jer su prva i prava podrška na svim mojim putevima i planovima, pa i na znanstvenom.

I na kraju, hvala svim onim slavnim, ali i bezimenim znanstvenicima čiji rezultati istraživanja već stoljećima omogućuju čovječanstvu da napreduje, ali i novim generacijama da na njihovim temeljima dolaze do novih spoznaja. Ja ih volim ne samo zbog njihovih otkrića, već i zbog toga kakvi su ljudi bili. Volim ih sa svim njihovim vrlinama i manama; počevši od jednog Anthony van Loevenhooka koji nije imao nikakvog formalnog obrazovanja (možda je na taj način bio i zaštićen od zablude tadašnjeg učenog svijeta), ali se oslanjao na vlastite oči, vlastite ideje i vlastite prosudbe. Zatim me je uvijek oduševljavao, ali i nasmijavao Louis Pasteur, taj vatromet od čovjeka. Bila je to osoba kojoj je umjetnička mašta pomagala koliko i njegov istraživački nagon, koji je odlučno istovremeno radio na desetak zadataka, nalazio više-manje netočna rješenja da bi najzad svijetu objavio neko genijalno otkriće. Tu je i njegova suprotnost, Robert Koch, savjestan i logičan istraživač koji je svoje eksperimente izvodio matematičkom preciznošću, a na njih gledao kao da se radi o otkrićima druge osobe za koju sprema vrlo oštru kritiku (kako li je samo ispravan bio). Poseban mi je i Ilija Mečnikov, tako oduševljen svojim otkrićem fagocita da je «njihovo ime ispisao na svoju zastavu pod kojom je plovio» i koji su mu postali objašnjenje za sve, pa i za vlastito postojanje. I još je tu nebrojeno puno pripadnika te posebne skupine genijalaca koji nam svojim entuzijazmom daju snage i navode nas da budemo bolji i da dajemo više. Jer što će nam sva čudesna tehnologija i čudesni mikroskopi ako nema takvih čudesnih promatrača koji će kroz njih gledati.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Osnovni cilj istraživanja nam je bio uspostaviti model za izučavanje sortiranja i smještanja staničnih glikoproteina i ostalih molekula, kako u membranske mikrodomene, tako i u funkcionalne domene endocitoznih odjeljaka, te ustanoviti kako konformacija molekule utječe na taj proces. Pored toga, željeli smo ispitati kako se konformirane i nekonformirane molekule normalno razmještaju u staničnim organelama i endosomalnim odjeljcima, te istražiti mogućnost prelaska nestabilne konformacije MHC molekula I razreda (MHC-I molekule) u stabilnu, tj. mogućnost i mehanizam alternativnog načina antigenskog predočavanja.

Materijal i metode: U pokusima smo koristili mišje stanične linije haplotipa H-2^d - mastocitom P815, mišje L fibroblaste transficirane genom koji kodira za molekule L^d (stanice L-L^d) i mišje fibroblaste Balb 3T3. U svrhu praćenja MHC-I molekula koristili smo monoklonska protutijela (mPt) MA-215 za konformirane molekule K^d, 34-5-8S za konformirane molekule D^d, 34-2-12S za konformirane i nekonformirane molekule D^d, 30-5-7 za konformirane molekule L^d i 64-3-7 za nekonformirane molekule L^d. Transferinski receptor (TfR) smo pratili pomoću mPt R17, a molekule GM₁ pomoću obilježene podjedinice B kolera toksina. Ne-ionski detergentski (Triton X-100, CHAPS, Brij 96 i Tween 20) su nam poslužili za ispitivanje nazočnosti molekula u lipidnim splavima. Kako bismo utvrdili koji putovi su uključeni u prienos, transformaciju i opću dinamiku ovih molekula, koristili smo različite kemijske inhibitore endocitoze, vezikularnog transporta i staničnog signaliranja. Kinetiku uklanjanja sa stanične površine pratili smo protočnom citometrijom, a unutarstanične molekule konfokalnom mikroskopijom koristeći princip površinskog vezivanja odgovarajućeg monoklonskog protutijela i njegovog praćenja nakon određene kinetike internalizacije. Internalizirane molekule kolokalizirali smo međusobno, te s određenim endosomalnim markerima. U cilju identifikacije sudbine površinskih proteina koristili smo metodu površinske biotilacije, te imunoprecipitacije, elektroforeza na poliakrilamidnim gelovima (SDS-PAGE), Western-blot i kemiluminiscencije. Na kraju, oponašanjem uvjeta endosomalnog pH izvan stanice, utvrdili smo međusoban odnos punih i praznih molekula L^d, odnosno promjenu njihove konformacije u zadanim uvjetima.

Rezultati: Nekonformirane MHC-I molekule se, jednako kao i GM₁, ne uklanjaju nakon tretmana ne-ionskim detergentima, za razliku od konformiranih molekula i TfR. Međutim, na staničnoj površini konformirane MHC-I molekule se ne kolokaliziraju s TfR, a nekonformirane molekule se slabo kolokaliziraju s GM₁. Nadalje, utvrdili smo da molekule unutar svojih mikrodomena nisu statične, već se premještaju iz jedne domene u drugu ovisno o konformaciji. Konformirane i nekonformirane MHC-I molekule se međusobno slabo kolokaliziraju unutar stanice, bilo da se prate u ustaljenom stanju (*steady state*), bilo nakon internalizacije, a međusobno se razlikuju i prema načinu endocitoze. Naime, dok je endocitoza nekonformiranih MHC-I molekula zakočena djelovanjem filipina, te prema tome, ovisna o nakupljenosti kolesterola (lipidnim splavima), konformirane MHC-I molekule se endocitiraju masovnim putem (*bulk pathway*), kojeg ne inhibira niti djelovanje filipina, niti klorpromazina (inhibitor klatrinske endocitoze). Međutim, ubrzo nakon internalizacije, konformirane i nekonformirane MHC-I molekula se kolokaliziraju s EEA1 (marker ranih endosoma), ali i međusobno. Nakon toga stupanj kolokalizacije se opet smanjuje: konformirane MHC-I molekule se pretežno recikliraju i kolokaliziraju s TfR, a nekonformirane molekule

se pretežno kolokaliziraju s markerima kasnih odjeljaka (Lamp1 i LBPA). Ipak, u konačnici, i konformirane molekule ulaze LBPA i Lamp1 odjeljke. Degradacija MHC-I molekula je samo djelomično zakočena primjenom inhibitora endosomalnog zakiseljavanja (bafilomicin A₁ i konkanamicin A), što upućuje da se jedan dio uklanja i egzocitozom. Također, inhibitori normalnog ustroja staničnog citoskeleta (nokodazol, taksol, latrunkulin A, citohalazin D) narušavaju normalan obrazac izražaja MHC-I molekula, što navodi da unutarstanični razmještai konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula ovisi o citoskeletu, prije svega mikrotubulima. Nadalje, utvrdili smo da molekule L^d mogu prelaziti iz jedne konformacije u drugu. Endosomalnom alkalizacijom (korištenjem bafilomicina A₁), utvrdili smo da nekonformirane molekule L^d mogu nastati raspadom konformiranih molekula L^d, kako u sekretornom, tako i u endocitoznom putu, a inhibicijom endocitoze nekonformiranih molekula L^d smanjio se površinski izražaj konformiranih molekula, što ukazuje da je moguć i obrnut proces. Na kraju, ustanovili smo da se nekonformirane molekule L^d nakupljaju i neko vrijeme zadržavaju u kiselom retencijskom odjeljku (ELRC) koji se djelomično do znatno kolokalizira s markerima kasnih endosomalnih odjeljaka, ali ne i s markerima sekretornog puta, EEA1 i TfR. Nadalje, slabo se kolokaliziraju s internaliziranim i *steady state* konformiranim MHC-I molekulama, ali znatno s endocitiranim nekonformiranim molekulama L^d. Njegov izgled je promijenjen nakon djelovanja inhibitora citoskeleta, endosomalnog zakiseljavanja, te PI(3) kinaze (LY294002).

Zaključak: Osnovna mjesta sortiranja membranskih makromolekula tijekom njihovog endocitoznog puta su: plazma membrana, rani endosomi i kasni odjeljci. Utvrdili smo da se MHC-I molekule općenito različito sortiraju, ovisno o konformaciji. Tako se nekonformirane MHC-I molekule uglavnom nalaze u membranskim mikrodomenama otpornim na djelovanje detergenata, endocitiraju se na način ovisan o kolesterolu i uglavnom upućuju u kasne odjeljke. Suprotno tome, konformirane MHC-I molekule se nalaze u membranskim mikrodomenama osjetljivim na djelovanje detergenata, endocitiraju se masovnim putem, a potom se uglavnom recikliraju. Nadalje, molekule L^d mogu prelaziti iz jedne konformacije u drugu, procesom koji bi mogao poslužiti u alternativnom mehanizmu antigenskog predočavanja. Na kraju, nekonformirane MHC-I molekule se nalaze u retencijskom odjeljku koji je sličan kasnim odjeljcima, a dinamika njegovog punjenja i pražnjenja znatno ovisi o mikrotubulima, pH, te PI(3)K.

Ključne riječi: Endocitoza, endosomi, vezikularni transport; Konformirane i nekonformirane molekule; Membranske mikrodomene, lipidne splavi; MHC molekule I razreda, molekule L^d; Sortiranje proteina.

SUMMARY

Objectives: The aim of this study was to establish experimental models that will enable us to investigate the process of sorting and localization of cell surface proteins and other molecules, not only in membrane microdomains, but also in functional domains of endosomal compartments. Furthermore, we were interested to clarify the influence of molecule conformation in that process. Additionally, we wanted to investigate the localization of conformed and non-conformed molecules in distinct cellular organelles and endosomal compartments in normal conditions, and, finally, to examine the possibility of transforming the conformed MHC-I molecules into non-conformed, and vice versa.

Material and methods: In our experiments we used murine cell lines, of H-2^d haplotype – P815 mastocytoma cell line, L-cells stably transfected with L^d molecules (L-L^d), and Balb 3T3 fibroblasts. In order to follow MHC-I molecules, we have used a palette of monoclonal antibodies (mAbs): MA-215 for conformed K^d molecules, 34-5-8S for conformed D^d molecules, 34-2-12S for conformed and non- conformed D^d molecules, 30-5-7 for conformed L^d molecules, and 64-3-7 for non-conformed L^d molecules. Transferrin receptor was followed by the R17 mAb, and GM₁ molecule by labelled cholera toxin B subunit. Non-ionic detergents (Triton X-100, CHAPS, Brij 96, and Tween 20) were used in order to investigate the presence of macromolecules in lipid rafts. In order to clarify the endocytic pathways that play the role in the transport, transformation, and general dynamics of these molecules, we used a palette of chemical inhibitors of endocytosis, vesicular transport, and cell signaling. The kinetics of surface molecules was followed by flow cytometry and their intracellular traveling by confocal microscopy after binding of appropriate mAbs in various internalization protocols. Internalized molecules were colocalized either to each other, or with markers of endosomal compartments and pathways. In order to investigate the fate of the internalized molecules, cell surface glycoproteins were biotinylated and determined by immunoprecipitation and chemiluminescence. Furthermore, the conditions of endosomal pH were simulated outside the cell and the relationship between full and empty L^d molecules, as well as the switch in their conformation in those conditions was studied.

Results: We have found that non-conformed MHC-I molecules and GM₁ were resistant to the treatment with non-ionic detergents, that was different to conformed MHC-I molecules and TfR. However, we did not observe the surface colocalization between conformed MHC-I molecules and TfR, while only slight colocalization between non-conformed MHC-I molecules and GM₁ was detectable. Furthermore, we have found that surface molecules could change their localization in membrane microdomains after they change conformation. In accordance with results observed at the cell surface, conformed and non-conformed MHC-I molecules did not colocalize significantly inside the cell, both at the steady state and after internalization. The differences were also observed in the mechanism of their internalization: endocytosis of non-conformed MHC-I molecules was inhibited by filipin treatment, indicating for cholesterol (lipid rafts) dependence. In contrast, endocytosis of conformed MHC-I molecules was not blocked by the filipin and chlorpromazine (an inhibitor of clathrin endocytosis) treatments, indicating for their entry via the bulk pathway. However, soon after the internalization, conformed and non-

conformed MHC-I molecules colocalized in the EEA1-positive early endosomes, but after this point the level of their colocalization decreased. Conformed MHC-I molecules entered the recycling route, including colocalization with TfR, while non-conformed MHC-I molecules were mainly directed into late endosomal compartments (LEs) and colocalized with Lamp1 and LBPA. Interestingly, the degradation of MHC-I molecules was only partially inhibited by inhibitors of endosomal acidification (bafilomycin A₁, concanamycin A and NH₄Cl), that indicate for involvement of the exocytosis. Furthermore, disruption of the microtubular and actin cytoskeletal network (by nocodazol, taxol, latrunculin A, and cytochalasin D) disturbed normal patterns of MHC-I expression. We also explored a possibility of physiologicly transformation of conformed L^d molecules into nonconformed, and vice versa. In line with that, we found that endosomal alkalization (after the bafilomycin A treatment) increased the access of conformed L^d molecules into late endosomal compartments. Furthermore, inhibition of endocytosis of non-conformed L^d molecules decreased surface expression of the conformed L^d molecules, indicating that the reverse process is also possible. Finally, we have found that non-conformed L^d molecules are loaded and retained the late-endosomal acid retention compartment, which contained late endosomal markers (Lamp1, LBPA) but not markers of the secretory and the recycling pathway (EEA1 and TfR). This compartment was poorly accessible to the internalized conformed MHC-I molecules, but it was a final station in the endosomal trafficking of internalized non-conformed and misfolded L^d molecules. Its shape and size was disturbed after treatment with inhibitors of endosomal acidification, cytoskeletal disruption and inhibition of PI(3) kinase activity (LY294002).

Conclusion: We have found that membrane proteins are sorted at three levels: at the plasma membrane, on the leave of early endosomes, and upon entry into the late endosome. Generally, sorting of MHC-I molecules at all three levels is conformation dependent. Non-conformed MHC-I molecules mainly localize in membrane microdomains that are resistant to the treatment with non-ionic detergents (detergent resistant membrane microdomains), they are internalized by using the cholesterol and lipid rafts dependent mechanism, and a majority is targeted into late endosomal compartments. In contrast, conformed MHC-I molecules localize in detergent-sensitive membrane microdomains, they are internalized via the bulk internalization pathway, and a majority of them is recycled after the internalization through the peripheral recycling route. Furthermore, the L^d molecules are able to change their conformation during endosomal trafficking, which is of physiological importance for alternative antigen presentation. Finally, non-conformed MHC-I molecules are retained in the compartment generated from late endosomes, which loading and dynamics is dependent upon endosomal pH, microtubular network and PI(3) kinase activity.

Key words: endocytosis, clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endocytosis, endosomes, vesicular transport, inhibitors of endocytosis and vesicular transport, MHC class I molecules, L^d molecules, conformation of L^d molecules.

SADRŽAJ

1. UVOD (Prikaz područja).....	1
1.1. Membranske mikrodomene i lipidne splavi.....	1
1.1.1. Organizacija i ustroj membranskih mikrodomena.....	1
1.1.2. Lipidne splavi.....	3
1.1.2.1. Građa i sastav lipidnih splavi.....	4
1.1.2.2. Nastanak lipidnih splavi i sortiranje molekula u lipidne splavi.....	5
1.1.2.3. Metode istraživanja lipidnih splavi i ostalih membranskih mikrodomena.....	7
1.1.2.3.1. Korištenje neionskih detergenata.....	7
1.1.2.3.2. Uklanjanje kolesterola.....	8
1.1.2.3.3. Vizualizacija lipidnih splavi i ostale metode njihovog istraživanja.....	9
1.2. Endocitoza.....	9
1.2.1. Vrste endocitoze.....	10
1.2.1.1. Makropinocitoza.....	10
1.2.1.2. Klatrinska endocitoza.....	11
1.2.1.3. Endocitoza ovisna o lipidnim splavima.....	11
1.2.1.3.1. Kaveolama endocitoza.....	11
1.2.1.3.2. Endocitoza ovisna o lipidnim splavima u užem smislu.....	12
1.2.1.4. Masovna endocitoza.....	13
1.2.2. Unutarstanični put internaliziranih molekula.....	13
1.2.2.1. Glavni (klatrinski) endocitozni put.....	14
1.2.2.1.1. Sortiranje endocitiranih molekula u ranim endosomima.....	15
1.2.2.1.2. Recikliranje endocitiranih molekula.....	15
1.2.2.1.3. Degradacija endocitiranih molekula.....	16
1.2.2.1.4. Egzocitoza.....	18
1.2.2.2. Alternativni endocitozni putevi i odjeljci.....	19
1.2.2.2.1. Kaveosomi.....	19
1.2.2.2.2. GEEC (endocitozni odjeljak GPI-sidrenih proteina).....	19
1.2.2.2.3. Recikliranje preko ARF6 vezikula.....	20
1.2.2.3. Retencijski odjeljci.....	20
1.2.2.4. Endosomalno zakiseljavanje.....	23
1.2.2.4.1. Mehanizmi postizanja pH staničnih organela.....	24
1.2.2.4.2. Mehanizmi narušavanja pH gradijenta.....	25
1.3. MHC molekule I razreda.....	27
1.3.1. Građa i sinteza MHC molekula I razreda.....	27
1.3.1.1. Građa MHC molekula I razreda.....	27
1.3.1.2. Sinteza MHC-I molekula.....	28
1.3.2. Konformacije MHC-I molekula.....	30
1.3.2.1. Konformirane MHC-I molekule.....	30
1.3.2.2. Nekonformirane MHC-I molekule.....	31
1.3.2.3. Korištenje monoklonskih protutijela kao model za ispitivanje različitih konformacija MHC-I molekula.....	33
1.3.3. Endocitoza MHC-I molekula.....	36
1.3.4. Alternativni načini nastanka konformiranih MHC-I molekula.....	37
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	40
3. MATERIJAL I METODE.....	41
3.1. Laboratorijske životinje.....	41
3.2. Materijal.....	41
3.2.1. Kemikalije.....	41
3.2.2. Mediji i puferi.....	43
3.2.3. Laboratorijsko posude.....	44
3.2.4. Monoklonska i poliklonska protutijela.....	45
3.2.4.1. Protutijela koja prepoznaju određene konformacije MHC-I molekula.....	45
3.2.4.2. Marker endocitoznih puteva.....	45
3.2.4.3. Marker endocitoznih odjeljaka.....	45

3.2.4.4. Sekundarna poliklonska protutijela	46
3.2.5. Stanične linije	46
3.3. Metode	47
3.3.1. Priprema monoklonskih protutijela	47
3.3.1.1. Održavanje hibridoma	47
3.3.1.2. Priprema monoklonskih protutijela iz supematanta kulture	47
3.3.1.3. Proizvodnja ascitesa	47
3.3.2. Uzgoj staničnih linija	47
3.3.2.1. Uzgoj adherentnih stanica	47
3.3.2.2. Uzgoj neadherentnih stanica	47
3.3.2.3. Umjetno stvaranje misfolded konformacije MHC-I molekula na staničnoj površini	47
3.3.3. Određivanje površinskog izražavanja MHC molekula I razreda metodom imunofluorescencije protočnim citometrom	48
3.3.3.1. Priprema stanica	48
3.3.3.2. Indirektna imunofluorescencija	48
3.3.3.3. Analiza stanica protočnim citometrom	49
3.3.4. Ispitivanje površinskog i unutarstaničnog izražaja i smještaja membranskih molekula metodom konfokalne mikroskopije	49
3.3.4.1. Priprema stanica	49
3.3.4.2. Imunofluorescencija	49
3.3.4.3. Analiza stanica konfokalnom mikroskopijom	49
3.3.5. Imunoprecipitacija	50
3.3.5.1. Biotinilacija površinskih proteina	50
3.3.5.2. Imunoprecipitacija monoklonskim protutijelima	50
3.3.5.3. Gel-elektroforeza	50
3.3.5.4. Elektroblob proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu	50
3.3.5.5. Kemiluminiscencija	50
3.3.6. Ispitivanje utjecaja pH na izražaj MHC molekula I razreda	51
3.3.6.1. Izlaganje stanica sniženom pH	51
3.3.6.2. Vraćanje medija fiziološkog pH nakon zakiseljavanja	51
3.3.7. Praćenje smještaja molekula u membranskim mikrodomenama	51
3.3.7.1. Kolokalizacija površinskih molekula na staničnoj površini	51
3.3.7.2. Smještaj membranskih molekula u domenama otpornim na djelovanje detergenta (lipidne splavi)	52
3.3.8. Utvrđivanje obrazaca izražaja MHC-I molekula	52
3.3.9. Praćenje endocitoze i endocitoznog puta ispitivanih molekula	52
3.3.9.1. Protočna citometrija	53
3.3.9.1.1. Praćenje spontane endocitoze usljed djelovanja cikloheksimida	53
3.3.9.1.2. Praćenje endocitoze nakon površinskog vezivanja monoklonskog protutijela ili liganda	53
3.3.9.2. Konfokalna mikroskopija	53
3.3.9.2.1. Praćenje kontinuirane intemalizacije	53
3.3.9.2.2. Praćenje <i>pulse-chase</i> intemalizacije	54
3.3.9.2.3. Praćenje recikliranja	54
4. REZULTATI	56
4.1. Lokalizacija i izražaj MHC molekula I razreda	56
4.1.1. Površinski i subcelularni obrazac izražaja MHC molekula I razreda	57
4.1.1.1. Površinski izražaj MHC-I molekula	57
4.1.1.1.1. Nepravilno svijene (<i>misfolded</i>) MHC-I molekule	58
4.1.1.2. Unutarstaničan obrazac izražaja MHC-I molekula	61
4.1.2. Međusobna kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC molekula I razreda	64
4.1.2.1. Smještaj konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula u domenama na staničnoj površini	64
4.1.2.1.1. Lokalizacija MHC-I molekula u lipidnim splavima	66
4.1.2.2. Unutarstanična kolokalizacija različitih konformacija MHC-I molekula	73
4.2. Endocitoza i vezikulami transport površinskih glikoproteina i receptora	75
4.2.1. Endocitoza površinskih glikoproteina i receptora	76
4.2.1.1. Klatrinska endocitoza	76
4.2.1.2. Endocitoza ovisna o lipidnim splavima	77

4.2.1.3. Endocitoza <i>misfolded</i> MHC-I molekula	79
4.2.1.4. Kaveolarna endocitoza.....	81
4.2.2. Vezikularni transport površinskih glikoproteina i receptora	82
4.2.2.1. <i>Steady state</i> lokalizacija	82
4.2.2.1.1. Kolokalizacija MHC-I molekula s markerima endosomalnih puteva.....	82
4.2.2.1.2. Kolokalizacija MHC-I molekula s markerima endosomalnih odjeljaka	84
4.2.2.2. Internalizacija nativnih površinskih glikoproteina i receptora	87
4.2.2.2.1. Međusobna kolokalizacija internaliziranih nativnih MHC-I molekula.....	89
4.2.2.2.2. Internalizacija nativnih MHC-I molekula u endosomalne odjeljke.....	92
4.2.2.2.3. Internalizacija Tfr/Kolera toksina u odjeljke MHC molekula I razreda.....	104
4.2.2.2.4. Istodobna internalizacija MHC molekula I razreda i Tfr/CTxB.....	108
4.2.2.3. Internalizacija nepravilno svijenih (<i>misfolded</i>) površinskih glikoproteina	110
4.2.2.4. Internalizirane površinske molekule nakon endocitoze ostaju u istoj domeni	115
4.3. Učinak citoskeleta na izražaj MHC molekula I razreda	117
4.4. Recikliranje internaliziranih membranskih molekula	124
4.5. Transport i sortiranje MHC-I molekula niz vezikulami pH gradijent	130
4.5.1. Učinak pH na promjenu konformacije MHC-I molekula	130
4.5.1.1. Učinak izvanstaničnog pH na promjenu konformacije molekula na staničnoj površini	130
4.5.1.2. Učinak pH na promjenu konformacije MHC-I molekula u staničnom lizatu.....	131
4.5.2. Učinak inhibitora endosomalnog zakiseljavanja na površinsku ekspresiju MHC-I molekula i transferinskog receptora.....	132
4.5.3. Učinak inhibitora endosomalnog zakiseljavanja na recikliranje MHC-I molekula	133
4.5.4. Promjena konformacije punih i praznih molekula L ^d	134
4.5.4.1. Promjena konformacije punih molekula L ^d u kiselim endosomalnim odjeljcima.....	135
4.5.4.1.1. Učinak inhibitora endosomalnog zakiseljavanja na <i>steady state</i> ekspresiju i kolokalizaciju punih i praznih molekula L ^d	135
4.5.4.1.2. Učinak inhibitora endosomalnog zakiseljavanja na obrazac internalizacije punih i praznih molekula L ^d	136
4.5.4.2. Učinak promjene konformacije punih molekula L ^d na smještaj u membranskim mikrodomenama.....	138
4.5.4.3. Alternativni načini nastanka konformiranih molekula L ^d	139
4.5.4.3.1. Ispitivanje alternativnog načina nastanka konformiranih molekula L ^d na staničnoj površini	140
4.5.4.3.2. Ispitivanje alternativnog načina nastanka konformiranih molekula L ^d unutar stanice.....	140
4.6. Degradacija MHC molekula I razreda	143
4.6.1. Kinetika degradacije internaliziranih MHC-I molekula	143
4.6.2. Učinak lizosomotropnih tvari na degradaciju molekula L ^d	145
4.7. Porijeklo praznih molekula L ^d i retencijski odjeljci za nekonformirane MHC-I molekule	149
4.7.1. Porijeklo nekonformiranih molekula L ^d	149
4.7.1.1. Uloga biosintetskog i sekretornog puta u nastanku praznih molekula L ^d	149
4.7.1.2. Endocitozno porijeklo unutarstaničnih <i>steady state</i> praznih molekula L ^d i ELRC.....	152
4.7.2. Obilježja odjeljka u kojem se nalaze nekonformirane molekule L ^d (ELRC).....	155
4.7.2.1. Opća obilježja ELRC u intaktnim stanicama.....	155
4.7.2.2. Učinak endosomalne alkalizacije na usmjeravanje molekula u ELRC	157
4.7.2.3. Čimbenici koje mijenjaju obrazac ELRC	158
4.7.2.3.1. Učinak citoskeleta na ELRC obrazac.....	158
4.7.2.3.2. Učinak endosomalnog pH na ELRC obrazac	161
4.7.2.3.3. Učinak PI(3)-kinaze na ELRC obrazac.....	163
5. RASPRAVA	165
5.1. Smještaj površinskih konformiranih i nekonformiranih makromolekula u membranskim mikrodomenama	165
5.2. Endocitoza i endocitozni put membranskih makromolekula.....	169
5.3. Neformirane molekule i promjena konformacije MHC-I molekula u kiselim endosomalnim odjeljcima.....	185
6. ZAKLJUČCI	194
7. LITERATURA	196
Popis skraćenica.....	208
Životopis.....	209

1. UVOD (PRIKAZ PODRUČJA)

Molekule se u stanici sortiraju, kako na njezinoj površini, tako i u samoj unutrašnjosti. Sortiranje se može vršiti na mikro-, ali i na makrorazini. Smještaj molekula u određenim membranskim (mikro)domenama utječe na njihovo usmjeravanje, prvenstveno u sekretornom i endocitoznom putu. U ovom poglavlju ćemo pokušati razjasniti čimbenike koji utječu na membransko sortiranje, njihov učinak na endocitozni put, s posebnim naglaskom na MHC molekule-I razreda.

1.1. MEMBRANSKE MIKRODOMENE I LIPIDNE SPLAVI

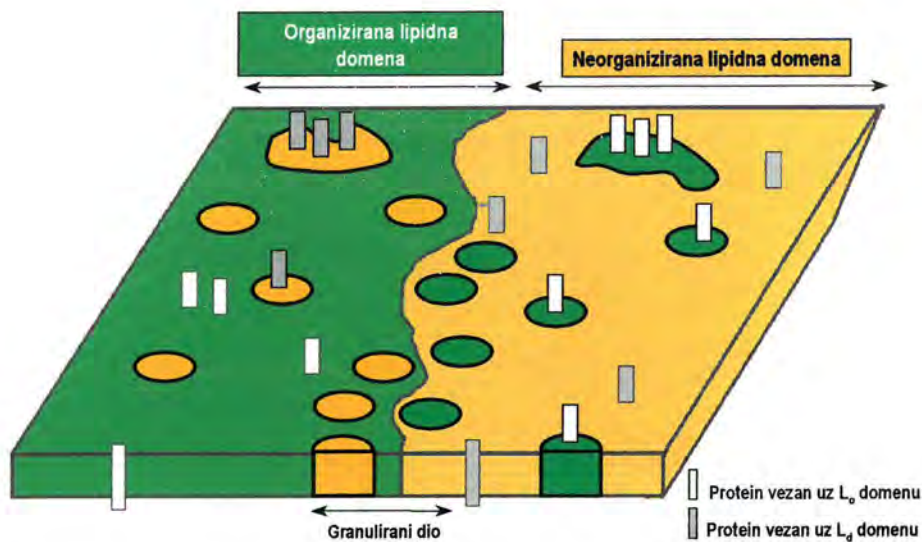
U pravilu se slične molekule spajaju u domene kako bi imale manju slobodnu energiju. Domene predstavljaju omeđena područja posebnog fizikalnog obilježja koja ih razlikuju od njegovog okruženja. To su dinamičke strukture u koje molekule ulaze, ali i iz kojih izlaze prema određenim pravilima ravnajući se prvenstveno prema odgovarajućim protein-proteinskim i protein-lipidnim međudjelovanjima (1). U narednom dijelu opisat ćemo nastajanje, sastav i značaj membranskih mikrodomena, s posebnim naglaskom na lipidne splavi.

1.1.1. Organizacija i ustroj membranskih mikrodomena

Prema strukturi membranske mikrodomene u osnovi mogu se podijeliti na klatrinske jamice i kaveole. Prema lipidnom sastavu mogu se podijeliti na organizirane dijelove (lipidne splavi) i neorganizirane dijelove.

Klatrinske jamice (2) su danas najbolje razjašnjene od svih membranskih mikrodomena, no sve većim predmetom interesa postaju i **kaveole**, a zajedno s njima i **lipidne splavi** (3). Ove strukture obilježava visoka uređenost njezinih sastavnih dijelova, a obje imaju važnu ulogu u sortiranju membranskih proteina, te njihovoj endocitozi. Dok je kod klatrinskih jamica prvenstveno važno prisustvo određenih proteina – uz glavni protein klatrin, važnu ulogu imaju i razni adaptorski proteini, kod lipidnih splavi težište je postavljeno na sastavu i udjelu membranskih lipida.

Lipidi su vrlo važan sastavni dio stanične membrane, kako plazmatske, tako i one unutarstaničnih organela, te upravo njihov sastav i raspored određuju stupanj njezine uređenosti. Membrana eukariota posjeduje >500 različitih vrsta lipida (neutralni glicerolipidi, glicerofosfolipidi, ceramidi, glikosfingolipidi i sfingomijelini, a vrlo važna lipidna komponenta u plazmatskoj membrani (PM) je kolesterol (ergosterol u kvasca). Ovisno o njihovoj organiziranosti možemo govoriti o membranskim organiziranim i neorganiziranim dijelovima (slika 1)



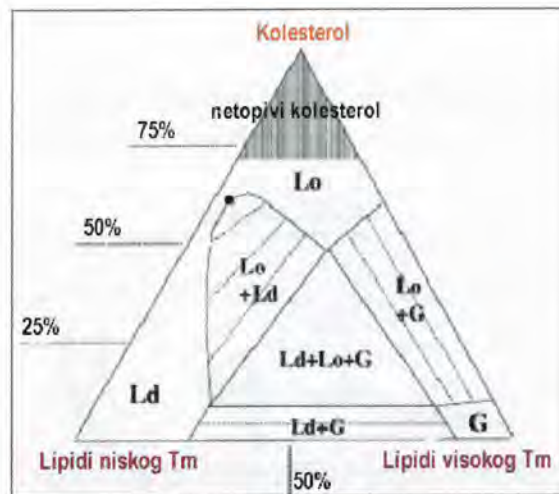
Slika 1: Organizirani i neorganizirani dijelovi stanične membrane. Na temelju raspodjele i organiziranosti lipidnih molekula, stanična membrana može se podijeliti na organizirane i neorganizirane djelove u koje sa pridružuju membranski proteini. Neki se proteini svojim lipidnim sidrom mogu nalaziti u organiziranom dijelu, dok su svojom transmembranskom domenom smješteni u neuređenom lipidnom dvosloju. (prilagođeno prema referenci 4).

Iako je dugo vremena prevladavala teorija o građi stanične membrane kao tekućem mozaiku, danas sve više dokaza ukazuje da lipidni dvosloj može postojati u više faza (5) (slika 2):

1. Gel faza
2. Tekuća uređena faza – L_o (engl. *liquid-ordered*)
3. Tekuća neuređena faza - L_d (engl. *liquid-disordered*)

U **gel fazi** su lipidi imobilizirani, a acilni lanci potpuno ispruženi. **Tekuća uređena faza (L_o struktura)** je uređena struktura s ispruženim acilnim lancima u kojoj lipidi imaju visoku lateralnu mobilnost. **Tekuća neuređena faza (L_d, ili tekuća kristalna faza)** se javlja iznad temperature taljenja lipida (T_m), pri kojoj oni stvaraju slabo pakirane strukture, masne kiseline su neuređene te posjeduju visoku lateralnu mobilnost (6).

L_o fazu uglavnom tvore *sfolipidi*, koji sadrže većinom zasićene alifatske ugljikovodične lance, *fosfolipidi* s *relativno dugačkim i zasićenim acilnim lancima*, te *kolesterol*. Suprotno tome, u L_d fazi su zastupljeni uglavnom fosfolipidi koji se sastoje od fosfoglicerolipida s višestruko nezasićenim masnim kiselinama. Smatra se da upravo ova razlika u faznim svojstvima dovodi do lateralnog odjeljivanja L_d i L_o faza u ravnini membrane.



Slika 2: Ternarni fazni dijagram lipidne smjese koja oponaša vanjski sloj plazmatske membrane (PM). Prikazan je utjecaj zastupljenosti kolesterola, odnosno lipida s visokim i niskim T_m (temperatura taljenja) na uređenost lipidnih domena. Uočava se da veća zastupljenost kolesterola i lipida s većom T_m povećavaju zastupljenost L_d . (L_o – uređena faza, organiziran i dio; L_d – neuređena faza, neorganizirani dio) (prilagođeno prema referenci 7)

1.1.2. Lipidne splavi

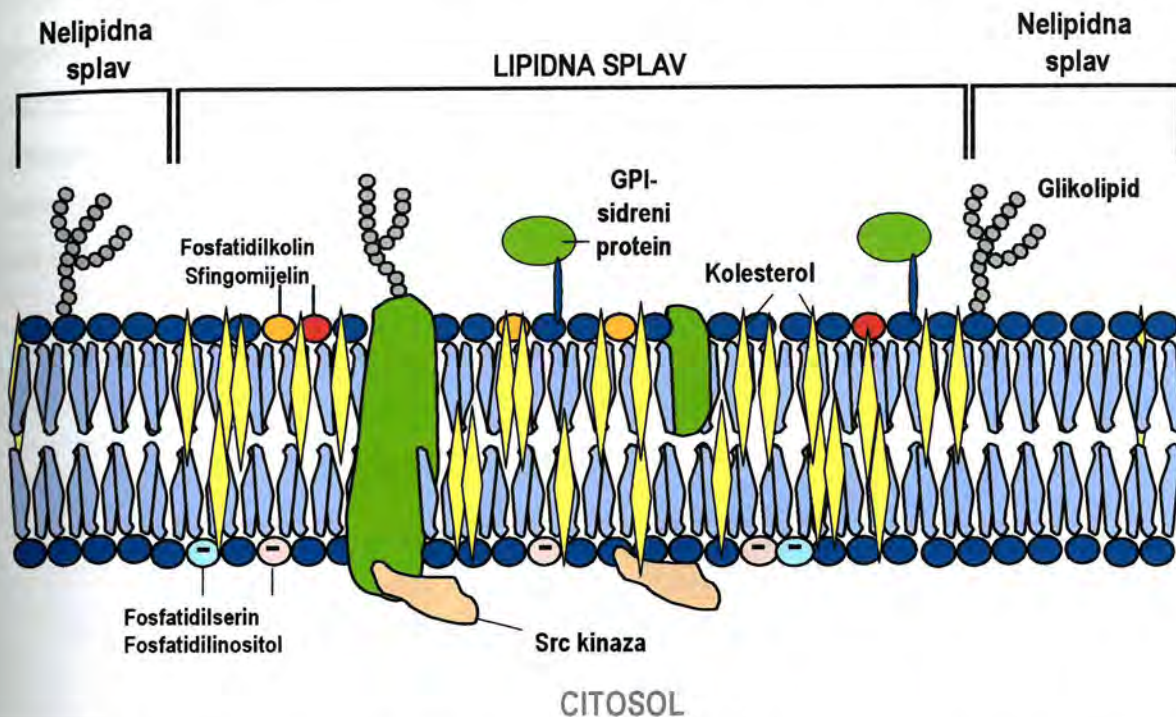
Kao što je navedeno u prethodnom odjeljku, lipidne splavi se ubrajaju u organizirani dio stanične membrane, a igraju važnu ulogu u sortiranju i prijenosu proteina, te staničnom signaliranju. Osim u izvanstaničnom sloju plazmatske membrane, ove se visokodinamičke strukture također nalaze u ranim endosomima, reciklirajućim endosomima, te *trans*-Golgijevom aparatu (TGN) (8). O endocitozi proteina pomoću lipidnih splavi raspravljat će se u sljedećem poglavlju, a sada će biti govora u njezinom sastavu, načinima istraživanja, te sortiranju molekula.

Lipidne splavi se najčešće opisuju kao (9):

1. *Stabilne mikrodomene* koje imaju promjer od ~50 nm, obogaćene kolesterolom, glikosfingolipidima, sfingomijelinom, GPI-sidrenim proteinima, te nekim transmembranskim proteinima (10);
2. *Membranske domene otporne na djelovanje neionskih detergenata* (prema nuklearnoj magnetskoj rezonanciji (NMR; engl. nuclear magnetic resonance) i kalorimetrijskim mjerenjima);
3. Proteinske molekule koje su okružene omotačem od glikosfingolipida i ostalih lipida koje nalazimo u splavima (*engl. lipid shell*). Ovaj omotač time čini proteinske molekule otporne na djelovanje detergenata.

1.1.2.1. Građa i sastav lipidnih splavi

Lipidne splavi se u osnovi sastoje od lipidnog i nelipidnog - primarno proteinskog dijela (slika 3).



Slika 3: Građa lipidnih splavi. Lipidne splavi se sastoje od *lipidnog dijela* (fosfolipidi sa zasićenim acilnim ostacima, glikosfingolipidi, te veća zastupljenost kolesterola nego u ostalom dijelu membrane) i *proteinskog dijela* koji uglavnom čine GPI-sidreni proteini (dodatno objašnjenje u tekstu).

1. Lipidni dio

Lipidni dio lipidnih splavi čine fosfolipidi sa zasićenim acilnim ostacima, kolesterol, glikosfingolipidi i sfingomijelin, te ceramid.

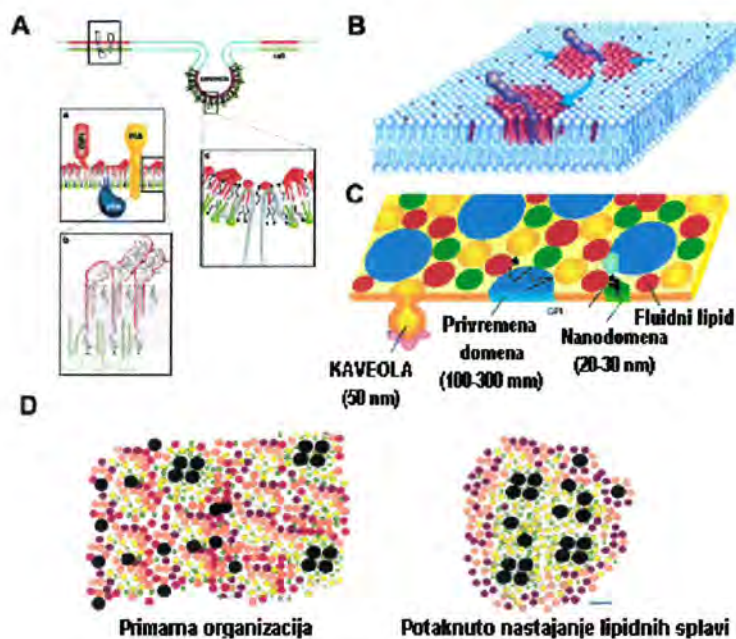
Kolesterol ima važnu ulogu u kondenziranju sfingolipida u splavima (11), te igra ključnu ulogu time što pomaže i povećava sklonost **zasićenih fosfolipida** i **sfingolipida** u odvajanju od nezasićenih fosfolipida u membranskom dvosloju (12). Dodavanje kolesterola smjesi zasićenih lipida (npr. sfingolipidi) u gel fazi potiče stvaranje L_o faze u kojoj su zasićeni acilni lanci visokoorganizirani kao u gel fazi, ali posjeduju sposobnost lateralne mobilnosti vrlo sličnu onoj u tekućoj kristalnoj fazi (L_d) (4).

Ceramid (neobičajeni sfingolipid) ima velik afinitet za uređene domene i već njegova mala količina ih stabilizira. Te domene su često velike i mogu se vidjeti svjetlosnim mikroskopom, a jedan od razloga njihove veličine bi mogao biti posljedica njihove sklonosti uklanjanju kolesterola iz uređenih domena. U ekstremnim slučajevima ove domene mogu nalikovati gel stanju – stopa lateralne difuzije bi mogla biti mnogo sporija u nego o običnim L_o domenama (4).

2. Proteinski dio

Proteini koji se nalaze u lipidnim splavima dijele se u dvije osnovne grupacije. Prema tome razlikujemo proteine trajno smještene u ovim domenama (npr. *kaveolini*, *flotilini/ Reggie*, *raftilin*, *sinaptofizin*, *prominin*), odnosno proteine koji su samo djelomično ili privremeno smješteni u lipidnim splavima (13). U ovu posljednju grupaciju ubrajamo molekule *CD44* (u fibroblastima $\leq 50\%$ otporno na ekstrakciju pomoću TX-100) (14), *MHC-II* (molekula koja se nalazi funkcionalno u lipidnim splavima) (15), *CLIP* (15), *Hemaglutinin* iz virusa gripe, *Src-obitelj Tyr-kinaza* (Lck, Fyn, Lyn, LAT...), te *visokoafinitetni IgE receptor (FcεRI)*, *T-stanični receptor (TCR)* i *B stanični receptor (BCR)*, koji se premještaju u lipidne splavi nakon unakrsnog povezivanja (16).

1.1.2.2. Nastanak lipidnih splavi i sortiranje molekula u lipidne splavi



Slika 4: Najčešće hipoteze koje opisuju nastanak lipidnih splavi. (A) Lipidne splavi se opisuju kao relativno velike strukture (~50 nm), obogaćene kolesterolom i sfingolipidima (SL), s kojima neki proteini pokazuju sklonost povezivanju. (B) Lipidni omotač (*lipid shell*) predstavlja male, ali dinamičke nakupine u kojima se proteini okružuju određenim vrstama lipida. (C) Veći udio stanične membrane nalikuje na splav i postoji kao mozaik domena. Stanica regulira količinu stvaranja više različitih domena kolesterol-ovisnim mehanizmom. (D) Primarne nakupine lipida su male i dinamične, te postoje kao monomeri. Oni se aktivno potiču na stvaranje većih i stabilnih «splavi» (Crni kružići – GPI-sidreni proteini; crveni i ružičasti kružići – lipidi koji nisu sastavni dio lipidnih splavi; žuti kružići – lipidi koji se nalaze u splavima; zeleni kružići – kolesterol; Mjerna crta – 5 nm). (prilagođeno prema referenci 18)

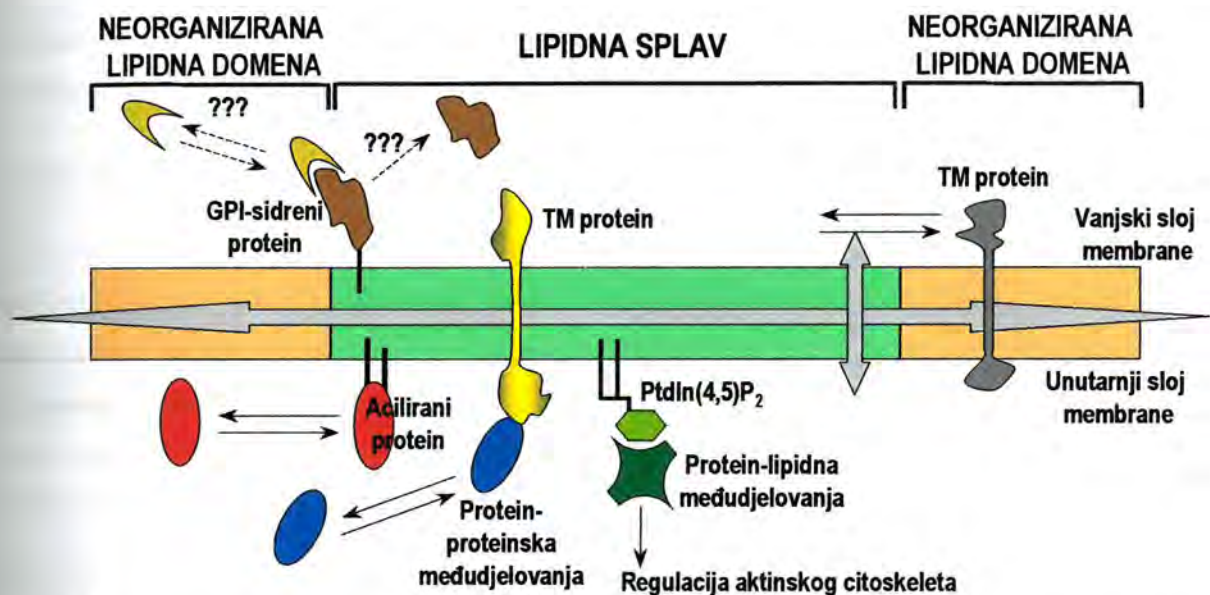
Stvaranje lipidnih splavi može biti potaknuto djelovanjem i lipida i proteina (17), a postoji više mogućnosti. Prema jednoj teoriji postojeće splavi mogu regrutirati proteine. Nadalje, lipidna organizacija bi mogla biti vođena protein-lipidnim i protein-proteinskim međudjelovanjima. U konačnici, postoji i hipoteza lipidnog omotača (engl. *lipid shell*), odnosno protein koji se nalazi u sredini je okružen lipidnim molekulama

Ulazak i izlazak molekula u i iz lipidnih splavi je dinamičan proces, ali neke molekule mogu boraviti unutar njih nekoliko minuta (7).

Proteini se s lipidnim splavima mogu povezivati pomoću (4, 13) hidrofobnih sekvenci koje prolaze kroz membranu ili transmembranske domene, primjerice u slučaju hemaglutinina influence ili LAT (engl. *linker for activation of T cells*), hidrofobnih repova, primjerice proteini s

GPI sidrom ili proteini s prikačenim masnim kiselinama (N-miristilacija i / ili S-palmitilacija) te

međudjelovanjem između dviju proteinskih molekula (protein-protein) ili proteinskih molekula i lipida (protein-lipid).



Slika 5: Sortiranje i djelovanje proteina u lipidnim splavima. Proteini se s lipidnim splavima mogu povezivati usljed acilacije, preko transmembranske (TM) domene, pomoću protein-proteinskih i protein-lipidnih međudjelovanja, te pomoću GPI sidra. Neki se TM proteini samo privremeno povezuju s lipidnim splavima. Dvostruke strelice ukazuju na reverzibilno povezivanje sa splavima. Postoji mogućnost da se GPI-sidreni proteini otkidaju s membrane nakon što se otpuste od GPI sidra, što za posljedicu ima konformacijsku promjenu. Isto tako, GPI-sidreni proteini sa sobom mogu ponijeti i ER luminalne proteine. (prilagođeno prema referenci 13)

Iako je relativno dobro poznato kako acilacija i međudjelovanje s lipidima uzrokuju usmjeravanje proteina u lipidne splavi, još je dosta nejasno kako na to utječe struktura samog proteina, odnosno njegovo međudjelovanje s drugim proteinima. Naime, za očekivati je da **TM domena** pokazuje sklonost sortiranju u L_d domene. No, kod nekih proteina (npr. HA virusa gripe) ona upravo utječe na njihov smještaj u lipidnim splavima. Možda je tome uzrok specifičnost i duljina (npr. kod HA je bitna duljina TM). Nadalje, aminokiselinski sastav TM domene može uzrokovati da se protein okruži odgovarajućim lipidima, čime bi nezasićeni lanac bio okrenut prema proteinu, a zasićen prema L_o domeni (4).

U nekim slučajevima postoje pokazatelji da su i TM domena i acilacija potrebni za učinkovito povezivanje sa splavima. Tako i HA iz virusa gripe (19), i LAT (20) zahtijevaju palmitilaciju za svoju povezanost s lipidnim splavima.

Osim TM domene, određena **protein-proteinska** i **protein-lipidna međudjelovanja** mogu uzrokovati usmjeravanje proteina u organizirane domene. Tako bi *kaveolin* mogao regrutirati proteine koji posjeduju kaveolin-vezujuću domenu, iako protein-proteinska međudjelovanja još nisu potvrđena. Nadalje, prisustvo fosfatidilinozitol-(4,5)-bifosfata-(PI(4,5)P₂) u lipidnim splavima (21) ukazuje na mjesto gdje bi moglo doći do usmjeravanja proteina s PH domenom (domena homologna plekstrinu) u lipidne splavi, što potvrđuje da se sortiranje događa i s citoplazmatske strane stanične membrane. Ova vrsta povezivanja bi se mogla povezati s modulacijom i stabilizacijom aktinskog citoskeleta u lipidnim splavima.

Na kraju, obzirom da L_o faza lipidnih splavi ovisi o njihovom lipidnom sastavu, mehanizmi koji mijenjaju ove parametre mogu se odražavati na sposobnost ostajanja ili izlaženja određenih proteina iz lipidnih splavi..

1.1.2.3. Metode istraživanja lipidnih splavi i ostalih membranskih mikrodomena

Usljed njihovog sastava i veličine, te nepostojanja određenog markera, lipidne splavi nije jednostavno istraživati. Stoga su razvijeni mnogi pristupi i tehnike, koje je potrebno međusobno nadopunjavati jer niti jedna sama za sebe ne daje konačan odgovor. Od najčešćih metoda koje se primjenjuju su: korištenje neionskih detergenata, kolokalizacija s markerima lipidnih splavi, uklanjanje kolesterola, imunofluorescentne tehnike (FRET (engl. *fluorescence resonance energy transfer*); FRAP (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*)), elektronska mikroskopija, te spektroskopske metode (4, 13, 21).

1.1.2.3.1. Korištenje neionskih detergenata

Ova metoda se zasniva na tvrdnji da jaka lipid-lipidna međudjelovanja u čvrsto pakiranim uređenim domenama čine molekule mnogo otpornijima na otapanje u neionskim detergentima, u usporedbi sa slabo povezanim L_d domenama u kojima se lipid-lipidna međudjelovanja zamjenjuju s onima između lipida i detergenta (4). Prema tome se i zasniva prva i tradicionalna definicija lipidnih splavi je da su to membranske mikrodomene otporne na ekstrakciju u 1% neionskom detergentu Tritonu X-100 (TX-100) i koje, nakon ekstrakcije, plutaju u gornjoj polovici 5-30% gradijenta sukroze (4, 22).

Osim TX-100 koriste se i ostali neionski detergentsi, od kojih neki jače, a neki slabije izdvajaju proteine iz lipidnih splavi. Neki od najvažnijih su prikazani od najmanje prema najviše selektivnim (23):

Tween 20 < Brij58 < Lubrol WX < Brij 96 < Brij 98 < TX-100 < CHAPS

Prema toj selektivnosti možemo razlikovati primjerice: TX-100 splavi; Lubrol WX splavi; Brij 98 splavi itd. (23, 24). Stoga postoje različite vrste membrana otpornih na detergente (DRM – engl. *detergent resistant membranes*). Međutim, nazočnost proteina i lipida u DRM, na koje ukazuje tretman određenim detergentom, ne znači i nužno

da se taj protein nalazi u toj domeni i u nativnim membranama. S druge strane, različiti rezultati s drugim detergentima ne moraju značiti i izolaciju drugih vrsta domena.

Nadalje, molekule u lipidnim splavima su netopive samo obzirom na molekule koje se ne nalaze u splavima. Naime, kod viših omjera detergent-lipid, lipidne splavi se učinkovito otapaju (25). Stoga je važno titrirati detergente i koristiti ispitane kontrole.

Većina detergenata, među kojima je i TX-100, se mora koristiti na 4°C, kako ne bi došlo do otapanja cijele membrane. To može uzrokovati stabilizaciju i L_d domena, a time i dobijanje lažno pozitivnih rezultata. Stoga se ponekad primjenjuju detergentski koji mogu djelovati na 37°C (npr. Brij 98) (13). O problemima korištenja detergenata, te kod primjene drugih metoda kod detekcije proteina u lipidnim splavima bit će više govora u raspravi.

1.1.2.3.2. Uklanjanje kolesterola

Kao što je ranije opisano, kolesterol je vrlo bitan za održavanje integriteta lipidnih splavi. Stoga će njegovo uklanjanje imati značajne posljedice na njihovu zastupljenost. Međutim, potreban je oprez jer može doći i do promjene u staničnoj morfologiji, egzocitozi i prijenosu, te do dezintegracije aktinskog citoskeleta, što rezultira velikim brojem pleotropnih učinaka (17).

Tvari koje se koriste za uklanjanje kolesterola se dijele u tri osnovne skupine (4). U prvu skupinu ubrajamo **ciklodekstrine**, tvari koje uzrokuju brzo uklanjanje (ekstrakciju) kolesterola, ali ne djeluju uvijek i lipid specifično;. Nadalje, **statini** inhibiraju sintezu kolesterola, ali je potrebno duže vrijeme za djelovanje (mevastatin). Na kraju, **polieni antibiotici**, npr. *nystatin* ili *filipin*, sa sterolima stvaraju komplekse. Međutim, nije još uvijek dobro poznata priroda tih kompleksa, što dovodi do ograničenja kod ovog pristupa.

Važno je napomenuti da se samo djelomično uklanjanje može postići pod uvjetima koji održavaju staničnu vijabilnost.

Općenito, ako se u membrani nalaze L_α i L_d domene, za očekivati je da će količina lipidnih splavi ipak biti smanjena ako se kolesterol ukloni. Konačan rezultat ovisi o početnoj količini kolesterola, te o stupnju njegovog uklanjanja (4).

1.1.2.3.3. Vizualizacija lipidnih splavi i ostale metode njihovog istraživanja

Većina ostalih metoda često služi za detekciju tzv. nedetergentskih splavi. Naime, pokazano je da su takve splavi uglavnom slične onima koje se mogu izolirati nakon djelovanja detergenata s umjerenim djelovanjem kao što su Brij 96 i 98 (21, 26).

Tako se primjenjuju **sonifikacija membrana**, izolacija pomoću **kationskih koloidnih silika čestica** (za odvajanje kaveola od ostalih lipidnih splavi), te afinitetna kromatografija.

Splavi je teško detektirati u stanici prvenstveno uslijed njihove male veličine, umjerene razlike u sastavu obzirom na neorganizirane dijelove, te nepostojanja u odsustvu poticajnih međudjelovanja (npr. u odsustvu agregacije proteina pridruženih splavima) (4).

Izravno se pokušavaju vizualizirati, primarno pomoću **konfokalne mikroskopije**, kolokalizacijom s odgovarajućim markerima, primjerice GM₁ koji se detektira nakon vezivanja kolera toksina, Gb3 nakon vezivanja shiga toksina ili protutijela na aneksine i flotiline kao markere lipidnih splavi s citoplazmatske strane (27).

Bez obzira na mnogobrojne tehnike, veličinu lipidnih splavi teško je odrediti. Naime, vizualizacija klasičnom fluorescentnom mikroskopijom predstavlja problem uslijed ograničenja moći razlučivanja (oko 300 nm), a njihova detekcija je također najvjerojatnije i ispod moći razlučivanja standardnih EM. Zato se koriste drugačiji pristupi primjerice razna spektroskopska mjerenja (FRET) kojim se može detektirati blizina dviju molekula na udaljenosti 1-10 nm, te analiza stupnja lateralne difuzije (18). No rezultati i dalje nisu ujednačeni i daju različite rezultate, pa se veličina lipidnih splavi kreće u rasponu od 25-5000 nm.

Za praćenje dinamike molekula u lipidnim splavima važnu ulogu ima i primjena FRAPa, (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*), tj. oporavljanje fluorescentnog signala nakon njegovog uklanjanja intenzivnim osvjetljavanjem. Naime, u toj metodi se dio fluorescentno obilježenih molekula iz određenog dijela stanice (primjerice vezikule), osvijetli, nakon čega dolazi do gubitka fluorescencije u tom dijelu. Međutim, nakon određenog vremena fluorescentno obilježene molekule mogu ponovo dolaziti u to područje, te se na taj način može pratiti kinetika njihova ulaska. Nadalje, promjenjuje se i metoda u kojoj je omogućeno praćenje samo jedne čestice (engl. *single particle tracking*).

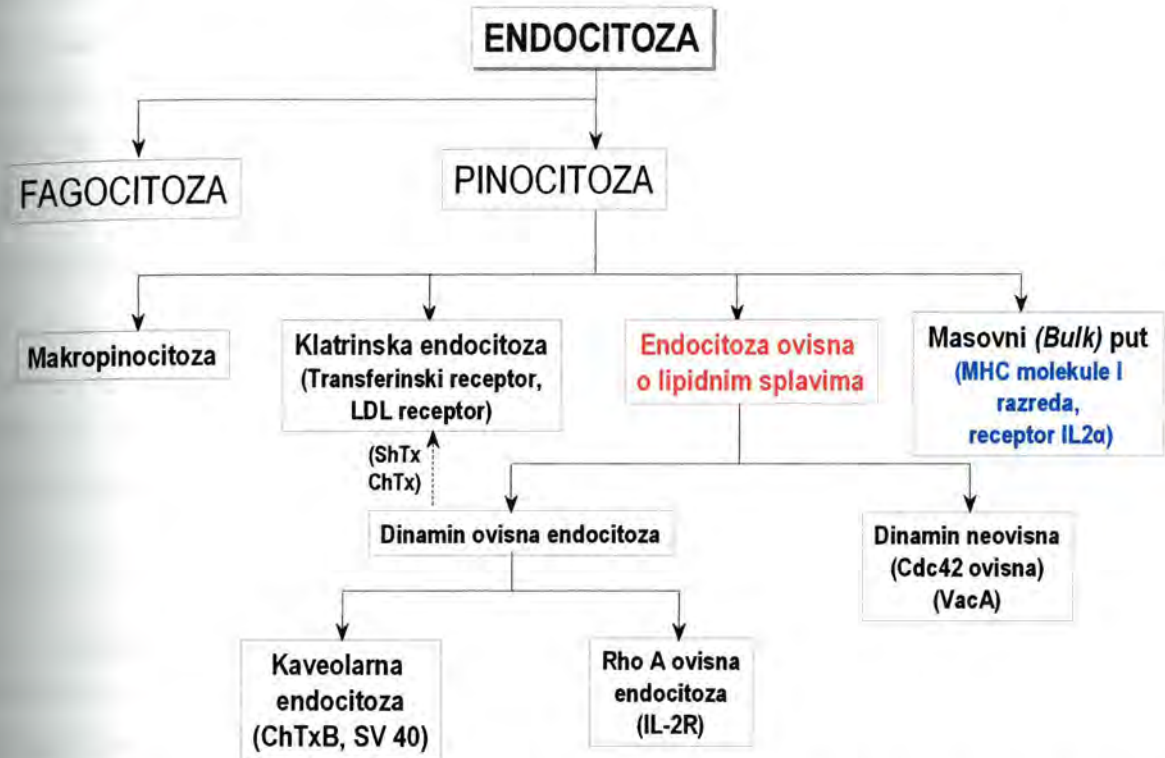
Sumarno, rezultati pokazuju da se lipidne splavi koje se nalaze na staničnoj površini razlikuju u veličini (40 do > 500 nm), te da se njima pridruženi proteini drže u definiranim odjeljcima koji se ne preklapaju (13). No, za sigurnije i detaljnije rezultate ipak je potreban razvoj boljih fizikalnih metoda.

1.2. ENDOCITOZA

Endocitoza je proces kojim slobodne izvanstanične, ali i površinske molekule ulaze u stanicu. Općenito se odvija uvrnućem plazmatske membrane i posljedičnim otcjepljivanjem novonastale vezikule s endocitiranim sadržajem u staničnu unutrašnjost. Molekule koriste različite mehanizme endocitoze, a upravo način ulaska u stanicu može biti posljedica sortiranja odgovarajućih staničnih receptora u određene membranske domene, ali i koncentracije internaliziranih molekula. Iako sam mehanizam endocitoze može utjecati na sudbinu internalizirane molekule (npr. kod EGFR), na njezino usmjeravanje tijekom unutarstaničnog prijenosa kroz endosomalne odjeljke znatno utječe smještaj u membranskim domenama.

1.2.1. Vrste endocitoze

Endocitoza se okvirno može podijeliti (slika 6) na **fagocitozu** (stanično jedenje), tj. proces kojim u stanicu ulaze veće čestice (npr. bakterije) i **pinocitozu** (stanično pijenje) kojom u stanicu ulaze manje čestice, primjerice stanični receptori, nutritivni ligandi (transferin, Tf), lipoprotein male gustoće (LDL), virusi i sl. (28).



Slika 6: Podjela endocitoze. Endocitoza se okvirno može podijeliti na fagocitozu i pinocitozu. U najvažnije pinocitotzne puteve ubrajamo makropinocitozu, klatrinsku endocitozu, endocitozu ovisnu o lipidnim splavima (najvažniji predstavnik je kaveolarna endocitoza), te tzv. masovnu endocitozu (engl. *bulk pathway*). Dodatne podjele su objašnjene u tekstu. (ShTx – shiga toksin; ChTx(B) – kolera toksin (podjedinica B), IL-2R – interleukin-2 receptor) (prilagođeno prema referenci 28)

1.2.1.1. Makropinocitoza

Makropinocitoza se često odvija konstitutivno, ali je znatno povećavaju faktori rasta ili forbolni esteri (29). Uključuje djelovanje Rho obitelji GTPaza, aktivaciju aktinskog citoskeleta, te nastanak izdanaka na staničnoj membrani i njezino nabiranje (28).

Makropinosomi su veći od $1\mu\text{m}$ (28), ne spajaju se s uobičajenim endosomima, te su u usporedbi s njima dosta oskudni receptorskim molekulama (30). Uglavnom se spajaju međusobno, te se najvjerojatnije usmjeravaju prema PM. Međutim, njihov sadržaj može ulaziti i u rane, odnosno kasne endosome (29).

Ovim mehanizmom u stanicu često mogu ulaziti i markeri fluidne endocitoze (npr. dekstran), koji često u stanicu ulaze i obložnim vezikulama.

1.2.1.2. Klatrinska endocitoza

Klatrinska endocitoza predstavlja danas najbolje istražen mehanizam endocitoze. Ovim mehanizmom u stanicu konstitutivno ulaze neophodne prehrambene tvari, primjerice LDL i transferin, ili različite signalne molekule, primjerice receptor za epidermalni faktor rasta (28, 31, 32).

Osnovni mehanizam klatrinske endocitoze podrazumijeva koncentriranje transmembranskih (TM) receptora, te za njih vezanih liganada u obložne jamice na PM. Ove se jamice stvaraju sklapanjem citosolnih obložnih proteina, kojih je glavni predstavnik **klatrin**, te se uvlače i otkidaju sa PM stvarajući *klatrinske vezikule*, koje su veličine oko 120 nm (2).

Vrlo važnu ulogu u odabiru molekula koje će u stanicu ući klatrinskom endocitozom imaju **adaptorski proteini**. Oni prepoznaju određene signalne dijelove u citoplazmatskom dijelu membranskog receptora.

Od signalnih motiva najbolje su poznati: *tirozinski motiv* (YXΨΦ) koji prepoznaje ga podjedinica $\mu 2$ adaptorskog proteina AP2, a na taj način ulazi primjerice transferinski receptor (TfR); *dileucinski motiv* koji također prepoznaje podjedinica $\mu 2$ adaptorskog proteina AP2; te **LDL receptorska obitelj (F_xNP_xY)** koju prepoznaje adaptorski protein Dab2 (engl. *Disabled-2*), ali i AP2 (33).

1.2.1.3. Endocitoza ovisna o lipidnim splavima

Endocitozu ovisnu o lipidnim splavima možemo dodatno podijeliti na kaveolarnu endocitozu i endocitozu ovisnu o lipidnim splavima u užem smislu, koja može biti ovisna ili neovisna o dinaminu, proteinu koji ima ključnu ulogu u otkidanju endocitoznih mjehurića od stanične membrane (31, 34, 35):

1.2.1.3.1. Kaveolarna endocitoza

Oblik i strukturalna organizacija **kaveola** je prvenstveno posljedica utjecaja **kaveolina**, dimernog palmitiliranog proteina koji vezuje kolesterol, poput ukosnice se umeće u unutrašnji sloj PM i međusobno povezuje stvarajući prugast kaveolinski omotač na površini membranskih invaginacija (36). Začudujuće, nedavna istraživanja ukazuju da bi kaveolin negativno djelovao na kaveolarnu endocitozu (28, 37).

Kaveole su statične strukture na PM koje drži aktinski citoskelet. Obogaćene su kolesterolom i glikosfingolipidima, jednako kao i lipidne splavi, te predstavljaju njihovu podvrstu. Njihova internalizacija se potiče nakon signalne kaskadne reakcije koja rezultira tirozinskom fosforilacijom kaveolarnih sastavnih dijelova. Međutim još je dosta nejasnoća u razjašnjavanju kako poticaja i tijeka signalne kaskade, tako i receptora koji je aktiviraju, te supstrata neophodnih za kaveolarnu endocitozu. (28, 31, 37).

Kaveolarna endocitoza se događa s poluvremenom ($t_{1/2}$) > 20 min, te je sporija od klatrinske endocitoze. No, kao i klatrinska endocitoza, ovisna je o dinaminu, a kaveole također zahtijevaju nazočnost sličnih molekula za pristajanje i fuziju svojih 60 nm velikih vezikula sa ciljnim endosomalnim odjeljcima (VAMP, NSF, SNAP, aneksini, GTPaze) (28, 37).

Osim na PM, kaveolin se nalazi i na *trans*-Golgijevom aparatu (TGN; engl. *trans*-Golgi network – *trans*-Golgijeva mreža), te u kaveosimima (vrsta endocitoznih odjeljaka – odjeljak 1.2.2.2.1) (37, 38). Nakon uklanjanja kolesterola s PM, kaveole nestaju, a kaveolin se premješta u unutarstanične strukture – endosome, Golgijev aparat (GA) ili endoplazmatsku mrežicu (ER; engl. endoplasmic reticulum) (37).

Kaveolarnom endocitozom u stanicu ulazi toksin kolere, albumin, alkalna fosfataza, folna kiselina, laktozilceramid, majmunski virus 40 (SV40, engl. *simian virus 40*) GPI-GFP (zeleni fluorescentni protein konjugiran GPI sidrom) i druge molekule. Međutim, važno je napomenuti da velik broj ovih molekula u stanicu može ući i ostalim endocitoznim mehanizmima, uključujući i klatrinsku endocitozu (npr. kolera toksin, albumin, folna kiselina...) (37, 38, 39, 40).

Kolera-toksin je jedna od najbolje istraženih molekula koja u stanicu ulazi mehanizmom kaveolarne endocitoze. Međutim, klatrinski mehanizam ulaska također može biti uključen (40, 41, 42, 43). To je pentavalentni toksin koji se vezuje za glikolipid GM₁ prije endocitoze (44) uzrokujući njegovo premještanje u velikom broju staničnih linija (45, 46).

Kao što je ranije rečeno **mehanizmi koji sudjeluju u procesu kaveolarne endocitoze** su mnogo slabije razjašnjeni nego kada je u pitanju klatrinska endocitoza. No, poznato je da kaveolarnu endocitozu može uzrokovati više pojava. Jedna od njih je *unakrsno vezivanje kaveolarnih dijelova* (npr. kod nekih GPI-sidrenih proteina). Mnogi ligandi su multivalentni (primjerice virusi) i time sposobni unakrsno povezivati svoje receptore (37). Nadalje, poznat je utjecaj *aktivacije fosforilacijske kaskade* (47). Tako fosfatazni inhibitori mogu potaknuti kaveolarnu endocitozu, no, način na koji izvanstanični ligandi aktiviraju fosforilaciju još se ne zna. Pored toga, moguće je i *izravno signaliranje preko lipida u splavima kao što su ceramid i fosfatidilinozitol (PI)* (31), a izgleda da i aktivacija *aktinskog citoskeleta* ima nezamjenjivu ulogu tijekom odvijanja kaveolarne endocitoze (37). U konačnici, pokazano je da je stopa kaveolarne endocitoze ovisna o *ravnoteži kaveolina-1 i lipida u splavima* (kolesterol i glikosfingolipidi) – prekomjerna ekspresija kaveolina-1 smanjuje stopu kaveolarne endocitoze, dok povećanje splavnih lipida ubrzava stopu endocitoze (31, 48).

1.2.1.3.2. Endocitoza ovisna o lipidnim splavima u užem smislu

Endocitoza ovisna o lipidnim splavima u užem smislu podrazumijeva sve vrste endocitoze ovisne o lipidnim splavima koje nisu kaveolarne. Još nije dovoljno razjašnjena, ali je predmetom intenzivnog istraživanja. Poznato je da vezikule nastaju iz lipidnih splavi na staničnoj površini iz područja gdje se nalaze lipidne splavi, a promjera su 40-50 nm (28).

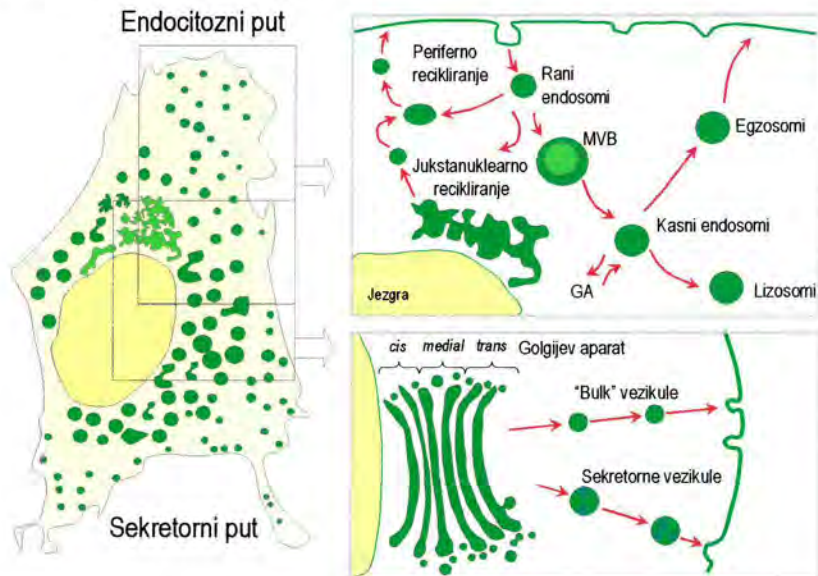
Jednako kao i klatrinska i kaveolarna endocitoza može biti ovisna o dinaminu (npr. IL2-R (49)), ali i dinamin neovisna (VacA toksin iz *H. pylori* (50)), te se tako i dijeli (slika 6). Dinamin neovisan mehanizam često zahtijeva prisustvo Cdc42, ali postoje i drugi, slabije karakterizirani mehanizmi (28).

1.2.1.4. Masovna (bulk) endocitoza

Podrazumijeva način endocitoze na koji u stanicu masovno ulaze mnogobrojni receptori, ali i manje molekule, ali kojima mehanizam nije dostatno razjašnjen. Poznato je da se radi o pinocitoznom putu koji je neovisan o klatrinu, lipidnim splavima i dinaminu, a prvi put je pokazano da se potiče u dyn^{is} stanicama (stanicama koje ne izražavaju funkcionalan dinamin na određenoj temperaturi), čime se nadomješta gubitak klatrinskog doprinosa ovoj vrsti endocitoze (51). Ovim načinom u stanicu ulazi fluid fazni marker HRP (peroksidaza iz hrena; engl. *horseradish peroxidase*), a također i konformirane MHC molekule I razreda (51, 52, 53). Morfološka ispitivanja su pokazala prisustvo glatkih endocitičkih vezikula kao posrednika ove klatrin i kaveolin-neovisne endocitoze (51, 54, 55).

1.2.2. Unutarstanični put internaliziranih molekula

Nakon endocitoze molekule se usmjeravaju u unutarstanične odjeljke, o čemu ovisi i njihova daljnja sudbina – recikliranje prema staničnoj površini, degradacija, ili retrogradni put prema GA (slika 7).



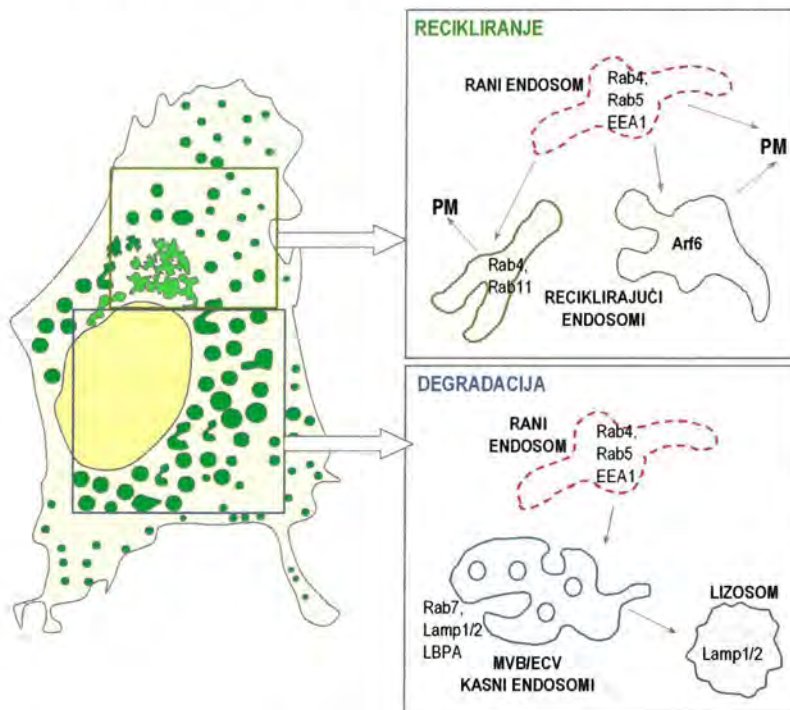
Slika 7: Unutarstanični membranski odjeljci i vezikularni prijenos. Dva su osnovna puta kojima se usmjeravaju molekule unutar stanice. Endocitoznim putem se prenose internalizirane molekule koje uglavnom slijede put recikliranja ili degradacije. Alternativno, one se mogu usmjeriti i prema GA i ER, odnosno sekretornom putu kojim uglavnom putuju novosintetizirane molekule prema PM. MVB – multivezikulama tjelešca (prilagodeno prema referencama 28, 32, 56).

Iako se molekule mogu endocitirati na različite načine, većina njih putuje odjeljcima koji su dio glavnog endocitoznog puta ili se nakon prolaska kroz specifične endocitozne vezikule na kraju ipak usmjeruje u njega. Stoga ćemo najprije opisati ovu glavnu granu internalizacijskog puta, a kasnije specifične dijelove endocitoznog prijenosa karakteristične za neke vrste endocitoze.

1.2.2.1. Glavni (klatrinski) endocitozni put

Glavnim endocitoznim putem (slika 8) uglavnom putuju molekule koje su u stanicu ušle klatrinskom endocitozom. No, kao što je rečeno, vrlo se često i molekule endocitirane dugim mehanizmima usmjeravaju u ove odjeljke (32, 57, 58, 59, 60).

Prvo račvište u kojem se događa daljnje usmjeravanje molekula kroz stanicu je **rani endosom**. Iz njega se mogu izravno reciklirati prema PM, ili nakon prolaska kroz reciklirajući endosomalni odjeljak (32). Alternativno, molekule koje se ne recikliraju ostaju u njegovoj unutrašnjosti, te kasnije postaju sastavni dio **multivezikularnih tjelešaca (MVBs)** i **kasnih endosoma**, nakon čega se uglavnom degradiraju u **lizosomima**. Međutim, kasni endosomi služe i kao i drugo račvište iz kojeg se molekule mogu usmjeravati i prema GA odnosno egzocitirati (56, 61, 62).



Slika 8: Endosomalni odjeljci glavnog endocitoznog puta. Nakon endocitoze, molekule endocitirane klatrinskom endocitozom (a često i one koje su ušle u stanicu i drugim mehanizmima) ulaze u rane endosome, iz kojih se mogu usmjeravati u degradaciju ili recikliranje, odnosno retrogradnim putem u GA (nije prikazano). Endosomalni odjeljci su karakterizirani nazočnošću određenih markera. Daljnje objašnjenje nalazi se u tekstu (prilagođeno prema referencama 32 i 58).

Svi ovi odjeljci su karakterizirani specifičnim markerima koji su često citoplazmatski proteini, a na odgovarajućim endosomima su smješteni u domene u kojima vrše određenu ulogu (slika 8). O njima će biti govora u narednim odjeljcima. Osim ovih proteinskih markera, važnu ulogu u transportu i remodeliranju vezikula imaju fofatidilinozitolfosfati (PIP) – PI(3)P, PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂ i PI3,4,5P₃ (31, 63).

1.2.2.1.1. Sortiranje endocitiranih molekula u ranim endosomima

Rani endosomi (EE; engl. early endosomes) su uglavnom periferno smještene tubulo-vezikularne strukture kojima pH u unutrašnjosti iznosi oko 6,2 (64, 65, 66, 67). Kao i većina drugih vezikula, karakterizirani su prisustvom Rab molekula – proteina koji imaju važnu ulogu u usmjeravanju i spajanju istih ili različitih endosomalnih odjeljaka, a često se koriste kao njihovi markeri. U njima EE razlikujemo nekoliko domena: Rab5, Rab4 i Rab11. Dok su molekula **Rab5** i njegov efektor **EEA1**, zajedno sa **SNARE** proteinima, zaduženi za procese homotipske ili heterotipske fuzije između primarnih ranih endosoma i EE, **Rab4** i **Rab11** igraju važnu ulogu tijekom odvajanja molekula koje se recikliraju (68). Tijekom homotipske fuzije neprekidno se od novonastalih endosoma odvajaju vezikule koje se usmjeravaju u recikliranje (pozitivne na marker Rab4), dok se u unutrašnjosti koncentrira materijal koji je uglavnom predviđen za degradaciju. On uzduž mikrotubula putuje prema središnjem dijelu stanice. Prema tome, Rab5⁺ EE se neprekidno stvaraju i obnavljaju na staničnoj periferiji, te putuju prema perinuklearnom dijelu. Tijekom tog procesa veličina im se povećava, jednako kao i koncentracija materijala predviđenog za degradaciju, dok se istodobno gube reciklirajuće molekule. Također se i pH dodatno smanjuje. U jednom trenutku događa se konverzija Rab molekula, te se Rab5 otpušta, a istodobno se vezuje Rab7, marker **kasnih endosoma (LE – engl. late endosomes)**. Ovaj put od EE do LE traje oko 5-10 minuta, a sam proces sazrijevanja naziva se **maturacija** (69).

Kao posljedica smanjenja pH unutar EE, dolazi do otpuštanja mnogih liganada od svojih receptora (npr. LDL od LDLR, EGF od EGFR...), koji se miješaju s unutarvezikularnim otopljenim molekulama. Ovo odvajanje predstavlja prvi korak endosomalnog sortiranja. Kao rezultat maturacije EE, ove otopljene molekule, kao i dio membranskih proteina i lipida se upućuju u LE bez stvarnog napuštanja lumena EE (32). Vjeruje se da se velik dio membrane EE uklanja otkidanjem uskih tubula; ovim se načinom prvenstveno uklanjaju reciklirajuće od otopljenih molekula. Posljedično, u odsustvu specifičnog signala, membranski proteini koji su internalizirani u endosome bit će transportirani iz EE s većim dijelom membrane prema PM. Jednako tako, i lipidi s nezasićenim ili kraćim zasićenim acilnim lancima se smještaju u fluidnije dijelove membrane koji se lakše podvrgavaju tubuliranju, te se prema tome i recikliraju. Za razliku od toga, lipidi sa zasićenim acilnim lancima se smještaju u središnje, vezikularne dijelove koji postaju dio LE (70). Prema tome, prvi se korak endosomalnog sortiranja prvenstveno zasniva na *geometriji* EE i membranskih proteina, te se većina sadržaja ukloni prije nego što EE sazrije u LE (32).

Molekularni mehanizmi maturacije i regulacije vremena maturacije nisu u potpunosti razjašnjeni.

Osim spomenutih markera, važna je i ARF obitelj GTPaza koja najvjerojatnije koordinira neke od endocitičkih procesa pupanja se EE, a često su uključeni u proces recikliranja (52, 53 68, 71).

1.2.2.1.2. Recikliranje endocitiranih molekula

Kao što je opisano u prethodnom odjeljku, jedan od putova iz ranih endosoma vodi u recikliranje. Ovaj put je neophodan za održavanje normalnog sastava pojedinih organela, ali i za vraćanje neophodnih molekula koje vrše u njima određene uloge. Recikliranje najvjerojatnije ne zahtijeva postojanje specifičnog signala i

predstavlja zadani put, a molekule se mogu reciklirati *izravnim putem iz EE*, ili *neizravno preko jukstanuklearnog endocitoznog reciklirajućeg odjeljka (ERC – engl. endocytic recycling compartment)* kojem je karakterističan marker Rab11, ali je također pozitivan i na Rab4 (68).

Endocitički reciklirajući odjeljak – jedan od odjeljaka endocitičkog reciklirajućeg sustava. Kroz njega prolazi velik udio reciklirajućih molekula. Uglavnom se sastoji od velikog broja uskih tubula, a u nekim stanicama je uglavnom smješten oko organizirajućeg centra mikrotubula (MTOC; engl. *microtubule organizing centre*).

Kao što je spomenuto u prethodnom odjeljku, u reguliranju procesa recikliranja važnu ulogu imaju molekule Rab4, Rab5 i Rab11 koje su smještene u zasebnim domenama (32).

Izgleda da **Rab4** ima ulogu u recikliranju membrane izravno iz EE, u procesu koji vjerojatno uključuje izravno recikliranje prema PM. Međutim, ovaj protein se nalazi i na ERC (32). Rab4 domene, koje su smještene u tubularnim pododjeljcima EE, bi mogle koordinirati stvaranje reciklirajućih vezikula. Suprotno tome, ova aktivnost bi mogla biti isključena u Rab5 domenama, koje se nalaze u vezikularnim dijelovima endosoma (68).

Rab11, koji se nalazi na ERC i membranama TGN, ima također ulogu u recikliranju prema PM. Potreban je u brojnim sortirajućim procesima koji započinju u ERC (32). Nešto ga malo ima i u EE (68).

Od molekula koje se recikliraju najbolje je istražen **transferinski receptor (TfR)**. Nakon što u stanicu uđe mehanizmom klatrinske endocitoze, dopijeva u EE. Iz njih se može reciklirati izravno (brzi put; $t_{1/2} \sim 5$ min), ili usmjeriti u ERC (spori put; $t_{1/2} \sim 15-30$ min). Za ovu molekulu je karakteristično da se reciklira zajedno sa svojim ligandom transferinom koji je otpustio željezo i pretvorio se u apotransferin, a od TfR se odvaja na PM (72, 73, 74). Nadalje, preko ERC se reciklira i **C6-NBD-sphingomijelin** (58, 75), dok se **TGN38** reciklira nekoliko puta kroz ERC dok ne dođe u TGN. Međutim, njegova stopa recikliranja je puno brža nego stopa izlaska iz GA do PM, te se stoga u normalnim uvjetima 80% nalazi u TGN (76). U konačnici, recikliranje molekula **IRAP** (engl. *insulin regulated aminopeptidase*) i **GLUT4** u fibroblastima zahtijeva nazočnost inzulina, a do tada je većim dijelom pohranjen u retencijskim odjeljcima (77, 78). O tome će biti govora kasnije u odjeljku 1.2.2.3.

Recikliranje lipida

Osim činjenice da se recikliranje molekula općenito događa zadanim putem, mehanizam endocitotskog sortiranja lipida je vrlo slabo razjašnjen, i ovisi o svojstvima kako lipidne glavice, tako i hidrofobnih repova. Izgleda da lipidni sastav i sortiranje imaju znatan utjecaj na sortiranje proteina (32).

Kolesterol putuje između odjeljaka kao dio lipidnog dvosloja ili difuzijom kroz citoplazmu povezan s proteinima nosačima. Zajedno sa sfingolipidima sudjeluje u regulaciji kinetike recikliranja proteina (58). U stanici ga ima znatno u TGN, ERC, a pokazano je i da se nalazi u Arf6-pozitivnim sortirajućim endosomima (70). Arf6⁺ tubularne strukture (reciklirajuće) imaju manje kolesterola, ali sadrže zamjetne količine PIP₂ (53).

1.2.2.1.3. Degradacija endocitiranih molekula

Ranije je napomenuto da molekule koje se usmjeravaju u degradaciju postaju sastavni dio kasnih endosoma nakon njihova sazrijevanja u ranim endosomima. Vezikule koja služe kao prijenosnici između ova dva

odjeljka su **multivezikularna tjelešca** (MVB – engl. *multivesicular bodies*), poznate još kao i **endosomalne prijenosne vezikule** (ECV – engl. *endosomal carrier vesicle*) (56).

Svi endosomi koji se nalaze na putu degradacije posjeduju multivezikularne elemente (vezikularne tvorbe koje nastaju pupanjem membrana u unutrašnjost samog odjeljka, te stvaraju nove vezikule koje se nakupljaju u negovoj unutrašnjosti), uključujući područja EE (koji odgovaraju novonastalim MVB/ECV) i LE. U stvari, multivezikularni elementi LE sadrže složen sustav internalnih membrana koji je uključen kako u degradaciju, tako i u recikliranje proteina i lipida (32, 56, 61)

Često se postavlja pitanje: **što usmjerava proteine u degradaciju?** Jedan od najbolje razjašnjenih mehanizama koji sudjeluju u usmjeravanju endocitiranih površinskih receptora i ostalih molekula u degradaciju je njihova *multiubikvitinilacija*. Ova modifikacija je odgovorna za njihovo sortiranje u novostvorena **MVB**, a za taj proces potrebna je još i aktivnost proteina **HRS** (vezuje multiubikvitinilirani receptor i ESCRT-I), te **ESCRT-I, -II i -III kompleksa**. Kada se ovaj kompleks stvori na površini EE, dolazi do njezinog selektivnog uvrnuća, te se od tog dijela membrane, zajedno s receptorima predviđenim da se degradiraju, stvara vezikula koja postaje unutarvezikularni dio multivezikularnog tjelešca (31, 32, 56). Za razliku od LE, malo se zna o membranskom sastavu MVB, osim da sadrže internalizirane receptore. Ipak, neki lipidi bi se mogli selektivno usmjeravati u ove odjeljke, te imati važnu ulogu u njihovoj biogenezi, primarno zbog toga što bi «vrat» novostvorenih uvrnuća mogao davati prednost u smještaju samo nekih lipida uslijed jakog membranskog zakrivljenja tih područja (79).

Nakon što su se otkinuli od ranih endosoma, MVB, koja su tipično kuglastog oblika (promjer 400-500 nm), se prenose preko mikrotubula prema kasnim endosomima, s kojima se u konačnici spajaju (56, 80)

Neki rezultati ukazuju da nishodna regulacija proteina nije učinkovit proces koji se događa odmah tijekom prvog kruga endocitoze i recikliranja, već je posljedica činjenice da se taj ciklus neprestano ponavlja. Prema tome, učinkovito uklanjanje proteina se događa čak i uslijed malih gubitaka u učinkovitosti recikliranja. Nishodna regulacija mnogih proteina se uobičajeno događa nakon nekoliko sati, što ukazuje da je djelomičan gubitak djelotvornog recikliranja bio dostatan za objašnjenje njihovog nestanka. To također navodi na pomisao da usmjeravanje u lizosome, barem sa stanične površine, ne zahtjeva specifičan sortirajući signal u citoplazmatskom repu, već može biti odraz biofizičkih svojstava samih produkata u ranim endosomima. Sortiranje proteina u ranim endosomima, koje se zasniva na pretpostavci o fluidnosti dijela membrane i njima pridruženih molekula, bi tako moglo objasniti slab napredak u identificiranju obložnih proteina na tom mjestu (81).

Kasni endosomi

To su endocitičke organele s kojima se više izravno ne spajaju endocitozne vezikule otkinute od plazmatske membrane i ne nalaze se na glavnom dijelu endocitoznog puta. No, u zadnje vrijeme se otkriva njihov *značaj u sortiranju molekula*, što je svojstvo koje nemaju MVB. Molekule se iz kasnih endosoma mogu reciklirati prema TGN, primjerice TGN38, MPR (receptor manosa 6 fosfata), ali i egzocitirati prema plazmatskoj membrani (61, 76, 82). Ovaj proces egzocitoze je, između ostalog, izuzetno bitan kod antigenskog predočavanja, kako MHC-II, tako i MHC-I molekula (61, 83, 84). O egzocitozi će biti više govora u odjeljku 1.2.2.1.4.

Kasni endosomi su visokopolimorfne strukture s cisternalnim, tubularnim i multivezikularnim dijelovima, a proteinski sastav im se razlikuje od onog kod MVB. Više su sferični negc EE i nižeg pH (5,0-5,5), a izgled im više podsjeća na MVB. Također, smješteni su više jukstanuklearno i koncentrirani oko MTOC. Kasni endosomi sadrže **LAMP-1** i **LAMP-2** (jednako kao i lizosomi), proteine koji se nalaze u njihovim graničnim (vanjskim) membranama (56, 85), a za njihovu funkciju je važan **Rab7** (68, 86). Međutim, za razliku od lizosoma posjeduju manozna-6-fosfatni receptor (MPR). Osim toga, ovi odjeljci u svojim unutarnjim membranama sadrže velike količine lizobisfosfatidne kiseline (**LBPA**). LBPA se nalazi u velikim količinama upravo u LE, ali nije prisutna u ostalim staničnim odjeljcima (56, 86, 87, 88).

Neke lipidne strukture koje pokazuju sklonost više uređenim domenama se primarno ugrađuju u MVB, a sastavni dijelovi lipidnih splavi se prenose od EE prema LE, berem u nekim staničnim vrstama (89). Osim toga, signaliranje putem PI(3)P također regulira sortiranje receptora u unutrašnjost MVB – omogućuje otkidanje uvrnutog dijela membrane i stvaranje unutrašnjih vezikula (90). Nadalje, jedan od proteina koji djeluje kao efektor PI3P je ranije spomenuti HRS (56).

Poznato je da se u *kasne endosome usmjeravaju* molekule **LDL**, liganda koji se vezuje za LDL receptor (LDLR) i zajedno s njim u stanicu ulazi mehanizmom klatrinske endocitoze. LDLR se reciklira (jednako kao i TfR), dok se LDL usmjerava u LE i lizosome i lizosome, te se degradira (91). Nadalje, i **CI-MPR (Kation neovisan manozna-6-fosfatni receptor)** vezuje lizosomalne enzime i prenosi ih iz TGN u kasne endosome, iz kojih se ponovo reciklira (najvjerojatnije uz pomoć molekula LAMP^{1/2}) (82, 92).

1.2.2.1.4. Egzocitoza

Osim klasičnog procesa egzocitoze, koji se odvija nakon konstitutivnog otpuštanja molekula nastalih u sekretornom putu, i endocitirane molekule se mogu izbacivati iz stanice, procesom koji prvenstveno započinje nakon sortiranja u kasnim endosomima (61, 83).

Egzosomi nastaju iz unutrašnjih vezikula MVBs. Te **unutrašnje vezikule** najvjerojatnije nastaju pupanjem prema unutrašnjosti MVB, čime se stvara membranom ograničen odjeljak čiji lumen topološki odgovara citoplazmi (61, 74, 93).

Iako se proteini koji se nalaze u ovim unutrašnjim membranama često upućuju u **degradaciju** (npr. faktori rasta), neki se mogu i **egzocitirati**.

Od lipida, ranije spomenuta LBPA se učinkovito ugrađuje u ove unutarvezikularne odjeljke, a smatra se da regulira prijenos kolesterola, vjerojatno djelujući kako njihov sakupljač i raspoređivač (94).

Prema tome, MVBs mogu slijediti 2 različita puta: **fuziju s lizosomima**, što prvenstveno rezultira *degradacijom* njihovog sadržaja (95, 96), ili **fuziju s PM, odnosno egzocitozu** unutarnjih vezikula u izvanstanični prostor (61, 83).

Egzocitoza je zamijećena u više staničnih linija, između ostalog u limfocitima B i stanicama melanoma tijekom ugradnje MHC-II molekula iz graničnih membrana MVB u PM (97). Suprotno tome, ako se MHC-II (ili čak i MHC-

l) molekule nalaze u unutarnjim membranama vezikule, dolazi do njihovog otpuštanja u vanstanični prostor (97, 98, 99).

U egzosomima se, osim MHC-I i MHC-II molekula mogu naći: TfR, molekule tetraspaninske obitelji (CD63, CD81, CD82, CD37), neki GPI-sidreni proteini (DAF/CD55, CD59), ICAM-1, Hsp70, Hsc73, aneksin II, i LBPA (revijski prikazano u 61).

1.2.2.2. Alternativni endocitozni putovi i odjeljci

Poznato je da se neklatirski endocitozni putovi mogu prekopčati na glavni endocitozni put i sadržaj predati njihovim endosomima i lizosomima. Brojne studije pokazuju da se molekule endocitirane kaveolarnim načinom, poput laktozil ceramida (LacCer) ili kolera-toksina (CTxB, engl. *cholera toxin*), spajaju s markerima klatrinske endocitoze u EE. Nadalje, muskarinski acetilkolinski receptor M₂, internaliziran na način koji nije niti klatrinski, niti kaveolarni, niti ovisan o dinaminu, također se spaja s klatrinskim putem u ranim endosomima. Ipak, iznimke postoje među različitim staničnim linijama (58, 60, 100, 101, 102, 103).

Međutim, dok se molekule ne spoje s ovim osnovnim putem, nalaze se u odjeljcima karakterističnima upravo za njihov način endocitoze. O njima će biti govora u ovom odjeljku.

1.2.2.2.1. Kaveosomi

Molekule internalizirane kaveolarnom endocitozom često ulaze u klasične endosomalne odjeljke, no postoje i zasebni odjeljci karakteristični upravo za tu vrstu endocitoze. Jedan od takvih odjeljaka predstavljaju **kaveosomi**. To su rane organele u koje ulaze molekule odmah nakon kaveolarnog mehanizma internalizacije (CTxB, SV40, unakrsno vezani GPI-sidreni proteini). Glavna su im obilježja to što su pozitivni na kaveolin-1, te što su neutralnog pH (38, 104, 105). Nakon kaveosoma, materijal se može prenijeti u ER (npr. SV40) (105), ali i u EE, te vjerojatno u još nedovoljno karakterizirane odjeljke – koji su kaveolin negativni, a u njih ulaze GPI-AP prije dolaska u GA (106).

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

GEEC (engl. *GPI-anchored proteins early endosomal compartment*), je rani tubulo-vezikularan odjeljak smješten na staničnoj periferiji u kojem se nalaze GPI-sidreni proteini. Kao što mu i samo ime kaže, karakteriziran je nazočnošću GPI-sidrenih proteina, a upravo GPI sidro je signal za ulazak molekula u njega. U njemu se na nalazi kaveolin, EEA1 i Tf, te se osim GPI-sidrenih proteina u njemu nakupljaju dekstran i folatni receptor. Ipak, važno je napomenuti da je GEEC-posredovana internalizacija (koja je neklatirska, nekaveolarna, Cdc42 ovisna, RhoA neovisna i dinamin-neovisna) ključni endocitozni put samo za GPI-AP koji nisu unakrsno povezani, a ovisi o Cdc42, ali ne i o klatrinu i dinaminu. Iz GEEC, GPI-AP slijede put recikliranja preko ERC, ali ove molekule se 3-4 puta sporije recikliraju nego TfR (107).

Zanimljivo je da se molekule koje se nalaze u lipidnim splavima mogu internalizirati u različite odjeljke: podjedinica B kolera-toksina i unakrsno vezan GPI-AP u kaveosome, te u Golgijevom aparatu, a neunakrsno

vezan GPI-AP u GEEC, te u reciklirajuće endosome (106). Suprotno tome LacCer ulazi u rane endosome a konačna sudbina mu ovisi o koncentraciji – veća koncentracija uključuje reciklirajući put zajedno s TfR, dok se domene manje koncentracije usmjeravaju u GA (100). Razlog za nekoliko različitih endocoznih putova posredovanih lipidnim splavima još nije jasan. Moguće je da se različite domene lipidnih splavi, koje se ne razlikuju samo po lipidnom sastavu, već i u prirodi proteina koji se smještaju u te domene, podrazumijevaju i aktivaciju drugačijih mehanizama.

Na kraju, **Vac A**, toksin iz *Helicobacter pylori*, koji se internalizira na način neovisan o klatrinu, kaveolinu, RhoA, dinaminu, ARF6 GTPaznoj aktivnosti, Cdc42 i tirozinskoj fosforilaciji, ali ovisan o aktinu i Rac1, nakon 10 minuta ulazi u odjeljke koji nalikuju na GEEC (sadrže GPI-AP i dekstran, ali su negativni na EEA1 i Tf, te kaveolin-1). Nakon ovih odjeljka prelazi u EE i LE, odnosno lizosome (50)

1.2.2.3. Recikliranje preko ARF6 vezikula

Ovaj poseban endosomalni odjeljak uključuje nazočnost još nedovoljno objašnjenih struktura u jukstanuklearnom području, te njima pridruženih tubularnih elemenata koji se protežu prema staničnoj periferiji – uključenošću perifernog endosomalnog sustava. Uz to važna je uloga i PIP(5) kinaze, te aktinskog citoskeleta (71, 108, 109)

Velik dio PM se internalizira i reciklira iz ovog odjeljka, a primarno uključuje transport molekula internaliziranih neklatrinским mehanizmom endocitoze (često masovnom ("bulk") internalizacijom; npr MHC-I molekule (53). Ovo je spori način recikliranja, te se punjenje i pražnjenje ovog odjeljka događa nakon 5-10 minuta (71, 110).

Nadalje, regulirajući količinu PIP₂ nastalu djelovanjem PI(5) kinaze, Arf6 kontrolira internalizaciju molekula endocitiranih neklatrinским mehanizmom. Naime, u slučaju da se količina PIP₂ na endosomima ne može smanjiti, dolazi do homotipske fuzije i vakuolizacije odjeljka, a sadržaj se ne može reciklirati i nakuplja se u stanici. Kao posljedica toga, smanjena je i stopa endocitoze s PM (71, 111).

Osim što djeluje u recikliranju, aktivacija Arf6 je također uključena u procesu regulirane egzocitoze (112).

Na kraju, smatra se da je jukstanuklearan reciklirajući odjeljak važno mjesto *koncentriranja unutarstaničnog kolesterola*. Tako rezultati ukazuju da su Arf6⁺ rani endosomi vrlo važan izvor PM kolesterola (70). S druge strane, pokazano je da membranski kolesterol ulazi u Rab5/EEA1 pozitivne EE (113), a jedan dio se vraća na PM preko tubularnih Arf6⁺ RE. Kako je i izražaj aktiviranih Rab11⁺ tubulovezikula koji su dio ERC također znatno pozitivan na kolesterol, izgleda da je i Rab11 odjeljak, kao i Rab5 endosomi, također smješten nizvodno od Arf6⁺ EEa.

1.2.2.3. Retencijski odjeljci

Retencijski odjeljci podrazumijevaju klasične i neklasične endosomalne odjeljke u kojima se molekule zadržavaju dulje vrijeme nego što je to uobičajeno, a često predstavljaju «usko grlo» u njezinom unutarstaničnom prijenosu.

Jedan od mehanizama retencije proteina u organelama je sprječavanje njihovog ugrađivanja u prijenosne vezikule koje pupaju iz odjeljka. Ovaj mehanizam se naziva «**statičkim**» **retencijskim procesom** u kojem su molekule fizički spriječene da napuste odjeljak. Ova inhibicija se može postići: vezivanjem proteina za citoskelet, stvaranjem proteinskih agregata koji su preveliki da uđu u prijenosne vezikule, te koncentriranjem proteina u vezikule koje sporo pupaju iz odjeljka (10, 114).

Drugi mehanizam kojim bi se uzrokovala retencija molekula u nekom odjeljku se naziva «**dinamički**» **retencijski proces**, a u njemu se retencija uglavnom postiže sporim prijenosom iz organele, te brzim vraćanjem proteina koji su uspješni pobjeći iz nje (npr. TGN38, furin) (115, 116).

Neke studije su pokazale da se selektivno vraćanje ovih proteina postiže motivom koji posreduje selektivnom koncentriranju vezikula predodređenih za prijenos u retencijski odjeljak (115).

Reciklirajući retencijski odjeljci / domene

Endosomalni reciklirajući odjeljak (ERC) može poslužiti kao stanica za sortiranje internaliziranih proteina, jednako kao i spremišni rezervoar za regulirano upućivanje proteina prema PM.

Kao što je ranije spomenuto, **GPI-sidreni proteini** koji se internaliziraju u GEEC, te posljedično u ERC, recikliraju se prema staničnoj površini mnogo sporije ($t_{1/2}$ ~30 min), nego klasične komponente koje se nalaze u reciklirajućim membranama – TfR i fluorescentno obilježeni lipidi ($t_{1/2}$ ~8 min) (58, 117). Obzirom da poluvrijeme izlaska GPI-sidrenih proteina (folatni receptor) iz GEEC iznosi ~13 min, a iz ERC ~30 min, vjerojatno je upravo izlazak iz ERC korak koji ograničava stopu recikliranja. Stoga se može zaključiti da se ove molekule *dinamički koncentriraju i zadržavaju* u ERC, u usporedbi s mnogim TM proteinima koji se relativno brzo prenose kroz ovaj odjeljak. Ovaj zaključak je temeljen na činjenici da je spor prijenos iz ERC povezan s učinkovitim vraćanjem molekula s PM (58, 116). Bitno je napomenuti da uklanjanje kolesterola ili sfingolipida kod CHO fibroblasta uzrokuje brže recikliranje GPI-sidrenih proteina, što ukazuje na ulogu lipidnih splavi u samom procesu retencije kod recikliranja (6). Kolesterol i sfingolipidi bi mogli promijeniti veličinu i strukturu GPI-sidrenih proteina, time ukidajući proces lateralne segregacije/sortiranja na membrani. Također je važna činjenica da na stopu recikliranja DAF (također vrsta GPI-AP) ne utječe alkalizacija endosomalnih odjeljka, dok je recikliranje ostalih transmembranskih receptora usporeno (118). Prema tome, GPI-sidreni proteini najvjerojatnije izlaze iz ERC preko drugih vezikularnih/tubularnih nosača, odnosno postoje barem dva različita puta izlaska molekula iz ERC.

S druge strane, već ranije opisani **IRAP**, se također brzo endocitra, ali sporo reciklira iz ERC ($t_{1/2}$ ~30 minuta) (77). Pokazano je da je za *dinamičku retenciju* IRAPa u ERC zadužena sekvenca kiselih aminokiselina, kao i dileucinska sekvenca unutar tog područja (za razliku od statičke retencije koj je posljedica nemogućnosti izlaska molekule iz nekog odjeljka, kod dinamične retencije molekula se zadržava u datom odjeljku usljed stalnog vraćanja molekula koje su eventualno izašle iz njega). Do danas se još ne zna zašto se IRAP koncentrira u GLUT-4 vezikulama u masnim i mišićnim stanicama ili zašto se dinamički zadržava u endosomima fibroblasta.

Postoje dva pretpostavljena *modela za retenciju IRAPa u endosomalnom reciklirajućem odjeljku* (116). Prema prvom modelu, neki adaptinu sličan protein vezuje retencijski signal IRAPa i koncentrira ga u domenama ERC

koje znatnije sporije pupaju iz njega nego transportne vezikule koje prenose reciklirajući TfR (koji se vjerojatno ne isključuje aktivno iz sporih vezikula, već je sposoban ući u brze vezikule). Pretpostavlja se da inzulin stimulira pupanje sporih vezikula. Naime, u fibroblastima (CHO) inzulin 2-3 puta stimulira izlazak GLUT-4 na PM, a u masnim stanicama 5-10x. S druge strane, postoji mogućnost da retencijski motiv posreduje segregaciji IRAPa u posebne domene ERCa koje ne mogu stvarati transportne vezikule, a molekule koje su izbjegle retenciju vraćaju se na staničnu površinu preko vezikula koje sadrže TfR.

Vrlo slično, **GLUT4** se u prisustvu inzulina može naći u ERC odjeljcima koji sadrže i TfR, te slijedi put:

PM → ERC → PM → ERC → PM →

No, u odsustvu inzulina, ili kod njegove male količine, GLUT4 se iz ERC prenosi u **IRC** (engl. *insulin regulated compartment*) koji predstavlja vrstu retencijskog odjeljka, te postaje jednoliko raspoređen između ERC i IRC.

Kasni endosomi kao retencijski odjeljak

Osim što je poznato da se neke molekule mogu zadržavati u ERC, također je opisana i retencija tetraspanina **CD63/Lamp3** u **kasnim endosomima** (119). Naime, većina staničnog CD63 u endotelnim stanicama, odnosno više od 80%, je smješteno unutar složene mreže LBPA pozitivnih unutarnjih membrana kasnih endosoma.

Nadalje, u staničnoj liniji HUVEC (humane endotelne stanice iz pupčane vene), pokazano je da protutijela vezana za molekule CD63 nakon endocitoze dolaze u LE, te kasnije prelaze u tzv. Weibel-Paladeova (WP) tjelešca, ali vrlo sporom kinetikom (nakon 8 sati). Za razliku od CD63, P-selektin se također prenosi u ove odjeljke iz LE, no znatno bržom kinetikom (nakon 2 sata).

protu-**CD63** → EE → LE (**RETENCIJA**):8h → TGN (?) – kratko vrijeme → 8-10h: novonastala WP tjelešca

protu-**P-selectin** → EE → LE (brz izlazak):2h → TGN (?) – kratko vrijeme → 2h: novonastala WP tjelešca

Prema tome, u kasnim endosomima bi postojao retencijski mehanizam koji bi bio selektivan za ovaj tetraspanin, a koji je vjerojatno posljedica smještaja molekule CD63 unutar LE. Nakon toga CD63 se reciklira, odnosno spaja sa sekretornim putem.

Ranije je pokazano da se materijal iz unutarnjih membrana kasnih endosoma može **degradirati**, primjerice EGFR (120) i glukozilceramid (121). Međutim, obzirom da su internalne membrane LE vrlo bogate molekulom LBPA (122), koja se zbog svoje jedinstvene stereokonfiguracije vrlo slabo degradira (123), malo je vjerojatno da u tom slučaju dolazi do razgradnje cijelog lipidnog dvosloja.

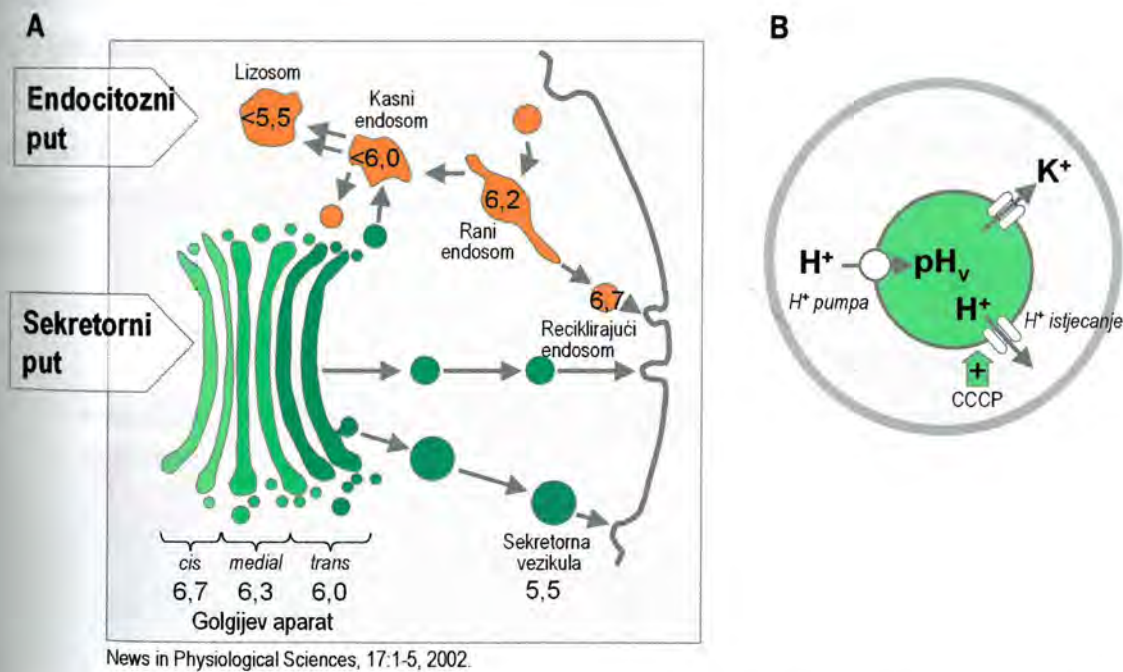
Suprotno tome, neke molekule **kruže** između unutarnjih membrana LE i drugih odjeljaka, primjerice IGF2/MPR između LE i TGN (124), dok se druge iz LE **egzocitiraju**, primjerice MHC-II molekule u antigen-predočnim stanicama (98). Stoga je očito postojanje učinkovitog mehanizma koji regulira kakva će biti sudbina molekule koja se nalazi unutar ovih odjeljaka. Važnu ulogu u tom procesu bi mogla imati upravo LBPA jer je pokazano da njezina imobilizacija i inaktivacija nakon egzogenog dodavanja protu-LBPA protutijela dovodi do nakupljanja kolesterola u LE i onemogućavanja izlaska prisutnih molekula iz njega (94). Moguće je da unutarnje i granične membrane LE međudjeluju na vrlo dinamičan način, vjerojatno preko intraluminalnih procesa fuzije i fizije. Ova

dinamička svojstva bi mogla doprinijeti u kontroli kretanja proteina kroz ovaj odjeljak, uključujući i CD63, a zajedno u kombinaciji sa još neotkrivenim mehanizmom.

Kao posljedica svega gore navedenog, moguće je da upravo smještanje CD63 u domene kasnih endosoma bogate s LBPA doprinosi njegovom zadržavanju i nakupljanju u tom odjeljku. Suprotno tome, P-selektin se ne nalazi samo u unutarnjim već i u graničnim membranama, što je pokazano na megakariocitima jer se u endotelnim stanicama slabo vidi (125), te pokazuje manju sklonost smještanja u membrane bogate s LBPA i ne nakuplja se u kasnim endosomima. Prema tome, domene bogate s LBPA funkcioniraju u retencijskom mehanizmu CD63, a vjerojatno i ostalih molekula, npr. tetraspanina koji se znatno nalaze u unutarnjim membranama kasnih endosoma.

1.2.2.4. Endosomalno zakiseljavanje

Već je ranije bilo govora o tome kako endosomalni pH znatno utječe na međusobno vezivanje receptora i njegovog liganda. U endosomima pH vezikula pada od ranijih endosoma prema kasnijima – najmanje iznosi u lizosomima (4,5-5,0), odnosno opet se povećava tijekom prijenosa iz EE u reciklirajuće vezikule. U sekretornom putu pH počinje opadati od *cis* prema *trans* Golgijevom aparatu, a najmanji je u sekretornim vezikulama (oko 5,5) (slika 9). U ER pH je neutralan, odnosno sličan citoplazmatskom (126-127)



Slika 9: Usporedba pH endocitoznih i sekretornih organela. (A) pH endocitoznih organela kontinuirano pada od ranijih prema kasnijim odjeljcima. U sekretornom putu pH opada od *cis* prema *trans* GA, a najniži je u sekretornim vezikulama. pH ER je neutralan. (B) pH u endosomu je prvenstveno posljedica odnosa njegovog zakiseljavanja djelovanjem vodikove crpke s jedne strane, te gubljenja H^+ iona kroz polupropusne kanale, s druge strane. Određen doprinos daju također i ostali ioni, primjerice K^+ i Cl^- . (prilagođeno prema referenci 66).

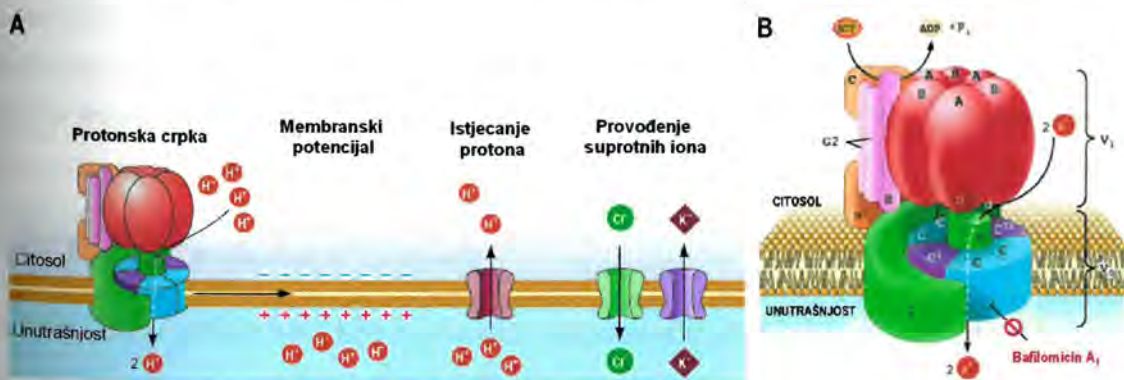
Osim što utječe na međudjelovanje različitih molekula, pH također utječe na spajanje i razdvajanje odjeljaka (fuzija i fizija). Tako je pokazano da povećavanje endosomalnog pH smanjuje ili onemogućuje proces prijenosa spajanja ranih i kasnih endosoma (128), te sposobnost fuzije membrana kasnih endosoma bogatih LBPA (88). Nadalje, kada se izgubi pH gradijent u GA, dolazi do poremećenosti procesa posttranslacijskih modifikacija, kao i prerade sekretornih proteina (129), molekule se krivo usmjeravaju (130), a narušen je i integritet same organele, te dolazi do redistribucije markera (131). U konačnici, sortiranje i proteolitičko sazrijevanje prohormona u sekretornim granulama također strogo ovisi o pH, te zahtijeva kisele odjeljke (132).

1.2.2.4.1. Mehanizmi postizanja pH staničnih organela

Već smo naveli da se različiti odjeljci mogu razlikovati u vrijednosti pH. Međutim, postavlja se pitanje načina na koji se to postiže, odnosno mehanizma regulacije vrijednosti pH u određenim staničnim organelama. Na konačni pH odjeljka djeluje više faktora, a najvažniji su: djelovanje vakuolarne H^+ ATPaze (V-ATPaza), učinak izlaska H^+ (OH^- , HCO_3^-) iona iz odjeljka u citosol, te učinak membranskog potencijala i prijenosa suprotnih iona. (slika 9b).

Vakuolarna ATPaza

Djelovanje vakuolarne H^+ ATPaze (slika 10) predstavlja primarni, i vjerojatno jedini način na koji H^+ ioni mogu ući u određeni odjeljak (67). Nalazi se u velikom broju staničnih organela sekretornog i endocitoznog puta (osim u ER) i u gotovo svim vrstama stanica (66). Vakuolarna H^+ ATPaza je složen proteinski kompleks koji se sastoji od velikog broja podjedinica, odnosno od dvije domene: *domena* V_0 , integralni membranski kompleks pet podjedinica koji posreduje prijenosu protona te *domena* V_1 , periferni kompleks od osam različitih vrsta podjedinica zadužen za pretvaranje energije, nastale kao posljedica hidrolize ATP, u mehaničku silu koja je potrebna za prijenos protona.



Slika 10: Mehanizmi stvaranja pH staničnih organela. (A) Prkazani su različiti mehanizmi koji određuju vrijednost pH organela. Protonska crpka stvara transmembranski potencijal (pozitivan u unutrašnjosti), čija veličina je obrnuto proporcionalna provodljivosti membrane za suprotne ione. Provodljivosti za suprotne ione omogućava crpki stvaranje protonskog koncentracijskog gradijenta suprotnog električnom potencijalu. Sposobnosti crpke da stvara protonski gradijent (iznutra pozitivan) suprotstavlja se istjecanje protona u suprotnom smjeru. (B) Prikazana je V-ATPaza i mjesto djelovanja bafilomicina A_1 (67).

Obzirom da su sve V-ATPaze u stanici najvjerojatnije iste, postavlja se pitanje što utječe na različit pH u odjeljcima. Smatra se da osnovni razlog leži upravo u razlici u gustoći ovog proteina u membrani različitih staničnih odjeljaka. Usto, smatra se da aktivnost protonske pumpe može biti regulirana preko procesa asocijacije i disocijacije ovih domena. Jedan od načina na koji se vrši ova regulacije je nazočnost glukoze i aktivacije PI(3) kinaze (133).

Iako prema termodinamičkim mjerenjima najniži pH koji uzrokuje V ATPaza iznosi do pH 3.0, činjenica je da je on u organelama uglavnom znatno viši, što ukazuje na postojanje ostalih faktora koji onemogućuju postizanje ove termodinamičke ravnoteže.

Istjecanje H⁺ iona

Usprkos postojanju električnog gradijenta, zbog stalnog prijenosa suprotnih iona (vidi kasnije) membranski potencijal nije velik, pa se čini da je kemijski koncentracijski gradijent H⁺ osnovna sila koja uzrokuje tendenciju izlaska vodikovih iona iz kiselih odjeljaka. Točan mehanizam koji omogućuje ovo istjecanje H⁺ iona nije do kraja razjašnjen. Naime, ispitivane su moguće uloge različitih kationskih i anionskih izmjenjivača (Na⁺/H⁺, Ca²⁺/H⁺, Cl⁻/OH⁻/HCO₃⁻), ali značajniji uspjesi nisu postignuti (66).

Membranski potencijal i utjecaj ostalih iona

Zbog djelovanja V-ATPaze i ulaska pozitivnih vodikovih iona stvara se električni potencijal duž membrane organele (pozitivnost prema unutrašnjosti). On djeluje antagonistički daljnjem ulasku H⁺ iona i potiče njihov izlazak. Osim izlaska H⁺ iona, aktivnost protonske crpke utječe i na prijenos ostalih iona, time da će kationi (npr. K⁺) pokazivati sklonost izlasku iz odjeljka, dok će anioni (npr. Cl⁻) pokazivati sklonost ulasku u odjeljak. Tako će gubitak Cl⁻ iona uzrokovati rasipanje pH gradijenta i alkalizaciju odjeljaka, dok njihov ulazak potiče acidifikaciju. (66). Stoga je istraživanje vrsta i utjecaja kanala koji prenose ove ione predmet velikog zanimanja.

Ipak, pokazano je da u sekretornom putu *pH prvenstveno ovisi o brojnosti V-ATPaze u membrani odjeljka te propusnost za ione H⁺*. Tako je u GA najveća gustoća protonske crpke na njegovom *trans* kraju (povećavajući se i u sekretornim vezikulama), dok je najveća propusnost za H⁺ ione na *cis* kraju (127). No, u konačnici je, uz broj, bitna i V-ATPazna aktivnost koja se može regulirati, kao što je ranije navedeno.

1.2.2.4.2. Postupci narušavanja pH gradijenta

Nasuprot djelovanju svih gore navedenih regulacijskih mehanizama, u nekim uvjetima može doći do narušavanja pH gradijenta. Kočenjem normalnog odvijanja prethodno navedenih procesa, pH kiselih endosomalnih odjeljaka uglavnom se izjednačava s citoplazmatskim pH (slika 11). Većina istraživača nastoji navedene procese zakočiti inhibicijom V-ATPaze, povećanjem istjecanja H⁺ iona ili djelovanjem na ostale ione.

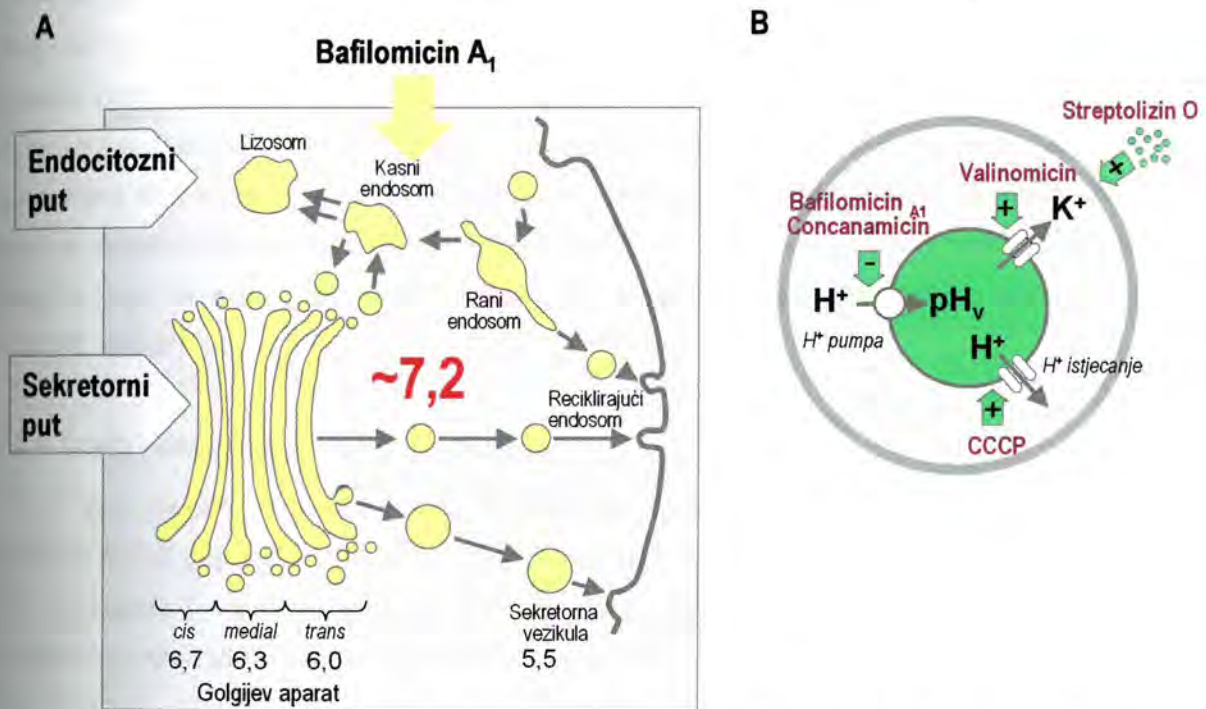
Inhibicija V-ATPaze

Najpoznatiji inhibitori V-ATPaze su makrolidni antibiotici – **bafilomicin A₁** i **konkanamicin A**. Oni inaktiviraju njezinu transmembransku V_o domenu podjedinice c na koju se vezuje H⁺ (134, 135, 136). Time onemogućuju

normalno funkcioniranje cijelog kompleksa zbog čega dolazi do izlaženja protona dok se ne postigne ravnoteža i alkalizacije odjeljka, odnosno izjednačavanja s citosolnim pH.

Djelovanje na prijenos ostalih iona

Protonofore, tvari koji povećavaju propusnost za H^+ ione (CCCP, carbony-cyanide-*m*-chlorophenylhydrazon), izazivaju vrlo brzu alkalizaciju odjeljka (čak nakon 3min), bez obzira na aktivnost V-ATPaze (66). S druge strane, zamjetno je njihovo djelovanje i na druge ione. Iako se očekivalo da će poticanje istjecanja kalijevih iona **valinomicinom** uzrokovati dodatan izlazak pozitivnih iona i smanjenje pH odjeljka, učinak na promjenu pH u GA nije uočen. To ukazuje da rad protonске crpke nije ograničen propusnošću membrane za suprotne ione te da je endogena propusnost za K^+ ione razmjerno visoka (66).



Slika 11: Alkalizacija endosomalnih odjeljaka. Alkalizacija endosomalnih odjeljaka se može postići inhibicijom V-ATPaze, djelovanjem na istjecanje i prijenos H^+ , te ostalih kationa i aniona (prilagođeno prema referenci 66).

Jedan od često korištenih inhibitora je **monenzin**, ionofora koja potiče aktivnost izmjenjivača za katione i H^+ (Na^+/H^+ izmjenjivača), te tako izbacuje Na^+ i ubacuje H^+ u stanični odjeljak. Na^+/H^+ izmjenjivač je alosterički reguliran djelovanjem vodikovog iona, tako što mu je aktivnost najmanja oko pH «osnovne točke», koja je bliska vrijednosti pH u ustaljenom stanju («steady state»), a mehanizam ove regulacije se pripisuje inhibicijskom djelovanju protonacije alosteričkog mjesta na aktivnost crpke (ovaj mehanizam regulacije inače ne vrijedi za V-ATPazu). Djelovanjem monenzina izjednačava se pH staničnih odjeljaka s izvanstaničnim pH. Obzirom da je on u normalnim okolnostima neutralan, posljedično dolazi do alkalizacije odjeljaka (137)

Propusnost membrane se, isto tako, može povećati djelovanjem **streptolizina O** što utječe na ionsko stanje i ATP aktivnost, a posljedično i na pH vrijednost.

Svi će ovi učinci imati će utjecaja na prijenos i sortiranje proteina, kako onih koji se nalaze u sekretornom, tako i onih koji se nalaze u endocitoznom putu, najčešće uzrokujući njihov zastoј tijekom prolaska kroz inače kisele odjeljke. Iako to može djelovati samo na ispitivani protein, često se učinak očituje na razini cijele stanice, što nerijetko dovodi i do njezine smrti.

1.3. MHC MOLEKULE I RAZREDA

Nakon ulaska u stanicu domaćina, virusi, bakterije, te njihovi produkti su pronašli mnoge načine kako bi izbjegli izravan dodir sa imunološkim odgovorom organizma. Ipak, kako bi ukazale na nazočnost stranih organizama, stanice na svojoj površini predočavaju njihove peptide u sklopu MHC molekula I i II razreda (molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti; engl. *major histocompatibility complex*) u procesu koji se naziva antigensko procesiranje i predočavanje. Postoje dva osnovna načina predočavanja stranih proteina. MHC molekule II razreda (MHC-II molekule) predočavaju egzogene, uglavnom endocitirane peptidne dijelove, a nalaze se na antigen predočnim stanicama koje aktiviraju imunološki sustav, prvenstveno pomagačke limfocite T. S druge strane, MHC molekule I razreda predočavaju endogeno nastale peptide, a kada su oni stranog porijekla to je signal citotoksičnim limfocitima T za ubijanje takve stanice. Ove molekule su izražene na svim stanicama koje posjeduju jezgru i omogućuju imunološkom sustavu prepoznavanje i uništavanje prvenstveno virusom zaraženih i tumorskih stanica (138).

1.3.1. Građa i sinteza MHC molekula I razreda

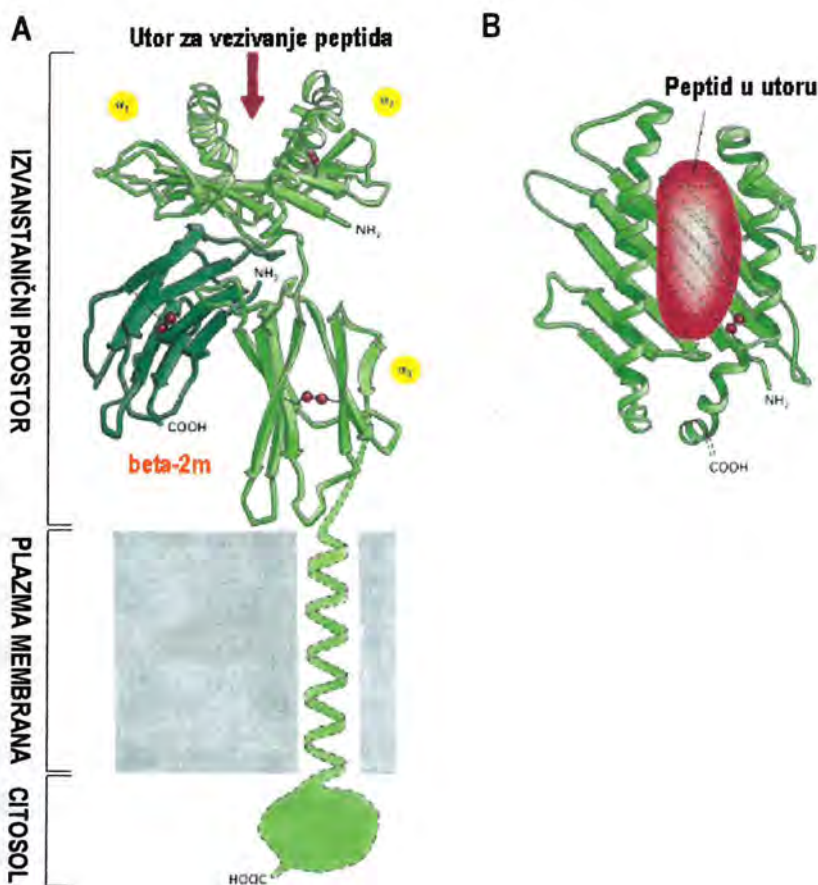
MHC molekule I razreda (MHC-I molekule) su polimorfni površinski glikoproteini. Njihov stupanj ekspresije na PM se prilagođava imunološkom odgovoru. Tako primjerice interferon gama (IFN γ), kojeg izlučuju aktivirani limfociti T, te interferon beta (IFN β), kojeg izlučuju stanice zaražene virusom, uzrokuju povećanje površinskog izražaja MHC-I molekula, kako sistemski, tako i lokalno (139).

1.3.1.1. Građa MHC-I molekula

MHC-I molekule normalno su izražene kao trimolekularni kompleksi (slika 12), a sastoje se od glikoziliranog transmembranskog **teškog lanca** (45 kDa) na koji su nekovalentno vezani **β_2 -mikroglobulin** (12 kDa) i kratki **peptid** od 8 do 10 aminokiselina (138).

Teški lanac sastoji se od tri domene (α_1 - α_3) od oko 90 aminokiselina, jednog hidrofobnog transmembranskog segmenta i kratkog citoplazmatskog repa od oko 30-40 aminokiselina. Domene α_1 i α_2 sadrže dvije α -uzvojnice postavljene na plohi od 8 nabranih β -ploča, stvarajući utor za vezivanje peptida s džepovima u koje se smještaju odgovarajući aminokiselinski postranični lanci (sidreni izdanci). Ovi džepovi se između različitih alela razlikuju prema dubini i kemijskim osobinama, a u skladu s time i određuju skupine peptida koje se mogu vezati za određene alele. Peptidi koji se povezuju s *humanim MHC molekulama I razreda* imaju hidrofoban ili bazičan sidreni dio koji se nalazi na C-terminalnom dijelu aminokiseline (140). Sve tri izvanstanične domene su u dodiru s

β_2 -mikroglobulinom (β_2 -m), a većina antigenskih determinanti se nalazi u α_1 i α_2 domenama (141). U primjeru mišjih MHC molekula I razreda, svi do danas obrađeni peptidi imaju hidrofobni postranični lanac na C-kraju. Prema tome, selektivnost peptidne translokacije preko TAP kompleksa se odražava i vezivanjem peptida na MHC molekulu I razreda, obzirom na C-terminalni dio. Peptid postaje integralni dio strukture MHC molekule i igra važnu ulogu u sastavljanju, stabilnosti, i prijenosu MHC molekula I razreda (142).

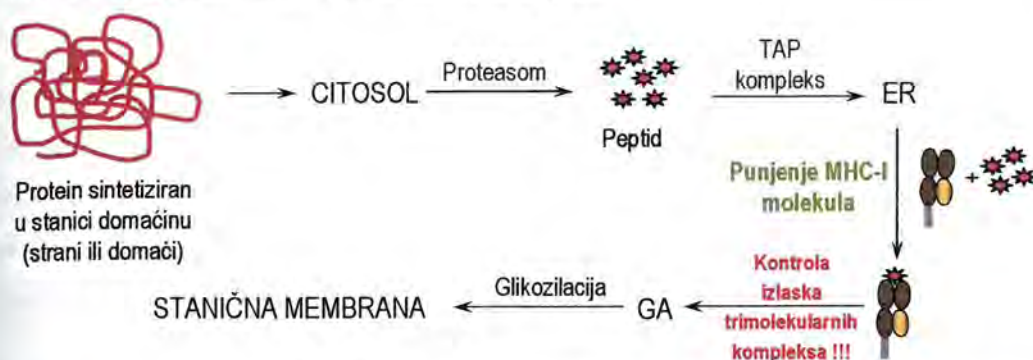


Slika 12: Građa MHC-I molekule. (A) Pogled sa strane: MHC-I molekula je trimolekularan kompleks koji se sastoji od teškog lanca za koji su nekovalentno vezani β_2 -m i 8-10 aminokiselina dugačak peptid. (B) Pogled odozgo: Peptid se vezuje u utor kojeg omeđuje α_1 i α_2 domena, dok se na dnu nalazi nabrana β -ploča. Aminokiseline u utoru određuju koji se peptidi mogu vezati za određenu MHC-I molekulu (143).

1.3.1.2. Sinteza MHC-I molekula

MHC-I molekule se sklapaju u ER i uglavnom predočavaju peptide endogenog porijekla. Oni su prvenstveno nastaju iz citosolnih i jezgrinih proteina djelovanjem proteasoma (slika 13), multikatalitičkog proteinaznog kompleksa, te se potom prenose u endoplazmatsku mrežicu pomoću proteinskog kompleksa TAP (engl. *transporter associated with antigen processing*). U endoplazmatskoj mrežici se, uz pomoć *chaperonskih* proteina, stvara stabilan trimolekularan kompleks koji se sastoji od teškog lanca MHC-I molekule (HC, engl.

heavy chain), β_2 -mikroglobulina (β_2 -m) i peptida. Trimolekularni kompleks napušta endoplazmatsku mrežicu i konstitutivnim sekretornim putem dolazi do stanične površine (142).



Slika 13: Klasičan mehanizam sinteze MHC molekule I razreda. MHC-I molekule se sintetiziraju u ER, gdje se susreću s endogenim peptidom koji je nastao nakon razgradnje stranog ili domaćeg proteina na citosolnim proteasomima. Nakon djelovanja chaperonskih proteina stvaraju se trimolekularni kompleksi koji nakon kontrole izlaska ulaze u GA, a nakon toga dolaze na staničnu površinu (prilagođeno prema referencama 145-153).

Iako postoji velika varijabilnost između MHC-I molekula (poznato je nekoliko stotina različitih alela) osnovni mehanizam njihove sinteze je konzerviran, a čak je sličan i između različitih vrsta (144).

Peptidi koji se vežu na MHC-I molekule nastaju degradacijom poliubikvitiniliranih proteina na proteasomima. Biokemijskim i biofizičkim metodama pokazano je da se relativno veliki udio proteina degradira u peptide ubrzo nakon translacije, a tu su uključeni i virusni proteini (145, 146). Ovaj udio obuhvaća više od 30% svih sintetiziranih proteina (145), a u nekim slučajevima može doseći vrijednost i od 80% (146). Ipak, zbog velike aktivnosti peptidaza, kao i zbog drugih uvjeta, od 10^4 degradiranih proteina, samo se jedan peptid u konačnici veže za MHC-I molekulu (147).

Nakon razgradnje na proteasomima, peptidi se prenose u ER pomoću TAP kompleksa. TAP sa svoje dvije podjedinice, TAP1 i TAP2, izgrađuje u membrani ER poru kroz koju se odvija prijenos peptida iz citosola u unutrašnjost cisterni endoplazmatske mrežice. Osim veličine peptida (najučinkovitije se prenose peptidi veličine 8-16 aminokiselina), važan je i slijed aminokiselina u peptidu, posebice C-terminalne aminokiseline te pravilna orijentacija postraničnih peptidnih lanaca (142).

Kada peptidi uđu u ER, tamo ih čekaju podjedinice MHC-I molekula – teški lanac i β_2 -m. U tom ranom razdoblju, dok još nisu vezani s peptidom, stabilizaciji MHC-I molekula pomaže mekoliko *chaperonskih proteina*. Teški lanac se još tijekom sinteze povezuje s *kalneksinom*, koji vjerojatno ima ulogu u njihovom zadržavanju u ER, svijanju, te stvaranju disulfidnih mostova i poticanju vezivanja s β_2 -m (148). Potom nastaje kompleks koji se sastoji od teškog lanca, β_2 -m, ERp57, kalretikulina, tapasina i TAP kompleksa. *Tapasin* je još jedna *chaperonska* molekula, a posjeduje neovisna vezna mjesta za prazne MHC molekule I razreda (α_2 i α_3 domene), kao i za TAP (149), te između njih stvara fizičku vezu. Takvim koncentriranjem MHC-I molekula uz TAP kompleks povećava se vjerojatnost da će peptid susresti praznu MHC molekulu, te zadržava nepotpuno sklopljene MHC-I molekula u

endoplazmatskoj mrežici. Nadalje, vezivanjem α domene teškoga lanca, tapasin održava mjesto za vezanje peptida prazne MHC-I molekule u nestabilnoj, "otvorenoj" konformaciji (150). Osim toga, smatra se da bi mogao imati ključnu ulogu u stabilizaciji i transformaciji praznih MHC-I molekula u stanje koje vezuje peptid (151, 152).

Nakon vezivanja peptida dolazi do promjene konformacije MHC-I molekule. Posljedično se otpušta tapasin, kao i ostali dijelovi kompleksa. U pravilu, samo stabilno konformirane trimolekularne MHC-I molekule otpuštaju se iz endoplazmatske mrežice, te se preko GA (gdje se dovršava N-vezana glikozilacija) i sekretornih vezikula prenose do stanične površine gdje mogu predočiti antigenski peptid (slika 13). Suprotno tome, nepotpuno sklopljeni kompleksi se translokacijom prenose u citoplazmu i degradiraju u proteasomima (153).

1.3.2. Konformacije MHC-I molekula

U prethodnom odjeljku je navedeno da se MHC-I molekule na staničnoj površini izražavaju samo kao stabilni molekularni kompleksi teškog lanca, β_2 -m i endogeno nastalog peptida. Međutim, pokazano je da se na PM nekih stanica mogu izražavati i nepravilno konformirane, odnosno prazne MHC-I molekule (slika 14). O mogućim mehanizmima njihovog nastanka još uvijek se dosta toga ne zna, iako postoje neke pretpostavke.

1.3.2.1. Konformirane MHC-I molekule

Malo prije opisani stabilni trimolekularni kompleksi MHC-I molekula su konformirane molekule (slika 14), koje prepoznaju citotoksični limfociti T (CTL). Ipak, i konformirane MHC-I molekule međusobno pokazuju neke razlike koje se primarno očituju u poluživotu i kinetici dolaska na plazmatsku membranu. Razlike mogu postojati kako među lokusima, tako i između različitih alela istog lokusa.

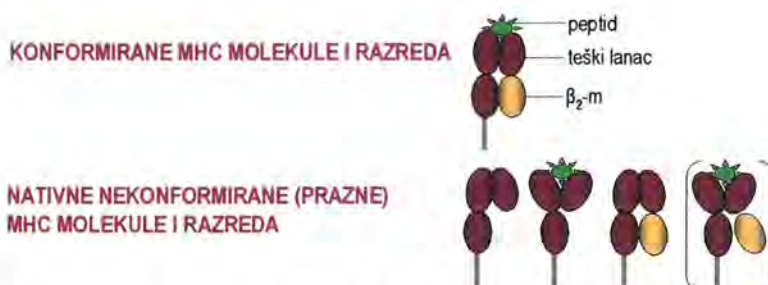
Teške lance *MHC molekula I razreda u ljudi* kodiraju geni na 6. kromosomu raspoređeni u osnovna tri lokusa: HLA -A, -B i -C. HLA lokusi su viskoko polimorfni, te postoji više od 80 alela za HLA-A, 180 za HLA-B i 40 za HLA-C (154). *Mišje MHC molekule I razreda* kodirane su na 17. kromosomu na lokusima H-2K, -D i -L, a najpoznatiji haplotipovi su -d, -k, -b i -q. Primjerice, haplotip **H-2^d**, koji se prisutan u miševa soja BALB/c, sadrži tri vrste MHC molekula I razreda označene kao K^d, D^d i L^d, koje djeluju kao klasični transplantacijski antigeni (144).

Tablica 1. Obilježja nekih mišjih MHC molekula I razreda (155).

	H-2K ^b	H-2D ^b	H-2L ^d
Broj aminokislinskih ostataka u dodiru s β_2 -m	17	23	12
Broj van der Waalsovih dodira	17	24	7
Broj vodikovih veza	7	13	10
Stupanj ($t_{1/2}$) unutarstaničnog prijenosa	~ 1h	~ 1h	~ 4h
Relativno površinsko izražavanje	1	1	$\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{4}$

Stanice izražavaju više alelnih oblika MHC-I molekula koje se međusobno razlikuju obzirom na stopu sinteze, unutarstanične raspodjele i stabilnosti na staničnoj površini. Poluživot na staničnoj površini je prvenstveno određen stabilnošću trimolekularnog kompleksa. Tako su primjerice mišje molekule K^b i D^b znatno stabilnije nego molekule L^d. Naime, treba im znatno kraće vrijeme za dolazak do PM na kojoj se dulje i zadržavaju. S druge

strane, nestabilnije, iako konformirane, molekule L^d dolaze na staničnu površinu znatno sporije, a na kojoj se zadržavaju kraće vrijeme, što smo i pokazali u ranijem radu (156, 157, 158). Nestabilnost L^d kompleksa može biti posljedica njegove strukture, te se slabijeg povezivanja s β_2 -m i peptidom (158). Najvjerojatnije, upravo uslijed te nestabilnosti, molekule L^d mogu na staničnu površinu dospjeti kao nekonformirane molekule, o čemu će biti govora u narednom odjeljku.



Slika 14: Oblici MHC-I molekula na staničnoj površini. MHC-I molekule se na staničnoj membrani mogu izražavati kao jedan oblik konformiranih, odnosno četiri oblika nekonformiranih molekula (prilagođeno prema podacima iz referenci 155, 156, 159, 160).

1.3.2.2. Nekonformirane MHC-I molekule

Nekonformirani oblici MHC-I molekula normalno se pojavljuju dva puta tijekom njihova životnog vijeka: na početku, prije nego što se u ER stvori trimolekularni kompleks, te na kraju, neposredno prije degradacije u lizosomima.

Mnogi autori vjeruju da se nekonformirane MHC-I molekule ne izražavaju na staničnoj površini. Naime, čak i ako do nje dođu, za razliku od konformiranih molekula koje imaju dugo vrijeme poluživota (12h, pa i >24h), vrlo se brzo degradiraju ili pune peptidom koji se nalazi u njihovom okolišu, mehanizmom o kojem će biti govora kasnije (142, 155). Ipak, ako su prisutne, nekonformirane MHC-I molekule se na PM mogu izražavati u nekoliko različitih oblika (slika 14): kao nestabilni kompleks teškog lanca, β_2 -m i peptida vezanog slabim afinitetom, kao teški lanac vezan samo s β_2 -m ili samo s peptidom, odnosno isključivo kao teški lanac (155, 156, 159, 160, 161). Pokazano je da je oko 10% molekula D^b na staničnoj površini izraženo kao bi-molekularni kompleks teškog lanca i β_2 -m (161). Obzirom da heterodimer (teški lanac s β_2 -m ili peptidom) predstavlja izuzetno kratkoživući oblik, kada se govori o nekonformiranim molekulama najčešće se govori o praznoj konformaciji, te se ova dva pojma često koriste kao sinonimi.

Još nije jasno da li se svi MHC-I aleli na površini stanice mogu naći u svim navedenim oblicima. Jedino se molekule D^b i L^d mogu na površini detektirati kao slobodni teški lanci u stanicama koje ne izražavaju β_2 -m, čak i nakon tretmana IFN γ (162). Zanimljivo je da ovi slobodni teški lanci molekula D^b mogu uzrokovati imunološku reakciju (163). Moguće je da one na površini ipak imaju vezan peptid, obzirom da je unutarstanični prijenos u β_2 -m^{-/-} stanicama povećan u nazočnosti funkcionalnog TAP-1 gena. Međutim, ovakve molekule neće biti stabilne na staničnoj površini. Naime, stabilnost MHC-I molekula je kontrolirana alosteričkim mehanizmom (164). Općenito, samo je trimolekularni kompleks koji ima vezan visokoafinitetni peptid stabilan, dok otpuštanje peptida

posljedično smanjuje afinitet teškog lanca za $\beta_2\text{-m}$, jednako kao što i otpuštanje $\beta_2\text{-m}$ uzrokuje slabljenje jakosti veze između teškog lanca i peptida za nekoliko redova veličine. Time se dramatično smanjuje poluživot heterodimera na samo nekoliko minuta ili manje (164, 165).

Molekule L^d

Kao što je ranije opisano, molekule L^d se ubrajaju u nestabilnije alele proteina MHC-I (tablica 1). Teški lanci molekula L^d razmjerno se slabo povezuju s peptidom i $\beta_2\text{-m}$ (155, 156). Utor za vezivanje antigena u molekuli L^d mnogo je plići i hidrofobniji u usporedbi s ostalim MHC-I molekulama (156). To, kao i vrlo slabi dodiri između α_1/α_2 domena i $\beta_2\text{-m}$, uzrokuje njihovo nedovoljno punjenje peptidom u endoplazmatskoj mrežici (167), sporiji unutarstanični prijenos (166), sklonost izmjenjivanju peptida na staničnoj površini (164) i 2-5 puta manju površinsku izraženost nego u drugih klasičnih MHC-I molekula (155, 166). Obzirom da je unutarstanični mehanizam sklapanja teškog lanca MHC-I molekula s $\beta_2\text{-m}$ i peptidom izuzetno međuovisan, teško je odrediti da li je primaran uzrok slabom izražaju MHC-I molekula njegovo slabo vezivanje s $\beta_2\text{-m}$, peptidom ili oboje. U svakom slučaju, stvara se nestabilan kompleks koji relativno lako disocira i za posljedicu ima pojavu nekonformiranih molekula (156, 164, 166, 167, 168), koje su znatno češće zastupljene nego kod drugih alela, a na staničnoj površini se izražavaju još kraće vrijeme nego konformirane molekule L^d (158, 169). Prema tome postoje dvije alternativne konformacije: otvorena, koju prepoznaje protutijelo 64-3-7 i druga, pravilno svijena s vezanim peptidom, koju prepoznaju ostala protutijela, primjerice protutijelo 30-5-7 (170). O specifičnosti vezivanja određenih monoklonskih protutijela na nekonformirane molekule bit će govora kasnije u okviru opisivanja modela za njihovo prepoznavanje i praćenje.

Ostale nekonformirane MHC-I molekule

Ranije je napomenuto da u nekim slučajevima nekonformirane MHC-I molekule ipak mogu doći do stanične površine, ali su nestabilne te se brzo uklanjaju i razgrađuju. Zbog toga su stabilnije na temperaturama od 23-31°C nego na 37°C, a struktura im se stabilizira nakon vezivanja peptida što je povezano s konformacijskom promjenom. Egzogeno dodane peptide vezuju mnogo učinkovitije nego potpuno konformirane («pune») molekule. Nadalje, poznato je da ponekad vezuju ista protutijela koja prepoznaju MHC molekule I razreda potpune konformacije.

TAP-2 deficijentne **stanice RMA-S** ne mogu stvarati funkcionalne TAP heterodimere i time ne mogu učinkovito dovesti peptide u endoplazmatsku mrežicu (171, 172). Stoga se u endoplazmatskoj mrežici teški lanci molekula K^b i D^b samo djelomično svijaju i nekovalentno povezuju s $\beta_2\text{-m}$, vjerojatno uz pomoć proteina kalneksina. Molekule koje u ovakvim stanicama uspiju napustiti endoplazmatsku mrežicu i doputovati do stanične površine, uslijed nazočnosti stabilizirajućeg protutijela, specifičnog peptida (NP 365-380) ili niže temperature (26°C), stabiliziraju se, te se mogu naći u Golgijevu aparatu, *trans*-Golgijevoj mreži i na plazmatskoj membrani, iako u puno manjoj zastupljenosti nego potpuni trimolekularni kompleksi (173, 174). Iako se pretpostavljalo da su ove molekule prazne i bez konstitutivno pridruženog peptida (172), kasniji rezultati su počeli ukazivati da ove

molekule na staničnu površinu dolaze s vezanim peptidom koji bi se otpuštao pri 37°C zbog niskog afiniteta. MHC molekula bez peptida je kratkoživuća na 37°C i samo prolazno sposobna da veže egzogeni peptid (175).

Osim toga, istraživanja na *RIE.D^b*, $\beta_2\text{-m}^{-/-}$ staničnoj liniji transficiranoj s genom *D^b* pod snažnim virusnim promotorom, pokazala su da se površinske molekule *D^b* izražavaju i u tim stanicama, ali ne postizu potpunu konformaciju (163).

Osim mišjih, i humane nekonformirane MHC-I molekule (HLA-I) se također mogu izražavati na staničnoj površini. Tako je pokazano da se na nekim staničnim linijama na površini mogu naći molekule HLA-Cw6, HLA-B27, HLA-E, a ponekad i HLA-G (160, 176, 177). Zanimljivo je da se molekula HLA-B27 može naći kao kompleks samo teškog lanca i peptida (160).

Nekonformirane MHC-I molekule na staničnoj površini, i to vrlo često one koje se nalaze u obliku slobodnih teških lanaca, pokazuju sklonost nakupljanju i povezivanju (178), a pokazano je da stvaranje ovih MHC-I kompleksa ima svrhu kako bi i nekonformirane molekule bile prepoznate od strane citotoksičnih limfocita T (179). Ovo bi povezalo prisustvo nepravilno svijenih (*misfolded*) MHC-I molekula s njihovom ulogom u kontroli aktivacije citotoksičnih limfocita T.

Nastanak nekonformiranih MHC-I molekula je proces koji nije u potpunosti razjašnjen, a pretpostavlja se da mogu nastati kako tijekom biosintetskog puta izbjegavanjem kontrole na izlasku iz ER, tako i u endocitoznom putu raspadom pravilno svijenih, u procesu koji će kasnije detaljnije biti opisan. Biokemijskom analizom je pokazano da su ove molekule na površini izražene kao potpuno glikozilirane zrele molekule, koje su fosforilirane na tirozinima i posjeduju kinaznu aktivnost (180).

1.3.2.3. Korištenje monoklonskih protutijela kao model za ispitivanje različitih konformacija MHC-I molekula

Već je dugo vremena poznato da je povezanost teškog lanca s $\beta_2\text{-m}$ potrebna osim za prijenos MHC-I molekula prema staničnoj površini tako i u određivanju antigenskog profila ovih trimolekularnih kompleksa koji se razlikuju od antigenskog profila teškog lanca koji nema vezanu $\beta_2\text{-m}$ molekulu i/ili peptid (153, 166, 167). Stoga, uz nekoliko izuzetaka, protutijela koja reagiraju s konformiranim molekulama MHC-I neće reagirati s nekonformiranim i obrnuto. Većina toga što se zna o strukturi praznih MHC-I molekula potječe od rezultata dobivenih korištenjem monoklonskih protutijela koja specifično prepoznaju konfirmaciju u kojoj ligand nije vezan.

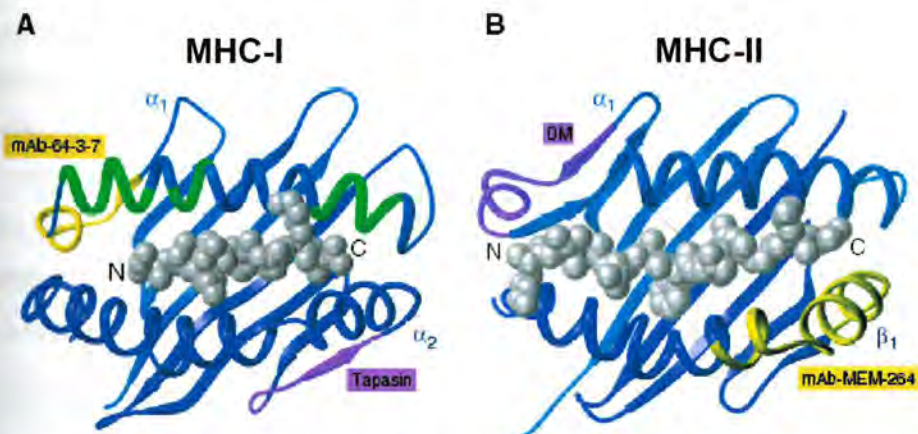
Za prepoznavanje molekula L^d koriste se sljedeća protutijela:

- **28-14-8S** – prepoznaje α_3 domenu molekula L^d i L^q konformiranih i nekonformiranih molekula (170);
- **30-5-7** – prepoznaje α_2 domenu konformiranih molekula L^d (170);
- **B22/249** - prepoznaje α_1 domenu konformiranih molekula L^d i L^q , iako ovo protutijelo prepoznaje i molekule D^b (181)
- **64-3-7** - prepoznaje α_1 domenu nekonformiranih molekula L^d i L^q (170)

Jedno od najbolje istraženih i korištenih protutijela je **64-3-7** koje prepoznaje **nekonformirane molekule L^d** (170). Upravo su studije dobivene korištenjem tog protutijela dovele do zaključka da se konformacijska promjena događa nakon vezivanja peptida na MHC-I molekulu i obrnuto (182). Tako je u pokusima *in vitro* pokazano da u staničnim lizatima 64-3-7 specifično prepoznaje molekule L^d kada peptid nije dodan. Suprotno tome, nakon dodavanja visokoafinitetnog peptida novonastalu konformaciju više ne prepoznaje mPt 64-3-7, već od mPt 30-5-7 koje prepoznaje samo stabilnu konformaciju (183).

Monoklonsko protutijelo 64-3-7 prvenstveno prepoznaje *linearni epitop* unutar kojeg je pokazano da su ključne aminokiseline Q48, P50 i W51 (slika 15a). Inače su aminokiselinski ostaci 46-52 visokokonzervirani između mišjih i humanih MHC-I molekula, ali upravo je povezivanje Q48 i P50 jedinstveno svojstvo molekula L^d i jedini još alel koji u normalnim okolnostima može biti 64-3-7⁺ je L^q, inače najbliži alelu L^d (182). Inače ovo područje molekule može djelovati kao zglob kada se veže peptid, te tako otkriva specifičnu orijentaciju aminokiselinskih postraničnih lanaca koji se pokazuju kada teški lanac nije povezan s peptidom (182, 183).

Nadalje, bitno je spomenuti da 64-3-7 epitop nije sterički blokiran peptidom, a vezivanje β_2 -m za teški lanac ne sprječava njegovo međudjelovanje s ovim protutijelom. Međutim, sekvence uključene u prepoznavanje od strane 64-3-7 uključene su u konformacijsku promjenu kad se veže visokoafinitetni peptid (182). Činjenice da se ovaj epitop može mutagenезom prenijeti i na ostale MHC-I molekule, te da je trodimenzionalna struktura ovog područja visokokonzervirana između različitih vrsta teških lanaca, ukazuju da se sve MHC-I molekule podvrgavaju sličnoj konformacijskoj promjeni nakon vezivanja visokoafinitetnih peptida (182).



Slika 15: Usporedba struktura MHC-I (A) i MHC-II (B) molekula, te mjesta vezivanja odgovarajućih mPt koji prepoznaju prazne konformacije. Na slici su prikazana mjesta koja prepoznaju odgovarajuća mPt koja međudjeluju s «otvorenim» konformacijama. Također su vidljiva i mjesta koja međudjeluju s odgovarajućim *chaperonima* (tapasin za MHC-I i DM za MEM-264). α_1 domena je na oba dijagrama prikazana u svijetloplavoj boji, dok su domene α_2 i β_1 prikazane tamnoplavo. Peptid je prikazan sivo. Žuto obojen segment na slici A je sekvenca 46-54 koju prepoznaju mPt 64-3-7 i KU1. Krećući se u smjeru kazaljke na satu duž α_1 domene prikazuju se epitopi za mPt: HC10 (57-62), LA45 (62-63), L31 (66-68) i HCa (77-84). Ljubičasti segment na slici A predstavlja vezujuće mjesto za tapasin (128-136). Na slici B, žutim su prikazana vezujuća mjesta za mPt MEM-264 a ljubičasto vezujuća mjesta za chaperon HLA-DM (183).

Transformacija epitopom 64-3-7 je također korištena kako bi se mogla pratiti učinkovitost punjenja MHC-I molekula peptidom, potreba za pomoćnim molekulama, te izraženost nekonformiranih molekula na staničnoj površini. Tako su molekule K^d , K^b i HLA-B27 s ubačenim 64-3-7 epitopom praćene nakon ubacivanja u stanice koje jesu ili nisu izražavale tapasin (184). Bitno je spomenuti da se određene MHC-I molekule znatno razlikuju prema zastupljenosti molekula s "otvorenom" konformacijom na svojoj površini. Tako je primjerice oko 40% molekula L^d površinski izraženo u nekonformiranom obliku, a nekonformiranih molekula K^d i HLA-B27 manje od 10%. Uočeno je da se nazočnosti tapasina površinski izražava 2-3 puta manje nekonformiranih molekula u usporedbi kada se tapasin ne izražava. Prema tome tapasin je molekula koja olakšava vezivanje peptida, čak i za MHC-I molekulu kao što je HLA-B27 za koju je pokazano da je relativno neovisna o tapasinu (185).

Ostala protutijela koja prepoznaju nekonformirane MHC-I molekule

Kao i mPt 64-3-7, ostala protutijela koja se vežu za otvorenu konformaciju prepoznaju linearnu sekvencu. Zanimljivo je da se ona nalazi u α_1 domeni, protežući se od mjesta 64-3-7 epitopa. Preciznije rečeno, mAb **KU1**, prepoznaje aminokiselinske ostatke 49-54 (186), koji se preklapaju s ostacima 46-52 koje prepoznaje mPt 64-3-7 (184). Ovo protutijelo je dobiveno nakon imuniziranja stanica denaturiranim molekulama K^b koje su se izražavaju u bakterijama, dok je mPt 64-3-7 dobiveno nakon imuniziranja stanicama (185). Činjenica da 64-3-7 i KU1 prepoznaju slične epitope podupire zapažanje da ostaci 46-54 tvore zglobno područje na koje utječe vezivanje peptida. Stoga vezivanje KU1, jednako kao i 64-3-7, nije uzrokovano gubitkom steričke smetnje koju bi uzrokovao peptid ili β_2 -m, već ovo protutijelo prepoznaje konformacijsku promjenu molekule.

Monoklonska protutijela koja prepoznaju nekonformirane humane MHC-I molekule prepoznaju linearni epitop smješten u helikalnom području neposredno iznad epitopa kojeg prepoznaju protutijela 64-3-7 i KU1. Protutijelo **HC-10** proizvedeno je na denaturiran topivi lanac HLA-B (188), mPt **HCA2** proizvedeno je na denaturiran topivi lanac HLA-A (189), mPt **L-31** proizvedeno je na toplinski-inaktivirane čestice HIVa iz zaraženih stanica i prepoznaje teški lanac bez vezanog peptida (190), mPt **L-45** proizveden je nakon imunizacije HUT102 stanicama (191), mPt **MEM/G01** prepoznaje nekonformirane molekule HLA-G (177) a mPt **MEM/E02** prepoznaje nekonformirane molekule HLA-E (177).

Monoklonsko protutijelo **HC-10** je jedno od najčešće korištenih mišjih protutijela koje prepoznaje isključivo nekonformirane molekule HLA-I za koje nije vezan β_2 -m. Vezivanje β_2 -m s HLA-I ne djeluje izravno na vezivanje HC-10 protutijela jer su antigenske determinante za ova dva vezivanja prostorno udaljene. Ovo djelomično objašnjava činjenicu da se HC-10 može vezati i za teški lanac slabo povezan s β_2 -m. Prema tome, smatra se da je vezivanje ovog protutijela posljedica konformacijske promjene. Međutim, postoje i pretpostavke da bi nemogućnost prepoznavanja „otvorene“ konformacije moglo biti posljedica maskiranja epitopa vezivanjem peptida (183).

Na kraju, potrebno je navesti da, uz protutijela koja prepoznaju nekonformirane MHC-I molekule, postoje i protutijela koja prepoznaju nekonformirane MHC-II molekule. Tako primjerice, mPt **MEM-264**, **-265** i **-276**, prepoznaju nekonformirane molekule **DR1** koje nemaju vezan peptid, dok one molekule s vezanim peptidom ne

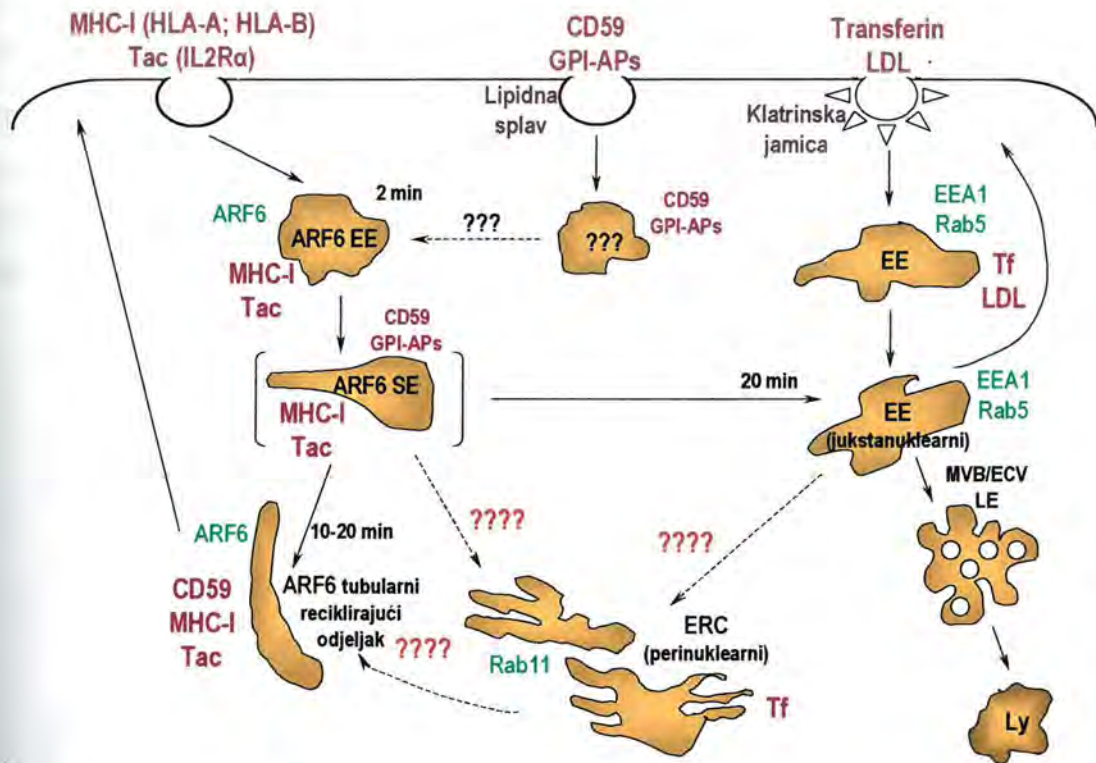
prepoznaju (slika 15b). Ovo mjesto se nalazi u β_1 domeni (192). Nadalje, još ranije su proizvedena protutijela **KL295** i **KL304** koja prepoznaju određene alele nekonformiranih mišjih i humanih MHC-II molekula bez vezanog peptida (192).

1.3.3. Endocitoza MHC-I molekula

Iako se već duže vremena zna da se MHC-I molekule mogu endocitirati (52, 53, 193-197), te da njihov citoplazmatski rep ima važnu ulogu tijekom odvijanja ovog procesa (198), signal za njihovo sortiranje još uvijek nije dobro razjašnjen. Nadalje, pokazano je da neke stanice pokazuju veću sklonost internaliziranju svojih MHC-I molekula, dok su druge dosta inertne. Tako je, primjerice, objavljeno da fibroblasti svoje MHC-I molekule internaliziraju tek nakon snažnog unakrsnog vezivanja pomoću multivalentnih liganada (54). Slično tome, brza i djelomična internalizacija ovih molekula je opisana nakon vezivanja odgovarajućih mPt na površinu aktiviranih limfocita T (199), stanica mastocitoma P815 (198), te monocita, ali ne i monocitnih tumorskih stanica (196). U nekim slučajevima, endocitoza MHC-I molekula nije uočena na limfocitima B i na L fibroblastima (195, 199), dok je s druge strane pokazana na B limfoblastoidnoj staničnoj liniji A46 transformiranoj s EBV, jednako kao i na staničnoj liniji 721 221 proizvedenoj iz limfocita B (193). Mi smo u našim ranijim ispitivanjima (200) pratili *konstitutivnu endocitozu konformiranih i nekonformiranih mišjih H-2^d molekula* na više staničnih linija (mastocitomu P815, fibroblastima Balb 3T3, te staničnoj liniji fibroblasta L-L^d (L fibroblasti H-2^k haplotipa transficirani s genom za izražavanje molekula L^d). Koristeći dva različita pristupa (inhibiciju sinteze proteina djelovanjem cikloheksimida, te praćenje internaliziranih molekula nakon vezivanja odgovarajućeg mPt) ustanovili smo da se različiti aleli internaliziraju različitom kinetikom koja prvenstveno ovisi o njihovoj stabilnosti koja se tiče ne samo alelne specifičnosti, već i konformacije (157, 158).

Također je i opisano da se većina endocitiranih MHC-I molekula reciklira na staničnu površinu, a samo manji dio se usmjerava u degradaciju (193, 197, 201).

Iako se u nekim ranijim radovima govori da se MHC-I molekule internaliziraju mehanizmom klatrinske endocitoze (196, 199), a samo iznimno kaveolarno, i to nakon snažnog unakrsnog vezivanja protutijelima (54), noviji radovi ukazuju da se konformirane MHC-I molekule, jednako kao i Tac (IL-2R α) internaliziraju tzv. **masovnom (bulk) endocitozom**, neovisnom o klatrinu, dinaminu i lipidnim splavima (52, 53). Međutim, uklanjanje kolesterola ipak može narušiti njihovu internalizaciju (52). Nakon ulaska u stanicu, MHC-I se spaja s kolesterol-bogatim vezikulama u kojima se nalaze molekule čiji je ulazak ovisan o lipidnim splavima (CD59, GPI-sidreni proteini). Zajedno s njima ulazi u Arf6⁺ tubularne strukture (imaju manje kolesterola) koje sadrže zamjetne količine PIP₂. One vjerojatno imaju ulogu sortiranja, te se iz njih molekule mogu usmjeriti prema EEA1-pozitivnim ranim endosomima, te tako postati dio glavnog (klatrinskog) endocitoznog puta, a nakon toga se mogu degradirati. S druge strane, mogu se usmjeriti u ranije opisan Arf6⁺ reciklirajući odjeljak (odjeljak 1.2.2.2.3.), te prema staničnoj membrani. Postoji također i mogućnost da iz sortirajućih Arf6⁺ endosoma mogu prijeći u klasičan jukstanuklearan ERC (Tf⁺ i Rab11⁺), te se također na taj način reciklirati (71, 52, 53). Endocitozni put konformiranih molekula HLA prikazan je na slici 16.



Slika 16: Usporedba endocitoznog puta MHC-I molekula s markerima ostalih endocitoznih putova i odjeljaka. Iako se endocitiraju načinom koji je neovisan o klatrinu, lipidnim splavima i dinaminu, MHC-I molekule mogu se spojiti s glavnim endocitoznim putem, iako jedan dio slijedi put Arf6 pozitivnih vezikula. Dodatno objašnjenje je u tekstu (prilagođeno prema referencama 52 i 53)

1.3.4. Alternativni načini nastanka konformiranih MHC-I molekula

Iako većina MHC molekula I razreda predočava endogene antigene, na način kako je ranije opisano, postoji također i mogućnost predočavanja egzogenog antigena, a u tom procesu prvenstveno sudjeluju APC (antigen-predočne stanice). Pretpostavlja se da je u **makrofazima** (makro)pinocitoza glavni put predočavanja egzogenog peptida MHC-I molekulama (202, 203), dok endocitoza posredovana receptorom pretpostavlja predočavanje istog peptida MHC-II molekulama (203). No, kod **nezrelih dendritičnih stanica** i pinocitozni materijal može se predočavati MHC-II molekulama (204). **Dendritične stanice** antigen internaliziran preko FcγR mogu predočavati i MHC-I i MHC-II molekulama, ali im je za prvi način potrebno više vremena (205). U istom pokusu **limfociti B** nisu pokazali sposobnost alternativnog načina predočavanja MHC-I molekulama (205).

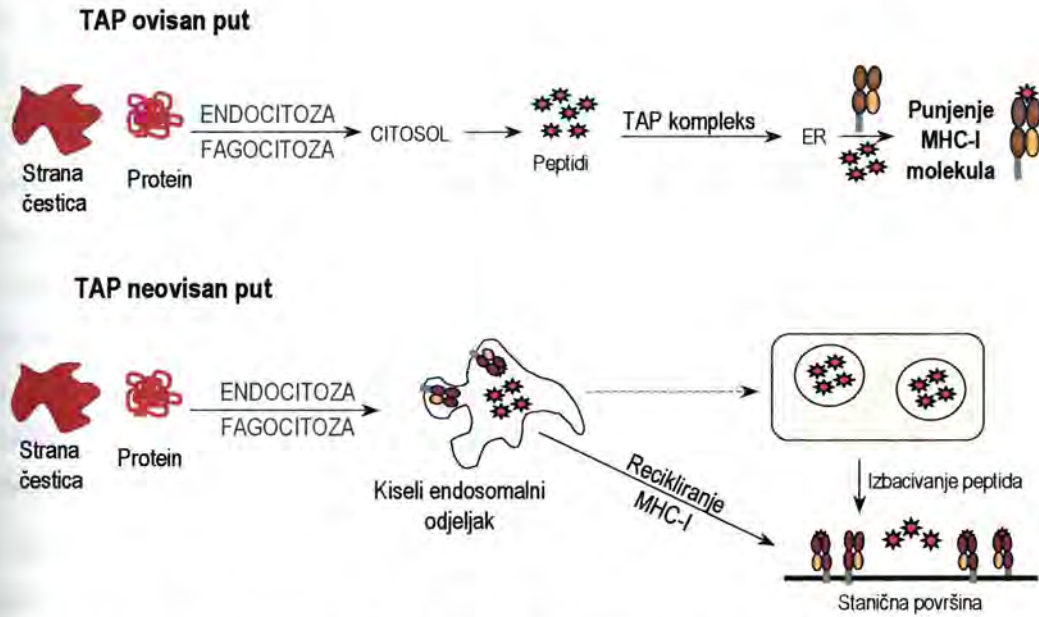
Razlikuju se dva osnovna puta predočavanja egzogenog peptida MHC-I molekulama (slika 17): put ovisan o TAP kompleksu te put neovisan o TAP kompleksu.

Put ovisan o TAP-kompleksu

Ovaj put slijede oni egzogeni peptidi koji ne nastaju u endosomnim/lizosomnim odjeljcima, a za njihov nastanak potrebna je aktivnost TAP-kompleksa i proteasoma. Stoga se pretpostavlja da nedirnuti odlomci peptida ili

fagocitirani egzogeni antigeni dospijevaju u citosol, degradiraju se na proteasomima, te ulaze u ER i nastavljaju klasični put stvaranja zrelih MHC-I molekula (206, 207).

Različite tvari iz endosomalnih i fagosomalnih odjeljaka mogu prijeći u citosol bez narušavanja integriteta membrane odjeljka (208), ali i kao posljedica prevelike fagocitoze i gubitka integriteta membrane fagolizosoma (209). Suprotno nespecifičnom načinu, neke vrste antigena mogu biti dostavljene izravno u citosol i izazvati CTL odgovor, primjerice bakterijski toksini koji razaraju membranu (210), te fuzogeni virusi (211).



Slika 17: Alternativni načini stvaranja MHC-I molekula. MHC-I molekule alternativno mogu nastati na TAP-ovisan način, gdje egzogeni peptid puni nosivac novostetizirane MHC-I molekule, odnosno na TAP neovisan način u kojem egzogeni peptid puni «stare» MHC-I molekule (prilagođeno prema 142).

Put neovisan o TAP-kompleksu

Obzirom da lizosomotropne tvari sprječavaju ovakav način predočavanja (211, 212, 213) smatra se da ovaj put najvjerojatnije uključuje preradu antigena u endosomskim ili fagosomskim odjeljcima. Postoji više načina ovakvog predočavanja egzogenog antigena.

Jedan način je preko izbacivanja (*regurgitacije*) peptida, nastalog u endosomskim odjeljcima, u izvanvanstaničnu tekućinu, koji se potom na staničnoj površini istih ili susjednih stanica može ponovo vezati na MHC molekule I razreda (214, 215, 216), bilo iz razloga što su one prazne ili zbog toga što na sebi imaju peptide vezane slabim afinitetom. Ovaj proces je značajan za *makrofage* koji fagocitiraju komplekse, primjerice HbsAg agregate (168), ili su stimulirani IFN γ i inficirani *S. typhimurium* (217).

Drugi način je punjenje MHC-I molekula unutar endosomskih odjeljaka. Novostetizirane MHC-I molekule mogu dospjeti u ove odjeljke izravnim prijenosom iz endoplazmatske mrežice (218), procesom koji bi mogao uključivati povezivanje s invarijantnim lancem (219).

Jednako tako, MHC-I molekule mogu biti prisutne u endosomskim odjeljcima nakon njihove internalizacije sa stanične površine (186, 194, 201). Pretpostavlja se da se pri niskom pH peptidi otpuštaju sa MHC-I kompleksa dopuštajući izmjenu s drugim peptidima prisutnim u endosomima (196), što je potvrđeno i pokusima *in vitro* (201). Prema tome, kada se doda egzogeni peptid, peptidi koji su prethodno vezani niskim afinitetom podvrgavaju se peptidnoj izmjeni u visokom stupnju i obrnuto (164, 220, 221). Ovaj put koristi druge proteaze nego one korištene u klasičnom putu. Stoga je u predočavanju egzogenih antigena važno recikliranje MHC-I molekula (222, 223).

Jedno od pitanja koje se postavlja je mehanizam vezivanja peptida, odnosno β_2 -m, za teški lanac MHC-I molekula. Naime, poznato je da tijekom klasičnog puta u tom procesu vrlo važnu ulogu imaju razne *chaperonske* molekule koje djeluju prvenstveno u ER, a one su najvjerojatnije odsutne tijekom ovih alternativnih načina, osobito TAP neovisnih.

Smatra se da se vezivanje β_2 -m na teški lanac najvjerojatnije događa u procesu izmjene (164). Tom procesu bi bile podložnije MHC-I molekule koje inače vezuju β_2 -m slabijim afinitetom, primjerice molekule L^d, ali niti drugi aleli ne mogu biti isključeni. Nadalje, i sama uloga β_2 -m u procesu vezivanja peptida nije u potpunosti jasna. Tako neki autori smatraju da vezivanje egzogenog β_2 -m oslobađa vezno mjesto za β_2 -m na teškom lancu i omogućava peptidnu izmjenu. No, ispitivanjem kompleksa molekula K^b i peptida u bezstaničnom sustavu pokazano je da se peptidna izmjena može događati bez prisustva egzogenog β_2 -m, te da se ovaj proces događa u rasponu pH: 5,5-7,5 koji inače vlada u velikom broju endosomalnih odjeljaka, ali i na staničnoj površini (224).

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

Iz ovoga slijedi da je u ovom procesu alternativnog predočavanja važna uloga nekonformiranih (praznih) MHC-I molekula, primjerice molekula L^d. Neki smatraju da se upravo one, nakon internalizacije, u endosomalnim odjeljcima pune egzogenim peptidom koji najčešće potječe iz potpuno konformiranih MHC molekula I razreda (168, 225), a potreba za egzogenim β_2 -m bi mogla ovisiti o izvoru egzogenog peptida. Tako bi on bio potreban u slučaju alternativnog predočavanja čestice, ali ne i peptida (226). Na kraju, razumijevanje mehanizma alternativnog predočavanja igra vrlo važnu ulogu u razvijanju novih mogućnosti stvaranja cjepiva koja bi bila usmjerena u aktivaciju imunološkog odgovora preko CTL.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U ovom nam je radu prvenstveni cilj bio uspostaviti *model za izučavanje sortiranja i smještanja staničnih glikoproteina* (prvenstveno MHC molekula I razreda), ali i ostalih molekula, kako u membranske mikrodomene, tako i u funkcionalne domene endocitoznih odjeljaka, te ustanoviti kako *konformacija molekule utječe na taj proces*. Proučavane su bile native konformirane i nekonformirane molekule (koje se izražavaju u normalnim uvjetima), te nepravilno konformirane molekule nastale djelovanjem kiselog pH (*misfolded* molekule).

U skladu s tim, željeli smo utvrditi zadžava li se smještaj u membranskoj mikrodomeni na staničnoj površini i unutar stanice nakon endocitoze, te utječe li promjena konformacije na premještanje molekule u drugu mikrodomenu u bilo kojoj točki endocitoznog puta, odnosno ima li utjecaj na konačnu sudbinu endocitirane molekule.

Nadalje, cilj nam je bio rasvjetljavanje puta internalizacije molekula. Prije svega, nastojali smo utvrditi vrstu i način endocitoze te MHC molekule I razreda (K^d , D^d i L^d) i usporediti ga s putem transferinskog receptora (TfR), koji započinje klatrinskom endocitozom (28, 32), kao i putem kojim ulazi B podjedinica toksina-kolere, kao primjer molekule koja u stanicu ulazi endocitozom ovisnoj o lipidnim splavima (39, 41). Osim toga, nastojali smo utvrditi ovisi li endocitozni put pojedine molekule o konformaciji (konformirane i nekonformirane molekule). Osnovnu pozornost posvetili smo ispitivanju usmjeravanja molekula na trima glavnim mjestima gdje se molekule sortiraju tijekom svog endocitoznog puta: plazmatskoj membrani (31, 33), ranim endosomima (32) i kasnim endosomima (32, 62). S tim ciljem smo i odlučili uspostaviti modele praćenja internalizacije ispitivanih molekula nakon površinskog vezivanja protutijela, te njihove kolokalizacije s markerima staničnih odjeljaka.

Pored toga, također smo željeli ispitati kako su konformirane i nekonformirane molekule normalno smještene u određenim staničnim organelama i endosomalnim odjeljcima, te, na kraju, istražiti mogućnost prelaska nestabilne konformacije MHC molekula I razreda u stabilnu, odnosno mogućnost i mehanizam alternativnog načina antigenškog predočavanja.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. LABORATORIJSKE ŽIVOTINJE

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

3.2. MATERIJAL

3.2.1. Kemikalije

Ammonij klorid (NH₄Cl), Kemika 0137 407

Bafilomycin A₁, Sigma, B-1793

methyl – β– cyclodextrin, Sigma, C 4555

Biotin/Streptavidin-POD kit za blotiranje, blokiranje i kemiluminiscenciju, Roche, 1 559 097

Brefeldin A, Sigma, B-7651

Brij 96, Fluka, 16011

Brij 98, Aldrich, 436 240

CHAPS, Sigma, C-3023

Chlorpromazine hydrochloride (2-Chloro-10-(3dimethylaminopropyl)phenothiazine hydrochloride), Sigma, C-0982

Concanamycin A, Sigma, C-9075

Cycloheximide, Sigma, C-6255

Cytochalasin D, Sigma, C8273

DABCO (1,4-Diazabicyclo [2.2.2.] octane, Triethylenediamine), Sigma, D-2522

DAMP, Molecular Probes, P02/07-1-0080

Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck, 2931

EDTA (Ethylendiaminetetraacetat-Na₂-salt), Serva, 11280

Fetal calf serum, Gibco, 011-06290M

Fiksir, Paul-Trade Matulji

Filipin III (iz *Streptomyces filipinensis*), Sigma, F-4767

Glicerol, Kemika, 0111901

Hepes, Serva, 25245

Kloridna kiselina, Kemika, 1 824 301

Kodak Biomax film, Amersham, 25-0098-21

Latrunculin A, Sigma, L-5163

Leupeptin, Sigma, L-9783

L-Glutamin, Merck, 289

LY294002, Sigma, L-9908

rIFN-gamma, rekombinantni mišji IFN- γ , Bender Wien M3-RD48
Magnesium chlorid, $MgCl_2 \times H_2O$, Merck 5831
Markeri – proteinski plavi za SDS-PAGE, Sigma, P-1677
MEM (Minimal Essential Medium), Gibco, 041-01090
Metanol, Kemika, 1 308 901
Monensin (Monensin sodium salt), Sigma, M-5273
Mowiol 4-88, Fluka, #81381
Natrij-dihidrogenfosfat-2-hidrat, $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$, Kemika
di-Natrij-hidrogenfosfat-12-hidrat, $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$, Kemika
Natrij-hidroksid, NaOH, Kemika
Natrij-klorid, NaCl, Kemika
Nocodasol, Sigma M-1404
Nonidet P-40 (NP-40), Sigma, N-6507
Nystatin dihydrate, Sigma, N-4014
Paraformaldehid, Sigma, P-6148
Pacitaxel, semisynthetic, Sigma, T-7191
Penicilin; Grunenthal, Stolberg, 113944
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), Sigma, P7626
Pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane), Sigma, T-7640
Propidium iodide, Serva, 33671
Protein A sepharose, Amersham, 17-0780-01
PVDF membrana za western blot, Roche, 3010040
Razvijač, Paul-Trade Matulji
RPMI 1640 medium, Gibco, 074-01800
Sodium azide, NaN_3 , Difco, 0601-13
Sodium vanadate, Sigma, S-6383
Streptavidin-fluorescein, Boehringer Mannheim, 1 055 097
Streptomycin sulphate, Merck, 10117
Sulfo NHS-LC-Biotin, Pierce, 21 335
SuperSignal West Pico supstrat za kemiluminiscenciju, Pierce, 34080
Tris-Hydroxymethyl-aminomethan, Boehringer Mannheim, 708976
Tween-20 (polyoxyethylene-sorbitan monolaureat), Sigma, P-1379
Tripansko modriilo, Serva, 37252
Tripsin, Gibco
Triton X-100, Rohm&Haas NEF936
Tween 20, Sigma, P1379
Western blocking reagens, Roche, 1 921 673

3.2.2. Mediji i puferi

Bikarbonatni pufer

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

Kompletan RPMI 1640 medij

(medij za uzgoj hibridomskih linija)

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

Kompletan MEM medij

(medij za uzgoj mišjih embrionalnih fibroblasta)

Medij MEM, 2 mM L-glutamin, 1×10^5 U/L penicilin, 0,1 g/L streptomycin-sulfat, 0,05 g/L gentamicin-sulfat, i 3% fetalni goveđi serum (FCS).

Kompletan D-MEM medij

(medij za uzgoj imortaliziranih linija)

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

PBS (fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom)

140 mM natrijev klorid (NaCl), 2,7 mM kalijev klorid (KCl), 6,5 mM natrij-hidrogenfosfat-2-hidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), 1,5 mM kalij-dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), 0,7 mM kalcij-klorid (CaCl_2) i 0,7 mM magnezij-klorid-6-hidrat ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$).

Medij za FACS (medij za imunofluorescenciju protočnim citometrom)

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

Medij za smrzavanje stanica

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

Otopina za razaranje eritrocita

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

Otopina za razaranje stanica

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

Otopina za ispiranje (imunoprecipitacija)

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

Otopina za denaturaciju

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

Paraformaldehid

40g/L Paraformaldehid, 16,833 g/L natrijev dihidrogen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), 3,85 g/L natrijev hidroksid (NaOH), glukoza (5,4 g/L)

Pufer za biotinizaciju

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

Otopina za zaustavljanje biotinizacije (biotinylation stop solution)

Amonijev klorid (NH_4Cl) 50mM

Otopina za liziranje biotinom obilježenih staničnih proteina

50mM natrijev borat, 150 mM natrijev klorid (NaCl), 0,1 mg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 1% NP-40

Uklopno sredstvo za fluorescentne mikroskopske preparate (Mowiol)

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

Transfer pufer za western blotting (prema Towbinu)

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

TBS

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

TTBS

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

3.2.3. Laboratorijsko posude

Ploče za kulturu tkiva s 6 rupica, Greiner

Ploče za kulturu tkiva s 24 rupice, Greiner

Ploče za kulturu tkiva s 48 rupica, Costar

Ploče za kulturu tkiva s 96 rupica, Greiner

Ploče za ELISA s 96 rupica, Goliass

Bočice (flasks) za kulturu tkiva od 50 i 250 ml, Greiner

Petrijeve posude za uzgoj tkiva, Greiner

Ploče za neadherentne kulture s 12 rupica, Greiner 150 200

3.2.4. Monoklonska i poliklonska protutijela

3.2.4.1. Protutijela koja prepoznaju određene konformacije MHC-I molekula

- Protu -D^d (klon 34-5-8S) mišje IgG_{2a} protutijelo
 Protu -D^d (klon 34-2-12s) mišje IgG_{2a} protutijelo
 Protu -K^d (klon MA-215) mišje IgG_{2b} protutijelo
 Protu -K^d (klon SF-1.1.1.) mišje IgG_{2a} protutijelo
 Protu -L^d (α₂) (klon 30-5-7) mišje IgG_{2a} protutijelo
 Protu -L^d (α₃) (klon 28-14 8S) mišje IgG_{2a} protutijelo
 Protu -L^d (α₂) (klon 64-4-7) mišje IgG_{2b} protutijelo

Tablica 2: Monoklonska protutijela protiv MHC-I molekula.

	KONFORMIRANE (PUNE)	NATIVNE NEKONFORMIRANE (PRAZNE)	PUNE I PRAZNE MOLEKULE	NEPRAVILNO SVIJENE (MISFOLDED)
MOLEKULE K ^d	MA-215 SF-1.1.1	-	-	-
MOLEKULE D ^d	34-5-8-S 34-2-12S	(34-2-12S) ?	34-2-12S	34-2-12S
MOLEKULE L ^d	30-5-7 28-14-8S	28-14-8S 64-3-7	28-14-8S	64-3-7

KONFORMIRANE (PUNE)
MHC-I MOLEKULE



MOLEKULE K^d
MOLEKULE D^d
MOLEKULE L^d

NATIVNE NEKONFORMIRANE
(PRAZNE) MHC-I MOLEKULE



MOLEKULE L^d
(MOLEKULE D^d)

Slika 18. Ispitivani i oblici konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula.

3.2.4.2. Markeri endocitoznih puteva

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

3.2.4.3. Markeri endocitoznih odjeljaka

- Caveolin Cy3, poliklonsko kuničje protutijelo, Sigma, C-3990
 Protu caveolin-1, mišje IgG₁ protutijelo, Transduction Laboratories, 610406

Protu EEA1, poliklonsko pileće protutijelo, Zymed, 40-5700
 Protu Rab11, poliklonsko kunićje protutijelo, Zymed, 71-5300
 Protu Lamp1, štakorsko IgG_{2a} protutijelo, Pharmingen, 55792
 Protu LBPA, mišje IgG₁ protutijelo (klon 6C4, mišje IgG₁ protutijelo, dobijeno od Jean Gruenberga)
 Protu GM130, mišje IgG₁ protutijelo, Transduction Laboratories, 610823
 Protu Vti1a, mišje IgG₁ protutijelo, Transduction Laboratories, 611 220
 Protu kalretikulini, mišje IgG₁ protutijelo, Transduction Laboratories 612136
 Phalloidin – Alexa 488, Molecular Probes, A12379
 Protu α-tubulin, mišje IgG₁ protutijelo, ExBio, 11-250-C100
 Streptavidin Alexa 488, Molecular Probes, S11223

3.2.4.4. Sekundarna poliklonska protutijela

Protu-mišji Ig, kozje protutijelo konjugirano FITC, Becton-Dickinson Pharmingen, 394031
 Protu-mišji IgG₁ Alexa 488, Molecular Probes, A21121
 Protu-mišji IgG₁ Alexa 555, Molecular Probes, A21127
 Protu-mišji IgG_{2a} Alexa 488, Molecular Probes, A21131
 Protu-mišji IgG_{2a} Alexa 555, Molecular Probes, A21137
 Protu-mišji IgG_{2b} Alexa 488, Molecular Probes, A21141
 Protu-mišji IgG_{2b} Alexa 555, Molecular Probes, A21147
 Protu-štakorski IgG Alexa 488, Molecular Probes, A11006
 Protu-štakorski IgG Alexa 555, Molecular Probes, A21434
 Protu-pileći IgG Alexa 488, Molecular Probes, A11039
 Protu-pileći IgG Alexa 555, Molecular Probes, A213477
 Protu dinytrophenyl-KLH Alexa 488, Molecular Probes, 45274A

3.2.5. Stanične linije

Ispitivanje su vršena na tri stanične linije koje na svojoj površini, te u unutrašnjosti izražavaju različite konformacije molekula H-2^d (tablica 3).

Tablica 3: Površinski izražaj MHC-I molekula na ispitivanim staničnim linijama.

STANIČNE LINIJE	KONFORMIRANE (PUNE) MOLEKULE K ^d	KONFORMIRANE (PUNE) MOLEKULE D ^d	KONFORMIRANE (PUNE) MOLEKULE L ^d	NEKONFORMIRANE (PRAZNE) MOLEKULE L ^d
P815 (mišji mastocitom)	+	+	+	+
Balb 3T3 (mišji fibroblasti)	+	+	+/-	(+)*
L-L^d (mišji fibroblasti transficirani genom za Ld)	-	-	+	+

* Izražava se samo uz dodatak IFN γ

3.3. METODE

3.3.1. Priprema monoklonskih protutijela

3.3.1.1. Održavanje hibridoma

Hibridomske linije koje luče monoklonska protutijela uzgajane su u kompletnom RPMI mediju na 37°C uz 5% CO₂ u plastičnim bočicama za uzgoj tkiva. Dugoročno su pohranjene u tekućem dušiku (-180°C), zamrznute u mediju za smrzavanje.

3.3.1.2. Priprema monoklonskih protutijela iz supernatanta kulture

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

3.3.1.3. Proizvodnja ascitesa

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

3.3.2. Uzgoj staničnih linija

3.3.2.1. Uzgoj adherentnih stanica

Adherentne stanice (fibroblasti) uzgajane su u plastičnim Petrijevim posudama s medijem D-MEM, pri temperaturi od 37°C i uz 5% CO₂. Fibroblasti su stanice sklone prijanjanju za plastiku, te nakon nekoliko dana (3-5) uzgoja, stanice prekriju dno Petrijeve posude pa se mogu prebaciti u nove, gdje se uzgajanje nastavlja do željene gustoće.

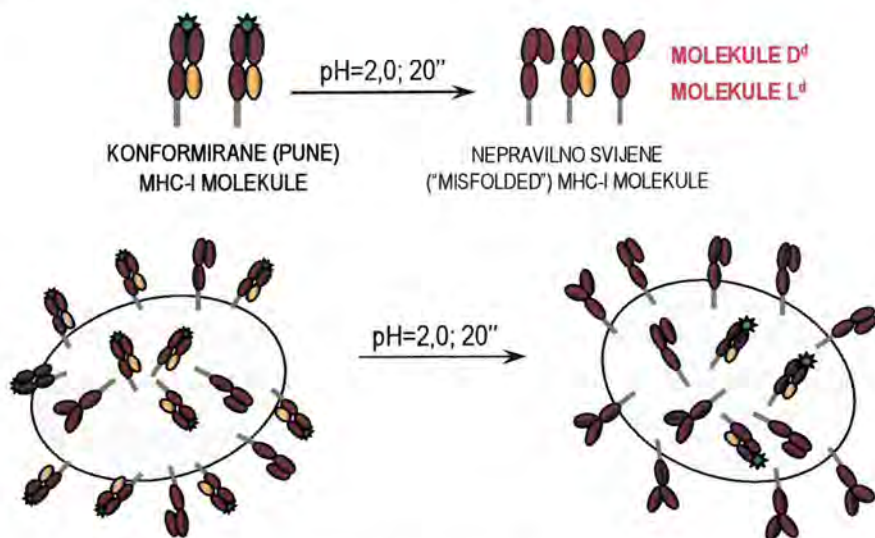
3.3.2.2. Uzgoj neadherentnih stanica

Neadherentne stanice (P815 stanice mastocitoma i stanice hibridoma) uzgajane su u mediju RPMI 1640, u plastičnim bočicama pri temperaturi od 37°C i uz 5% CO₂. Neadherentne stanice slobodno plivaju u mediju i nakon nekoliko dana (1-3) uzgoja, mogu se prebaciti u nove bočice, gdje se uzgajanje nastavlja do željene gustoće.

3.3.2.3. Umjetno stvaranje "misfolded" konformacije MHC-I molekula na staničnoj površini

Adherentne stanice (Balb 3T3) su kratkotrajno (20-30 sekundi) izložene kiselom pH (2,0), 2 puta isprane u PBSs, te prosljeđene na dalji postupak. Neadherentne stanice (P815) su nakon jednakog postupka

zakiseljavanja neutralizirane dodavanjem medija neutralnog pH, te centrifugirane (1200 rpm, 5 min.). Potom su još jednom isprane u PBSu. Osnovni princip postupka prikazan je na slici 19.



Slika 19. Izazivanje nepravilno svijene (*misfolded*) konformacije MHC-I molekula na staničnoj površini. Stanice su kratkotrajno izložene niskom pH (2,0), nakon čega su isprane u PBSu, te proslijeđene na daljnji postupak.

3.3.3. Određivanje površinskog izražavanja MHC-I molekula metodom imunofluorescencije i protočnom citometrijom

3.3.3.1. Priprema stanica

Adherirani mišji fibroblasti inkubirani na plastičnim Petrijevim posudama odvojeni su od podloge kratkom tripsinizacijom. Djelovanje tripsina zaustavljeno je dodavanjem desetorostrukog većeg volumena medija s 10% FCS. Stanice su isprane jednom u MEM mediju, a zatim resuspendirane u FACS-mediju. Neadherentne stanice (P815) jednostavno su uzete zajedno s medijem, centrifugirane i također resuspendirane u FACS-mediju. Broj stanica je podešen na $10^5/100 \mu\text{l}$ volumena za svaku epruvetu. Cijeli postupak izvodi se na ledu, da bi se spriječila endocitoza protutijela vezanih na membrani stanice.

3.3.3.2. Indirektna imunofluorescencija

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

3.3.3.3. *Analiza stanica protočnim citometrom*

Analiza stanica vršena je na protočnom citometru FACSCalibur (Becton-Dickinson). Pomoću izvora laserske svjetlosti valne duljine 488 nm može se odrediti relativna veličina i unutrašnja složenost (granuliranost) stanica, te detektirati emisija fluorokroma s obilježenih stanica. FITC emitira zelenu svjetlost (500-550 nm), a propidij-iodid crvenu (600-650 nm). Analizirano je 5000-10000 stanica koje svojom relativnom veličinom i unutrašnjom složenošću odgovaraju ispitivanim stanicama. Mrtve stanice isključene su iz analize na osnovu emisije crvene svjetlosti propidij-iodida koji ulazi samo u mrtve stanice. Analiza stanica vršena je pomoću programa CellQuestPro (CellQuestPro software Becton-Dickinson), a grafička obrada rezultata u programu za osobno računalo Winmdi 2.8. Rezultati su prikazani kao histogrami učestalosti broja stanica u odnosu na intenzitet fluorescencije ili kao grafički prikaz srednjeg intenziteta fluorescencije (MFI - engl. *mean fluorescence intensity*) ili postotka izražaja tijekom ispitivanog vremenskog razdoblja. *Postotak izražaja* predstavlja omjer MFI u ispitivanom i nultom vremenu pokusa. Srednji intenzitet fluorescencije u datom vremenu uvijek je umanjnjen za odgovarajuću vrijednost analogne negativne kontrole u koju je dodano samo sekundarno protutijelo. Prikazani rezultati su reprezentativni primjeri najmanje 3-5 puta ponovljenih pokusa.

3.3.4. *Ispitivanje površinskog i unutarstaničnog izražaja i smještaja membranskih molekula metodom konfokalne mikroskopije*

3.3.4.1. *Priprema stanica*

Adherentne stanice (Balb 3T3) uzgajane su u pločama u koja su prethodno stavljena sterilizirana pokrovna stakalca dok nisu prekrile 50-60% podloge. Nakon ispiranja s PBS fiksirane su 20 minuta u 4% PFA, te permeabilizirane 7 minuta u 0,5% TX-100. Blokiranje nespecifičnih mjesta vršeno je 20 minuta u 1% BSA. *Neadherentne stanice* (stanična linija P815) su centrifugiranjem na citospinu (5 minuta, 500 rpm) adherirane na predmetna stakalca, te se dalje s njima postupalo kao s adherentnim staničnim linijama.

3.3.4.1. *Imunofluorescencija*

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

3.3.4.3. *Analiza stanica konfokalnom mikroskopijom*

Preparati su slikani na konfokalnom mikroskopu Olympus Fluoview FV300 (Olympus Optical Company, Tokyo, Japan) koristeći 60xPlanApo objektiv. Kako bi se ustanovio stupanj kolokalizacije (žuta fluorescencija, obzirom da su korištene samo crvena i zelena fluorescentna boja), 8-10 stanica u svakom preparatu je

nasumično odabrano, te prikazano u različitim povećanjima koja zadovoljavaju obrazac razlučivanja. Slike jedne stanice koje su dobivene na jednom povećanju su prebačene u format TIFF, te procesuirane pomoću programa Fluoview, Version 4.3 FV 300 (Olympus Optical Company, Tokyo, Japan). Prezentacija slika je dovršena u programu Adobe Photoshop i Image Composer.

3.3.5. Imunoprecipitacija

3.3.5.1. Biotinilacija površinskih proteina

Stanice su tri puta isprane hladnom otopinom PBS s $MgCl_2$ i $CaCl_2$ nakon čega je na 10^6 stanica dodan 1ml pufera za biotinilaciju i 5 μ l biotina-7-NHS (D-biotinoyl- β -aminocaproic acid-N-hydroxysuccinimide ester). Nakon toga, stanice su inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena na ledu tijekom slijedećih 15 minuta, dodavanjem 50 μ l/ml otopine za zaustavljanje biotinilacije (završna koncentracija 50 mM NH_4Cl). Stanice su potom 2 puta isprane s hladnim PBS, nakon čega su lizirane dodatkom 1ml otopine za razaranje.

3.3.5.2. Imunoprecipitacija monoklonskim protutijelima

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

3.3.5.3. Gel-elektroforeza

Proteini dobiveni u postupku imunoprecipitacije razdvojeni su poliakrilamid gel-elektroforezom (SDS-PAGE) na 12,5% i 13% gelovima. Nakon elektroforeze, proteini obilježeni biotinom i razdvojeni na gelu su prebačeni na PVDF membranu (blotting).

3.3.5.4. Elektroblot proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu

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

3.3.5.5. Kemiluminiscencija

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

3.3.6. Ispitivanje utjecaja pH na izražaj MHC-I molekula

3.3.6.1. Izlaganje stanica sniženom pH

Stanice su ekvilibrirane u svježem mediju fiziološkog pH (RPMI 1640 ± 10% FCS). Zatim su centrifugirane, isprane s PBS, nakon čega im je dodan prethodno pripremljen zakiseljen medij (±10% FCS) kojem je pH dva puta podešavan sa 1M HCl na željenu vrijednost kako bi ostao stabiliziran. U nultom vremenu, kao i nakon točno određenog vremenskog razdoblja, uzorci su odvojeni i izražaj ispitivanih molekula određen indirektnom imunofluorescencijom na protočnom citometru.

3.3.6.2. Vraćanje medija fiziološkog pH nakon zakiseljavanja

Stanice inkubirane u kiselom mediju su centrifugirane i isprane 3 puta s PBS nakon čega im je dodan medij fiziološkog pH. U nultom vremenu, kao i nakon točno određenog vremenskog razdoblja, uzorci su odvojeni i izražaj ispitivanih molekula određen indirektnom imunofluorescencijom na protočnom citometru.

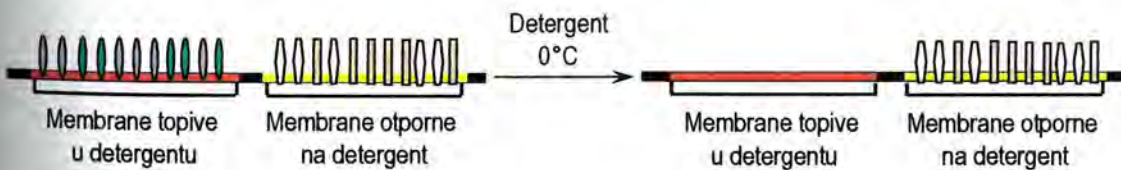
3.3.7. Praćenje smještaja molekula u membranskim mikrodomenama

3.3.7.1. Kolokalizacija površinskih molekula na staničnoj površini

Površinsko obilježavanje vršeno je tijekom 1 sata na 4°C. Stanice su potom isprane 1-2 puta u hladnom PBSu, fiksirane u 4% PFA, kako je ranije objašnjeno, te proslijeđene dalje za postupak imunofluorescencije.

3.3.7.2. Smještaj membranskih molekula u domenama otpornim na djelovanje detergenta (lipidne splavi)

Osnovna načela tretmana stanica s neionskim detergentima i njihovo djelovanje prikazano je na slici 20.



Slika 20. Osnovna načela djelovanja neionskih detergenta na membranske molekule. Nakon hladnog tretmana neionskim detergentima molekule koje se nalaze u membranama otpornim na njegovo djelovanje (DRM; engl. *detergent resistant membranes*), moći će se i dalje vizualizirati. Suprotno tome, molekule koje se nalaze u membranama osjetljivim na djelovanje detergenta (DSM; engl. *detergent soluble membranes*), uklanjaju se i više se ne uočavaju (protokol prilagođen prema referenci 53).

Ako se želio pratiti smještaj molekula lipidnim splavima u cijeloj stanici, stanice (adherentne) su prethodno ohlađene, te na ledu (ako nije navedeno drugačije) tretirane ispitivanim detergentom tijekom navedenog vremena. Nakon toga su isprane 1-2 puta u hladnom PBSu, fiksirane u 4% PFA, bez dodatne permeabilizacije i

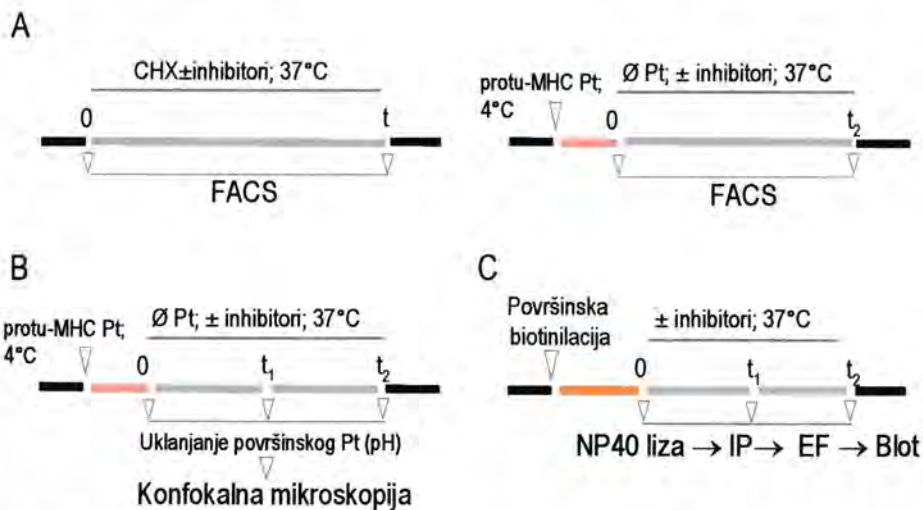
prosljedeće dalje u postupak imunofluorescencije. Alternativno, ako se želio pratiti samo površinski smještaj ispitivanih molekula, prethodno se provelo samo površinsko obilježavanje pomoću odgovarajućeg mPt, kako je ranije objašnjeno, te se nakon toga tretiralo ispitivanim deterгентom, kao i u prethodnom odlomku.

3.3.8. Utvrđivanje obrazaca izražaja MHC-I molekula

Obrazac unutarstaničnog izražaja MHC-I molekula praćen je konfokalnom mikroskopijom. Ukratko, netretirane stanice, ili stanice koje su određeno vrijeme bile podvrgnute djelovanju nekog od inhibitora, imunofluorescentno su obilježene. Postotak zastupljenosti određenog vezikularnog obrasca je izračunat na osnovu njegove zastupljenosti u ≥ 100 stanica. Zapaženi primjeri su slikani na konfokalnom mikroskopu a u slikama prikazani reprezentativni rezultati iz 3-5 ponovljenih pokusa.

3.3.9. Praćenje endocitoze i endocitoznog puta ispitivanih molekula

Kinetika endocitoze, kao i endocitozni put, internaliziranih molekula praćen je na nekoliko načina: protočnom citometrijom, konfokalnom mikroskopijom i imunoprecipitacijom nakon površinske biotinizacije (slika 21).



Slika 21. Protokoli praćenja endocitoze i endocitoznog puta internaliziranih molekula. (A) Praćenje ukidanja molekula sa stanične površine nakon djelovanja cikloheksimida (lijevo), odnosno nakon površinskog obilježavanja odgovarajućim mPt (desno). (B) Praćenje unutarstaničnog puta internaliziranih molekula metodom konfokalne mikroskopije. (C) Praćenje kinetike degradacije površinski biotiniziranih molekula metodom imunoprecipitacije i SDS-PAGE elektroforeze. Dodatna objašnjenja nalaze se u tekstu.

3.3.9.1. Protočna citometrija

3.3.9.1.1. Praćenje spontane endocitoze usljed djelovanja cikloheksimida

Nakon kultivacije, neposredno prije izvođenja pokusa, stanice su ekvilibrirane u svježem mediju 30 minuta do 1 sat. Potom je ili dodan cikloheksimid (CHX) u navedenoj koncentraciji, samostalno ili u kombinaciji s nekim od inhibitora endocitoze i/ili vezikularnog transporta. U nultom vremenu, kao i nakon odgovarajućeg vremenskog razdoblja, uzorci su odvojeni i analizirani indirektnom imunofluorescencijom na protočnom citometru.

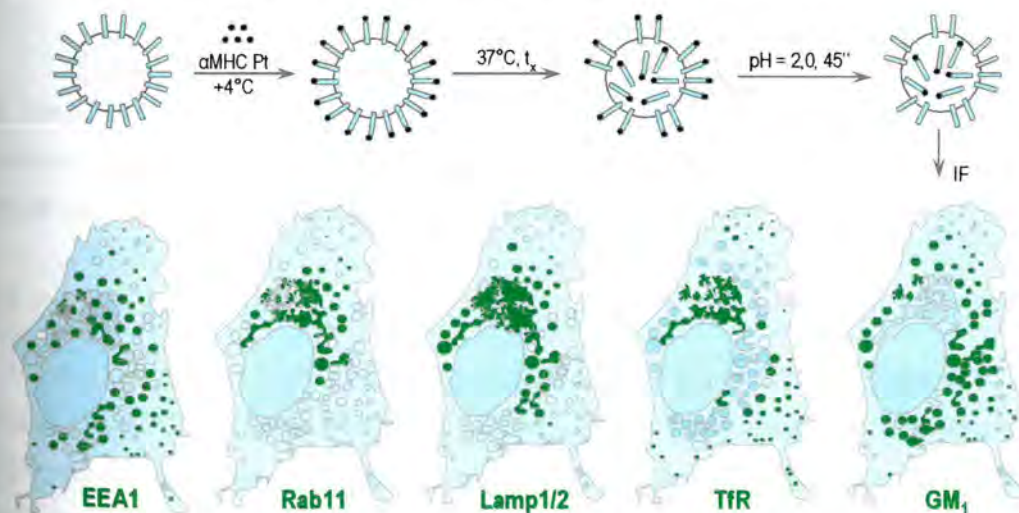
3.3.9.1.2. Praćenje endocitoze nakon površinskog vezivanja monoklonskog protutijela ili liganda

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

3.3.9.2. Konfokalna mikroskopija

3.3.9.2.1. Praćenje kontinuirane internalizacije

Protokol je modificiran prema već ranije opisanom (227).



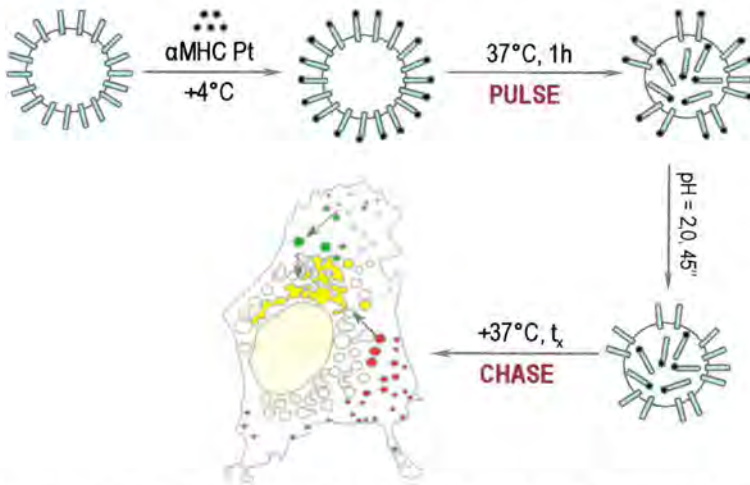
Slika 22. Osnovni protokol praćenja kontinuirane internalizacije konfokalnom mikroskopijom. Nakon površinskog obilježavanja odgovarajućim mPt, dopuštena je internalizacija molekula (slika gore). Nakon uklanjanja preostalih površinskih mPt internalizirane molekule su vizualizirane metodom konfokalne mikroskopije i kolokalizirane s markerima endocitoznih odjeljaka i putova (slika dolje).

Ukratko, stanice su površinski obilježene odgovarajućim mPt. Potom je protutijelo uklonjeno, a stanicama dodan svjež medij na 37°C. Nakon navedenog vremena internalizacije stanice su kratkotrajno zakiseljene (pH=2,0; 45 sek.) kako bi se uklonilo preostalo površinski vezano mPt, isprane 3 puta hladnim PBSom, te fiksirane. Potom su imunofluorescentno obilježene i analizirane konfokalnom mikroskopijom kako je opisano (slika 22).

Ako je bio praćen utjecaj inhibitora, stanice su najprije tretirane inhibitorom a zatim površinski obilježavane. Inhibitor je također bio prisutan i cijelo vrijeme tijekom internalizacije.

3.3.9.2.2. Praćenje pulse-chase internalizacije

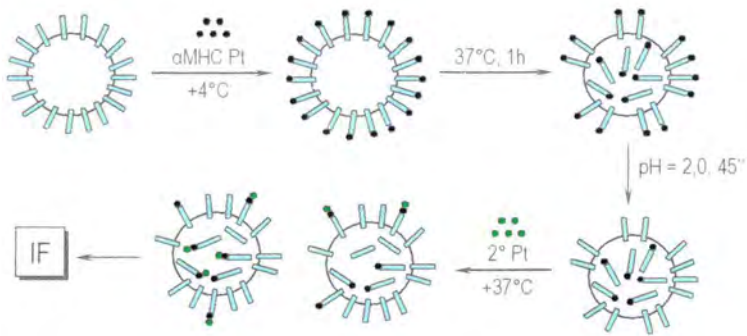
Protokol je također modifikacija ranije opisanog protokola (227). Stanice su nakon površinskog obilježavanja (4°C, 1h) i internalizacije na 37°C (*pulse*) površinski zakiseljene kako bi se uklonilo preostalo površinsko mPt. Potom je dopuštena daljnja internalizacija određeno vrijeme (*chase*), nakon čega su stanice imunofluorescentno obilježene i analizirane konfokalnom mikroskopijom (slika 23). U slučaju ispitivanja utjecaja inhibitora, protokol je vršen na gore objašnjen način.



Slika 23. Prikaz praćenja *pulse-chase* internalizacije metodom imunofluorescencije i konfokalne mikroskopije. Nakon površinskog obilježavanja odgovarajućim mPt, dopuštena je internalizacija molekula. Nakon određenog vremena površinsko mPt je uklonjeno, te se dalje pratio endocitozni put internaliziranih molekula.

3.3.9.2.3. Praćenje recikliranja

Protokol je prilagođen prema ranije opisanom (228). Stanice su površinski obilježene (4°C, 1h). Nakon internalizacije (1h, 37°C) površinsko protutijelo je uklonjeno i dodan medij u kojem su razrijeđena sekundarna protutijela konjugirana sa fluorescentnom bojom. Stanice su potom inkubirane dodatnih sat vremena (ako nije navedeno drugačije), fiksirane, te uklopljene i analizirane konfokalnom mikroskopijom (slika 24).



Slika 24. Postupak praćenja recikliranih molekula metodom konfokalne mikroskopije

Nakon površinskog obilježavanja odgovarajućim mPt, dopuštena je internalizacija molekula 1 sat. Potom je površinsko mPt uklonjeno, a stanice dodatno inkubirane na 37°C u mediju s fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelom.

4. REZULTATI

4.1. LOKALIZACIJA I IZRAŽAJ MHC MOLEKULA I RAZREDA

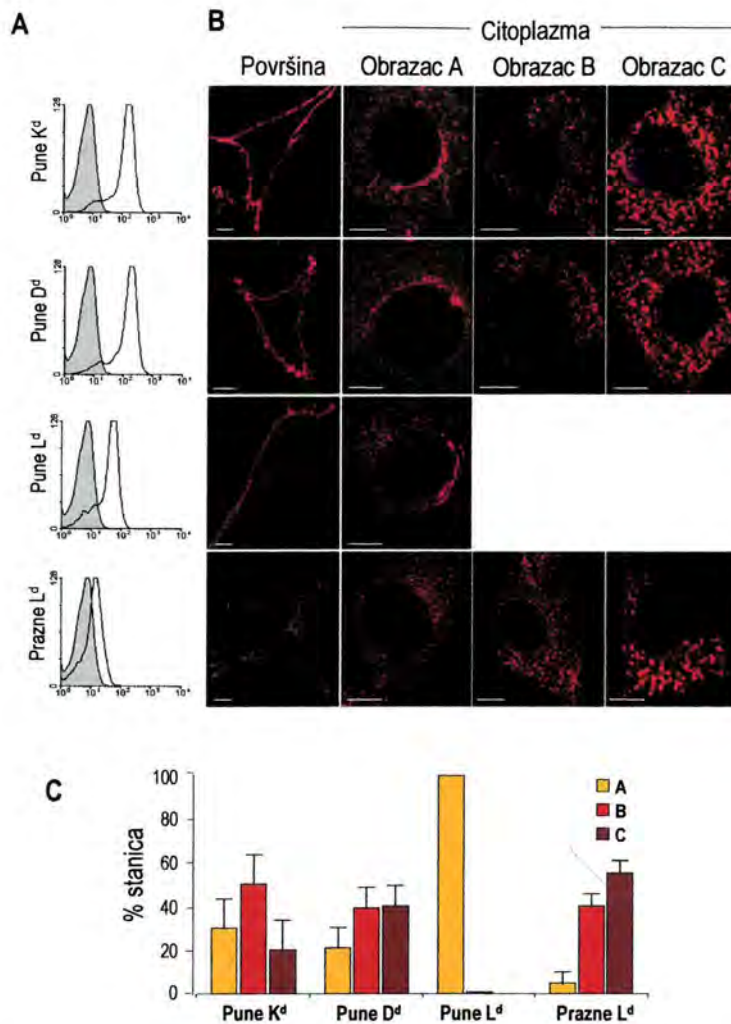
Izražaj MHC-I molekula haplotipa H2^d praćen je na mišjim staničnim linijama (tablica 3) - fibroblastima Balb 3T3 i L-L^d (fibroblasti haplotipa H2^k transficirani tako da izražavaju i molekule L^d), te stanicama P815 (staničnoj liniji mastocitoma). Praćena su dva osnovna konformacijska stanja molekula: stabilni konformirani trimolekularni kompleksi (pune molekule K^d, D^d i L^d) i nekonformirane molekule koje se normalno više ili manje mogu izražavati na površini ispitivanih stanica (prazne molekule L^d). Nadalje, umjetno nastanak nekonformiranih molekula na staničnoj površini izazvali smo kratkim izlaganjem stanica kiselom pH (pH=2,0; 30 sekundi), protokolom koji dovodi do dezintegracije trimolekularnog kompleksa MHC-I molekula i stvaranja nepravilno svijenih (engl. *misfolded*) molekula koje se mogu pratiti protutijelima za praznu konformaciju (molekule L^d i D^d) (odjeljci 3.3.2.3 i 4.1.1.1.1).

Za vizualizaciju ispitivanih molekula koristili smo paletu monoklonskih protutijela (tablica 2). Pri tome smo za molekule K^d koristili monoklonsko protutijelo MA-215 (229), a za molekule D^d protutijelo 34-5-8S (230). Obzirom da se molekule L^d na staničnoj površini mogu pojavljivati u dvije osnovne konformacije, a time i u dva oblika – kao pune molekule L^d, odnosno stabilni trimolekularni kompleksi teškog lanca, β_2 -m i peptida (156), te kao prazne molekule L^d nestabilne konformacije, koje se sastoje samo od teškog lanca bez β_2 -m i peptida ili od teškog lanca s vrlo slabo vezanim β_2 -m (156). Za njihovo prikazivanje koristili smo dva različita monoklonska protutijela. Protutijelo 30-5-7 prepoznaje α_2 domenu teškoga lanca u konformaciji kada je za teški lanac vezan peptid, što znači da se njime mogu prikazati samo pune molekule L^d (231), dok mPt 64-3-7 prepoznaje α_2 domenu teškog lanca, ali samo u slučaju kada je molekula prazna (bez peptida/ β_2 -m) ili nije konformirana (170). Točno mjesto prepoznavanja mPt 64-3-7 je kombinacija ostataka Q48 i P50 koji se nalaze u petlji koja spaja β nabranu ploču s α -heliksom, tj. području koje može djelovati kao zglobov kada se veže peptid. Pretpostavlja se da struktura teškog lanca u području 48-50 aminokiseline pokazuje konformacijsku promjenjivost, te da 64-3-7 otkriva specifičnu orijentaciju aminokiselinskih postraničnih lanaca koji se pokazuju kada teški lanac nije povezan s peptidom (slika 15) (182). Ovo protutijelo prepoznaje i *misfolded* konformaciju molekula L^d (4.1.1.1.1.). Za prepoznavanje *misfolded* molekula D^d koristili smo mPt 34-2-12S koje prepoznaje konformirane i nekonformirane molekule D^d (230).

4.1.1. Površinski i subcelularni obrazac izražaja MHC molekula I razreda

4.1.1.1. Površinski izražaj MHC-I molekula

Površinski izražaj MHC-I molekula haplotipa H2^d praćen je na fibroblastima Balb 3T3, stanicama L-L^d i p815 metodom indirektno imunofluorescencije na nepermeabiliziranim stanicama, protočnom citometrijom ili konfokalnom mikroskopijom. Pri tome smo koristili prethodno opisana monoklonska protutijela.

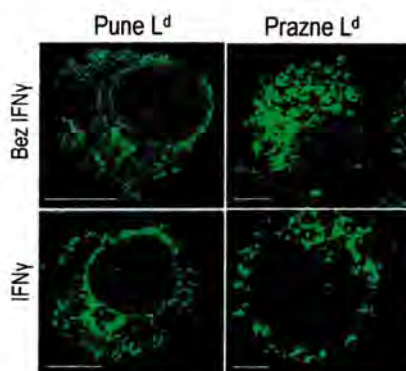


Slika 25. Izražaj MHC-I molekula na fibroblastima Balb 3T3. Stanice Balb 3T3 su 72h bile pod djelovanjem IFN γ (kao i u svim daljnji pokusima). Površinski izražaj mišjih MHC-I alela (pune K^d, D^d i L^d, te prazne L^d) je prikazan na metodom protočne citometrije (A), te konfokalne mikroskopije (B, lijevi dio) bez permeabilizacije stanične membrane. Citoplazmatski izražaj (B, desni dio) prikazan je nakon uklanjanja konformiranih MHC-I molekula sa stanične površine (pH=2,0; 1 min) i permeabilizacije stanica (stanice na kojima je praćen izražaj praznih molekula L^d nisu tretirane kiselim pH). Nakon vezivanja odgovarajućeg mPt (MA-215 za K^d, 34-5-8S za D^d, 30-5-7 za pune L^d, te 64-3-7 za prazne L^d) stanice su vizualizirane pomoću sekundarnog protutijela (protu-mišji IgG_{2a} Alexa 555 za D^d i pune L^d, odnosno protu-mišji IgG_{2b} Alexa 555 za K^d i prazne L^d). Postotak zastupljenosti određenog vezikularnog obrasca, računat na ≥ 100 stanica, prikazan je na slici C. Navedena mPt su dalje korištena za praćenje H-2^d molekula u svim daljim pokusima. Mjerna crta = 10 μ m. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

U uvjetima ustaljenog stanja (engl. *steady state*) stanice P815 izrazito dobro izražavaju konformirane molekule, osobito K^d i D^d . Iako se nekonformirane (prazne) molekule L^d izražavaju nešto slabije, intenzitet je i dalje zadovoljavajući. Jednako dobar izražaj pokazuju i molekule L^d na fibroblastima L- L^d (nije prikazano). Nasuprot tome, fibroblasti Balb 3T3 površinski samo umjereno izražavaju molekule K^d i D^d , izuzetno slabo konformirane molekule L^d , a gotovo nimalo nekonformirane (prazne) molekule L^d (nije prikazano). Ipak, nakon djelovanja IFN γ 48-72h stupanj izražaja se povećava oko 10 puta što omogućava zadovoljavajuću vizualizaciju konformiranih molekula K^d , D^d i L^d . Međutim, izražaj praznih molekula L^d , iako primjetan, izuzetno je slab, što ukazuje da ova stanična linija nije sklona izražavanju nekonformiranih molekula (slika 25a). Primarna stanična linija mišjih embrionalnih fibroblasta također pokazuje sličan obrazac ekspresije (nije prikazano).

Metodom konfokalne mikroskopije na površini fibroblasta Balb 3T3 nisu se mogli vizualizirati aleli MHC-I molekula bez tretmana IFN γ . Ipak, nakon tretmana od 48-72h, molekule K^d i D^d se dobro uočavaju, pune L^d nešto slabije, dok je ekspresija praznih molekula L^d na staničnoj površini je jedva zamjetna (slika 25b). Nadalje, konfokalnom mikroskopijom se kod rezova u ravnini jezgre uočava kako se MHC-I molekule relativno jednoliko izražavaju duž PM. Ipak, u najgornjim i najdonjim rezovima vidljivo je da se molekule na površini nalaze u nakupinama, tj. da su smještene u mikrodomenama (slika 30).

Djelovanje IFN γ je dalje korišteno u svim protokolima za praćenje MHC-I molekula konfokalnom mikroskopijom na stanicama Balb 3T3. Obzirom da je na stanicama P815 pokazano da se obrazac ekspresije se ne mijenja bez obzira da li su stimulirane IFN γ ili ne, rezultati dobiveni na fibroblastima Balb 3T3 mogu se smatrati vjerodostojnima onima na netretiranim stanicama (slika 26).



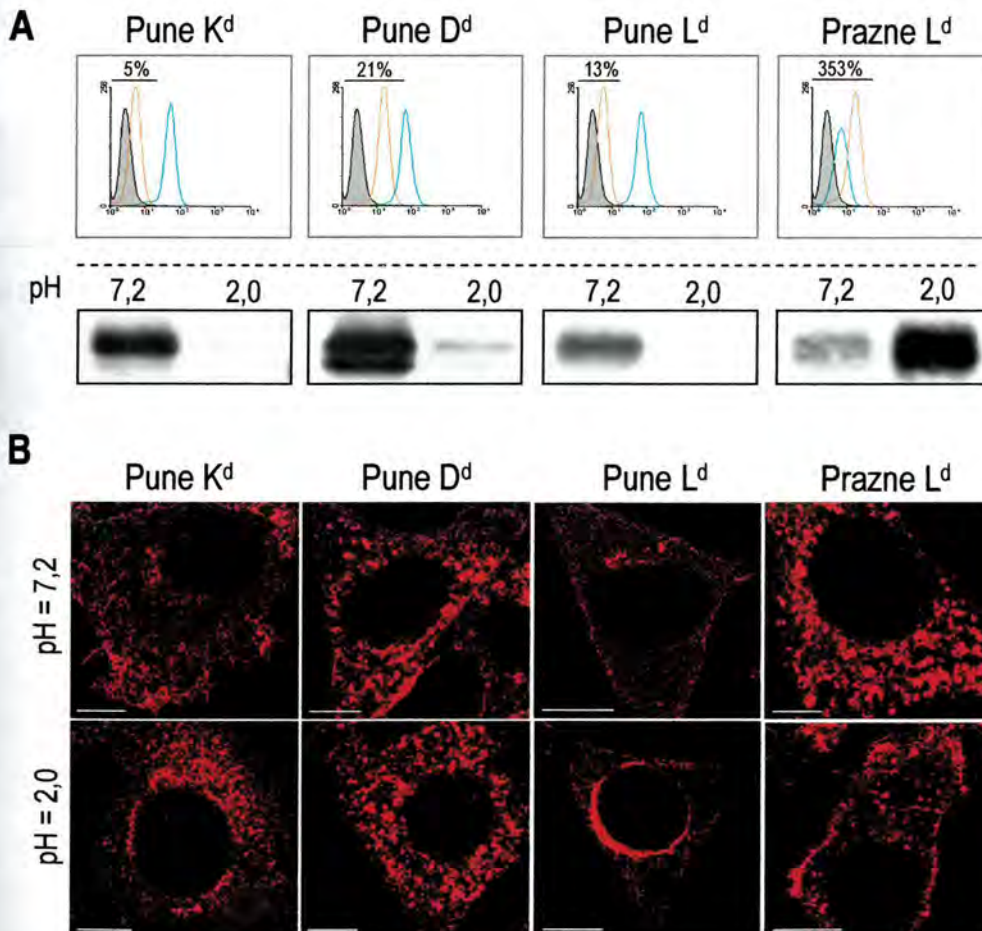
Slika 26. Učinak IFN γ na obrazac izražaja molekula L^d na stanicama P815. Stanice P815 su 48 sati tretirane IFN γ (50 mU/ml), te nakon toga imunofluorescentno obilježene odgovarajućim mPt kako je ranije navedeno, te vizualizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μ m. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

4.1.1.1.1. Nepravilno svijene (*misfolded*) MHC-I molekule

Već smo prethodno naveli da se MHC-I molekule mogu izražavati u konformiranom i nekonformiranom obliku. Jedan od načina na koji se može izazvati stvaranje nepravilno svijene (*misfolded*) konformacije je kratkotrajni kiseli tretman stanica (pH = 2,0; 30 sek.) kojim se omogućava dezintegracija površinskih

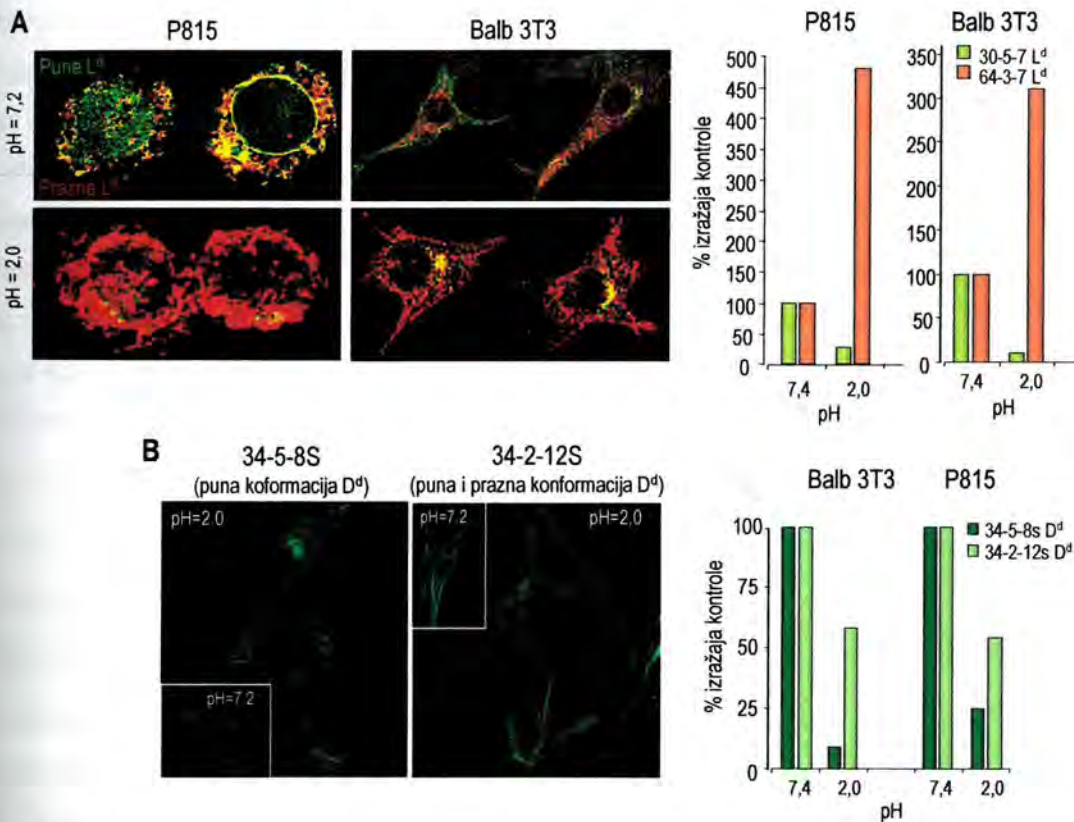
konformiranih MHC-I molekula, uz očuvanje integriteta stanične membrane i unutarstaničnih molekula (slika 19). Stoga pojam *misfolded* u ovom radu podrazumijeva umjetno stvorene nekonformirane molekule, što ih razlikuje od nativnih nekonformiranih molekula koje su nastale spontano u stanici.

Nakon usporedbe površinskog izražaja MHC-I molekula na stanicama P815 metodom protočne citometrije možemo uočiti da se postotak konformiranih molekula znatno smanjuje, dok se postotak nekonformiranih molekula L^d razmjerno povećava (slika 27a, gornji panel). Jednak rezultat je dobiven u istom pokusu imunoprecipitacijom i SDS-PAGE elektroforezom nakon površinske biotilacije (slika 27a, donji panel). Nadalje, kada je na fibroblastima Balb3T3 primijenjen isti protokol, nakon čega su stanice fiksirane, permeabilizirane, imunofluorescentno obilježene i analizirane konfokalnom mikroskopijom, također se uočava gubitak površinske ekspresije konformiranih molekula K^d, D^d i L^d, uz zadržavanje, ili čak i bolju vizualizaciju unutarstaničnih organela, prvenstveno endosomalnih vezikula (slika 27b).



Slika 27. Učinak zakiseljavanja na promjenu konformacije MHC-I molekula na stanicama P815 i Balb 3T3. Stanice P815 (A), odnosno Balb 3T3 (B) su kratkotrajno zakiseljene (pH 2,0; 1 min), te im je analiziran površinski izražaj MHC-I molekula protočnom citometrijom (A gornji dio; narančasta krivulja), imunoprecipitacijom nakon površinske biotilacije (A donji panel), odnosno konfokalnom mikroskopijom nakon IF obilježavanja (C). Kao kontrola (plava linija na A) su korištene stanice koje su izložene fiziološkom pH (7,4). Mjerna crta = 10 μ m. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

Kao što smo prethodno pokazali, izražaj nekonformiranih molekula L^d na površini stanica Balb 3T3 je izuzetno slab, no kiseli tretman (pH = 2,0; 30 sek.) omogućuje dezintegraciju konformiranih molekula L^d i povećanje izražaja *misfolded* konformacije što je pokazano njihovim obilježavanjem indirektnom fluorescencijom, te vizualizacijom konfokalnom mikroskopijom (praćenje ukupnog izražaja), odnosno protočnom citometrijom (praćenje površinskog izražaja) na stanicama P815 i Balb 3T3 (slika 28a). Vijabilnost je iznosila je 85-90%, što je utvrđeno protočnom citometrijom, određivanjem postotka stanica negativnih na propidij-iodid (nije prikazano). Iako se ovim protokolom pune molekule L^d gotovo u potpunosti uklanjaju sa stanične površine, ostaju prisutne u njezinoj unutrašnjosti, uglavnom u području Golgijevog aparata (GA) i ERIC (prijelazni dio između ER i *cis*-GA) (slika 28a i kasnije). To ukazuje da ovim tretmanom nije narušen integritet stanične membrane, što bi dovelo do promjene konformacije i u citoplazmatskim odjeljcima. Suprotno rezultatima dobivenim s punim molekulama L^d, na obje stanične linije, objema metodama možemo uočiti kako se intenzitet ekspresije nekonformiranih (praznih) molekula znatno pojačao, što je praćeno protutijelom 64-3-7 koje inače koristimo za obilježavanje nativnih nekonformiranih molekula L^d (slika 28a).



Slika 28. Učinak zakiseljavanja na izražaj *misfolded* molekula L^d i D^d na stanicama P815 i Balb 3T3. Stanice P815 i Balb 3T3 su kratkotrajno zakiseljene (pH 2,0; 1 min), te je konfokalnom mikroskopijom analiziran ukupni izražaj molekula L^d (A lijevo) i D^d (B lijevo). Pune L^d prikazane su s mPt 30-5-7 zelenom fluorescencijom, prazne L^d s mPt 64-3-7 crvenom fluorescencijom. Pune molekule D^d prikazane su s mPt 34-5-8s a prazne s mPt 34-2-12 zelenom fluorescencijom. Površinski izražaj *misfolded* molekula L^d (A desno), odnosno molekula D^d (B desno) određen je protočnom citometrijom. Kao kontrola su korištene stanice koje su izložene fiziološkom pH (7,4). Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Obzirom da na raspolaganju nismo imali još jedno protutijelo koje prepoznaje isključivo praznu konformaciju MHC-I, iskoristili smo činjenicu da se ovim protokolom zakiseljavanja uglavnom dezintegriraju svi trimolekularni MHC-I kompleksi. Tako smo *misfolded* molekule D^d mogli pratiti pomoću mPt 34-2-12S koje prepoznaje α_3 domenu teškog lanca molekule D^d, odnosno njezin i konformiran i nekonformiran oblik (230). Obzirom da su nakon ovakvog tretmana konformirane molekule D^d ostale samo slabo prisutne na staničnoj površini (slika 28b), dominiraju uglavnom one prazne (*misfolded*). Ipak, bitno je naglasiti da ovo protutijelo ne obilježava jednak postotak molekula kao prije tretmana, što bi možda moglo biti posljedica toga da tijekom zakiseljavanja nastaje više oblika *misfolded* molekula od kojih neke ne mogu biti prepoznate od strane navedenog protutijela. Nadalje, protutijelo 28-14-8 ζ , koje se vezuje za α_3 domenu teškog lanca molekule L^d, prepoznaje samo punu konformaciju i zakiseljavanjem prepoznaje jednak broj molekula L^d kao i protutijelo 30-5-7 (nije prikazano).

4.1.1.2. Unutarstanični obrazac izražaja MHC-I molekula

Unutarstanične MHC-I molekule su praćene indirektnom imunofluorescencijom i konfokalnom mikroskopijom koristeći dva osnovna protokola. Naime, obzirom da se konformirane MHC-I molekule dobro izražavaju na staničnoj površini tijekom istodobnog obilježavanja istih molekula na plazmatskoj membrani i u staničnoj unutrašnjosti dolazi do zasjenjenja sitnijih i slabije obilježenih citoplazmatskih struktura. Kao posljedica toga, najčešće se unutar stanice mogu uočiti samo perinuklearne strukture koje uglavnom odražavaju prisustvo MHC-I molekula u Golgijevom aparatu (GA), te veće vezikularne i vezikulotubularne strukture. Nasuprot tome, unutarstanične strukture koje izražavaju prazne molekule L^d dobro se uočavaju zbog njihova slabog površinskog izražaja. Stoga je za praćenje punih molekula primijenjena modifikacija osnovnog protokola kod kojeg su stanice prethodno kratko izložene mediju kiselog pH (pH=2,0; 30 sekundi) kako bismo površinski dezintegrirali trimolekularni kompleks MHC-I molekula koji ne mogu prepoznati korištena protutijela za punu konformaciju.

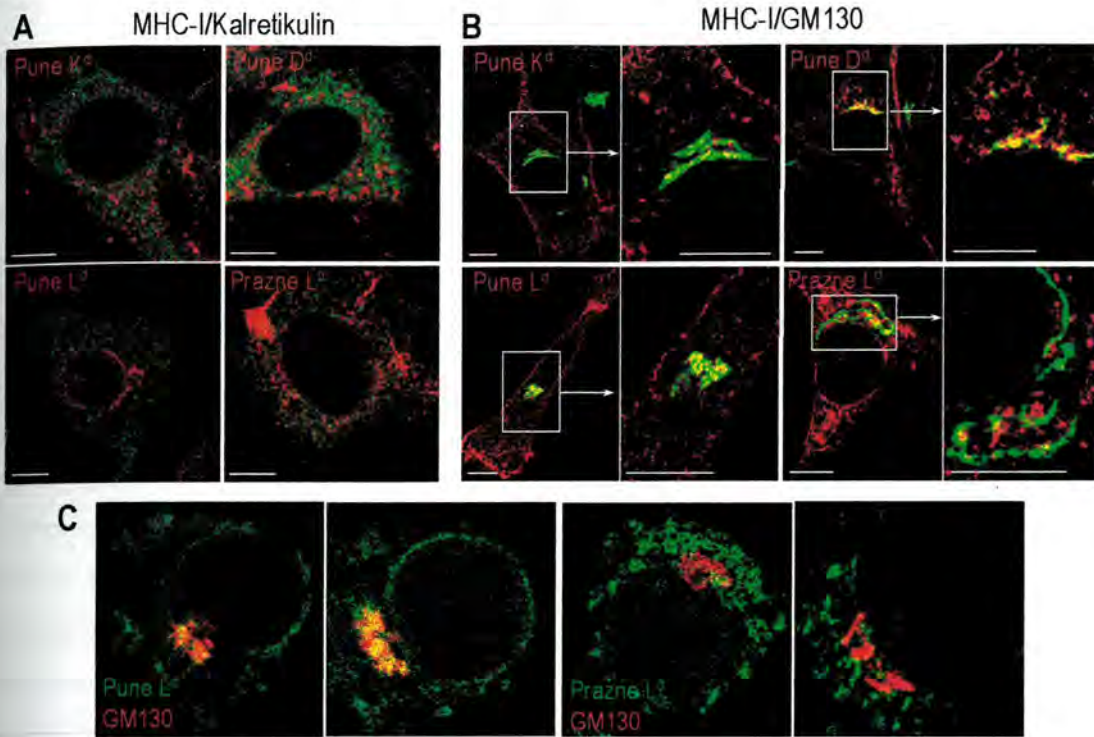
Možemo uočiti da se na fibroblastima Balb 3T3 MHC-I molekule uočavaju kao difuzne strukture koje uglavnom nalikuju ER i GA, te kao vezikularne strukture različitih veličina i oblika.

Prema prisustvu, odnosno veličini vezikula, model izražaja MHC-I molekula smo podijelili u tri osnovna obrasca (slika 25b, citoplazmatski izražaj):

1. Obrazac A – vezikule nisu prisutne ili su vrlo sitne (0-0,5 μ M)
2. Obrazac B – uočavaju se vezikule srednje veličine (0,5-1 μ M)
3. Obrazac C – dominiraju velike vezikularne ili vezikulotubularne strukture (>1 μ M)

Struktura koja nalikuje endoplazmatskoj mrežici uglavnom se može vidjeti bez vezikula ili s vezikulama veličine A (rijetko uz tip B i to uglavnom kod konformiranih MHC-I), te uz jukstanuklearnu tvorbu oblika GA. Nadalje, na fibroblastima L-L^d obje konformacije molekula L^d dominiraju u ER gotovo svih stanica a vezikule, iako prisutne (osobito prazne L^d) se teže definiraju (nije prikazano). Teža definiranost vezikula bi mogla biti posljedica izrazito jake citoplazmatske dominacije ER koji zasjenjuje čak i B i C tip vezikula, te prevage sinteze nad endocitozom.

Iako MHC-I molekule, osobito konformirane, pokazuju slab stupanj kolokalizacije s kalretikulinom (molekulom koja se nalazi u ER), njihov smještaj u ovoj organeli nije isključen (slika 29a).



Slika 29. Kolokalizacija MHC-I molekula s markerima ER i GA na stanicama Balb 3T3. MHC-I molekule (crvena fluorescencija) na stanicama Balb3T3 (A i B), odnosno P815 (C) su kolokalizirane s markerom ER (kalretikulin) i GA (GM130, slike B i C). GM130 i kalretikulin prikazani su sekundarnim protu-mišjim IgG₁ Alexa 488 (zeleno fluorescencija), žutom bojom su prikazana mjesta kolokalizacije. Mjerna crta = 10 µm. Debljina snimka (z) = 0,5 µm.

U većini stanica MHC-I molekule su također zastupljene u **jukstanuklearnom području** (neposredno uz jezgru, uglavnom na jednom polu). Većina **vezikula** u tom dijelu je obrasca B, iako i vezikule obrasca A, odnosno obrasca C, također mogu biti prisutne. Zanimljivo je da u slučaju kada su prazne molekule L^d zastupljene u obrascu vezikula C, jukstanuklearno područje je uglavnom odsutno (za razliku od molekula K^d i osobito D^d). Važno je napomenuti da se u ovom području vizualiziraju MHC-I molekule koje se nalaze u **Golgijevom aparatu** i kolokaliziraju s GM130 (marker *cis*-GA), prvenstveno konformirane molekule (slika 29). Bitno je istaknuti da se konformirane molekule L^d nalaze uglavnom (99%) u tom obrascu. Suprotno tome, prazne molekule L^d se vrlo slabo kolokaliziraju s GM130. Ipak, valja napomenuti da stupanj kolokalizacije praznih molekula L^d koleba ovisno o tome pratimo li markere *cis*-, *medial*- ili *trans*-GA (poglavlja 4.3 i 4.7).

Nadalje, jukstanuklearan smještaj molekula može se podudarati i s **endosomalnim reciklirajućim odjeljkom** (ERC – engl. *endosomal recycling compartment*), osobito Rab11⁺ vezikulama. Nakon kolokalizacije molekula K^d i D^d s tim odjeljkom ustanovili smo da se dio tih molekula doista i nalazi u tim vezikulama, kako u ustaljenom stanju (*steady state*), tako i nakon internalizacije. Suprotno tome, kolokalizacija *steady state* praznih molekula L^d s Rab11 je dosta nejasna, iako se može reći da se nakon internalizacije ne kolokaliziraju s tim markerom

(4.2.2.1.2). Rezultati dobiveni s TfR, molekulom koja se uglavnom nalazi u reciklirajućim odjeljcima, također potvrđuju rezultate dobijene s Rab11 (4.2.2.1.1.).

Konformirane molekule K^d i D^d , te nekonformirane molekule L^d su vrlo često znatno zastupljene u različitim vezikularnim obrascima (A, B ili C), kao što je ranije opisano. Različiti su oblika i veličina (slika 25), a velika je vjerojatnost da su endocitnog porijekla (odjeljak 4.2.2.). Suprotno tome, konformirane molekule L^d se uglavnom (99%) prikazuju u obrascu A u kojima se u 70% stanica vidi samo GA, dok 30% stanica posjeduje sitne vezikule koje su raspršene po citoplazmi (najčešće perinuklearno, iako nije pravilo). Većina tih vezikula vjerojatno pripada ER, iako i endocitno porijeklo nije u potpunosti isključeno.

Različite vrste vezikula su i različito smještene unutar stanice. Obično se male vezikule (obrazac A) nalaze raspršene po stanici, a nešto veće vezikule (obrazac B i prijelazni obrasci) su više ili manje jednoliko raspoređene po stanici s tendencijom ka perinuklearnoj lokalizaciji. Na kraju, vezikulotubularne strukture, odnosno vezikule vrste C se uglavnom koncentriraju perinuklearno. Ovaj posljednji obrazac ekspresije je posebno uočljiv kod praznih molekula L^d kod kojih je u prosjeku zastupljen s više od 50% (slika 25c). Pune molekule K^d i još češće molekule D^d također prate ovakav obrazac izražaja, iako povremeno mogu biti smještene jukstanuklearno, a ponekad jednoliko po citoplazmi, ili, iako dosta rijetko, smještene ekscentrično. Nerijetko se, kod ovog obrasca, GA teže ili uopće ne uočava.

Prema tome, u većini stanica molekule K^d se nalaze raspršene po citoplazmi i jukstanuklearno uglavnom u obrascu B (slika 25b i c). U nekim stanicama može se uočiti samo perinuklearni dio, te male i rijetke vezikule koje se odvajaju od perinuklearnih vezikulo-tubularnih struktura. Suprotno tome, u nekim stanicama vezikulo-tubularne strukture nisu uočljive. Molekule D^d se prvenstveno nalaze perinuklearno, te jednoliko po citoplazmi, također velikim dijelom u obrascu B, iako je zamjetan i broj stanica zastupljenih u obrascu C (slika 25c). U trećini stanica, perinuklearna ekspresija velikih vezikulo-tubularnih struktura dominira u stanici, a male vezikule se mogu vidjeti periferno. Ovakve velike vezikule vrste C vrlo često nadvladaju površinsku ekspresiju koja postaje slabije vidljiva. Molekule D^d su rijetko zastupljene kao čiste vezikule obrasca A. Pune molekule L^d uglavnom (99%) se prikazuju u obrascu A dok se prazne molekule L^d mogu vidjeti zastupljene u sve tri vrste vezikula. Najčešći, i najzanimljiviji, je obrazac C u kojem se nalazi 40-60% stanica. Te velike vezikulo-tubularne strukture su radijalno raspoređene oko jezgre (perinuklearna ekspresija) i šire se prema perifernom dijelu citoplazme (slika 25b). Ovakve C vezikule povezujemo s posebnom strukturom u koju se nakupljaju nekonformirane molekule L^d i koju smo nazvali ELRC (engl. *empty L^d retention compartment*), a predstavlja značajan dio našeg kasnijeg istraživanja (poglavlje 4.7.2). Pored toga, u značajnom dijelu stanica prazne molekule L^d se mogu prikazivati kao obrazac B i rjeđe kao obrazac A (slika 25c). Prijelazni i kombinirani obrasci kod svih alela su također uočljivi. Što su vezikule manje i rjeđe, ER se bolje uočava. Prosječan obrazac izražaja određenih alela, odnosno konformacija MHC-I molekula je prikazan na slici 25b.

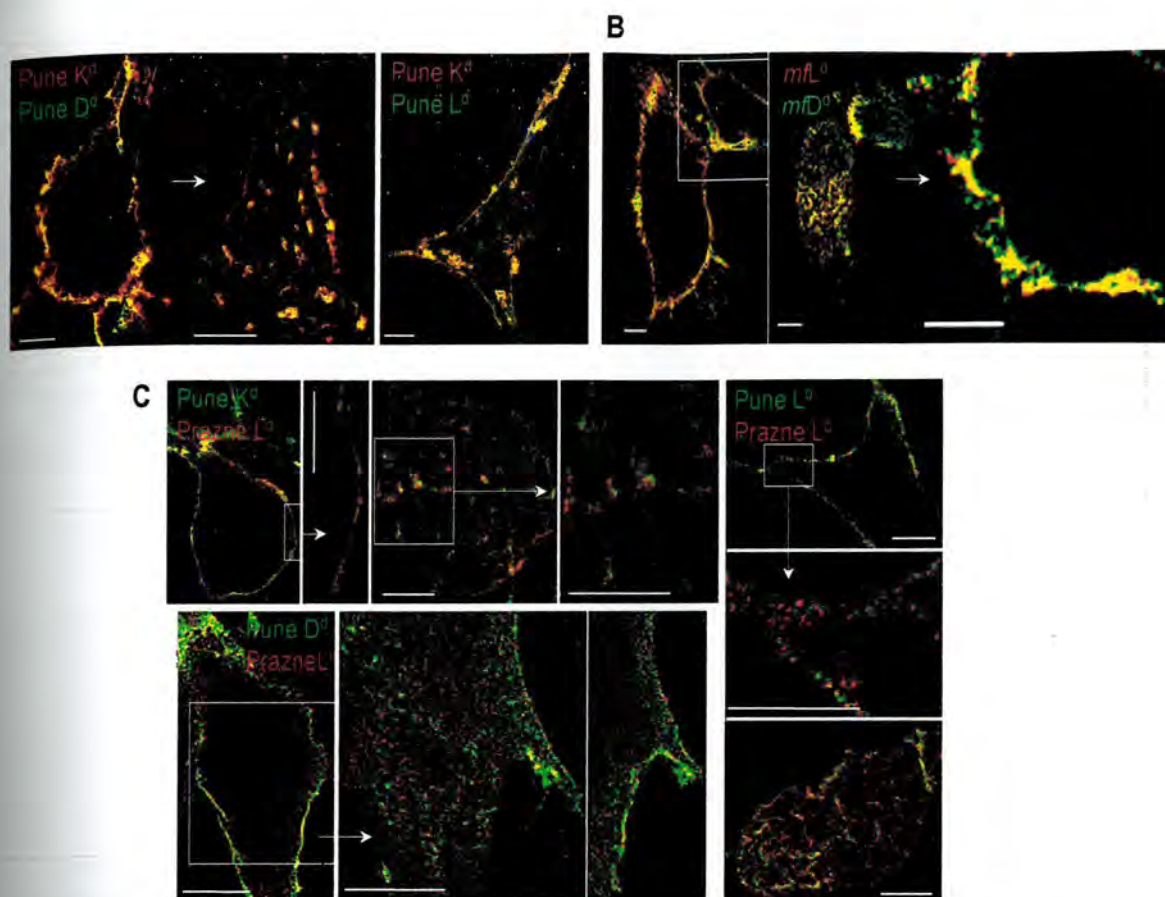
Kao što je ranije navedeno, sličan obrazac izražaja uočava se i u stanicama P815, što ukazuje da je obrazac ekspresije neovisan o staničnoj liniji (slika 26). Nadalje, on se ne mijenja bez obzira jesu li stanice stimulirane IFN γ ili ne, što potvrđuje vjerodostojnost rezultata dobivenih na fibroblastima Balb 3T3.

4.1.2. Međusobna kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula

U prethodnim rezultatima pokazano je da se pojedini aleli MHC-I molekula međusobno mogu razlikovati prema stupnju izražaja, kako na staničnoj površini, tako i u njezinoj unutrašnjosti, te prema unutarstaničnom obrascu ekspresije. To ukazuje da postoji mogućnost da se mogu i nalaziti u različitim odjeljcima ali i u zasebnim (mikro)domenama. Zbog toga smo ispitali njihovu međusobnu kolokalizaciju, kako u domenama na staničnoj površini, tako i u unutarstaničnim odjeljcima, obrađujući pozornost prvenstveno na različite konformacije.

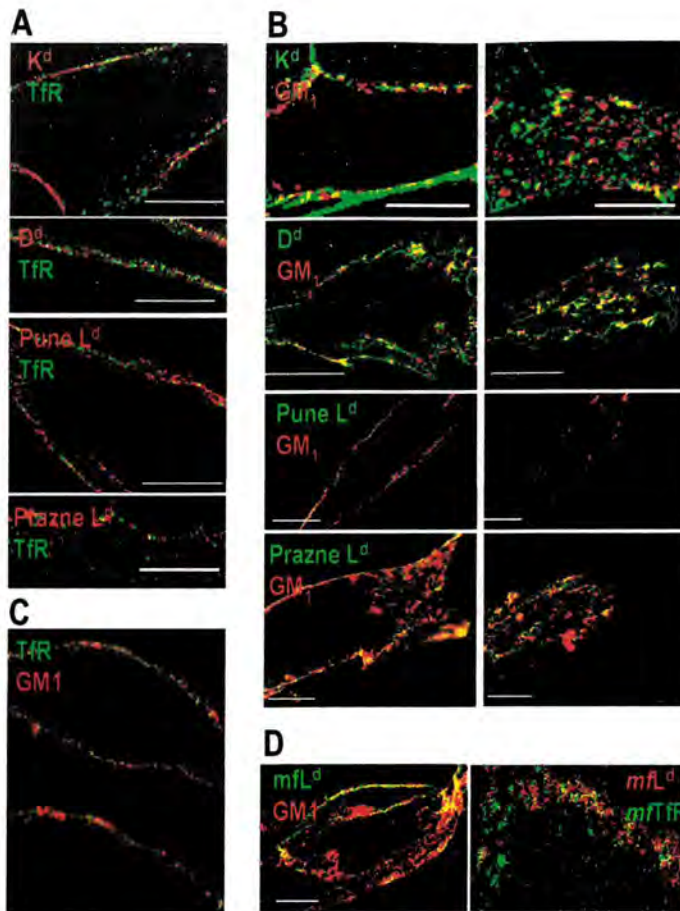
4.1.2.1. Smještaj konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula u domenama na staničnoj površini

Kolokalizacija mišjih MHC-I alela je praćena korištenjem fluorokromom-konjugiranih izotipski specifičnih sekundarnih protutijela. Sva protutijela su prethodno testirana prema specifičnosti za isključivo jedan izotip (nije prikazano). Kao što je ranije spomenuto, možemo uočiti da MHC-I molekule nisu jednoliko raspoređene po PM, već su agregirane i nalaze se u nakupinama različitih veličina i oblika, što ukazuje da su te molekule smještene u membranskim mikrodomenama (slika 30). Konformirane MHC-I molekule se na staničnoj površini nalaze u istim domenama bez obzira na praćeni alel - molekule K^d i D^d , odnosno molekule K^d i pune molekule L^d (slika 30a). Suprotno tome, kolokalizacijom konformiranih molekula K^d , D^d i L^d s nekonformiranim molekulama L^d možemo uočiti da se one vrlo malo kolokaliziraju, što znači da se uglavnom nalaze u različitim domenama (slika 30c). Naposljetku, kako bismo mogli usporediti međusobnu lokalizaciju nekonformiranih MHC-I molekula, stanice smo kratko izložili kiselom pH (pH=2,0, 30 sekundi), što uzrokuje pretvorbu konformiranih molekula u nekonformirane, odnosno nepravilno svijene oblike (*misfolded*). Kada se radi o molekulama L^d , one se, kao što je prethodno opisano u odjeljku 4.1.1.1.1., mogu pratiti pomoću monoklonskog protutijela 64-3-7. *Misfolded* molekule D^d smo pratili pomoću mPt 34-2-12S (odjeljak 4.1.1.1.1). Na slici 30c se može uočiti da se ova dva alela nekonformiranih molekula međusobno znatno kolokaliziraju. Područja koja su samo 34-2-12s pozitivna mogu se objasniti djelomičnom «kontaminacijom» punim molekulama D^d koja nisu promijenila konformaciju (10-15%, slika 4c), a koja prepoznaje ovo protutijelo. Ovi rezultati ukazuju da se MHC-I molekula na staničnoj površini separiraju u zasebne membranske mikrodomene prema svojoj konformaciji, a ne prema alelu.



Slika 30. Kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula na površini stanica Balb 3T3. Stanice Balb 3T3 su površinski obilježene ranije navedenim odgovarajućim mPt (4°C, 1h), te su fiksirane bez naknadne permeabilizacije. Nakon obilježavanja odgovarajućim sekundarnim protutijelima, protu-mišji IgG_{2a} Alexa 488 (zelena fluorescencija) i protu-mišji IgG_{2b} Alexa 555 (crvena fluorescencija), molekule su vizualizirane konfokalnom mikroskopijom. Međusobno su kolokalizirane konformirane molekule K^d i D^d, odnosno K^d i pune L^d (A), nekonformirane (*misfolded*, skraćeno *mf*) molekule D^d i L^d (B), te nativne nekonformirane molekule L^d s konformiranim molekulama K^d, D^d i L^d (C). *Misfolded* konformacija je izazvana kratkotrajnim zakiseljavanjem (pH=2.0; 45 sek.). Žutom bojom su prikazana mjesta kolokalizacije. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Nadalje, na staničnoj površini smo pratili kolokalizaciju MHC-I molekula s TfR, kao molekulom koja se nalazi u klatrinskim jamicama (2), zasad najbolje istraženoj vrsti membranskih mikrodomena, te s molekulom GM₁ koja se nalazi u lipidnim splavima, a služi kao receptor za endocitozu kolera toksina (44). Možemo uočiti da se niti konformirane, niti nekonformirane MHC-I molekule ne kolokaliziraju s TfR (slika 31a). Iako se konformirane MHC-I molekule ne kolokaliziraju s GM₁, nekonformirane molekule L^d (slika 31b) i *misfolded* molekule L^d (slika 31d) se mjestimično djelom kolokaliziraju. Međutim, *misfolded* molekule L^d i *misfolded* TfR se ipak nalaze u različitim domenama, što ukazuje da sama promjena konformacije nije preduvjet za smještaj molekula u istoj membranskoj mikrodomeni (slika 31d). Nadalje, kao što je i očekivano, TfR i GM₁ se međusobno ne kolokaliziraju (slika 31c).



Slika 31. Kolokalizacija MHC-I molekula s TfR i GM₁ na površini stanica Balb 3T3. MHC-I molekule su kolokalizirane na staničnoj površini s TfR (mPt R17, te potom protu štakorski Alexa 488; zelena fluorescencija) (A), ili GM₁ (Kolera toksin B Alexa 555; crvena fluorescencija) (B). Prikazana je i međusobna kolokalizacija TfR s GM₁ (C), te *misfolded* (*mf*) molekula L^d s TfR odnosno GM₁ (D). *Misfolded* konformacija je izazvana kratkotrajnim zakiseljavanjem (pH = 2,0; 45 sek). Žutom bojom su prikazana mjesta kolokalizacije. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

4.1.2.1.1. Lokalizacija MHC-I molekula u lipidnim splavima

Kao što je ranije opisano (poglavlje 2.1) stanična membrana se sastoji od organiziranih i neorganiziranih dijelova, a od organiziranih dijelova najbolje su upoznate klatrinske jamice i lipidne splavi (2, 3). Prema prethodno opisanim rezultatima, konformirane i nekonformirane MHC-I molekule se međusobno nalaze u različitim mikrodomenama koje se razlikuju od onih u kojima se nalaze TfR (klatrinske jamice), odnosno GM₁ (GM₁ pozitivne lipidne splavi).

Prisutnost molekula u lipidnim splavima ispitivana je primjenom činjenice da su splavi dobile ime prema svojstvu netopivosti u neionskim detergentima na 4°C (DRM – engl. *detergent resistant membranes*) (slika 20), te specifičnosti u lipidnom sastavu - bogate su kolesterolom, sfingomijelinom, te glikolipidima kao što je gangliozid GM₁ (4, 22).

Detergent koji se najčešće koristi za dokazivanje nazočnosti molekula u lipidnim splavima je TX-100, iako se katkad molekule koje se nalaze u lipidnim splavima uklanjaju nakon djelovanja ovim detergentom, i obrnuto, ako djelovanje detergenta nije dobro testirano (4).

Tablica 4: Učinak djelovanja neionskim detergentima na prisustvo površinskih molekula u lipidnim splavima

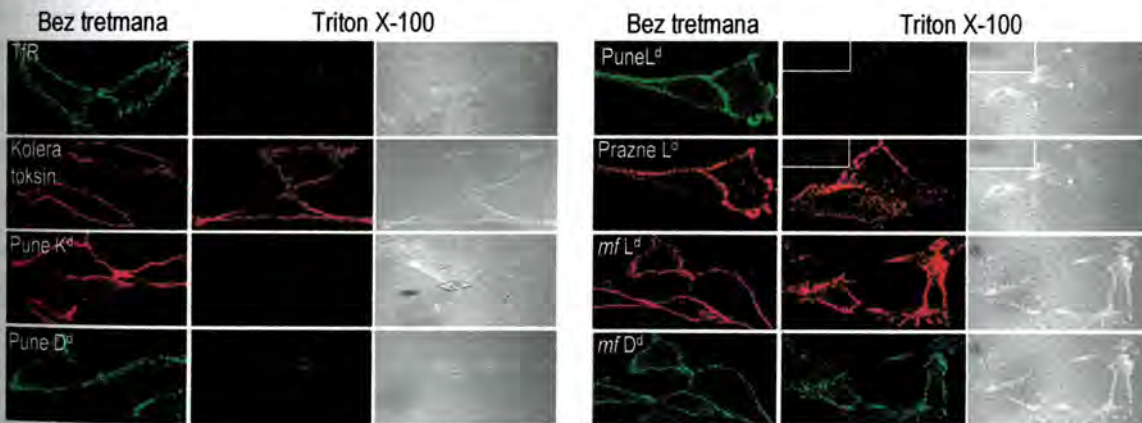
MOLEKULA	TX-100									
	0,25 %				0,5%					
	30"	45"	1'	2'	20"	30"	45"	1'	2'	
Transferinski receptor	-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	
GM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Nativne prazne L ^d	-	-/+	-/+	+	+	-/+	+	+/-	+	
Misfolded L ^d							-	-/+		
MOLEKULA	Brij 96									
	2 %		1 %		0,5%					
	1'	30"	30"	1'	2'	2,5'	3'			
Transferinski receptor	+/-	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-			
Nativne prazne L ^d	-	-	-	-	-	-	-			
Misfolded L ^d							-/+			
MOLEKULA	CHAPS									
	8 %		4 %		2 %					
	1'	30"	30"	1'	2'	2,5'	3'			
Transferinski receptor	+/-	+/-	+/-	+	+/-	-	+			
GM1	-									
Nativne prazne L ^d	-	-/+	-	-	-	-	-			
Misfolded L ^d							+			
MOLEKULA	Tween 20									
	4%		2 %							
	2'	3'	1'	2'	2,5'	3'	4'	5'		
Transferinski receptor	-	-	+/-	+	+	+/-	+/-	-/+		
GM1			-	-						
Nativne prazne L ^d	-	-	-	-	-	-	-	-		
Misfolded L ^d						-	-	-		

+ uklanjanje; - nema učinka.

Stoga je bilo bitno ustaliti protokol prema koncentraciji i vremenu djelovanja detergenta kako bi se potvrdilo da će se molekule za koje se zna da se ne nalaze u lipidnim splavima isprati iz njih (npr. TfR, Na⁺/K⁺ ATPaza), odnosno da molekule koje se nalaze u njima ostaju integrirane u staničnoj membrani (npr. GM1, Gb3). U našim

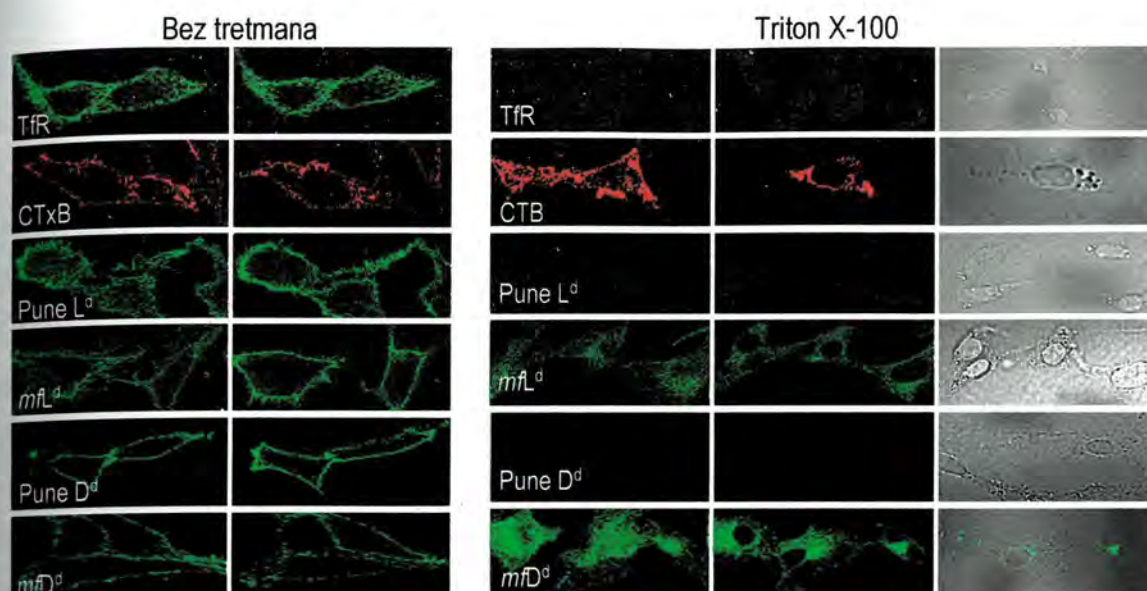
eksperimentima TfR je korišten kao kontrolna molekula koja se uklanja iz lipidnih splavi, a GM₁ (molekula koja se prikazuje s CTxB) kao pozitivna kontrola koja ostaje vezana u lipidnim splavima. Prema izgledu stanica i dobivenim rezultatima ustanovili smo da je najbolje koristiti 0,5% TX-100 tijekom 30-45 sekundi (tablica 4, sjenčano).

U cilju praćenja površinskih molekula na stanice smo vezali odgovarajuće monoklonsko protutijelo ili ligand (4°C, 1h), nakon čega smo ih izložili djelovanju TX-100 u ispitivanoj koncentraciji tijekom 45 sekundi. Konformirane molekule K^d, D^d i L^d, kao i nekonformirane molekule L^d smo pratili na prethodno netretiranim stanicama dok su *misfolded* molekule L^d i D^d praćene nakon kratkog kiselog tretmana (pH=2,0; 20-30 sek.). Nakon izlaganja Balb 3T3 stanica TX-100 na 4°C, izražaj molekula je praćen konfokalnom mikroskopijom (slika 32). Možemo uočiti da se TfR i konformirane MHC-I molekule uklanjaju sa stanične površine, za razliku od CTxB i nekonformiranih MHC-I molekula (nativnih L^d i *misfolded* L^d i D^d). Iako postoji mogućnost da je TX-100 uzrokovao dezintegraciju MHC-I molekule ili odljepljivanje vezanog protutijela, a ne njegovo uklanjanje sa stanične membrane, to je malo vjerojatno. Naime, pokazali smo da se u lizatu s TX-100 na 4°C normalno imunoprecipitiraju konformirane MHC-I molekule, što ukazuje da detergent ne narušava strukturu trimolekularnog kompleksa, niti ometa vezivanje protutijela (nije prikazano). Nadalje, sam protokol imunoprecipitacije se standardno izvodi u NP40, još jednom neionskom detergentu.



Slika 32. Učinak TX-100 na uklanjanje membranskih makromolekula sa stanične površine fibroblasta Balb 3T3 nakon vezivanja mPt (liganda). Na površinu stanica Balb 3T3 je vezano odgovarajuće mPt ili ligand (4°C), nakon čega su na ledu tretirane 0,5% TX-100 kroz 45 sekundi. Stanice su potom fiksirane u hladnom PFA (4%) i obilježene sekundarnim protutijelom. Debljina snimka (z) = 0,5 µm.

Nadalje, kako bismo ustanovili prisutnost ispitivanih molekula, ne samo na staničnoj površini, već i u njezinoj unutrašnjosti, stanice smo izložili djelovanju TX-100 (0,5%, 30 sekundi), fiksirali ih u 4% PFA, i tek potom obilježili odgovarajućim protutijelom i pratili konfokalnom mikroskopijom (slika 33).



Slika 33. Učinak TX-100 na uklanjanje membranskih makromolekula iz fibroblasta Balb 3T3. Stanice Balb3T3 su na ledu 45 sekundi tretirane s 0,5% TX-100, fiksirane u hladnom PFA (4%), te vizualizirane nakon vezivanja odgovarajućeg mPt (ili liganda) i sekundarnog protutijela. CTxB – kolera toksin, podjedinica B; *mf* – *misfolded*. Debljina snimka (*z*) = 0,5 μ m.

Kontrolnim stanicama je dodan samo PBS nakon čega su fiksirane bez naknadne permeabilizacije, te je stoga vizualizirana samo površina. Kao i u prethodnoj slici, možemo uočiti da se TfR i konformirane MHC-I molekule uklanjaju iz stanice, dok se GM₁ (CTxB) i nekonformirane MHC-I molekule (nativne L^d i *misfolded* L^d i D^d) uočavaju prvenstveno u njezinoj unutrašnjosti. Naime, zbog jakog citoplazmatskog signala površina se slabije uočava, kao što je ranije objašnjeno (odjeljak 4.1.1.2.). Ovaj rezultat ukazuje da se lokalizacija površinskih molekula u određenim membranskim mikrodomenama općenito zadržava u i staničnoj unutrašnjosti, a o čemu će kasnije biti više govora.

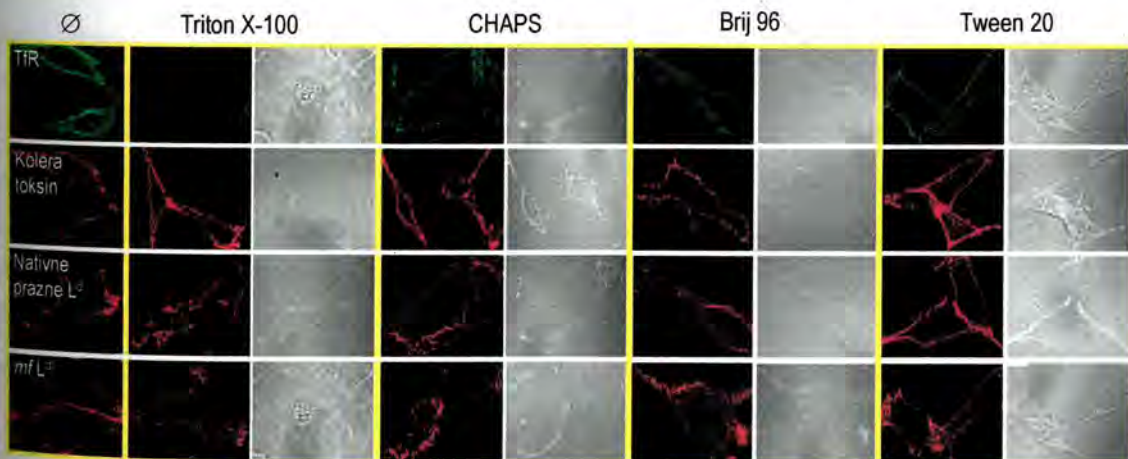
Tablica 5. Sumaran učinak tretmana neionskim detergentima na prisustvo površinskih molekula u lipidnim splavima

MOLEKULA	DETERGENT							
	TRITON X-100		Brij 96		CHAPS		Tween 20	
	Učinak	Konc./ vrijeme	Učinak	Konc./ vrijeme	Učinak	Konc./ vrijeme	Učinak	Konc./ vrijeme
Transferinski receptor	+	0,5 % 30"	+/-+	0,5 % 1-3'	+/-+	2 % 30" – 2'	+ → -	2 % 2-3'
GM1	-		-		-		-	
Nativne prazne L ^d	-/+		-		-		-	
Misfolded L ^d	-		-/+		+-			

+ uklanjanje; - nema učinka

Kao dodatnu potvrdu da se nekonformirane molekule L^d nalaze u lipidnim splavima, native i *misfolded* prazne molekule L^d smo obilježili protutijelom 64-3-7 i izložili različito vrijeme ispitivanim koncentracijama neionskih detergenata TX-100, Brij 96, CHAPS i Tween 20 (tablica 5, sjenčano su prikazane reprezentativne kombinacije koncentracije i vremena djelovanja). Naime, kao je ranije opisano (poglavlje 2.1.), neke molekule se mogu nalaziti u lipidnim splavima koje su otporne na djelovanje jednog detergenta, a neotporne na djelovanje drugog (TX-100 splavi, Lubrol X splavi i sl.), i obrnuto. To može ovisiti kako o vrsti lipidne splavi, tako i o ispitivanoj molekuli (4, 23, 24).

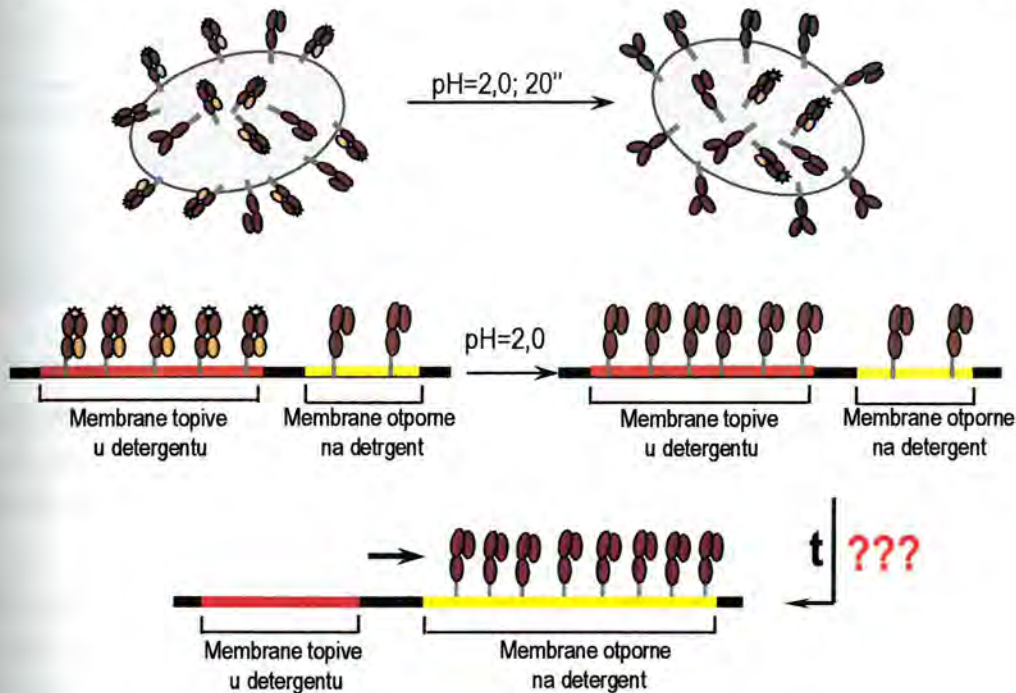
Možemo uočiti da najjači učinak ima TX-100, što je potvrđeno i u literaturi (23). Ipak, njegovo djelovanje na native prazne molekule L^d je teže utvrditi, prvenstveno zbog njihova slabog površinskog izražaja u kontroli (tablica 5). No, za razliku od TfR, *misfolded* molekule L^d se ne uklanjaju nakon tretmana ovim detergentom, jednako kao niti GM_1 . Ipak, treba naglasiti da u nekim slučajevima TfR ostaje prisutan u obrascu koji nalikuje nakupinama («vezikulama») neposredno ispod PM (moguće je da se radi o klatrinskim jamicama). Brij 96 i CHAPS ubrajaju se u skupinu umjereno jakih detergenata, iako je CHAPS nešto jači. No, rezultati s CHAPSom su diskutabilni obzirom da znatno narušava strukturu stanice i stanične membrane, te često izgleda da se molekule teže ispiru (s TfR su dobiveni šaroliki rezultati, od potpunog uklanjanja, do gotovo nikakvog učinka). Suprotno tome, rezultati dobiveni s Brij 96 su više kontinuirani i ponovo ukazuju na nazočnost nekonformiranih molekula L^d u lipidnim splavima. Tween 20 pripada skupini najslabijih detergenata (23) što se može vidjeti i iz naših rezultata. Naime, on je samo slabo ispirao TfR, ne djelujući na GM_1 i nekonformirane molekule L^d (2%, 3 min). Zanimljivo je da je doveo čak do pojačanja izražaja nativnih nekonformiranih molekula L^d (slika 34). Ipak, zbimi rezultati s neionskim detergentima ponovo ukazuju da se nekonformirane molekule L^d nalaze u lipidnim splavima (slika 34 i tablica 5), te da se TfR i nekonformirane molekule L^d nalaze u različitim domenama na staničnoj membrani (nije prikazano).



Slika 34. Učinak neionskih detergenata na uklanjanje TfR, GM_1 i nekonformiranih molekula L^d sa stanične površine fibroblasta Balb 3T3 nakon vezivanja mPt (liganda). Na površinu stanica Balb 3T3 je vezano odgovarajuće mPt ili ligand ($4^{\circ}C$), nakon čega su na ledu tretirane neionskim detergentima (koncentracija i vrijeme prikazani su u tablici 5). Stanice su potom fiksirane u hladnom PFA (4%), te obilježene sekundarnim protutijelom. Debljina snimka (z) = $0,5 \mu m$.

U prethodnim eksperimentima smo pokazali da se *misfolded* molekule L^d nalaze u lipidnim splavima. Njih prepoznaje protutijelo 64-3-7 koje ne razlikuje nativnu i *misfolded* konformaciju, te se nakon obilježavanja uz njih vizualiziraju i one nastale iz nativnih nekonformiranih L^d .

Ipak, treba naglasiti da je broj nativnih nekonformiranih molekula znatno manji od *misfolded* (3-4 puta), prvenstveno zbog većeg izražaja punih molekula na staničnoj površini (slika 25). Dakle, obzirom da *misfolded* molekule L^d uglavnom potječu od konformiranih, koje se ne nalaze u lipidnim splavima, odmah po zakiseljavanju većina novonastalih molekula bi se također trebala nalaziti izvan lipidnih splavi. Obzirom da smo pokazali da se nalaze u DRM, u sljedećim pokusima pokušali smo utvrditi nakon koliko vremena se u njih premještaju (slika 35).

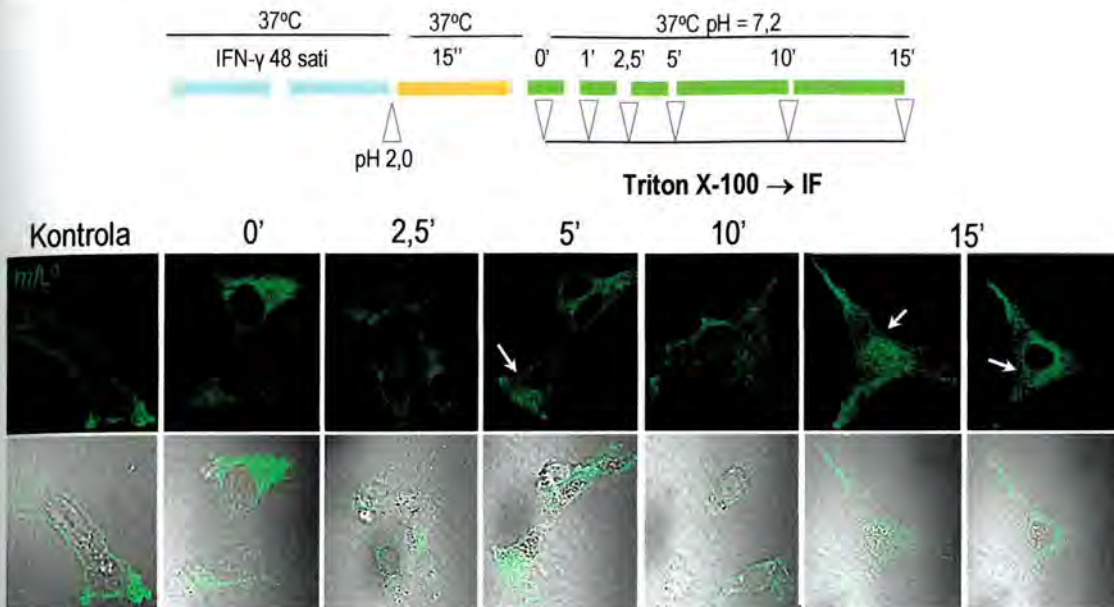


Slika 35. Hipoteza premještanja *misfolded* molekula L^d iz DSM u DRM neposredno nakon promjene konformacije.

Nakon promjene stabilne konformacije u nestabilnu "misfolded" molekule se premještaju u membransku mikrodomenu koja odgovara novoj konformaciji, te se ne uklanjaju nakon djelovanja TX-100.

Kako bismo odgovorili na to pitanje, stanice smo kratkotrajno zakiselili. Dio smo odmah izložili djelovanju TX-100 (0,5%, 30 sekundi), a ostatak inkubirali u svježem mediju pH=7,4 te nakon naznačenog vremena dodali detergent. Nakon djelovanja TX-100 stanice su fiksirane i proslijeđene za protokol imunofluorescencije i konfokalnu mikroskopiju. Kako kontrola su korištene odmah po zakiseljavanju fiksirane stanice. Možemo vidjeti da se na stanicama koje su tretirane TX-100 neposredno nakon zakiseljavanja nekonformirane molekule L^d izražavaju samo u lipidnim splavima citoplazmatskih organela (vjerojatno nativne nekonformirane L^d), dok je membrana negativna. Jednako je i nakon 1, odnosno 2,5 minute. No, nakon 5 minuta može se zapaziti slabo bojanje citoplazme, koje postaje dominantnije nakon 10 i 15 minuta (slika 36). Ova pojava ipak nije istodobno zapažena u svim stanicama. Naime, nakon 15 minuta slika je vrlo šarolika, te uz stanice na kojima se jasno uočava površinska ekspresija, uočavaju se i one u kojima se vide samo citoplazmatski odjeljci. Bitno je istaknuti

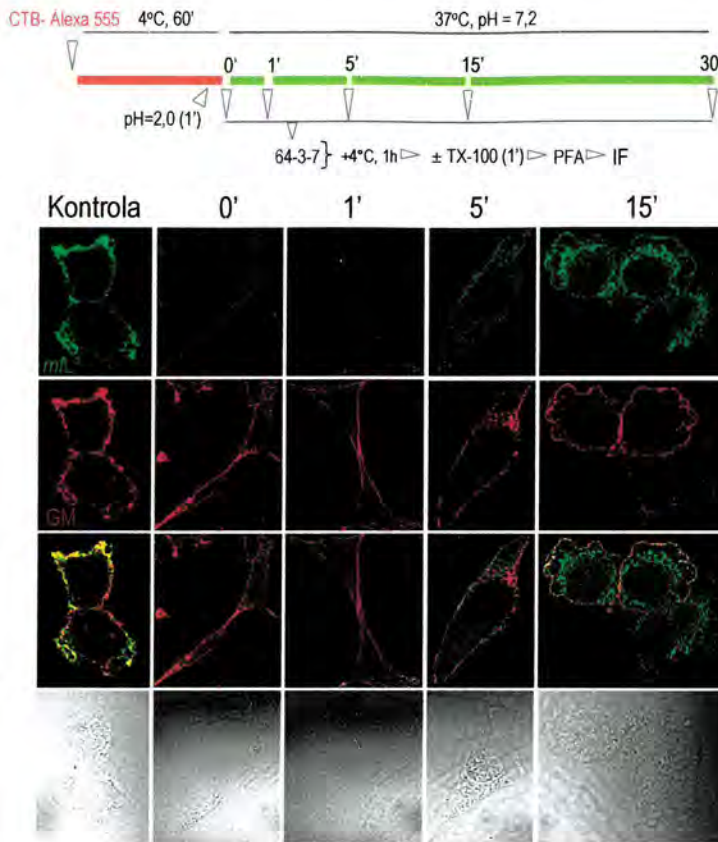
da postoji mogućnost da je zbog jakog obilježavanja citoplazme površina teže uočljiva i kinetiku oporavka i premještanja u DRM je stoga teže uočiti.



Slika 36. Kinetika premještanja *misfolded* molekula L^d iz DSM u DRM neposredno nakon promjene konformacije (praćenje ukupnog staničnog izražaja). Ballb 3T3 stanice su izložene djelovanju pH 2,0 (20 sekundi), nakon čega su inkubirane u mediju fiziološkog pH navedeno vrijeme. Potom su na ledu tretirane s TX-100 (0,5%, 45 sek.), te fiksirane i vizualizirane konfokalnom mikroskopijom nakon IF obilježavanja. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

U drugom protokolu smo, za razrješavanje istog problema premještanja *misfolded* molekula L^d u lipidne splavi, pratili samo površinske molekule zajedno s CTxB (GM_1). Nakon obilježavanja površinskih molekula GM_1 fluorescentno konjugiranom podjedinicom B toksina kolere (4°C, 1h), stanice smo kratkotrajno zakiselili kako bismo potaknuli stvaranje *misfolded* konformacije. Jednom dijelu stanica smo odmah dodali mPt 64-3-7 i prebacili na 4°C pretpostavljajući da na toj temperaturi molekule nisu mobilne (ili im je mobilnost znatno smanjena), odnosno da ne prelaze iz jedne u drugu domenu stanične membrane. Ostalim uzorcima stanica smo dodali svjež medij pH=7,4 i inkubirali ih dodatnih 1, 5, 15 i 30 minuta na 37°C. Nakon navedenog vremena stanice su izložene djelovanju TX-100 (0,5%) kao u prethodnim pokusima, fiksirane, te prosljeđene za imunofluorescenciju i konfokalnu mikroskopiju. Na slici 37 možemo uočiti da CTxB (GM_1) ostaje vezana na površini, dok se *misfolded* molekule L^d zamjetnije počinju pokazivati tek nakon 5, odnosno 15 minuta. Slabiji signal u početku i nakon 1 minute koji bi mogao odgovarati površini može potjecati od *misfolded* molekula L^d koje su nastale od nativnih nekonformiranih i već se nalaze u lipidnim splavima.

Ovi rezultati ukazuju da se *misfolded* molekule L^d , od kojih je većina smještena u DSM (izvan lipidnih splavi), premješta u DRM i nakon 5 minuta mogu se uočiti u područjima membrane otpornim na djelovanje TX-100, što se pojačava nakon 10 i 15 minuta.



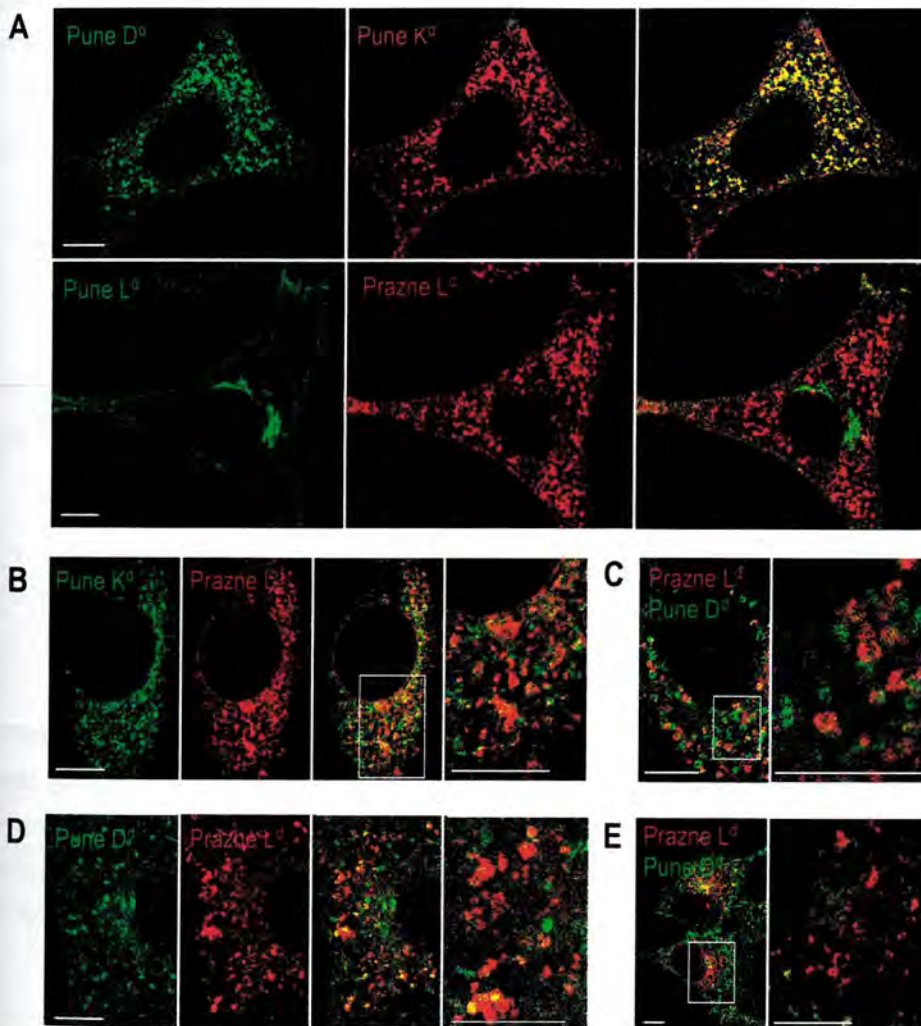
Slika 37. Kinetika premještanja *misfolded* molekula L^d iz DSM u DRM neposredno nakon promjene konformacije (praćenje površinskog izražaja). Stanice Balb 3T3 su površinski obilježene CTxB-Alexa 555 (crvena fluorescencija). Nakon kratkotrajnog zakiseljavanja i promjene konformacije, stanicama je vraćen medij fiziološkog pH navedeno vrijeme, te su površinski obilježene nekonformirane (nativne i *misfolded*) molekule L^d (4°C , 1h). Nakon djelovanja TX-100 stanice su fiksirane i prazne molekule L^d vizualizirane pomoću sekundarnog protutijela (protu-mišji IgG_{2b} Alexa 488, zelena fluorescencija). Mjerna crta = 10 μm . Debljina snimka (z) = 0,5 μm .

4.1.2.2. Unutarstanična kolokalizacija različitih konformacija MHC-I molekula

Obzirom da je pokazano da se MHC-I molekule nalaze u različitim mikrodomenama na staničnoj površini, te da se MHC-I molekule unutar stanice izražavaju u različitim obrascima, ispitali smo njihovu međusobnu kolokalizaciju obzirom na pripadnost određenoj konformaciji i alelu.

Jednako kao i na staničnoj površini, konformirane molekule K^d i D^d se vrlo intenzivno kolokaliziraju, kako perinuklearno, tako i vezikularno, bez obzira na obrazac citoplazmatskog izražaja. Na slici 38a prikazana je jaka citoplazmatska kolokalizacija vezikula obrasca C. No, konformirane molekule K^d se s punim molekulama L^d kolokaliziraju samo u jukstanuklearnom dijelu (GA i/ili RE), što je i očekivano, obzirom da je to uglavnom jedino mjesto njihovog unutarstanične ekspresije (nije prikazano). Iako se konformirane molekule K^d i D^d , jednako kao i nekonformirane molekule L^d , uglavnom nalaze zastupljene u obrascu vezikula B i C (slika 25), vezikule obrasca C praznih molekule L^d se vrlo slabo kolokaliziraju s molekulama K^d i D^d koje se nalaze u vezikulama te veličine

(slike 38b-e). Međutim, kolokalizacija praznih molekula L^d s molekulama D^d , nerijetko se može zapaziti perifernije, i to između vezikula obrasca B (slika 38d). Ova razlika u stupnju kolokalizacije konformiranih i nekonformiranih molekula određenog tipa vezikula bi mogla biti posljedica njihovog odjeljivanja u određenoj točki endocitoznog puta, što je problem koji će se kasnije detaljnije razmatrati. Ipak, bitno je naglasiti da se ove molekule mogu naći u istim odjeljcima (često multivezikularnim tipa C), ali u različitim domenama (nije prikazano), što ukazuje na njihovu separaciju već unutar samih vezikula. Kolokalizacija punih i praznih molekula L^d može se uočiti samo u perinuklearnom području, ali samo u dijelu koje potpuno isključuje vezikule u kojima se nalaze nekonformirane molekule L^d (slika 38a). Vrlo rijetko, kada se pune molekule L^d vide vezikularno, povremena kolokalizacija se može uočiti (nije prikazano).



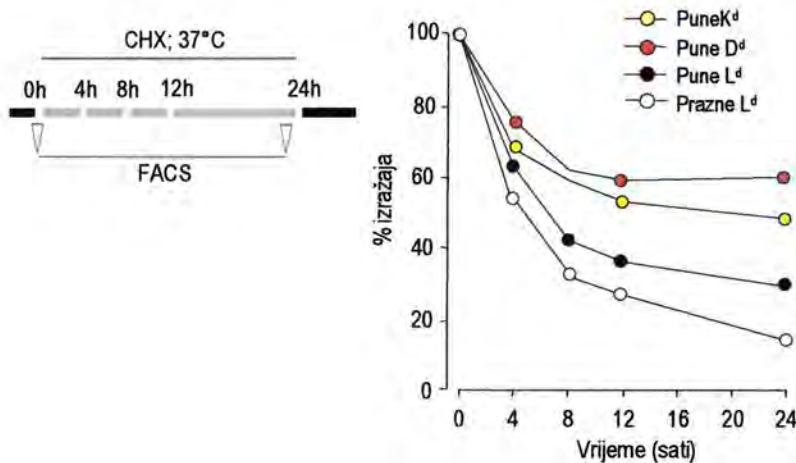
Slika 38. Unutarstanična kolokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula na stanicama Balb 3T3.

MHC-I molekule na stanicama Balb3T3 su nakon fiksacije i permeabilizacije međusobno kolokalizirane ranije navedenim mPt. Nakon obilježavanja odgovarajućim sekundarnim protutijelom (protu-mišji IgG_{2a} Alexa 488, zelena fluorescencije), odnosno protu-mišji IgG_{2b} Alexa 555 (crvena fluorescencije)), molekule su vizualizirane konfokalnom mikroskopijom. Žutom bojom su prikazana mjesta kolokalizacije. Mjerna crta = 10 μ m. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

Ovi rezultati ukazuju da se konformirane i nekonformirane MHC-I molekule nalaze u različitim membranskim mikrodomenama, kako na površini, tako i u staničnoj unutrašnjosti, ali često i u različitim unutarstaničnim odjeljcima. Stoga separacija u različite citoplazmatske vezikule jednim dijelom može upravo biti posljedica njihove različite lokalizacije na staničnoj membrani i različitog usmjeravanja u endocitoznom putu o čemu će se raspravljati u narednim odjeljcima.

4.2. ENDOCITOZA I VEZIKULARNI TRANSPORT POVRŠINSKIH GLIKOPROTEINA I RECEPTORA

Kao što smo već opisali u našim ranijim radovima (157, 158), MHC molekule I razreda se uklanjaju sa stanične površine, kako fibroblastnih staničnih linija (Balb 3T3, MEF, L-L^d) tako i sa stanica mastocitoma P815. Nadalje, kinetika njihovog uklanjanja ovisi prvenstveno o konformaciji (nekonformirane molekule se uklanjaju sporije), a manje o alelu. Najbrže se uklanjaju molekule L^d, dok najsporije molekule D^d, iako i molekule K^d prate njima sličnu kinetiku (slika 39).



Slika 39. Kinetika uklanjanja MHC-I molekula sa površine stanica P815. Stanicama koje su rasle u kulturi dodan je cikloheksimid (CHX) u koncentraciji 15 $\mu\text{g/ml}$, te su u naznačenom vremenu uzeti uzorci i analizirani indirektnom imunofluorescencijom na protočnom citometru. Rezultati su prikazani kao % izražaja koji predstavlja omjer srednjeg intenziteta fluorescencije (*mean fluorescence intensity*, MFI) u ispitivanom i nultom vremenu pomnožen sa 100. Od svake vrijednosti MFI oduzeta je vrijednost negativne kontrole koju predstavlja inkubacija stanica samo sa sekundarnim protutijelom.

U daljem stupnju našeg istraživanja željeli smo utvrditi da li smještaj površinskih receptora u određenoj mikrodomeni stanične membrane utječe na način njihove endocitoze i unutarstanične sudbine internalizirane molekule. Nadalje, istražili smo kako unutarstanični put ispitivanih molekula ovisi s jedne strane o njihovoj vrsti i načinu endocitoze, a s druge strane o konformaciji (konformirane i nekonformirane molekule).

4.2.1. Endocitoza površinskih glikoproteina i receptora

Kao što je ranije opisano, smještaj proteina u različitim mikrodomenama stanične membrane često ima važnu ulogu u načinu njihovog endocitiranja (28). Prema tome, molekule smještene u klatrinskim jamicama internaliziraju se prvenstveno klatrinskom endocitozom, a molekule smještene u lipidnim splavima i kaveolama - endocitozom ovisnom o lipidnim splavima, odnosno kaveolarnom endocitozom, najbolje istraženom tom vrstom endocitoze (28). Ipak, nije isključeno da se molekule koje se nalaze u lipidnim splavima endocitiraju klatrinskom endocitozom i obrnuto (37, 38, 39, 40). No, većina molekula se ne internalizira niti na jedan od dosad opisanih načina, već mehanizmima koji su gotovo nepoznati i općenito podrazumijevaju endocitozu neovisnu i o klatrinu i o lipidnim splavima, tzv. *bulk pathway* (51, 52, 53).

Stoga smo se u ovom dijelu našeg istraživanja puta membranskih proteina (MHC-I molekula, TfR i CTxB) posvetili ispitivanju načina njihovog puta uklanjanja sa stanične membrane koristeći prvenstveno modele koji podrazumijevaju praćenje neto gubitka molekula sa stanične membrane protočnom citometrijom nakon inhibicije njihove sinteze cikloheksimidom (CHX), odnosno nakon površinskog obilježavanja odgovarajućim mPt ili ligandom (slike 21a i 39). Nadalje, nakon obilježavanja površinskih molekula odgovarajućim mPt ili ligandom, internalizirane molekule se mogu pratiti i konfokalnom mikroskopijom. Često je, osobito kada su u pitanju MHC-I molekule, na kraju ispitivane kinetike potrebno kratkotrajnim zakiseljavanjem ukloniti neinternalizirane molekule kako površinska fluorescencija ne bi ometala unutarstanični signal (slika 21b). Na kraju, membranske proteine smo također površinski obilježili biotinom, te kinetiku njihovog uklanjanja u stanici pratili metodom imunoprecipitacije (slika 21c). U svim protokolima u kojima se koristilo površinsko obilježavanje (mPt, ligand, biotin) stanice su dodatno, prije početka eksperimenta, tretirane inhibitorima koji su i bili prisutni u mediju tijekom cijelog vremena (157, 158). U našim eksperimentima smo kod korištenja svih inhibitora vodili računa o vijabilnosti koja je uglavnom iznosila 85-90%. Nadalje, nakon protočne citometrije u analizu nisu uzete u obzir nevijabilne stanice (pozitivne na propidij-iodid).

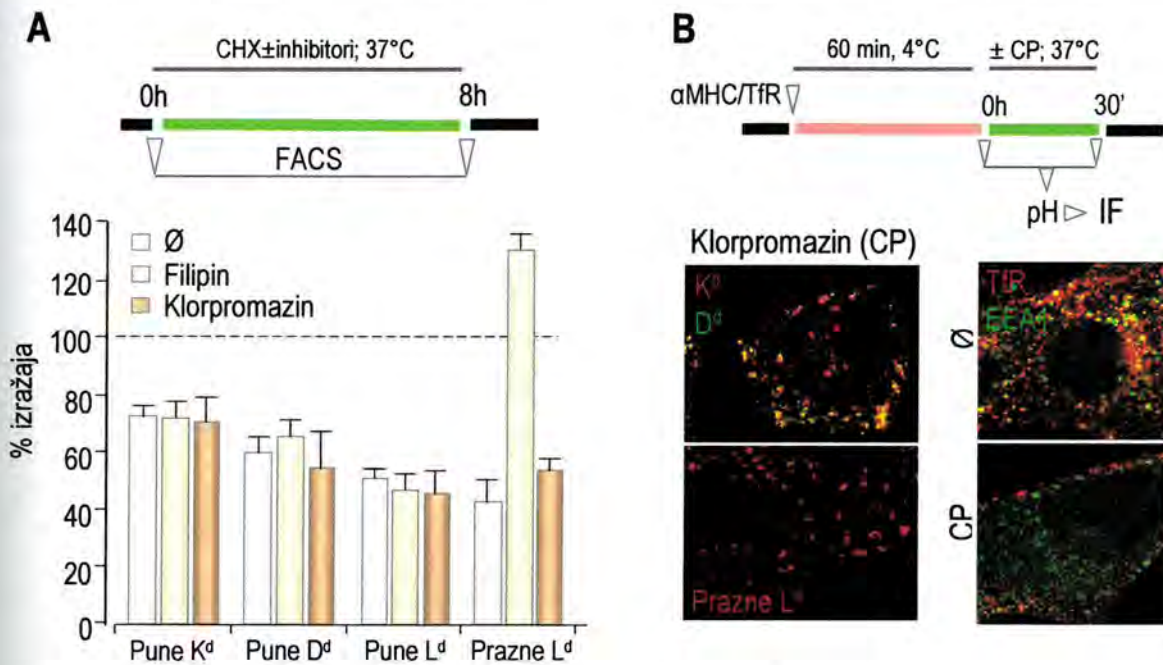
4.2.1.1. Klatrinska endocitoza

Klatrinska endocitoza je dosad najbolje istražen mehanizam endocitoze, a jedna od molekula za koju je dokazano da se endocitira na taj način je TfR (232), u našim istraživanjima uglavnom korišten kao kontrolna molekula. *Klorpromazin* (CP), tvar koja onemogućuje vezivanje klatrinskih triskeliona za citoplazmatski dio stanične membrane i potaknute klatrinske endocitoze (233, 234) korišten je kao inhibitor ovog načina endocitoze. Ispitivanje smo proveli na stanicama P815 (bez prethodnog tretmana IFN γ) metodom protočne citometrije, te na Balb3T3 fibroblastima (tretiranim IFN γ) metodom konfokalne mikroskopije.

Stanicama P815 smo dodali CHX (15 μ g/ml), samostalno ili u kombinaciji s CP (7,5 μ g/ml). Odmah po dodavanju CHX (\pm inhibitor), te nakon 8 sati odredili smo površinsku izraženost molekula L^d na protočnom citometru (slika 40a), te smo ustanovili da CP nema znatniji učinak na kinetiku internalizacije niti jedne nativne konformacije MHC-I molekula.

Kako bismo potvrdili dobiveni rezultat stanice Balb3T3 smo pretretirali CP (8 $\mu\text{g/ml}$) 30 minuta na 37°C, nakon čega smo na njih površinski vezali mPt koje prepoznaje odgovarajuću konformaciju i alel MHC-I molekula, odnosno TfR (R17). Nakon 30 minuta internalizacije, sa ili bez CP, molekule su imunofluorescentno obilježene i praćene na konfokalnom mikroskopu. U nazočnosti CP MHC-I molekule se internaliziraju (slika 40b) jednako kao i bez inhibitora (nije prikazano). Za razliku od njih, usljed djelovanja CP, TfR ostaje vezan na staničnoj površini, dok se u kontrolnom uzorku vidi internaliziran u stanici znatno kolokaliziran s molekulom EEA1 (markerom ranih endosoma) (slika 40c).

Prema ovim rezultatima možemo zaključiti da se MHC-I molekule ne endocitiraju mehanizmom klatriinske endocitoze za razliku od TfR.

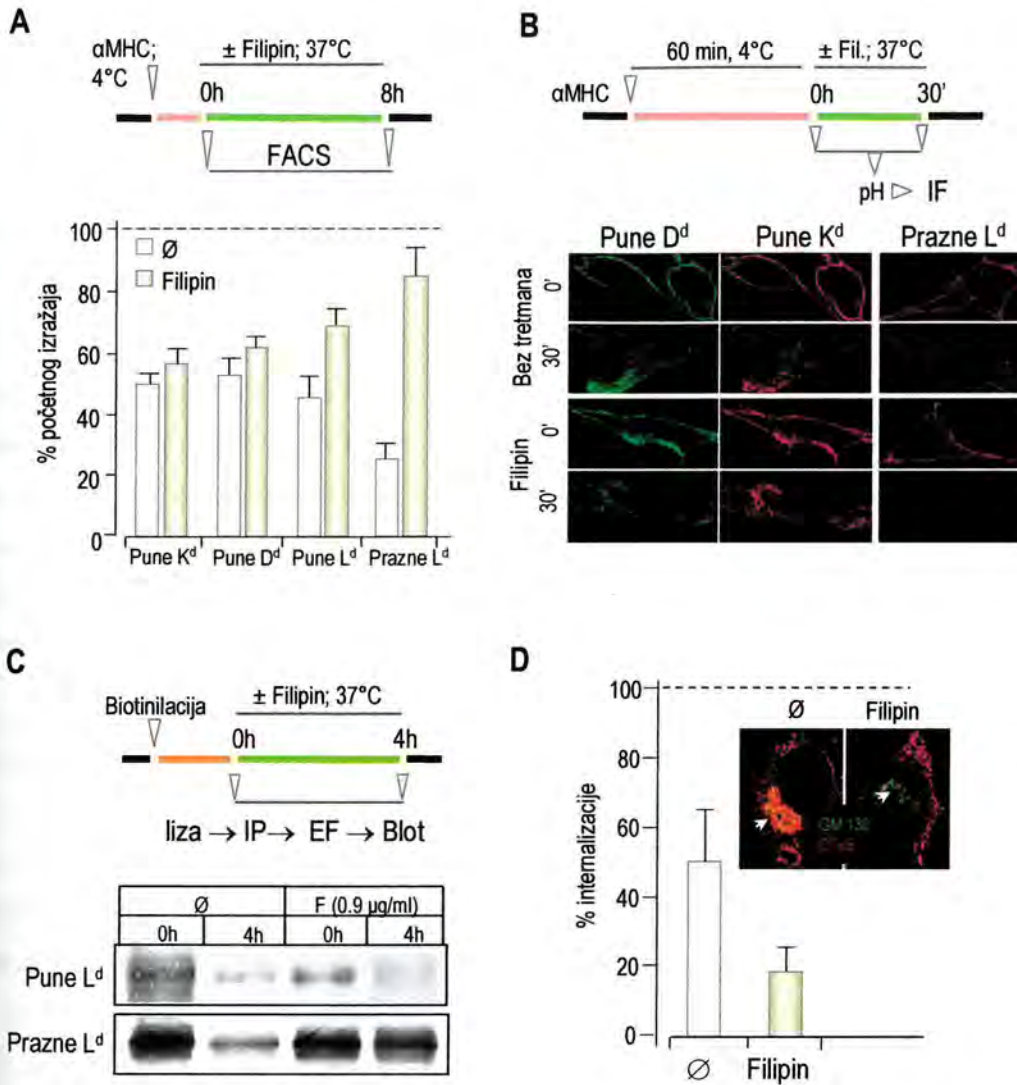


Slika 40. Učinak filipina i klorpromazina na internalizaciju nativnih MHC-I molekula. (A) Stanicama P815 koje su rasle u kulturi dodan je cikloheksimid (CHX) u koncentraciji 15 $\mu\text{g/ml}$, samostalno, ili u kombinaciji s filipinom (1 $\mu\text{g/ml}$) ili klorpromazinom (7,5 $\mu\text{g/ml}$). Površinski izražaj MHC-I molekula je određen nakon 8 sati metodom protočne citometrije. Isprekidana linija predstavlja početni izražaj (100%), a vrijednosti predstavljaju prosječnu vrijednost dobivenu iz tri neovisna eksperimenta, a prikazana je varijacija između uzoraka. (B) Nakon površinskog vezivanja odgovarajućeg mPt (4°C), stanice Balb3T3 su inkubirane u svježem mediju ($\pm\text{CP}$), te su nakon 30 minuta međusobno kolokalizirane MHC-I molekule (dolje lijevo), ili TfR i EEA1 (dolje desno). Debljina snimka (z) = 0,5 μm .

4.2.1.2. Endocitoza ovisna o lipidnim splavima

Dok je nazočnost molekula klatriina osnovno za integritet klatriinskih jamica i klatriinsku endocitozu, tako je kolesterol ključan za održavanje strukture lipidnih splavi (4, 11, 12). Prema tome, tvari koje uklanjaju kolesterol is stanične membrane, narušit će i endocitozu ovisnu o lipidnim splavima. Jedna od njih koja se najčešće koristi

je filipin koji stvara komplekse sa sterolima (36). S druge strane, methyl- β -ciklodekstrin (m- β -CD) dovodi do ekstrakcije kolesterola, ali nije uvijek lipid-specifičan, te može imati učinka i na klatrinsku endocitozu (235).



Slika 41. Učinak inhibitora endocitoze posredovane lipidnim splavima na internalizaciju nativnih MHC-I molekula.

(A) Stanice P815 su površinski obilježene odgovarajućim mPt (4°C; 1 sat) i zatim 8h inkubirane u svježem mediju sa ili bez filipina (1 μ g/ml). Preostala mPt vezana na staničnoj površini određena su protu-mišjim Ig FITC i protočnom citometrijom. Isprekidana linija predstavlja početni izražaj. (B) Nakon površinskog vezivanja odgovarajućeg mPt (4°C), stanice Balb 3T3 su inkubirane u svježem mediju (\pm filipin), te su nakon 30 minuta vizualizirane imunofluorescencijom i konfokalnom mikroskopijom. (C) Stanice P815 su površinski biotinilirane i inkubirane 4 sata u mediju (\pm filipin) nakon čega su iz staničnog ekstrakta (1% NP40) imunoprecipitirane molekule L^d i prikazane kemiluminiscencijom. (D) Učinak filipina na endocitozu CTxB-FITC. Stanice P815 su pretretirane filipinom (1 μ g/ml tijekom 90 min) nakon čega je dopuštena internalizacija CTxB-FITC 45 min. Zaostali, neinternalizirani, CTxB-FITC je uklonjen kratkotrajnim zakiseljavanjem, te je postotak unutarstanične CTxB-FITC određen protočnom citometrijom. Prikazana je srednja vrijednost od 5 eksperimenata i varijacija. Umetak: Kolokalizacija CTxB-Alexa 555 s GM130 (GA) nakon 30 minuta internalizacije (\pm filipin 1 μ g/ml). Strelica prikazuje nazočnost odnosno odsustvo CTxB u GA. \emptyset – bez tretmana. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

Na žalost, ovi inhibitori često dosta narušavaju i integritet stanične membrane, te se samo parcijalno uklanjanje kolesterola može postići pod uvjetima koji održavaju staničnu vijabilnost. Ipak, kako je rečeno, u našim eksperimentima su analizirane samo vijabilne stanice, a koncentracije su titrirane tako da se postigne maksimalna učinkovitost uz maksimalnu vijabilnost.

Kao kontrolnu molekulu za praćenje endocitoze ovisne o lipidnim splavima koristili smo podjedinicu B kolera toksina (CTxB) za koju je poznato da u stanicu uglavnom ulazi mehanizmom kaveolarne endocitoze nakon vezivanja za receptor GM₁ (dakle, ovisno o lipidnim splavima), iako može i klatrinskim mehanizmom, ovisno o uvjetima i o staničnoj liniji (40, 41, 42, 43).

Na slici 40a možemo uočiti da filipin (1 µg/ml) ne zaustavlja endocitozu konformiranih MHC-I molekula (osim blago molekula D^d) u stanicama P815 tretiranim 8 sati cikloheksimidom. Međutim, filipin ne samo zaustavlja, već i pojačava izražaj nekonformiranih molekula L^d. Kako bismo potvrdili ovaj rezultat, stanice P815 (pretretirane filipinom 30 minuta) smo površinski obilježili odgovarajućim protu-MHC-I protutijelom te inkubirali u svježem mediju sa ili bez filipina 8 sati, a površinske molekule vizualizirali pomoću sekundarnog protutijela (protu-mišje IgG FITC). Filipin je ponovo onemogućio endocitozu nekonformiranih molekula L^d, ne djelujući znatnije na konformirane MHC-I molekule (slika 41a).

Nadalje, da native nekonformirane molekule L^d zahtijevaju nazočnost domena bogatih kolesterolom pokazuju i rezultati dobiveni na fibroblastima Balb 3T3 konfokalnom mikroskopijom nakon praćenja internalizacije protutijela vezanog za konformirane molekule K^d i D^d, u odnosu na internalizaciju protutijela vezanog na nekonformirane molekule L^d. Naime, filipin je ponovo inhibirao ulazak nekonformiranih MHC-I molekula u stanicu, dok su se konformirane MHC-I endocitirale (slika 41b). Odsustvo internaliziranih MHC-I molekula vidi se kao neprisustvo signala obzirom da su stanice nakon dopuštene internalizacije kratkotrajno zakiseljene (pH=2,0, 1 min) kako bi se uklonilo ne-endocitirano površinsko protutijelo. Kontrolne stanice koje su fiksirane na početku kinetike nisu prikazane zakiseljene, te se na njihovoj površini vidi protutijelo, što znači da inhibitor nije omeo proces vezivanja (pH=7,4).

Filipin, pored navedenog, sprječava i degradaciju praznih molekula L^d ali ne i punih molekula L^d četiri sata nakon površinske biotinizacije, (slika 41c). Dapače, signal punih molekula L^d je čak i nešto slabiji nakon djelovanja filipina o čemu će se raspravljati kasnije u sklopu mogućnosti transformacije jedne konformacije u drugu.

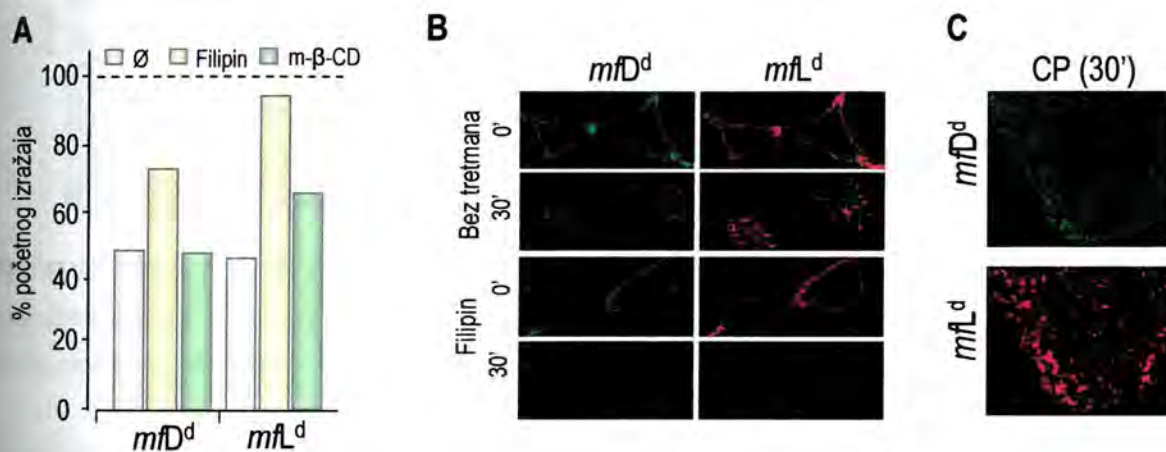
Kao kontrola učinka filipina korištena je CTxB. Filipin je znatno usporio internalizaciju CTxB na stanicama P815 (slika 41d) ali i stanicama Balb 3T3 (slika 41d, umetak), pa se nakon 30 minuta internalizacije ne kolokalizira s GM130, odnosno ne ulazi u GA, odjeljak u se koji CTxB normalno usmjerava (kontrolne stanice).

4.2.1.3. Endocitoza misfolded MHC-I molekula

Prikazani rezultati ukazuju da narušavanje integriteta lipidnih splavi prvenstveno ometa endocitozu nativnih nekonformiranih molekula L^d. Stoga smo se pitali vrijedi li isto i za *misfolded* MHC-I molekule. Stoga smo ispitali kako filipin i metil-β-ciklodekstrin (m-β-CD) djeluju na endocitozu *misfolded* molekula L^d i D^d u stanicama

p815 tretiranim s CHX. Nakon 8 sati filipin je potpuno onemogućio endocitozu *misfolded* molekula L^d, te znatno usporio endocitozu *misfolded* molekula D^d. No, m-β-CD nije imao tako jak učinak: on je samo usporio endocitozu *misfolded* molekula L^d ali nije djelovao na endocitozu *misfolded* molekula D^d (slika 42a). Ipak, što se tiče protutijela koje prepoznaje *misfolded* konformaciju D^d moramo imati na umu da ono može prepoznati i konformirane molekule D^d od kojih su se neke održale nakon tretmana zakiseljavanja, a na čiju internalizaciju filipin ne djeluje.

Nadalje, konfokalnom mikroskopijom, u istom pokusu koji je prikazan na slici 41b, ustanovili smo da je filipin ponovo inhibirao ulazak *misfolded* MHC-I molekula u stanicu, dok su se konformirane MHC-I endocitirale (slika 42b). Suprotno tome, istom metodom možemo uočiti da se *misfolded* MHC-I molekule endocitiraju u nazočnosti klorpromazina, što je rezultat koji pokazuje da *misfolded* MHC-I molekule ne ulaze u stanicu mehanizmom klatrinske endocitoze (slika 42c).



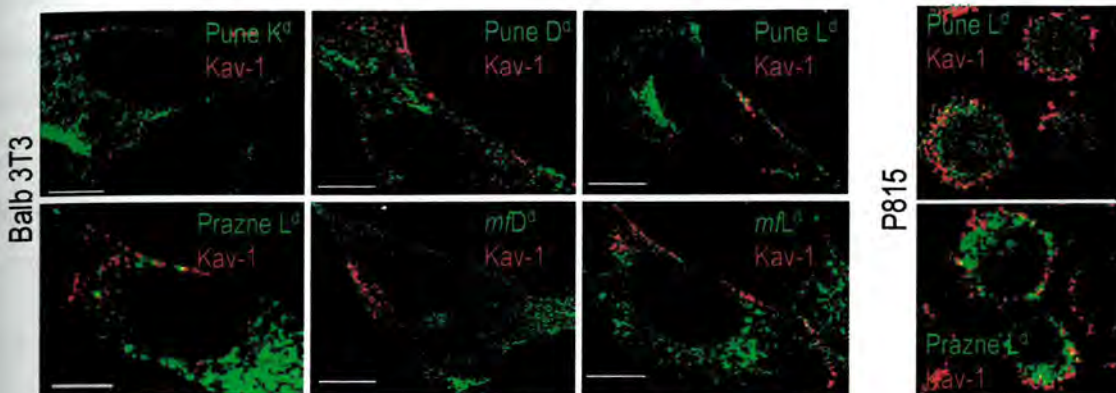
Slika 42. Učinak inhibitora endocitoze na internalizaciju *misfolded* MHC-I molekula. (A) Stanicama P815 koje su rasle u kulturi dodan je cikloheksimid (CHX) u koncentraciji 15 μg/ml, samostalno, odnosno u kombinaciji s filipinom (1 μg/ml) ili m-β-CD (7,5 mM). Površinski izražaj MHC-I molekula je određen nakon 8 sati metodom protočne citometrije. Isprekidana linija predstavlja početni izražaj (100%). Nakon površinskog vezivanja odgovarajućeg mPt (4°C), stanice su inkubirane u svježem mediju bez inhibitora, ili uz filipin (1 μg/ml) (B), odnosno CP (7,5 μg/ml) (C), te su nakon 30 minuta međusobno kolokalizirane MHC-I molekule. Prikazan je reprezentativan rezultat iz 3 neovisna pokusa. Ø – bez tretmana; F- filipin, CP- klorpromazin; m-β-CD – metil- β-ciklodekstrin, *mf-misfolded*. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Prema ovome možemo zaključiti da i native i *misfolded* nekonformirane MHC-I molekule za konstitutivnu endocitozu zahtijevaju nazočnost domena bogatih kolesterolom – lipidnih splavi, za razliku od konformiranih MHC-I molekula. Ovi su rezultati u skladu s prethodno dobivenim rezultatima koji ukazuju da se nekonformirane, ali ne i konformirane MHC-I molekule, nalaze u DRM, vjerojatno u lipidnim splavima.

4.2.1.4. Kaveolarna endocitoza

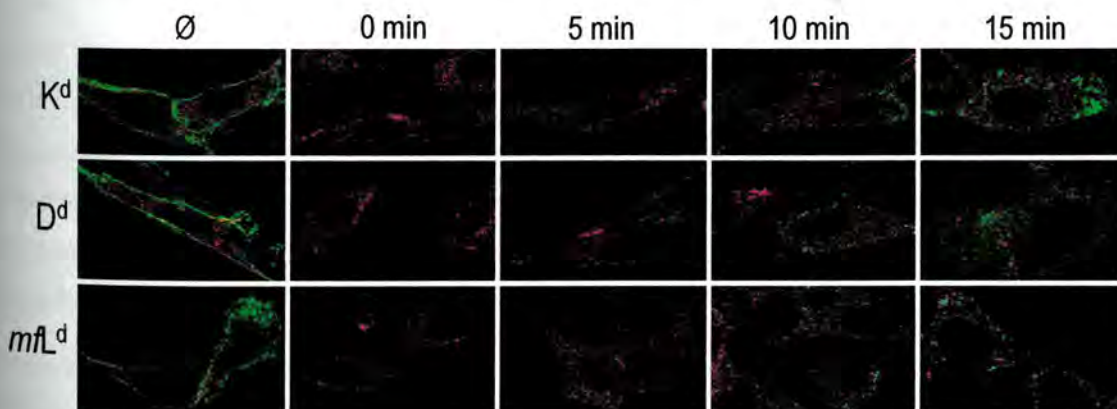
Obzirom da je kaveolarna endocitoza najbolje upoznat mehanizam kojim se mogu endocitirati molekule koje se nalaze u lipidnim splavima, ispitili smo da li se nekonformirane MHC-I molekule mogu ući u stanicu na taj način.

Kako je kaveolin-1 glavni protein koji se nalazi u kaveolama, ispitili smo da li se MHC-I molekule kolokaliziraju s njim na stanicama Balb 3T3 i P815. Međutim, ustanovili smo da se niti jedna konformacija i niti alel ispitivanih molekula ne kolokalizira s ovim proteinom (slika 43).



Slika 43. Kolokalizacija *steady state* MHC-I molekula s kaveolinom na stanicama Balb 3T3 i P815. MHC-I molekule su u stanicama Balb3T3, odnosno P815 kolokalizirane s kaveolinom-Cy3 (Kav-1, crvena fluorescencija). Mjerna crta = 10 μm . Debljina snimka (z) = 0,5 μm .

Nadalje, nakon internalizacije mPt vezanog za konformirane molekule K^d i D^d , odnosno *misfolded* molekule L^d , možemo također uočiti odsustvo kolokalizacije s kaveolinom-1 (slika 44). Suprotno tome, na istoj staničnoj liniji je pokazano da se CTxB znatno kolokalizira s kaveolinom-1 nakon 5-10 minuta internalizacije (nije prikazano).



Slika 44. Kolokalizacija internaliziranih MHC-I molekula s kaveolinom na stanicama Balb 3T3. Nakon vezivanja odgovarajućeg mPt (4°C, 1 sat) stanicama Balb 3T3 je dodan svjež medij, te su inkubirane na 37°C navedeno vrijeme. Potom su MHC-I molekule (zeleno fluorescencija) kolokalizirane s kaveolinom-Cy3 (crvena fluorescencija) i analizirane konfokalnom mikroskopijom. Debljina snimka (z) = 0,5 μm .

Stoga možemo zaključiti da, iako je endocitoza nekonformiranih MHC-I molekula ovisna o lipidnim splavima, ona se ne odvija mehanizmom kaveolarne endocitoze. Nadalje, konformirane MHC-I molekule ulaze u stanicu najvjerojatnije tzv. «masovnim putem» (engl. *bulk pathway*).

4.2.2. Vezikularni transport površinskih glikoproteina i receptora

Endosomalni sustav predstavlja međusobno povezanu i dinamičku mrežu organela koje se razlikuju prema biokemijskom sastavu i smještaju u stanici, a predmet opsežnog istraživanja je upravo način na koji se molekule usmjeravaju u određene odjeljke i što određuje njihovu sudbinu. Nas je zanimalo utječe li *smještaj u određenoj mikrodomeni na staničnoj površini* na endocitozno usmjeravanje internalizirane molekule, zadržavaju li se i dalje unutar stanice, te ima li, i u kojoj mjeri, utjecaj na konačnu sudbinu endocitirane molekule.

Podjela endocitoznih vezikula prema njihovom sastavu i ulozi se danas najčešće vrši prema određenim biljezima, koji se nalaze na njihovoj površini, a od kojih su najpoznatije Rab molekule, iako su poznati i drugi biljezi koje smo pratili u našim istraživanjima.

4.2.2.1. «Steady state» lokalizacija

U odjeljku 4.1. smo pokazali da se MHC-I molekule u citoplazmi mogu nalaziti u različitim obrascima, od kojih su oni vezikularni vrlo izraziti (slika 25). Kako bismo rasvijetlili njihovu ulogu pokušali smo im utvrditi povezanost s endocitoznim putem prateći da li se, i koliko, kolokaliziraju s markerima endosomalnih odjeljaka.

4.2.2.1.1. Kolokalizacija MHC-I molekula s markerima endosomalnih puteva

Neke molekule se mogu koristiti kao biljezi određenih endocitoznih putova obzirom da pokazuju sklonost usmjeravanju u određeni dio endocitoznog puta i/ili nagomilavanje u karakterističnom odjeljku. Primjer takve molekule je **transferinski receptor**, molekula koja se tijekom ustaljenog stanja (*steady state*) 60% nalazi u endosomima (uglavnom reciklirajućim), 20% na staničnoj površini (što je slabije vidljivo zbog jakog citoplazmatskog signala), dok je ostatak vjerojatno u biosintetskom putu (236). Prema tome, oko 80% citoplazmatskog obilježavanja se odnosi na reciklirajuće endosome. Tome bi uzrok mogao biti taj što izlazak TfR iz **ERC** predstavlja najsporiji korak tijekom njegova recikliranja, te stoga i predstavlja najsjajnu strukturu tijekom *steady state* (70). Stoga kolokalizacija s TfR uglavnom ukazuje da se ispitivana molekula slijedi put recikliranja, i to barem dijelom preko ERC.

Konformirane molekule, posebice konformirane D^d, se kolokaliziraju sa *steady state* TfR, često jako u jukstanuklearnom području, ali također i po citoplazmi (slika 45a). Velika je vjerojatnost da je znatan dio citoplazmatske kolokalizacije posljedica nazočnosti MHC-I molekula u sortirajućim endosomima (EEA1⁺), a kolokalizacija u jukstanuklearnom području rezultat prisustva MHC-I molekula u reciklirajućim endosomima (neki su od njih, a možda i veći dio, Rab11⁺, opisano kasnije). Ipak, stupanj kolokalizacije nije jednak u svim stanicama i vjerojatno ovisi o izražaju, kako MHC-I molekula, tako i TfR. Naime, za razliku od MHC-I molekula, TfR

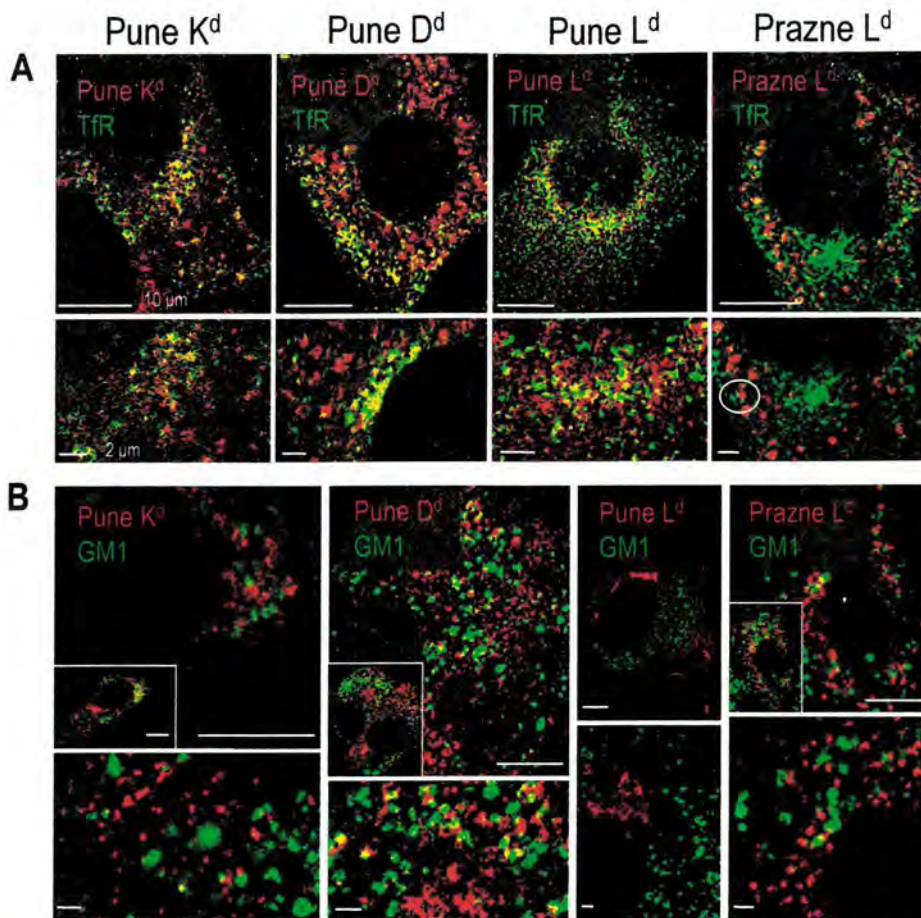
uglavnom pokazuje ujednačen obrazac ekspresije - jako jukstanuklearno bojenje i sjajne vezikule koje su jednoliko raspoređene po citoplazmi (osim perinuklearno, vrlo su česte i guste vezikule koje su smještene subplazmalemalno). Citoplazmatske TfR⁺ vezikule su veličinom uglavnom manje od MHC-I⁺ vezikula (uglavnom bi pripadale A-B obrascu), a najrjeđe su u središnjem dijelu citoplazme. Međutim, u nekim stanicama citoplazmatski izražaj TfR je vrlo slab i veće perinuklearne vezikulotubularne strukture dominiraju. Općenito rečeno, što su vezikule veće i sjajnije, to je njihov međusoban stupanj kolokalizacije jači, barem što se tiče konformiranih molekula K^d i D^d.

Ipak, to nije slučaj s praznim molekulama L^d koje se uglavnom ne kolokaliziraju s TfR (slika 45a). Naime, neovisno o svojoj veličini i raspodjeli, te vezikule izgleda kao da izbjegavaju područja gdje su TfR vezikule gusto raspoređene - vrlo često se većina vezikula s praznim molekulama L^d (ELRC) ili nalazi na drugoj strani stanice od TfR, ili je smještena perinuklearno, zauzimajući središnji dio stanične unutrašnjosti, tj. onaj u kojem se ne nalaze TfR molekule (većina kojih je smještena jukstanuklearno i periferno, kako je već rečeno). Ipak, ponekad se vezikule TfR i eL^d nalaze u istom dijelu stanice. Iako ih se većina i dalje ne kolokalizira, neke od njih pokazuju sličan obrazac koji je zamijećen i između molekula MHC-I i EEA1 (opisano kasnije, slika 46), tj. prazne molekule L^d se nalaze u središnjoj vezikuli, a nekoliko tubulovezikularnih TfR⁺ struktura oko nje. Ova slika se također može vidjeti i kod konformiranih molekula K^d i D^d, iako rjeđe. Isto tako, valja napomenuti da su ovakvi obrasci rjeđi nego kada se *steady state* MHC-I molekule kolokaliziraju s EEA1 ili kada se prate internalizirane MHC-I (opisano kasnije).

Na kraju, pune molekule L^d se labo kolokaliziraju s TfR, i to jukstanuklearno, što se može vidjeti i na većim povećanjima (slika 45a).

Već je prethodno rečeno se gangliozid GM₁ nalazi u DRM na staničnoj membrani. No, obzirom da služi kao receptor za internalizaciju CTxB, molekule čiju unutarstaničnu sudbinu pratimo, te da se nalazi u lipidnim splavima, koje su nam posebno zanimljive uslijed toga što su nekonformirane MHC-I molekule smještene u njima, željeli smo detaljnije ispitati i njegovu lokalizaciju unutar stanice, te moguću kolokalizaciju s MHC-I molekulama.

GM₁ je u većini stanica perinuklearno raspoređen po stanici, uglavnom u velikim tubulo-vezikularnim strukturama (obrazac C). Ipak, te vezikule se ne kolokaliziraju niti s jednim MHC-I alelom, jednako kao niti s konformiranimi nekonformiranim MMHC-I molekulama. Štoviše, nije zamijećena ni najmanja kolokalizacija s MHC-I vezikulama vrste C iako postoji velika sličnost u njihovu rasporedu i izgledu (slika 45b). U nekim slučajevima ipak izgleda kao da su vezikule s MHC-I molekulama (uglavnom tipa C, ali nije uvjet) smještene u blizini GM₁ pozitivnih vezikula, te da s njima ipak komuniciraju iako se ne kolokaliziraju. Vrlo je zanimljivo da se niti endocitirana CTxB ne kolokalizira s unutarstaničnim GM₁ odjeljcima, bez obzira što tu molekulu koristi kao receptor za svoj ulazak u stanicu (nije prikazano).



Slika 45. Kolokalizacija *steady state* MHC-I molekula s transferinskim receptorom (TfR) i GM1. (A) MHC-I molekule (crvena fluorescencija) su u stanicama Balb 3T3, kolokalizirane s TfR (zelena fluorescencija), odnosno (B) s CTxB koji obilježava molekulu GM1 (zelena fluorescencija). Mjerna crta = 10 (2) μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

4.2.2.1.2. Kolokalizacija MHC-I molekula s markerima endosomalnih odjeljaka

U prethodnom odjeljku korišteni su markeri koji karakteriziraju određene endosomalne putove. Dalje smo *steady state* MHC-I molekule kolokalizirali s markerima koji karakteriziraju jedan odjeljak ili skupinu odjeljaka sličnih ili jednakih svojstava. Od vezikularnih odjeljaka pratili smo sortirajuće, reciklirajuće i kasne endosome/lizosome, odnosno njima pripadajuće biljege.

Rani sortirajući endosomi su karakterizirani markerom **EEA1** (odjeljak 2.2.2.1), koji se u stanici može vidjeti jednoliko raspoređen po citoplazmi s radijalno oko jezgre (slika 46a), iako je u nekim stanicama razbacan po citoplazmi. MHC-I molekule se u osnovi ne kolokaliziraju intenzivnije s EEA1, odnosno sa sortirajućim endosomima. Međutim, njihova prisutnost u ovim odjeljcima (osim punih molekula L^d) je očigledna (slika 46a). Najveći stupanj kolokalizacije se uočava kod molekula K^d, kako u jukstanuklearnom, tako i u perinuklearnom obrascu. Slična slika se uočava i kod konformiranih molekula D^d. Prazne (nekonformirane) molekule L^d pokazuju najmanji stupanj kolokalizacije (ne računajući pune L^d), a nerijetko je perinuklearni obrazac kolokalizacije nešto više izražen od citoplazmatskog (iako je u osnovi sličan kao i kod konformiranih molekula). Nadalje, osobito kod praznih molekula L^d, na većim povećanjima i u nekim rezovima (najvjerojatnije onima koji pokazuju rubne krajeve

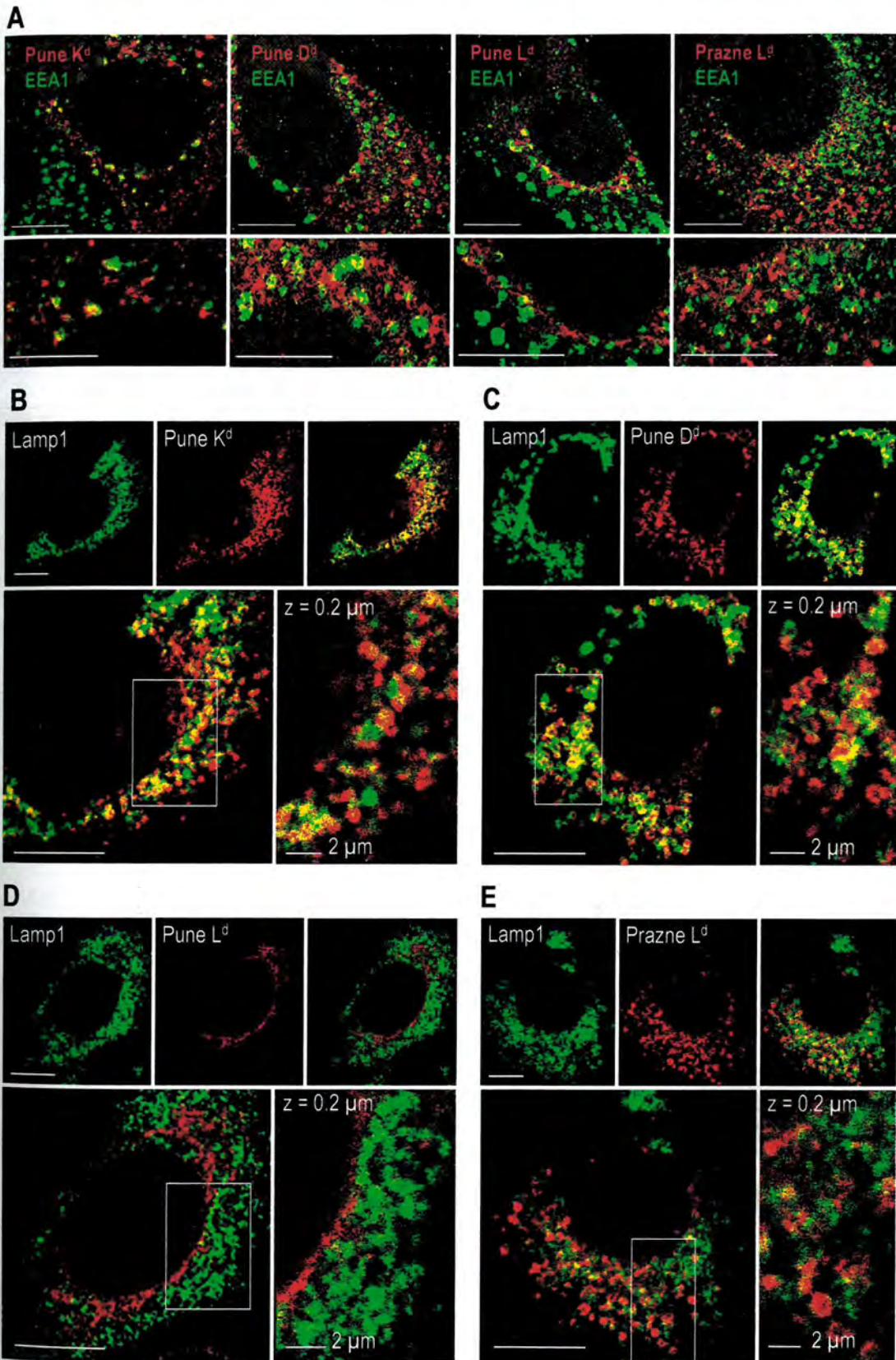
vezikule), može se uočiti da se neke i MHC-I i EEA1 pozitivne vezikule u stvari sastoje najmanje od dviju domena, a često i više. MHC-I molekula se nalazi u središnjem dijelu, dok su s vanjske strane EEA1⁺ vezikulo-tubularne strukture (najčešće njih 3-5 koje kao da izlaze iz središnje vezikule). Te strukture izgledaju kao da će se odvojiti ili su se već odvojile (slika 46a, povećanje). Ipak, postoji i mogućnost da se radi o vezikulama različitog porijekla koje na manjim povećanjima izgledaju kolokalizirane jer se nalaze u blizini.

Odsustvo punih molekula L^d iz EEA1 pozitivnih vezikula je očekivana, i u skladu je s njihovom lokalizacijom uglavnom u odjeljcima sekretornog puta, prvenstveno GA (slika 29).

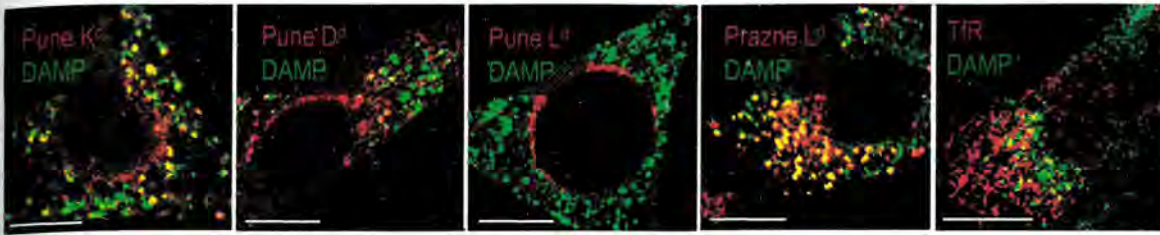
Nakon dolaska u rane endosome, molekule se usmjeravaju u recikliranje ili degradaciju. Vrsta odjeljaka koji sudjeluju u recikliranju ima više, jedni od njih su upravo i sami sortirajući endosomi, uglavnom preko Rab4⁺ domena (odjeljak 1.2.2.1). Također je vrlo važan i **endosomalni reciklirajući odjeljak (ERC, engl. endosomal recycling compartment)** kojeg karakterizira marker **Rab11**, a nalazi se uglavnom jukstanuklearno, iako i nešto malo i po citoplazmi.

Izgleda kao da se konformirane molekule K^d i D^d nalaze u perinuklearnim Rab11 pozitivnim odjeljcima, no, također postoji i mogućnost da se samo različite vezikule nalaze u susjedstvu. Prazne molekule L^d se u osnovi ne kolokaliziraju s Rab11, iako u nekim stanicama njihova nazočnost u Rab11 vezikulama nije isključeno. Ipak, možemo reći da se pune molekule L^d ne nalazi u ERC (nije prikazano). Obzirom da se Rab11 slabo vidi, u daljim pokusima kao marker reciklirajućih endosoma je korišten TfR.

U odjeljke u koje se usmjeravaju molekule predodređene za degradaciju ubrajamo prvenstveno **kasne endosome** i **lizosome**, a skupina markera koja ih karakterizira su različite Lamp molekule, od kojih smo koristili **Lamp1** i **Lamp2** koji se neznatno razlikuju po svojoj lokalizaciji (92). Lamp1/2 vezikule se prvenstveno lokaliziraju perinuklearno zauzimajući velik dio citoplazme. Nadalje, te vezikule su velike i intenzivno se fluorescentno obilježavaju. Međutim, njihovi krajevi nisu jasno definirani, kao oni primjerice kod EEA1⁺ vezikula, prvenstveno stoga što se ove molekule nalaze u vanjskim (graničnim) membranama ovih kasnih odjeljaka (56, 85). Stoga nije lako procijeniti stupanj kolokalizacije. Naime, kod manjih povećanja zbog gustoće vezikula stupanj kolokalizacije izgleda znatan, a kod većih povećanja vezikule izgledaju dosta difuzne. Ipak, izgleda da se konformirane molekule K^d i D^d djelomično nalaze u Lamp1 pozitivnim odjeljcima (osobito kada su u pitanju vezikule vrste C – gotovo potpuna kolokalizacija), ali ne i konformirane L^d molekule (slika 46b-d). Postoji mogućnost da se one raspadaju u kiselim odjeljcima, obzirom da je pokazano da je trimolekularni kompleks L^d molekule dosta nestabilan (156). To bi se uklapalo u činjenicu da ove molekule ne pokazuju vezikularnu ekspresiju (slika 25). Nadalje, iako stupanj kolokalizacije nije jednak u svim stanicama, nekonformirane molekule L^d su u prosjeku djelomično do zamjetno prisutne kasnim endosomima/lizosomima (računajući i vezikule vrste C i vrste B – ali niti jedne u potpunosti), iako se čini da se nalaze u različitim domenama (slika 46e).



Slika 46. Kolokalizacija *steady state* MHC-I molekula s markerima endosomalnih odjeljaka. MHC-I molekule (crvena fluorescencija) su u stanicama Balb 3T3, kolokalizirane s (A) EEA1 (zelena fluorescencija), te (B-E) s Lamp1 (zelena fluorescencija). Mjerna crta = 10 μm, ako nije navedeno drugačije (2 μm). Debljina snimka (z) = 0,5 μm (0,2 μm).



Slika 47. Kolokalizacija *steady state* MHC-I molekula s DAMP. DAMP se 40 minuta internalizirao u stanice Balb 3T3 na 37°C nakon čega su prikazane MHC-I molekule i TfR. Molekule su vizualizirane dodavanjem sekundarnog protu-MHC-I protutijela (konjugiranim s Alexa 555 – crvena fluorescencija), odnosno protu DNP Alexa 488 (zeleno fluorescencija). Mjerna crta = 10 μm , ako nije navedeno drugačije (2 μm). Debljina snimka (z) = 0,5 μm .

Na kraju smo ispitali stupanj kolokalizacije MHC-I molekula s DAMP, molekulom koja se nakon kratkotrajne internalizacije (30 min) pretežno nalazi u kiselim endosomalnim odjeljcima kojima je pH manji od 6,0 (237). U našim pokusima smo pokazali da se DAMP ne kolokalizira (ili izuzetno slabo) s EEA1, TfR i GM1, dok je znatnija kolokalizacija zapažena s Lamp1 (slika 47 i nije prikazano). Zanimljivo je da je kolokalizacija punih molekula K^d i D^d , te osobito praznih molekula L^d , veća s DAMP nego s Lamp1 (usp. slike 46 i 47), neovisno o međusobno velikom stupnju kolokalizacije ovih dviju molekula. Dapače, prazne molekule L^d se izuzetno jako kolokaliziraju s DAMP, dok se s Lamp1 kolokaliziraju samo djelomično, što ukazuje na njihovo prisustvo u još nekom kiselom odjeljku. Nadalje, bitno je napomenuti da se s DAMP prvenstveno kolokaliziraju MHC-I molekule koje se nalaze u vezikulama obrasca C. U skladu s nepprisustvom ovakvog tipa vezikula (kao i uglavnom općenito *steady state* vezikula) punih molekula L^d , je i rezultat njihova nekolokalizacije s ovim markerom kiselih endosomalnih odjeljaka (slika 47).

Inače, MHC-I⁺ vezikule često pokazuju sličan stupanj i obrazac kolokalizacije s ispitivanim markerima bez obzira da li su vrste B ili C, koje su općenito i praćene zbog svoje jasnoće i definiranosti.

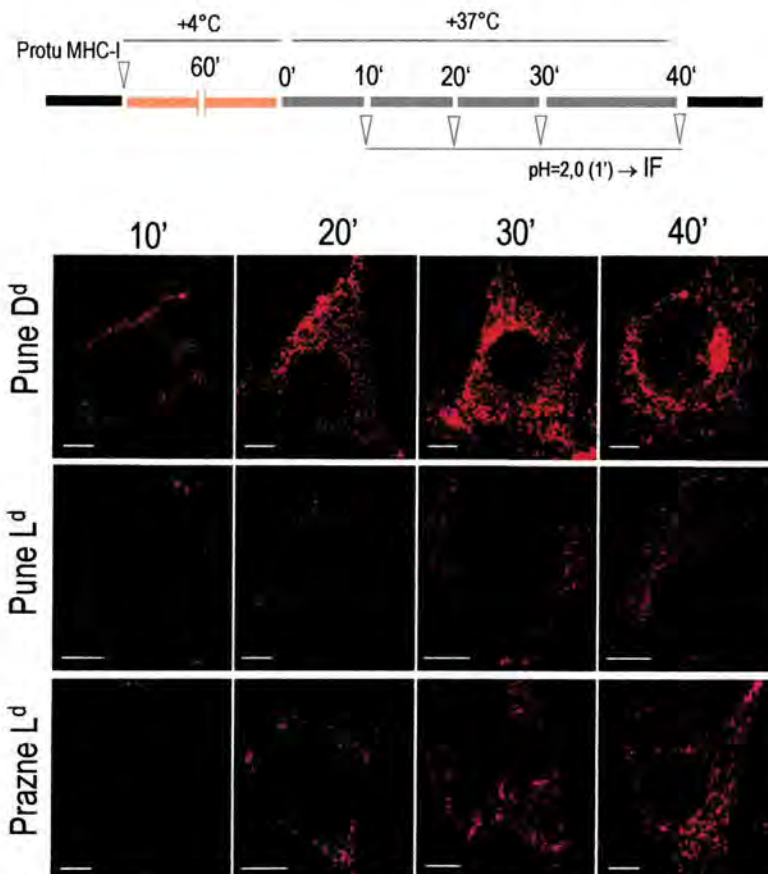
Sumarno, dobiveni rezultati s markerima endosomalnih odjeljaka i TfR ukazuju da je barem dio, prvenstveno konformiranih, molekula K^d i D^d smješten u nekom od odjeljaka endosomalnog puta, što bi ukazivalo da su *steady state* vezikule djelomično, ako ne i znatno, endocitoznog porijekla.

4.2.2.2. Internalizacija nativnih površinskih glikoproteina i receptora

U narednom dijelu našeg istraživanja posvetili smo se praćenju endocitoznih putova molekula MHC-I, TfR i CTxB, kolokalizirajući ih međusobno, te s određenim markerima endosomalnih odjeljaka. Time smo željeli rasvijetliti njihov unutarstanični put, što bi nam pomoglo u utvrđivanju njihove konačne sudbine. Pri tome smo koristili prvenstveno metodu imunofluorescencije primijenjujući dva osnovna protokola na IFN γ -tretiranim Balb 3T3 fibroblastima. Pomoću prvog smo, kako je ranije opisano, pratili **kontinuiranu internalizaciju** ispitivane molekule sa stanične površine tijekom određenih kinetika (slika 22). Međutim, ovim načinom (prvenstveno kada su u pitanju MHC-I molekule) ne možemo postići da se sve molekule istodobno endocitiraju s PM, te zbog «kašnjenja» jednog dijela i njihovog odgođenog ulaska u određene endosomalne vezikule, nismo bili u

moćnosti pratiti kinetiku izlaska istraživanih molekula iz ispitivanih odjeljaka jer je izlazak jednih (koje su ranije ušle) stalno pratio ulazak drugih («zakašnjelih»). Iako ovaj problem nije tako izražen kada su u pitanju TfR i CTxB uslijed njihove izrazito brze i relativno istodobne endocitoze, u cilju što preciznijeg praćenja izlaska praćenih molekula iz endosomalnih odjeljaka primijenili smo tzv. **pulse-chase internalizacijski protokol** (slika 23). U njemu smo stanice površinski obilježili odgovarajućim mPt (4°C, 1h), zatim ga uklonili i dodali svjež medij te inkubirali na 37°C određeno vrijeme (npr. 15 minuta, *pulse*) kako bi se omogućila internalizacija. Potom smo kratkotrajnim zakiseljavanjem (pH=2,0; 30-45 sek.) uklonili preostala površinska protutijela i ponovo dodali svjež medij, te dodatno inkubirali na 37°C (*chase*). Na kraju smo stanice fiksirali i imunofluorescentno obilježili. Time je omogućeno praćenje samo one skupine molekula koja je endocitirana tijekom *pulse* razdoblja. Međutim, signal je na ovaj način nešto slabiji (prvenstveno za MHC-I molekule koje se slabije izražavaju ili pokazuju manju unutarstaničnu ekspresiju, posebice molekule L^d). Stoga smo ova dva protokola kombinirali ovisno o informaciji koju smo željeli dobiti: za praćenje kinetike ulaska u neki odjeljak uglavnom je dovoljno provesti kontinuiranu internalizaciju, dok je za praćenje izlaska iz tog odjeljaka *pulse-chase* protokol važan.

Kontinuiranom internalizacijom smo pratili promjene obrazaca ekspresije internaliziranih MHC-I molekula.

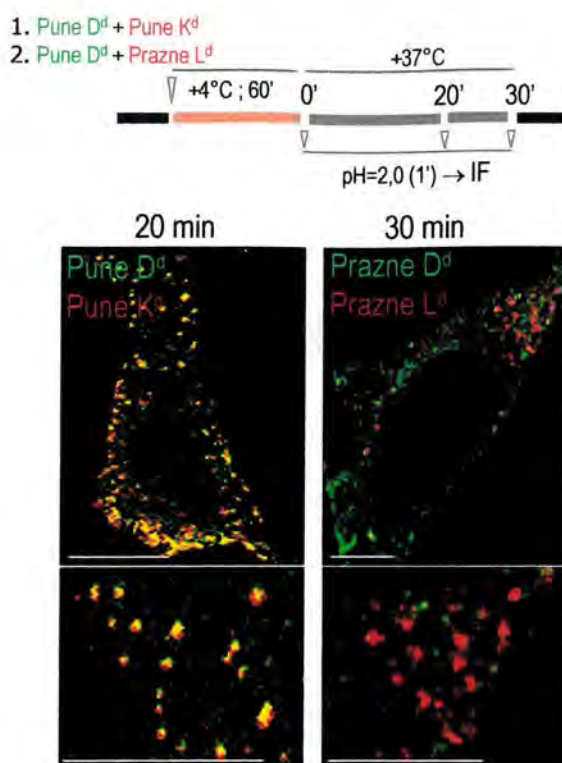


Slika 48. Obrazac kontinuirane internalizacije nativnih MHC-I molekula. Nakon površinskog obilježavanja Balb 3T3 stanica odgovarajućim mPt protiv MHC-I molekula, praćena je njihova kontinuirana internalizacija prema gore navedenom protokolu. Mjerna crta = 10 μm . Debljina snimka (z) = 0,5 μm .

Konformirane molekule D^d se odmah po internalizaciji (10 min.) prikazuju periferno, odmah ispod PM, no već nakon 20 minuta se jednoliko raspoređuju po citoplazmi. Već se tada može uočiti sklonost ka perinuklearnoj i jukstanuklearnoj lokalizaciji koja gotovo dostiže maksimum nakon 30 minuta, a u daljim kinetikama (45 i 60 minuta) se samo još više pojačava (slika 48). Obrazac ekspresije internaliziranih *konformiranih molekula K^d* je vrlo sličan, samo je kinetika nešto sporija i jukstanuklearna lokalizacija manje intenzivna (nije prikazano). Nakon 20 minuta sve vezikule *konformiranih molekula L^d* su lokalizirane uglavnom citoplazmatski. Međutim, nakon 30 minuta, te u kasnijim kinetikama, osim u citoplazmi, znatno se uočavaju i perinuklearno, te jukstanuklearno. Iako je uočeno da su vezikule s punim molekulama L^d u kinetikama do 1 sata vidljive u samo oko 10-15% stanica (nekad i manje), nakon 1 sata i više taj postotak se povećava na vrijednost od 70-80%. Bitno je istaknuti da je cijelo vrijeme osnovni obrazac sličan kao i kod ostalih konformiranih MHC-I molekula što ukazuje da konformirane MHC-I molekule slijede sličan unutarstaničan put. *Nekonformirane molekule L^d* nakon 10 minuta internalizacije također se prikazuju periferno. Iako su nakon 20 i 30 minuta smještene citoplazmatski (često perinuklearno), ne pokazuju sklonost ka jukstanuklearnom koncentriranju. Taj se obrazac zadržava cijelo vrijeme, jedino što se intenzitet vezikula pojačava zbog većeg broja endocitiranih molekula (slika 48). Naime signal je mnogo slabiji u usporedbi s molekulama K^d i D^d, što je i očekivano, prvenstveno zbog njihova slabog površinskog izražaja. Međutim, bitno je naglasiti da je često jači od punih molekula L^d, bez obzira što mu je površinski izražaj manji (slika 25).

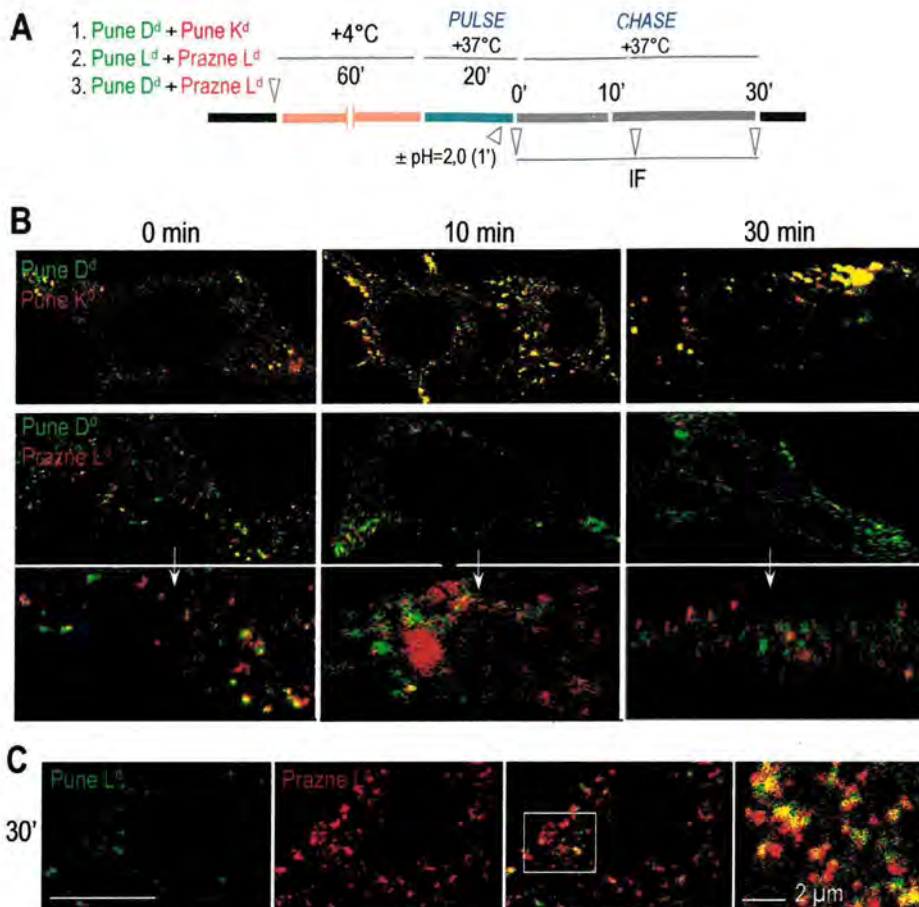
4.2.2.2.1. Međusobna kolokalizacija internaliziranih nativnih MHC-I molekula

U odjeljku 4.1.2.2 ustanovili smo da međusobna kolokalizacija *steady state* MHC-I molekula ovisi o njihovoj konformaciji, tj. visok stupanj kolokalizacije pokazuju molekule iste konformacije. Suprotno tome, konformirane i nekonformirane molekule se međusobno vrlo slabo, ili uopće ne kolokaliziraju, kako u stanici (slika 38), tako i na njezinoj površini (slika 30). Obzirom da prethodni rezultati ukazuju da je barem dio *steady state* vezikula endocitoznog porijekla, željeli smo ispitati njihov stupanj kolokalizacije nakon internalizacije.



Slika 49. Kontinuirana istodobna internalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula. Nakon površinskog obilježavanja Balb 3T3 stanica kombinacijom odgovarajućih mPt protiv MHC-I molekula, praćena je njihova kontinuirana internalizacija prema gore navedenom protokolu. Mjerna crta = 10 μm . Debljina snimka (z) = 0,5 μm .

Prema rezultatima protokola kontinuirane i *pulse-chase* internalizacije različitih konformacija i alela MHC-I molekula možemo zaključiti da konformirane molekule općenito prate isti endocitozni put koji se razlikuje onoga u koji se usmjeravaju nekonformirane MHC-I molekule (slike 49 i 50). Ipak, precizniji rezultati su dobiveni *pulse-chase* protokolom i oni ukazuju da se 10 minuta nakon internalizacije (*pulse*) konformirane molekule D^d i native nekonformirane molekule L^d ipak nešto kolokaliziraju. No, već 30 minuta nakon *chase* razdoblja ta kolokalizacija nestaje (slika 50b). To bi ukazivalo na mogućnost da tijekom ranog razdoblja endocitoznog puta obje konformacije MHC-I molekula, bilo neizravno, ili čak, ali manje vjerojatno, izravno, dospijevaju u isti endosomalni odjeljak (vjerojatno EEA1⁺ vezikule) No, nakon toga njihovi se putovi razilaze. Kao potvrda toj pretpostavci govori činjenica da se na većim povećanjima nerijetko mogu uočiti manje vezikule s molekulama D^d koje se odvajaju od središnje vezikule u kojoj se nalaze prazne molekule L^d. Slična slika je uočena i s molekulama EEA1 i TfR (slike 52 i 62), a ukazuje na mogućnost odvajanja reciklirajućih D^d pozitivnih vezikula od eL^d pozitivne vezikule koja kasnije maturira.



Slika 50. Istodobna *pulse-chase* internalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula. (A) Protokol istodobne internalizacije MHC-I molekula nakon površinskog obilježavanja Balb 3T3 stanica kombinacijom odgovarajućih mPt. (B) Kolokalizacija punih molekula D^d s punim molekulama K^d, odnosno praznim molekulama L^d, nakon 10 i 30 minuta. (C) Kolokalizacija punih molekula L^d (zeleno) s praznim molekulama L^d (crveno) nakon 30 minuta. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Endocitozni put punih i praznih molekula L^d je nešto teže usporediti. Naime, kao što je rečeno, pune molekule L^d se uvijek slabo vide nakon endocitoze. Ipak, kada se uspiju vizualizirati, uočava se da se djelomično kolokaliziraju s praznim molekulama L^d (neposredno nakon *pulsa* i nakon 10 minuta *chase*), uglavnom periferno, i nepravilno citoplazmatski. Kasnije, odnosno već nakon 30 minuta *chase*, ta se kolokalizacija gubi (slika 50c). Kolokalizacija konformiranih molekula K^d i L^d potpuna neposredno nakon *pulsa*, te 30 minuta nakon *chase* razdoblja (nije prikazano).

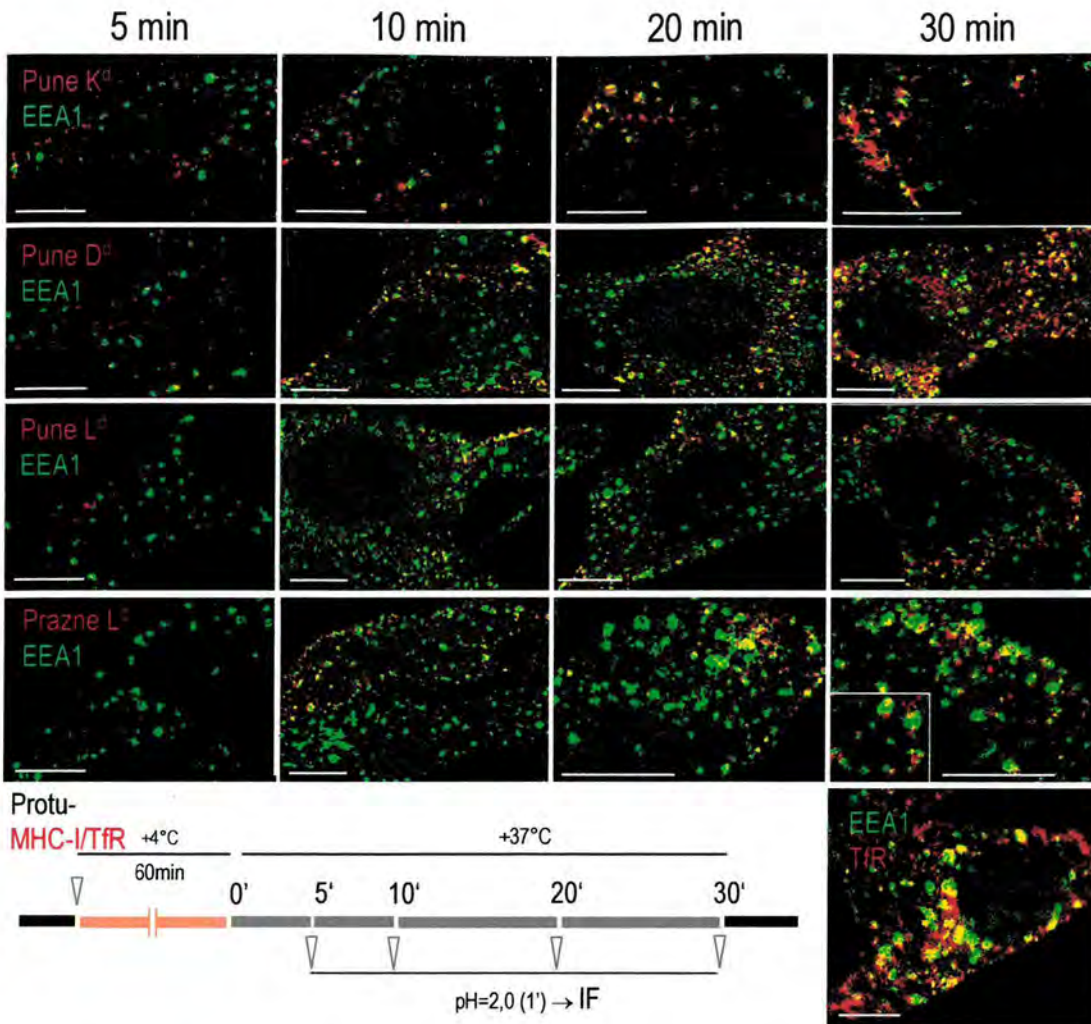
Ovi su rezultati u skladu s prethodnima koji pokazuju da je *steady state* kolokalizacija MHC-I molekula konformacijski ovisna, te ukazuju da se konformirane i nekonformirane molekule međusobno susreću u nekom ranijem endosomalnom odjeljku (vjerojatno sortirajućim endosomima), ali se kasnije vrlo brzo razdvajaju. Stoga smo dalje internalizirane molekule kolokalizirali s markerima odjeljaka kako bismo preciznije definirali njihov put.

4.2.2.2. Internalizacija nativnih MHC-I molekula u endosomalne odjeljke

Rani endosomi

Kao što je već opisano, **rani (sortirajući) endosomi (EE/SE)** predstavljaju ranu i iznimno važnu stanicu na endocitoznom putu većine internaliziranih molekula, prvenstveno stoga što se iz njih usmjeravaju u recikliranje ili degradaciju. Kolokalizaciju endocitiranih MHC-I molekula s **EEA1** smo pratili tijekom kontinuirane internalizacije (slika 51) i nakon *pulse-chase* protokola.

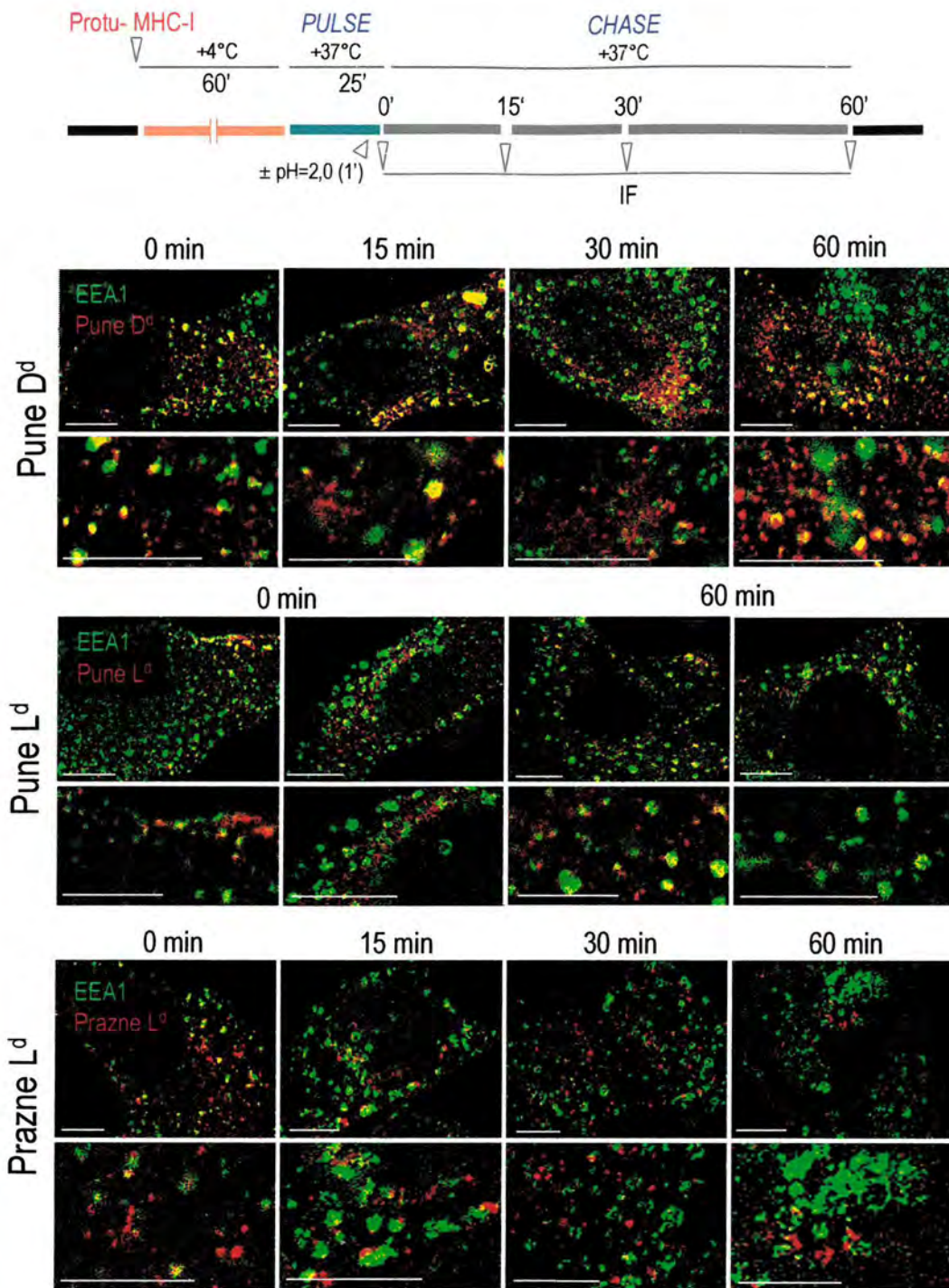
Kontinuirana internalizacija je rađena u svrhu praćenja kinetike ulaska MHC-I molekula u EEA1⁺ endosome (slika 51). Nakon 5 minuta niti jedan alel, niti konformacija, MHC-I molekula se ne kolokalizira s EEA-1. Međutim, nakon 10 minuta MHC-I ulaze u rane endosome, a velik se broj njihovih vezikula može vidjeti neposredno ispod PM ili u perifernom dijelu citoplazme. Ipak, još ih se uvijek samo mali broj kolokalizira s EEA1. To ukazuje da se MHC-I molekule, prije nego što dopiju do EE, nalaze u nekom drugom, još ranijem endosomalnom odjeljku. Izostanak kolokalizacija MHC-I i EEA1 nakon 5 minuta potvrđuje tu pretpostavku. Kao što smo opisali ranije (slika 48), **konformirane molekule K^d i D^d** u osnovi pokazuju sličan obrazac internalizacije, iako izgleda da D^d putuju nešto brže. Ipak, oba alela se dosta intenzivno, ali ne i potpuno, kolokaliziraju s EEA1 nakon 20 minuta. U nekim stanicama se može zamijetiti da su nakon tog vremena, osobito pune molekule D^d, već smještene u jukstanuklearnom području u kojemu se, u osnovi, ne nalaze EEA1⁺ vezikule. Ovaj obrazac se još više pojačava nakon 30 i 60 minuta. Zanimljivo je da je citoplazmatska kolokalizacija s EEA1 gotovo potpuna nakon 30 minuta (slika 51) i 60 minuta (nije prikazano), dok se u jukstanuklearnom području MHC-I vezikule općenito vide nekolokalizirane s ovim markerom. **Pune molekule L^d** (kada se vide) pokazuju sličan obrazac kolokalizacije s EEA1 u svim ispitivanim vremenima (5, 10, 15, 20, 30, 45 i 60 minuta – samo su neka od njih prikazana na slici 51) – uglavnom periferna ekspresija, često neposredno ispod PM, te katkad citoplazmatska. Jukstanuklearna lokalizacija je rijetka, a kada je prisutna, te vezikule se ne kolokaliziraju s EEA1. **Nativne prazne molekule L^d** također pokazuju sličan obrazac kolokalizacije s EEA1, iako je stupanj kolokalizacije, u usporedbi s konformiranim molekulama manji. Obzirom da se ove molekule ne izražavaju jukstanuklearno, kolokalizacija s EEA1 je citoplazmatska, rijetko periferno. Općenito, one vezikule koje se nalaze neposredno ispod PM se vrlo rijetko, ili uopće ne, kolokaliziraju s EEA1. Zanimljivo je da je obrazac multidomenskih vezikula (prazne L^d u sredini, a EEA1 mjehurići je okružuju) relativno čest, osobito u kasnijim vremenima (slika 51, 30 minuta). Jednako se može vidjeti i na konformiranim MHC-I molekulama, iako rjeđe.



Slika 51. Kolokalizacija MHC-I molekula s EEA1 nakon kontinuirane internalizacije. Nakon površinskog obilježavanja Balb 3T3 stanica protu-MHC-I, odnosno protu-TfR mPt, molekule su internalizirane u svježem mediju tijekom navedenog vremena. Internalizirane molekule (crvena fluorescencija) su kolokalizirane s EEA1 (zelena fluorescencija) i vizualizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm . Debljina snimka (z) = 0,5 μm .

Za usporedbu je prikazan *TfR* koji se nakon 30 minuta znatno kolokalizira s EEA1 vezikulama i citoplazmatski i perinuklearno. Jedini dio u kojem nema kolokalizacije je jukstanuklearna skupina endosoma (vjerojatno ERC) (slika 51).

Na opisani način *kontinuirane* internalizacije smo utvrdili da MHC-I molekule počinju ulaziti u EEA1 pozitivne endosome nakon 10 minuta, dok su nakon 5 minuta najvjerojatnije lokalizirane u nekim još nekarakteriziranim vezikulama. Međutim, za određivanje vremena njihova izlaska iz tog odjeljaka morali smo primijeniti *pulse-chase* protokol (slika 52). Tijekom 25 minuta (*pulse*) smo maksimalno zasitili vezikule MHC-I molekulama, te uklonili preostala površinska mPt. Tako su samo već internalizirane molekule praćene tijekom navedene kinetike (slika 52).



Slika 52. Kolokalizacija MHC-I molekula s EEA1 nakon *pulse-chase* internalizacije. Nakon površinskog obilježavanja Balb 3T3 stanica protu-MHC-I mPt, molekule su internalizirane 25 min (pulse). Nakon uklanjanja preostalog površinskog mPt, molekule su dodatno vrijeme inkubirane na 37°C prema navedenom protokolu. Internalizirane molekule (crvena fluorescencija) su kolokalizirane s EEA1 (zeleno fluorescencija) i vizualizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μ m. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

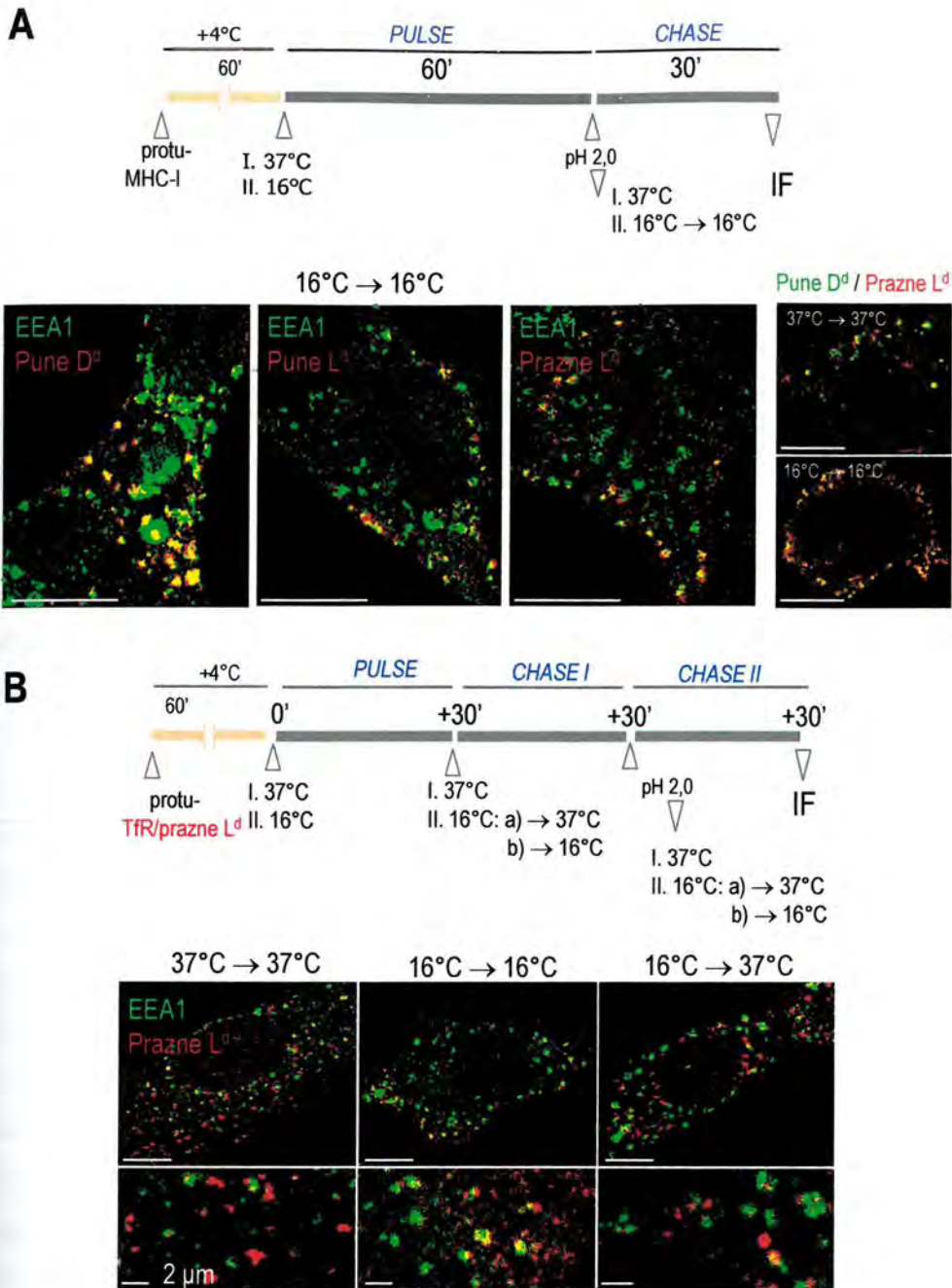
Sve molekule su se mogle vidjeti čak i nakon 2 sata *chase* razdoblja. *Konformirane* molekule D^d su cijelo vrijeme ostale kolokalizirane s EEA1, za razliku od *nekonformiranih* molekula L^d . Nativne prazne molekule L^d se

neposredno nakon pulsa parcijalno kolokaliziraju s EEA1, no već nakon 15 minuta kolokalizacija je bila vrlo slaba, ako uopće i prisutna. Nakon 30 minuta kolokalizacije je nestala, a molekule su razmještene po citoplazmatskim vezikulama. Konformirane molekule D^d se kolokaliziraju s EEA1 citoplazmatski (relativno jako), ali ne i jukstanuklearno. Moguće je da se one, iako izlaze iz SE, recikliraju i kasnije ponovo ulaze u taj odjeljak više puta tijekom ispitivane kinetike. Vjerojatno barem dio njih prolazi kroz Rab11⁺ reciklirajuće endosome, što bi potvrđivali rezultati kolokalizacije s ovim markerom nakon internalizacije. **Konformirane molekule L^d** se kolokaliziraju s EEA1 uglavnom periferno (u onima rijetko pozitivnim stanicama). Ipak, kolokalizacija katkad može biti i citoplazmatska, ponekad čak i u blizini jezgre, ali ne jukstanuklearno. Zanimljivo je da se nakon 1 sata *chase* razdoblja u nekim stanicama pune molekule L^d prikazuju citoplazmatski, a nekad i jukstanuklearno.

Prema tome, MHC-I molekule prolaze kroz EEA1⁺ endosome, ali se ne zadržavaju u njima. Kako bismo dodatno potvrdili da u ove odjeljke ulaze sve MHC-I molekule, te se u njima sortiraju prije nego što se, barem znatnim dijelom, usmjeravaju u različite odjeljke iskoristili smo pojavu da se internalizirane molekule zadržavaju u ranim endosomima na 16°C (238). Površinske prazne molekule L^d i TfR obilježene 64-3-7 mPt su internalizirane sa stanica Balb 3T3 30 minuta (pulse) na 37°C ili 16°C. Potom su preostala površinska protutijela uklonjena, a stanice su inkubirane dalje na istoj temperaturi. Nakon 30 minuta, jedan dio stanica koje su bile izložene temperaturi 16°C je daljih 30 min prebačen na 37°C, dok je ostatak ostavljen na istoj temperaturi (slika 53b). Potom su internalizirane molekule kolokalizirane s EEA1 i vizualizirane konfokalnom mikroskopijom. Uočava se da se prazne molekule ne kolokaliziraju s EEA1 ako su cijelo vrijeme bile na 37°C, što je i očekivano, jer smo već ranije (slika 52) opisali kako u tom vremenu ove molekule izlaze iz EE i u njih se više ne vraćaju. Međutim, zamjetna kolokalizacija se uočava ako su molekule cijelo vrijeme bile na 16°C, što ukazuje da su zadržane u ovom odjeljku. Suprotno tome, ako su stanice nakon internalizacije sa 16°C prebačene na 37°C kolokalizacije s EEA1 odjeljcima ponovo više nema ili je vrlo slaba. Kao kontrolnu molekulu koristili smo TfR za koji je poznato da prolazi kroz EEA1⁺ EE. Jukstanuklearna lokalizacija internaliziranog TfR bila je znatno smanjena ako mu je prolazak kroz EE zapriječen ili usporen, a ona se ponovo pojačava ako se stanice sa 16°C prebace na 37°C (nije prikazano).

Onemogućavanje prolaska kroz EE i zadržavanje u EEA1⁺ odjeljcima je pokazano i na konformiranim molekulama D^d i L^d kad su izložene temperaturi od 16°C (slika 53a, lijevo). Također, pokazana je i potpuna kolokalizacija punih molekula D^d i praznih molekula L^d ako su cijelo vrijeme bile izložene temperaturi od 16°C. No, samo parcijalna kolokalizacija je prisutna ako su cijelo vrijeme bile na 37°C (slika 53a, desno). Ovaj rezultat ukazuje da ove molekule zajedno ulaze u EEA1⁺ odjeljke, nakon čega se razdvajaju.

Zbirno, prema ovim rezultatima možemo zaključiti da MHC-I molekule ulaze u EE nakon 10 minuta, te da se konformirane molekule najvjerojatnije recikliraju, te ponovo ulaze u taj odjeljak, dok nekonformirane molekule L^d izlaze iz njega i zadržavaju se u stanici još najmanje 2 sata što bi upućivalo da se odmah ne degradiraju. Manje je vjerojatno da se recikliraju, jer svi do sada klasični opisani reciklirajući putovi odvijaju preko RE (odjeljak 1.2.1.1.2).



Slika 53. Zadržavanje praznih molekula L^d i TfR u EEA1 odjeljcima. (A) MHC-I molekule, zajedno s vezanim odgovarajućim mPt, su internalizirane s površine stanica Balb 3T3, te prema prikazanom protokolu inkubirane na 16°C , odnosno 37°C . Potom su kolokalizirane s EEA1. Alternativno, prema istom protokolu praćena je i kolokalizacija punih molekula D^d i praznih molekula L^d . (B) Nakon površinskog obilježavanja Balb 3T3 stanica odgovarajućim mPt, TfR, odnosno prazne molekule L^d su internalizirane na 37°C , odnosno 16°C kako je prikazano na protokolu i opisano u tekstu. Tijekom chase razdoblja dio stanica sa 16°C je prebačen na 37°C , dok je ostatak ostao na istoj tempetauri. Internalizirane molekule (crvena fluorescencija) su kolokalizirane s EEA1 (zelena fluorescencija) i vizualizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = $10\ \mu\text{m}$ ($2\ \mu\text{m}$ – velika povećanja). Debljina snimka (z) = $0,5\ \mu\text{m}$.

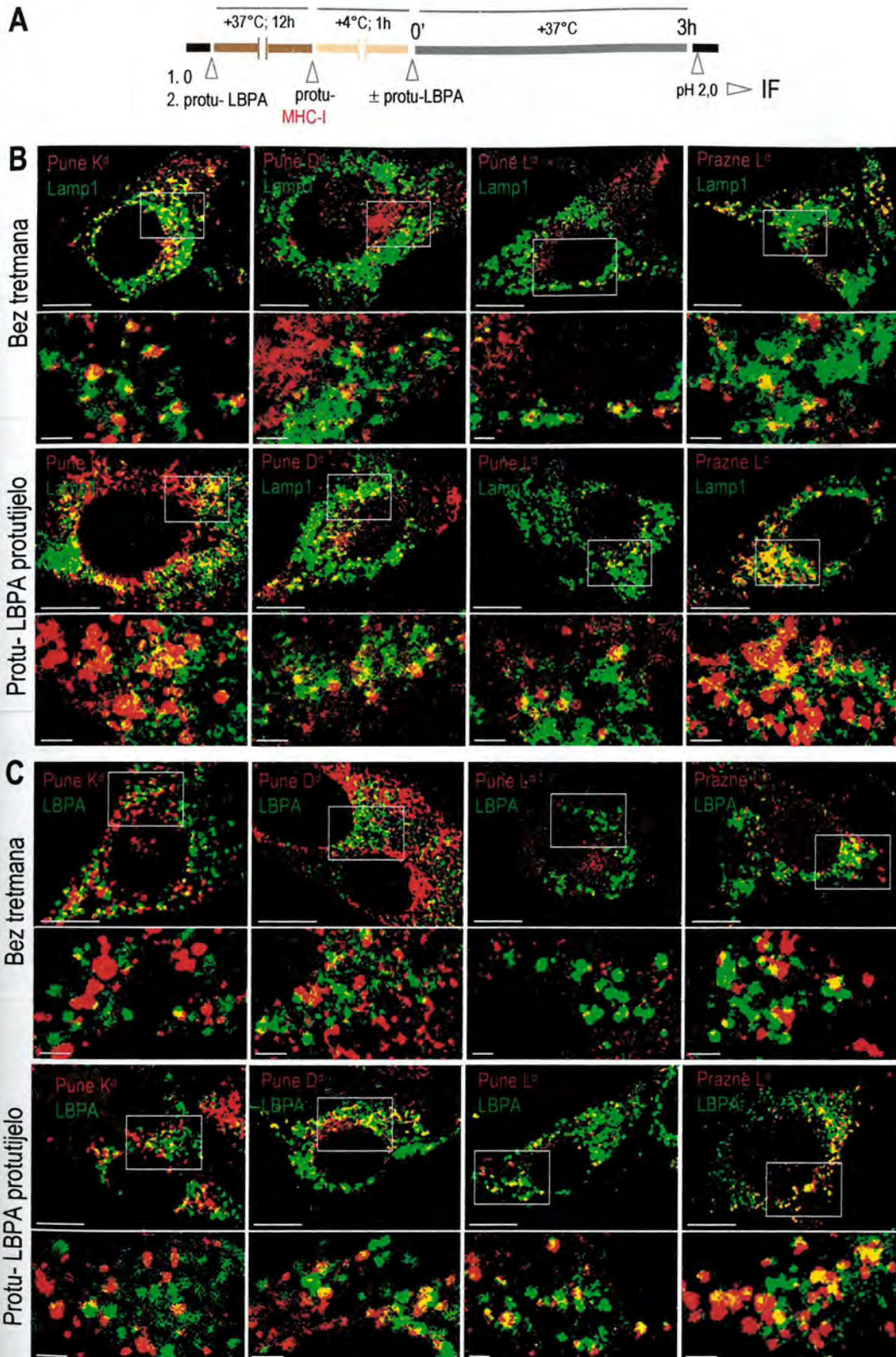
Reciklirajući endosomi

U prethodnom pokusu smo već najavili mogućnost recikliranja konformiranih MHC-I molekula, što ne bi bila sudbina nekonformiranih molekula. Kao što smo već opisali, Rab11 je jedan od najvažnijih markera reciklirajućih endosoma i jukstanuklearnog ERC (68). No, obzirom da na raspoloživim stanicama signal Rab11 nije bio jasan, kao potvrdu recikliranja koristili smo *steady state* TFR iz ranije navedenih razloga, te uspostavili reciklirajući protokol. O recikliranju će kasnije biti riječi znatno opširnije (poglavlje 4.4).

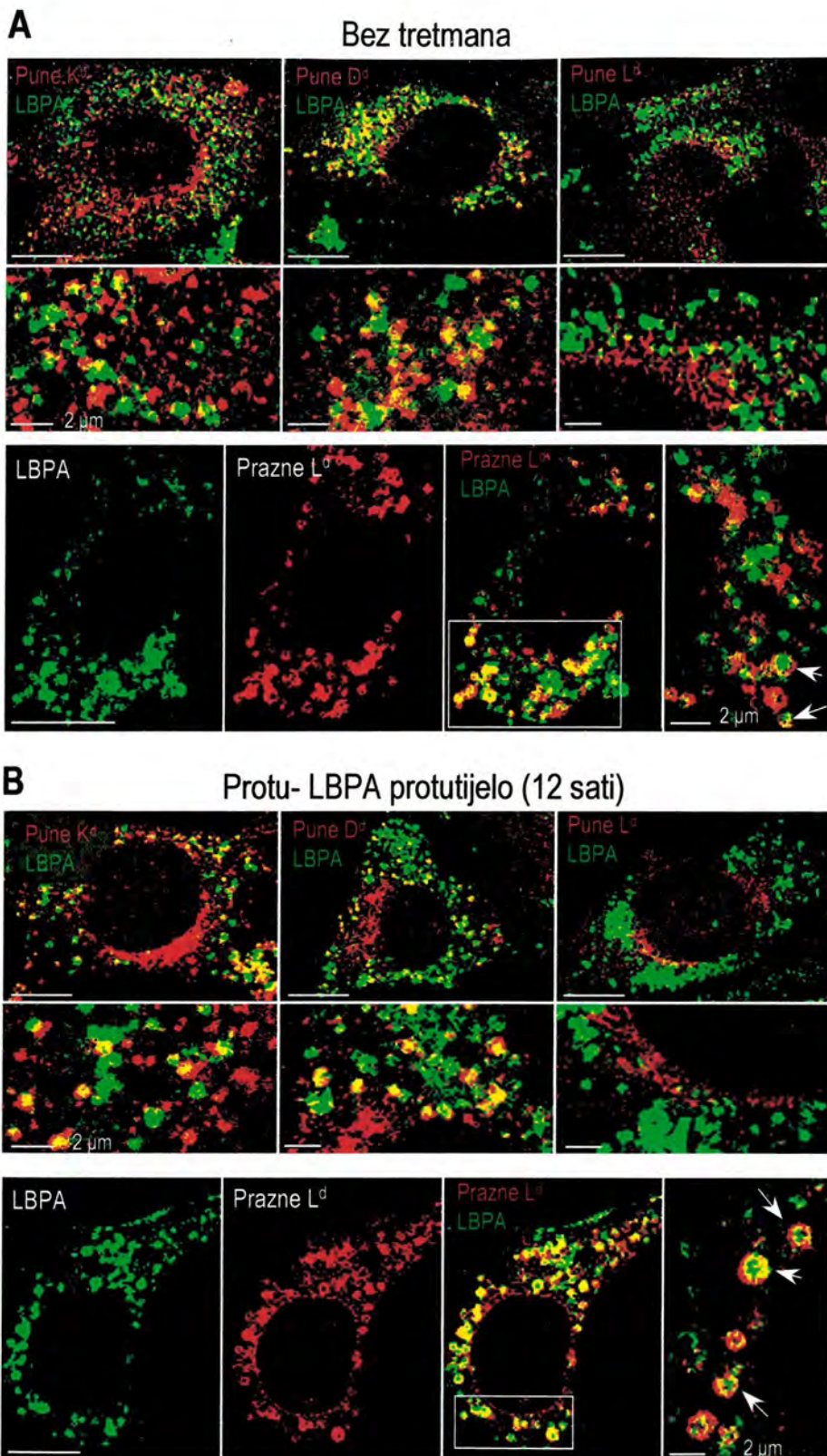
Kasni endosomi i lizosomi

Kako bismo ispitali da li se MHC-I molekule usmjeravaju u kasne (kisele) odjeljke, a iz kojih se mogu usmjeriti u degradaciju, primijenili smo protokol kontinuirane internalizacije i kolokalizaciju s **Lamp1** i **LBPA**, markerima koji se nalaze u kasnim endosomima. MHC-I molekule su internalizirane tijekom 3 sata sa površine stanica Balb 3T3 prema protokolu kontinuirane internalizacije, te nakon toga kolokalizirane s Lamp1 i LBPA (slika 54a).

Zapaža se da se konformirane molekule K^d i D^d djelomično kolokaliziraju s Lamp1, ali slabije sa LBPA. Bitno je uočiti jukstanuklearno područje u kojem se nakupljaju molekule K^d i D^d (koje se vjerojatno znatnijim dijelom odnosi i na reciklirajuće endosome), a u kojem se ne nalazi niti jedan od ova dva biljega kasnih endosoma. Konformirane molekule L^d se izuzetno slabo, ili uopće ne kolokaliziraju s ovim markerima. Kao što je i očekivano, najveći stupanj kolokalizacije uočen je kod nekonformiranih molekula L^d . Međutim, i kod njih kolokalizacija s Lamp1 je bila veća nego s LBPA (slike 54b i c). Prema tome, iako su oba biljega karakteristična za kasne odjeljke, te međusobno pokazuju znatan stupanj kolokalizacije (nije prikazano), izgleda da se ipak ne preklapaju u potpunosti, te da među njima postoje neke različitosti. Veća kolokalizacija MHC-I molekula s Lamp1 nasuprot LBPA ukazuje da one, ili relativno brzo izlaze iz LBPA⁺ endosoma prije nego što uđu u Lamp1⁺ odjeljke, ili se zadržavaju u Lamp1⁺ odjeljcima prije ulaska u one LBPA pozitivne. Kako bismo razlučili između tih dviju mogućnosti, primijenili smo protokol već opisan u literaturi, a prema kojem inkubacija stanica zajedno s protu-LBPA protutijelom uzrokuje onesposobljavanje djelovanja ove molekule u LBPA odjeljcima, te onemogućavanje izlaska kolesterola (koji se nakuplja), kao i ostalih molekula iz njega (npr. manozna-6-fosfatnog receptora) (94). Na donjem dijelu slike 54c uočava se da je stupanj kolokalizacije konformiranih MHC-I molekula (uključujući i molekule L^d) jači s LBPA, nego kod stanica koje nisu bile izložene ovom protutijelu. Bitno je naglasiti da je kod konformiranih molekula i dalje uočljivo njihovo nakupljanje u jukstanuklearnom području koje se ne kolokalizira s kasnim odjeljcima. Zanimljivo je da je stupanj kolokalizacije s Lamp1 samo nešto jači za molekule K^d i D^d , ali uočljivo za pune molekule L^d , koje, prema tome također ulaze u ovaj odjeljak, ali se najvjerojatnije normalno vrlo brzo gube iz njega (ili u njemu). Ipak, najveći učinak se zamjećuje kod nekonformiranih molekula L^d koje se gotovo u potpunosti kolokaliziraju i s LBPA, kao i s Lamp1. To ukazuje na da ove molekule znatno komuniciraju s kasnim odjeljcima, kako s Lamp1, tako i s LBPA. Također, treba naglasiti da se nekonformirane molekule L^d jednako kao i LBPA, odnosno Lamp1 uglavnom ne nalaze u jukstanuklearnom području, iako izgleda da s njihovim markerima počinju lagano komunicirati u njegovom perifernom dijelu.



Slika 54. Kolokalizacija internaliziranih MHC-I molekula s LBPA i Lamp1 odjeljcima. U protokolu kontinuirane internalizacije (A) MHC-I molekule su nakon 3 sata kolokalizirane s Lamp1 (B), odnosno LBPA (C). Stanice su bile netretirane ili 12 sati u mediju u kojem je bilo prisutno protu-LBPA protutijelo. Mjerna crta = 10 μ m (manja povećanja) ili 2 μ m (veća povećanja). Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.



Slika 55. Učinak protu-LBPA na *steady state* kolokalizaciju MHC-I i LBPA. Balb 3T3 fibroblasti su netretirani (A) ili su 16 sati bili izloženi djelovanju protu-LBPA protutijela (B). Potom su stanice fiksirane i permeabilizirane, a MHC-I molekule kolokalizirane s LBPA. Strelice pokazuju vakuolizirane odjeljke s nekonformiranim molekulama L^d. Mjerna crta = 10 μm (manja povećanja) ili 2 μm (veća povećanja). Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Kako bismo dodatno potvrdili da MHC-I molekule komuniciraju s LBPA odjeljcima, ispitili smo učinak pretretmana s protu-LBPA protutijelom na njihovu *steady state* kolokalizaciju s LBPA (slika 55). MHC-I molekule (osim konformiranih molekula L^d) djelomično se kolokaliziraju s LBPA već u kontroli. Kolokalizacija se nešto pojačava nakon LBPA tretmana kod molekula K^d i D^d, ali znatno kod nekonformiranih molekula L^d koje se u tom slučaju gotovo u potpunosti kolokaliziraju s ovim markerom. Također je bitno naglasiti da su odjeljci pozitivni na prazne molekule L^d postali izrazito vakuolizirani. U takvim vakuolama prazne molekule L^d se nalaze sa vanjske strane, dok je LBPA u unutrašnjosti, što je u skladu s njezinom lokalizacijom u unutrašnjim membranama kasnih odjeljaka (88). Ovakve vakuole se uočavaju i u kontrolnim stanicama ali u znatno manjem postotku (slika 55b, strelica). Značajno je da su vakuole s praznim molekulama L^d nakon tretmana bile prisutne u oko 75% stanica (u kontroli manje od 20%). Za razliku od toga, postotak zastupljenosti vakuoliziranih odjeljaka s molekulama K^d i D^d je samo neznatno porastao s nešto manje od 10% na 15% (nije prikazano). Nadalje, konformirane molekule L^d se ponovo nisu vidjele vezikularno, čak niti nakon protu-LBPA tretmana što ukazuje da ili samo manji dio dolazi do njih, ili se vrlo brzo razgrađuju, odnosno dezintegriraju u njima. Obzirom na ostale rezultate ova druga mogućnost je mnogo vjerojatnija, te će o ispitivanju ove hipoteze kasnije biti više govora (odjeljak 4.5.4.)

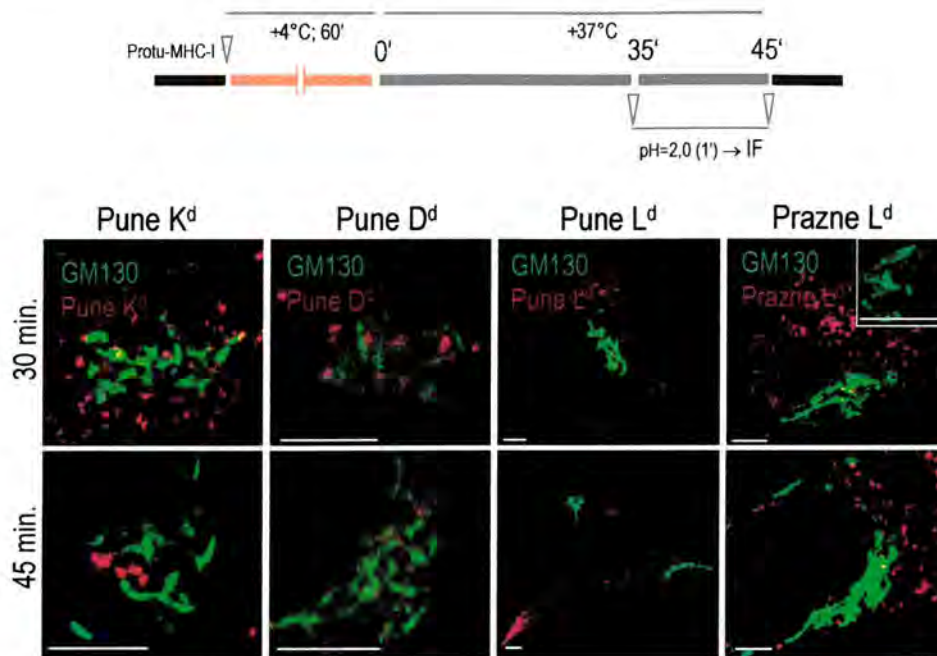
Zaključno, prema dobivenim rezultatima, MHC-I molekule ulaze u kasne odjeljke najmanje nakon 3 sata internalizacije (prema drugim rezultatima i nakon 1,5 sata, nije prikazano). No, za razliku od konformiranih molekula, koje se nakon tog vremena mogu naći i u ostalim dijelovima stanice (prvenstveno jukstanuklearni dio, iako i citoplazmatske vezikule nisu isključene), nekonformirane molekule se primarno usmjeravaju u ove odjeljke. Međutim, MHC-I molekule se u LBPA odjeljcima vjerojatno kraće zadržavaju, dok je retencija izraženija u onima koji su Lamp1 pozitivni. Ipak, bitno je naglasiti da se s kasnim odjeljcima ne kolokaliziraju samo velike vezikule vrste C, već je vrlo česta i kolokalizacija s manjim vezikulama (najčešće tubulo-vezikularnim tvorbama) koje se mogu nalaziti i periferno, a ne samo perinuklearno, što je primarno mjesto lokalizacije kasnih odjeljaka (slike 54 i 55). Ova činjenica, kao i činjenica da se MHC-I molekule ne degradiraju tako brzo kao što bi se dalo zaključiti prema stupnju njihove kolokalizacije s Lamp1 i LBPA (osobito kada su u pitanju nekonformirane molekule L^d), ukazuje na činjenicu da se one najvjerojatnije u njima dodatno sortiraju, od kojih se jedan dio ipak usmjerava u degradaciju, dok se drugi najvjerojatnije upućuje na staničnu površinu.

U narednim pokusima, o kojima će biti riječi kasnije, ispitat ćemo kinetiku degradacije MHC-I molekula nakon površinske biotilacije, te značaj održavanja kiselog pH na degradaciju i učinak inhibitora acidifikacije na njihovo nakupljanje u lizosomima.

Golgijev aparat

Jedno od odredišta u koje mogu doći endocitirane molekule je GA (32, 62), a kao marker tog odjeljka smo koristili GM130 koji prvenstveno obilježava *cis* Golgi. Iako su konformirane MHC-I molekule znatno prisutne u perinuklearnim i jukstanuklearnim odjeljcima već 30 minuta nakon endocitoze, niti jedan alel se ne kolokalizira s GM130, kako nakon 30, tako niti 45 minuta po internalizaciji (slika 56). Taj rezultat ukazuje na činjenicu da se GA nije dio endocitoznog puta MHC-I molekula, tj. da on u osnovi nije povezan sa sekretornim putem. Međutim, nije

isključena mogućnost da internalizirane MHC-I molekule ipak ulaze u ovaj odjeljak, ali ga brzo napuštaju, te je stoga teško detektirati njihovu prisutnost u njemu.



Slika 56. Kolokalizacija MHC-I molekula s GM130 nakon *kontinuirane* internalizacije. MHC-I molekule obilježene odgovarajućim mPt su internalizirane s površine Balb 3T3 fibroblasta, te nakon navedenog vremena kolokalizirane s GM130 prema prikazanom protokolu. Mjerna crta = 5 μ m. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

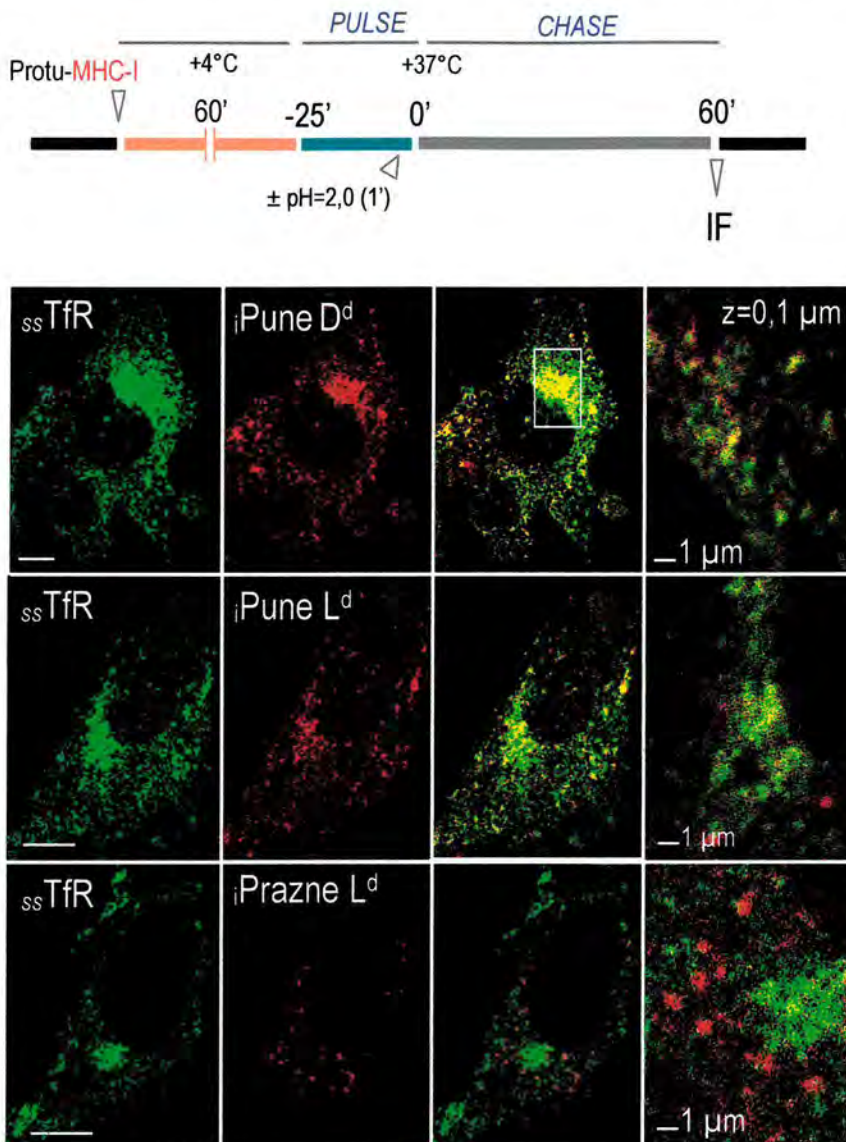
Iako su konformirane MHC-I molekule znatno prisutne u perinuklearnim i jukstanuklearnim odjeljcima već 30 minuta nakon endocitoze, niti jedan alel se ne kolokalizira s GM130, kako nakon 30, tako niti 45 minuta po internalizaciji (slika 56). Taj rezultat ukazuje na činjenicu da se GA nije dio endocitoznog puta MHC-I molekula, tj. da on u osnovi nije povezan sa sekretornim putem. Međutim, nije isključena mogućnost da internalizirane MHC-I molekule ipak ulaze u ovaj odjeljak, ali ga brzo napuštaju, te je stoga teško detektirati njihovu prisutnost u njemu.

Steady state transferinski receptor

Kao što smo objasnili ranije, *steady state* TfR ne predstavlja isključivo jednu vrstu vezikula, već je mješavina više različitih endocitoznih odjeljaka: ranih endosoma, te u većoj mjeri endocitoznog reciklirajućeg odjeljka (ERC). Također, zastupljenost GA i sekretornih vezikula nije isključena, ali u manjoj mjeri. Ipak, prvenstveno se koristi kao pokazatelj endocitoznog puta ispitivane molekule, jednako kao i potvrda dobivenih rezultata s određenim markerom.

Kolokalizaciju internaliziranih MHC-I molekula sa *steady state* TfR praćena je nakon *pulsa* od 25 minuta (nije prikazano), te nakon 60 minuta *chase* razdoblja (slika 57). *Konformirane* molekule D^d se djelomično, ali znatno, kolokaliziraju sa *steady state* TfR neposredno nakon *pulsa* (25 minuta), kako citoplazmatski, tako i perinuklearno (nije prikazano). Obrazac je sličan i nakon 60 minuta *chase* perioda, s jedinom razlikom što je tada više molekula D^d smješteno perinuklearno. *Pune* molekule L^d se nakon *pulsa* ne uočavaju u većini stanica. Ipak, u pozitivnim

stanicama se izražavaju periferno (uglavnom neposredno ispod PM) i nasumično citoplazmatski gdje se vrlo slabo ili uopće ne kolokaliziraju TfR, te perinuklearno, gdje se parcijalno kolokaliziraju s TfR. No, stupanj perinuklearne ekspresije ovih MHC-I molekula je znatno slabiji od onoga koji pokazuju pune molekule D^d. Nakon 60 minuta *chase* razdoblja u pozitivnim stanicama perinuklearna lokalizacija je nešto izraženija, jednako kao i stupanj kolokalizacije. Vezikule se mogu vidjeti i raspršene po citoplazmi gdje je stupanj kolokalizacije također prisutan, ali varira od stanice do stanice. Suprotno tome, *nativne prazne molekule L^d* se ne kolokaliziraju sa *steady state* TfR (eventualno slabo citoplazmatski), što je u skladu s pretpostavkom da se ne recikliraju. Slaba citoplazmatska kolokalizacija bi mogla biti posljedica nazočnosti ovih molekula u ranim endosomima.

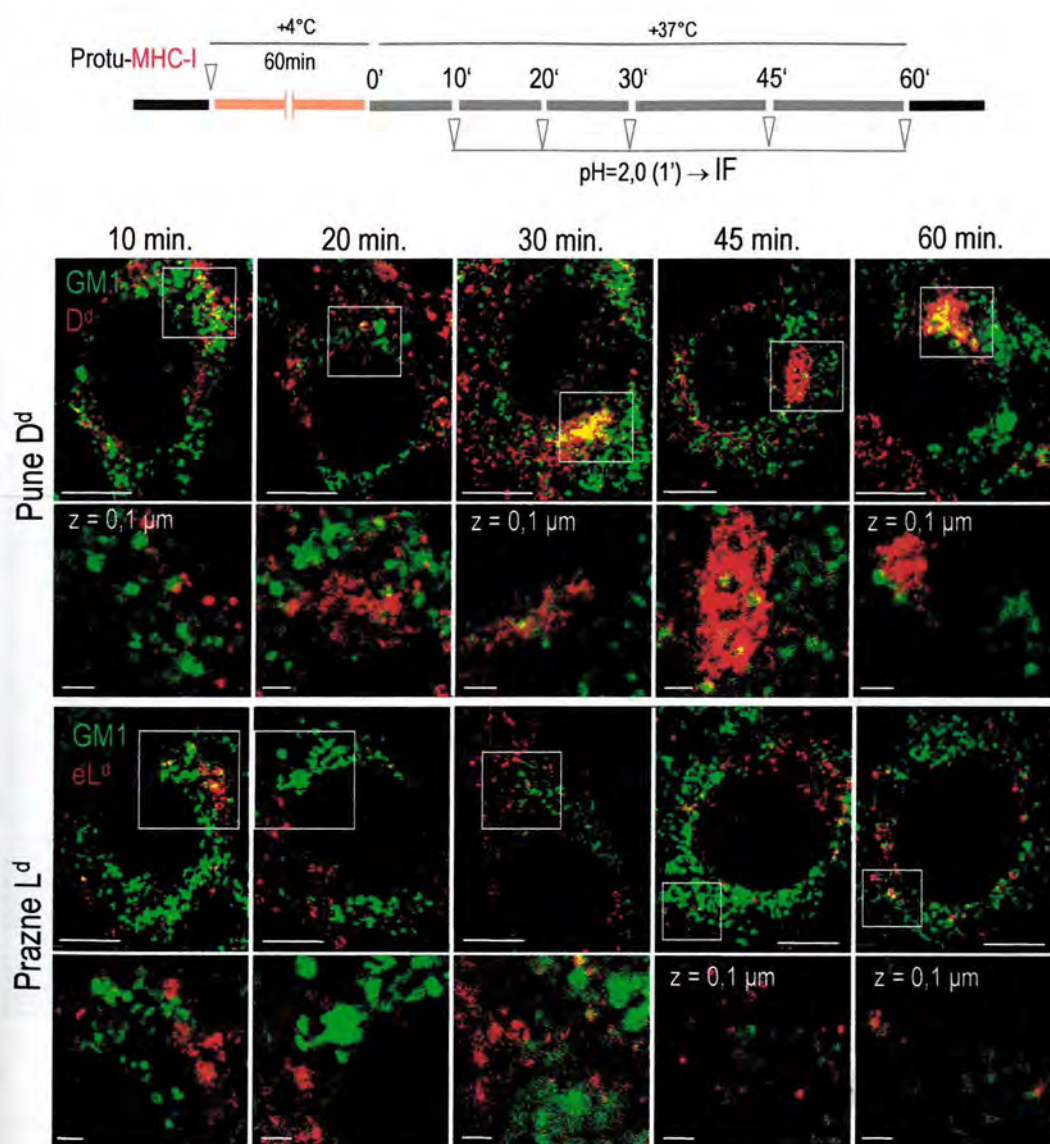


Slika 57. Internalizacija MHC-I molekula u TfR odjeljke nakon *pulse-chase* internalizacije. MHC-I molekule (crvena fluorescencija) obilježene odgovarajućim mPt su 25 min. (*pulse*) internalizirane (*i*) s površine fibroblasta Balb 3T3. Nakon uklanjanja površinskog protutijela kratkotrajnim zakiseljavanjem, stanice su dodatno inkubirane 1 sat na 37°C, te kolokalizirane sa *steady state* (*ss*) TfR (zelena fluorescencija). Mjerna crta = 10 μm (1 μm navedeno). Debljina snimka (*z*) = 0,5 μm.

Ovi rezultati također ukazuju na vjerojatnost recikliranja konformiranih MHC-I molekula, dok nekonformirane nakon izlaska iz EE slijede neki drugi endosomalni put.

GM₁ receptor

U skladu s ranijim rezultatima prema kojima se *steady state* MHC-I molekule i GM₁ nisu kolokalizirali, niti nakon 10, 20, 30, 45 i 60 minuta kontinuirane internalizacije MHC-I molekule (konformirane D^d, te nativne, odnosno *misfolded* nekonformirane molekule L^d) ne ulaze u GM₁ pozitivne odjeljke (slika 58).



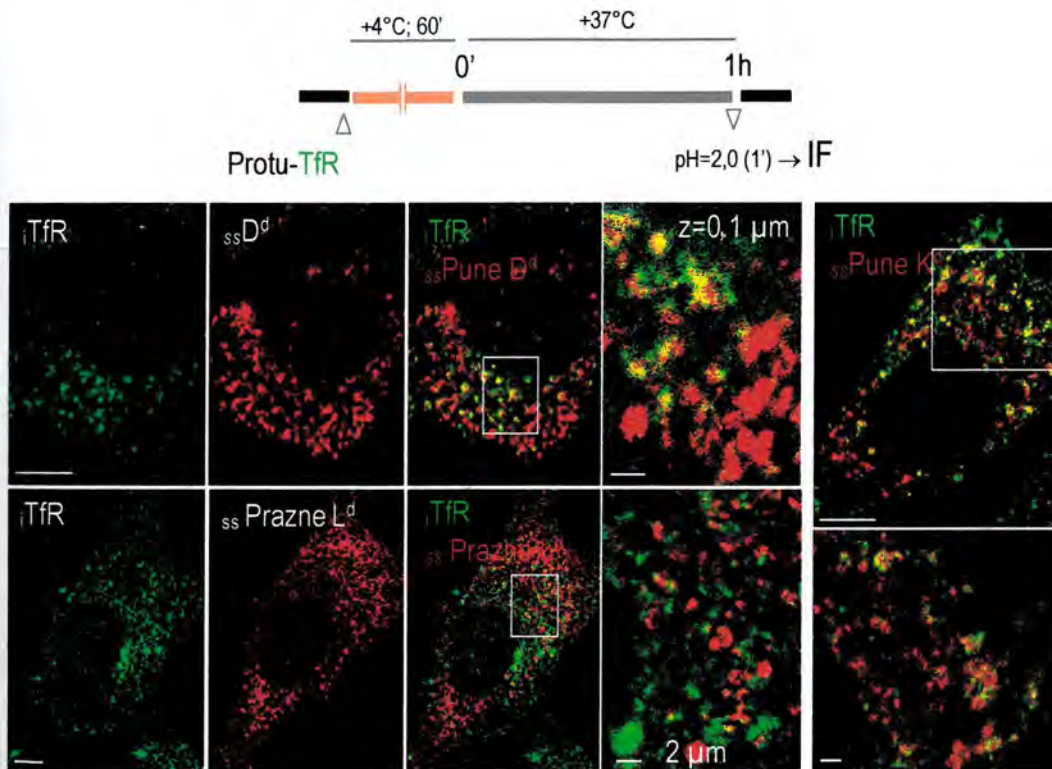
Slika 58. Kontinuirana Internalizacija MHC-I molekula u GM₁ odjeljke. MHC-I molekule (crvena fluorescencija) obilježene odgovarajućim mPt su internalizirane s površine fibroblasta Balb 3T3 navedeno vrijeme. Nakon uklanjanja površinskog protutijela kratkotrajnim zakiseljavanjem, stanice su fiksirane i permeabilizirane. Potom su kolokalizirane s kolera-toksin B Alexa fluor 488 (zeleno fluorescencija – GM₁). Mjerna crta = 10 μm - veća povećanja; 2 μm – manja povećanja. Debljina snimka (z) = 0,5 μm ili 0,1 μm (navedeno).

4.2.2.2.3. Internalizacija TfR i kolera-toksina u odjeljke MHC-I molekula

U prethodnom odjeljku pokazano je da se konformirane MHC-I molekule, za razliku od nekonformiranih molekula L^d , znatno kolokaliziraju sa *steady state* TfR. Suprotno tome, niti jedna konformacija MHC-I molekula se ne kolokalizira sa *steady state* GM_1 molekulom. Dalje smo željeli utvrditi da li vrijedi i obrnuto, odnosno recipročno ispitali kolokalizaciju internaliziranog TfR i CTxB (liganda za molekulu GM_1) sa MHC-I odjeljcima.

Transferinski receptor

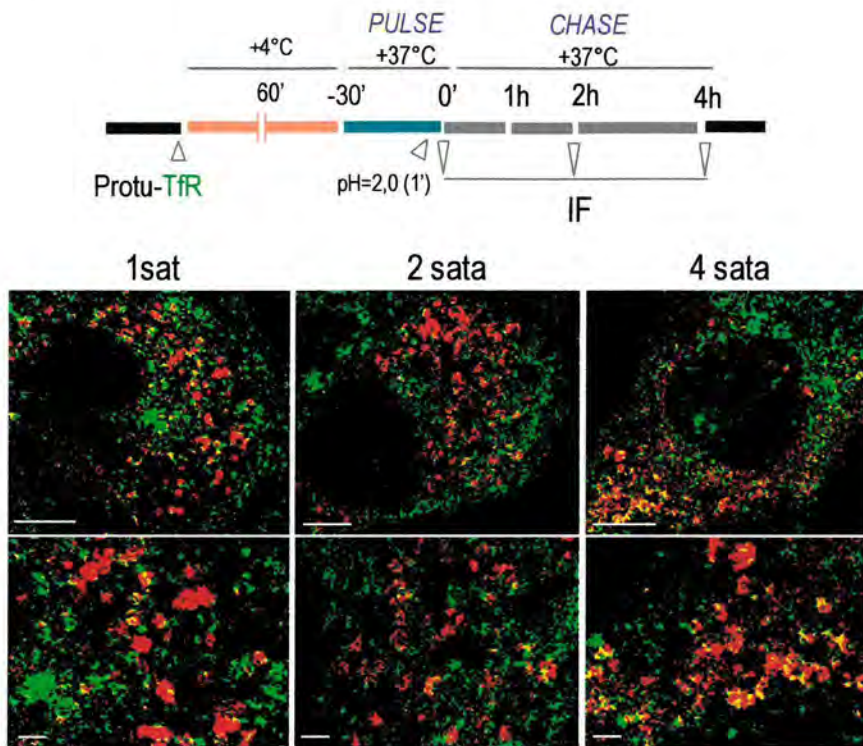
Kao što smo već naveli, endocitozni put TfR je relativno dobro karakteriziran, te se stoga često koristi kao indikator endocitoznog puta ispitivane molekule, jednako kao i lokalizacije nepoznatih vezikula.



Slika 59. Kontinuirana internalizacija TfR molekula u MHC-I odjeljke. TfR (zeleno fluorescencija) je obilježen mPt R17, te internaliziran s površine fibroblasta Balb 3T3 jedan sat. Nakon uklanjanja površinskog protutijela kratkotrajnim zakiseljavanjem, stanice su fiksirane i permeabilizirane. Potom su kolokalizirane sa *steady state* (ss) MHC-I molekulama (crvene). Mjerna crta = 10 μm - veća povećanja; 2 μm - manja povećanja. Debljina snimka (z) = 0,5 μm .

Obzirom da TfR uglavnom slijedi put recikliranja, kolokalizacija s TfR vezikulama ukazuje da se nepoznata molekula (vezikula) nalazi na putu recikliranja, uglavnom ranim-sortirajućim ili reciklirajućim endosomima (najčešće ERC).

Nakon 1 sata *kontinuirane internalizacije* TfR djelomično, ali relativno dobro, kolokalizira s *steady state* odjeljcima u kojima se nalaze *konformirane molekule* K^d i D^d . Ta kolokalizacija je znatno citoplazmatska (često i periferna), iako je i perinuklearni i jukstanuklearni obrazac ponekad prisutan, osobito kod molekula D^d (slika 59). Suprotno tome, *steady state* vezikule s *nekonformiranih molekula* L^d (ELRC) ne pokazuju primjetniju kolokalizaciju s internaliziranim nativnim TfR, čak niti 2,5 sata nakon internalizacije, uglavnom pokoja citoplazmatska vezikula (nije prikazano). Ipak, neke multidomenske vezikule (prethodno opisane) se uočavaju 4,5 sati nakon internalizacije (nije prikazano, usp. slika 60). Nakon *pulse-chase* protokola (*pulse* 30 minuta) uočava se rijetka kolokalizacija nakon 1 i 2 sata. Ipak, nakon 4 sata *chase* razdoblja, može se uočiti primjetnija citoplazmatska kolokalizacija (slika 60).



Slika 60. Pulse-chase internalizacija TfR u odjeljke s praznim molekulama L^d . TfR (zeleno fluorescencija) je obilježen mPt R17, te 30 minuta internaliziran s površine fibroblasta Balb 3T3. Nakon uklanjanja površinskog protutijela kratkotrajnim zakiseljavanjem, stanice su inkubirane na 37°C navedeno vrijeme. Potom su fiksirane i permeabilizirane, te kolokalizirane sa *steady state* (ss) praznim molekulama L^d (crvene). Mjerna crta = $10\ \mu\text{m}$ - veća povećanja; $2\ \mu\text{m}$ – manja povećanja. Debljina snimka (z) = $0,5\ \mu\text{m}$.

Obzirom da se većina TfR reciklira i a samo manji dio se usmjerava u degradaciju (manje od 1%), valja imati na umu da je kinetika recikliranja izuzetno brza i iznosi 7-12 min (32) pa dobiveni rezultati ukazuju da *steady state* vezikule *konformiranih molekula* K^d i D^d mogu predstavljati dio reciklirajućeg puta. Iako se i rani endosomi (EE) nalaze na putu recikliranja, u njima se molekule zadržavaju samo kraće vrijeme. Ipak, rezultati dobiveni s internaliziranim TfR također ne isključuju mogućnost da se *steady state* pune molekule K^d i D^d , barem djelomično, nalaze i u rani endosomima. Uostalom, već smo pokazali da se MHC-I molekule, iako se ne kolokaliziraju

znatnije s EEA1, ipak nalaze i u ovim odjeljcima (osim punih molekula L^d). Povrh svega, nazočnost molekula u EE nakon duljeg *chase* perioda ukazuje da se molekule recikliraju. Naime, ako se molekule iz EE ne usmjeravaju u recikliranje, već se prenose negdje drugdje (npr. u degradaciju koja općenito ne predstavlja glavni endocitozni put TfR, osobito u ranijim kinetikama), najvjerojatnije će nakon duljeg *chase* razdoblja biti potpuno ispražnjene iz tih odjeljaka. Suprotno tome, recikliranje će omogućiti ponovno ulazanje u EE i kolokalizaciju s EEA1 tijekom *chase* razdoblja, kao što smo već opisali (slika 52). Ipak, neovisno o EE, proces recikliranja omogućuje veći stupanj kolokalizacije ispitivane molekule s TfR, primarno uslijed toga što izlazak TfR iz ERC predstavlja najsporiji dio njihovog endocitoznog puta, o čemu smo govorili ranije. Prema tome, konformirane molekule K^d i D^d se recikliraju i to putem koji se, barem djelomično, preklapa s putem recikliranja TfR. To bi mogao biti izvorište barem dijela njihovih *steady state* vezikula.

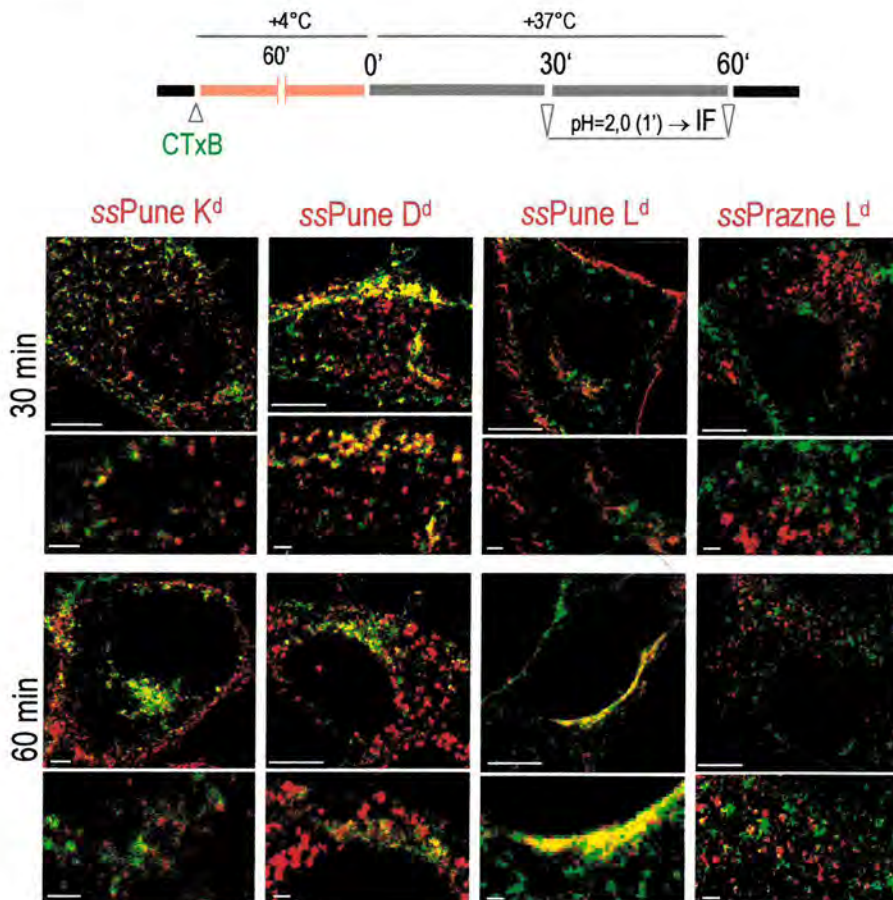
Prema ovim pretpostavkama, *prazne molekule* L^d se ne bi trebale reciklirati, a na to ukazuju i prethodni rezultati. Iako i TfR i prazne molekule L^d dolaze u EE, što bi trebalo rezultirati njihovom nešto zamjetnijom kolokalizacijom, važno je podsjetiti se da u usporedbi s konformiranim molekulama K^d i D^d *steady state* prazne molekule L^d pokazuju najmanji stupanj kolokalizacije s EEA1. Povećanje stupnja kolokalizacije s internaliziranim TfR u kasnijim kinetikama, posebice nakon 4 sata u kontinuiranom, a i ranije u *pulse-chase* eksperimentu, mogla bi biti posljedica toga što tada TfR počinje stizati u endosome nishodno od EE, vjerojatno multivezikularna tjelešca (MVBs, engl. *multivesicular bodies*), koji vode do, ili su već sami postali kiseliji odjeljci. Neki od njih bi mogli biti pozitivni na prazne molekule L^d .

Prema svemu navedenom, *steady state* molekule K^d i D^d bi mogle biti mješavina reciklirajućih (većim dijelom) i sortirajućih endosoma (manjim dijelom). Nadalje, ukupne reciklirajuće vezikule bi mogle biti kombinacija TfR⁺ (kolokalizacija), ali i drugih (TfR⁻) reciklirajućih endosoma (odsustvo kolokalizacije). Osim toga, moguća je uključenost i nekih degradacijskih odjeljaka. Nekonformirane molekule L^d se djelomično kolokaliziraju s LBPA/Lamp1 odjeljcima (slike 46 i 54), no jedan mali dio vezikula s *steady state* molekulama L^d bi mogao predstavljati EE. Ipak, dio je još upitnog porijekla. Moguće je da bi to mogle biti vezikule koje se nalaze između EE i degradacijskih odjeljaka, a mogle bi služiti kao kontrolna točka gdje bi se nekonformirane molekule mogle zadržavati. O tome će se opširnije raspravljati kasnije (odjeljci 4.3.3.2 i 4.3.3.3).

Podjedinica B kolera-toksina

Iako se endocitozni put kolera toksina intenzivno istražuje i mnogo se o njemu zna, još nije dobro definiran kao onaj TfR. Receptor za njegovu endocitozu je već prethodno spomenut gangliozid GM₁. CTxB u stanicu uglavnom ulazi procesom kaveolarne endocitoze, ali može koristiti i mehanizam klatrinske endocitoze (40, 41). Neovisno o načinu ulaska u stanicu, važno odredište CTxB je GA (39). Nažalost, put od PM do GA je još uvijek predmet rasprave, a mnogi autori su opisali više različitih putova koji mogu biti uključeni. Ukratko, CTxB se može prenositi do GA putem kaveosoma u alternativnom putu ili putem ranih (sortirajućih) endosoma u klasičnom endocitoznom putu. Nadalje, ovi putovi mogu uključivati neke dodatne vrste vezikula. U konačnici, podjedinica koja je bitna za endocitozu, podjedinica B, se degradira u lizosomima (39).

Kao što je ranije opisano, GM1 se ne kolokalizira niti sa *steady state* MHC-I molekulama (slika 47), niti s internaliziranom CTxB (nije prikazano). No, praćenjem kontinuirane internalizacije nakon 30 i 60 minuta ustanovili smo da se internalizirana CTxB kolokalizira sa *steady state* konformiranim molekulama K^d , D^d i L^d perinuklearno, prvenstveno jukstanuklearno (slika 61). Ova jaka kolokalizacija je vjerojatno posljedica toga što se u Balb 3T3 stanicama CTxB nalazi u GA već nakon 40-60 minuta gdje se može kolokalizirati s konformiranim MHC-I molekulama koje su normalno smještene u ovoj organeli. Kao što se i očekivalo, stupanj kolokalizacije je najjači s punim molekulama L^d , kojih je najveći dio smješten u GA. Suprotno od dobro razjašnjenih struktura koje nalikuju GA, jukstanuklearne vezikule s CTxB i MHC-I, kada se vizualiziraju pod većim povećanjima, pokazuju znatno manji, ili čak nikakav stupanj kolokalizacije. Nadalje, kolokalizacija molekula K^d i D^d s CTxB može katkad biti i citoplazmatska, često periferna. *Steady state* nekonformirane molekule L^d se izuzetno slabo citoplazmatski (često perifernije), ili čak uopće niti ne kolokaliziraju s internaliziranom CTxB (slika 61). Kao što smo ranije istaknuli, te molekule ne pokazuju klasičan obrazac ekspresije GA.



Slika 61. *Kontinuirana* internalizacija kolera-toksina (CTxB) u MHC-I odjeljke. CTxB-Alexa 488 (zelena fluorescencija) je vezana na površinu fibroblasta Balb 3T3, te internalizirana 30 i 60 minuta. Stanice su potom su fiksirane i permeabilizirane, te kolokalizirane sa *steady state* (ss) MHC-I molekulama (crvena fluorescencija). Mjerna crta = 10 μm - veća povećanja; 2 μm - manja povećanja. Debljina snimka (z) = 0,5 μm .

Obzirom da smo u našim pokusima uočili da se CTxB intenzivno kolokalizira s TfR i parcijalno s EEA1 nakon 20-25 minuta (nije prikazano), parcijalna citoplazmatska (često periferna) kolokalizacija može biti pokazatelj lokalizacije konformiranih molekula K^d i D^d u ranim (sortirajućim) endosomima. Nadalje, iako postoje rezultati koji ukazuju da se CTxB može reciklirati u nekim staničnim linijama, većina autora ne spominje tu mogućnost, a i u našim pokusima smo pokazali da to općenito nije slučaj u fibroblastima Balb 3T3 (odjeljak 4.4). Prema tome, vezikule s CTxB nisu reciklirajuće, za razliku od većine TfR⁺. Ovo za posljedicu ima manji stupanj citoplazmatske kolokalizacije *steady state* molekula K^d i D^d s CTxB nego s TfR. Nedostatak zamjetnije kolokalizacije vezikula *steady state* praznih molekula L^d s internaliziranom CTxB ne bi trebala biti posljedica njihove neprisutnosti u EE, kako smo objasnili ranije u vezi TfR. Osim toga, slaba citoplazmatska kolokalizacija bi možda bila upravo posljedica njihova smještaja i u tom odjeljku. Ipak, izostanak kolokalizacije ukazuje da prazne molekula L^d nisu nazočne u brojnim definiranim i nedefiniranim vezikulama kroz koje CTxB prolazi na svom putu do GA (kaveosomi, kaveolin negativne vezikule nastale iz kaveosoma, neke neutralne vezikule i sl.).

Na kraju, bitno je spomenuti da je, kao i ranije, sličan stupanj kolokalizacije s TfR i CTxB svih alela i konformacija uočen bez obzira koji se tip citoplazmatskih vezikula pratio.

4.2.2.2.4. Istodobna internalizacija MHC-I molekula, TfR i CTxB

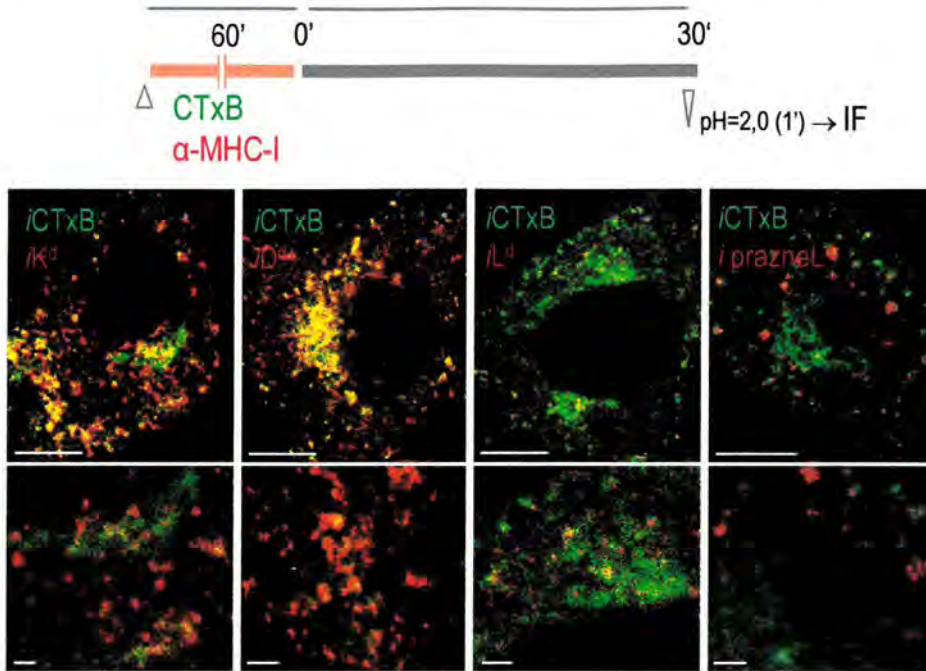
Kao posljednji korak u ovom fazi ispitivanja smještaja MHC-I molekula u endocitoznom putu, pratili smo istodobnu internalizaciju s markerima endocitoznih putova – TfR i CTxB u protokolu kontinuirane internalizacije.

Transferinski receptor

Istodobnom internalizacijom TfR i MHC-I molekula ustanovili smo da se *konformirane molekule* K^d kolokaliziraju s TfR, uglavnom periferno nakon 20 i perinuklearno nakon 45 minuta (slika 62a). Sličan obrazac je uočen i kod *konformiranih molekula* D^d , s razlikom što ove molekule pokazuju izraženiji citoplazmatski obrazac nakon 45 minuta internalizacije (slika 62a). Rijetko vidljive internalizirane *konformirane molekule* L^d se dosta slabo kolokaliziraju s TfR (nije prikazano). *Nativne nekonformirane (prazne) molekule* L^d se, također, slabo kolokaliziraju s TfR nakon 20 minuta. No, nakon 40 i 60 minuta, uočava se kolokalizacija (slika 62a i 62b), prvenstveno u citoplazmatskom perinuklearno obrascu. Pritom, valja istaknuti da se pri većim povećanjima ponovo zapaža obrazac multidomenskih vezikula, jednak prethodno opisanom u slučaju kolokalizacije s EEA1 i TfR. Njihov broj ovisi o vremenu i povećava se nakon duljih inkubacija (slika 62b, zaokruženo).

Navedeni rezultati u skladu su s prethodnim koji ukazuju na nazočnost molekula K^d i D^d u EE i RE. *Internalizirane prazne molekule* L^d se počinju kolokalizirati s internaliziranim TfR nešto ranije (nakon 1 sata ili nešto kraće) u usporedbi sa *steady state* praznim molekulama L^d (nakon 2 i 4 sata), iako u istom obrascu perinuklearnih multidomenskih vezikula. Ove molekule mogu se kolokalizirati u EE (ranija dionica puta) ili u vezikulama koje se nalaze između EE i degradacijskih odjeljaka (koji mogu uključivati i MVB). To potvrđuje i jača kolokalizacija kad se TfR internalizirao sat vremena prije nego što je počela i internalizacija molekula L^d nego kada su se obje molekule počele endocitirati u isto vrijeme (slika 62), vjerojatno stoga što se veći broj molekula TfR usmjerava u

slabija nakon 60 minuta, što bi ukazivalo da ispitivane molekule ulaze u zajednički odjeljak ali tijekom vremena iz njega izlaze (samo CTxB/MHC-I ili obje). *Pune molekule* L^d se djelomično kolokaliziraju s CTxB, prateći sličan obrazac kao i *pune* K^d i D^d , ali u manjem stupnju i manje intenzivno, osobito kada je u pitanju perinuklearna kolokalizacija. *Prazne molekule* L^d se najmanje kolokaliziraju s kointernaliziranom CTxB, nešto citoplazmatski i vrlo slabo perinuklearno. Nakon 3 sata kolokalizacije više nema (nije prikazano i kasnije).



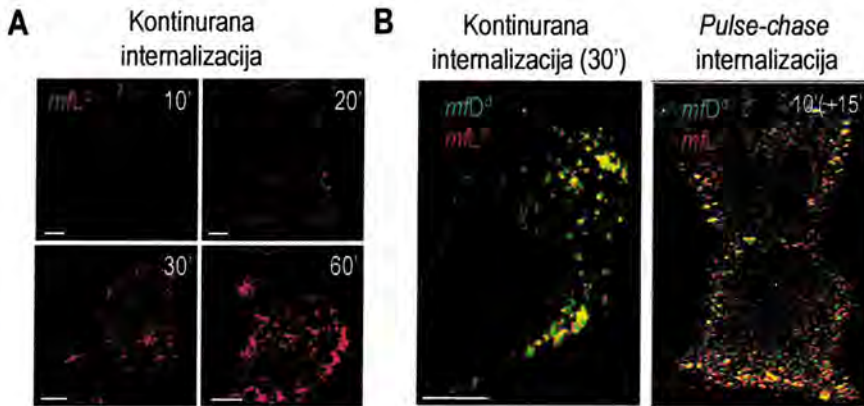
Slika 63. *Kontinuirana* internalizacija kolera-toksina i MHC-I molekula. Nakon vezivanja CTxB Alexa 555 (crvena fluorescencija) u kombinaciji s mPt protiv MHC-I molekula u navedenim vremenima se odvijala internalizacija molekula sa stanične površine fibroblasta Balb 3T3. Nakon toga, površinska mPt su uklonjena kratkotrajnim zakiseljavanjem a internalizirane MHC-I molekule vizualizirane dodavanjem sekundarnog protutijela (crvena fluorescencija) i kolokalizirane s internaliziranom CTxB. Mjerna crta = 10 μm - veća povećanja; 2 μm - manja povećanja. Debljina snimka (z) = 0,5 μm .

4.2.2.3. Internalizacija nepravilno svijenih (*misfolded*) površinskih glikoproteina

U prethodnom odjeljku smo pratili unutarstaničnu sudbinu nativnih molekula. Iako se *misfolded* proteini prema svojim svojstvima mogu svrstavati u skupinu s nativnim nekonformiranim molekulama, one ipak predstavljaju zasebnu skupinu, prvenstveno stoga što su u našim pokusima umjetno nastale (prethodno opisanim kratkotrajnim zakiseljavanjem). Od *misfolded* molekula najviše smo istraživali *misfolded* molekule L^d , uglavnom stoga što smo ih mogli pratiti protutijelom koje prepoznaje isključivo njihovu konformaciju. No, pored njih su praćene i *misfolded* molekule D^d pomoću protutijela 34-2-12s koje prepoznaje obje konformacije, te *misfolded* TfR. Iako je protutijelo koje prepoznaje nativnu konformaciju jednako prepoznaje i *misfolded* (iako slabije, nije prikazano), za očekivati je da izlaganje niskom pH od 2,0 dovodi do promjene konformacije, a time možda i do drugačijeg usmjerenja u endocitoznom putu. Bitno je napomenuti da su u svim protokolima, nakon izazivanja

promjene konformacije izlaganjem pH 2,0 (20 sekundi), stanice prije površinskog obilježavanja odgovarajućim monoklonskim protutijelom 10-15 minuta inkubirane u mediju pH 7,4 na 37°C, kao bi se osiguralo premještanje novonastalih nekonformiranih molekula u pripadajuće membranske mikrodomene, a prema rezultatima dobijenim ranije (slike 36 i 37).

Misfolded molekule L^d se vrlo brzo endocitiraju u velike vezikule koje pokazuju obrazac vrlo sličan onome nativnih nekonformiranih molekula L^d (slika 48 i 69a), osim što je signal puno jači usljed većeg broja internaliziranih molekula. Na početku internalizacije se nalaze periferno u citoplazmi a kasnije (30 min i dulje) najviše perinuklearno. Pored toga možemo uočiti da se *misfolded* molekule L^d izrazito jako kolokaliziraju s *misfolded* molekulama D^d , jednako nakon kontinuirane i *pulse-chase* internalizacije (slika 69b), prema protokolima prikazanim na slikama 49 i 50. Ovaj rezultat je u skladu s prethodnim koji ukazuje da se konformirane molekule međusobno jako kolokaliziraju nakon internalizacije, za razliku od konformiranih i nekonformiranih molekula gdje je stupanj kolokalizacije znatno slabiji. Prema tome, barem u slučaju MHC-I molekula, konformacija bi mogla biti od presudnog značaja za sortiranje u endocitoznom putu.

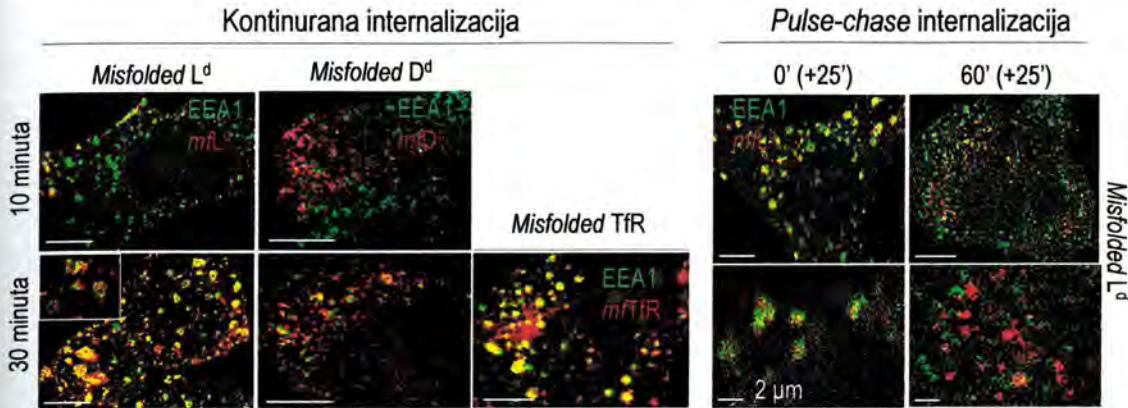


Slika 64. Obrasci internalizacije *misfolded* MHC-I molekula. (A) Nakon kratkotrajnog zakiseljavanja (pH 2,0; 30 sek.), površinske *misfolded* (*mf*) molekule L^d su obilježene pomoću mPt 64-3-7, te su internalizirane sa stanične površine fibroblasta Balb 3T3 navedeno vrijeme i vizualizirane konfokalnom mikroskopijom. (B) Zajedno s *misfolded* molekulama L^d internalizirane su i *misfolded* molekule D^d (mPt 34-2-12s) prema protokolu kontinuirane internalizacije, odnosno *pulse-chase* (10' *pulse*, 15' *chase*) internalizacije. Mjerna crta = 10 µm. Debljina snimka (z) = 0,5 µm.

Kako bismo točnije ustanovili endocitoznu sudbinu internaliziranih *misfolded* proteina kolokalizirali smo ih s istim markerima endosomalnih odjeljaka i puteva kao i u slučaju nativnih molekula. Nakon kontinuirane internalizacije i kolokalizacije s EEA1 ustanovili smo da se *misfolded* molekule D^d , a posebno *misfolded* L^d , znatno kolokaliziraju s EEA1. *Misfolded* molekule L^d su već nakon 20, a osobito nakon 30 minuta, gotovo potpuno kolokalizirane s EEA1, a vezikule su često sastavljene od više domena, sličnim onima koje se često viđaju i u kombinaciji EEA1 i nativnih nekonformiranih molekula L^d (slika 65).

Kao što je već rečeno, nastanak *misfolded* Tfr izazvali smo istim protokolom zakiseljavanja kao i nastanak *misfolded* MHC-I molekula. No, protutijelo koje prepoznaje nativnu konformaciju (R17), prepoznaje također i onu *misfolded*, a *misfolded* Tfr također vezuje transferin (nije prikazano). On se kolokalizira s EEA1 vrlo intenzivno

(izgleda još i više nego nativni konformiran oblik). Tako jak intenzitet kolokalizacije podsjeća na onaj *misfolded* MHC-I molekula, osobito *misfolded* molekula L^d (slika 38a). Pored toga, kolokalizaciju *misfolded* molekula L^d s EEA1 smo također pratili i nakon *pulse-chase* protokola. Ove molekule se se nakon *pulsa* izrazito jako citoplazmatski kolokaliziraju s EEA1 (kao i u ranijem eksperimentu), jednako kao i nakon dodatnih 15 i 30 minuta *chase* perioda. No, nakon 1 sata ta kolokalizacija postaje vrlo slaba ili uopće nije prisutna (slika 65), a jednako tako je niti nema nakon 2 sata (bit će prikazano kasnije kad bude govora o retencijskom odjeljku).

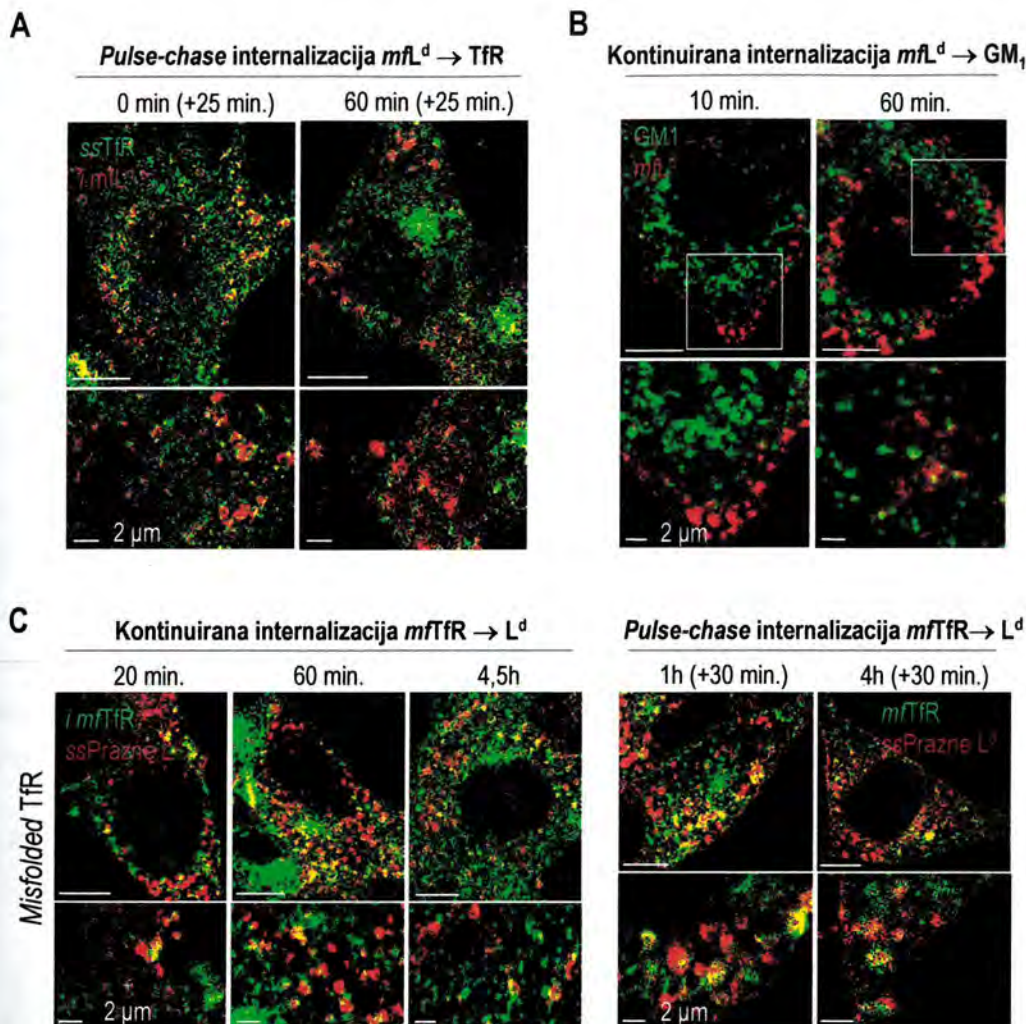


Slika 65. Kolokalizacija internaliziranih *misfolded* molekula s EEA1. (A) Nakon kratkotrajnog zakiseljavanja (pH 2,0; 30 sek), površinske *misfolded* (*mf*) molekule L^d ili *misfolded* TfR su obilježene pomoću odgovarajućih mPt, te su internalizirani sa stanične površine fibroblasta Balb 3T3 10 i 30 min, te kolokalizirane s EEA1. (B) Prema protokolu *pulse-chase* (25' *pulse*, 60' *chase*) internalizacije praćene su internalizirane *misfolded* molekule L^d koje su potom kolokalizirane s EEA1. Mjerna crta = 10 μ m – veća povećanja; 2 μ m – manja povećanja. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

Nadalje, *misfolded* molekule L^d su kolokalizirane i s **Rab11**, te je nakon kontinuirane internalizacije nakon 20 minuta, kao i nakon 45 minuta (nije prikazano) ustanovljeno da se, jednako kao i nativne nekonformirane molekule L^d , ne kolokaliziraju s ovim markerom.

Iako se nativne prazne molekule L^d ne kolokaliziraju sa **steady state** TfR, zanimljivo je da *misfolded* molekule L^d pokazuju znatan stupanj citoplazmatske kolokalizacije neposredno nakon *pulsa* i to uglavnom u obrascu multidomenskih vezikula, a što se može vidjeti na većim povećanjima. No, nakon 60 min. *chase* perioda, ta kolokalizacija se znatno smanjuje. Uzrok kolokalizaciji u ranijem razdoblju bi mogao biti dolazak *misfolded* molekula L^d u EE, u kojima se nalazi i dio TfR. Vjerojatno se nakon umjetnog stvaranja izuzetno velikog broja nekonformiranih, odnosno nepravilno svijenih, molekula L^d na staničnoj površini znatno potiče njihova endocitoza, čija je kinetika brža nego u normalnim uvjetima, te stoga velik broj molekula istodobno ulazi u određeni endosomalni odjeljak, u ovom slučaju u EE. U prilog pretpostavci da se i ove molekule ne recikliraju govori odsustvo njihove lokalizacije u jukstanuklearnom području, kao i odsustvo kolokalizacije s Rab11 nakon internalizacije.

U skladu s ranijim rezultatima prema kojima se niti *steady state*, niti internalizirane MHC-I molekule i GM₁ međusobno nisu kolokalizirali, također nakon 10, 20, 30, 45 i 60 minuta kontinuirane internalizacije *misfolded* nekonformirane molekule L^d ne ulaze u GM₁ pozitivne odjeljke (slika 66b, prikazano samo 10 i 60 minuta).



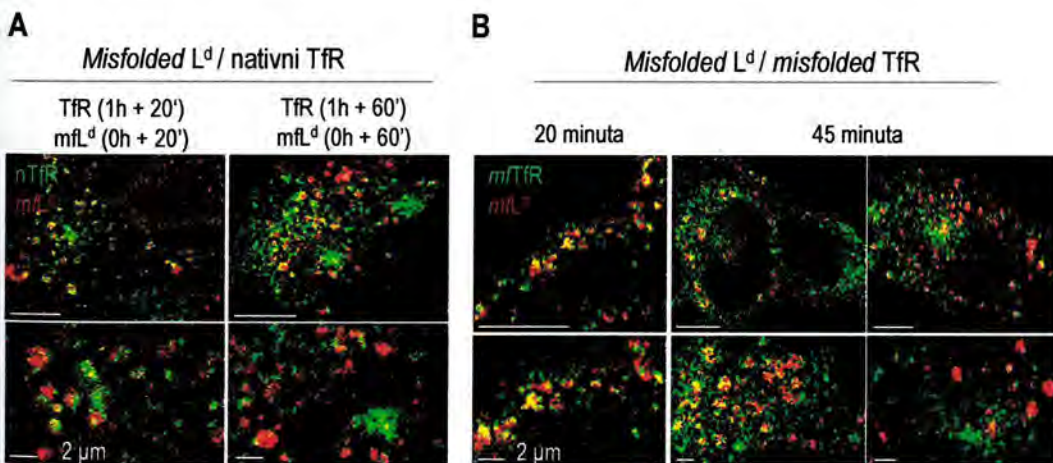
Slika 66. Kolokalizacija internaliziranih *misfolded* molekula L^d i molekula TfR. (A) Nakon kratkotrajnog zakiseljavanja (pH 2,0; 30 sek.), površinske *misfolded* (*mf*) molekule L^d obilježene 64-3-7 mPt, su internalizirane sa stanične površine fibroblasta Balb 3T3 u protokolu *pulse-chase* (25' *pulse*, 60' *chase*) internalizacije te kolokalizirane sa *steady state* (ss)TfR. (B) Nakon kontinuirane internalizacije *misfolded* molekule L^d su kolokalizirane s GM₁ (vizualiziran pomoću CTxB B Alexa 555). (C) Internalizacija *misfolded* TfR u odjeljke praznih molekula L^d je praćena nakon kontinuirane i *pulse-chase* internalizacije (30' *pulse*). Mjerna crta = 10 μ m – veća povećanja; 2 μ m – manja povećanja. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

Kako bismo ustanovili da li konformacija TfR utječe na njegov stupanj kolokalizacije sa *steady state* nekonformiranim molekulama L^d, nakon konituirane i u *pulse-chase* inetmalizacije koju smo ranije opisali (slika 59), dio stanica je prije dodavanja protu-TfR protutijela kratkotrajno zakiseljen kako bi došlo do poticanja njihova *misfoldinga*. Možemo uočiti da se internalizirani *misfolded* TfR pomalo počinje citoplazmatski kolokalizirati sa *steady state* nekonformiranim molekulama L^d već nakon 20 minuta, a znatnije se pojačava i ostaje na istom stupnju nakon 40 minuta, te 1, 1,5, 2,5 i 4 sata u protokolu kontinuirane internalizacije, odnosno zamjetno se vidi

kolokaliziran nakon sva tri vremena *chase* razdoblja (1, 2 i 4 sata) u *pulse-chase* eksperimentu (slika 66c). Važno je napomenuti ne samo da je stupanj ekspresije *misfolded* TfR jednak kao i stupanj ekspresije nativnog TfR 4h nakon *pulsa* (30 minuta), što ukazuje da se i *misfolded* konformacija vjerojatno reciklira ili se zadržava u nekon retencijskom odjeljku, što je manje vjerojatno obzirom da je i obrazac ovih dvaju konformacija nakon internalizacije sličan. Na isti zaključak upućuju i rezultati eksperimenta za praćenje recikliranja (odjeljak 4.4).

Zanimljivo je da se u oba protokola internaliziran *misfolded* TfR ranije i znatnije kolokalizira sa *steady state* praznim molekulama L^d , u usporedbi s nativnim TfR. To bi se moglo objasniti naglom internalizacijom koja je posljedica *misfoldinga* (iako se TfR sam po sebi brzo endocitira). No, isto tako, moguće je da nekonformirane molekule imaju sklonost ulasku u neki, njima zajednički, odjeljak (vjerojatno kasni). Problem kod ovog objašnjenja je taj što je također vjerojatno da se *misfolded* TfR reciklira (iako će dalje još trebati ispitati u kojoj mjeri), a to, prema svemu dosada rečenom, nije vjerojatno za nekonformirane molekule L^d . Nadalje, ova dva objašnjenja se međusobno ne isključuju, nagla internalizacija može za posljedicu imati brži *turn-over* *misfolded* TfR, a time i ranije vrijeme dolaska u kisele odjeljke, pozitivne na prazne molekule L^d .

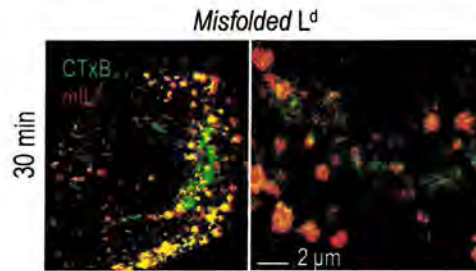
Nadalje, pratili smo **kointernalizaciju *misfolded* molekula L^d s nativnim, odnosno *misfolded* TfR**, prema ranije opisanom protokolu (slika 62). Najprije se TfR internalizirao 1 sat, zatim su stanice kratkotrajno izložene pH 2,0 i obilježene mPt na prazne molekule L^d , nakon čega je internalizacija dopuštena narednih 20, 40 i 60 minuta za obje molekule. Slično kao i u slučaju nativnih nekonformiranih molekula L^d , ali znatno jače, u svim vremenima nakon početka endocitoze *misfolded* molekula L^d (20, 40 i 60 min.), možemo uočiti opisane multidomske odjeljke (slika 67a).



Slika 67. Kointernalizacija *misfolded* molekula L^d s nativnim i *misfolded* TfR. (A) Balb 3T3 fibroblasti su površinski obilježeni mPt R17 (protu-TfR), koji je nakon toga internaliziran 1 sat. Stanice su potom kratkotrajno zakiseljane (pH 2,0; 30 sek.), a površinske *misfolded* (*mf*) molekule L^d obilježene mPt 64-3-7, te internalizirane 20, odnosno 60 minuta. Internaliziran nativni (*n*) TfR i *misfolded* molekule L^d su potom kolokalizirani. (B) Nakon zakiseljavanja (pH 2,0; 30 sek.) *misfolded* molekule L^d i TfR su internalizirani navedeno vrijeme, i prikazani konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm – veća povećanja; 2 μm – manja povećanja. Debljina snimka (*z*) = 0,5 μm .

Usto, istodobnom internalizacijom *misfolded TfR* i *misfolded molekula L^d* uočavamo znatnu perifernu citoplazmatsku kolokalizaciju već nakon 20 minuta, koja se održava i nakon 45 minuta (iako u nekim stanicama nešto slabije), ali ovaj put perinuklearnom obrascu (slika 67b).

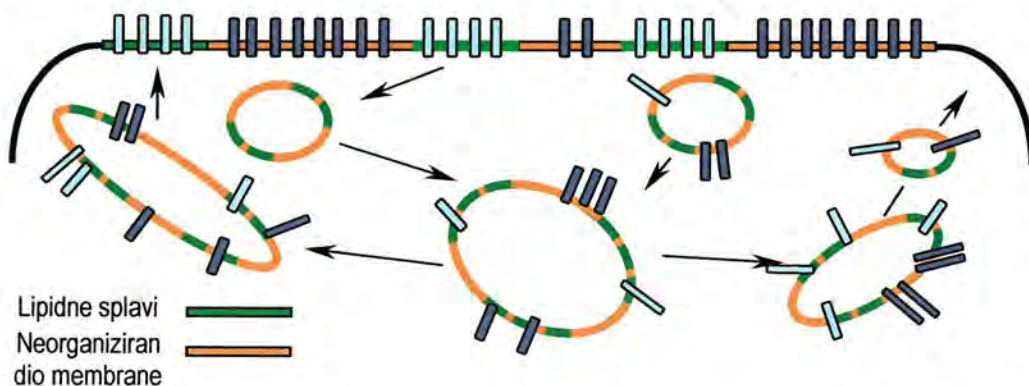
U konačnici, nakon 30 minuta kontinuirane internalizacije, zanimljivo je da se, za razliku od nativnih praznih molekula L^d, ***misfolded molekule L^d*** znatno citoplazmatski kolokaliziraju s CTxB, iako prinuklearan obrazac izostaje (slika 68). Ova pojava podsjeća na lokalizaciju kolokalizacije *misfolded* molekula L^d i TfR.



Slika 68. Kontinuirana kointernalizacija *misfolded* molekula L^d s kolera-toksinom. Fibroblasti Balb 3T3 su kratkotrajno zakiseljeni (pH 2,0; 30 sek.) i *misfolded* molekule L^d su obilježene s 64-3-7 mPt a GM₁ s CTxB-Alexa 555. Nakon kontinuirane internalizacije od 30 minuta molekule suprikazane konfokalnom mikroskopijom. Debljina snimka (z) = 0,5 µm.

4.2.2.4. Internalizirane površinske molekule nakon endocitoze ostaju u istoj domeni

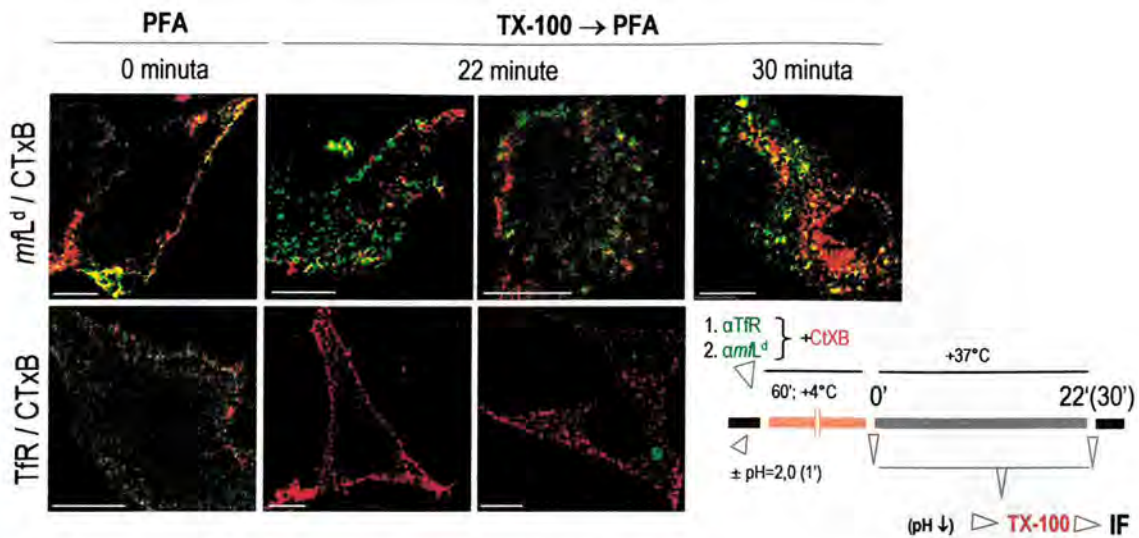
U našim ranijim pokusima pokazali smo da se nekonformirane molekule L^d nalaze u detergent-otpornim domenama, bilo kao native ili umjetno nastale iz punih nakon kratkotrajnog zakiseljavanja. Suprotno tome, konformirane MHC-I molekule se ispiru sa stanične površine nakon djelovanja neionskih detergenata (odjeljak 4.1.2.1.). Zbog toga, možemo pretpostaviti da se smještaj neke molekule u zadanoj membranskoj mikrodomeni na staničnoj površini zadržava i nakon njezine endocitoze (slika 69).



Slika 69. Hipoteza ostajanja endocitiranih molekula u istoj membranskoj mikrodomeni nakon endocitoze. Prema pretpostavci molekule koje su internalizirane u stanicu u jednoj domeni ostaju u njoj cijelo vrijeme.

Stoga smo na stanice Balb 3T3 nakon kontinuirane internalizacije monoklonskog protutijela (za TfR i mFL^d), odnosno liganda (CTxB) vezanih na ispitivane molekule tretirali s TX-100 (slika 70). Obzirom da smo ranije

pokazali da TX-100, pored površinskih, može ukloniti i unutarstanične molekule (slika 33), pretpostavili smo da će internalizirane molekule koje se nalaze u DRM i dalje ostati vezane u membrani, dok će se one koje se nalaze u DSM isprati.



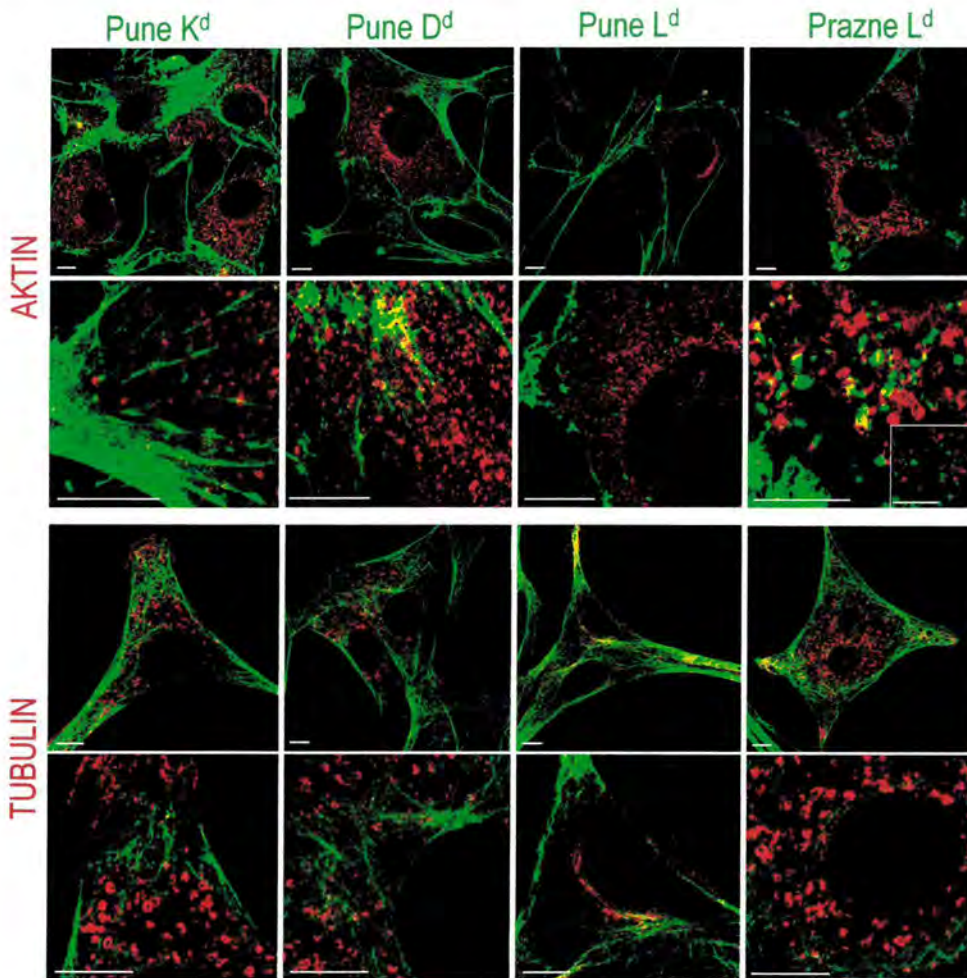
Slika 70. Učinak TX-100 na ispiranje internaliziranih molekula iz unutarstaničnih membranskih mikrodomena. Na površinu fibroblasta Balb 3T3 su vezana mPt 64-3-7 (mL^d) i CTxB-Alexa 555 (stanice prethodno izložene kiselom mediju pH 2,0 kroz 30 sek.), ili mPt R17 (TfR) i CTxB-Alexa 555. Nakon internalizacije dio stanica je ostao netretiran (nije prikazano), a dio je tretiran TX-100 (0,5%, 45 sek.). Potom su stanice fiksirane i molekule obilježene sekundarnim protutijelom mikroskopijom. CTxB - crvena fluorescencija; TfR i mL^d – zelena fluorescencija. Mjerna crta = 10 μ m. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

Prema očekivju, CTxB je ostalo vezan u staničnoj membrani (najvjerojatnije i dalje za svoj GM₁ receptor), kako na staničnoj membrani u početnom vremenu, tako i u membranama unutarstaničnih odjeljaka nakon 22 i 30 minuta internalizacije. Jednako tako se uočavaju i *misfolded* molekule L^d, za koje se može vidjeti i da se djelomično kolokaliziraju s internaliziranim CTxB (slika 70). Suprotno tome, TfR (slika 70) i pune molekule L^d (nije prikazano) se nakon tretmana TX-100 ne uočavaju niti na staničnoj površini ni unutar stanice. Jednak rezultat je dobven i na staničnoj liniji fibroblasta L-L^d (nije prikazano).

Prema tome, možemo zaključiti da se molekule nakon internalizacije (barem u ranijim razdobljima) zadržavaju u istim membranskim mikrodomenima kao i na plazmatskoj membrani. Kasnije ćemo vidjeti da li promjena konformacije molekule utječe na premještanje u drugu membransku mikrodomenu (odjeljak 4.5.4.2.).

4.3. UČINAK CITOSKELETA NA IZRAŽAJ MHC MOLEKULA I RAZREDA

Iako se dugo vremena smatralo da citoskelet predstavlja relativno inertnu strukturu, u novije vrijeme se sve više otkriva njegov značaj u mnogobrojnim dinamičkim procesima, od kojih ubrajamo i unutarstanični prijenos internaliziranih molekula. Stoga smo odlučili ispitati njegovu ulogu i na izražaj i endocitozni put MHC-I molekula, imajući na umu prvenstveno njegovu važnost u omogućavanju prijenosa molekula ka kasnijim endosomalnim odjeljcima, odnosno onima koji ih vode u degradaciju.



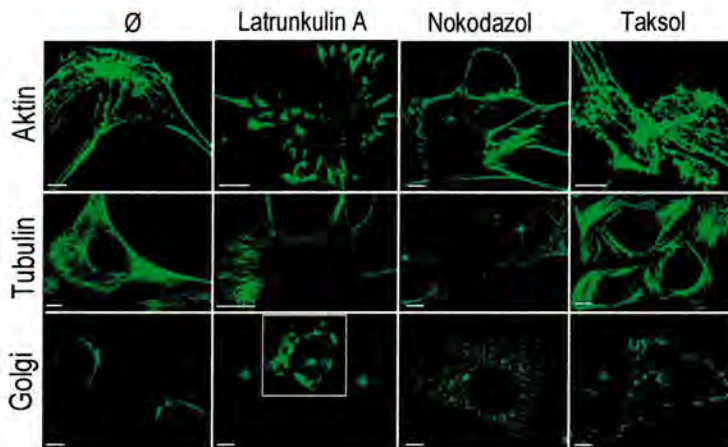
Slika 71. Kolokalizacija MHC-I molekula s citoskeletom. MHC-I molekule (crvena fluorescencija) su na stanicama fibroblasta Balb 3T3 kolokalizirane s aktinom, odnosno tubulinom (zelena fluorescencija). Mjerna crta = 10 μm . Debljina snimka (z) = 0,5 μm .

U pokusima u kojima smo međusobno kolokalizirali *steady state* MHC-I molekule s aktinskim mikrofilamentima, koji su vizualizirani pomoću fluorescentno obilježenog *phalloidina*, tvari koja vezuje i polimerizira aktinske mikrofilamente (239), uočili smo da se ova dva proteina općenito međusobno ne kolokaliziraju. Međutim, možemo vidjeti vezikule MHC-I molekula koje su smještene na nitima aktina (slika 71), kako unutar stanice, tako i u blizini njezine površine (ili čak i na samoj PM). Kao što smo ranije naglasili, recikliranje MHC-I molekula je ovisno o

aktinu. No, i većina drugih procesa koji se odvijaju u stanici, primjerice sama endocitoza, vjerojatno zahtijevaju normalnu funkciju ovog proteina.

Vrlo slična situacija, ali nešto jače izražena, zamijećena je nakon ispitivanja kolokalizacije MHC-I molekula i β -tubulina. Često se konformirane MHC-I molekule (osobito pune molekule L^d) mogu uočiti smještene oko organizirajućeg centra mikrotubula (MTOC - engl. *microtubule organizing centre*), što se najvjerojatnije podudara s njihovim smještajem u GA (slika 71). Nadalje, ERC se također nalazi u tom području. Ipak, u tom jukstankulearnom dijelu se uočavaju i prazne molekule L^d. No, obzirom je prijenos proteina prema kasnim, često degradacijskim endosomalnim odjeljcima (kasni endosomi i lizosomi), ovisan o mikrotubulima, smještaj ispitivanih vezikula u njihovoj blizini također ukazuje da one slijede i ovu granu endosomalnog puta. Daljnja kolokalizacija s motornim proteinima (kinezinom i dinaminom) je potrebna kako bi se bolje mogla razlučiti uloga mikrotubula u vezikularnom prijenosu.

Stanični citoskelet, kako aktinski, tako i mikrotubularni, može biti narušen djelovanjem brojnih kemijskih tvari, od kojih neki svojim djelovanjem uzrokuju njegovu prekomjernu stabilizaciju, dok drugi dovode do njegove destabilizacije i potpune dezintegracije. U našim pokusima (slika 54) koristili smo *citohalazin D* i *latrunkulin A*, tvari koje destabiliziraju aktinsku mrežu (239, 240, 241), te *taksol* kao stabilizator, odnosno *nokodazol* kao destabilizator mikrotubularne mreže (242, 243).

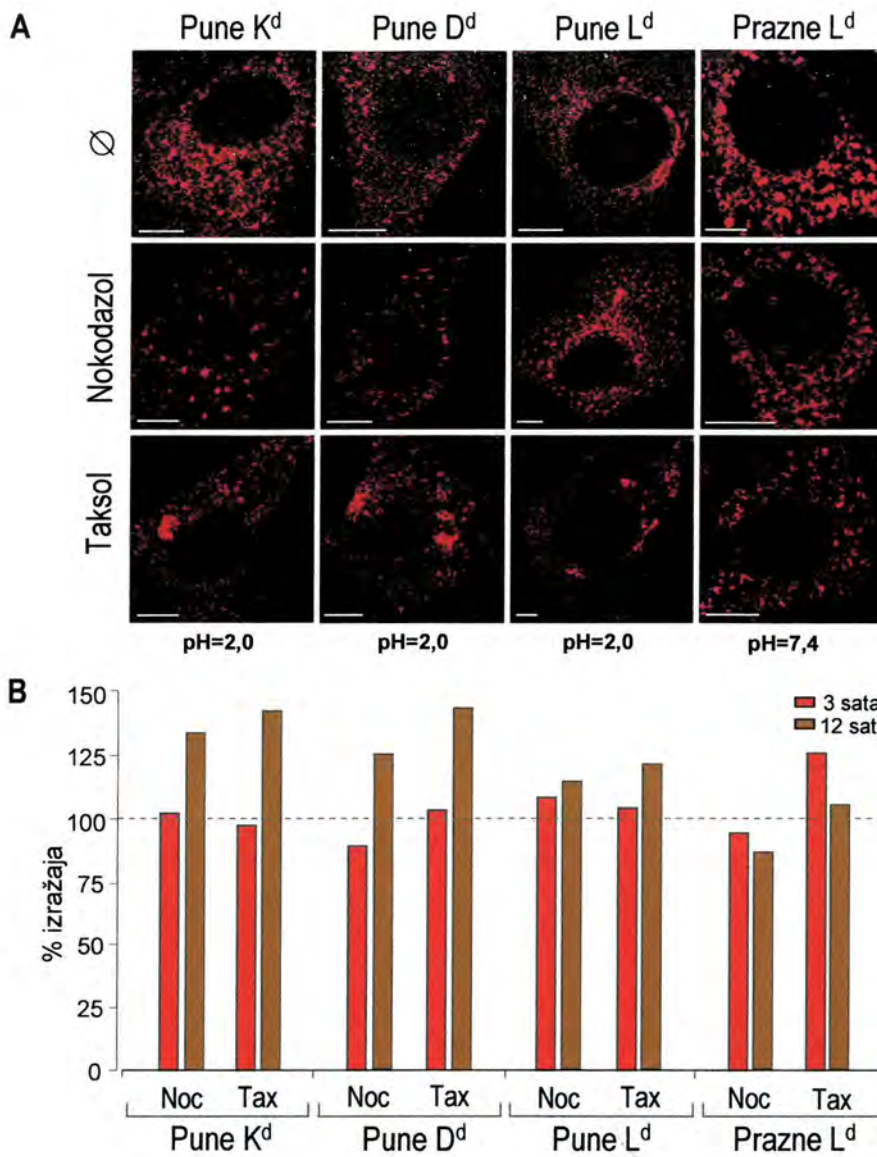


Slika 72. Kolokalizacija MHC-I molekula s citoskeletom. Stanice Balb 3T3 su inkubirane bez (Ø) ili u prisustvu inhibitora normalne integracije citoskeleta. Latrunkulin A (1 μ M), nokodazol (4 μ M) i taksol (30 μ M) djelovali su 2 sata. Potom su u stanicama fluorescentno obilježeni aktin (Phalloidin-Alexa 488), Tubulin (α -tubulin) i Golgijev aparat (GM130), te vizualizirani konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μ m. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

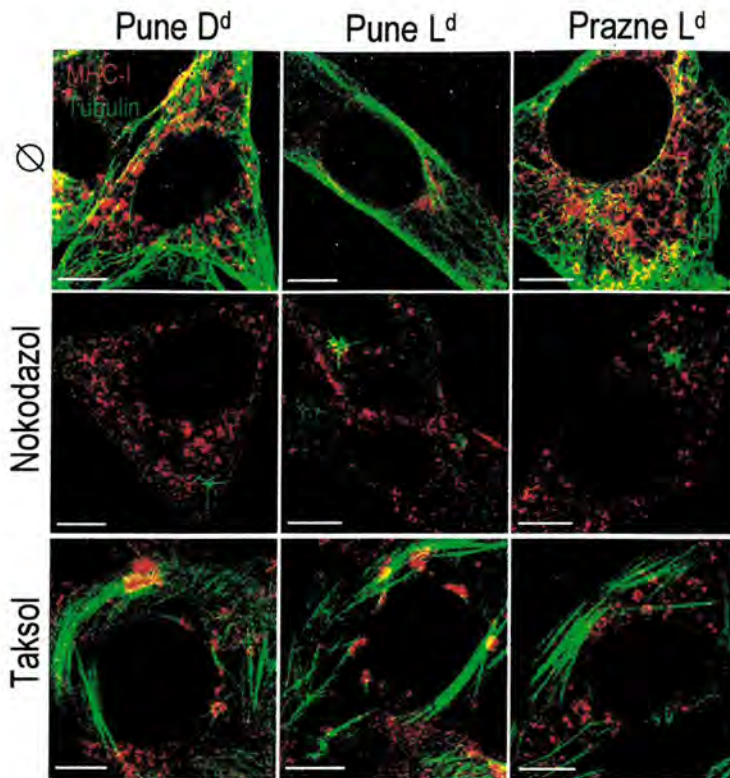
Za *taksol* je utvrđeno da nakon 2-3 sata uzrokuje polimerizaciju slobodnih mikrotubula koji nisu povezani s MTOC (MTOC fenotipski ostaje nepromijenjen nakon tretmana), a pojavljuju se u obrascu snopića na staničnoj periferiji, ostavljajući velika područja citoplazme bez ovog proteina. Kao posljedica toga GA se fragmentira, te premješta perifernije (242, slika 45). Suprotno tome, nokodazol vezuje tubularne podjedinice uzrokujući depolimerizaciju mikrotubula (242). Nakon njegovog djelovanja (2-3 sata), jednako kao i nakon djelovanja drugih inhibitora koji djeluju sličnim mehanizmom (vinblastin, kolhicin), mikrotubuli se više ne mogu uočiti u citoplazmi, ili samo vrlo

slabo, dok se u blizini jezgre može vidjeti zvjezdoliki ostatak MTOC. Nadalje, GA se fragmentira, ali na način različit nakon djelovanja taksola: fragmenti su znatno manji i nasumično raspoređeni po citoplazmi (242, slika 72). Na kraju, nakon djelovanja latrunkulina A, uočava se fragmentacija aktinske mreže, koja se degradira i pomiče periferno, te stanice zadobijaju zvjezdasti oblik. Zanimljivo je da usljed djelovanja latrunkulina A dolazi i do fragmentacije GA (slično kao i nakon djelovanja taksola), jednako kao i to što nokodazol izaziva narušavanje normalne aktinske strukture (slika 72). Sve to ukazuje da su aktinska i mikrotubularna mreža međusobno povezane i zajednički djeluju u sklopu citoskeletne mreže.

Nadalje, s obzirom na mikrotubularnu uključenost u vezikularnom prijenosu, ispitali smo kako **nokodazol** i **taksol** utječu na *steady state* izražaj MHC-I molekula. Nakon 2 sata djelovanja nokodazola izražaj MHC-I molekula se smanjuje, vezikule konformiranih K^d i D^d i nekonformiranih molekula L^d postaju manje i rjeđe, raspoređene nasumično po citoplazmi i periferno. To je još uočljivije kod duljih kinetika (odjeljak 4.2.7.3.1.), ali se počinje uočavati već nako 20-30 minuta (nije prikazano). Suprotno tome, pune molekule L^d se vide u obliku sitnih vezikula, što je najvjerojatnije posljedica fragmentacije GA, primarnog mjesta njihove unutarstanične lokalizacije (slika 73a). Nadalje, nakon 5 sati djelovanja taksola izražaj MHC-I molekula se također smanjuje, bez obzira što je mehanizam njegova djelovanja upravo suprotan djelovanju nokodazola. Ipak, obrazac ekspresije je nešto različit, s dominacijom rjeđih i nasumično raspoređenih vezikula različitih veličina i oblika koje izgledaju kao da se rasplinjuju i nestaju, što se i uočava u kasnijim kinetikama (slika 73a). Veća zastupljenost sitnih vezikula nakon djelovanja taksola je ranije opisana. Naime, nakon 2,5 sata izlaganja stanica ovom inhibitoru zapaženo je četverostruko povećanje broja manjih i multivezikularnih (<500 nm u promjeru), te proporcionalno smanjenje broja većih vezikula (>500 nm u promjeru) (243). Dakle, smanjenje citoplazmatskog izražaja MHC-I molekula nakon narušavanja normalne mikrotubularne strukture i funkcije ukazuje na njegovo značenje u njihovoj dinamici. Ono bi, s jedne strane, moglo biti uzrokovano narušavanjem strukture i funkcije ER i GA, što bi za posljedicu imalo smanjenje njihove sinteze. No, s druge strane, ako se uzme u obzir uloga mikrotubula u usmjeravanju molekula u degradaciju, za očekivati je očuvanje njihove ekspresije. Naime, iako nakon 3 sata djelovanja nokodazola na stanice P815 (slika 73b) i Balb 3T3 (nije prikazano), protočnom citometrijom nismo uočili značajnije promjene površinske ekspresije MHC-I molekula. To pretpostavku potvrđuje povećanje izražaja konformiranih molekula (prvenstveno K^d i D^d) i blago smanjenje nekonformiranih molekula L^d na stanicama P815 nakon 12h. Međutim, unutarstanično smanjenje ekspresije MHC-I molekula koje je ustanovljeno konfokalnom mikroskopijom nakon 12 sati djelovanja nokodazola (nije prikazano) u suprotnosti je s rezultatima dobivenim protočnom citometrijom. Sličan je rezultat daje i taksol, s razlikom da je ovaj inhibitor izazvao povećanje površinske ekspresije i praznih molekula L^d nakon 3, ali ne i nakon 12 sati. Prema tome, očito je da su u proces dotoka i gubitka MHC-I molekula sa stanične površine mikrotubuli uključeni na više načina, a njihova ravnoteža bitna je za održavanje ravnoteže izražaja MHC-I molekula. Stoga smo u narednim pokusima kolokalizirali MHC-I molekule s različitim unutarstaničnim markerima nakon djelovanja ovih inhibitora.



Slika 73. Učinak narušavanja strukture mikrotubula na unutarstaničnu i površinsku ekspresiju MHC-I molekula. (A) Stanice Balb 3T3 su inkubirane bez (∅) ili u prisustvu inhibitora normalne integracije mikrotubula: nokodazola (Noc, 4 μM, 2 sata) i taksola (Tax, 30 μM 5 sati). Potom su u stanicama fluorescentno obilježene MHC-I molekule, te vizualizirane konfokalnom mikroskopijom. (B) Nakon djelovanja inhibitora u istoj koncentraciji nakon 3 i 12 sati određen je površinski izražaj MHC-I molekula protočnom citometrijom. % izražaja predstavlja omjer MFI vrijednosti tretiranih i netretiranih stanica u ispitivanom vremenu. Isprekidana linija predstavlja postotak izražaja netretiranih stanica. Prikazana je reprezentativna vrijednost 4 neovisna pokusa. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.



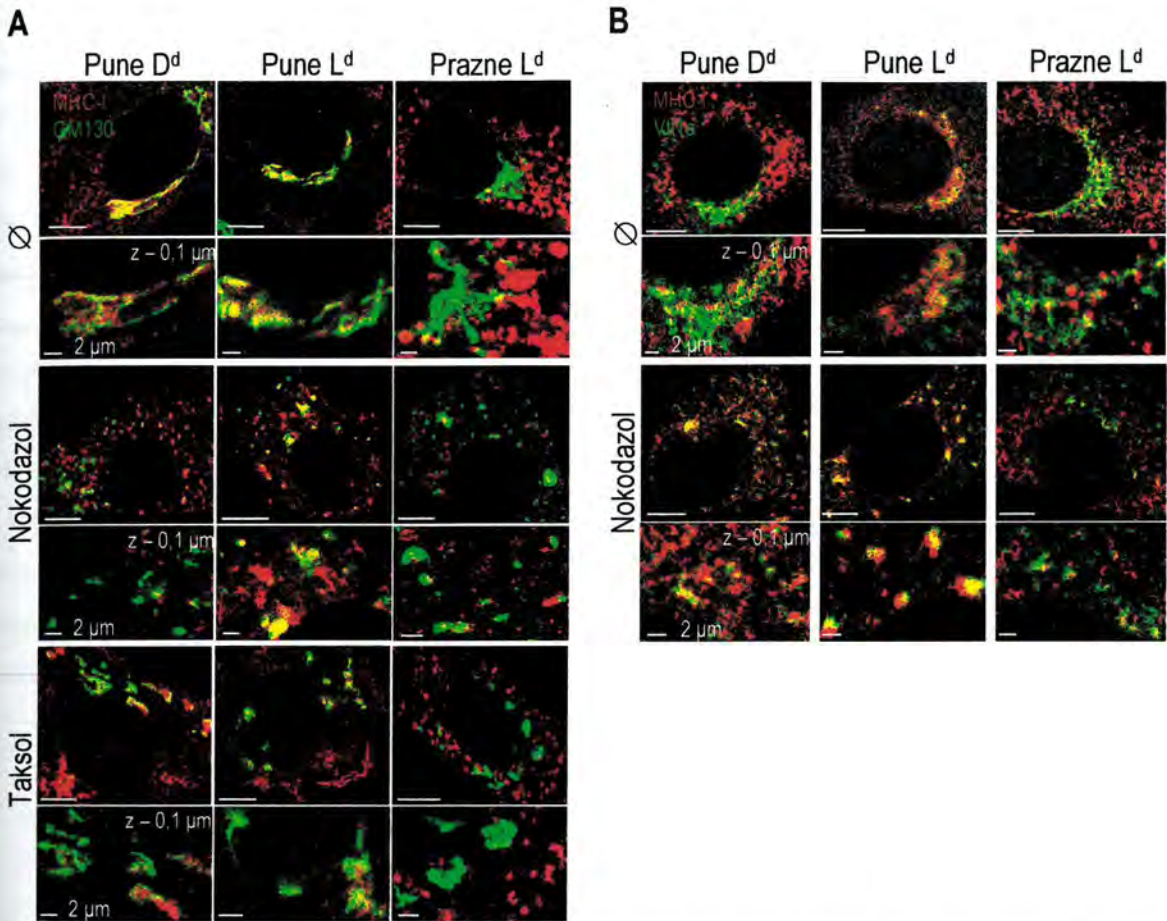
Slika 74. Učinak nokodazola i taksola na kolokalizaciju MHC-I molekula s tubulinom. Stanice Balb 3T3 su inkubirane bez (\emptyset), ili u prisustvu nokodazola (4 μ M, 3 sata) odnosno taksola (30 μ M, 5 sati). Potom su u stanicama fluorescentno obilježene MHC-I molekule (crvena fluorescencija), te kolokalizirane s α -tubulinom i vizualizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μ m. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

Na slici 74 možemo uočiti da se nakon 3 sata djelovanja nokodazola od mikrotubula uočava jedino ostatak MTOC, u blizini kojega se može vidjeti pokoja MHC-I vezikula. MHC-I vezikule su ponovo slabije izražene u usporedbi s kontrolom. Nadalje, nakon 5 sati djelovanja taksola krpaste MHC-I vezikule (osobito konformiranih molekula D^d i L^d) se mogu naći u blizini snopića polimeriziranog citoplazmatskog tubulina. Zanimljiva je slika s punim molekulama L^d čije su vezikule često smještene na repovima polimeriziranog tubulina, a vjerojatno se podudaraju s lokalizacijom fragmentiranog GA.

Kako bismo utvrdili koliki udio preostalih vezikula MHC-I molekula nakon djelovanja ovih inhibitora je porijeklom iz GA, molekule smo kolokalizirali s GM130 (marker *cis* GA), odnosno s Vti1a (marker *trans* GA i sekretornih vezikula) (slika 75).

Iako izgleda da se u kontroli konformirane molekule D^d i L^d relativno jako kolokaliziraju, kako s GM130, tako i s Vti1a, a prazne molekule L^d slabo ili nimalo s GM130, a nešto jače s Vti1a, obzirom da je u tom području stanice signal dosta jak, ne može se sa sigurnošću reći da kolokalizacija nije samo posljedica nedovoljne moći razlučivanja mikroskopa (0,2 μ m). No, kako i nokodazol i taksol uzrokuju fragmentiranje GA, nakon njihovog djelovanja bolje možemo procijeniti stvaran stupanj kolokalizacije. Kako nakon djelovanja taksola (5 sati), tako i nakon djelovanja nokodazola (3 sata), molekule D^d ostaju parcijalno kolokalizirane s GM130. Ipak, znatan broj vezikula je ostao nekolokaliziran. Kako je i očekivano, te u skladu s prethodnim rezultatima, još se jači stupanj

kolokalizacije uočava između punih molekula L^d i GM130, nakon djelovanja i nokodazola i taksola. Prazne molekule L^d se ne vide kolokalizirane s GM130 (iznimno koja vezikula), nakon djelovanja bilo kojeg od inhibitora (slika 75a).

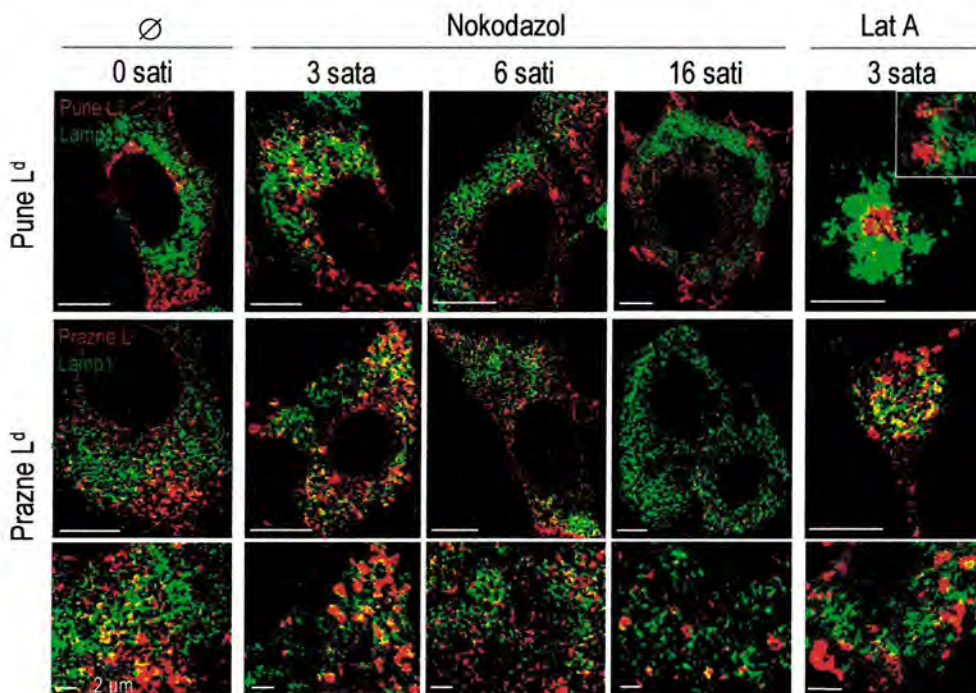


Slika 75. Učinak nokodazola i taksola na kolokalizaciju MHC-I molekula s markerima Golgijeva aparata. Stanice Balb 3T3 su izložene djelovanju nokodazola (4 μM, 3 sata) i taksola (20 μM, 5 sati). Potom su u stanicama fluorescentno obilježene MHC-I molekule (crvena fluorescencija), te kolokalizirane s(A) GM130 ili (B) Vti1a (zelene fluorescencije). Mjerna crta = 10 μm – manja povećanja; 2 μm – veća povećanja. Debljina snimka (z) = 0,5 μm - manja povećanja; 0,1 μm - veća povećanja.

Nadalje, kolokalizacija MHC-I molekula s Vti1a je praćena nakon 3 sata djelovanja nokodazola. Iako je zamjetan broj konformiranih molekula D^d kolokalizira s Vti1a u stanicama tretiranim nokodazolom, ponovo je veliki broj vezikula ostao nekolokaliziran, što nije slučaj i s punim molekulama L^d kod kojih su gotovo sve vezikule Vti1a pozitivne. Bitno je napomenuti da se i manji dio nekonformiranih molekula L^d kolokalizira s Vti1a, što se podudara s rezultatom dobivenim na netretiranim stanicama (slika 75b). Ovi rezultati ukazuju da se dio konformiranih molekula D^d i većina konformiranih molekula L^d nalazi u GA, najvjerojatnije u *trans* GA i sekretornim vezikulama. Nadalje, i jedan dio nekonformiranih molekula L^d se također nalazi u *trans* GA i sekretornim vezikulama, što nameće pitanje kako su tamo došle. Moguća su dva odgovora. Jedno je da su zaobišle kontrolu na prijelazu iz

ER u GA, a drugo da su nastale raspadom konformiranih molekula L^d u kiselijim sekretornim vezikulama. O tome će se podrobnije raspravljati u narednim odjeljcima.

Na kraju smo istražili kako *latrunkulin A* i *nokodazol* djeluju na *stupanj kolokalizacije molekula L^d i Lamp1*. Kao i u ranijim pokusima, u kontrolnim uzorcima Lamp1 se samo djelomično kolokalizirao s praznim i nimalo s punim molekulama L^d (slika 76). Nakon djelovanja *nokodazola* uočava se ekscentrično pomicanje Lamp1 u citoplazmi, što se može uočiti već nakon 3 sata, a zamjetno je nakon 6 i osobito nakon 16 sati. Molekule L^d , iako ostaju i perinuklearno, također se pomiču i periferno. Stupanj izražaja im je obrnuto razmjeran vremenu djelovanja *nokodazola* (iako se u nekim stanicama su relativno dobro uočljive i nakon 12-16 sati inkubacije). Važno je istaknuti da se prazne molekule L^d u kasnijim kinetikama gotovo uopće ne kolokaliziraju ili se izuzetno slabo mogu naći u Lamp1 odjeljcima, što ukazuje da je nefunkcionalnost mikrotubularne mreže najvjerojatnije spriječila taj put. Ipak, nameće se pitanje usljed čega im je izražaj ipak smanjen. Nadalje, pune molekule L^d se vide ponovo raspršene po citoplazmi i očekivano se ne kolokaliziraju s Lamp1. Promjena lokalizacije Lamp1 odjeljaka nakon djelovanja *nokodazola* (slika 76) i *taksola* (nije prikazano) je najvjerojatnije posljedica dezintegracije mikrotubula za koje se zna da su odgovorni, kako za prijenos molekula iz ranijih u kasne endosomalne odjeljke, tako i za prijenos molekula iz TGN u LE i lizosome, a što je osnovni način kako Lamp1/2 molekule dolaze do ovih odjeljaka. Nadalje, postoji i mogućnost da *taksol* narušava transport između samih kiselih odjeljaka (LE i lizosoma) (243).



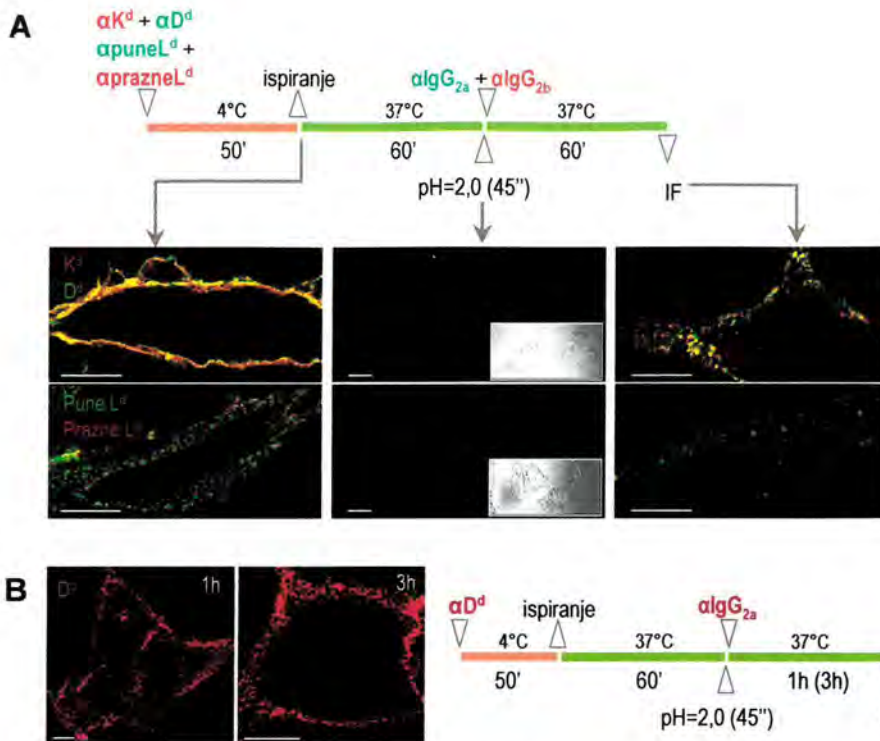
Slika 76. Učinak *nokodazola* i *latrunkulina A* na kolokalizaciju molekula L^d s Lamp1. Stanice Balb 3T3 su izložene djelovanju *nokodazola* (4 μM) ili *latrunkulina A* (Lat A, 1 μM) naznačeno vrijeme. Potom su u stanicama fluorescentno obilježene molekule L^d (crvena fluorescencija), te kolokalizirane s Lamp1 (zelena fluorescencija), Mjerna crta = 10 μm – manja povećanja; 2 μm – veća povećanja. Debljina snimka (z) = 0,5 μm .

Za razliku od nokodazola, učinak *latrunkulina A* se očituje prvenstveno na izgledu stanica, što uzrokuje poremećaj lokalizacije molekula. Naime, obzirom da je stanica izrazito smanjena i zaokružena (ne računajući tanke izdanke koji su nastali kao posljedica dezintergracije aktinskih mikrofilamenata), sve organele su stiješnjene u malom preostalom dijelu citoplazme oko jezgre. Stoga se niti ne može govoriti o njihovoj preciznijoj lokalizaciji unutar stanice. Ipak, prema onome što se može razlučiti na većim povećanjima, nakon 3 sata djelovanja ovog inhibitora (slika 76), stupanj kolokalizacije molekula L^d i Lamp1 se znatnije ne mijenja, a nakon 16 sati djelovanja cytochalasina D (nije prikazano) prazne molekule L^d se djelomično još mogu uočiti u Lamp1 odjeljcima, u nekim stanicama možda i jače nego u kontroli. Ovaj rezultat je u skladu s rezultatom dobivenim protočnom citometrijom, prema kojem se već nakon 3 sata na stanicama P815 i Balb 3T3 za 50% smanjuje ukupna površinska ekspresija MHC-I molekula (posebice praznih molekula L^d). Ukupnu unutarstaničnu ekspresiju molekula L^d konfokalnom mikroskopijom je teže procijeniti, prvenstveno usljed smanjenog citoplazmatskog prostora. Ipak, što se tiče praznih molekula L^d , čini se da se one i dalje unutarstanično dobro izražavaju, jednoliko raspoređene po citoplazmi. Međutim, za razliku od kontrole, grupiraju se u manji broj većih vezikula tipa C, između kojih se nerijetko mogu uočiti i manje vezikule. Slično se događa i s Lamp1-pozitivnim odjeljcima koji su također jednoliko raspoređene po citoplazmi, ali kod kojih je zastupljenost manjih vezikula ipak nešto veća (slika 76).

4.4. RECIKLIRANJE INTERNALIZIRANIH MEMBRANSKIH MOLEKULA

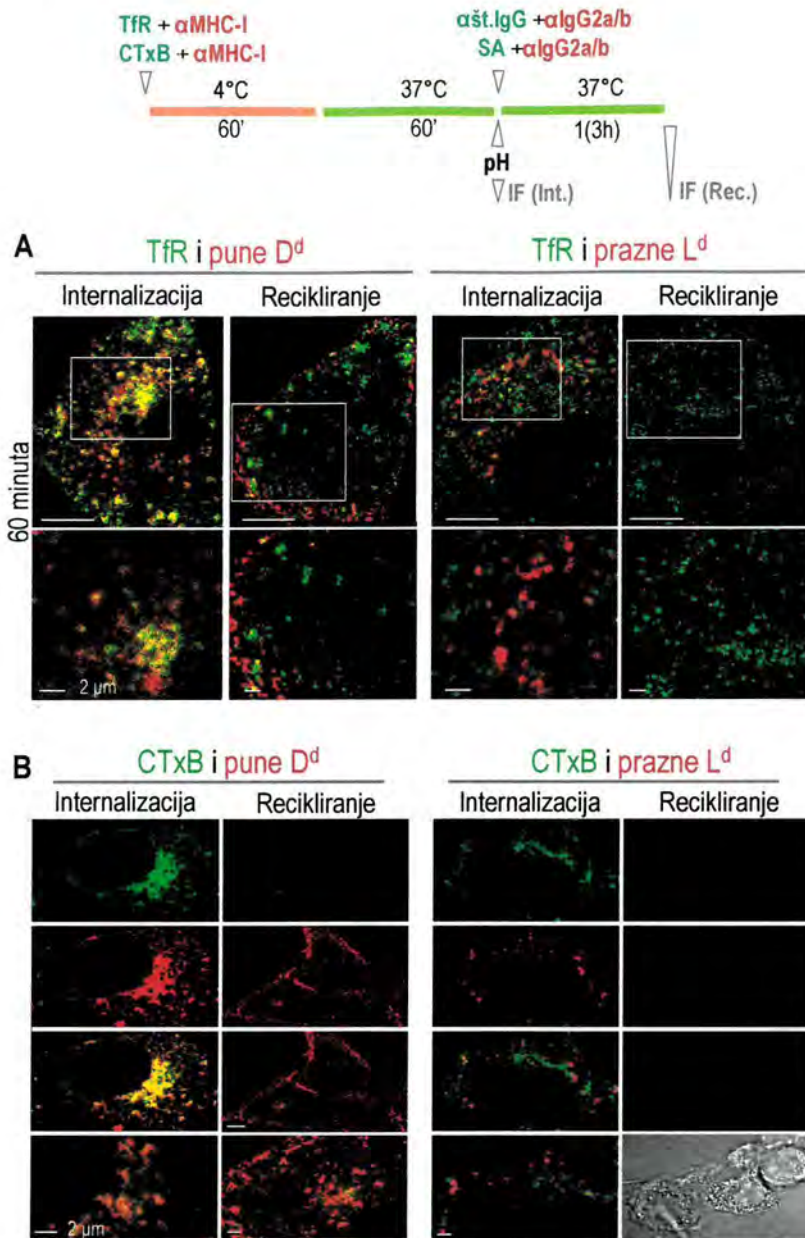
U prethodnom odjeljku smo s jedne strane ispitivali lokalizaciju internaliziranih membranskih molekula u endosomalnim odjeljcima, a s druge strane međusobno uspoređivali njihove endocitozne puteve. Kako bismo preispitali pretpostavke koje smo donijeli na temelju dobivenih rezultata, u sljedeća dva odjeljka ćemo dodatno istražiti da li ispitivane molekule nakon endocitoze slijede put recikliranja ili put degradacije.

Kako bismo utvrdili da li se neka molekula reciklira uspostavili smo *protokol recikliranja* (slike 77 i 24). Ukratko, stanice su površinski obilježene odgovarajućim mPt, nakon čega je dopuštena internalizacija. Potom su preostala površinska protutijela uklonjena kratkotrajnim zakiseljavanjem, a stanice su dalje inkubirane na 37°C u mediju u koje je dodano fluorescentno obilježeno sekundarno protutijelo. Prema tome, samo stanice koje su recikliranjem došle na površinu mogle su se fluorescentno obilježiti, dok su one koje su ostale internalizirane ostale neobilježene. Kontrolni uzorci su inkubirani u istom mediju, ali na 4°C, tj. na temperaturi na kojoj je onemogućen proces endocitoze.



Slika 77. Praćenje recikliranja nativnih MHC-I molekula. (A) Stanice Balb 3T3 su površinski obilježene navedenim kombinacijama protu MHC-I mPt. Nakon toga protutijela su uklonjena, a stanice prebačene na 37°C kako bi se dopustila internalizacija. Nakon 1 sata preostala površinska mPt su uklonjena, a stanice inkubirane u mediju sa fluorescentno konjugiranim sekundarnim protutijelom. Potom su stanice fiksirane, a reciklirane molekule vizualizirane konfoknom mikroskopijom. (B) Prema istom protokolu praćeno je recikliranje molekula D^d tijekom 1 i 3 sata. Mjerna crta = 10 μm . Debljina snimka (z) = 0,5 μm .

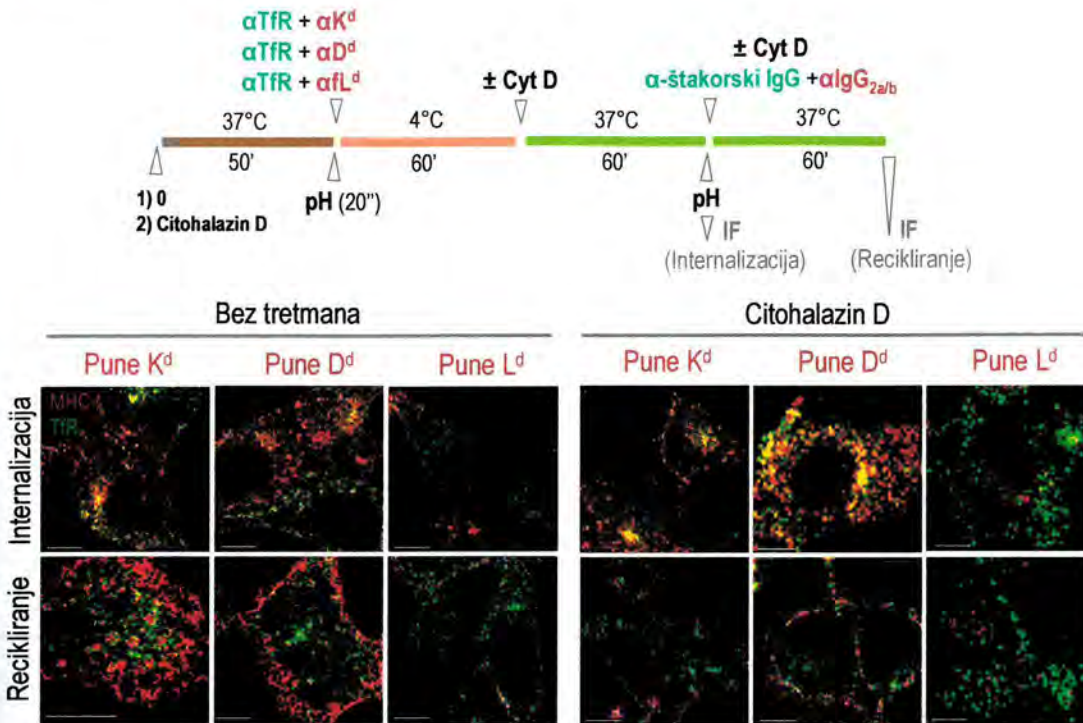
Kada smo ispitali recikliranje **MHC-I molekula** uočili smo da se samo konformirane molekule tijekom 1 sata inkubacije recikliraju (konformirane K^d, D^d i L^d), ali ne i nekonformirane molekule L^d (slika 7a), barem većim dijelom. Naime, samo vrlo mali broj nativnih nekonformiranih molekula L^d se može vidjeti recikliran, a tada se uglavnom kolokaliziraju s punim molekulama L^d. Osim toga, možemo uočiti da se konformirane molekule recikliraju duže razdoblje, odnosno, prisutne su u stanici i nakon 3 sata, kao što se vidi na primjeru punih molekula D^d (slika 77b). Obrazac ekspresije recikliranih MHC-I molekula uglavnom podrazumijeva njihovu perifernu lokalizaciju, te nešto slabiju perinuklearnu, koja na nekim stanicama može i izostati.



Slika 78. Usporedba recikliranja i internalizacije konformiranih molekula D^d, odnosno nekonformiranih molekula L^d s transferinskim receptorom (TfR) i kolera-toksinom (CTxB). Stanice Balb 3T3 su površinski obilježene navedenim kombinacijama mPT, te su reciklirane i internalizirane molekule praćene prema navedenom protokolu (dodatno objašnjenje u tekstu). MHC-I molekule (A i B) su prikazane crvenom fluorescencijom a TfR (A) i CTxB (B) zelenom. Mjerna crta = 10 μm – manja povećanja; 2 μm – veća povećanja. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Nadalje, kako bismo pokazali da odsustvo signala nakon ispitivanja recikliranja nekonformiranih molekula L^d nije posljedica toga što se te molekule nisu endocitirale, usporedno s praćenjem recikliranja pratili smo i internalizaciju, te ustanovili da se te molekule nakon 1 sata internalizacije zaista nalaze u stanici, ali očigledno ne podliježu recikliranju. Suprotno tome, konformirane molekule D^d se u stanici uočavaju kako internalizirane, tako i reciklirane (nije prikazano). Recikliranje MHC-I molekula je u istom protokolu praćeno i u kombinaciji s TfR, odnosno s molekulom za koju je poznato da se reciklira. TfR se vidi smješten prvenstveno jukstanuklearno, ali i

periferno, prema obrascu koji je vrlo sličan onome nakon same internalizacije (slika 78a). Također smo ispitali recikliranje CTxB, molekule koja se u pravilu ne reciklira. To ukazuju i naši rezultati (slika 78b), no, na nekim stanicama uočena je slabija prisutnost signala u obrascu koji nalikuje onom kod konformiranih MHC-I molekula (nije prikazano).

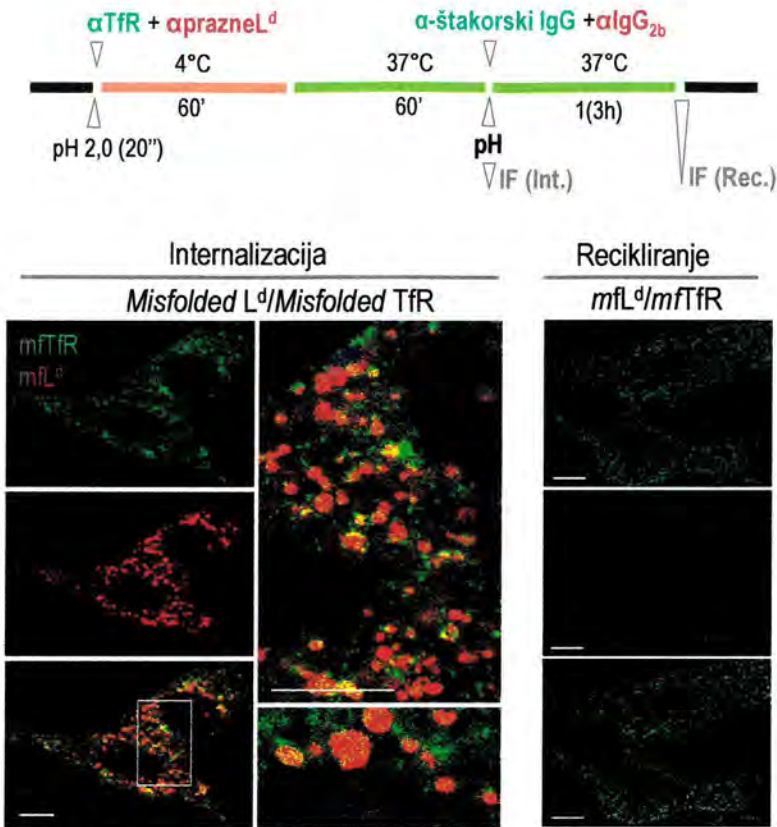


Slika 79. Učinak citohalazina D na recikliranje nativnih MHC-I molekula i TfR. Stanice Balb 3T3 su površinski obilježene navedenim kombinacijama mPt, te su reciklirane, odnosno internalizirane molekule praćene prema navedenom protokolu. MHC-I molekule su prikazane crvenom fluorescencijom a TfR zelenom. Citohalazin D (Cyt D, 2,5 μ M) je bio prisutan cijelo vrijeme tijekom pokusa. Mjerna crta = 10 μ m. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

Zanimljivo je da se TfR vrlo slabo ili uopće ne kolokalizira s recikliranim molekulama D^d, što bi ukazivalo da MHC-I molekule koriste dva različita puta recikliranja. Kako bismo to ispitali, recikliranje MHC-I molekula i TfR je ispitano na stanicama inkubiranim u prisustvu *citohalazina D* (2,5 μ M), tj. tvari koja depolimerizira mikrotubule. Naime, pokazano je da recikliranje humanih MHC-I molekula ovisi o Arf6⁺ reciklirajućim endosomima koji zahtijevaju održanje intergriteta aktinskog citoskeleta (71, 244). Na slici 79 možemo uočiti da je citohalazin D smanjio intenzitet recikliranja konformiranih MHC-I molekula, ne mijenjajući stupanj recikliranja TfR, kao niti općenito utječući na internalizaciju.

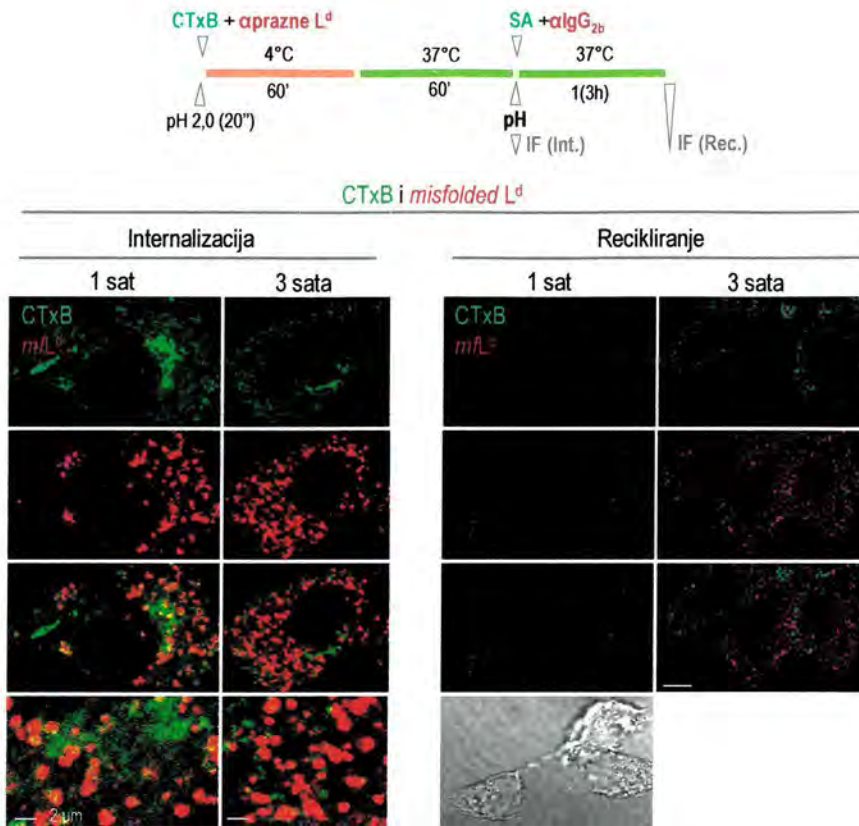
Nadalje, da li promjena konformacije utječe na recikliranje ispitali smo na primjeru *misfolded molekula L^d* i *misfolded TfR*. *Misfolded* molekule L^d nisu pokazale nikakvu sklonost recikliranju. Međutim, iako u usporedbi s nativnim TfR, *misfolded* TfR izgleda kao da se nešto manje reciklira, i dalje se dobro vidi recikiran u stanici (slika 53). Prema tome, narušavanje konformacije TfR koja je posljedica zakiseljavanja ne utječe na njegovu sposobnost recikliranja, a slabije recikliranje bi moglo biti posljedica slabijeg vezivanja protutijela. Nadalje

misfolded TfR zadržava sposobnost vezivanja Tf što ukazuje da je njegova funkcionalnost, barem što se toga tiče još zadržana.



Slika 80. Usporedba recikliranja i internalizacije *misfolded* molekula L^d i *misfolded* TfR. Stanice Balb 3T3 su kratkotrajno zakiseljene i površinski obilježene kombinacijom monoklonskih protutijela 64-3-7 (prazne L^d) i R17 (TfR). Potom su reciklirane, odnosno internalizirane molekule praćene kao i ranije, a prema navedenom protokolu. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

U konačnici, kako bismo ispitali da li je rezultat koji ukazuje da se nekonformirane MHC-I molekule ne recikliraju uzrokovan kraćom inkubacijom, *misfolded* molekule L^d smo internalizirali 1 sat, te 3 sata dopustili praćenje njihova recikliranja. Molekule smo pratili u kombinaciji s kolera-toksinom. Značajnije recikliranje nije uočeno, iako se neke reciklirane molekule mogu zamijetiti (slika 81). Ovaj nešto pojačani signal ukazuje na mogućnost da zbog preopterećenja odjeljka u koji se usmjeravaju, neke molekule izbjegnu iz njega i pojavljuju se na staničnoj površini. Druga mogućnost je da se recikliraju izuzetno sporo. Međutim, to je manje vjerojatno jer bi, prema ovim rezultatima, bila potrebno izuzetno mnogo vremena da se signal nakon recikliranja bude barem približno izjednači onom nakon internalizacije, kakav je već nakon 1 sata u slučajevima konformiranih MHC-I molekulama i TfR. Treća mogućnost uključuje put egzocitoze, odnosno smještaj ovih molekula u graničnim (vanjskim) membranama kasnijih odjeljaka.



Slika 81. Usporedba recikliranja i internalizacije *misfolded* molekula L^d i kolera-toksina (CTxB). Stanice Balb 3T3 su kratkotrajno zakiseljene i površinski obilježene kombinacijom mPt 64-3-7 (Prazne L^d) i CTxB-biotin. Potom su reciklirane, odnosno internalizirane molekule praćene kao i ranije, a prema navedenom protokolu. SA-streptavidin; *mf*- *misfolded*. Mjerna crta = 10 μ m. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

Navedeni rezultati potvrđuju prethodne pretpostavke da se konformirane MHC-I molekule, za razliku od nekonformiranih, recikliraju. Budući da se vrlo slabo, ili uopće ne kolokaliziraju s recikliranim TfR, vrlo je vjerojatno da, barem jednim dijelom, slijede zaseban put recikliranja, te da je za njega važno održanje integriteta aktinskog citoskeleta. Ipak, treba naglasiti da se i reciklirane molekule K^d i D^d u potpunosti ne recikliraju, iako im je put najvjerojatnije isti, što bi ukazivalo da kinetika recikliranja, a vjerojatno i stupanj zasićenosti neke vezikule određenom molekulom, može utjecati na sliku vezikula u kojima se nalaze reciklirane molekule. Na kraju, *misfolded* TfR se, iako malo slabije, ipak reciklira u zamjetnoj mjeri, što ukazuje da ova promjena konformacije nije promijenila njegov unutarstanični put.

4.5. TRANSPORT I SORTIRANJE MHC-I MOLEKULA NIZ VEZIKULARNI pH GRADIJENT

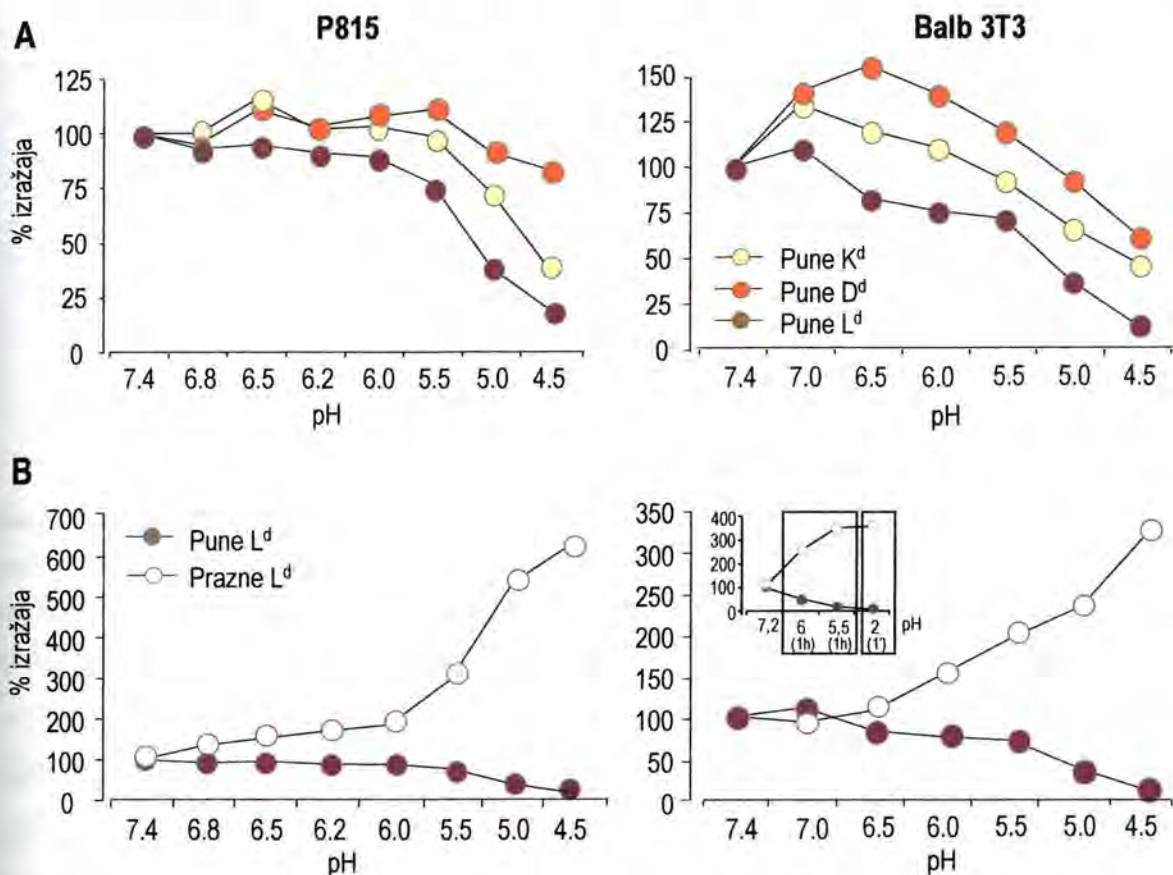
U narednom dijelu smo se posvetili istraživanju učinka pH na izražaj i konformaciju MHC-I molekula. Naime, kako je ranije opisano (1.2.2.4.), pH gradijent, ne samo endosomalnih odjeljaka, već i ostalih staničnih organela, ima izuzetno važnu ulogu u usmjeravanju i sortiranju, kako internaliziranih molekula, tako i onih novosintetiziranih. Jedno od djelovanja pH se očituje u aktivaciji odgovarajućih enzima, primjerice kiselih hidrolaza u lizosomima ili peptidaza u sekretornim vezikulama. Drugi, ne manje važan učinak, je promjena konformacije molekule internalizirane u dati odjeljak koja može dalje imati ulogu u njezinom sortiranju. Naime, promjena konformacije može omogućiti međudjelovanje s drugim molekulama, od kojih se velik dio ima *chaperonsku* ulogu ili se ubraja u razne vrste adaptora. Nadalje, moguće je da dovodi i do premještanja u određene dijelove membrane, te se prema tome dalje sortira.

4.5.1. Učinak pH na promjenu konformacije MHC-I molekula

4.5.1.1. Učinak izvanstaničnog pH na promjenu konformacije molekula na staničnoj površini

Obzirom da određen pH ne mijenja jednako konformaciju svih molekula, željeli smo ispitati kako različite vrijednosti pH staničnog medija, koje odgovaraju fiziološkom pH u endosomalnim odjeljcima, djeluju na površinski izražaj različitih alela i konformacija MHC-I molekula na stanicama Balb 3T3 i P815. Nakon 30 minuta djelovanja kiselog pH stupanj površinskog izražaja ispitivanih molekula smo pratili protočnom citometrijom (slika 82a). Na obje stanične linije u početku možemo uočiti da tek kod vrijednosti pH 5,0 i 4,5 dolazi do uočljivijeg pada površinskog izražaja kod sva tri alela konformiranih molekula. Suprotno tome, kod viših vrijednosti, koje odgovaraju pH u ranim i reciklirajućim endosomima, izražaj molekula K^d i D^d čak je i djelomično porastao, osobito na fibroblastima Balb 3T3, što odgovara i osnovnoj ulozi ovih odjeljaka. Kod pH 5,0 i 4,5 (koji odgovara vrijednostima u LE i lizosomima), međutim, ekspresija se značajno snižavala. Moguće je da gubitak stabine konformacije olakšava njihovu razgradnju i djelovanje hidrolitičkih enzima u ovim odjeljcima. Bitno je istaknuti da je smanjenje izražaja najviše uočeno kod punih molekula L^d, što je u skladu s rezultatima iz literature, prema kojima se ovaj alel ubraja u jedan od najnestabilnijih (156). Dapače, smanjenje izražaja se počinje uočavati ranije, kod pH 5,5 na stanicama P815, odnosno pH 6,5 na fibroblastima Balb 3T3. Tako se kod fibroblasta na pH 6,5 uočava smanjenje površinske ekspresije za 25%, a kod 5,0 za više od 50% (slika 82a). Suprotno tome, u obje stanične linije se ekspresija praznih (nekonformiranih) molekula L^d uglavnom povećava razmjerno padu ekspresije punih molekula L^d (slika 82b), prvenstveno kod nižih vrijednosti pH (5,0 i 4,5). Zanimljivo je da kod pH vrijednosti između 6,8 i 6,0 (koje vladaju u EE i RE) porast ekspresije nekonformiranih molekula L^d nije proporcionalan padu ekspresije punih molekula L^d. Moguće je da se pri tom pH postiže «djelomično otvoreno», tzv. Prijelazno, stanje koje omogućava mPt 64-3-7 da prepozna linearnu domenu, ali koje je još dovoljno stabilno da održi onu konformaciju koje prepoznaje i protutijelo 30-5-7. U takvom kompleksu bi možda bila omogućena izmjena peptida i recikliranje nove molekule L^d. O tome će se raspravljati kasnije (odjeljak 4.5.3.). Bitno je

istaknuti da je vijabilnost stanica kod svih vrijednosti pH iznosila 90-95%, osim kod pH 4,0 (60% kod stanica p815, odnosno 80% kod fibroblasta Balb 3T3, nije prikazano). Kao i ranije, analizirane su samo vijabilne stanice.

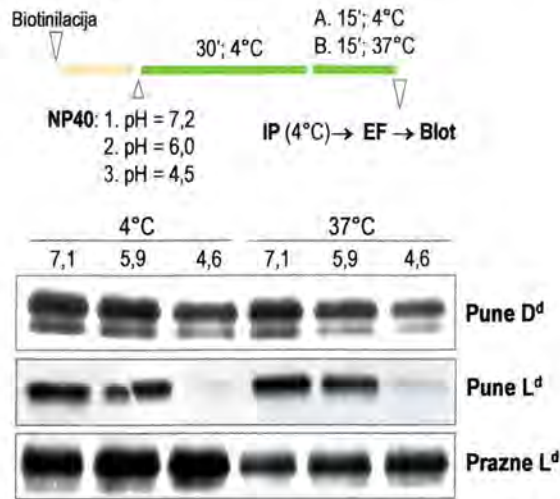


Slika 82. Učinak promjene pH staničnog medija na površinski izražaj MHC-I molekula. Stanice P815 i Balb 3T3 su tijekom 30 min. izložene mediju navedenih pH vrijednosti. Stanice su potom isprane, a površinske MHC-I molekule vizualizirane metodom protočne citometrije. Površinski izražaj konformiranih molekula L^d je prikazan u odnosu na molekule K^d i D^d (A), ili u odnosu na nekonformirane molekule L^d (B). Umetak na slici B predstavlja % izražaja molekula L^d nakon duljeg vremena inkubacije s pH 6,0 i 5,5 u odnosu na % ekspresije nakon 1 minute tretmana s pH 2,0. % izražaja – omjer početne MFI vrijednosti, te MFI vrijednosti nakon tretmana. Prikazani su reprezentativni rezultati 2-4 neovisna pokusa.

4.5.1.2. Učinak pH na promjenu konformacije MHC-I molekula u staničnom lizatu

Nadalje smo željeli ispitati kako se pH odražava na izražaj izoliranih molekula, dakle onih koje više nisu sastavni dio stanice, niti dio stanične membrane. Stoga smo biotinilirane stanice P815 izložili različitim pH pufera za razaranje (lizu) stanica pri temperaturi od 4° i 37°C, te iz njih na 4°C imunoprecipitali (IP) konformirane molekule D^d i L^d, odnosno nekonformirane molekule L^d (slika 83). Možemo uočiti da se izražaj konformiranih molekula D^d i L^d smanjuje kod pH 6,0, a posebno kod 4,5. Dapače, pune molekule L^d se nakon IP iz lizata pH 4,5 gotovo više uopće ne izražavaju. Takav izrazit pad nije uočen kod punih molekula D^d, što je u skladu s prethodnim rezultatima i razlici u stabilnosti ovih dvaju alela. Suprotno tome, s padom pH ponovo se uočava

porast izražaja nekonformiranih molekula L^d. Valja istaknuti da se promjena konformacije događa i pri temperaturi od 4°C, jednako kao i pri temperaturi od 37°C.



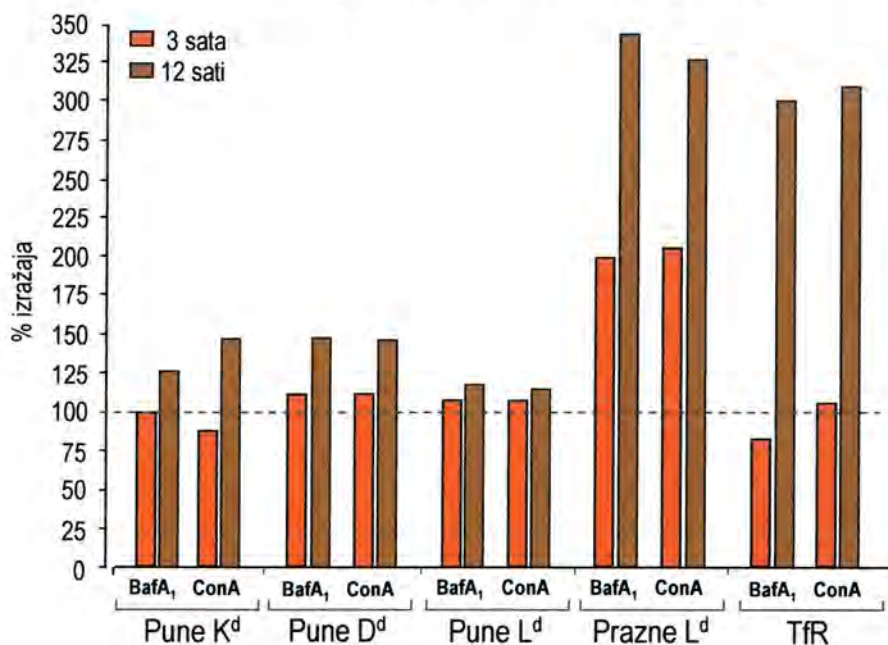
Slika 83. Učinak pH na promjenu konformacije MHC-I molekula u staničnom lizatu. Stanice P815, su površinski biotinilirane i razorene u puferu s 1% NP40 različitog pH (7,1, 5,9 i 4,6) 30 minuta na 4°C ili 37°C. MHC-I molekule su potom imunoprecipitirane (IP) i podvrgnute SDS-PAGE elektroforezi (EF) i blotu, te vizualizirane pomoću SA-POD i kemiluminiscencije.

4.5.2. Učinak inhibitora endosomalnog zakiseljavanja na površinsku ekspresiju MHC-I molekula i transferinskog receptora

Inhibitori endosomalnog zakiseljavanja djeluju na sve unutarstanične odjeljke kiselog pH i dovode do njihove alkalizacije. Međutim, učinak se najviše očituje u najkiselijim odjeljcima, tj. MVB, LE i lizosomima. Neučinkovitost degradacije može kao posljedicu imati usmjeravanje molekula u alternativne odjeljke endocitoznog puta, te promjenu u obrascu i intenzitetu njihova izražaja. Naime, s jedne strane se može spriječiti usmjeravanje molekule u kasne odjeljke, ili, s druge strane, onemogućiti sam proces degradacije u, sada neutralnim, LE i lizosomima. Stoga je za očekivati povećanje izražaja molekula koje se trebaju degradirati.

U ovom dijelu smo protočnom citometrijom pratili kako se učinak *inhibitora endosomalne acidifikacije* – *baflomicina A₁* i *konkanamicina A* (slika 84), te *NH₄Cl* i *monenzina* (nije prikazano) očituje na površinsku ekspresiju MHC-I molekula i TfR. Stanice P815 (slika 84) i Balb 3T3 (nije prikazano) smo izložili djelovanju inhibitora kraće (3 sata) ili dulje vrijeme (12 sati), te nakon isteka kinetike protočnom citometrijom pratili površinski izražaj. Možemo uočiti da se već nakon 3 sata značajno povećava površinska ekspresija praznih molekula L^d, i to oko dva puta na stanicama P815 (slika 84), te oko 40% na stanicama Balb 3T3 (nije prikazano). Suprotno tome, kod ostalih molekula se ne zapaža neka značajnija promjena. Međutim, nakon 12 sati, uz izrazito povećanje broja praznih molekula L^d (oko 3,5 puta), značajno se povećava i površinska ekspresija TfR (oko 3 puta), te umjereno ekspresija punih molekula K^d i D^d (25-50%). Povećanje površinske ekspresije punih molekula L^d se može uočiti, iako je od svih ispitivanih molekula najmanje izraženo (15-20%). Kasnije ćemo vidjeti da se povećanje, osobito

praznih molekula L^d, očituje i u unutastaničnom izražaju (poglavlje 7). Razlika u stupnju povećanja ekspresije konformiranih i nekonformiranih molekula se može objasniti činjenicom da se konformirane MHC-I prvenstveno recikliraju i inače imaju dulji poluživot, za razliku od praznih molekula koje imaju kraći poluživot i više se usmjeravaju u kasne odjeljke koji su povezani s putem degradacije. Obzirom da inhibitori acidifikacije ne koče recikliranje molekula (naredni odjeljak), njihov učinak će se prvenstveno očitovati na degradaciji. Nadalje, iako se TfR prvenstveno reciklira a samo mala količina degradira (0.1-1%), zbog izrazito brzog *tum-overa* ove molekule (7-12 min), za očekivati je da bi se nakon 12 sati relativno velik dio molekula degradirao, te da bi inhibitori acidifikacije to sprječavali. Također, konfokalnom mikroskopijom smo uočili da ove tvari ne inhibiraju sintezu molekula, dapače, vrlo se često može zapaziti jača ekspresija molekula u GA (slika 96).

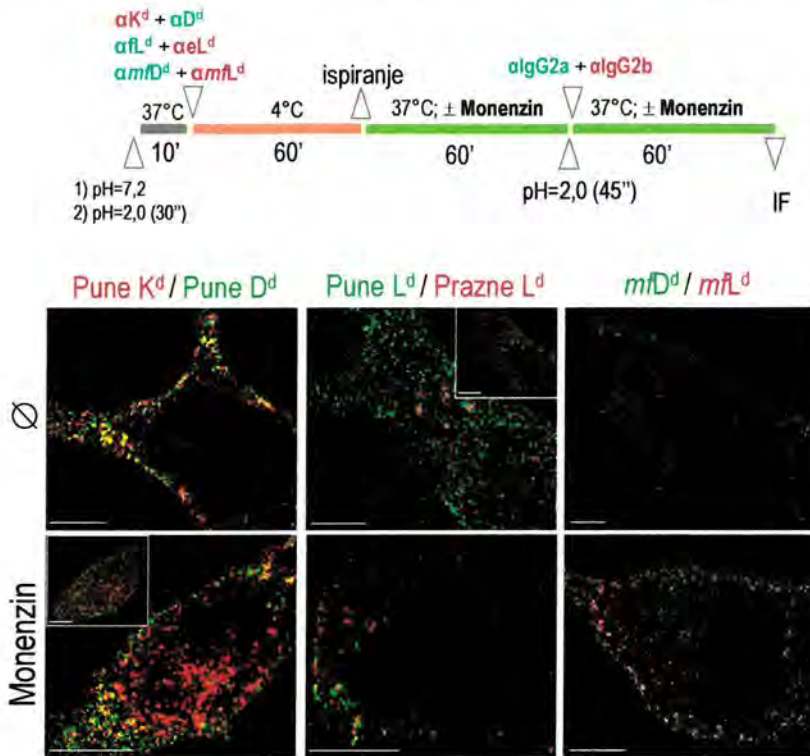


Slika 84. Učinak inhibitora endosomalnog zakiseljavanja na površinsku ekspresiju MHC-I molekula i TfR. Stanice P815 su kultivirane bez inhibitora (isprekidana linija) ili u nazočnosti bafilomicina A₁ (BafA₁, 200 nM), odnosno konkanamicina A (ConA) (50 nM) tijekom 3, odnosno 12 sati. Potom je površinski izražaj MHC-I molekula određen protočnom citometrijom. % izražaja – omjer MFI vrijednosti tretiranih i netretiranih stanica u ispitivanom vremenu. Prikazan je reprezentativan od 4 neovisna pokusa.

4.5.3. Učinak inhibitora endosomalnog zakiseljavanja na recikliranje MHC-I molekula

U prethodnom odjeljku smo vidjeli da inhibitori endosomalnog zakiseljavanja povećavaju površinsku ekspresiju MHC-I molekula i TfR. Prema tom rezultatu logično je očekivati da ne zaustavljaju proces recikliranja, jer bi u tom slučaju površinska ekspresija bila smanjena. Ipak, kako bismo isključili mogućnost da se njihovim djelovanjem recikliranje samo usporava, ali u stupnju manjem nego degradacija (time bi ravnoteža ponovo bila pomaknuta prema većem dotoku molekula na staničnu površinu, nego gubitku s nje), ispitali smo učinak monenzina na recikliranje MHC-I molekula prema prethodno opisanom protokolu (slika 85). Možemo uočiti da monenzin nije imao inhibicijski učinak na taj proces. Dapače, čak se jedan dio *misfolded* molekula L^d i D^d počeo

reciklirati, što je vjerojatno posljedica njihova pretjeranog nakupljanja u stanici usljed nemogućnosti degradacije. Nadalje, izgleda da je i recikliranje **konformiranih molekula K^d i D^d** također pojačano. Osobito je zanimljivo pojačanje stupnja recikliranja u jukstanuklearnom dijelu, koje bez inhibitora nije tako izraženo (slika 85). Nadalje, prema ranijim rezultatima (odjeljak 4.4) MHC-I molekule se uglavnom vizualiziraju u perifernim reciklirajućim endosomima. Ipak, monenzin nije imao značajnijeg učinka na molekule L^d obiju konformacija.



Slika 85. Učinak monenzina na recikliranje MHC-I molekula. Stanice Balb 3T3 su površinski obilježene navedenim kombinacijama protu MHC-I mPt. Nakon toga protutijela su uklonjena, a stanice prebačene na 37°C kako bi se dopustila internalizacija (\pm monenzin 7,5 μ M). Nakon 1 sata preostala površinska mPt su uklonjena, a stanice inkubirane u mediju sa fluorescentno konjugiranim sekundarnim protutijelom (\pm monenzin). Potom su stanice fiksirane, a reciklirane molekule vizualizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μ m. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

4.5.4. Promjena konformacije punih i praznih molekula L^d

U odjeljku 4.5.1. je pokazano da sniženi pH staničnog medija, čak i onaj vrijednosti koje se nalaze u ranijim i srednjim endosomalnim odjeljcima (6,5 - 5,0) uzrokuje smanjenje izražaja konformiranih molekula L^d, a povećanje ekspresije nekonformiranog oblika (slika 82). Također, ranije je uočeno da se pune molekule L^d nakon internalizacije praćene vezivanjem mPt slabo vezikularno izražavaju. Jedan od razloga bi mogao biti taj da se izuzetno sporo i u malim količinama endocitiraju (dakle sporije i manje nego molekule K^d i D^d). Druga mogućnost je da u kiselim endosomalnim odjeljcima mijenjaju konformaciju i prelaze u prazne, što bi uzrokovalo otpuštanje mPt 30-5-7 koje prepoznaje samo pune molekule. Protiv prve pretpostavke govori činjenica da je kinetika poluživota punih molekula L^d, kako na staničnoj površini, tako i unutar stanice, čak i kraća nego ona kod molekula K^d i D^d (slika 39 i slika 91). Što se tiče druge mogućnosti, postavlja se pitanje zašto je ipak oko 75% molekula,

(sve do pH vrijednosti 5,0) još uvijek prepoznalo protutijelo 30-5-7. Jedan razlog bi bio da se glavnina promjene konformacije događa tek u MVB i LE, te da pune molekule L^d do tih odjeljaka, u kojima se gube, stižu dosta brzo te je potrebno dulje vrijeme za njihovo nakupljanje u jukstanuklearnim vezikulama u količini koja omogućava njihovu vizualizaciju (više od 1 sata). Drugi razlog bi mogao biti taj da sam pH nije jedini faktor koji omogućuje promjenu konformacije, već u tom procesu sudjeluju i endosomalne *chaperonske* molekule koje ubrzavaju proces, a nisu prisutne (ili izrazito malo) na staničnoj membrani ili u mediju. U prilog tome govori činjenica da se nakon dulje inkubacije u pH medija 5,5 (1 sat) na stanicama Balb 3T3 postiže jednaka promjena konformacije kao i nakon 1 min u pH 2,0, što je gotovo potpuni gubitak konformacije punih molekula L^d i proporcionalno povećanje postotka zastupljenosti nekonformiranih molekula L^d , dok se u mediju pH 6,0 postiže 50% od maksimalne promjene konformacije (slika 82b ulomak).

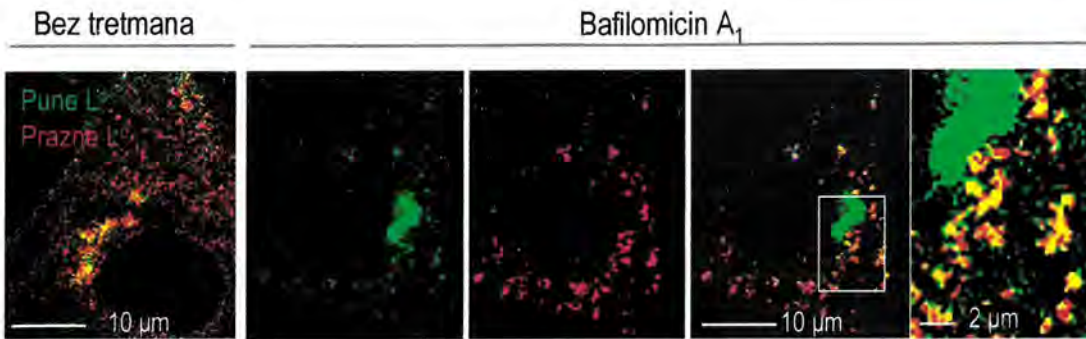
U narednim odjeljcima ćemo istražiti mogućnosti promjene konformacije kako punih molekula u prazne, tako i obrnuto.

4.5.4.1. Promjena konformacije punih molekula L^d u kiselim endosomalnim odjeljcima

Kako bismo ispitali utjecaj kiselosti endosoma na obrazac i intenzitet ekspresije, te konformaciju molekula L^d , koristili smo inhibitore endosomalne acidifikacije.

4.5.4.1.1. Učinak inhibitora endosomalnog zakiseljavanja na steady state ekspresiju i kolokalizaciju punih i praznih molekula L^d

Kao što smo ranije prikazali, u *steady state* uvjetima nema znatnije kolokalizacije između punih i praznih molekula L^d (osim djelomično u perinuklearnim odjeljcima). Naime, pune molekule L^d ne pokazuju vezikularnu ekspresiju, a nalaze se prvenstveno na površini i u GA. Suprotno tome, prazne molekule L^d se nakupljaju u vezikularno-tubularnim retencijskim odjeljcima, a slabo se ekspimiraju na staničnoj površini i upitno u GA. Međutim, nakon dulje inkubacije stanica s *bafilomicinom A₁* (12-16 sati) dolazi do alkalizacije inače kiselih endosomalnih odjeljaka. To rezultira time da se vezikule s praznim molekulama L^d povećavaju, jednako kao i intenzitet njihove ekspresije (o tome će se posebno raspravljati u poglavlju 4.7.). S druge strane uočava se i prisustvo punih molekula L^d u vezikulama (čak i vakuolama) koje se kolokaliziraju s odjeljcima pozitivnim na prazne molekule L^d (slika 86). Ovaj rezultat ukazuje da se usljed endosomalne alkalizacije pune molekule L^d premještaju i grupiraju u vezikulama (vakuolama) s praznim molekulama L^d , ili da se usljed alkalizacije onemogućuje njihova pretvorba u prazne molekule. Također se uočava smanjena kolokalizacija, ili potpuno odsustvo kolokalizacije molekula L^d u perinuklearnom području (GA). Ovo bi moglo biti posljedica alkalizacije *trans* GA i njemu bliskih sekterornih vezikula u kojima se, također moguće usljed niskoga pH (5,5-6,0), može događati djelomična pretvorba punih molekula L^d u prazne (o tome će se raspravljati kasnije). Jednak rezultat je dobiven i s NH_4Cl (nije prikazano).



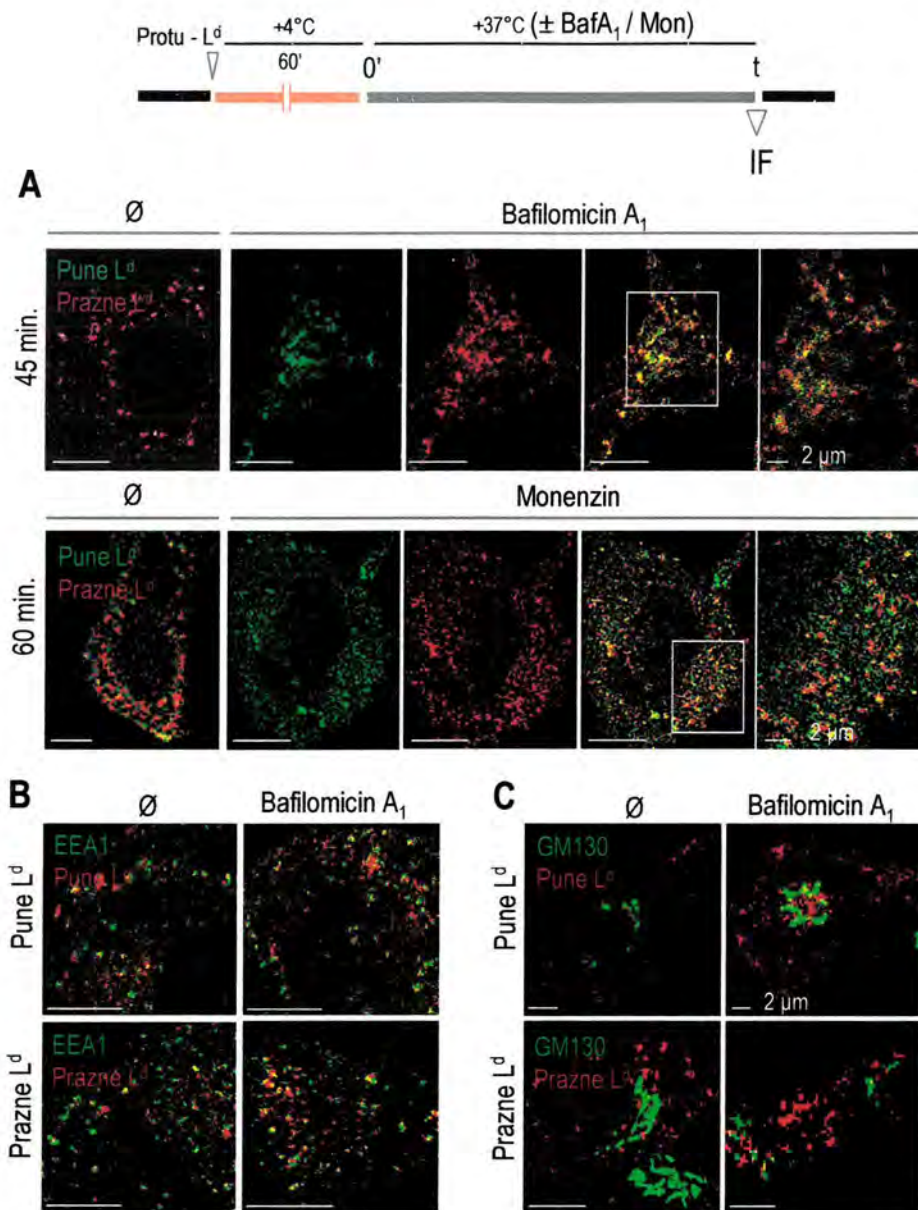
Slika 86. Učinak bafilomicina A1 na međusobnu *steady state* kolokalizaciju molekula L^d. Stanice Balb 3T3 su izložene djelovanju bafilomicina A1 (200 nM) tijekom 15 sati. Potom su fiksirane i permeabilizirane, te su im međusobno kolokalizirane konformirane i nekonformirane molekule L^d. Mjerna crta = 10 (2) µm. Debljina snimka (z) = 0,5 µm.

4.5.4.1.2. Učinak inhibitora endosomalnog zakiseljavanja na obrazac internalizacije punih i praznih molekula L^d

U prethodnom odjeljku smo pokazali da bafilomicin A₁ uzrokuje pojavu vezikularnog obrasca *steady state* punih molekula L^d, koji se inače ne uočava, te da se te vezikule znatno kolokaliziraju s praznim molekulama L^d. Obzirom na činjenicu da se vezikule s internaliziranim konformiranim molekulama L^d slabo uočavaju, te da nisu niti vidljive u 80-90% stanica, osobito u ranijim razdobljima endocitoze, željeli smo ispitati kako inhibitori acidifikacije utječu na njihovu vizualizaciju, te općenito na obrazac internaliziranih molekula L^d, i smještaj u unutarstaničnim odjeljcima. Stoga smo, nakon tretmana lizosomotrofnim inhibitorima, internalizirane molekule L^d na stanicama Balb 3T3 kolokalizirali međusobno, te s EEA1 (EE) i GM130 (GA) (slika 87).

Možemo uočiti da se bez tretmana pune molekule L^d gotovo ne uočavaju nakon 45 minuta, odnosno slabo nakon jednog sata (slika 87a). Međutim, kako nakon bafilomicina A₁, tako i nakon djelovanja monenzina, citoplazmatske vezikule s punim molekulama L^d se vizualiziraju u većini stanica, nerijetko s tendencijom ka perinuklearnoj lokalizaciji. Velik dio tih vezikula se kolokalizira s praznim molekulama L^d, iako kolokalizacija nije potpuna. Također se može uočiti i nešto pojačana vezikularna ekspresija praznih molekula L^d.

Kako bismo ispitali da li ovi inhibitori uzrokuju pojačano usmjeravanje ili zadržavanje vezikula s molekulama L^d u ranim endosomima, nakon endocitoze u nazočnosti ili bez BafA₁, kolokalizirali smo ih s EEA1 nakon 30 minuta (slika 87b). Pune molekule L^d su se bez tretmana mogle uočiti u samo oko 10% stanica, gdje su se samo djelomično kolokalizirale s EEA1, kao što je i ranije uočeno (slika 51). BafA₁ nije uzrokovao znatnije pojačanu kolokalizaciju s EEA1, ni punih niti praznih molekula L^d, što ukazuje da se alkalizacijom endosoma ove molekule ne premiještaju (zadržavaju) u ove odjeljke, niti da se glavina promjene konformacije najvjerojatnije ne događa u EE.



Slika 87. Učinak inhibitora endosomalnog zakiseljavanja na internalizaciju molekula L^d. Površinske molekule L^d su na stanicama Balb 3T3 obilježene pomoću mPt 30-5-7 (pune L^d), odnosno 64-3-7 (prazne L^d). Stanice su potom inkubirane u čistom mediju, ili je dodan bafilomicin A₁ (200 nM), odnosno monenzin (7,5 μM) navedeno vrijeme. Nakon fiksacije i permeabilizacije, internalizirane molekule L^d su vizualizirane pomoću sekundarnog protutijela, te kolokalizirane međusobno (A), s EEA1 (B) ili s GM130 (C). Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

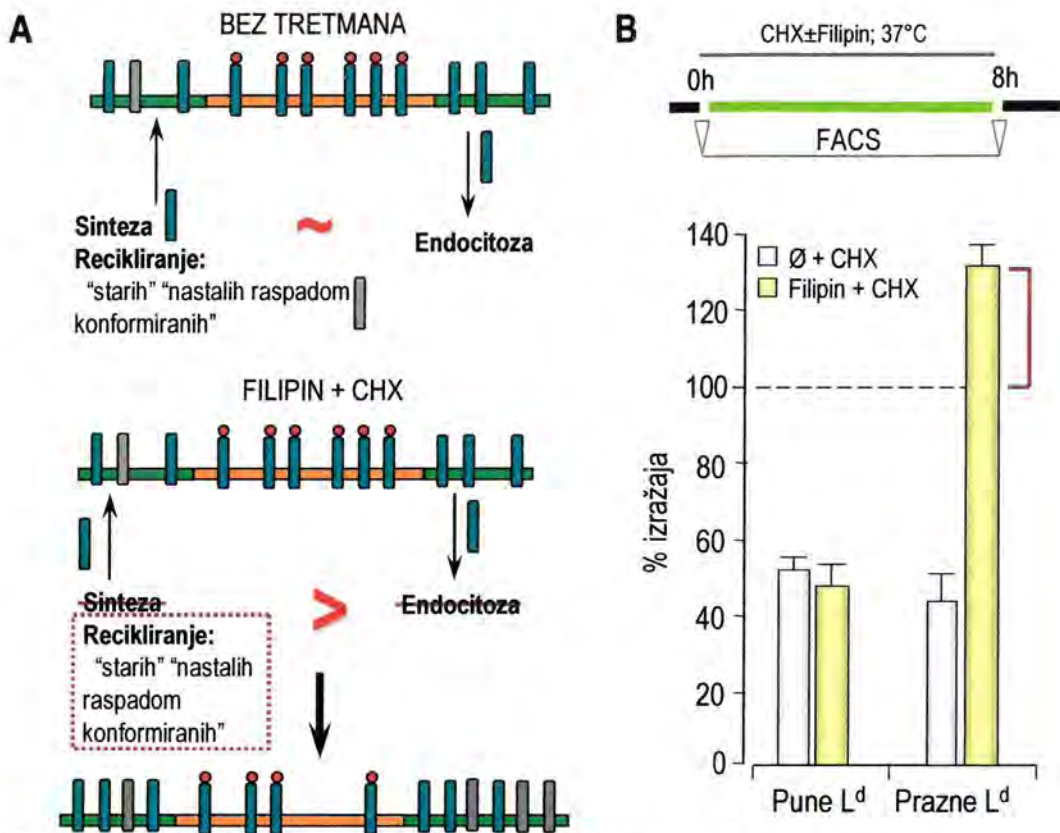
Obzirom da se u nekim slučajevima MHC-I molekule mogu usmjeravati u retrogradni put, tj. u ER preko GA, gdje se također može događati promjena konformacije, uglavnom alternativnim načinom punjenja nekonformiranih molekula pepetidom (142), ispitali smo kako BafA₁ utječe na kolokalizaciju punih, odnosno praznih molekula L^d s GM130, markerom GA (slika 87c). Ni u kontroli ni u stanicama tretiranim inhibitorom nije uočena kolokalizacija s ovim markerom nakon 30 minuta endocitoze. Jednak rezultat je dobiven za prazne molekule L^d i nakon 2 sata kontinuirane internalizacije (nije prikazano). Ovi rezultati ukazuju da se molekule L^d ne usmjeravaju u retrogradni put internalizacije, niti u normalnim uvjetima, niti nakon alkalizacije kiselih odjeljaka.

4.5.4.2. Učinak promjene konformacije punih molekula L^d na smještaj u membranskim mikrodomenama

Ako nakon djelovanja kiselog endosomalnog pH konformirane molekule L^d prelaze u nekonformirane, moguće je da bi se kao takve premještale u novu membransku mikrodomenu, organiziranu i otpornu na djelovanje detergenta, te dalje usmjeravale, odnosno endocitirale u skladu s tim. Prema ranije pokazanim rezultatima određen udio molekula L^d se nakon endocitoze reciklira. Ako je promjena konformacije nastala nakon što su konformirane molekule L^d već predodređene za put recikliranja (ranije je opisano da je put recikliranja zadani put ako ne postoji signal za usmjeravanje u neki drugi odjeljak – 2.2.2.1.2.), te su se tek onda uslijed prelaska u nekonformirane premjestile u novu membransku mikrodomenu, zajedno s njom će i doći na staničnu površinu.

Kao što je već ranije bilo govora, izražaj neke molekule na staničnoj površini zadan je ravnotežom između dotoka novo-sintetiziranih molekula i recikliranjem prethodno endocitiranih, te njezinog uklanjanja endocitozom (a ako dugoročno gledamo i degradacije). U normalnim okolnostima dotok je jednak uklanjanju, te se molekule više-manje jednako izražavaju na staničnoj površini tijekom vremena, tj. nalaze se u ravnotežnom (ustaljenom) stanju (*steady state*). Svaki faktor koji narušava ovu ravnotežu dovesti će do promjene izražaja ispitivane molekule.

Za očekivati je da će endocitoza **recikliranih nekonformiranih molekule L^d nastalih iz punih** biti zakočena djelovanjem filipina (ranije smo pokazali da filipin inhibira endocitozu nekonformiranih molekula koje se nalaze u DRM, slike 40 i 41). Ako se pritom primijeni i CHX kao inhibitor sinteze proteina, u pravilu, jedini parametar koji dinamički utječe na ekspresiju nekonformiranih molekula L^d na staničnoj površini bi trebalo biti recikliranje nekonformiranih molekula koje su nastale dezintegracijom punih, a čija se endocitoza normalno odvija u prisustvu filipina (slika 41). Stoga će ravnoteža biti pomaknuta u smjeru dotoka, te je za očekivati da će ukupan broj nekonformiranih molekula L^d biti povećan (slika 88a). Kako bismo to ispitali, stanice P815 smo izložili djelovanju filipina i CHX tijekom 8 sati, te protočnom citometrijom odredili ukupan broj molekula L^d na staničnoj površini. Na slici 88b možemo uočiti da je broj praznih molekula u nazočnosti filipina i CHX nakon tog vremena iznosio 130% početne ekspresije, dok je je samo uz CHX pao na oko 40%. Nakon 12 sati (moguće kada se iscrpe zalihe punih molekula L^d), ekspresija praznih molekula je pala na početnu vrijednost, a nakon 24 sata na 70-80% početne (nije prikazano). Suprotno tome, izražaj punih molekula L^d je nakon 8 sati iznosio oko 50%, bez obzira jeli filipin bio dodan uz CHX ili ne. Dakle, ovaj rezultat govori u prilog mogućnosti da premještanje u membranske mikrodomene koje se događa u endosomalnim odjeljcima i na staničnoj membrani može određivati dalju sudbinu molekule. Međutim, nije isključena niti mogućnost da dodatak filipina, uslijed utjecaja na izražaj kolesterola u staničnim membranama (kako PM, tako i u onim unutrašnjim), može uzrokovati premještanje «poola» praznih molekula L^d iz unutarstaničnih odjeljaka prema površini. Također, valja istaknuti da se značajno povećanje ekspresije praznih molekula L^d na staničnoj površini od 30-40% zapaža već 30 minuta nakon što se doda filipin, a malo je vjerojatno očekivati da je to posljedica samo dotoka novosintetiziranih molekula u tako kratkom vremenu.



Slika 88. Ispitivanje mogućnosti premještanja praznih molekula L^d nastalih iz konformiranih iz neorganiziranih domena u organizirane membranske mikrodomene nakon dezintegracije konformiranih molekula L^d. (A) Hipoteza povećanja površinskog izražaja praznih molekula L^d kao posljedica inhibicije njihove endocitoze filipinom (dodatno objašnjenje u tekstu). (B) Stanice su 8 sati inkubirane u prisustvu filipina (1 µg/ml), ili bez njega. Potom je površinska ekspresija molekula L^d određena protočnom citometrijom. % izražaja – omjer MFI vrijednosti tretiranih i netretiranih stanica u ispitivanom vremenu; isprekidana linija - % izražaja netretiranih stanica. Prikazana je srednja vrijednost 4 neovisna pokusa i varijacija.

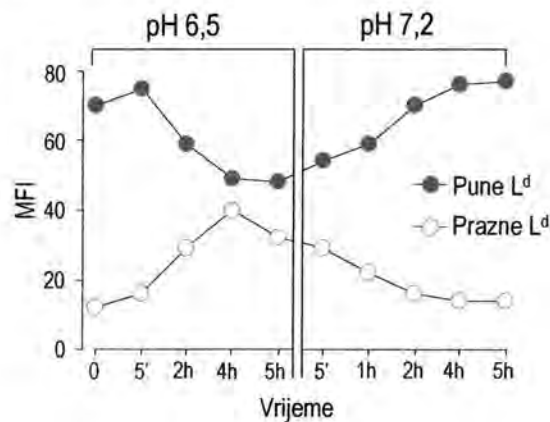
4.5.4.3. Alternativni načini nastanka konformiranih molekula L^d

Prema prethodnim rezultatima vrlo je vjerojatno da u kiselim endosomalnim odjeljcima pune molekule L^d mijenjaju svoju konformaciju čime mogu prelaziti u prazne. Međutim, već smo napomenuli da postoji mogućnost samo djelomične promjene njihove konformacije djelovanjem pH u tzv. *prijelazno stanje* čime bi se omogućila izmjena peptida i recikliranje takve nove molekule na staničnu površinu. Kiseli pH bi mogao omogućiti i djelomičnu promjenu konformacije praznih molekula L^d u stanje koje može vezati egzogeni peptid i β₂-m. Takav bi se kompleks najvjerojatnije stabilizirao u odjeljcima nešto višeg pH (npr. oko 6,8 kao što su RE), te obliku alternativno nastalih punih molekula L^d dolazio do stanične površine.

4.5.4.3.1. Ispitivanje alternativnog načina nastanka konformiranih molekula L^d na staničnoj površini

Kako bismo ispitili mogućnost alternativnog punjenja praznih molekula na staničnoj površini, djelovanjem kiselog pH koji djeluje u EE (6,5) sa stanične membrane P815 stanica tretiranih s IFN_γ uklonili smo

pune molekule L^d , te pratili njihov oporavak protočnom citometrijom. Možemo uočiti da je ovaj pH tek nakon 4 sata smanjio izražaj punih molekula L^d na oko 50% početne vrijednosti, te približno jednako povećao postotak, odnosno broj nekonformiranih molekula L^d , što je u skladu s prethodnim rezultatima (slika 82). Nakon što je stanicama vraćen medij normalnog pH (7,4), jednakom kinetikom i postepeno počeo se smanjivati broj nekonformiranih molekula L^d , a proporcionalno povećavati broj njihovog konformiranog oblika, te ponovo tek nakon 4 sata dosegao početnu vrijednost (slika 89). Jednak rezultat je dobiven i na stanicama koje nisu bile tretirane IFN γ (nije prikazano). Ovako spora kinetika oporavka ukazuje da se glavina promjene konformacije najvjerojatnije ne događa na staničnoj površini, te da je vraćanje broja punih molekula na početnu vrijednost samo posljedica njihove sinteze. Usporen nastanak nekonformiranih molekula i usporeno vraćanje na početnu ekspresiju govori u prilog mogućnosti da sam pH nije dovoljan parametar koji omogućuje promjenu konformacije, već su potrebni i dodatni faktori koji djeluju u endosomima, najvjerojatnije prisutnost pomagačkih molekula i koncentriranje peptidi i β_2 -m, sastavnih dijelova trimolekularnog MHC-I kompleksa. Prema tome, učinkovito punjenje praznih molekula peptidom, ako se i događa, u ovom slučaju bi bilo moguće tek u unutrašnjosti stanice. Stoga smo u narednom odjeljku ispitivali tu mogućnost.



Slika 89. Praćenje ponovnog izražaja punih molekula L^d na staničnoj površini nakon njihovog uklanjanja djelovanjem kiselog pH. Stanice P815 i Balb 3T3 su izložene djelovanju pH 6,5 navedeno vrijeme (lijevi dio grafa). Stanice su potom isprane i premještene u medij fiziološkog pH, te su prema navedenoj kinetici površinske MHC-I molekule vizualizirane metodom protočne citometrije (desni dio grafa). MFI – srednji intenzitet fluorescencije (engl. *mean fluorescence intensity*).

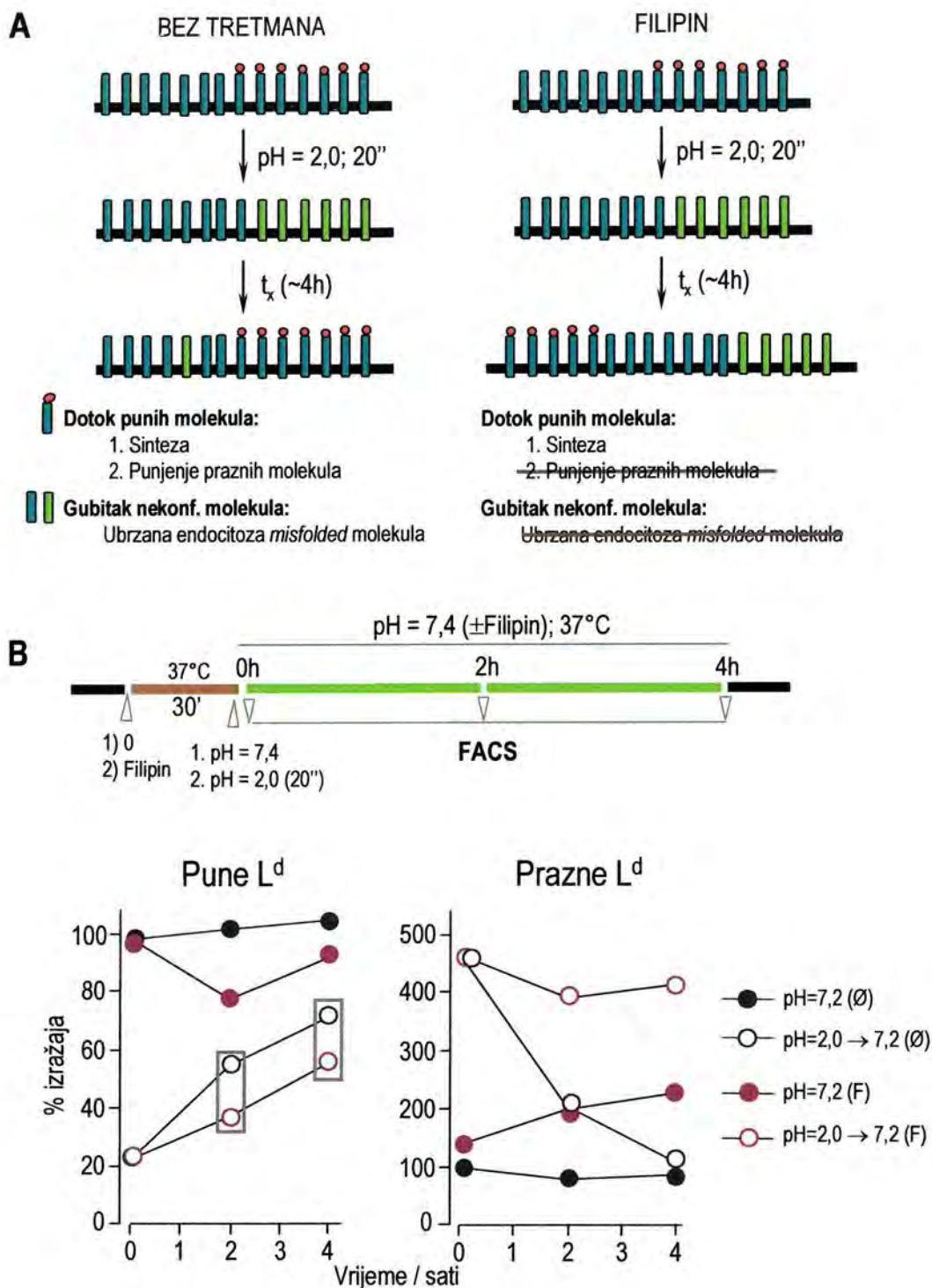
4.5.4.3.2. Ispitivanje alternativnog načina nastanka konformiranih molekula L^d unutar stanice

Kako bismo ispitivali mogućnost alternativnog punjenja praznih molekula unutar stanice pratili smo učinak inhibicije endocitoze nekonformiranih molekula L^d na oporavak izražaja punih molekula L^d na staničnoj površini nakon njihove deplecije djelovanjem kiselog pH (pH 2,0; 20 sekundi).

Naime prema hipotezi prikazanoj na slici 90a, tijekom ustaljenog stanja, na PM postoji ravnoteža između broja punih i praznih molekula L^d . Međutim, nakon djelovanja kiselog pH, pune molekule prelaze u *misfolded* i gotovo se potpuno gube sa stanične površine. Ipak, u normalnim okolnostima, vraćanjem staničnog medija fiziološkog

Naime prema hipotezi prikazanoj na slici 90a, tijekom ustaljenog stanja, na PM postoji ravnoteža između broja punih i praznih molekula L^d. Međutim, nakon djelovanja kiselog pH, pune molekule prelaze u *misfolded* i gotovo se potpuno gube sa stanične površine. Ipak, u normalnim okolnostima, vraćanjem staničnog medija fiziološkog pH od 7,4, nakon oko 4 sata omjer površinskih ekspresija ovih dviju konformacija se vraća na početnu vrijednost. To je posljedica pojačane endocitoze nekonformiranih (*misfolded*) molekula, čime se one uklanjaju sa stanične površine, te sinteze konformiranih molekula, čime se njihov broj na PM povećava. Međutim, postoji i mogućnost da jedan dio punih molekula nastaje u unutarstaničnim endosomalnim odjeljcima punjenjem praznih molekula, te također doprinosi oporavku njihove ekspresije na staničnoj površini. U svrhu provjere te mogućnosti, nakon uzrokovanja gubitka punih molekula L^d na PM kratkotrajnim izlaganjem stanica P815 pH 2,0, jedan njihov dio smo inkubirali u nazočnosti filipina i protočnom citometrijom pratili kinetiku oporavka konformiranih molekula na površini (slika 90b). Osnovna pretpostavka je bila da će filipin spriječiti endocitozu nekonformiranih molekula i time im onemogućiti dotok u kisele endosomalne odjeljke gdje bi se trebale puniti peptidom i zadobivati stabilnu konformaciju. Time bi se usporio oporavak punih molekula koje bi na staničnu površinu dolazile samo uslijed svoje sinteze (slika 90a). To se odista i dogodilo, te na slici 90b možemo uočiti da se nakon dva, jednako kao i nakon 4 sata, uz djelovanje filipina na staničnoj membrani izražavalo 20% manje punih molekula L^d (crveni prazni kružići) nego u kontroli (sivi prazni kružići). Zanimljivo je da su stanice koje su cijelo vrijeme bile izložene fiziološkom pH, ali uz dodatak filipina (puni crveni kružići), također izražavale nešto manje punih molekula L^d u usporedbi s kontrolnim stanicama (puni sivi kružići). Usto, praćenjem kinetike degradacije punih molekula L^d nakon površinske biotínilacije uz dodatak filipina, također se uočava njihova nešto manja ekspresija nego bez dodatka ovog inhibitora (slika 41). Suprotno tome, učinak filipina je potvrđen sprječavanjem endocitoze *misfolded* molekula L^d (prazni crveni kružići), dok se uklanjanje ovih molekula sa stanične površine bez inhibitora normalno odvijalo, sve dok se nije postiglo ustaljeno stanje (prazni sivi kružići). Također, kao što je ranije napomenuto, filipin je u stanicama koje nisu bile izložene kiselom pH uzrokovao povećanje ekspresije u usporedbi s kontrolom bez inhibitora (puni crveni, odnosno sivi kružići).

Dakle, ovaj rezultat govori u prilog pretpostavci da se nekonformirane molekule L^d nakon endocitoze mogu puniti egzogenim peptidom u endosomalnim odjeljcima i kao pune doći na staničnu površinu.



Slika 90. Učinak inhibicije endocitoze nekonformiranih molekula L^d na ponovni izražaj punih molekula L^d na staničnoj površini nakon njihovog uklanjanja djelovanjem kiselog pH. (A) Hipoteza inhibicije oporavka punih molekula L^d na staničnoj površini nakon njihovog uklanjanja kratkotrajnim zakiseljavanjem kao posljedica sprječavanja endocitoze praznih molekula L^d filipinom (dodatno objašnjenje u tekstu). (B) P815 stanice su kratkotrajno zakiseljene (prazni kružići), ili netretirane (puni kružići), te potom 2 i 4 sata inkubirane u mediju fiziološkog pH bez (crni kružići) ili sa filipinom (1 µg/ml, crveni kružići). Potom je površinska ekspresija molekula L^d određena protočnom citometrijom. % izražaja – omjer MFI vrijednosti tretiranih i netretiranih stanica u ispitivanom vremenu.

4.6. DEGRADACIJA MHC MOLEKULA I RAZREDA

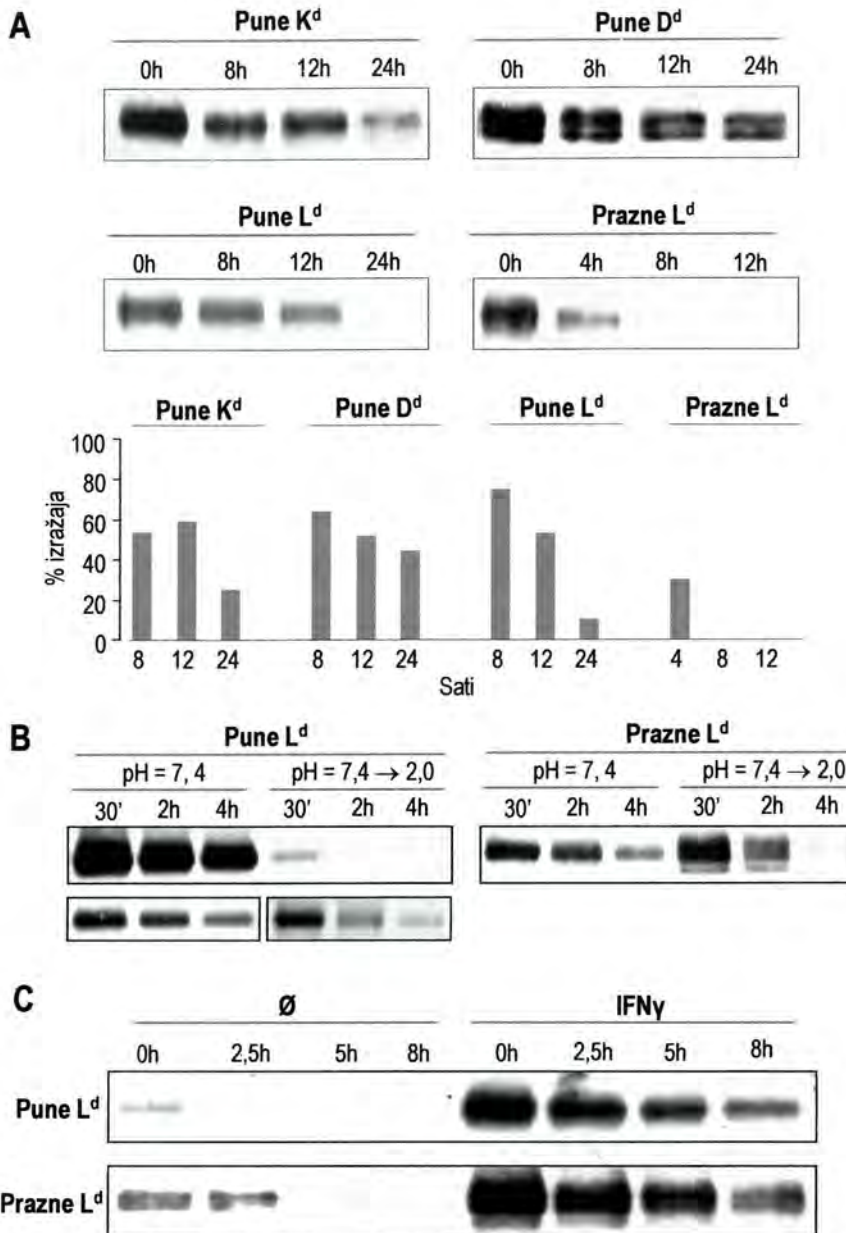
Najčešći alternativni put recikliranja je degradacija, odnosno razgradnja molekula u kiselim endosomalnim odjeljcima – kasnim endosomima i lizosomima.

4.6.1. Kinetika degradacije internaliziranih MHC-I molekula

Kao što je pokazano u našim prethodnim istraživanjima (157, 158), MHC-I molekule se sa stanične površine uklanjaju relativno sporom kinetikom koja je ipak brža za nekonformirane MHC-I molekule – native nekonformirane L^d (slika 39) i *misfolded* L^d (nije prikazano). Nakon inhibicije sinteze proteina pomoću CHX, kako je ranije opisano, te praćenja njihove površinske ekspresije metodom protočne citometrije nakon određenog vremena, možemo uočiti da konformirane molekule imaju znatno dulji poluživot na staničnoj površini od nekonformiranih (osobito konformirane molekule K^d i D^d).

Stabilnost MHC-I molekula na staničnoj površini odražava njihovu stabilnost nakon internalizacije. Kako bismo to potvrdili, površinski smo biotinilirali membranske glikoproteine na stanicama P815, te imunoprecipitali MHC-I molekule iz NP40 lizata. Naknadna biotinizacija citoplazmatskih proteina u ekstraktu je testirana imunoprecipitacijom aktina i proteina 14-3-3, koji nisu uočeni na blotu (nije prikazano). Možemo uočiti da su konformirane MHC-I molekule (K^d , D^d i L^d) ponovo stabilnije nego nekonformirane prazne molekule L^d (slika 91a). **Molekule K^d i D^d** ostaju stabilne više od 12 sati nakon obilježavanja, a u zamjetnom broju mogu se detektirati čak i nakon 24 sata. **Pune molekule L^d** se kontinuirano degradiraju tijekom cijelog *chase* razdoblja, a smanjenje njihovog ukupnog broja počinje ranije nego kod molekula K^d i D^d . Nakon 24 sata više se uglavnom niti ne uočavaju. **Prazne molekule L^d** se degradiraju još i brže, te nakon 8 sati više se gotovo niti ne zamjećuju (slika 91a). Prema tome, kinetika internalizacije MHC-I molekula sa stanične površine podudara se s njihovim poluživotom u stanici, a ukazuje da se MHC-I molekule na kraju ipak degradiraju. Rezultati koji pokazuju da se ove molekule vrlo brzo endocitiraju (slika 48), podudaraju se s rezultatima koji opisuju njihovo naknadno recikliranje, čime se produljuje njihov poluživot. Suprotno tome, nekonformirane molekule se u osnovi ne recikliraju i njihov poluživot je stoga kraći. No, obzirom da se i te molekule relativno brzo endocitiraju, postoji mogućnost da se zadržavaju u nekom retencijskom odjeljku, o čemu će biti govora u narednom poglavlju.

Valja istaknuti da se *misfolded* molekule L^d degradiraju brže nego native nekonformirane molekule (slika 91b). To je vjerojatno posljedica njihovog nefiziološki velikog broja koji se uslijed velikog "opterećenja" i zasićenosti stanične membrane izrazito brzo endocitira (nije prikazano) jer ga stanica želi što prije ukloniti. Zanimljivo je da se mali dio punih molekula L^d preostao nakon kratkotrajne acidifikacije nefiziološkim pH (2,0) također iz stanice uklanja razmjerno bržom kinetikom nego native konformirane molekule L^d (slika 91b, donji panel). Ovo također ukazuje na mogućnost da su se nakon zakiseljavanja u staničnoj membrani dogodile promjene koje dovode do brže endocitoze molekula. Također je moguće da ove preostale molekule, iako ih prepoznaje mPt 30-5-7, nemaju više konformaciju koju imaju native molekule i stanica ih pojačano uklanja.



Slika 91. Kinetika degradacije nativnih i *misfolded* MHC-I molekula. (A) P815 stanice su površinski biotinizirane, te potom inkubirane u svježem mediju. Nakon naznačenog protokola jednak broj stanica je razoren u 1% NP40 puferu, te su iz njega imunoprecipitirane MHC-I molekule. (B) Alternativno, dio površinski biotiniziranih stanica je kratkotrajno izložen djelovanju kiselog pH (2,0; 20 sek.). Potom je vraćen medij fiziološkog pH a nakon navedenog vremena stanice su razorene, te su imunoprecipitirane konformirane i nekonformirane molekule L^d. Donji dio slike punih molekula L^d prikazuje usporedbu kinetike uklanjanja na stanicama izloženim fiziološkom i nefiziološkom pH kod različitih ekspozicija gdje se postigla približno jednaka početna vrijednost. (C) Fibroblasti B12 su bili nestimulirani (Ø) ili 48 sati pod djelovanjem interferona γ (IFN γ). Potom je praćena kinetika degradacije molekula L^d na već opisan način. Nakon imunoprecipitacije (IP), svi uzorci su razdvojeni na SDS-PAGE elektroforezi i blotirani, a molekule vizualizirane pomoću SA-POD i kemiluminiscencije.

Na kraju, nakon površinske biotinizacije i imunoprecipitacije objiju konformacija molekula L^d sa stanica B12 (fibroblastna stanična linija vrlo slične stanicama Balb 3T3, s razlikom da ima pojačanu ekspresiju MHC-I

molekula), ustanovili smo da se njihov poluživot ne mijenja obzirom na to da li su stanice prethodno bile stimulirane IFN γ ili ne (slika 91c).

Prema tome, MHC-I molekule se degradiraju, ali njihov poluživot je dugačak, osobito za konformirane molekule koje se intenzivno recikliraju. Poluživot nekonformiranih molekula L^d je zamjetno kraći, iako se može reći da se i te molekule uklanjaju relativno sporijom kinetikom.

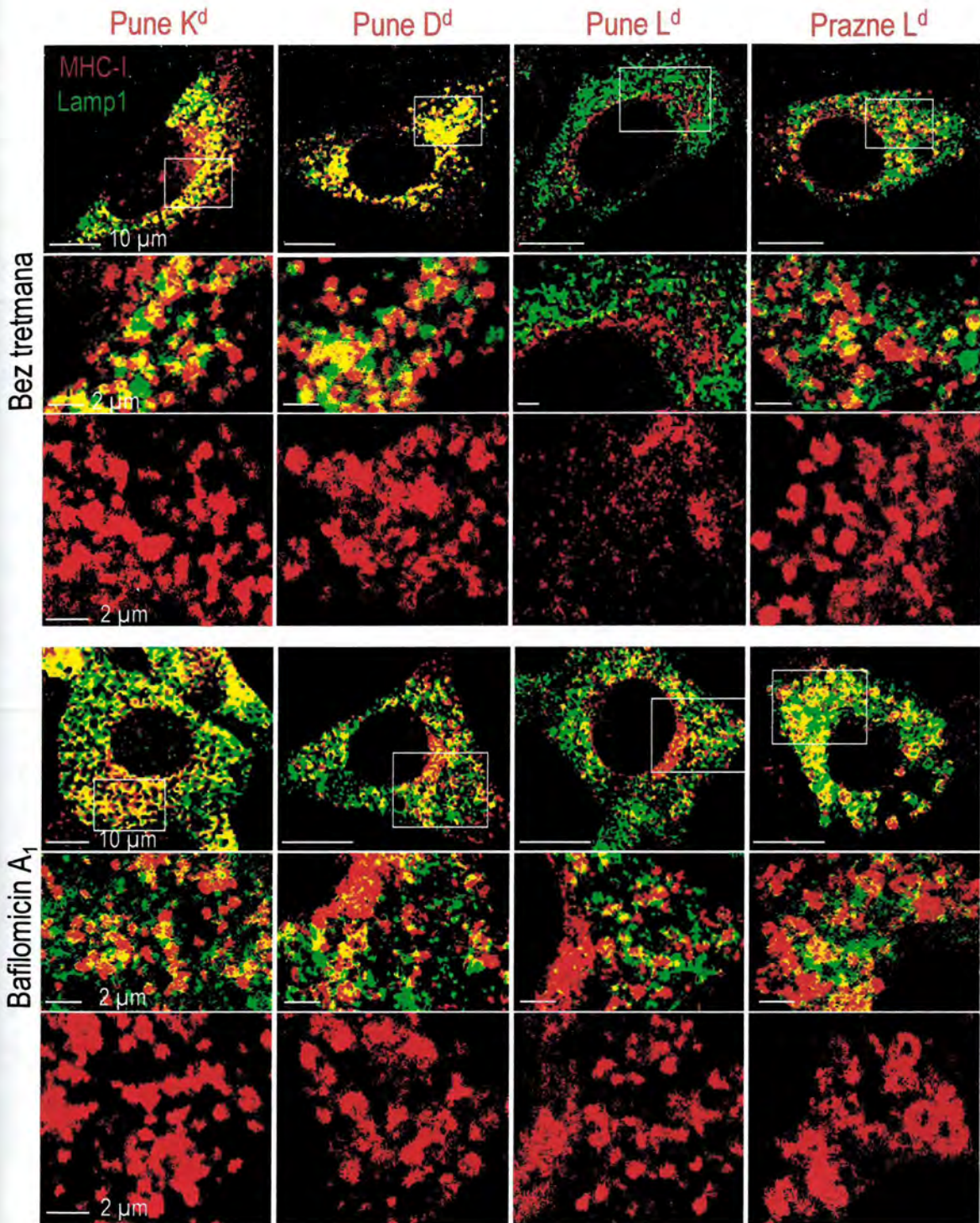
4.6.2. Učinak lizosomotropnih tvari na degradaciju molekula L^d

Ranije smo pokazali da se MHC-I molekule djelomično kolokaliziraju s molekulama Lamp1/2 (slika 46). Nadalje, kolokalizacija s Lamp1 odjeljcima zamjećuje se i već nakon 3 sata internalizacije (slika 54). Stoga smo u svrhu dodatnog razjašnjavanja koliko su kiseli endosomalni odjeljci važni za degradaciju MHC-I molekula ispitali kako inhibitori endosomalnog zakiseljavanja (bafilomicin A₁, i konkanamicin A) utječu na intenzitet kolokalizacije s Lamp1 odjeljcima, s jedne strane, odnosno na poluživot molekula, s druge strane.

Na slici 92 može se uočiti da se stupanj kolokalizacije MHC-I molekula s Lamp1 općenito povećava nakon 13 sati djelovanja bafilomicina A₁. Međutim, endosomalni odjeljci, kako oni s MHC-I molekulama, tako i još više s Lamp1, počinju se vakuolizirati, te je na većim povećanjima teže procijeniti stvaran stupanj kolokalizacije. Naime čini se kao da su i MHC-I i Lamp1 u istoj vakuoli/vezikuli, ali u različitim domenama (osobito vrijedi za konformirane molekule), te da se Lamp1 više nalazi s vanjske strane. Vakuolizacija je najizrazitija kod praznih molekula L^d, što podsjeća na učinak tretmana stanica protu-LBPA protutijelom, što je također dovelo do ~80% zastupljenosti vakuoliziranih stanica s praznim molekulama L^d (slika 54). O vakuolizaciji odjeljaka s praznim molekulama L^d biti će još govora u odjeljku 4.7.2.3.2.

Ovaj rezultat je još jedna potvrda da su ovi kasni odjeljci, odnosno njihova funkcionalnost, prvenstveno važni u endocitoznom putu nekonformiranih MHC-I molekula. Suprotno tome, iako su bitni i za konformirane molekule, za njih nisu tako ključni jer one mogu slijediti i ostale putove (npr. recikliranje). Naime, na slikama je uočljivo jukstanuklearno područje u kojem se mogu naći svi aleli konformiranih MHC-I molekula. Iako ono ne isključuje nazočnost ovih molekula u GA, prema izgledu (vezikulo-tubularne strukture), a i prema ranijim rezultatima, može se zaključiti da se radi i o RE, te da se recikliranje normalno odvija u ovim uvjetima. Suprotno tome, kao i u kontrolnim stanicama, jukstanuklearno područje je i nakon djelovanja bafilomicina A₁ općenito negativno na prazne molekule L^d.

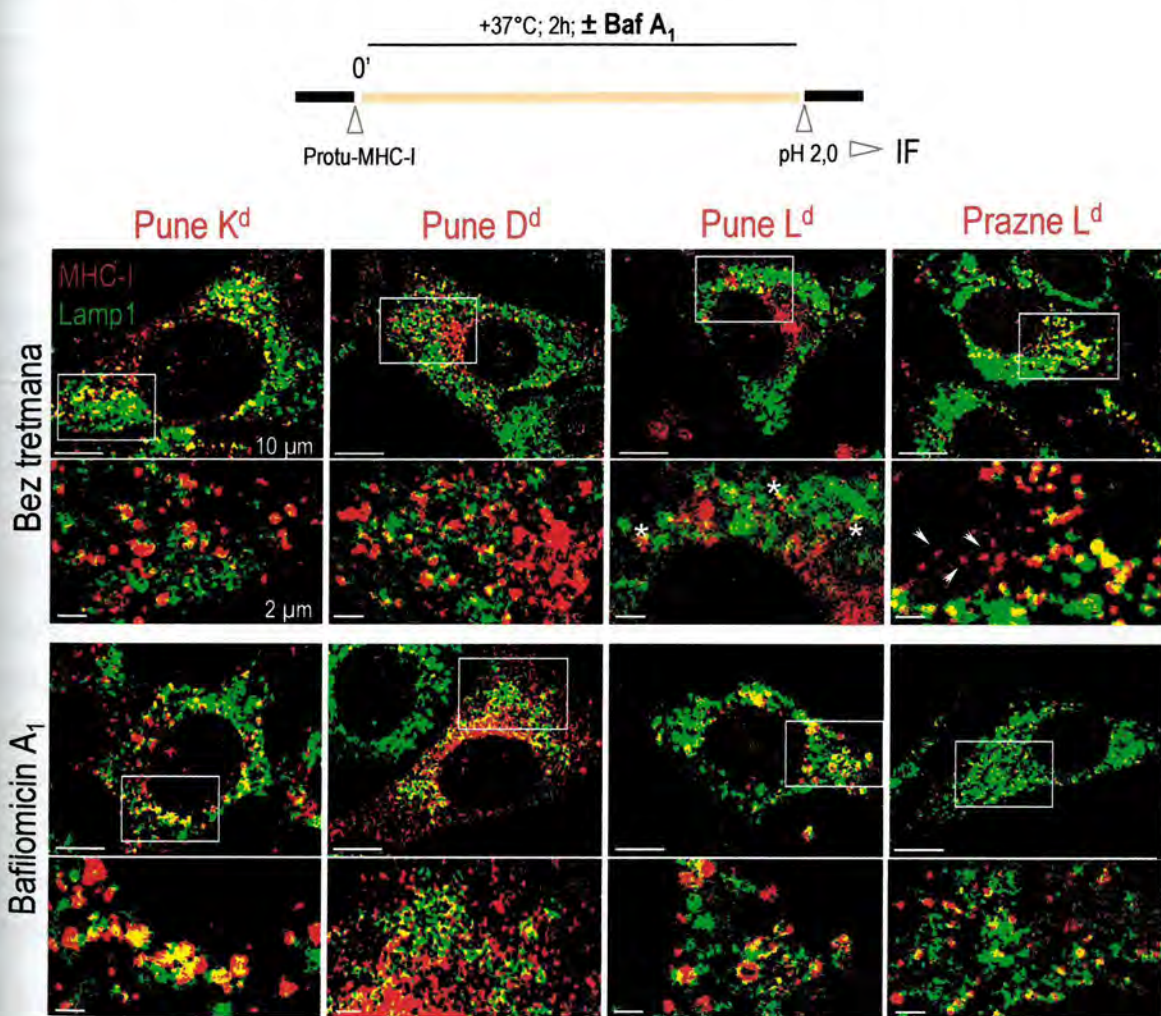
U skladu s prethodnim rezultatima, iako se *steady state* pune molekule L^d uopće ne mogu uočiti u Lamp1 pozitivnim odjeljcima u stanicama Balb 3T3, nakon 13 sati tretmana bafilomicinom A₁, zamjetan stupanj kolokalizacije se može uočiti. Dapače, čak se u nekim stanicama pokazuju i vakuole, što ukazuje da konformirane molekule L^d dolaze do ovih odjeljaka, ali se u njima ne nakupljaju uslijed brzog izlaska ili, mnogo vjerojatnije brze degradacije, odnosno dezintegracije.



Slika 92. Kolokalizacija *steady-state* MHC-I molekula s Lamp1 nakon djelovanja bafilomicina A₁. Stanice Balb 3T3 su tretirane bafilomicinom A₁ (200 nM) 13 sati. Stanice su potom fiksirane i permeabilizirane, a MHC-I molekule (crvena fluorescencija) su kolokalizirane s Lamp1 (zelena fluorescencija). Mjerna crta = 10 μm – manja povećanja, 2 μm – veća povećanja. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Kako bismo potvrdili da učinak bafilomicina A₁ i na internalizirane MHC-I molekule, Balb 3T3 fibroblaste smo 2 sata inkubirali na 37°C u u mediju zajedno s protu-MHC-I mPt, uz dodatak bafilomicina A₁ ili bez njega. Ustanovili

smo da se u netretiranim stanicama već nakon tog vremena MHC-I molekule mogu naći u Lamp1 pozitivnim odjeljcima što je u skladu s prethodnim rezultatima (slika 54). Međutim, kolokalizacija je očekivano najveća s nekonformiranim molekulama L^d, i to u gotovo svim vezikulama, osim u onim rijetkima koje se mogu u nekim stanicama vidjeti jukstanuklearno, a općenito isključuju nazočnost kasnih odjeljaka (strelice). Suprotno tome, pune molekule L^d se gotovo uopće ne kolokaiziraju s Lamp1, vjerojatno uslijed dezintegracije u tim odjeljcima. Naime, vrlo slaba djelomična kolokalizacija nekih endosoma (zvjezdice) ukazuje da ove molekule ipak mogu doći do Lamp1 odjeljaka, ali se u njima vjerojatno i ubrzo gube, znatno brže nego ostale molekule. S Lamp1 se slabije kolokaliziraju i molekule D^d, ali najvjerojatnije uslijed toga što prvenstveno slijede put recikliranja, što se vidi i po obrascu njihove ekspresije, a u skladu je s činjenicom da imaju najdulji poluživot (slika 91).



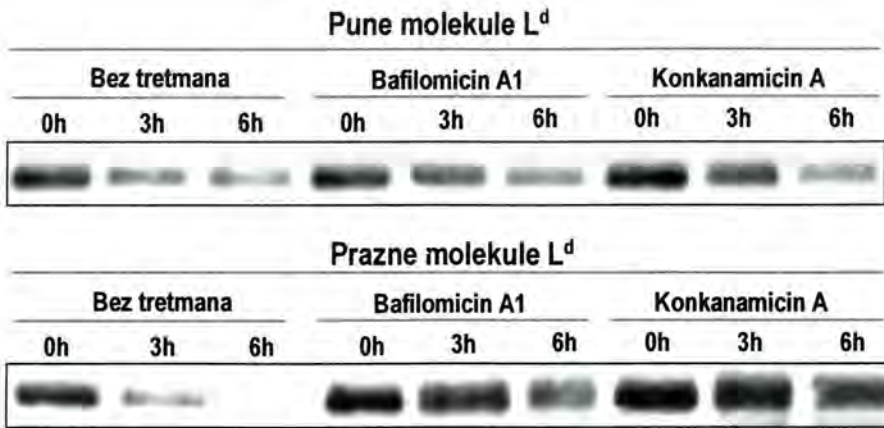
Slika 93. Kolokalizacija internaliziranih MHC-I molekula s Lamp1 nakon djelovanja bafilomicina A₁. Stanice Balb 3T3 su inkubirane 2 sata na 37°C u prisustvu određenog protu-MHC-I mPt (± bafilomicin A₁, 200 nM). Potom su kratkotrajno zakiseljene kako bi se uklonilo preostalo površinski vezano mPt, te fiksirane i permeabilizirane, a MHC-I molekule (crvena fluorescencija) su kolokalizirane s Lamp1 (zelena fluorescencija). Strelice pokazuju jukstanuklearno područje u kojem se mogu vidjeti jukstanuklearne vezikule praznih molekula L^d koje se ne kolokaliziraju s Lamp1, a zvjezdice područja u kojima se djelomično preklapaju pune molekule L^d i Lamp1. Mjerna crta = 10 µm – manja povećanja, 2 µm – veća povećanja; z = 0,5 µm. Debljina snimka (z) = 0,5 µm.

Nakon djelovanja bafilomicina A₁, sve konformirane MHC-I molekule se jače kolokaliziraju s Lamp1. Određen učinak se zamjećuje kod konformiranih molekula D^d, kod kojih vezikule postaju i nešto veće. Ipak, još je i dalje uočljivo jukstanuklearno područje, te citoplazmatske vezikule koje se ne kolokaliziraju s Lamp1. Nadalje, iako više nego u kontrolnim stanicama, molekule D^d i dalje ne pokazuju velik stupanj kolokalizacije s Lamp1, opet najvjerojatnije što kiseli odjeljci nisu tako bitni u ovom razdoblju njihovog puta. Zanimljiva situacija se uočava s obje konformacije molekula L^d. Konformirane molekule L^d se sada mogu vidjeti mnogo jače vezikularno, i to i izvan jukstanuklearnog područja. Dapače, u ovom slučaju se radi o većim vezikulama, ponekad i vakuolama koje se kolokaliziraju s Lamp1. To potvrđuje prethodnu pretpostavku da ove molekule ulaze u Lamp1 odjeljke, ali tada mijenjaju konformaciju i gube se. Međutim, još uvijek se može vidjeti i nemali broj stanica u kojem se vide vezikule u jukstanuklearnom području, jednako kao i one periferne koje se ne kolokaliziraju s Lamp1, što ukazuje da se, kao i kod ostalih konformiranih MHC-I molekula recikliranje događa i u nazočnosti bafilomicina A₁. Na kraju, nakon alkalizacije endosoma, ekspresija praznih molekula nije tako intenzivna. Međutim, kolokalizacija s Lamp1 je i dalje gotovo potpuna.

Prema tome, sve MHC-I molekule dolaze do Lamp1 odjeljaka. Obzirom na nešto pojačan signal kod konformiranih MHC-I moguće je da se jedan dio degradira, ali to ne mora vrijediti za sve molekule. Nadalje, dio vezikula se vidi i dalje citoplazmatski. One se znatno kolokaliziraju s TfR (nije prikazano), što ukazuje da se radi o ranim endosomima ili reciklirajućim odjeljcima. Naime, mora se imati na umu da je kod ovog protokola mPt cijelo vrijeme ulazilo u stanicu, te je stalan dotok molekula u stanicu, koje nisu sve u istoj fazi. Degradacija-dezintegracija, odnosno njena inhibicija najuočljivija je na primjeru punih molekula L^d. Na kraju, nekonformirane molekule L^d se vrlo jako kolokaliziraju s Lamp1 već u kontroli, tako da bafilomicin A₁ nije značajno promijenio stupanj kolokalizacije.

Obzirom da se u ovim kasnim odjeljcima primarno degradacijski, za pretpostaviti je da je razgradnja i sudbina molekula koje ulaze u njih. Kako bismo to istražili, ispitali smo kinetiku degradacije molekula L^d nakon površinske biotilacije i naredne imunoprecipitacije nakon tretmana lizisotropnim tvarima. Međutim bafilomicin A₁, jednako kao i konkanamicin A (slika 94) nisu u potpunosti spriječili degradaciju ovih molekula, što ukazuje da se one mogu u stanici ili degradirati na druge načine, ili se iz nje mogu i gubiti (npr. procesom egzocitoze). Ova pojava je još uočljivija kod punih molekula L^d gdje se uočava da su lizisotropni inhibitori samo djelomično i privremeno usporili njihovu degradaciju.

Iz svega rečenog možemo zaključiti da se MHC-I molekule nakon endocitoze ne upućuju izravno u put degradacije, ali se u konačnici ipak degradiraju, i to najvjerojatnije u kiselim Lamp1/2 pozitivnim endosomalnim odjeljcima, relativno sporom kinetikom.



Slika 94. Učinak inhibitora endosomalnog zakiseljavanja na kinetiku degradacije molekula L^d. Stanice P815 su površinski biotinizirane, te potom inkubirane u svježem mediju fiziološkog pH bez inhibitora, ili uz bafilomicin A1 (200 nM), ili konkanamicin A (50 nM). Stanice su nakon naznačenog vremena razorene u puferu s 1% NP40, te su imunoprecipitirane pune i prazne molekule L^d. Molekule su razdvojene na SDS-PAGE elektroforezi, blotirane, te vizualizirane pomoću SA-POD i kemiluminiscencije.

4.7. PORIJEKLO PRAZNIH MOLEKULA L^d I RETENCIJSKI ODJELJCI ZA NEKONFORMIRANE MHC-I MOLEKULE

Kao što je već ranije opisano, nekonformirane MHC-I molekule bi se u pravilu trebale nalaziti samo u ER - kao preteče u sintezi stabilnih trimolekularnih MHC-I kompleksa, odnosno u lizosomima - kao međuprodukti razgradnje konformiranih molekula. Međutim, u nerijetkom broju slučajeva nekonformirane molekule se nalaze i u drugim unutarstaničnim odjeljcima, te na staničnoj površini. U ovom poglavlju pokušat ćemo rasvijetliti porijeklo praznih molekula L^d na PM, te istražiti odjeljke u kojima se grupiraju.

4.7.1. Porijeklo nekonformiranih molekula L^d

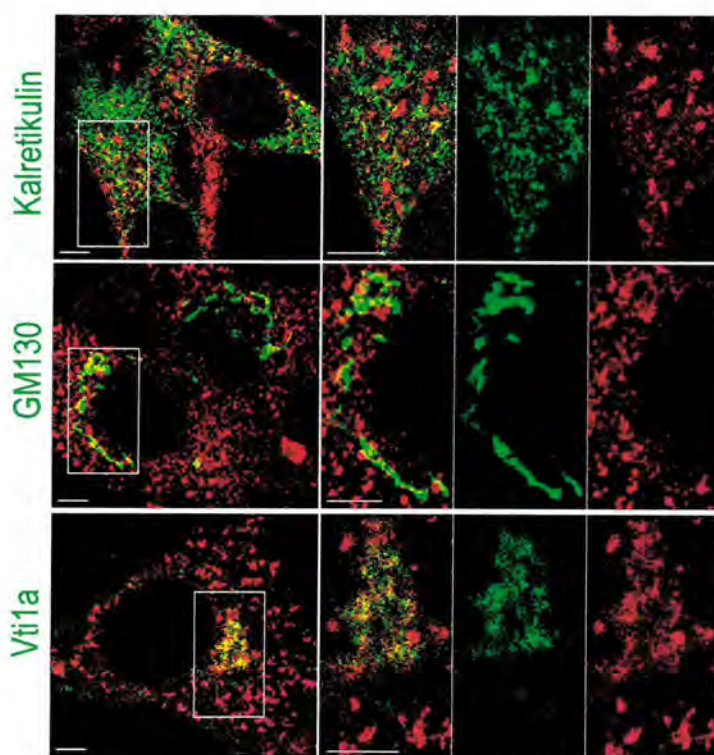
U osnovi postoje dvije mogućnosti dolaska nekonformiranih molekula na staničnu površinu, te kasnije i u endosomalne odjeljke. Jedan je da kao takve izlaze iz ER te se upućuju prema PM. Druga je da nastaju raspadom punih molekula, bilo tijekom biosintetskog, bilo tijekom endocitoznog puta. Obzirom da je o ovoj posljednjoj mogućnosti opširno bilo govora ranije (odjeljak 4.5.4.3.), u narednom dijelu ćemo navesti i opisati rezultate dobivene ispitivanjem ostalih načina.

4.7.1.1. Uloga biosintetskog i sekretornog puta u nastanku praznih molekula L^d

Iako u ER postoji stroga kontrola koja bi trebala osigurati izlazak samo potpuno stabilnih trimolekularnih kompleksa MHC-I molekula, postoji mogućnost da neke molekule ipak zaobilaze tu kontrolnu točku. Stoga smo na stanicama Balb 3T3 detaljnije ispitali kolokalizaciju praznih molekula L^d s markerima GA i usporedili je s s *kalretikulinom* (markerom ER). Kao i ranije (slika 29), iako djelomična kolokalizacija postoji, ona nije značajnija i

ukazuje da se glavina unutarstaničnog «poola» praznih molekule L^d općenito ne nalazi u ER (slika 95). Međutim, ipak treba napomenuti da je stupanj kolokalizacije praznih molekula L^d i kalretikulina jači kada se prikazuju u difuznom obrascu, nego kada se jedino mogu uočiti njezini jasni vezikulotubularni odjeljci. Tako možemo uočiti da kolokalizacije nema između kalretikulina i praznih molekula L^d koje se nalaze u većim vezikulama.

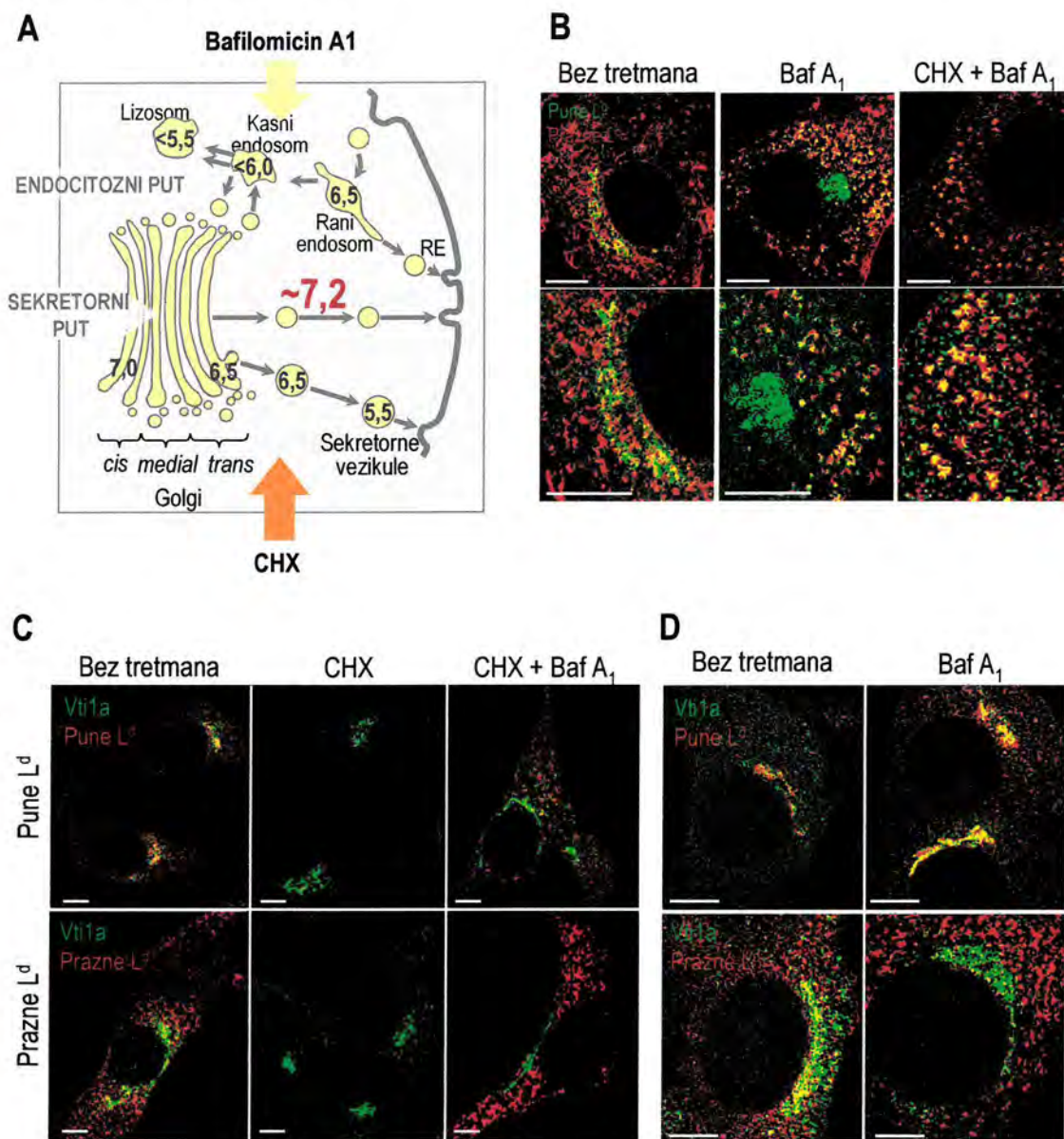
Nadalje, kako bismo napravili disekciju između pojedinih dijelova GA, koristili smo nekoliko markera, od kojih su na slici 94 prikazani GM130, kao marker *cis*-GA, te Vti1a, kao marker sekrecijskog puta i *trans*-GA. Uočava se da kolokalizacije praznih molekula L^d i GM130 u pravilu niti nema, ili je vrlo slaba (u tom slučaju je GM130, jednako kao i kalretikulin, općenito isključen iz vezikulotubularnih odjeljaka pozitivnih na prazne molekule L^d) (slika 29 i slika 94). Međutim, kolokalizacija s Vti1a je znatno jača. Ipak, ako ponovo promotrimo kako se Vti1a odjeljci odnose prema jasnim vezikulotubulima u kojima se nalaze prazne molekule L^d, uočavamo da niti s njima u pravilu kolokalizacije nema. Dakle, iako za nekonformirane molekule L^d zaključno možemo reći da se najvjerojatnije nalaze u sekretornom putu, njezini vezikulo-tubuli su najvjerojatnije samo dio endocitoznog puta. Objašnjenje veće prisutnosti praznih molekula L^d u *trans*-GA i sekrecijskim vezikulama, nego u *cis*-GA najvjerojatnije leži u činjenici da prvi odjeljci imaju znatno niži pH (6,5→5,5), za razliku od ER i *cis*-GA koji su neutralni. Kao što smo govorili ranije, kiseli pH pogoduje raspadu molekula L^d, te bi ovo mogao biti još jedan način nastanka praznih molekula L^d.



Slika 95. Kolokalizacija praznih molekula L^d (ERLC) s biljezima endoplazmatske mrežice i Golgijeva aparata. Prazne molekule L^d (crvena fluorescencija) su na stanicama Balb 3T3 kolokalizirane s kalretikulinom, GM130 ili Vti1a (zelena fluorescencija). Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Kako bismo potvrdili da se prazne molekule L^d odista kolokaliziraju s Vti1a, te u svrhu ispitivanja pretpostavke da zamjetan broj nekonformiranih molekula L^d nastaje raspadom iz punih u kasnijim, tj. kiselim odjeljcima

sekretomog puta, koristili smo CHX kao inhibitor proteinske sinteze, te BafA₁ kao inhibitor endosomalnog zakiseljavanja i degradacije (slika 96a).



Slika 96. Učinak alkalizacije endosomalnih odjeljaka na kolokalizaciju praznih molekula L^d s Vti1a i punim molekulama L^d. (A) Učinak bafilomicina A₁ na alkalizaciju endosomalnih odjeljaka (RE – reciklirajući endosomi). (B), (C) i (D) Stanice Balb 3T3 su 3,5 sata tretirane bafilomicinom A₁ (BafA₁, 200 nM), samostalno (B i D) ili u kombinaciji CHX (15 μM, B i C). Potom su stanice fiksirane i permeabilizirane, a pune, odnosno prazne molekule L^d kolokalizirane međusobno (B), ili s Vti1a (C i D), te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 5 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

Iako je CHX trebao omogućiti praćenje samo onih molekula koje su dio endocitoznog puta, već nakon 3,5 sata inkubacije uzrokovao je smanjenje broja obiju konformacija molekula L^d, tako da se one više nisu više mogle pratiti konfokalnom imunofluorescentnom mikroskopijom (slika 96c). Stoga smo uz njega dodali BafA₁ kako bi se spriječila degradacija, te nakon 3,5h osiguralo praćenje samo onih molekula koje su dio endocitoznog puta (slika 96b i c). Uočavamo da se nakon kombinacije djelovanja BafA₁ i CHX pune i prazne molekule ponovo vezikularno

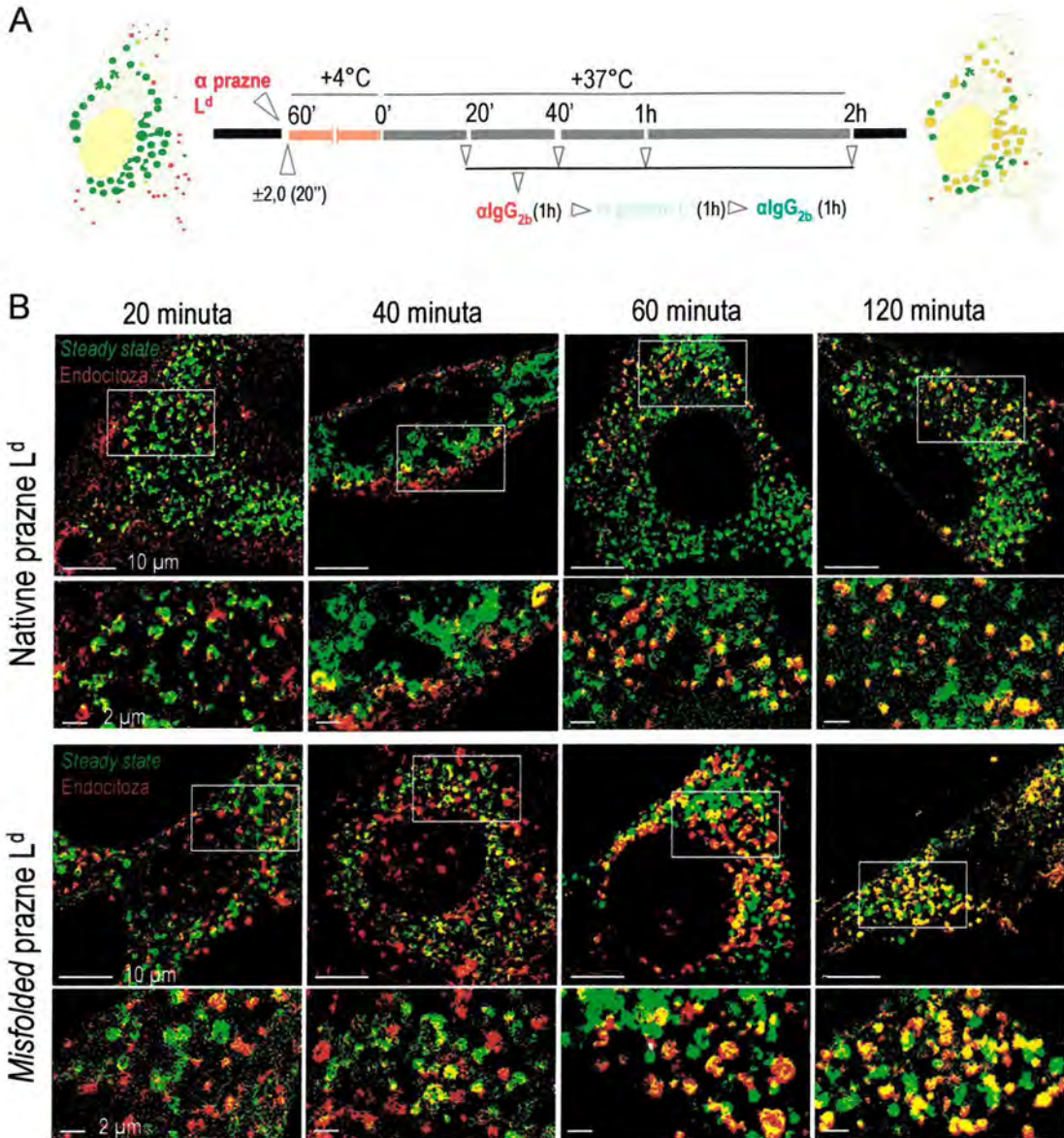
kolokaliziraju (slika 96b), što ukazuje da je pojava izražaja punih molekula L^d u vezikularnom obrascu i njihova znatna kolokalizacija s praznim molekulama nakon alkalizacije endosoma, koja je i ranije uočena (slika 86), vezana uz endocitozni put. Međutim, zanimljivo je da samo djelovanje BafA₁ dodatno pojačalo jukstanuklearni izražaj punih molekula L^d , koji se podudara s GA. Suprotno tome, prazne molekule L^d su se izgubile iz tog područja, te se, za razliku od kontrole, više u tom dijelu nisu kolokalizirale s punim molekulama L^d . Prema tome, u slučaju kada BafA₁ i CHX djeluju sinergistički, omogućeno je samo praćenje molekula u endocitoznom putu, te se obje konformacije molekula L^d uklanjaju iz područja GA. Međutim, djelovanjem samog BafA₁, biosinteza i sekretorni put su omogućeni, jednako kao i vizualizacija molekula koje su dio endocitoznog puta, nakon čega izgleda da pune molekule L^d ostaju zadržane u GA i sekretornom putu, za razliku od nekonformiranih molekula. U svrhu preciznijeg ispitivanja lokalizacije molekula L^d u GA, pod istim uvjetima smo ih kolokalizirali s Vti1a (slika 96c i d). Kao što je i očekivano, nakon inhibicije samo sinteze (istodobno djelovanje BafA₁ i CHX), molekule L^d se više ne kolokaliziraju s Vti1a odjeljcima što je posebno uočljivo u slučaju praznih molekula L^d (slika 96c). Nadalje, a u skladu sa slikom 67b, nakon 13 sati djelovanja BafA₁ pune molekule L^d se još jače kolokaliziraju s Vti1a, dok se prazne molekule L^d uklanjaju iz tih odjeljaka.

Prema dobivenim rezultatima, možemo zaključiti da se prazne molekule L^d u stanici mogu naći već kao dio sekretornog puta. Iako je moguće da zaobilaze kontrolu u ER (kao posljedica toga bi bila vrlo slaba kolokalizacija s GM130 kao markerom *cis* GA), vjerojatnije je da znatniji dio nastaje kao posljedica djelomične dezintegracije punih molekula L^d uslijed kiselog pH *trans*-GA i sekrecijskih vezikula. Bilo bi moguće da je to još jedan razlog slabijeg izražaja konformiranih molekula L^d na staničnoj površini u usporedbi s konformiranim molekulama K^d i D^d .

4.7.1.2. Endocitozno porijeklo unutarstaničnih *steady state* praznih molekula L^d i ELRC

Iako rezultati iz prethodnog odjeljka pokazuju da se prazne molekule L^d u stanici djelomično nalaze u sekretornom putu, te vjerojatno tamo i nastaju, ipak izgleda da znatan dio *steady state* vezikula nije dio toga, već endocitoznog puta. U svrhu ispitivanja te mogućnosti, te kako bismo odredili koja konformacija molekula L^d prvenstveno sudjeluje u stvaranju unutarstaničnog «poola» nekonformiranih molekula, uspostavili smo protokol koji bi nam omogućio razlikovanje neposredno internaliziranih molekula od onih koje su se nalazile unutar stanice prije početka pokusa (slika 97a). Stoga smo na stanice Balb 3T3 površinski vezeli mPt 64-3-7 (+4°C). Kako bismo, uz nativne nekonformirane molekule L^d , mogli pratiti i kuda se usmjeravaju *misfolded* molekule L^d , jedan dio stanica smo izložili pH 2,0 tijekom 20 sekundi. Nakon ispiranja mPt i endocitoze tijekom 20, 40, 60 i 120 minuta, stanice smo fiksirali, permeabilizirali i obilježili protu-IgG_{2b} sekundarnim protutijelom konjugiranim crvenom bojom (Alexa 555). Potom smo, u svrhu obilježavanja unutarstaničnog «poola» praznih molekula L^d , stanicama ponovo dodali mPt 64-3-7, a nakon njega također protu-IgG_{2b} sekundarno protutijelo kao i ranije, samo ovaj put konjugirano zelenom fluorescentnom bojom (Alexa 488). Prema tome, crvena fluorescencija je pokazatelj neposredno internaliziranih molekula koje (još) nisu stigle do unutarstaničnog «poola»; zelena fluorescencija predstavlja *steady state* prazne molekule L^d u koje internalizirane nekonformirane molekule (još) nisu stigle, dok žuta boja predstavlja vezikule u kojima je došlo do preklapanja, odnosno područja u kojima su

internalizirane molekule došle do *steady state* vezikula, te je pokazatelj njihovog endocitoznog porijekla (slika 96a).



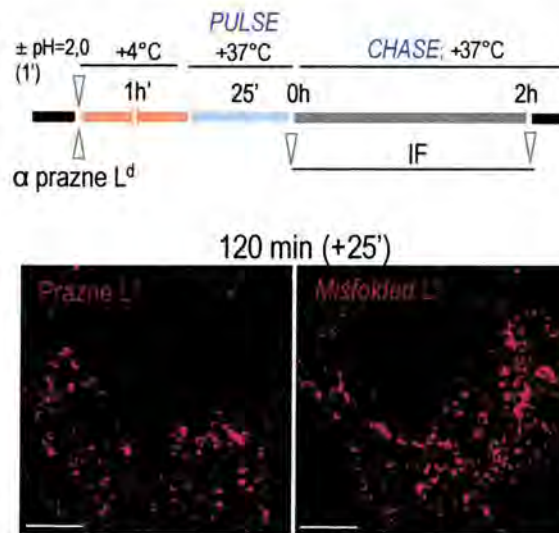
Slika 97. Endocitoza nekonformiranih molekula L^d u unutarstanične *steady state* vezikule s praznim molekulama L^d . A. *Protokol pokusa.* Površinske prazne molekule L^d (nativne ili *misfolded*) obilježene su s mPt,64-3-7 te internalizirane i obilježene crvenom fluorescentnom bojom (protu-mišji IgG_{2b} Alexa 555). Potom su istim mPt obilježene *steady state* nekonformirane molekule L^d , ali označene zelenom bojom (protu-mišji IgG_{2b} Alexa 488). Detaljnije objašnjenje u tekstu. B. Kolokalizacija endocitiranih nativnih/*misfolded* nekonformiranih molekula L^d prema rezultatima dobivenim konfokalnom mikroskopijom na stanicama Balb 3T3. Mjerna crta = 10 μ m – manja povećanja, 2 μ m – veća povećanja. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

Kao što je bilo i za očekivati, nakon 20 minuta većina neposredno internaliziranih molekula se nalazila u području ispod PM i nije se kolokalizirala sa *steady state* vezikulama, iako su se vezikule često nalazile u blizini ili se čak i dodirivale. Međutim, već nakon 40 minuta, znatniji dio vezikula se uočio kolokaliziran, iako perifernije, dok je

kolokalizacija u cirkumnuklearnom obrascu bila posebno uočljiva nakon 60 i 120 minuta. Dapače, nakon 2 sata gotovo sve novointernalizirane molekule su ušle u već prethodno stvorene vezikule s praznim molekulama L^d . Slika je bila vrlo slična, bez obzira da li su se pratile native ili *misfolded* prazne molekule L^d , jedino što je signal novointernaliziranih molekula bio nešto jači kada se pratila *misfolded* konformacija (slika 97b). Nadalje, iako su se i dalje mogle uočiti i *steady state* vezikule u koje još nisu ušle one tek internalizirane, mogući uzrok bi mogao biti potreba za još duljom kinetikom jer sunakon 3,5 sata su u većini stanica u pravilu sve vezikule bile žute, a nakon 2 sata u ovom pokusu se mogu uočiti takve stanice s internaliziranim *misfolded* molekulama L^d (nije prikazano). Nadalje, moguće je da je i jedan dio *steady state* vezikula u zasebnom sekretornom putu.

Kako bismo potvrdili da tijekom pokusa sekvencionirano obilježavamo najprije samo novointernalizirane, a tek onda *steady state* molekule, jedan dio stanica smo inkubirali sa sekundarnim crveno obilježenim protutijelom već tijekom internalizacije, te, prema osnovnom protokolu, i neposredno nakon fiksacije i permeabilizacije. Slika je bila jednaka kao i u slučaju bez dvostruke inkubacije sa sekundarnim protutijelom što ukazuje da je samo obilježavanja nakon fiksacije dovoljno (nije prikazano).

Prema tome, možemo zaključiti da je većina *steady state* praznih molekula L^d endocitoznog porijekla i znatan dio se može napuniti već tijekom 1-2 sata. Nadalje, obzirom da je unutarstanični «pool» stabilan tijekom više sati (prema našim rezultatima i do 3,5 sata), prozvali smo ga **retencijskim odjeljkom za prazne molekule L^d – ELRC** (engl. *empty L^d retention compartment*), te ćemo ga stoga i dalje tako nazivati.



Slika 98. Zadržavanje nekonformiranih internaliziranih molekula L^d unutarstaničnim odjeljcima nakon 25 minuta pulsa. Površinske prazne molekule L^d (native ili *misfolded*) obilježene su s mPt 64-3-7, te internalizirane 25 min. (pulse). Potom su praćene narednih 2 sata, vizualizirane pomoći sekundarnog protutijela (protu-mišji IgG2_b Alexa 555) i analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm . Debljina snimka (z) = 0,5 μm .

Kako bismo dodatno provjerili da s internalizirane nekonformirane molekule L^d zadržavaju u unutarstaničnim vezikulo-tubularnim strukturama, primijenili smo *pulse-chase* protokol iz prethodnog dijela. Tijekom 25 minuta (*pulse*) internalizirali smo nekonformirane native, odnosno *misfolded* molekule L^d . Nakon toga smo uklonili

preostala površinska protutijela i molekule pratili nakon 2 sata *chase* razdoblja. Čak i nakon toga vremena, molekule su se još dobro mogle vidjeti (slika 98), što također pokazuje da je odjeljak u koji dolaze retencijski.

4.7.2. Obilježja odjeljka u kojem se nalaze nekonformirane molekule L^d (ELRC)

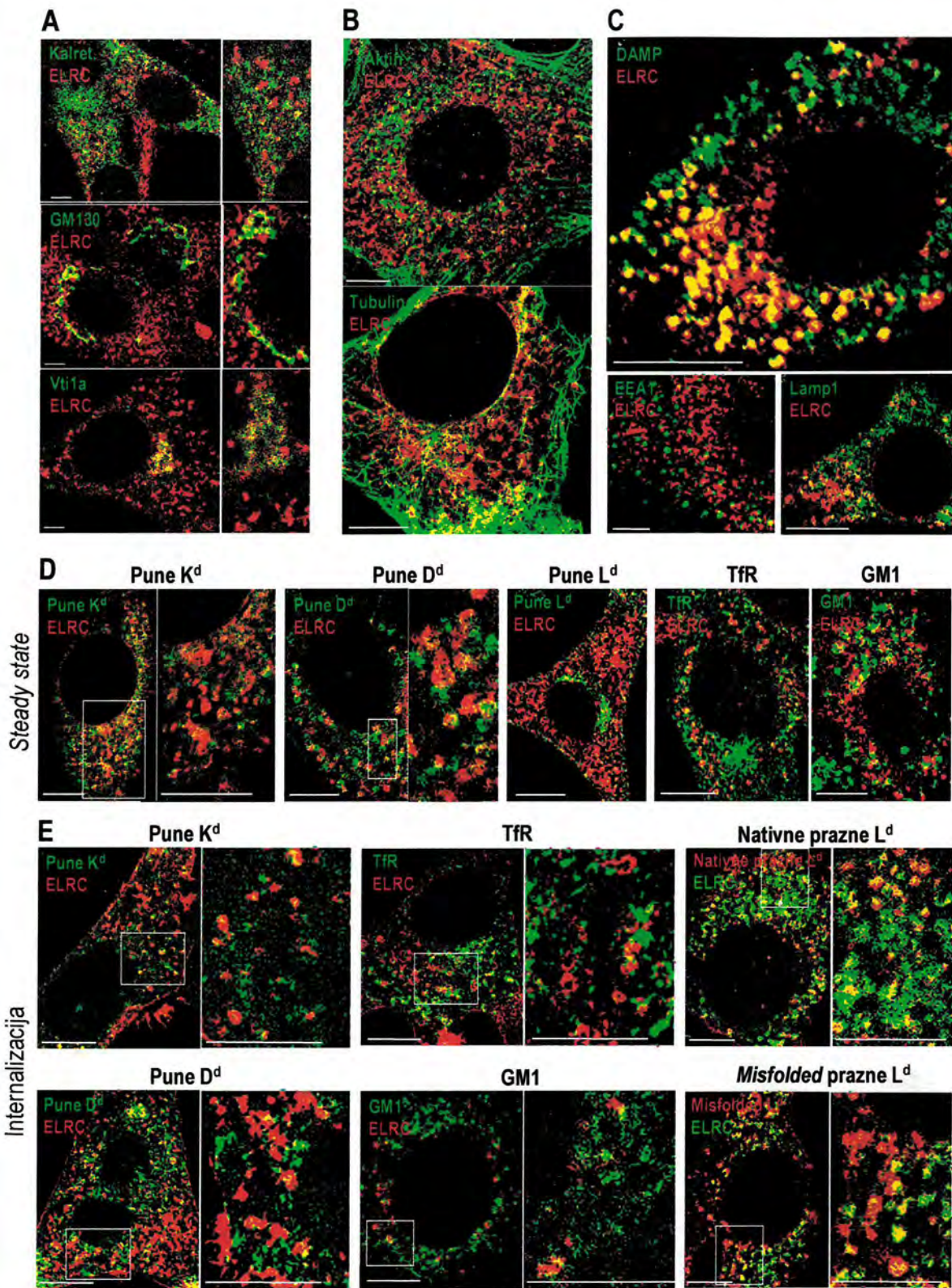
U ranijim odjeljcima već je dosta bilo riječi o obilježjima ELRC odjeljka u okviru praćenja *steady state* praznih molekula. Stoga ćemo u ovom dijelu samo ukratko ponoviti neka od njegovih najvažnijih obilježja, posvećujući najveću pozornost faktorima koji mijenjaju njegovu veličinu i oblik.

4.7.2.1. Opća obilježja ELRC u intaktnim stanicama

U ovom dijelu samo ćemo ukratko ponoviti opća obilježja ELRC obzirom na pH, kolokalizaciju s markerima endocitoznih odjeljaka i putova, te sa citoskeletom. Važno je razlikovati ovaj odjeljak od ostalih staničnih struktura u kojima možemo naći prazne molekule L^d, koje su više-manje difuznog oblika ili podrazumijevaju manje vezikule.

U osnovi ELRC podrazumijeva vezikulotubularne strukture obrasca C s nekonformiranim molekulama L^d, koje se u stanici uglavnom raspoređuju perinuklearno. Ti odjeljci se ne kolokaliziraju s markerima sekretornog puta (kalretikulin, GM130, Vti1a) kao niti s tubulimom i aktinom (slika 99a). Ipak, vrlo se često vezikule i vezikulotubularne strukture mogu naći u blizini citoskeletnih nitii, ili na njima (slika 98b). Nadalje, ove su vezikule kiselog pH, na što ukazuje znatna kolokalizacija s DAMP. Međutim, iako je DAMP pokazatelj odjeljaka s pH uglavnom nižim od 6,0 (npr. ne kolokalizira se s EEA1, nije prikazano), koji vlada prvenstveno u kasnim endosomima i lizosomima, ELRC se Lamp1/2 odjeljcima kolokalizira djelomično (slika 98c), a još slabije s LBPA (slika 55). Nadalje, ELRC se u glavnini ne preklapa s konformiranim MHC-I molekulama, kao niti s TfR i GM₁, bez obzira da se u stanici prate kao *steady state* (slika 99d) ili nakon 1 sata kontinuirane internalizacije (slika 99e). Jedine molekule za koje smo ustanovili da se internaliziraju u ELRC su same prazne molekule L^d (slika 99e).

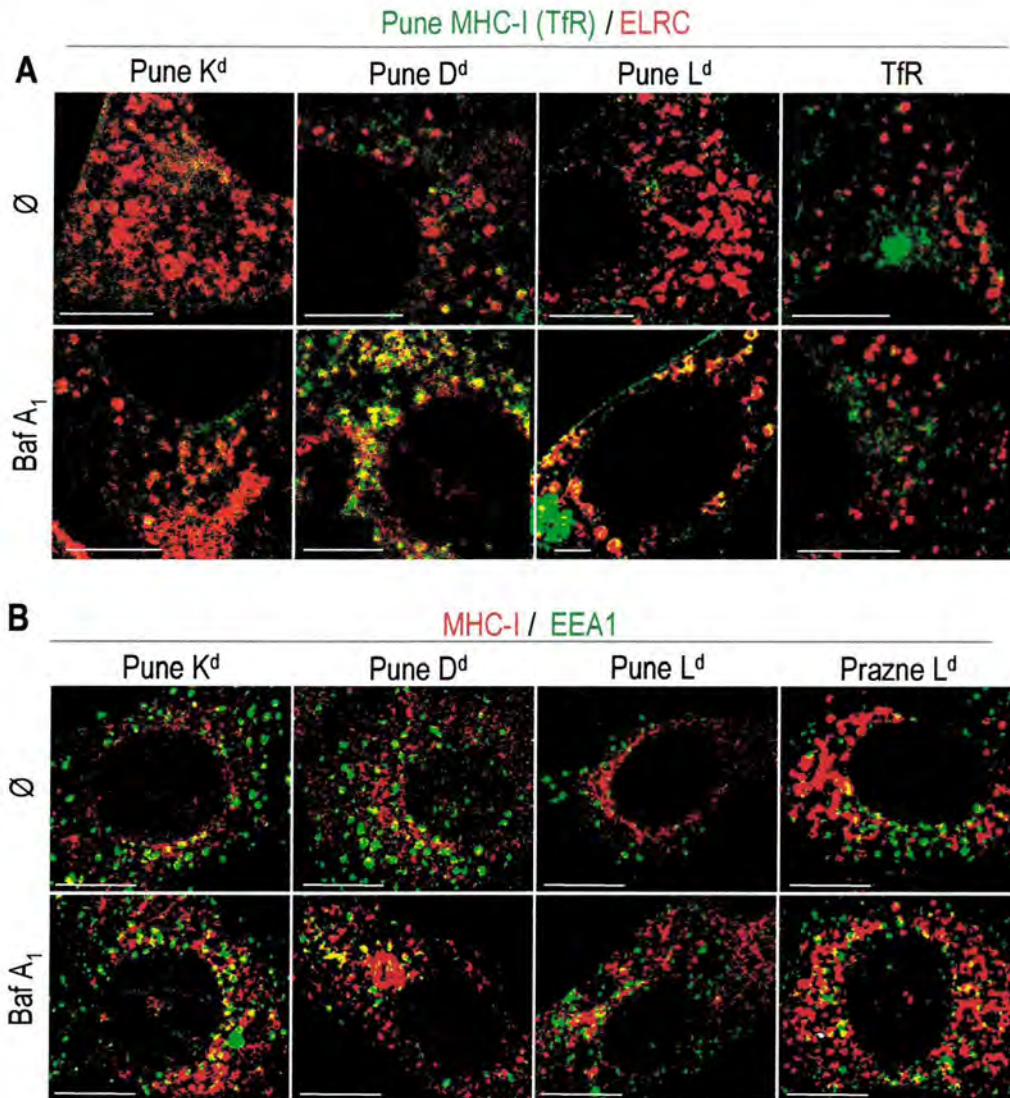
Stoga smo zaključili da ELRC vjerojatno jednim dijelom predstavlja posebnu vrstu odjeljka kiselog pH (najvjerojatnije <6,0), čije je glavno obilježje da se u njemu jedno vrijeme zadržavaju nekonformirane molekule (L^d), prije nego što se usmjere u degradaciju ili neko drugo odredište.



Slika 99. Kolokalizacija ELRC s markerima endocitoznih odjeljaka i putova, te internaliziranim površinskim molekulama. Prazne molekule L^d (nativne ili *misfolded*) su kolokalizirane s navedenim biljezima citoskeleta, sekretornog i endocitoznog puta, te analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μm. Debljina snimka (z) = 0,5 μm.

4.7.2.2. Učinak endosomalne alkalizacije na usmjeravanje molekula u ELRC

Ranije smo ustanovili da, iako se u normalnim uvjetima pune i prazne molekule L^d uglavnom ne nalaze u istim odjeljcima, nakon djelovanja inhibitora endosomalne alkalizacije dolazi do vezikularne kolokalizacije njihovih *steady state* vezikula. Stoga smo željeli ispitati, da li se, nakon takvog tretmana mijenja stupanj kolokalizacije ELRC vezikula s ostalim konformiranim MHC-I molekulama, kao i s TfR.



Slika 100. Kolokalizacija ELRC s EEA1 i Lamp1, te sa *steady state* MHC-I i TfR nakon djelovanja Bafilomicina A₁. (A) Stanice Balb 3T3 su tretirane bafilomicinom A₁ (200 nM) 17 sati, nakon čega su prazne molekule L^d (crvena fluorescencija) kolokalizirane s konformiranim MHC-I molekulama i TfR (zelena fluorescencija), ili su (B) MHC-I molekule (crvena fluorescencija) kolokalizirane s EEA1 (zelena fluorescencija). Mjerna crta = 10 µm. Debljina snimka (z) = 0,5 µm.

Balb 3T3 stanice smo izložili djelovanju bafilomicina A₁ 17 sati, te ELRC kolokalizirali s MHC-I i TfR odjeljcima (slika 100a). Možemo vidjeti da se konformirane MHC-I molekule, iako se u kontroli ne nalaze u ELRC, nakon djelovanja bafilomicina A₁ premještaju u njega. Za razliku od njih, TfR se ne kolokalizira s ELRC ni u kontroli niti nakon endosomalne alkalizacije.

Iako se kolokalizacija MHC-I molekula L^d i Lamp1 nešto povećavala (slika 92), kolokalizacija s EEA1 odjeljcima se nije znatnije mijenjala nakon 11 sati djelovanja ovog inhibitora (slika 100b). Stupanj kolokalizacije molekula K^d i D^d nakon djelovanja bafilomicina A₁ se nešto povećao, ali je i dalje velik broj vezikula vidljiv izvan tog odjeljka (slika 100b). To ukazuje da EEA1 odjeljci nisu oni u kojima se MHC-I molekule zadržavaju nakon endosomalne alkalizacije, već potvrđuje da se radi o kasnim, Lamp1 pozitivnim endosomima (usp. slika 92).

Prema tome možemo zaključiti da se putovi konformiranih MHC-I molekule u barem dvije točke sijeku s putem nekonformiranih molekula L^d tijekom svoga endocitoznog puta. Već smo pokazali da se prvo spajanje događa u EEA1⁺ endosomima (slika 53), ali se najvjerojatnije nakon toga razdvajaju. No, kada se ponovno sretnu u kasnim odjeljcima, moguće je da endosomalna alkalizacija sprječava eventualno novo razdvajanje, a dobrim dijelom i daljnji put molekula, te oni ostaju u istim odjeljcima koji bi se nalazili nizvodno od EEA1⁺ odjeljaka, a koji bi vjerojatno znatnijim dijelom obuhvaćali one Lamp1⁺ (a možda i LBPA⁺) pozitivne. S druge strane, moguće je i da bafilomycin A₁ sprječava normalan put konformiranih MHC-I molekula, te se oni alternativno usmjeravaju u ELRC. Suprotno tome, TfR se ne kolokalizira s ELRC niti nakon djelovanja inhibitora acidifikacije, te stoga pretpostavljamo da se odvaja od nekonformiranih molekula L^d prije MHC-I molekula (vjerojatno odmah nakon ranih endosoma), a njegov endosomalni put se čak niti alternativnim krakom ne preklapa s ELRC. S druge strane, činjenica da se izuzetno velik udio TfR usmjerava u recikliranje može biti uzrok ovoj izostanku kolokalizacije. Naime, iako se i konformirane MHC-I recikliraju, to recikliranje nije tako intenzivno kao kod TfR, te se i veći udio usmjerava u kasne endosome u odnosu na TfR, te se povećava vjerojatnost ulaska u odjeljke u kojima se nalaze prazne molekule L^d.

4.7.2.3. Čimbenici koji mijenjaju obrazac ELRC

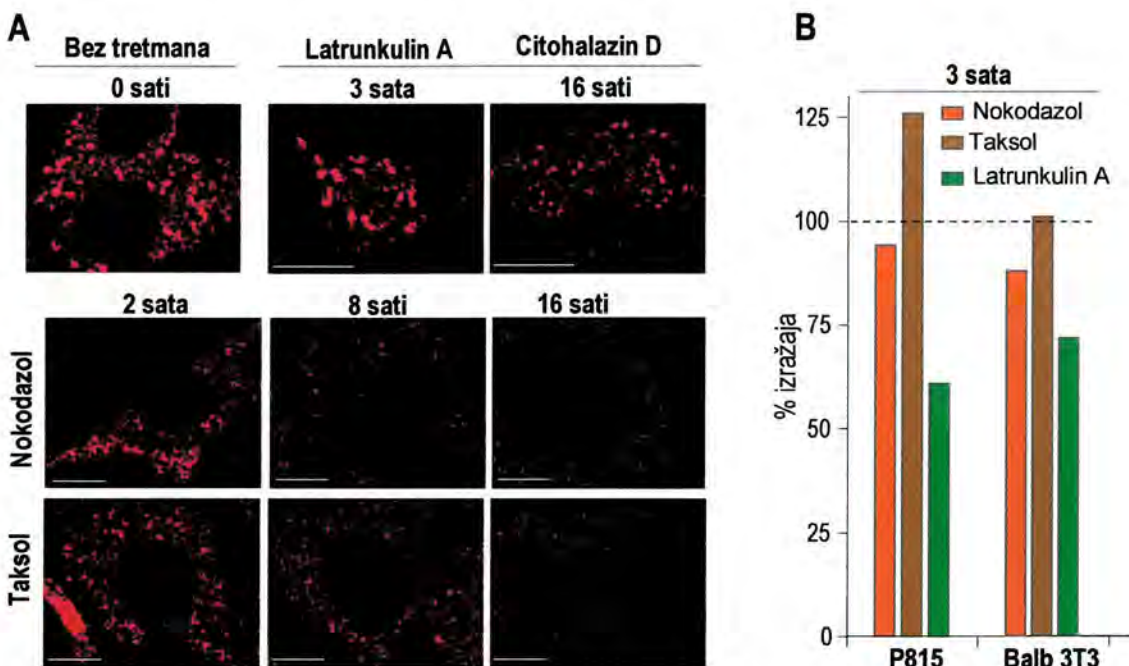
U prethodnim odjeljcima pokušali smo rasvijetliti porijeklo molekula koje dolaze u ELRC, te njegov smještaj u endocitoznoj mreži i odnos prema ostalim vezikulama. Obzirom da smo još na početku ustanovili da obrazac ELRC nije prisutan u svim stanicama (varira u prosjeku od 25-50%; slika 25), a i da jedna stanica može imati više vrsta vezikula, na kraju smo pokušali definirati što uzrokuje njegovu pojavu, odnosno dovodi do njegovog uklanjanja.

4.7.2.3.1. Učinak citoskeleta na ELRC obrazac

Uzimajući u obzir povezanost ELRC sa citoskeletom (odjeljak 4.4.), detaljnije smo ispitali kako dezintegracija aktina i tubulina utječe na njega.

Stoga smo u svrhu ispitivanja značaja **mikrotubula** za održavanje normalnog oblika i ekspresije ELRC stanice Balb 3T3 različito vrijeme inkubirali u nazočnosti *nokodazola* (depolimerizacija mikrotubula), odnosno *taksola* (imobilizacija mikrotubula), te prazne molekule L^d vizualizirali konfokalnom mikroskopijom. Oba inhibitora su već nakon 2 sata uzrokovala pražnjenje i skvrčavanje ELRC vezikula, što je nakon 8 sati dovelo do značajnog smanjenja i konačnog gubitka tih odjeljaka u većini stanica tretiranih nokodazolom. Gubitak i pražnjenje vezikula

u stanicama izloženima djelovanju taksola se odvijao nešto sporijom kinetikom, ali nakon 16 sati je također uočeno odsustvo ELRC u većini stanica (slika 101a). Suprotno tome, depolimerizacija *aktina* djelovanjem *latrunkulina A*, odnosno *citohalazina D* je uzrokovala skvrčavanje stanica, ali ne i gubitak ELRC. Iako su vezikule nešto promijenile oblik i smještaj, izgleda da je to bilo više posljedica djelovanja inhibitora na samu stanicu i gubitka čvrstoće. Ipak, nakon 16 sati vezikule su izgledale nešto manje, iako ni približno toliko kao nakon djelovanja taksola i nokodazola (slika 101a). Paradoksalno je da je na površini, prema rezultatima dobivenim protočnom citometrijom, na stanicama P815 i Balb 3T3 situacija bila obrnuta – nokodazol je uzrokovao samo blaže smanjenje površinske ekspresije praznih molekula L^d nakon 3 i 12 sati, a taksol ekspresiju nakon 3 sata povećavao ili održavao. Suprotno tome, LatA je već nakon 3 sata smanjio površinsku ekspresiju praznih molekula L^d na obje stanične linije (slika 101b). Nakon 12 sati situacija je bila slična (nije prikazano).

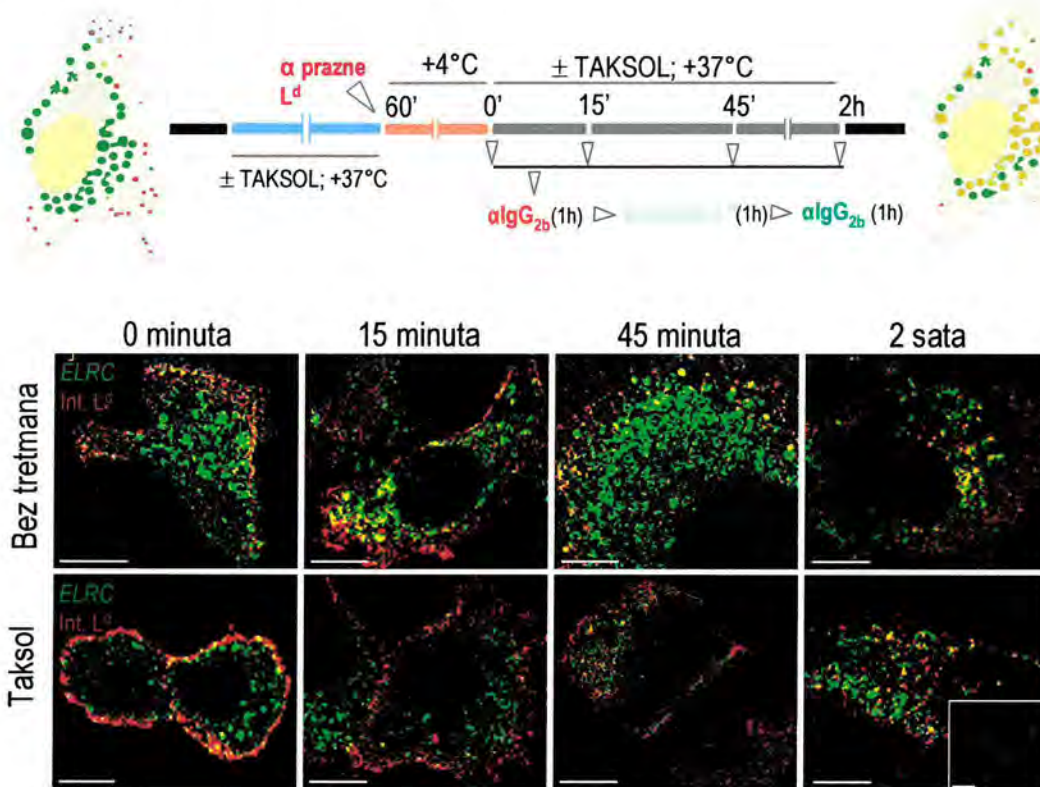


Slika 101. Učinak dezintegracije citoskeleta na ELRC. (A) Stanice Balb 3T3 su, navedeno vrijeme, inkubirane bez (\emptyset) ili u prisustvu inhibitora normalne integracije mikrotubula: nokodazol (4 μ M), citohalazin D (2,5 μ M), latrunkulin A (1 μ M) i taksol (30 μ M). Potom su u stanicama fluorescentno obilježene prazne molekule L^d. Mjerna crta = 10 μ m; z - 0.5 μ m. (B) Nakon djelovanja nokodazola, latrunkulina A i taksola u istim koncentracijama, nakon 3 i 12 sati određen je površinski izražaj MHC-I molekula protočnom citometrijom na stanicama P815 i Balb 3T3. Isprekidana linija predstavlja postotak izražaja netretiranih stanica. % izražaja – omjer MFI vrijednosti tretiranih i netretiranih stanica u ispitivanom vremenu. Prikazana je reprezentativna vrijednost 3-4 neovisna pokusa.

Ovi rezultati ukazuju da je mikrotubularna mreža važna za normalan dotok nekonformiranih molekula L^d. Stoga smo prema ranijem protokolu (slika 97) ispitali kako se odvija dotok internaliziranih nativnih nekonformiranih molekula u ELRC u uvjetima bez i nakon djelovanja *taksola*.

Balb 3T3 stanice smo 2 sata inkubirali sa ili bez nazočnosti taksola, stanice obilježili s mPt₆₄₋₃₋₇, te dopustili internalizaciju 15 i 45 minuta, odnosno 2 sata (slika 102). Fiksirane stanice su obilježene sekundarnim crveno

konjugiranim protutijelom (internalizirane molekule), nakon čega je slijedilo obilježavanje ELRCa, kako je već opisano (zelena fluorescencija). Iako se internalizacija u uvjetima bez djelovanja inhibitora normalno odvijala, te se već nakon 45 minuta znatan dio internaliziranih praznih molekula L^d nalazio u ELRCu, taksol je usporio endocitozu, te su se nakon 15 i 45 minuta površinske ne-internalizirane molekule još mogle vidjeti (ova pojava bi mogla objasniti povećan površinski izražaj praznih L^d uz djelovanje taksola). Nadalje, ELRC se znatno slabije vidio u tretiranim nego u kontrolnim stanicama, što je u skladu s prethodnim rezultatima, a to pražnjenje se najvjerojatnije dogodilo još tijekom pretretmana taksolom. Na kraju, iako se nakon 2 sata djelovanja taksola u većini stanica nisu uočavale internalizirane prazne L^d , kao niti ELRC, u nekim stanicama u kojima su vezikule bile vidljive kolokalizacija je bila znatno slabija nego u kontroli.



Slika 102. Učinak taksola na internalizaciju praznih molekula L^d u ELRC na stanicama Balb 3T3. Površinske prazne molekule L^d (nativne ili *misfolded*) obilježene su s mPt 64-3-7, internalizirane (\pm taksol 30 μ M) i obilježene crvenom fluorescentnom bojom (protu-mišji IgG_{2b} Alexa 555). Potom su istim mPt obilježene *steady state* nekoformirane molekule L^d , ali označene zelenom bojom (protu-mišji IgG_{2b} Alexa 488). Detaljnije objašnjenje u tekstu. Mjerna crta = 10 μ m. Debljina snimka (z) = 0,5 μ m.

Prema tome, možemo zaključiti da *mikrotubuli* imaju važnu ulogu u dotoku praznih molekula L^d u ELRC, te nakon narušavanja njihove normalne strukture dolazi do pražnjenja ovih odjeljaka. To je vjerojatno posljedica neravnoteže uslijed sprječavanja dotoka novih molekula, te gubljenja starih molekula u nekom procesu koji ne ovisi o mikrotubularnoj mreži i odvija se nama nepoznatim načinom. Naime, obzirom da se klasičan put degradacije preko kasnih endosoma i lizosoma odvija procesom koji znatno ovisi o mikrotubulima (243) moguće je da on nije uključen. Međutim, nije isključena mogućnost da molekule iz ELRCa mogu dospjeti do ovih

najkasnijih odjeljaka i nekim zaobilaznim načinom. Iako se neko vrijeme zadržavaju na površini, kasnije se ipak i sa nje uklanjaju, te je logično da se negdje degradiraju. S druge strane, depolimerizacija aktina dovodi do njihovog uklanjanja, alii najprije sa stanične površine, a tek onda iz ELRCa, no tek u kasnijim kinetikama i u znatno manjoj mjeri nego što je to uzrokovano nefunkcionalnošću mikrotubula (slika 101).

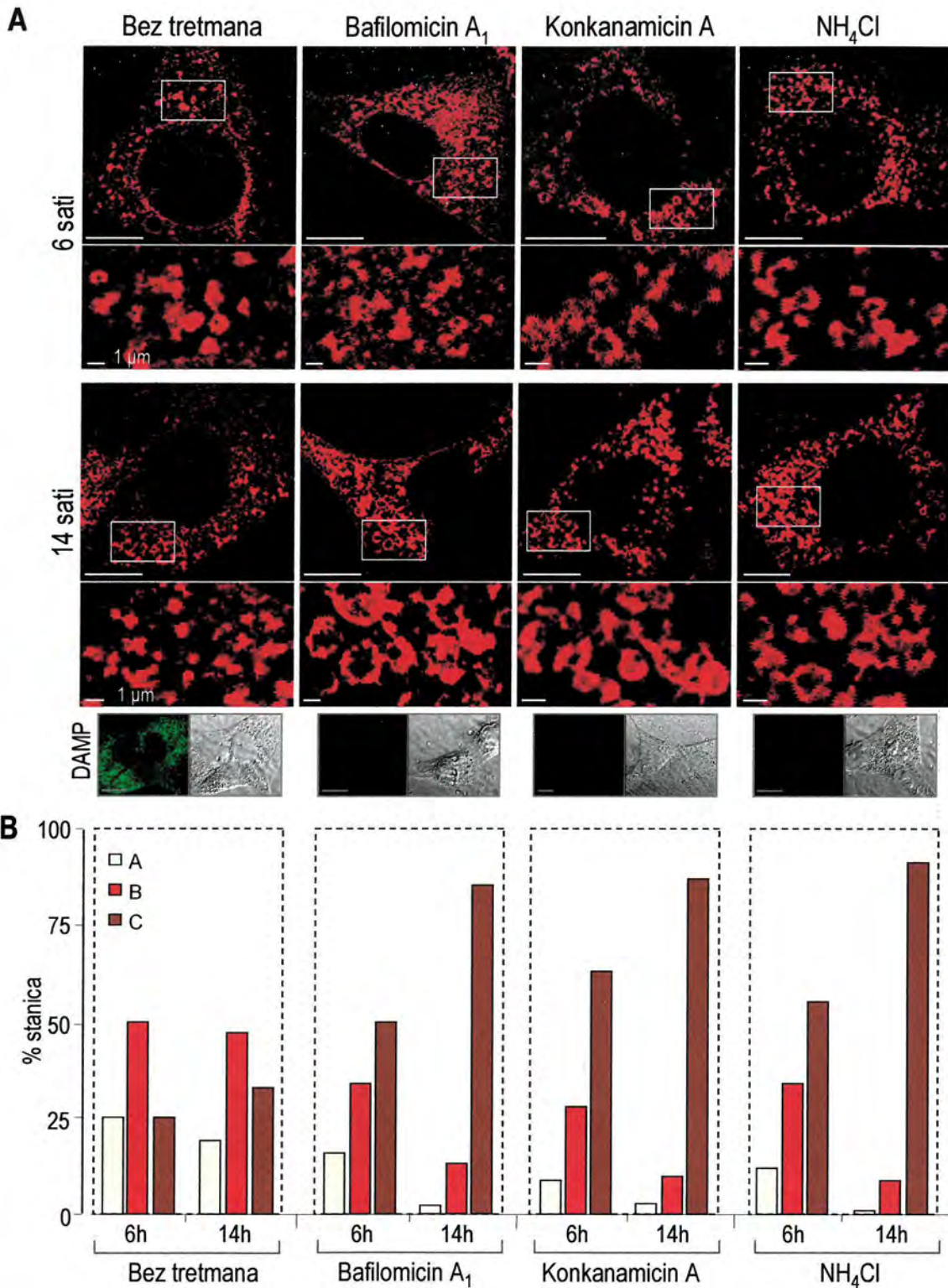
4.7.2.3.2. Učinak endosomalnog pH na ELRC obrazac

O učinku endosomalne alkalizacije već je bilo dosta govora što se tiče usmjeravanja molekula u određene odjeljke i promjeni konformacije. Ipak, obzirom da u ELRC vlada kiseli pH ($< 6,0$) (slika 98c), dalje smo istražili kako inhibitori endosomalne acidifikacije utječu na obrazac njegovog izražaja.

Već smo ranije pokazali da endosomalna alkalizacija uzrokuje izuzetno jako povećanje površinskog izražaja praznih molekula L^d na staničnoj površini, te njihovo uklanjanje iz odjeljaka sekretornog puta. Nakon što smo Balb 3T3 stanice izložili djelovanju BafA₁, ConA i NH₄Cl tijekom 6, odnosno 14 sati, stanice smo fiksirali, te pomoću mPt 64-3-7 vizualizirali ELRC (slika 103), te usporedili vezikule vrste C na netretiranim stanicama sa onima na stanicama na koje su djelovali inhibitori. Možemo uočiti da je nakon 6 sati djelomično, a nakon 14 sati izrazito došlo do povećanja ELRCa nakon djelovanja svih inhibitora. Naime, nakon 14 sati vezikule-vakuole su bile velike u prosjeku 2-3 μm (u kontroli $\geq 1\mu\text{m}$). U središnjem dijelu se uočavalo prosvjetljenje, što ukazuje da su molekule smještene s vanjske strane vezikule (što je bitno ako se radi o nekoj vrsti multivezikularnih tjelešaca). U nekom dijelovima vezikule su tako guste da se guraju i ponekad izgledaju difuzno (slika 103a).

Nadalje, također smo kvantificirali omjer vezikularnih obrazaca u tako tretiranim stanicama, te smo uočili da se nakon 6 sati broj vezikula vrste C povećava za oko 25-30% u usporedbi s kontrolom (u kontroli su u tom vremenu C vezikule bile zastupljene s 25%). Međutim, nakon 14 sati gotovo sve stanice ($\geq 90\%$) na koje je djelovao jedan od inhibitora su pretežno ili posve izražavale vezikule vrste C (slika 103b). Učinak inhibitora je potvrđen učinkom na DAMP koji se inače vizualizira samo u kiselim odjeljcima (slika 73a, donji panel).

Stoga zaključujemo da alkalizacija vezikula najvjerojatnije sprječava (ili usporava) izlazak praznih molekula L^d iz ELRCa (učinak ovih inhibitora na usporavanje procesa degradacije je ranije opisan (slika 94)), ne sprječavajući njihov dolazak u njih (obrnuto od učinka dezintegracije mikrotubula). Ipak, moguće je da se, uslijed preopterećenja ELRCa, te neučinkovite degradacije, jedan dio praznih molekula L^d usmjerio prema staničnoj površini, što bi objasnilo povećanje njihovog površinskog izražaja (slika 84). Kako prazne molekule L^d i dalje nastaju ostaje pitanje, obzirom da smo ranije prikazali da se uslijed inhibicije zakiseljavanja uklanjaju iz sekretornih odjeljaka (slika 96), jer je alternativan način nastanka uslijed dezintegracije punih molekula L^d bio onemogućen, barem načinom koji zahtijeva kiseli endosomalni pH.

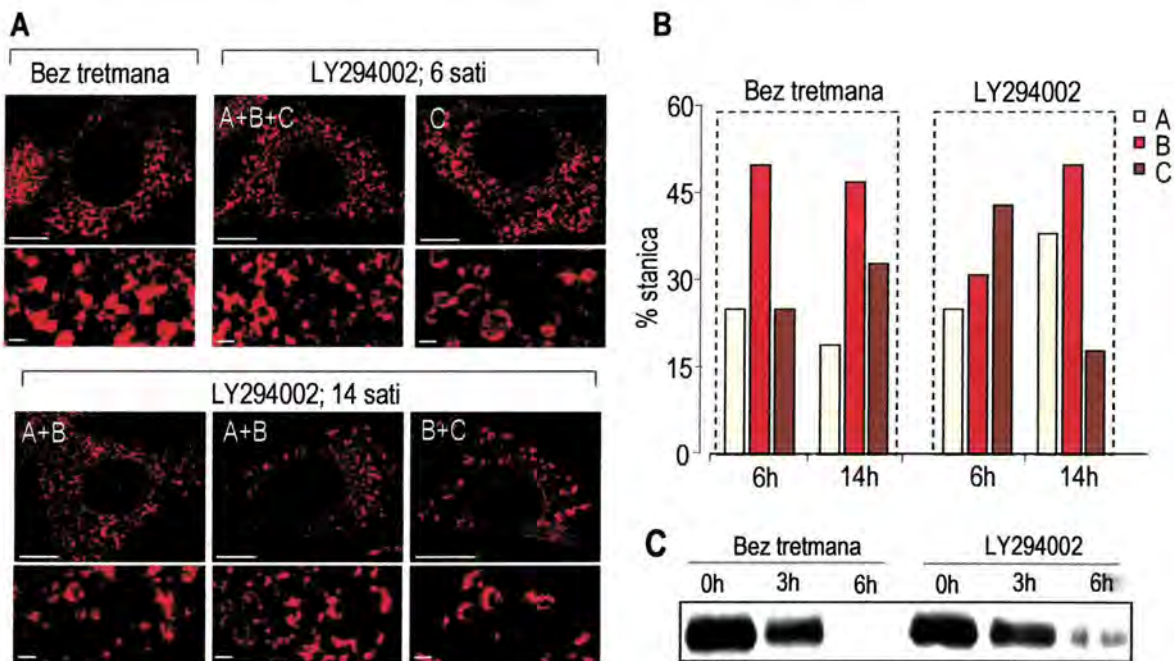


Slika 103. Učinak inhibitora endosomalnog zakiseljavanja na obrazac izražaja ELRC. (A) Stanice Balb 3T3 su tretirane bafilomicinom A₁ (200 nM), konkanamicinom A (50 nM) ili NH₄Cl (15 mM). Nakon navedenog vremena vizualizirane su prazne molekule L^d i analizirane konfokalnom mikroskopijom. Obilježavanje stanica s DAMP kod istog tretmana korišteno je kao kontrola. Mjerna crta – 10 (1 μm); z - 0.5 μm. (B) Na istim stanicama kvantificirana je zastupljenost određenog vezikularnog obrasca (analizirano > 100 stanica).

Zanimljivo je da je umjetna acidifikacija endosomalnih odjeljaka izlaganjem stanica zakiseljenom mediju tijekom 30 minuta (sa ili bez monenzina za koji je pokazano da pH endosomalnih odjeljaka izjednačava s izvanstaničnim pH (238)) od pH 6,0 samo umjereno povećala zastupljenost stanica sa C obrascem vezikula (za 20-30%). Međutim, dodatno kiseliji pH (5,0 i 4,5) je uzrokovao umjereno smanjenje izraženosti obrasca C, a povećanje obrasca A (nije prikazano).

4.7.2.3.3. Učinak PI(3)- kinaze na ELRC obrazac

PI(3)- kinaza ima važnu ulogu u regulaciji vezivanja raznih adaptorskih proteina koji igraju bitnu ulogu u heterotipskoj i homotipskoj fuziji endosomalnih vezikula (EEA1, Rabaptin i drugi). Stoga inhibicija ove skupine enzima uzrokuje usporavanje ili onemogućavanje prijenosa proteina na različitim točkama endosomalnog puta. Međutim, iako se kod nekih proteina inhibicija događa već na razini ranih endosoma, kod drugih se onemogućuje njihova degradacija (63, 90). Stoga smo u našim stanicama ispitali kako ovaj inhibitor djeluje na već poznat put TfR i usporedili ga s učinkom na prazne molekule L^d i ELRC. Kao inhibitor smo koristili LY294002, specifičan i manje toksičan inhibitor PI(3)K od vortmanina, inhibitora koji se također koristi.



Slika 104. Učinak inhibicije PI(3)- kinaze na izražaj ELRC i praznih molekula L^d. (A) Stanice Balb 3T3 su tretirane LY294002 (50 μ M), te su nakon navedenog vremena vizualizirane prazne molekule L^d i analizirane konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta = 10 μ m; z - 0.5 μ m. (B) Na istim stanicama kvantificirana je zastupljenost određenog vezikularnog obrasca (analizirano > 100 stanica). (C) Stanice P815 su površinski biotinilirane, te potom inkubirane u svježem mediju fiziološkog pH bez inhibitora, ili uz LY294002 (50 μ M). Stanice su nakon naznačenog vremena razorene u puferu s 1% NP40, te su imunoprecipitirane prazne molekule L^d. Molekule su razdvojene SDS-PAGE elektroforezom, blotirane, te vizualizirane pomoću SA-POD i kemiluminiscencije.

Nakon 6 sati djelovanja ovog inhibitora na stanicama Balb 3T3 možemo uočiti da se ELRC još uvijek mogao vidjeti u obliku sjajnih vezikula, koje međutim izgledaju kao da su se počele smanjivati, i često su eliptičnog oblika. Izuzetno je bilo puno stanica *obrasca B* za koje izgleda da su možda ranije bile C – imaju centralno prosvjetljenje, eliptične su i/ili «zgužvanije». Velik broj stanica je izražavao i vezikule miješanih obrazaca (slika 104). Međutim, vezikule C su ipak uočene zastupljene u većem broju stanica nego u kontroli (za oko 20%), a njihove vezikule su tada također bile veće od onih kontrolnih. Ovakav izgled vezikula se opisuje u literaturi i povezuje se s inhibicijom stvaranja luminalnih vezikula u MVB (90). Nadalje, velik dio vezikula *obrasca A* izgleda kao da se relativno naglo ispraznio (oko $\frac{3}{4}$). Suprotno rezultatu nakon 6 sati, nakon 14h broj vezikula C se smanjio, te mu je vrijednost za oko 10% bila manja od kontrolne vrijednosti, dok se broj vezikula tipa A i A+B povećao na ukupno oko 50%. Stanice koje imaju miješane vezikule su ponovo bile vrlo česte, a nerijetko su uočene i one s sva tri tipa vezikula (u računanju su pridružene obrascu prema većini prisutnih vezikula - uglavnom B ili A). U takvim stanicama veće vezikule su često smještene perifernije, a manje centralnije (slika 104 a i b).

Stoga zaključujemo da dinamika punjenja i pražnjenja ELRC znatno ovisi o PI(3)K. Međutim, za razliku od drugih inhibitora koji djeluju uglavnom tako da potiču njegovo punjenje (inhibitori endosomalne acidifikacije), odnosno tako da isključivo dovode do njegovog pražnjenja (tvari koji dovode do narušavanja integriteta staničnih mikrotubula), normalan PI(3)-kinazni put je bitan za održavanje ravnoteže kinetike punjenja i pražnjenja ovih vezikula, što nam ukazuje na složenost ovog procesa. Vjerojatno stoga nakon inhibicije ovog puta dolazi najprije do njihove ekspanzije, a potom smanjivanja i nestanka.

5. RASPRAVA

U ovom smo radu uspostavili model za izučavanje sortiranja i smještaja staničnih glikoproteina u membranske mikrodomene, s posebnim naglaskom na ispitivanje značaja konformacije molekule u tom procesu. Nastavljajući se na tu problematiku, istražili smo endocitozni put internaliziranih molekula, te ustanovili da lokalizacija površinskih makromolekula na staničnoj membrani igra važnu ulogu u njezinoj unutarstaničnoj sudbini. Ovo je osobito bitno kod MHC-I molekula kojima konformacija igra ključnu ulogu u njihovom usmjeravanju kroz većinu, ako ne i kroz sve dionice sekretornog i endocitoznog staničnog puta, počevši od samog nastanka, pa do konačnog uklanjanja.

5.1. SMJEŠTAJ POVRŠINSKIH KONFORMIRANIH I NEKONFORMIRANIH MAKROMOLEKULA U MEMBRANSKIM MIKRODOMENAMA

Membranske molekule nisu nasumično raspoređene po staničnim membranama, već se nalaze u različitim **membranskim mikrodomenama**, kako na samoj površini, tako i u njezinoj unutrašnjosti. Iako su neke domene bolje razjašnjene, primjerice klatrinske jamice ili lipidne splavi (2, 3), ne smiju se zanemariti i brojne druge koje se tako često ne spominju, ili još nisu niti otkrivene, a za čiju karakterizaciju trebaju znatno sofisticiranije i preciznije biofizičke metode.

Obzirom na osnovnu građu svake stanične membrane, bez obzira na njezin smještaj u stanici, vrlo važnu ulogu u usmjeravanju i zadržavanju proteina (ali i ostalih molekula) u njezinim dijelovima sigurno će imati međudjelovanja između samih lipidnih molekula, koja time određuju stupanj uredenosti dvosloja, ali i stupanj jačine privlačenja ili odbijanja između određene membranske makromolekule i lipida. Stoga se ovdje radi o jednom vrlo dinamičnom procesu prema kojem su molekule slobodne napustiti domenu ili ponovo ući u nju. Međutim, važno je napomenuti da je ta sloboda ograničena biofizičkim zakonitostima koja su posljedica građe ili konformacije molekule s jedne strane, odnosno posttranslacijske modifikacije ili vezivanja s nekom drugom molekulom koja ima dominantan utjecaj na membransku lokalizaciju, s druge strane. U skladu s tim, GPI-sidreni proteini su, upravo uslijed prisustva GPI sidra, stalno prisutni u lipidnim splavima (4, 13), jednako kao i kaveolin, na čiju lokalizaciju utječe prvenstveno njegova sklonost povezivanja s kolesterolom, ali i acilacija (13). S druge strane, TfR je molekula koja se koristi kao biljeg klatrinskih jamica (28, 31, 32). Neke druge molekule više podliježu reverzibilnom procesu S- ili N-palmitilacije, kada se posljedično premještaju u lipidne splavi - primjerice kinaze kao što su Lck, Fyn i Lyn, a koje igraju vrlo važnu ulogu u imunološkom odgovoru (245). Nadalje, visokoafinitetni IgE receptor (FcεRI), T stanični receptor (TCR), te B stanični receptor (BCR) se premještaju u lipidne splavi nakon unakrsnog vezivanja (16).

Jedan od faktora koji bi mogao imati značajnu ulogu u usmjeravanju molekula u određenu mikrodomenu je **konformacija molekule**. Općenito se smatra da aktivnu ulogu u stanici imaju samo konformirane molekule, a da nekonformirane predstavljaju privremeno prijelazno stanje koje se izražava samo tijekom sinteze, odnosno

tijekom degradacije, a koje se stoga, u pravilu, nalazi samo u sintetskim (ER ako se radi o membranskim proteinima), odnosno degradacijskim (lizosomi, proteasomi) odjeljcima. Kako bi se zaštitila od ovakvih, najčešće nefunkcionalnih proteina, stanica je iznašla nekoliko načina kako bi spriječila njihov izražaj u ostalim organelama. Jedan od najvažnijih mehanizama djeluje već na samom početku sinteze, a radi se o kontroli izlaska samo konformiranih molekula iz ER. Ovaj proces je vrlo bitan u sintezi MHC-I molekula i trebao bi osigurati prelazak samo stabilnih trimolekularnih kompleksa u GA. Suprotno tome, nepotpuno sklopljeni kompleksi se translokacijom prenose u citoplazmu i degradiraju na proteasomima (153). Sličnoj kontroli podliježu i ostali membranski proteini. Međutim, konformacijski nestabilne proteine moguće je naći i na PM, primjerice prazne MHC-I molekule, mutirane oblike proteina CFTR (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), α_2 -receptor, receptor faktora α , TfR, te HA (hemaglutinin) protein virusa gripe (246, 247, 248, 249, 250). Zanimljivo je da, iako su poznati brojni sortirajući signali koji reguliraju kako konstitutivnu, tako i ligandom-potaknutu nishodnu regulaciju konformiranih proteina sa stanične membrane (31, 33), izuzetno se malo zna o molekularnoj aparaturi koja sprječava nakupljanja nepravilno svijenih (*misfolded*) proteina (251). Jedan od načina bi upravo mogao biti preko sortiranja u određene membranske mikrodomene. Tako je pokazano je da se nepravilno svijeni (*misfolded*) prionski protein (*PrP^c*), čija je promjena konformacije uzrokovana na staničnoj membrani djelovanjem *suramina* (polisulfoniranog derivata naftilureje) ili povećanih koncentracija bakra, usmjeravaju u detergent otporne membrane (DRM), odnosno lipidne splavi, za razliku od konformiranog oblika. (252). Ovaj proces ima kasnije i ulogu u kinetici endocitoze i poluživota navedene molekule.

U našim istraživanjima smo pratili utjecaj konformacije na smještaj i usmjeravanje ispitivane molekule na mišjim staničnim linijama (tablica 3) - fibroblastima Balb 3T3 i L-L^d (fibroblasti haplotipa H2^k transficirani tako da izražavaju i molekule L^d), te stanicama P815 (staničnoj liniji mastocitoma). Praćena su dva osnovna konformacijska stanja MHC-I molekula; stabilni konformirani trimolekularni kompleksi (pune molekule K^d, D^d i L^d), i nekonformirane molekule koje se normalno, više ili manje, mogu izražavati na površini ispitivanih stanica (prazne molekule L^d). Za razlikovanje konformacija i alela poslužila su nam dobro karakterizirana monoklonska protutijela (tablica 2). Pri tome smo za konformirane molekule K^d koristili monoklonsko protutijelo MA-215 (229), za konformirane molekule D^d protutijelo 34-5-8S (230), a za konformirane molekule L^d mPt 30-5-7 koje prepoznaje α_2 domenu teškoga lanca u konformaciji kada je za teški lanac vezan peptid (231). Za prepoznavanje nekonformiranih molekula L^d korišteno je mPt 64-3-7 koje također prepoznaje α_1 domenu teškog lanca (slika 25), ali samo u slučaju kada je molekula prazna (bez peptida/ β_2 -mikroglobulina) ili nije konformirana (170). *Nekonformirane molekule* smo nadalje podijelili u dvije skupine: na one koje se normalno izražavaju u stanici, te smo ih nazvali *native*, i na one čiji smo nastanak umjetno izazvali na staničnoj površini kratkim izlaganjem stanica kiselom pH (pH=2,0, 30 sekundi) - protokolom koji dovodi do dezintegracije trimolekularnog kompleksa MHC-I molekula i stvaranja nepravilno svijenih molekula (slika 19) a koje smo, radi razlikovanja od nativnih, prozvali prema engleskom izrazu *misfolded*. One se također mogu pratiti protutijelima koje prepoznaju nekonformirane molekule (tablica 2, odjeljak 3.3.2.3). Tako je za prepoznavanje *misfolded* molekula L^d ponovo korišteno mPt 64-3-7, a za prepoznavanje *misfolded* molekula D^d mPt 34-2-12S koje prepoznaje α_3 domenu

teškog lanca molekula D^d (230), odnosno njegov konformirani i nekonformirani oblik (slike 27 i 28). U konačnici, ispitivali smo i *misfolded* TfR. Iako protutijelo koje prepoznaje nativnu konformaciju (mPt R17), djelomično prepoznaje i konformaciju koja nastaje nakon kratkotrajnog zakiseljavanja, ne možemo sa sigurnošću tvrditi da se radi o nepravilno svijenima (*misfolded*) molekulama (nakon zakiseljavanja postotak početnog izražaja je 60%, nije prikazano). Ipak, za očekivati je da izlaganje niskom pH od 2,0 dovodi do promjene konformacije, koja bi nadalje možda uzrokovala i drugačije usmjeravanje molekula u endocitoznom putu. Ipak, rezultate s *misfolded* TfR treba promatrati samo u sklopu onih koje smo dobili s protu-MHC-I, tj. bolje definiranim protutijelima, a ne kao pravilo.

Radi slabog izražaja MHC-I molekula (a posebice nekonformiranih molekula L^d) na fibroblastima Balb 3T3, stanice su prije pokusa stimulirane 48-72h s IFN γ . Da ovaj tretman ne utječe na konačni rezultat, pokazali smo uspoređujući obrazac izražaja MHC-I molekula na IFN γ -stimuliranim i -nestimuliranim stanicama P815 (slika 26), odnosno uspoređujući kinetiku poluživota površinski biotiniziranih molekula na fibroblastima B12 (slika 91c), te ustanovili da nema razlike. Nadalje, u literaturi je pokazano da pojačana ekspresija MHC-I molekula (20-50x, što je slično povećanju i nakon stimulacije s IFN γ) dovodi do toga da se samo 20% ukupnih molekula izražava na staničnoj površini, uslijed kontrolnih mehanizama koji djeluju negdje tek nakon njihova prolaska kroz GA, ali im poluživot sličan onome koji se nalazi kod normalno ekspimiranih MHC-I molekula (173, 253, 254).

U našim istraživanjima smo pokazali da se konformirane i nekonformirane MHC-I molekule nalaze u različitim domenama, koje se mogu dobro razlikovati na staničnoj membrani (slika 30). Tako se međusobno kolokaliziraju konformirane molekule K^d i D^d, odnosno K^d i L^d (konformirane molekule D^d i L^d nismo mogli međusobno kolokalizirati jer su mPt istog izotipa – IgG_{2a}). Nadalje, kolokalizacija je također uočena između nepravilno svijenih (*misfolded*) molekula L^d i D^d, ali ne i između nativnih konformiranih molekula D^d i nekonformiranih molekula L^d. Kao što smo objasnili, *misfolded* konformacija izazvana je na staničnoj površini kratkotrajnim zakiseljavanjem (pH 2,0; 20-30 sek., slika 19). Bitno je da se niti jedna konformacija MHC-I molekula na staničnoj površini ne kolokalizira s TfR. Nadalje, konformirane molekule se ne kolokaliziraju niti s GM₁ (markerom jedne vrste lipidnih splavi), a nekonformirane (i nativne i *misfolded*) samo djelomično (slika 31). Kao što je i očekivano TfR i GM₁ se ne kolokaliziraju, a samo nešto malo veći stupanj kolokalizacije zamijećen je između GM₁ i *misfolded* TfR (slika 31). Prema tome, zaključili smo da se **konformirane i nekonformirane MHC-I molekule već na staničnoj površini odjeljuju u zasebne membranske mikrodomene**. Ovi rezultati ukazuju da domene obiju konformacija MHC-I molekula najvjerojatnije isključuju klatrinske jamice, ali da postoji mogućnost da se nekonformirane molekule nalaze u lipidnim splavima.

Da je to doista i tako, pokazali smo primjenom metode ispiranja membranskih makromolekula pomoću *neionskih detergenata*. Naime, kao što je ranije objašnjeno, organizirane lipidne domene (lipidne splavi) su uslijed jakih lipid-lipidnih međudjelovanja u čvrsto pakiranim uređenim domenama mnogo otpornijim na otapanje u neionskim detergentima, u usporedbi sa slabo povezanim L_d domenama u kojima se lipid-lipidna međudjelovanja zamjenjuju onima između lipida i detergenta (4). Međutim, važno je napomenuti da otpornost proteina na djelovanje jednog detergenta ne mora značiti da će on biti otporan i na djelovanje drugog detergenta (13, 23). Stoga bi bilo pravilnije govoriti o TX-100 splavima, Brij 96 (Brij 98) splavima, Lubrol WX splavima itd.

Treba naglasiti i probleme koji nastaju kao posljedica korištenja detergenata. Naime, osnovni nedostatak korištenja ove metode leži u samoj primjeni detergenta. Prema tome, osim što detergent može narušiti strukturu dvosloja, TX-100 može otopiti i DRM ako se ne koriste niske temperature (4°C), koje, s druge strane, mogu posljedično stabilizirati L_d domene i dati lažno pozitivne rezultate. Također, primjena malih koncentracija može uzrokovati stvaranje L_o domena, a prevelika koncentracija detergenta otopit će i dio L_o domena, te dati lažno negativne rezultate (4). Prema tome, splavi su u detergentima netopive samo u odnosu na ne-splavi, a različiti proteini u lipidnim splavima mogu pokazivati različiti stupanj topivosti u detergentima (25). Stoga je bitno ustaliti protokol prema koncentraciji i vremenu tretmana detergentom kojim će se potvrditi da će molekule za koje se zna da se ne nalaze u lipidnim splavima isprati iz njih (npr. TfR, Na⁺/K⁺ ATPaza), odnosno da molekule koje se nalaze u njima ostaju integrirane u staničnoj membrani (npr. GM₁, Gb3) (25). Nadalje, rezultate s TX-100 je dobro usporediti i s onima koji su dobiveni nakon tretmana ostalim detergenatima. U našim eksperimentima TfR je korišten kao kontrolna molekula koja se uklanja iz lipidnih splavi (70), a CTxB (molekula koja se vezuje za GM₁) kao pozitivna kontrola jer ostaje vezana u lipidnim splavima (39). Prema izgledu stanica i dobivenim rezultatima metodom konfokalne mikroskopije ustanovili smo da je najbolje koristiti 0,5% TX-100 tijekom 30-45 sekundi (tablica 4). Ipak, iako otpornost na TX-100 najčešće podrazumijeva da se radi o lipidnim splavima, a i u ovom radu najčešće koristi taj naziv, treba imati na umu da se može raditi i o dva različita pojma.

Prema rezultatima dobivenim s TX-100, ustanovili smo da se **nekonformirane molekule nalaze u DRM, dok se konformirane molekule nalaze u DSM, kako na staničnoj površini, tako i u njezinoj unutrašnjosti** (slike 32 i 33). Iako postoji mogućnost unakrsnog povezivanje molekula zbog vezivanja mPt, što može uzrokovati premještanje molekula u DRM (npr. TCR, 23), mi smo dobili jednak rezultat i nakon obilježavanja površinskih molekula mPt (slika 33), kao i prilikom detekcije ukupnih molekula kod kojih je detergent dodan prije fiksacije stanica (slika 32). Kako bismo uklonili mogućnost da je TX-100 uzrokovao dezintegraciju MHC-I molekule ili odljepljivanje vezanog protutijela, a ne njegovo uklanjanje sa stanične membrane, testirali smo njegovo djelovanje na imunoprecipitaciju molekula u staničnom lizatu, te pokazali da se u njemu na 4°C normalno imunoprecipitiraju konformirane MHC-I molekule. To znači da sam detergent ne narušava strukturu trimolekularnog kompleksa, niti ometa vezivanje protutijela (nije prikazano).

Potom, kako bismo dodatno potvrdili da se nekonformirane molekule L^d (nativne i *misfolded*) odista nalaze u lipidnim splavima (DRM), koristili smo i ostale detergente u testiranim koncentracijama i vremenu djelovanja, a ravnajući se prvenstveno prema njihovom učinku na TfR i GM₁ (slika 34 i tablica 5). Kao i što je navedeno u literaturi, najjači učinak je imao TX-100 (23). U procjeni rezultata problem je ipak predstavljao slab površinski izražaj nativnih praznih molekula L^d u kontrolnim uzorcima. No, jasno je uočljivo da se, za razliku od TfR, *misfolded* molekule L^d ne uklanjaju nakon djelovanja ovog detergenta, jednako kao niti GM₁. TfR, koji je u nekim slučajevima vidljiv u «vezikulama» ispod PM, bi mogao predstavljati nespecifičnu nakupinu kao posljedicu djelovanja detergenta i narušavanja strukture stanične membrane. Rezultati dobiveni s umjereno jakim detergentom Brij 96, isto tako, upućuju na smještaj nekonformiranih molekula L^d u lipidnim splavima. Kao slab detergent, Tween 20 nije imao znatnijeg učinka niti na niti jednu od ispitivanih molekula, a CHAPS, koji kao i Brij

96 pripada umjereno jakima, dosta je narušio strukturu stanice. Ipak, sumarni rezultati s neionskim detergentima ukazuju da se *nekonformirane molekule L^d nalaze u lipidnim splavima* (slika 10 i tablica 5), da se *TfR i nekonformirane molekule L^d nalaze u različitim domenama na staničnoj membrani*, te da se *MHC-I molekule na staničnoj površini separiraju u zasebne mikrodomene prema svojoj konformaciji, a ne prema alelu*. Zanimljivo je da se nekonformirane molekule slabo ili uopće ne kolokaliziraju na membranama stanice (kako na PM, tako i u unutarstaničnim odjeljcima), iako su oboje smješteni u DRM (slike 31, 45b i 58). Međutim, kako smo ranije opisali, u stanici se može razlikovati više vrsta lipidnih splavi (4, 13, 23).

Na kraju, utvrdili smo da ***MHC-I molekule nisu imobilne u lipidnim splavima, već se premještaju iz jedne domene u drugu ovisno o konformaciji***. Tako smo pokazali da promjena konformacije iz stabilne u nestabilnu (uzrokovane *misfoldinga* kratkotrajnim zakiseljavanjem) uzrokuje premještanje molekula iz DSM (onih koje su ranije bile konformirane) u DRM (gdje se inače smještaju nekonformirane molekule), što se nakon 10-15 minuta može vizualizirati konfokalnom mikroskopijom (slike 35, 36 i 37).

5.2. ENDOCITOZA I ENDOCITOZNI PUT MEMBRANSKIH MAKROMOLEKULA

Obzirom da smještaj u određenoj membranskoj mikrodomeni može imati značajnog utjecaja na način endocitoze neke molekule, sljedeći korak bio je ispitivanje načina na koji MHC-I molekule, kako konformirane, tako i nekonformirane (nativne i *misfolded*), ulaze u stanicu. Koristeći inhibitore endocitoze (filipin, m- β -CD, klorpromazin) u više metoda (protočna citometrija, konfokalna mikroskopija i imunoprecipitacija nakon površinske biotilacije) i na dvije neovisne stanične linije (neadherentna stanična linija mastocitoma P815 i adherentni fibroblasti Balb 3T3), ustanovili smo da nekonformirane molekule ulaze u stanicu na način ovisan o kolesterolu, što ukazuje na mehanizam endocitoze ovisne o lipidnim splavima. Suprotno tome, ulazak konformiranih MHC-I molekula nije zakočio niti jedan od primijenjenih inhibitora (slike 40, 41 i 42), pa smo pretpostavili da radi o masovnom putu ulaženja (engl. *bulk pathway*). Ovakav način ulaženja konformiranih MHC-I molekula u stanicu (neovisan u klatrinu, lipidnim splavima i dinaminu) opisan je u literaturi na humanoj staničnoj liniji HeLa (52, 53), no u tom radu nisu korištena protutijela koja specifično prepoznaju pojedine alele, već mPt W6/32 koje prepoznaje nativne konformirane molekule HLA-A i HLA-B. Nadalje, isti autori navode da se MHC-I molekule ne nalaze u lipidnim splavima (ne ispiru se djelovanjem TX-100), što su ustanovili metodom konfokalne mikroskopije, ali tvrde da je ulazak MHC-I molekula ipak ovisan o kolesterolu. Naime, pokazuju da je filipin zakočio endocitozu ovih konformiranih MHC-I molekula, te da ih je nakon 20 minuta internalizirano 60% početne vrijednosti (kontinuiran protokol internalizacije nakon površinskog vezivanja mPt). Valja istaknuti da kontrolna molekula CD59 (GPI-sidreni protein koji se nalazi u lipidnim splavima) pokazuje 40%, a TfR (molekula koja je isključena iz lipidnih splavi) 110% vrijednosti internalizacije dobivene u kontrolnim uzorcima. Stoga zaključuju da MHC-I molekule i CD59, iako se nalaze u različitim mikrodomenama na staničnoj površini, u stanicu ulaze jednakim mehanizmom. Iako se to može zaključiti, treba imati na umu da je samo metodom konfokalne mikroskopije teško u potpunosti kvantificirati ulazak nekog proteina. Naime, radi se o relativno kraćim kinetikama (20-60min), te se može govoriti samo u uspoređenju endocitoznog procesa, ali ne i o njegovoj potpunoj blokadi. Naime, i u našim

rezultatima se može uočiti da je signal internaliziranih molekula D^d nakon djelovanja filipina nešto slabiji u usporedbi s kontrolnim uzorkom (slika 41b). Međutim, ako se prati ukupna populacija stanica tijekom dulje kinetike (8h), možemo ustanoviti da filipin u tom slučaju znatnije ne inhibira njihovo uklanjanje sa stanične površine, neovisno o tome da li se radi o praćenju površinskog izražaja nakon djelovanja CHX (slika 40a) ili nakon površinskog vezivanja mPt (u ovom slučaju 34-5-8s za pune molekule D^d , slika 41a). Ipak, djelomično povećanje izražaja nakon djelovanja filipina se ne treba zanemariti, no valja istaknuti da je ono veće u kraćoj kinetici (npr. 4 sata) i potpuno izostaje nakon duljih kinetika (12-24 sati). Za razliku od njih, konformirane molekule K^d ne pokazuju čak niti takva odstupanja, pa kod njih filipin nije imao nikakvog utjecaja, neovisno o metodi (protočna citometrija ili konfokalna mikroskopija) i o kinetici praćenja (slike 40 i 41). Suprotno tome, endocitoza nekonformiranih molekula L^d (nativnih i *misfolded*) kontinuirano i neovisno o pristupu i kinetici je zakočena djelovanjem filipina (slike 40, 41 i 42). Nadalje, i endocitoza *misfolded* molekula D^d je djelomično zakočena djelovanjem filipina (slika 42). Izostanak potpunog učinka se može objasniti činjenicom da je u nedostatku mPt koje prepoznaje isključivo nekonformirane molekule D^d korišteno mPt koje prepoznaje i konformirane i nekonformirane molekule D^d , te da i nakon umjetnog izazivanja nastanka nepravilne konformacije kratkotrajnim zakiseljavanjem, na staničnoj površini preostaje još 10-20% konformiranih molekula D^d (slika 28b), na koje filipin u pravilu ne djeluje. Nadalje, m- β -CD, tvar koja uklanja kolesterol iz membrana (235), je djelomično inhibirao ulazak *misfolded* molekula L^d dok nije imao utjecaja na ulazak *misfolded* molekula D^d (slika 42a).

Ipak, kada se radi s inhibitorima koji djeluju na uklanjanje kolesterola, treba biti na oprezu prilikom interpretacije rezultata. Naime, obzirom da je kolesterol važna komponenta stanične membrane, njegovim uklanjanjem mijenja se stanična morfologija i oštećuje aktinski citoskelet, što ima mnogostruke učinke u funkcioniranju same stanice (17). Prema tome, bilo da se radi o tvarima koji vezuju kolesterol (polieni antibiotici kao nistatin i filipin) ili o tvarima koje ga uklanjaju (metil- β -ciklodekstrini), možemo, osim željenog, očekivati i druge neželjene učinke. Tako m- β -CD uzrokuje promjene u lateralnoj mobilnosti lipida i proteina, te PI-(4,5) P_2 -ovisnoj organizaciji aktinskog citoskeleta (18), a kad se primjenjuju nekoliko sati, jednako kao i drugi ciklodekstrini, može djelovati na unutarne organele koje su povezane s membranskim transportom (7). Nadalje, m- β -CD može djelovati i na klatrinsku endocitozu i izazvati još nesigurnije rezultate (255). Za razliku od m- β -CD, pokazano je da filipin ne može reagirati s kolesterolom u klatrinskim obložnim jamicama (256), što ga čini idealnim sredstvom za razlikovanje ova dva puta, ali i dalje ozbiljnu smetnju predstavlja oštećenje stanične membrane izazvano njegovim vezivanjem kolesterola. Općenito, ako se u membrani nalaze L_o i L_d domene, za očekivati je da će količina lipidnih splavi ipak biti smanjena ako se kolesterol ukloni. Konačan rezultat ovisi o početnoj količini kolesterola i o stupnju njegova uklanjanja, no valja znati da je uklanjanje samo djelomično pod uvjetima koji održavaju staničnu vijabilnost (4).

Naši rezultati općenito pokazuju da **konformirane i nekonformirane molekule H-2^d koriste različite endocitozne putove**, jednako kao što se separiraju u različite membranske domene. **Konformirane MHC-I molekule koriste masovni put**, kao i HRP, molekula Tac (IL2R- α) i HLA-A i -B (51, 52, 53) **dok je endocitoza nekonformiranih H-2^d molekula ovisna o kolesterolu, i vjerojatno se odvija putem lipidnih splavi.**

Nekonformirane MHC-I molekule ne ulaze kaveolarnom endocitozom, što smo pokazali izostankom kolokalizacije ovih molekula s kaveolinom-1, bilo da su praćene *steady state* molekule (slika 44), bilo da su praćene molekule u protokolu kontinuirane internalizacije (slika 45). No, bez obzira na to, u ovom se slučaju odjeljivanje molekula u membranske mikrodomene odražava i na korištenje analognih načina endocitoze. Ipak, treba imati na umu da sama lokalizacija molekule u određenoj membranskoj mikrodomeni, ne određuje nužno i njezinu sudbinu. Tako se molekule koje se nalaze u klatrinskim jamicama mogu usmjeravati i u recikliranje (TfR) ali i u degradaciju (EGFR) (32, 56). S druge strane, jedna te ista molekula se može endocitirati i na više načina, prvenstveno ovisno o faktorima koji su taj proces potakli. Tako se unakrsno vezani GPI-sidreni proteini endocitiraju kaveolarno (106), a ako se na njih vežu monovalentni ligandi internaliziraju se na način ovisan o lipidnim splavima i Cdc42, te neovisan o klatrinu, kaveolinu, dinaminu i RhoA (107). Još su veća odstupanja kod kolera-toksina koji u stanicu može ulaziti i klatrinskim i kaveolarnim putem (9). Razlog ovakvom različitom usmjeravanju nije jasan, no, postoji mogućnost da leži upravo u tome što se splavi ne razlikuju samo po lipidnom, već i po proteinskom sastavu, što bi moglo uzrokovati stvaranje različitih domena unutar njih samih.

Da je ova *separacija konformiranih i nekonformiranih molekula vidljiva i unutar stanice*, može se uočiti već tijekom praćenja osnovnog obrasca njihovog unutarstaničnog izražaja metodom konfokalne mikroskopije. MHC-I molekule se na fibroblastima Balb 3T3 uočavaju ili kao difuzne strukture koje uglavnom nalikuju ER i GA, ili kao vezikularne (ili vezikulotubularne) tvorbe različitih veličina i oblika. Kako bismo ih mogli bolje proučavati podijelili smo ih u 3 osnovna obrasca, ravnajući se prvenstveno prema veličini vezikula (slika 25b):

1. Obrazac A – vezikule nisu prisutne ili su vrlo sitne (0-0,5 μM)
2. Obrazac B – vezikule srednje veličine (0,5-1 μM)
3. Obrazac C – velike vezikularne ili vezikulo-tubularne strukture koje dominiraju (>1 μM)

Konformirane molekule K^d i D^d se izražavaju u sva 3 osnovna obrasca, s time da je obrazac B najzastupljeniji. Međutim, nerijetko se mogu uočiti i vezikule obrasca C, a upravo je to obrazac koji najčešće dominira kada su u pitanju nekonformirane molekule L^d (slika 25c). Zanimljivo je da, iako se **vezikule svih obrazaca međusobno u potpunosti kolokaliziraju kada su u pitanju konformirane molekule K^d i D^d , znatno je slabiji stupanj kolokalizacije, ako ne i potpuno odsutan, kada se međusobno kolokaliziraju konformirane i nekonformirane MHC-I molekule** (slika 38). Ova je pojava najuočljivija upravo kod vezikula vrste C (Slika 38c), koje kod obje konformacije pokazuju da im je $\text{pH} < 6,0$, na što ukazuju rezultati kolokalizacije s DAMP (slika 47). Osim da se konformirane i nekonformirane MHC-I molekule nalaze u različitim vezikulama, postoji i mogućnost da se nalaze u različitim domenama jednog multivezikularnog kompleksa. Konformirane molekule L^d se ne izražavaju vezikularno, što je vjerojatno posljedica njihovog slabijeg izražaja u usporedbi s ostalim konformiranim MHC-I molekulama (slike 25a i 25b), ali veće dezintegracije u kiselim endosomalnim odjeljcima (odjeljak 4.5.4.1.). Još jedna bitna razlika u obrascima unutarstaničnog izražaja konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula je njihov smještaj u jukstanuklearnom dijelu. Naime, konformirane molekule se u tom području redovno nalaze a nekonformirane molekule su iz njega gotovo potpuno isključene (slike 25b i 105). Ovo jukstanuklearno područje

najvjerojatnije uključuje GA i reciklirajući odjeljak, ali vjerojatno i neke nedovoljno razjašnjene sortirajuće strukture.

Reprezentativan smještaj MHC-I molekula na stanicama Balb 3T3 prikazan je na slici 105, iako slično vrijedi i za ostale ispitivane stanične linije.

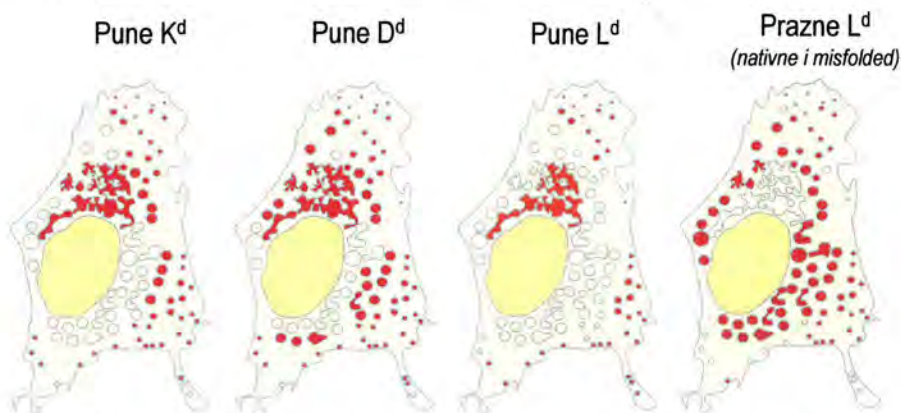


Slika 105. Unutarstanična lokalizacija konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula na stanicama Balb 3T3.

Prikazan je reprezentativan smještaj ispitivanih MHC-I alela i konformacijskih oblika. Detaljnije objašnjenje nalazi se u tekstu. Na primjeru molekula K^d zaokruženo je jukstanuklearno područje.

Ova lokalizacija MHC-I je dijelom posljedica njihova smještaja u sekretornom (sintetskom) putu, osobito kada su u pitanju konformirane molekule L^d . Na to ukazuju rezultati kolokalizacije s GM130 i Vti1a, markerima GA (slike 29b i c, 75), te kalretikulinom, proteinom ER (slika 29a). Međutim, ove *vezikule su ipak najvećim dijelom endocitoznog porijekla*. Na taj zaključak prvenstveno navode dvije činjenice;

1. Obrazac internaliziranih MHC-I molekula u mnogome nalikuje obrascu njihove lokalizacije u ustaljenom stanju (slike 48 i 106).



Slika 106. Lokalizacija internaliziranih konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula na stanicama Balb 3T3.

Prikazan je reprezentativan smještaj ispitivanih MHC-I alela i konformacijskih oblika. Detaljnije objašnjenje nalazi se u tekstu.

2. Znatna je kolokalizacija s markerima endocitoznih putova i odjeljaka. U tom slučaju, konformirane *steady state* molekule K^d i D^d pokazuju najveći stupanj kolokalizacije s TfR, prvenstveno u jukstanuklearnom

području (slika 45), te s Lamp1/2 perinuklearno (slika 46). Nekonformirane molekule L^d najviše kolokaliziraju s Lamp1/2 (slika 46), no, za razliku od konformiranih, ne kolokaliziraju se s TfR (slika 45). Naime, kao što je rečeno, većina unutarstaničnog obilježavanja, odnosno oko 80% vezikula vezikulo-tubularnih TfR⁺ odjeljaka se odnosi na reciklirajuće endosome (236) koji se većinom nalaze u jukstanuklearnom području, a nekonformirane MHC-I molekule ne slijede taj put (odjeljak 4.4).

Nadalje, što se tiče praznih molekula L^d, kod njih se uočavaju i vezikule koje se ne kolokaliziraju s niti jednim od ispitivanih markera. Nasuprot njima, konformirane molekule L^d se ne kolokaliziraju s markerima endocitoznog puta, već najveći stupanj kolokalizacije pokazuju s markerima GA (slike 29 b i c, i 75).

Da postoji razlika u endocitoznom putu konformiranih i nekonformiranih molekula, govore već rezultati praćenja njihovog obrasca internalizacije (slika 48). Naime, dok se u početku (nakon 10 minuta) sve molekule mogu naći u istim perifernim vezikulama, već nakon 20 minuta konformirane molekule se počinju uočavati jukstanuklearno (jednako kao i TfR), dok nekonformirane molekule (nativne i *misfolded*) ne dolaze u to područje niti u jednom trenutku tijekom kinetike (ili izuzetno malo), već se nakupljaju perinuklearno. Odvajanje tijekom endocitoznog puta potvrđeno je i praćenjem, njihove kontinuirane (slika 49) i *pulse-chase* internalizacije (slika 50). Naime, iako se konformirane molekule K^d i D^d kolokaliziraju gotovo cijelo vrijeme u potpunosti, međusobna kolokalizacija konformiranih molekula D^d i nekonformiranih molekula L^d je izuzetno slaba, osobito u kasnijem razdoblju. Ovo račvanje se najvjerojatnije događa tek nakon ranih endosoma. U prilog toj tvrdnji govori nekoliko činjenica:

1. Konformirane i nekonformirane MHC-I molekule se mogu uočiti u EEA1⁺ odjeljcima već nakon 10, a znatno nakon 20 minuta kontinuirane internalizacije u jednakom intenzitetu (slika 51).
2. Nakon inhibicije izlaska iz EEA1⁺ odjeljaka, držanjem stanica na 16°C, konformirane molekule D^d i nekonformirane molekule L^d gotovo se potpuno kolokaliziraju, kako međusobno, tako i s EEA1 (slika 53a), jednako kao i konformirane molekule i nekonformirane molekule L^d (nije prikazano). Suprotno tome, stupanj kolokalizacije je znatno manji na 37°C (slika 53a).
3. U *pulse-chase* eksperimentu, i konformirane i nekonformirane molekule se neposredno nakon *pulsa* od 25 min. mogu naći u EEA1 odjeljcima. Međutim, već nakon 15 minuta *chase* razdoblja nekonformirane molekule L^d više se ne uočavaju u tom odjeljku, za razliku od konformiranih molekula (slika 52). Ovaj rezultat ukazuje da nekonformirane molekule vrlo brzo izlaze iz ranih endosoma i više se ne vraćaju u njih, za razliku od konformiranih molekula. Iako bi ovaj rezultat mogao ukazivati i na zadržavanje konformiranih molekula u EE, obzirom da je njihova kolokalizacija s EEA1 u *ustaljenom stanju* vrlo slaba (slika 46a), mnogo je vjerojatnije da izlaze iz njega, ali se ubrzo vraćaju. Najvjerojatniji razlog tome je, naravno, recikliranje.
4. U stanicama se nerijetko mogu zapaziti tubulo-vezikularne tvorbe s nekonformiranim molekulama L^d i ostalim konformiranim MHC-I molekulama. U njima, nerijetko, nekoliko tubularnih izdanaka s konformiranim molekulama pupa iz središnje vezikule u kojoj se nalaze nekonformirane molekule L^d. Identična slika se može vidjeti između nekonformiranih molekula L^d i EEA1, odnosno TfR (slike 62b, 66c), s time da se prazne L^d uvijek nalaze u središnjoj vezikuli. Ovaj rezultat ukazuje na odjeljivanje molekula koje se nalaze u

središnjem dijelu i upućuju u kasne odjeljke (nekonformirane L^d), i molekula koje tubulacijom izlaze iz odjeljka i upućuju se u recikliranje (konformirane MHC-I i TfR).

Prema tome, bez obzira na različit mehanizam ulaska, **putovi konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula se vrlo brzo spajaju u ranim endosomima, da bi se kasnije ponovo razdvojili**. Ulazak konformiranih molekula HLA u EEA1⁺ odjeljke nakon 20 minuta je također pokazan i u literaturi (53).

Kao što je rečeno, **konformirane MHC-I molekule se nakon izlaska iz ranih endosoma najvjerojatnije recikliraju, za razliku od nekonformiranih molekula**. Na to ukazuju dvije činjenice;

1. Rezultati kolokalizacije s TfR u *ustaljenom stanju* (slika 45a), ali i nakon internalizacije MHC-I molekula u TfR odjeljke (slika 57), internalizacije TfR u MHC-I odjeljke (slike 59 i 60), te istodobne internalizacije MHC-I i TfR (slika 62). Kolokalizacija konformiranih MHC-I i TfR je prvenstveno jukstanuklearna, iako može biti i periferna. Nekonformirane molekule L^d se s TfR uopće ne kolokaliziraju u jukstanuklearnom dijelu, a citoplazmatski samo iznimno i to nakon duljih kinetika (>1h), najvjerojatnije onda kada se TfR već počinje usmjeravati u kasne odjeljke i degradaciju (slika 60).
2. Druga činjenica koja govori u prilog recikliranju konformiranih molekula su rezultati dobiveni primjenom reciklirajućeg protokola, u kojem se samo one internalizirane molekule koje se naknadno recikliraju mogu obilježiti fluorescentno označenim sekundarnim protutijelom (slika 24). Prema njemu, ponovo su se, uz TfR, reciklirale samo konformirane MHC-I molekule (slike 77-79) ali ne i nekonformirane (nativne i *misfolded*) (slike 77-81).

Da se MHC-I molekule recikliraju već je i ranije poznato (52, 53, 71, 193, 197, 201, 244). Međutim, još nije istražen utjecaj njihove konformacije na taj proces. Dosad je najbolje razjašnjen put recikliranja konformiranih molekula HLA-I (52, 53, 71, 244, 257). Ovaj proces se pretežno odvija preko Arf6⁺ reciklirajućih endosoma, a Arf6 je molekula koja ima važnu ulogu u njihovom endocitoznom putu i s kojom se one znatno kolokaliziraju u ustaljenom stanju (71). Naime, nakon endocitoze, molekule HLA, jednako kao i Tac (IL2-R α), CD59, integrini i E-kadherin ulaze u Arf6⁺ sortirajuće endosome (52, 71, 111, 258, 259). Potom se iz njih mogu usmjeriti prema EEA1⁺ ranim endosomima, čime postaju dio glavnog (klatrinskog) endocitoznog puta, a nakon toga u degradaciju. S druge strane, mogu se usmjeriti u ranije opisan jukstanuklearni *Arf6⁺ reciklirajući odjeljak* (odjeljak 1.2.2.2.3.). On nastaje tubulacijom iz klasičnog transferin-pozitivnog ERC (odjeljka koji se opisuje kao skupina tubularnih struktura koje izvire iz MTOC (260, 261), ali je sam negativan na nazočnost transferina. Ovaj proces tubulacije zahtijeva molekule Rab22a (71, 244) i funkcionalni aktinski citoskelet (71, 244). Za kasniju vezikulaciju ovih tubula bitna je molekula Rab11 (244), dok je Rab22a ponovo potreban za konačno spajanje (fuziju) vezikula s PM (244). Cijeli procesa je razmjerno spor i traje 5-10 minuta (110), pa se jednako kao i put preko Tf-pozitivnih ERC ubraja u put sporog recikliranja (262), za razliku od brzog koji se odvija izravno iz ranih endosoma (72, 238), i ovisan je o EHD3 i Rabenozinu 5 (263).

Zbirno, MHC-I molekule koje se recikliraju mogu se vizualizirati u 3 odjeljka:

1. Vezikularnim endosomima smještenim perinuklearno i jukstanuklearno – zajednički odjeljak Tf i MHC-I;

2. Tubularnim reciklirajućim endosomima u jukstanuklearnom području (Tf-negativni, Arf6-pozitivni);
3. Perifernim vezikulama koje nastaju iz tubularnih reciklirajućih endosoma (Tf-negativne).

Iako mi nismo bili u mogućnosti ispitati Arf6 pozitivne odjeljke, neke činjenice indirektno ukazuju na uključenost ovog puta u recikliranje konformiranih molekula H2^d.

1. Naši rezultati pokazuju da konformirane MHC-I molekule i TfR više kolokaliziraju u jukstanuklearnom području (koje uključuje i zajednički odjeljak) nego na periferiji (slike 57, 59 i 62), gdje bi reciklirane MHC-I, odnosno TfR vezikule mogle uglavnom biti razdvojene. Prisutna periferna kolokalizacija može predstavljati rane endosome, ali i strukture klasičnog puta recikliranja izravno iz ERC. Naime, u navedenim radovima nije preciznije definirana nazočnost MHC-I molekula u ovom putu, iako je kolokalizacija HLA i TfR zamjetna već nakon 20-30 minuta kontinuirane internalizacije, uglavnom jukstanuklearno, ali također i periferno (52, 53).
2. Nakon protokola recikliranja možemo uočiti da se TfR prikazuje i jukstanuklearno i periferno, dok se molekula K^d i D^d nalaze prvenstveno periferna (slike 78 i 79). Valja se podsjetiti da se kod recikliranja ovisnom o Arf6 često govori o uključenosti perifernog endosomalnog sustava (108, 109).
3. Za razliku od TfR, recikliranje konformiranih MHC-I molekula je bilo zakočeno djelovanjem citohalazina D, za koji je utvrđeno da blokira recikliranje preko Arf6 pozitivnih odjeljaka (71, 244). Međutim, jedan dio MHC-I molekula se ipak uspijeva reciklirati, što može ukazivati na to da MHC-I molekule djelomično koriste i klasičan put recikliranja.

Ipak, bitno je naglasiti da se Arf6-ovisni i klasičan transferinski put recikliranja preko ERC više ili manje sijeku ovisno o staničnoj liniji. Dok su u HeLa stanicama razdvojeni (71), u stanicama COS se djelomično preklapaju (108). Nije isključeno da ovakvo djelomično preklapanje postoji i na fibroblastima Balb 3T3.

Na kraju, nekonformirane MHC-I molekule u pravilu ne recikliraju, jednako kao i kolera-toksin. Zanimljiva je činjenica da *misfolded* CFTR (bez obzira na vrstu izazvane mutacije), ima 90% kraći poluživot na staničnoj površini u usporedbi s konformiranom molekulom ($t_{1/2} = 1-2$ sata, dok je $t_{1/2}$ konformiranih molekula 16 sati). Ovo smanjeno $t_{1/2}$ nije posljedica pojačane endocitoze, već upravo prigušivanja recikliranja, puta kojeg normalno slijede konformirane CFTR molekule, i usmjeravanja u degradaciju (250). Za usporedbu, vrijeme poluživota na staničnoj površini konformiranog CFTR slično je vrijednosti koju smo mi dobili za konformirane MHC-I molekule. Međutim, $t_{1/2}$ za *misfolded* CFTR, iako slično onome za nekonformirane molekule L^d nastale kratkotrajnim zakiseljavanjem (oko 2 sata), ipak je kraće od vrijednosti dobivene za native nekonformirane molekule L^d (oko 4 sata), što ukazuje da se potonje ipak zadržavaju u stanici i ne degradiraju odmah (slika 39 i nije prikazano). Međutim, konformacija ne mora uvijek biti presudna. Naime, pokazali smo da se *misfolded* TfR ipak reciklira, mada treba naglasiti da je intenzitet ekspresije recikliranog *misfolded* TfR nešto manji (slika 80).

Na kraju, zanimljivo je da se nakon duljeg vremena inkubacije (3 sata, naspram obično korištenih 1 sata), mogu vidjeti i reciklirane *misfolded* molekule L^d (slika 81). Ovaj signal je očekivano slabiji od signala internalizacije, ali posebno je zanimljivo da je u tom slučaju obrazac internalizacije jednak obrascu recikliranja, odnosno vezikule su jednoliko ili perinuklearno raspoređene po citoplazmi (slika 81). Ovaj obrazac se razlikuje od onog koji je dobiven

nakon iste kinetike s molekulama D^d (slika 77b), koje se nalaze uglavnom u perifernim vezikulama, kao i od onog koji se uočava kod TfR (jukstanuklearni i periferni odjeljci). Ovi rezultati ukazuju da *misfolded* molekule L^d u stanicu ulaze najvjerojatnije potpuno drugačijim putem, moguće i ponovnom endocitozom egzocitiranih vezikula, ali pod uvjetom da se nalaze u vanjskim membranama kasnih endosoma. Obzirom da smo kao kontrolu koristili preparat koji potvrđuje da su ne-internalizirana površinska primarna protutijela prije inkubacije s fluorescentno označenim sekundarnim na 37°C u potpunosti uklonjena zakiseljavanjem, isključena je mogućnost «kontaminacije» uslijed naknadne internalizacije. Nažalost, uslijed slabog signala, eventualno reciklirane native molekule L^d nismo uspjeli vizualizirati.

Osim u put recikliranja, MHC-I molekule se iz ranih endosoma (Rab5⁺ i EEA1⁺) mogu uputiti i u **kasne odjeljke** gdje se može odvijati *drugi stupanj sortiranja proteina*. Naime, osim što se mogu usmjeriti u lizosomalnu degradaciju, molekule se iz kasnih endosoma mogu reciklirati prema TGN, primjerice TGN38, MPR (receptor manoza 6 fosfata), furin (56, 76, 82), ili prema plazmatskoj membrani putem egzocitoze (61, 83, 84). Kako molekule iz ranih odjeljaka dolaze do kasnih još je uvijek predmet istraživanja, no, u novije se vrijeme otkrilo da se tijekom sazrijevanja Rab5 pozitivnih ranih endosoma, s jedne strane događa proces homotipske fuzije vezikula na staničnoj periferiji, čime one postaju sve veće, dok s druge strane iz njih cijelo vrijeme izlazi reciklirajući (često Rab4⁺) sadržaj. Takve vezikule putuju prema perinuklearnom (središnjem) dijelu stanice, pri čemu se u njima koncentriira materijal koji je predodređen za ulazak u Rab7⁺ MVB i LE. U jednom trenutku nastaje izuzetno kratkoživući prijelazni endosom koji je pozitivan i na Rab5 i na Rab7. Vrlo brzo nakon toga Rab5 se otpušta a novonastali odjeljak nazivamo kasnim. Ovaj proces traje u prosjeku 10-15 minuta (69).

Kasni odjeljci, općenito, podrazumijevaju skupinu perinuklearnih multivezikularnih i multilaminarnih odjeljaka kiselog pH (<6,0) iz kojih se molekule mogu usmjeriti u degradaciju ili u recikliranje egzocitozom (odjeljak 1.2.2.1.3.). Ove strukture su karakterizira nazočnost nekih, za njih karakterističnih, lipida i proteina. Tako LE sadrže *Lamp1* i *Lamp2* (jednako kao i lizosomi), proteine koji se nalaze u njihovim graničnim (vanjskim) membranama (85, 87, 92), a za njihovu funkciju je važan i *Rab7* (68, 86). Međutim, za razliku od lizosoma, u njima se nalazi i MPR (85). Osim toga, ovi odjeljci u svojim unutarnjim membranama sadrže velike količine lizobisfosfatidne kiseline (LBPA) (88), koja se ne nalazi u ostalim staničnim odjeljcima (56, 85, 88, 122). U kasnim endosomima je vrlo bitna separacija molekula u vanjske (granične), odnosno u unutarnje (luminalne) membrane. Tako je poznato da se u vanjskim membranama pretežno nalaze molekule *Lamp1/2* i HLA-DM, a na unutarnjim membranama tetraspaninski proteini (CD63, CD81, CD81) i LBPA. MHC-II molekule se mogu nalaziti i na unutarnjim i na vanjskim membranama, a ponekad se mogu naći i MHC-I molekule, uglavnom na unutarnjim membranama (61, 84, 88).

U našim pokusima, na uključenost kasnih odjeljaka ukazuje visok stupanj kolokalizacije *steady state* MHC-I vezikula, osobito u obrascima C i B, s DAMP (osim kod konformiranih molekula L^d koje ne pokazuju vezikularnu ekspresiju), što ukazuje da im je pH <6,0 (slika 47). U svrhu daljnje karakterizacije, MHC-I molekule smo kolokalizirali s ostalim markerima, LBPA i *Lamp1*. Naime, iako se ova dva markera međusobno znatno kolokaliziraju (nije prikazano), ipak postoji mogućnost da u nekom stupnju mogu predstavljati i zasebne odjeljke.

Problem je što lokalizacija Lamp1 u isključivo vanjskim membranama često otežava procjenjivanje kolokalizacije na većim povećanjima iz tehničkih razloga. No, ipak izgleda da se, ovisno o obrascu ekspresije, u ustaljenom stanju konformirane molekule K^d i D^d djelomično do znatno nalaze u Lamp1 pozitivnim odjeljcima, i to prvenstveno kada je riječ o vezikulama vrste C. Suprotno tome, vezikule vrste B i A se znatno slabije kolokaliziraju. Iz kolokalizacije je, očekivano, isključeno jukstanuklearno područje, u koje se ovi kasni odjeljci ne nalaze (osim malo na njegovim vanjskim područjima), te je pozitivno samo na nazočnost molekula K^d i D^d (slika 46b i c). Za razliku od njih, nekonformirane molekule L^d se također djelomično kolokaliziraju s Lamp1 (iako u nekim stanicama izgleda da je stupanj kolokalizacije manji), ali i preko svojih vezikula vrste C i B, te katkad i A. Međutim, dok su u slučaju molekula K^d i D^d gotovo sve vezikule vrste C sadržavale Lamp1, u slučaju nekonformiranih molekula se kolokalizira samo dio njih (slika 46e). Nadalje, u usporedbi s konformiranim molekulama K^d i D^d , mnogo se češće može vidjeti i periferna kolokalizacija između nekonformiranih molekula L^d i Lamp1, koja uglavnom uključuje vezikule B ili A. Vjerujemo da su ove razlike također jedan od razloga slabe kolokalizacije konformiranih molekula K^d i D^d s nekonformiranim molekulama L^d (slika 38). Na kraju, konformirane molekule L^d (slika 46d) se ne kolokaliziraju s Lamp1, kada je u pitanju ustaljeno stanje. Postoji mogućnost da se one raspadaju u kiselim odjeljcima, jer je pokazano da je trimolekularni kompleks molekule L^d dosta nestabilan (156). To bi se uklapalo u činjenicu da molekule L^d normalno ne nalaze u perinuklearnim vezikulama (slika 25). Ipak, nakon djelovanja bafilomicina A_1 , one se prikazuju u vezikularnom a katkad i vakuolarnom obrascu, te se kolokaliziraju s Lamp1. Također pojačana kolokalizacija s Lamp1, jednako kao i vakuolarna ekspresija, uočava se i kod ostalih MHC-I molekula. No, ponovo treba naglasiti da je jukstanuklearno područje i dalje prisutno kod svih konformiranih molekula, ali se i dalje općenito ne kolokalizira s Lamp1 (slika 92).

Dok se Lamp1 ipak može, iako vrlo slabo, vizualizirati u vanjskim dijelovima jukstanuklearnoga dijela, LBPA molekule su u potpunosti isključene iz njega i prikazuju se uglavnom perinuklearno. Nadalje, u usporedbi s Lamp1, *steady state* MHC-I molekule pokazuju nešto manji stupanj kolokalizacije s LBPA (slika 55). Međutim, nakon tretmana stanica protu-LBPA protutijelima, za koji je pokazano da sprječava izlazak molekula iz LE ako je on ovisan o funkciji LBPA (94,) stupanj kolokalizacije se pojačava, i to djelomično kod molekula K^d i D^d , ali znatnije kod nekonformiranih molekula L^d , koje se u tom slučaju gotovo u potpunosti kolokaliziraju s ovim markerom. Pored toga, uočava se i vakuolizacija odjeljaka (prvenstveno s praznim molekulama L^d , i to u oko 75% stanica), u kojima se prazne molekule L^d nalaze sa vanjske strane, dok je LBPA u unutrašnjosti, a što je u skladu s njezinom lokalizacijom u unutrašnjim membranama kasnih odjeljaka (88). Konformirane molekule L^d se niti nakon protu-LBPA tretmana ponovo ne uočavaju vezikularno, što ukazuje da ili samo manji dio dolazi do LE ili se vrlo brzo razgrađuju, odnosno dezintegriiraju, u njima.

Ovi rezultati ukazuju da MHC-I molekule dolaze do kasnih odjeljaka i da se dulje zadržavaju u Lamp1⁺ odjeljcima. Isključivo Lamp1 pozitivni odjeljci bi mogli biti lizosomi, jer ne posjeduju LBPA (122), u kojima se kasnije događa degradacija, ali možda i dio prijelaznih hibridnih organela nastalih nakon fuzije LE i lizosoma (85) u kojima se molekule dalje mogu sortirati. Također, nije niti isključeno da postoje i rani Lamp1 odjeljci koji će tek zadobiti LBPA, a u koje ulaze MHC-I molekule nakon izlaska iz jukstanuklearnog dijela, iako nije vjerojatno da se u njima

odvija retencija. Ipak, velik dio kasnih vezikula su odjeljci koji su i Lamp1 i LBPA pozitivni. Obzirom na slabiju kolokalizaciju MHC-I molekula s LBPA, pretpostavljamo da se u njima molekule kraće zadržavaju, nakon čega ulaze i ostaju dulje vrijeme u onima koji su više Lamp1 pozitivni. Naime, kako se molekule pojačano kolokaliziraju s LBPA tek nakon inhibicije njihovog izlaska iz kasnih endosoma s protu-LBPA, zaključujemo da LBPA⁺ odjeljak prethodi Lamp1⁺ odjeljku, koji bi mogao, kako smo rekli, biti tzv. hibridna organela koja nastaje fuzijom LE i lizosoma (85) ili sam lizosom. U tom slučaju LBPA/Lamp1 kasni endosomi postaju retencijski odjeljak.

Ovu hipotezu potvrđuju i rezultati dobiveni praćenjem kontinuirane internalizacije MHC-I molekula u Lamp1 i LBPA odjeljke nakon 3 sata (slika 54a), te u Lamp1 odjeljke (sa ili bez tretmana bafilomicinom A₁) nakon 2 sata (slika 93). U prvom slučaju je u kontrolnim uzorcima veća kolokalizacija MHC-I molekula s Lamp1 (slika 54b, gore), nego s LBPA, s kojima se izuzetno slabo kolokaliziraju (slika 54c, gore). Međutim, protu-LBPA tretman je uzrokovao povećanje kolokalizacije svih MHC-I molekula s LBPA, računajući i konformirane molekule L^d (slika 54c, dolje), dok je stupanj kolokalizacije s Lamp1 bio samo nešto povećan, vjerojatno kao posljedica hipertrofije odjeljka (slika 54b, dolje). Nadalje, kada su u pitanju konformirane MHC-I molekule, i dalje je uočljivo, čak i povećano, jukstanuklearno područje u kojem se nakupljaju molekule K^d i D^d (koje se vjerojatno znatnijim dijelom odnosi i na reciklirajuće endosome), a gdje se u pravilu ne nalaze ova dva biljega kasnih endosoma (osobito LBPA). Kao što je i očekivano, najveći stupanj kolokalizacije je uočen kod nekonformiranih molekule L^d za oba markera.

Sličan rezultat dobiven je i nakon 2 sata internalizacije, uz ili bez djelovanja bafilomicina A₁. Osnovna razlika u usporedbi djelovanja protu-LBPA protutijela i bafilomicina A₁ na konformirane molekule L^d je u njihovom izražaju. Naime, u ovom slučaju alkalizacija endosoma onemogućuje pretvorbu punih molekula L^d u prazne, pa njihova konformacija ostaje očuvana. Stoga je stupanj ekspresije, kao i kolokalizacija s Lamp1 zamjetno povećana (slika 93). Kolokalizacija internaliziranih konformiranih molekula HLA-I u Lamp1 odjeljke je također opisana u literaturi, ali tek nakon 10 sati, gdje je kolokaliziran s molekulama Tac i Tac-LL mutantom (52).

Prema tome, **sve MHC-I molekule dolaze do LBPA/Lamp1 odjeljaka, ali različitom kinetikom, i u različitom stupnju.**

Kao što je prethodno rečeno, molekule se iz kasnih odjeljaka mogu usmjeriti u nekoliko odredišta: u degradaciju, u TGN ili egzocitozom prema PM (62). Njihova *sortirajuća svojstva* su znatnim dijelom i posljedica njihove izuzetne dinamičke aktivnosti koja prvenstveno ovisi o **mikrotubulima** (264). Naime, Lamp1 i CD63 pozitivne strukture pokazuju znatnu stopu dvosmjernog gibanja, od kojih je ono prema perinuklearnom dijelu ovisno o dinaminima koji vezikule usmjeravaju prema minus krajevima (265, 266, 267), a prema periferiji o kinezinima koji ih usmjeravaju prema plus kraju mikrotubula (268, 269). Stoga se mogu vidjeti tubularne tvorbe koje se otkidaju od Lamp1 i CD63 pozitivnih odjeljaka i kreću se u oba smjera, a mogu se spajati sa sličnim strukturama (86). Tubularne tvorbe koje se otkinu mogu doći i do stanične površine, te se spojiti s njom, kako je pokazano na primjeru MHC-I molekula (270). U normalnim uvjetima aktivnost dineina je nešto jača nego aktivnost kinezina, pa su kasni odjeljci smješteni pretežno perinuklearno (86). Međutim, uočavaju se i periferno, gdje se mogu kolokalizirati s H-2^d molekulama. Bitno je ponoviti da je nešto veći stupanj periferne kolokalizacije s

nekonformiranim nego s konformiranim MHC-I, iako postoji u oba slučaja (slike 54 i 93). Ova mobilnost prema plus kraju (periferiji) se dokida nakon djelovanja protu-LBPA protutijela, odnosno nakupljanja kolesterola što ima za posljedicu preveliku aktivnost molekule Rab7 i neučinkovitost kinezina (86). S druge strane, depolimerizacija mikrotubula djelovanjem nokodazola uzrokuje pomicanje kasnih odjeljaka i njima pridruženih molekula prema periferiji, i to relativno brzo (nakon 45 minuta), čak i ako su imobilizirani uslijed nakupljanja kolesterola (86). I u našim pokusima je, nakon dezintegracije mikrotubularne mreže nokodazolom, uočljivo premještanje Lamp1 pozitivnih odjeljaka prema periferiji (slika 76), ali i onih s MHC-I molekulama (slike 73 i 74), što ponovo ukazuje da je znatan dio ovih vezikula povezan s kasnim odjeljcima. Ostatak se, barem kada su u pitanju konformirane MHC-I molekule, raspršuje uslijed smještaja u GA (slika 75) i reciklirajućem odjeljku (260, 261). Zanimljivo je da se pune molekule K^d i D^d i dalje međusobno kolokaliziraju nakon djelovanja nokodazola, za razliku od punih molekula D^d i praznih molekula L^d (30 min, te 2 i 3 sata tretmana; nije prikazano). Međutim tijekom višesatne inkubacije nokodazolom uočljivo je smanjivanje veličine vezikula i njihov gubitak, ili pak, nakon djelovanja taksola, prije slabljenja signala stvaranje krpastih struktura. Stoga je moguće da se kasnije dodatno raspršuju ili uklanjaju na neki drugi način. Dio bi mogao ipak biti još uvijek u stanici jer je površinska izraženost, osobito kada su u pitanju konformirane molekule, čak nešto i povećana (slika 73b). Da se MHC-I molekule mogu vidjeti u blizini mikrotubula vidljivo je na slikama 71 i 74. Nasuprot mikrotubulima, aktinski citoskelet ne utječe na smještaj i dinamiku kasnih odjeljaka (86). Naime, u našim pokusima nakon djelovanja citohalazina D i latrunkulina A nije zapaženo znatnije raspršivanje vezikula (u granicama koliko se to može procijeniti uslijed skvrčavanja stanice), iako je zapažen pad površinskog izražaja, osobito nekonformiranih molekula L^d (slike 76 i 101). Ipak, treba naglasiti da su strukture staničnog citoskeleta (mikrotubuli, odnosno aktinski mikrofilamenti) vjerojatno povezane, na što ukazuje rezultat da narušavanje integriteta jednog njegovog dijela ima, iako manji, učinak i na fenotipski izgled druge strukture (slika 72).

MHC-I molekule se, kao što je i očekivano, u konačnici *degradiraju*. Međutim, kinetika njihova uklanjanja nije tako brza kao što bi se dalo zaključiti prema stupnju kolokalizacije s markerima kasnih odjeljaka (slika 91), a vrijeme njihovog poluživota prvenstveno ovisi o konformaciji i stabilnosti. Tako su najstabilnije konformirane molekule K^d i D^d ($t_{1/2} > 12$ sati), potom konformirane molekule L^d ($t_{1/2}$ oko 12 sati), a najmanje nekonformirane molekule L^d ($t_{1/2} < 4$ sata). Vrijeme poluživota je nešto dulje nego što je u literaturi pretpostavljeno za konformirane molekula HLA-I, koje je, jednako kao za Tac i Tac-LL, iznosilo 6-8 sati (52). Ovako dugo vrijeme poluživota konformiranih molekula K^d i D^d može se objasniti visokim stupnjem recikliranja, a nešto kraće $t_{1/2}$ konformiranih molekula L^d, njihovom brzom dezintegracijom kada dođu u kasne endosome. Postavlja se pitanje, ako nakon ulaska u kasne odjeljke inače obavezno odmah slijedi degradacija, onda bi poluživoti svih konformiranih MHC-I molekula trebali biti jednaki, te se čak niti molekule stabilnije konformacije se ne bi trebale vizualizirati u njima. Stoga je za pretpostaviti da se dezintegracija punih molekula L^d može događati i u nekim ranijim, manje kiselim, odjeljcima, ili da ulazak u kasne endosome ne znači nužno i razgradnju te molekule. Ove dvije pretpostavke se međusobno ne isključuju, a u prilog drugoj govori činjenica da se nakon dodavanja bafilomicina A₁ i konkanamicina A, koji alkalizacijom endosoma onemogućuju funkcioniranje kiselih hidrolaza, te spajanje kasnih endosoma s

lizosomima (234, 235, 236), samo povećao $t_{1/2}$ površinski biotiniliranih molekula L^d . Naime, inhibicija degradacije je bila samo privremena i djelomična, osobito kod konformiranih molekula, što ukazuje da degradacija u lizosomima nije jedini način gubitka ovih molekula iz stanice (slika 94). S druge strane, postoji i mogućnost da MHC-I molekule recirkuliraju između kasnih odjeljaka i jukstanuklarnih sortirajućih odjeljaka.

Stoga smo se dalje posvetili sljedećem mogućem putu, a to je *egzocitoza*. Naime, već u ranim endosomima započinje proces vezikulacije, odnosno pupanja vezikula u unutrašnjost endosoma. Ovaj se proces posebno pojačava u kasnim odjeljcima, tako da se kasni endosomi sastoje od glavne vezikule u čijoj se vanjskoj membrani nalaze Lamp1 proteini, odnosno unutarnjih vezikula koje su pozitivne na LBPA, CD63 (iako se CD63 može naći ponekad i u vanjskim membranama zajedno s Lamp1), te $PI(3,5)P_2$. Važno je naglasiti da su ove molekule smještene u zasebnim domenama (87, 88), o čemu će kasnije biti više govora. Stoga, kada se kasni endosom usmjeri prema PM i s njom spoji, molekule koje se nalaze u graničnim membranama će postati njezin dio a unutrašnje vezikule, egzosomi, biti otpuštene u izvanstanični prostor (61, 62). Za brojne molekule je pokazano da se egzocitiraju. To vrijedi za TfR u retikulocitima, integrinske molekule, perforin na limfocitima T, molekule tetraspaninske obitelji (CD63, CD86, CD81), ICAM-I, te MHC-II, čak i MHC-I molekule (revijski opisano u 61). Egzocitoza MHC-I molekula je pokazana na limfocitima B i dendritičnim stanicama (84). Dok su na limfocitima B, MHC-I molekule smještene na unutarnjim membranama (za razliku od MHC-II koje su smještene i na unutarnjim i na vanjskim), u dendritičnim stanicama MHC-I molekule su se mogle naći na objema membranama. Na žalost, u navedenom radu je korišteno samo protutijelo koje prepoznaje i konformirane i nekonformirane molekule, pa se ne može reći da li konformacija utječe na smještaj molekule u vanjskoj ili unutarnjoj membrani, te da li obje konformacije slijede put egzocitoze. Vrlo je vjerojatno da se MHC-I molekule nalaze i na graničnim membranama dendritičnih stanica (koje se inače ubrajaju u profesionalne predočne stanice) sa svrhom alternativnog predočavanja antigena, o čemu će kasnije biti više riječi.

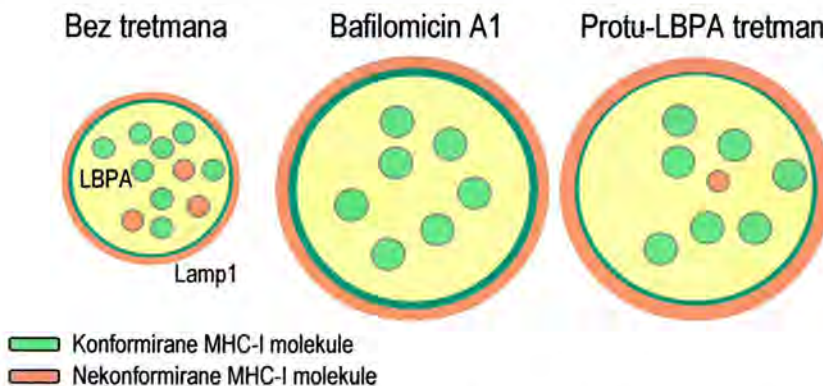
Prema našim dosadašnjim rezultatima, postoje neke naznake na **uključenost egzocitoze u putu molekula $H2^d$** :

1. Nemogućnost potpune inhibicije degradacije djelovanjem inhibitora endosomalne acidifikacije (slika 94);
2. Činjenica da relativno intenzivna kolokalizacija internaliziranih MHC-I molekula s Lamp-1 nema za posljedicu i brzu degradaciju (slike 54 i 93, te 91 i 94); te
3. Dvostruko povećanje površinskog izražaja nekonformiranih molekula (a konformiranih svega 10-15%) nakon samo 2-3 sata djelovanja bafilomicinom A_1 (slika 84 i nije prikazano) na stanice P815 i Balb 3T3..

Ova posljednja točka se djelomično može objasniti i dalje prisutnom sintezom uz nemogućnost degradacije (dotok uz nemogućnost odtoka). No, nekonformirane molekule L^d se ne izražavaju tako jako na PM, niti su inače sklone znatnijem površinskom izražavanju uslijed sinteze (čak niti nakon djelovanja IFN γ). Nadalje, u ovom slučaju je inhibiran i njihov dodatan put nastanka pretvorbom iz punih molekula L^d uslijed kiselog pH. Nakon 12 sati ovo povećanje je još izraženije i iznosi oko 350-400% (za konformirane MHC-I molekule samo 25-30). Uz činjenicu da se tada proporcionalno na površini povećava i izražaj Lamp1 (koji je, ipak treba napomenuti, na površini jedva zamjetan u kontroli, pa se učinak ne može dobro kvantificirati), nameće se zaključak da se ove molekule pojačano egzocitiraju, te da su smještene u graničnim membranama. Naime, moguće je da se događa

stalan dotok molekula u kasne odjeljke, uz inhibirano otjecanje (degradaciju). Ako bi se prazne molekule L^d i normalno nalazile smještene u graničnim membranama onda je, prema tome, logična i pojava vakuolizacije njihovih odjeljaka (slike 92 i 103). Egzocitoza takvih vakuola sa staničnom membranom bi za posljedicu imala na staničnoj površini povećanje broja onih molekula koje se inače nalaze na vanjskoj površini vakuolame membrane. Da se taj proces događa i u normalnim uvjetima trebamo tek pokazati, ali za očekivati je da se stanica, čak i nakon narušavanja normalnog stanja (npr. nakon djelovanja inhibitora), u osnovi služi mehanizmima kojima se koristi i u normalnim uvjetima. Ipak, pored svega, postavlja se i pitanje koliki udio se inače usmjerava u degradaciju, a koji u egzocitozu, što je problem koji još nije razjašnjen (84, 271). Naime, iz unutarnjih nebrana molekule se mogu ili degradirati ili reciklirati, a što na to utječe još je predmetom istraživanja. Zna se samo da LBPA može igrati ulogu u oba procesa (62, 94). Da se neće sve molekule uputiti u degradaciju, barem ako je riječ o molekulama L^d , upućuje naveden rezultat nepotpune inhibicije lizosomotropnim tvarima (slika 94). Naime, uz normalno odvijanje egzocitoze, unutarstanične vezikule bi se gubile iz stanice bez obzira na djelovanje ovih inhibitora. Zanimljivo je da se nepotpuna inhibicija degradacije molekula HLA-A i -B uočava nakon djelovanja NH_4Cl (21 sat), a također na površinski biotiniliranim stanicama (HeLa), što također ukazuje da se ove molekule mogu uklanjati iz stanice drugim načinom (53).

U svakom slučaju, dok bi nekonformirane molekule L^d bile, barem dijelom, smještene u graničnim membranama kasnih odjeljaka, iako niti prisustvo u unutarnjim nije isključeno, konformirane MHC-I molekule bi najvjerojatnije pokazivale sklonost smještaju u unutarnjim membranama. Naime, nakon djelovanja bafilomicina A_1 , odjeljci konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula se gotovo potpuno kolokaliziraju (slika 100a), a vakuolizacija punih MHC-I molekula nije tako izražena kao kod praznih molekula L^d , bez obzira što se očito radi o istim strukturama. Prema tome, konformirane molekule najvjerojatnije nisu smješteni prvenstveno s vanjske strane vakuole.



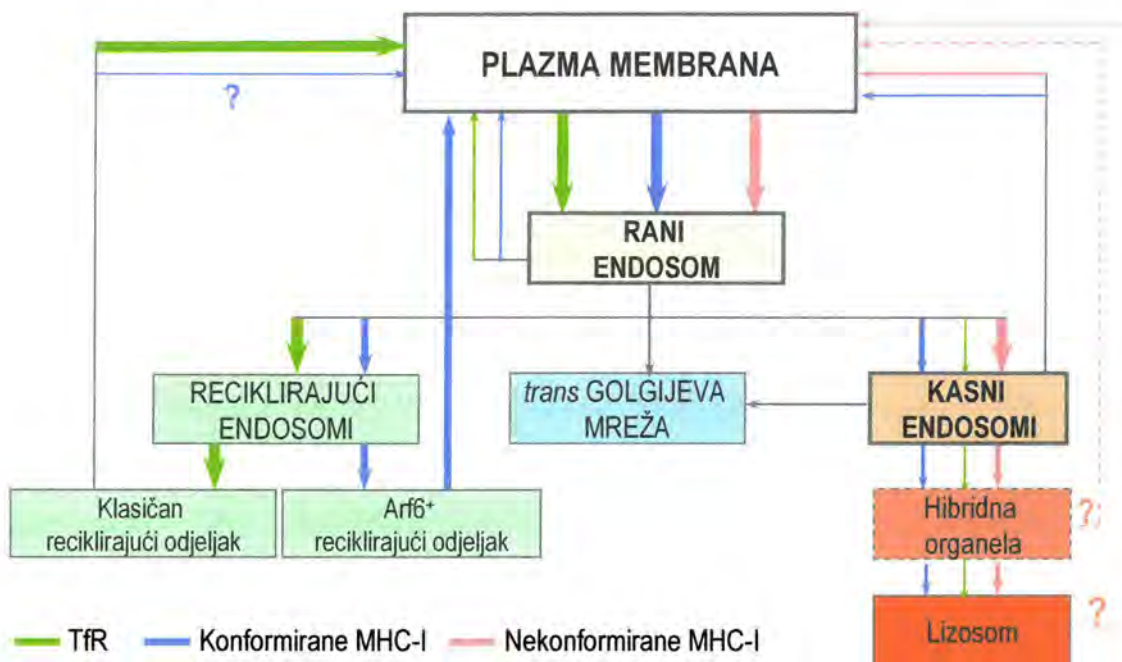
Slika 107. Hipoteza smještaja MHC-I molekula u membranama kasnih endosoma.

Konformirane MHC-I molekule su najvjerojatnije smještene pretežno u unutarnjim membranama kasnih odjeljaka, dok se nekonformirane molekule najvjerojatnije pretežno nalaze na vanjskim membranama. U vanjskoj membrani nije naznačen točan smještaj MHC-I molekula, već njihova količina koju prikazuje debljina kružnice. Molekule LBPA se nalaze na unutarnjim membranama, a Lamp1 na vanjskoj membrani, a smještaj im se ne mijenja uslijed tretmana.

Nadalje, zanimljiv je rezultat dobiven nakon djelovanja protu-LBPA protutijelom. Iako se i u kontrolnim stanicama mogu zapaziti vezikule u kojima se LBPA vidi s unutarnje, a prazne molekule L^d s vanjske strane, nakon samog tretmana ova je pojava znatno izraženija, vjerojatno jer se sada radi o vakuolama (slika 55). Međutim, zanimljivo je da, za razliku od povećane površinske ekspresije praznih molekula L^d nakon djelovanja inhibitora endosomalne acidifikacije, ona se nakon inaktivacije LBPA ne mijenja (nije prikazano). Obzirom da je poznato da djelovanjem protu-LBPA dolazi do nakupljanja kolesterola u kasnim endosomima (94) i njihove imobilizaciju uslijed pretjerane aktivnosti Rab7 (86), logično je da egzocitoza u ovom slučaju izostaje. Hipoteza o smještaju MHC-I molekula u kasnim endosomima prikazana je na slici 107.

Na kraju, molekule iz kasnih endosoma mogu ići u TGN, što je put koji slijede MPR i furin (62). Međutim, u našim pokusima, nismo uočili kolokalizaciju internaliziranih MHC-I molekula s GA (slika 56). Iako to može biti i posljedica brzog izlaska molekula iz GA koje se, prema tome, ne može detektirati našim metodama, ovu mogućnost smo, barem za sada, isključili.

Stoga pretpostavljamo da se **MHC-I molekule nakon ulaska u kasne odjeljke ne upućuju izravno u put degradacije, ali se u konačnici ipak razgrađuju, i to najvjerojatnije u kiselim Lamp1/2 pozitivnim endosomalnim odjeljcima.**



Slika 108. Endocitozni put MHC-I molekula i TfR. Površinski glikoproteini se tijekom svog endocitoznog puta sortiraju na tri mjesta (podebljano): staničnoj membrani, ranim endosomima i kasnim endosomima. Stupanj zastupljenosti pojedinog puta određene molekule naznačen je debljinom strelice. Detaljnije objašnjenje nalazi se u tekstu.

Iz svega prethodno rečenog možemo zaključiti da se **osnovno sortiranje ispitivanih površinskih glikoproteina (konformirane i nekonformirane MHC-I, te TfR) tijekom njihovog endocitoznog puta događa na tri mjesta** (slika 108):

1. Na PM molekule se sortiraju prema konformaciji (MHC-I molekule), te prema sklonosti prema određenim domenama (npr TfR prema klatrinskim jamicama). Često prema tome slijede i određen endocitozni put, ali to ne mora biti pravilo.
2. Sve ispitivane molekule dolaze u rane endosome i u njima se događa druga faza sortiranja. TfR i konformirane MHC-I molekule se usmjeravaju u putove recikliranja (koji su najvjerojatnije razlikuju), dok se nekonformirane MHC-I molekule usmjeravaju u kasne endosome. Jedan dio konformiranih MHC-I molekula, a vjerojatno na kraju i TfR, također se upućuje u ove odjeljke.
3. U kasnim endosomima događa se posljednja faza sortiranja. Dok se jedan dio molekula upućuje u degradaciju, drugi se može egzocitirati prema PM. Upravo ravnotežu između ova dva procesa, a posebice egzocitozu, tek trebamo dodatno istražiti.

Kao što smo već ranije naglasili, različite **domene** se ne nalaze samo u staničnoj membrani, već se održavaju i u endosomalnim odjeljcima. Ipak, trebamo naglasiti razliku u klasifikaciji. Naime pojam *domena* općenito podrazumijeva separaciju zastupljenosti određenih proteina (markera) u staničnim vezikulama. Tako, primjerice, razlikujemo Rab4, Rab5 i Rab11 domene u ranim endosomima (68). Međutim, možemo govoriti i o *mikrodomenama*, pojmu koji je jednakoznačan onome koji se odnosi na samu staničnu membranu, a podrazumijeva karakterizaciju membrana koja se prvenstveno zasniva na lipid-lipidnim i lipid-proteinskim međudjelovanjima. Prema tome, i u endosomalnim odjeljcima razlikujemo domene koje su karakteristične za rane odjeljke, nasuprot domenama koje su karakteristične za kasne odjeljke (87).

1. *Rani endosomi* posjeduju više PI(3)P i kolesterola od kasnih odjeljaka. Molekule PI(3)P igraju važnu ulogu u reguliranju dinamike odjeljaka i prijenosu proteina prema kasnim odjeljcima (87).
2. *Kasni odjeljci* su, za razliku od ranih, obogaćeni trigliceridima, kolesterolskim esterima i posebnim fosfolipidima, uključujući PI(3,5)P₂ i LBPA (85, 87). Važna uloga LBPA proistječe upravo iz njezine građe, pa se smatra da njezin visokohidrofoban konusni dio omogućuje savijanje dijela membrane u kojem se nalazi, što je važno za stvaranje MVB (88). Valja dodati da se PI(3,5)P₂ i LBPA nalaze u zasebnim dijelovima kasnih odjeljaka, te da se LE općenito sastoje od mozaika domena koje se razlikuju strukturno i funkcionalno.

Kolesterol ima važnu ulogu u organiziranju membrane (4), povećavanju njezinih fuzogenih svojstava (272), te, zajedno sa sfingolipidima, u regulaciji kinetike recikliranja proteina (58). U stanici ga ima znatno u TGN, ERC, a pokazano je i da se nalazi u Arf6⁺ sortirajućim endosomima (70). Reciklirajući Arf6⁺ tubuli imaju manje kolesterola, ali sadrže zamjetne količine PIP₂ (52). Kolesterol se, u kasnim odjeljcima nalazi u manjoj količini nego u ranima, jednako kao i lipidne splavi (87). Iako mehanizam njegova izbacivanja nije točno razjašnjen, zna se da je za njegovo uklanjanje bitna LBPA, čije onesposobljavanje (npr. djelovanjem protu-LBPA protutijela) dovodi do nakupljanja kolesterola, jednako kao i tretman određenim inhibitorima, npr. U18666A. Fenotipska slika ovih stanica nalikuje onima kod Nieman Pickove bolesti tipa C kada nedostaje protein NPC1, te se stoga pretpostavlja da U18666A može inhibirati NPC1, protein za koji se vjeruje da sudjeluje u putu uklanjanja suvišnog kolesterola (94). U ovom slučaju, osim imobilizacije i vakuolizacije odjeljaka, kao što smo već opisali, dolazi i do odjeljivanja sfingolipida, stvaranja multilaminarnih tvorevina, te nakupljanja lipidnih splavi, koje nisu tako česte u ovim

odjeljcima (274). Dakle, proces uklanjanja kolesterola, do te mjere da se normalno ne uočava konfokalnom mikroskopijom nakon bojanja filipinom (94), je nužan za normalnu funkciju i morfologiju kasnih endosoma. Možda je upravo i ovo jedan od razloga povećanog izražaja i vakuolizacije odjeljaka s praznim molekulama L^d u LE nakon djelovanja protu-LBPA protutijela, obzirom da smo pokazali da se nekonformirane molekule L^d nalaze u DRM – lipidnim splavima, kako na staničnoj površini, tako i nakon internalizacije (slike 32-34, 70).

Ipak, kolesterol, u manjim količinama, normalno postoji u kasnim odjeljcima, jednako kao i lipidne splavi, a prema rezultatima dobivenima EM izgleda da se nalazi u unutarjnim membranama. Najvjerojatnije su kolesterolske i LBPA membrane međusobno odvojene, jednako kao i $PI(3,5)P_2$ i LBPA membrane (85, 87).

Kao što je spomenuto, nazočnost *lipidnih splavi* je karakteristično za ranije odjeljke (rane reciklirajuće endosome), dok kasni odjeljci daju prednost više fluidnim domenama (88). Ipak, lipidne splavi se prenose od EE do LE preko MVB (56). Nadalje, pronađene su i u egzosomima, a i pupanje HIVa smještenog u lipidnim splavima se također događa preko egzosomalnog sustava (6).

Postavlja se pitanje: koja bi bila općenito bila funkcija domena u membranama endosomalnog sustava. Njihovu ulogu uglavnom možemo pretpostaviti prema nekim rezultatima. Iako se općenito smatra da tubulacija i tubuli koji često nastaju u ranim odjeljcima preferiraju prvenstveno fluidne (neuređene membrane), te će takvi nezasićeni lipidi prije ući u ERC, dok će se one sa zasićenim acilnim ostacima usmjeravati u LE i lizosome (70), to ne mora biti uvijek slučaj. Naime, poznato je da se GPI-sidreni proteini DAF i humani folatni receptor, recikliraju iako se nalaze u lipidnim splavima. Prema tome, osim same strukture, postoje još i drugi faktori koji igraju važnu ulogu u usmjeravanju molekula, vjerojatno sortirajući signali. Ipak bitno je napomenuti da je stupanj njihova izlaska iz ERC tri puta sporiji nego kada je u pitanju TfR. No, nakon uklanjanja kolesterola recikliraju se jednakom kinetikom. Prema tome, kolesterol, barem u ovom slučaju, ima ulogu u usporavanju recikliranja (272), ali dopušta recikliranje molekula smještenih u lipidnim splavima.

Mi smo u ovom radu pokazali da nakon internalizacije do 30 minuta MHC-I molekule ostaju u istoj domeni, barem što se tiče njezine otpornosti na TX-100. Konformirane MHC-I molekule i TfR koje se nalaze u DSM se recikliraju, dok nekonformirane MHC-I molekule i kolera-toksin ne (slika 70). Ipak, ne treba isključiti da vjerojatno postoje i dodatni faktori koji djeluju na konačnu sudbinu molekule. Naime, i samo djelomičan gubitak djelotvornog recikliranja može biti dostatan za objašnjenje kraćeg poluživota molekule. To također navodi na pomisao da usmjeravanje u lizosome, barem sa stanične površine, ne zahtjeva specifičan sortirajući signal u citoplazmatskom repu, već može biti odraz biofizičkih svojstava samih produkata u EE (81).

Na kraju, naši rezultati ukazuju da molekule nisu imobilne u membranskim mikrodomenama, ni na staničnoj površini niti u njezinoj unutrašnjosti, već su dinamične, te se premještaju iz jedne domene u drugu prema svojoj konformaciji. Tako bi se ukupno površinsko povećanje izražaja nekonformiranih molekula L^d nakon djelovanja filipina moglo objasniti time da, nakon što su se endocitirane pune molekule L^d u endosomalnim odjeljcima pretvorile u praznu konformaciju, prelaze u DRM. Nakon dolaska na staničnu površinu (recikliranjem) sada se, kao nekonformirane, uslijed filipina ne mogu endocitirati, jednako kao niti «stare» nekonformirane molekule L^d , od

prije prisutne na PM (slika 88). Ipak, postavlja se pitanje, ako se promjena konformacije događa tek u kasnim odjeljcima, kako se molekule mogu odatle reciklirati klasičnim putem. Prema tome, moguća je uključenost egzosomalnog sustava. Ipak, ne može se niti isključiti mogućnost da filipin na neki način uzrokuje premještanje unutarstaničnog «poola» s nekonformiranim molekulama L^d prema staničnoj površini, ali to bi vjerojatno uzrokovalo pojavu povećanja izražaja i ostalih molekule, a to se ne događa (nije prikazano). No, i ovu mogućnost treba dodatno ispitati obzirom na smještaj molekula u vanjskim, odnosno unutarnjim membranama kasnih endosoma.

5.3. NEKONFORMIRANE MOLEKULE I PROMJENA KONFORMACIJE MHC-I MOLEKULA U KISELIM ENDOSOMALNIM ODJELJCIMA

Kao što je ranije rečeno, općenito se smatra da aktivnu ulogu u stanici imaju samo konformirane molekule, a nekonformirane predstavljaju privremeno prijelazno stanje koje se ne povezuje s lokalizacijom gdje taj protein normalno vrši svoju ulogu. Njihova pojava na PM ukazuje na nefunkcionalnost staničnog kontrolnog sustava, ili na to da i nekonformirani protein katkad može u stanici biti funkcionalan.

Nekonformirane proteine je teško pratiti uslijed slabe palete raspoloživih protutijela koji ih prepoznaju. Stoga se često koriste razni mutirani oblici s fuzijskim proteinom na koje postoji protutijelo, npr. hemaglutinin s mutiranim CFTR (250), ili, nakon izazivanjaog *misfoldinga*, praćenje protutijelom koje inače prepoznaje obje konformacije, ali pod uvjetom da se zna da pod tim uvjetima više ne postoji konformirani oblik. Ovaj drugi pristup je korišten kod ranije opisanog prionskog proteina nakon tretmana suraminom (252), a mi smo ga primijenili u svrhu praćenja *misfolded* molekula D^d nakon stvaranja nepravilno svijene (*misfolded*) konformacije kratkotrajnim zakiseljavanjem (slika 28). Međutim, na sreću, za praćenje MHC molekula postoje mPt koja prepoznaju isključivo nekonformirane molekule I ili II razreda. Jedno od najbolje opisanih je mPt 64-3-7, koje prepoznaje nekonformirane molekule L^d bez obzira da li su prazne ili je na njih vezan β_2 -m i/ili peptid (170), a koje je intenzivno korišteno u ovom radu. Nasuprot ovom protutijelu, mPt 30-5-7 prepoznaje samo stabilnu konformaciju trimolekularnog kompleksa molekula L^d (170). Potom se koristi mPt KU1 koje prepoznaje nekonformirane molekule K^b, također primarno ovisno o konformaciji molekule, a neovisno o steričkim smetnjama (186). Što se tiče humanih MHC-I molekula, mPt HC-10 prepoznaje sve alele nekonformiranih molekula HLA-I (188), jednako kao i HCA2 (189), a, mPt MEM/G01 i MEM/E02 prepoznaju nekonformirane molekule HLA-E, odnosno HLA-G (177). Na kraju, uz protutijela koja prepoznaju nekonformirane MHC-I molekule, postoje i molekule koje prepoznaju nekonformirane MHC-II molekule. Tako npr. mPt MEM-264, -265 i -276, prepoznaju nekonformirane molekule DR1 koje nemaju vezan peptid, dok molekule s vezanim peptidom ne prepoznaju (192). Nadalje, još ranije su proizvedena protutijela KL295 i KL304 koja prepoznaju određene alele nekonformiranih mišjih i humanih MHC-II molekula bez vezanog peptida (192).

Nekonformirane MHC-I molekula ne izražavaju sve stanice, a kad su prisutne, stupanj izražaja se razlikuje. Nadalje, sklonost izražavanju u nekonformiranom obliku ovisi i o alelu. Tako je npr. oko 40% molekula L^d

površinski izraženo u nekonformiranom obliku, a nekonformiranih molekula K^d i HLA-B27 manje od 10% (183). Nadalje, pokazano je da je oko 10% molekula D^d na staničnoj površini izraženo kao bimolekularni kompleks teškog lanca i β_2 -m (161).

Sklonost izražavanja molekula L^d u nekonformiranom obliku zacijelo je velikim dijelom određena njihovom prirodnom nestabilnošću, kako je ranije opisano (odjeljak 1.3.2.2.). One se normalno izražavaju na površini stanica P815, te na IFN γ -stimuliranim fibroblastima (Balb 3T3 i B12, slika 25, odnosno nije prikazano). Također se izražavaju i na transficiranim fibroblastima L-L^d (nije prikazano).

Nadalje, nekonformirane i djelomično konformirane molekule K^b i D^b se mogu pojaviti na površini TAP-2 deficijernih stanice RMA-S na nižim temperaturama (26°C) ili u nazočnosti stabilizirajućeg protutijela, odnosno specifičnog peptida (173, 174). Iako se pretpostavljalo da su ove molekule prazne i bez konstitutivno pridruženog peptida (172), kasniji rezultati počeli su ukazivati da na staničnu površinu dolaze s vezanim peptidom koji bi se otpuštao pri 37°C zbog niskog afiniteta. MHC-I molekula bez peptida je kratkoživuća na 37°C i samo prolazno sposobna da veže egzogeni peptid (175).

Osim toga, istraživanja na RIE.D^b, β_2 -m^{-/-} staničnoj liniji transficiranoj s genom D^b pod snažnim virusnim promotorom pokazala su da se površinske molekule D^b izražavaju i u tim stanicama, ali ne postižu potpunu konformaciju (170).

Osim mišjih, i humane nekonformirane MHC-I molekule (HLA-I) se također mogu izražavati na staničnoj površini. Tako je pokazano da se na nekim staničnim linijama na površini mogu naći molekule HLA-Cw6, HLA-B27, HLA-E, a ponekad i HLA-G (160, 176, 177).

Kako **nastaju prazne molekule**, još je predmetom rasprave i nije u potpunosti poznato. Mogu nastati tijekom biosintetskog ili endocitoznog puta. Što se tiče *biosintetskog puta*, poznato je da se zreli, glikozilirani (Endo H pozitivni) oblici ovih molekula L^d pojavljuju nakon 3 staa što ukazuje da prazne molekule mogu napuštati endoplazmatsku mrežicu i dalje se prerađivati u Golgijevu aparatu (168). No, i dalje se ne zna kako su oni nastali. No, ako su i nekonformirane molekule zaobišle kontrolnu točku u ER, samo malom postotku molekula to uspijeva. Naime, isključivo kod velikog izražaja MHC-I molekula, nekonformirane molekule L^d se mogu uočiti na staničnoj površini (kod prirodno velikog izražaja u stanicama P815, transfekcije u stanicama L-L^d ili stimulacije IFN γ u fibroblasti Balb 3T3, B12 ili MEF, (slika 25 i nije prikazano).

U našim pokusima smo pokazali da se nekonformirane molekule L^d u pravilu ne kolokaliziraju s GM130, markerom *cis*-GA (slike 29 i 75). Međutim, daljnjim ispitivanjem na stanicama Balb 3T3 ustanovili smo da djelomičan, iako upitan, stupanj kolokalizacije postoji s Vti1a, markerom koji ukazuje na nazočnost molekula u *trans*-GA, te nešto i u sekretornim vezikulama. Kako se područje GA prikazuje dosta kompaktno, tako da kolokalizacija nije jasna, u svrhu boljeg uočavanja kolokalizacije, stanice smo tretirali nokodazolom kako bismo postigli raspršivanje GA i njegovog sadržaja, te ustanovili da, iako slaba, i dalje postoji kolokalizacija s Vti1a (slika 75b), za razliku od GM130, s kojim i dalje kolokalizacije nema. Kao kontrolne molekule su korištene pune

molekule D^d , koje su se djelomično kolokalizirale s markerima GA, te pune molekule L^d , koje su se znatno, do gotovo potpuno kolokalizirale s markerima GA, što je i očekivano s obzirom na njihovu gotovo potpunu lokalizaciju u tom području. Bitno je istaknuti da je stupanj kolokalizacije bio jednak u netretiranim stanicama kao i nakon dodatka inhibitora (slika 75). Ovaj izostanak kolokalizacije nekonformiranih molekula L^d s markerom *cis*-GA, te male, ali zamjetne kolokalizacije s markerom *trans*-GA, ukazuje da ove molekule u načelu ne prolaze kontrolu u ER, ali da možda već djelomično mogu nastati raspadom iz punih u distalnijim i kiselijim dijelovima GA. To smo i potvrdili nakon ispitivanja stupnja kolokalizacije molekula L^d s Vti1a nakon tretmana stanica CHX (inhibicija sinteze proteina), bafilomicinom A_1 (inhibicija zakiseljavanja svih staničnih odjeljaka na kojima se nalazi V-ATPaza), ili njihovom kombinacijom. Naime nakon djelovanja bafilomicina A_1 , bilo samoga (praćenje endocitoznog i sekretornog puta), bio u kombinaciji sa CHX (praćenje samo endocitoznog puta), kolokalizacija nekonformiranih molekula L^d s Vti1a, potpuno izostaje, za razliku od punih molekula L^d kod kojih se signal u GA nakon tretmana samo s bafilomicinom A_1 čak i pojačava, najvjerojatnije uslijed izostanka pretvorbe u nekonformirane zbog alkalizacije. Prema tome, *nekonformirane molekule L^d mogu nastati djelomično i raspadom iz punih u sekretornom putu, ali ne uslijed zaobilaženja kontrole u ER, već dezintegracije konformiranih molekula u kiselim odjeljcima trans-GA.*

Nadalje, *nekonformirane molekule mogu nastati iz «starih» punih molekula L^d , bilo tijekom endocitoznog puta, bilo na staničnoj površini.* Da je ovaj mehanizam nastanka čak i vjerojatniji ukazuje nekoliko rezultata:

1. Konformirane molekule L^d se ne vide vezikularno, iako se endocitiraju i prate jednak endocitozni put kao i ostale konformirane molekule $H-2^d$ (slika 48).
2. Vezikularna ekspresija (bilo *steady state*, bilo nakon internalizacije) može se vidjeti nakon tretmana inhibitorima endosomalne acidifikacije (slike 86, 87, 92, 93, 96).
3. Izlaganje molekula gradijentu kiselog pH (4,5-7,4) tijekom 30 minuta smanjuje se površinski izražaj svih konformiranih molekula (K^d , D^d , i L^d), ali kod L^d učinak je najizrazitiji, te se i najranije (kod viših pH vrijednosti) počinje uočavati (na Balb 3T3 već kod pH 6,5). Nadalje kod vrijednosti pH koja odgovara onoj u LE (5,0) dezintegrirano je 70% punih molekula L^d , ali samo 10-30% molekula K^d i D^d (slika 82). Suprotno tome, ekspresija praznih (nekonformiranih) molekula L^d uglavnom se povećava proporcionalno padu ekspresije punih molekula L^d (slika 82). Sličan rezultat dobiven je i praćenjem molekula u staničnom lizatu (slika 83).

Da nakon smanjenja pH vrijednosti (5.5-6.0), MHC-I molekule gube stabilnu konformaciju trimolekularnog kompleksa, bilo da se nalaze na staničnoj površini (213, 248, 249), bilo da se nalaze u staničnom lizatu, pokazano je i u literaturi (88, 196, 250). Prema tome, ***nekonformirane molekule L^d mogu nastati iz konformiranih molekula L^d , kako u sekretornom, tako i u endocitoznom putu,*** i upravo je ovaj proces odgovoran za značajan gubitak punih molekula L^d tijekom endocitoznog puta, odnosno odsustvo vezikularne ekspresije u ustaljenom stanju.

Osim što nekonformirane molekule mogu nastati raspadom iz konformiranih, postoji mogućnost da se može dogoditi i obrnuto (nastanak konformiranih molekula iz nekonformiranih). Naime, proces *alternativnog nastanka*

MHC-I molekula, uz već dobro razjašnjen klasičan put (142), već je neko vrijeme poznat. Iako većina MHC molekula I razreda predočava endogene antigene, na način kako je ranije opisano, postoji također i mogućnost predočavanja egzogenog antigena, a u tom procesu prvenstveno sudjeluju APC (antigen-predočne stanice). Prema tome, MHC-I molekule alternativno mogu nastati na dva, prethodno opisana načina, odnosno putovima ovisnim, odnosno neovisnim o TAP kompleksu (odjeljak 1.3.4.). Prvim načinom u MHC-I molekule se pune peptidi koji ne nastaju u klasičnim endosomnim/lizosomnim odjeljcima, a za njihov nastanak potrebna je aktivnost TAP-kompleksa i proteasoma. Drugim načinom nastaju MHC-I molekule koje se pune peptidima nastalim najčešće razgradnjom u kiselim endosomalnim odjeljcima. Jedan od načina je da se upravo tamo pune endocitirane MHC-I molekule koje su otpustile peptid uslijed niskog pH čime se dopušta izmjena peptida između MHC-I molekula (274). Naravno da stupanj vezivanja peptida, odnosno njegov afinitet ima važnu ulogu u ovom procesu (164, 220, 221).

Neovisno o načinu alternativnog nastanka MHC-I molekule, osim procesa međusobne izmjene peptida između konformiranih molekula, moguć je i proces punjenja praznih molekula, a u njemu bi ulogu upravo mogle imati prazne molekule L^d . Već je pokazano da blokiranje površinskih praznih molekula L^d na stanicama P815 pomoću mPt 64-3-7 onemogućuje L^d -restriktivno predočavanje odgovarajućih peptida nakon što je stanica bila podražena HbsAg česticama (168), što ukazuje da se površinske "prazne" molekule L^d internaliziraju, pune peptidom nastalim iz endocitiranih čestica HbsAg, povezuju s β_2 -m (time prelaze u stabilnu, trimernu 30-5-7⁺ konformaciju), te recikliraju natrag prema staničnoj površini predočavajući HbsAg. Na jednak način isti put istih molekula opisan je i na dendritičnim stanicama (225). Suprotno tome, izgleda da se pune molekule L^d mogu puniti egzogenim peptidom izravno na staničnoj površini, i to prvenstveno peptidom koji je izbačen iz stanice nakon fagocitoze i proteolitičke razgradnje HbsAg agregata – proces regurgitacije (168). Nadalje, uočeno je da egzogeno dodan peptid (125 I-CMV peptid) u staničnom lizatu povećava udio 30-5-7⁺ molekula L^d na račun smanjenja 64-3-7⁺ L^d . Poluvrijeme iznosi ~2 min, a plato se postiže nakon ~2h. Dokazano je da je upravo peptid izazvao da 64-3-7⁺ L^d postignu stabilnu konformaciju i prijeđu u 30-5-7⁺ L^d (275).

Naši pokusi ukazuju da **konformirane molekule L^d mogu nastati iz nekonformiranih najvjerojatnije u kiselim endosomalnim odjeljcima** (slike 89 i 90), što je prvenstveno pokazano činjenicom da se 4 sata nakon uklanjanja površinskih molekula L^d kratkotrajnim zakiseljavanjem postiže oko 60% početnog izražaja. Međutim, ako su stanice P815 bile izložene djelovanju filipina, koji sprječava endocitozu praznih molekula, postignuto je samo 40% početnog izražaja, vjerojatno kao posljedica sinteze (slika 90). Zanimljivo je da su stanice koje su cijelo vrijeme bile izložene fiziološkom pH, ali uz dodatak filipina, također izražavale nešto manje punih molekula L^d u usporedbi s kontrolnim stanicama. Prema tome, obzirom da inhibicija endocitoze nekonformiranih molekula L^d uzrokuje smanjenje površinskog izražaja, zaključili smo da njihov dotok u endocitozne odjeljke djelomično doprinosi i površinskom izražaju konformiranih molekula L^d .

Prema dosadašnjim spoznajama logično je da je u procesu predočavanja egzogenih antigena važno recikliranje MHC molekula I razreda (222, 223). Međutim, postavlja se pitanje: kako reciklirajuće molekule dolaze u odjeljke niskog pH koji omogućava peptidnu izmjenu, kada se zna da je pH ranih endosoma 6,2, a reciklirajućih

endosoma i viši, odnosno oko 6,7. Jedno bi objašnjenje moglo biti da se promjena konformacije događa i pri ovakvom pH. No, barem prema našim rezultatima, za taj proces, čak i kod molekula L^d, potrebne su ipak nešto niže vrijednosti. Naime, pokazali smo da se pune molekule L^d dulje vremena (> 1 sat) i dalje dobro izražavaju u EE ako im se izlazak spriječi držanjem molekula na 16°C (slika 53a). Nadalje, raspoloživih peptida kod takvog pH je zacijelo manje, pa bi to bio i dosta velik rizik za stanicu da ne izgubi konformirane molekule. Obzirom da se molekule u ovim odjeljcima vrlo kratko izražavaju, otpuštanje peptida bi moglo za posljedicu imati to da, u nedostatku vremena, prethodno puna molekula ostane u praznoj konformaciji. No, u kasnim endosomima pH je znatno niži i raspoloživih peptida za punjenje više. Izgleda da ovakav alternativan način punjenja MHC-I molekula ne uključuje topive peptide, već upravo one nastale iz egzogenih endocitiranih proteina (276). Nakon toga, jednako kao i MHC-II molekule i MHC-I molekule bi mogle egzocitozom izaći iz stanice. Nalaze li se na graničnim membranama, kao kod dendritičkih stanica, predočavat će peptid na istoj stanici, zajedno s pridruženim kostimulacijskim molekulama (61). Ako su bile prisutne u unutarnjim membranama, kao kod limfocita B (neprofesionalnih predočnih stanica), izaći će iz stanice te u organizmu predočavati strani peptid. Ovakav proces stimulacije imunoloških stanica MHC-I molekulama nastalim alternativnim mehanizmom naziva se *cross-priming*.

Stanice za koje se prvenstveno pretpostavlja da sudjeluju u alternativnom načinu antigenskog predočavanja su upravo *antigen predočne stanice* (APC), prvenstveno makrofagi i dendritične stanice (168, 202, 203, 205, 217, 225, 275, 277), bilo da se radi o procesu ovisnom (202, 217) ili neovisnom o TAP kompleksu (168, 203, 205, 225, 275). One bi na taj način mogle imati važnu ulogu u započinjanju alternativnog imunološkog odgovora (*cross priminga*). Ove stanice su također i sposobne za predočavanje egzogenih antigena koji se nalaze u obliku *debrisa* iz inficiranih mrtvih ili umirućih stanica (278). Nadalje, poznato je da dendritične stanice iz koštane srži (engl. *bone marrow derived dendritic cells* – BMDC) mogu započeti CTL odgovor, npr. nakon pulsiranja peptidom *in vitro* (279) ili proteinskim antigenima (280). BMMΦ (makrofazi nastali iz koštane srži) također mogu predočavati strani antigen u uvjetima *in vitro* (208). Isto tako, pokazano je da imortalizirane linije dendritičnih stanica mogu započeti CTL odgovor *in vivo*, nakon što su bili izloženi solubilnom egzogenom antigenu *in vitro* (261). BMDC su predočavali egzogeni OVA isključivo preko klasičnog puta nastanka MHC-I molekula. Poznato je i da vakcinacija miševa s HBsAg česticama, uspješno započinje CTL odgovor, ukazujući da dendritičke stanice koje su internalizirale HBsAg čestice (ali nisu primile nikakav dodatni signal) mogu potaknuti CTL *in vivo* (168).

Da egzosomi odista mogu stimulirati imunološke stanice pokazano je *in vitro* i *in vivo*. Tako su egzosomi nastali iz limfocita B *in vitro* stimulirali CD4⁺ stanice (276), a DC stimulirane tumorskim peptidima izlučivale su egzosome s MHC-I molekulama napunjenim tumorskim antigenima, te su nakon stimulacije citotoksičnih limfocita T uzrokovali tumorski odgovor *in vivo* (99). Zanimljivo je da i tumorske stanice stvaraju egzosome koji nose tumorske antigene i njima potiču CD8-ovisan protutumorski odgovor (281). Nadalje, egzosomi nastali iz mastocita koštane srži potakli su stvaranje T- i B- blasta, njihovu proliferaciju, te stvaranje IL2 i IFN γ *in vitro* i *in vivo* (276). Ove studije dovode do zaključka da egzosomi mogu izravno međudjelovati s limfocitima T, a na egzosomima nakupljeni MHC-I kompleksi dodatno potiču aktivaciju (282).

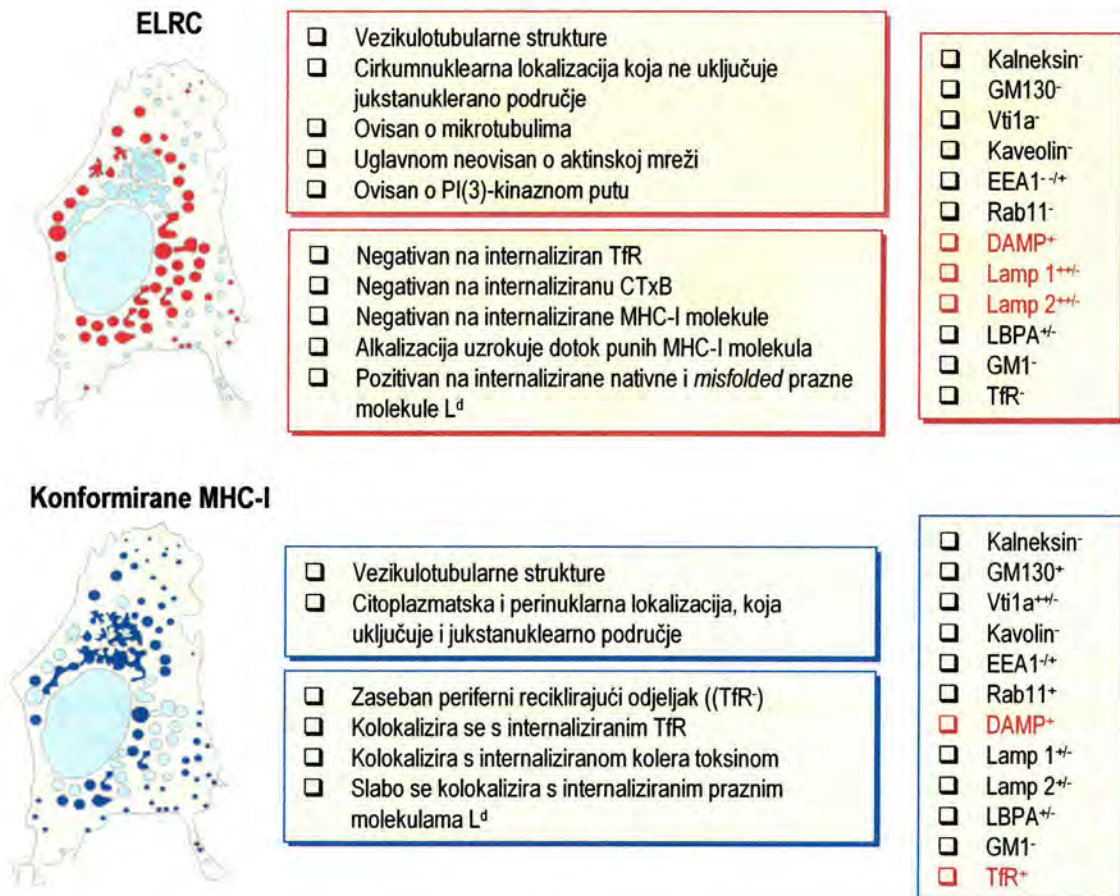
Zanimljivo je da i stanice koje se ne ubrajaju u predočne mogu sudjelovati u procesu alternativnog predočavanja peptida. Tako je dokazano da egzogene antigene svojim MHC-I molekulama mogu predočavati i *neutrofil* (216), jednako kao i *fibroblast* (283, 284). Neutrofil aktivno prerađuju bakterije alternativnim načinom i predočavaju novonastale MHC-I molekule limfocitoma T. Ovaj proces uključuje vakuolarni mehanizam, nakon čega dolazi do regurgitacije (izbacivanja peptida). Autoregurgitacija ima za posljedicu predočavanje peptida na istoj stanici, dok transregurgitacija, predočavanje na susjednim stanicama (190). Kostimulacijske molekule (kao što su CD80 i CD86) se ne izražavaju, ili se vrlo slabo izražavaju na površini neutrofila, te stoga oni i ne mogu aktivirati naivne limfocite T. Tako će njihovo izravno međudjelovanje teško započeti primarni T stanični odgovor. Međutim, efektorske stanice T mogu odgovoriti na izravnu antigensku prezentaciju na različite načine, npr. tako da započnu citokinsku produkciju, ali i tako što ova prezentacija može dovesti i do amplifikacije CD8 odgovora ili produženja života CD8 memorijskih stanica. No, u slučaju transregurgitacije, APC mogu migrirati do limfnih čvorova i predočiti antigen naivnim limfocitima T, čime započinju *cross-priming* i imunološki odgovor. Razumijevanje ovih procesa je izuzetno važno, prvenstveno jer bi pomoglo u razvoju novih cjepiva čiji bi se mehanizam zasnivao upravo na alternativnom predočavanju MHC molekulama I razreda.

Ipak, pored konformiranih MHC-I molekula, bez obzira na način kako su nastale, bitno je napomenuti da i nepravilno svijene (*misfolded*) MHC-I molekule imaju ulogu u kontroli aktivacije citotoksičnih limfocita T. Naime, vrlo često one nekonformirane MHC-I molekule koje se nalaze u obliku slobodnih teških lanaca, pokazuju sklonost nakupljanju i povezivanju (178), a pokazano je da stvaranje ovih MHC-I kompleksa ima svrhu kako bi i nekonformirane molekule bile prepoznate od strane citotoksičnih limfocita T (179). Također je poznato i da slobodni teški lanci molekula D^b mogu uzrokovati imunološku reakciju (163).

Prema svemu gore navedenom, prazne MHC-I molekule mogu u stanici igrati vrlo važnu ulogu. Kako bismo je bolje istražili, ispitali smo odjeljke u kojima se nakupljaju. Već smo ranije naveli da se vrlo često vide u vidu velikih vezikularnih ili vezikulotubularnih tvorbi vrste C, koje su različite od ostalih, manje-više difuznih staničnih struktura u kojima ih možemo naći (slika 25). Obzirom da se u njima nekonformirane molekule L^d zadržavaju (slika 98), nazvali smo ga **ELRC** (engl. *empty L^d retention compartment*, odnosno odjeljak za zadržavanje praznih molekula L^d). Osnovna obilježja ovog odjeljka i njegov odnos prema odjeljcima u kojima se nakupljaju konformirane MHC-I molekule prikazan je na slici 109. Uočavamo da su ove strukture **kiselog pH** (slika 99c), a **kolokaliziraju se isključivo, mada ne i potpuno, s markerima kasnih odjeljaka** (slike 46 i 55 i 99c). Ipak, **gotovo potpuno se kolokaliziraju s internaliziranim nekonformiranim molekulama L^d, što ukazuje da su endocitoznog porijekla** (slike 97 i 99e). No, vrlo se slabo kolokaliziraju s punim molekulama K^d i D^d, a gotovo nimalo s TfR (slika 99). Nakon tretmana bafilomicinom A₁, kao posljedica zadržavanja konformiranih MHC-I molekula u kasnim odjeljcima, kolokaliziraju se s konformiranim MHC-I molekulama, ali i dalje ne i s TfR (slike 99 i 100). U tom slučaju, kao i nakon tretmana ostalim lizosomotropnim tvarima, zapaža se pojava velikih vakuolarnih tvorbi koje se, osim s konformiranim MHC-I molekulama, kolokaliziraju i s Lamp1 (slike 92 i 103). Nadalje, ELRC se **ne kolokaliziraju se s markerima sekretornog puta, kao niti s EEA1** (slike 99 b i c).

Iako se ne kokaliziraju s tubulinom i aktinom, **vrlo često se vezikule i vezikulo-tubularne strukture mogu naći u blizini citoskeletnih niti, ili na njima** (slika 99b). Ova povezanost je logičan rezultat, jer smo pokazali da kasni odjeljci inače ovise o mikrotubularnoj mreži, te da se ELRC nakon djelovanja nokodazola pomiče periferno, a kasnije i gubi (slika 101). Nadalje, nakon tretmana stanica taksolom (stabilizator mikrotubula, ali ih čini nefunkcionalnim) nekonformirane molekule L^d se znatno slabije internaliziraju, te je ekspresija kako endocitiranih, tako i *steady state* nekonformiranih molekula L^d znatno slabija (slika 102). Za razliku od tretmana nokodazolom i taksolom, dezintegracija aktinskog citoskeleta latrunkulinom A ili citohalazinom D dovodi do kondenziranja vezikula, ali one općenito ne mijenjaju svoju lokalizaciju. Međutim površinski izražaj nekonformiranih molekula L^d se znatno smanjuje (slika 101).

Na promjenu obrasca izražaja ELRC također djeluje i LY294002, inhibitor PI(3)K, koji u početku uzrokuje pojavu vakuoliziranja ELRC, što nastaje vjerojatno kao posljedica nemogućnosti da se u tom odjeljku stvaraju luminalne vezikule. Nakon 6 sati broj velikih vezikula/vakuola je najveći, ali potom počinje opadati, tako da je nakon 14 sati situacija obrnuta i pretežu manje vezikule (slika 104). Ovakva pojava bubrenja, a potom skvrčavanja vezikula je opisna u literaturi, a vjerojatno nastaje i kao posljedica gubljenja aktivnosti inhibitora koji nije dugoživući (90).

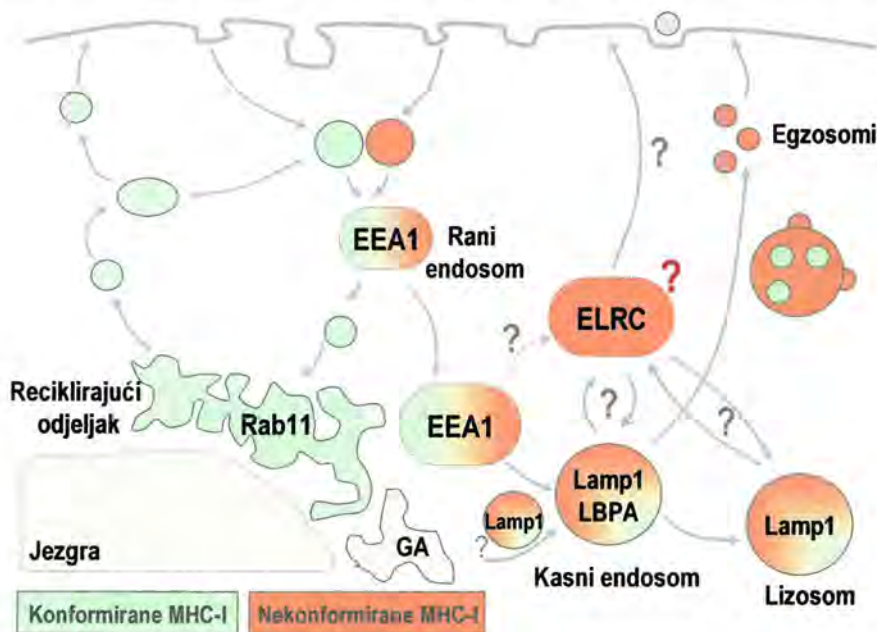


Slika 109. Obilježja ELRC odjeljka u usporedbi s odjeljkom u koji se smještaju konformirane MHC-I molekule.

Stoga zaključujemo da **dinamika punjenja i pražnjenja ELRC znatno ovisi o mikrotubulima, pH, te PI(3)K**. Tako lizosomotropne tvari potiču njegovo punjenje (nemogućnost odtoka uz stalan dotok), dok dezintegracija

citoskeleta dovodi do njegovog pražnjenja (raspršenje vezikula koje su uglavnom vezane uz dinamiku mikrotubula). Na kraju, inhibicija PI3K dovodi do mijenjanja oblika vezikula od vakuolarnih prema sitnozlastim. Narušavanje svake od ovih komponenti dovodi do narušavanja strukture i funkcije ELRC. Morfološke promjene su sigurno posljedica narušavanja ravnoteže kinetike punjenja i pražnjenja ovih vezikula, što se događa vjerojatno vrlo složenim mehanizmom. Za očekivati je da svaka od ovih promjena djeluje i na normalno odvijanje procesa alternativnog predočavanja.

Zadržavanje molekula u odjeljcima obično se događa s nekom svrhom. Tako se IRAP, također brzo endocitra, ali sporo reciklira iz ERC ($t_{1/2} \sim 30$ min) (77), reagirajući uglavnom na djelovanje inzulina. Jednako tako, u odsustvu inzulina, i GLUT4 se iz ERC prenosi u IRC (engl. *insulin regulated compartment*) koji predstavlja vrstu retencijskog odjeljka, te postaje jednoliko raspoređen između ERC i IRC (285). Time se ove molekule u odsustvu inzulina ne izražavaju nepotrebno na staničnoj površini. Nadalje, osim u reciklirajućim odjeljcima zadržavanje se može događati i u kasnim odjeljcima, put koji, primjerice, slijedi CD63, inače korišten kao marker LE i lizosoma (119). On se zadržava u kasnim endosomima, prije prelaska u TGN, te kasnije na PM. Zanimljivo je da se on, niti nakon tako dugog boravka u ovim odjeljcima ne degradira, a smatra se da je za to zaslužna molekula LBPA (94, 286).



Slika 110. Odnos ELRC odjeljka u odnosu na ostale odjeljke i endocitozni put MHC-I molekula. Hipotetski smještaj ELRC je prikazan u odnosu na konformirane MHC-I molekule i kasne odjeljke. Detaljnije objašnjenje nalazi se u tekstu.

Na kraju, hipotetski smještaj nekonformiranih MHC-I (L^d) molekula u stanici, u odnosu na konformirane MHC-I molekule je prikazan na slici 110. Za sada još ne možemo sa sigurnošću reći podrazumijeva li ELRC zaseban odjeljak, kombinaciju samostalnog odjeljka i klasičnih kasnih odjeljaka (LE i lizosomi), ili u potpunosti predstavlja kasne odjeljke. No, bitno mu je obilježje da se u njemu nekonformirane molekule L^d zadržavaju. Iako se na početku, površno gledano, može postaviti pitanje, ima li smisla zadržavanje molekula koje nemaju pravilnu konformaciju, za koje se može reći da su nedovršene, nefunkcionalne, a time i nepotrebne. Očigledno to nije tako. Naime, zdrava stanica neće dopustiti da se u njoj nakuplja ono što joj nije potrebno, te, prema tome,

očigledno smatra da joj (kao i cijelom organizmu) nekonformirane molekule trebaju. I to ne toliko na staničnoj površini, koliko u njoj samoj, odnosno u ovim odjeljcima gdje će možda upravo ove molekule nepravilnog i nefunkcionalnog izgleda dati svoj doprinos u odvijanju jedne važne faze imunološkog odgovora, alternativnog procesa antigenskog predočavanja, a čiji mehanizam znanost tek treba rasvijetliti.

6. ZAKLJUČCI

1. Konformirane i nekonformirane MHC-I molekule se odjeljuju u zasebne membranske mikrodomene. Nekonformirane MHC-I molekule se, jednako kao i GM₁, nalaze u membranama otpornim na djelovanje detergenata (DRM; lipidne splavi), dok se konformirane molekule, jednako kao i TfR, nalaze u membranama osjetljivim na djelovanje detergenata (DSM), kako na plazmatskoj membrani, tako i u membranama unutrašnjih odjeljaka.
2. Na staničnoj površini konformirane MHC-I molekule se međusobno kolokaliziraju ali se ne kolokaliziraju s TfR. Nekonformirane molekule se slabo kolokaliziraju s konformiranim molekulama i GM₁.
3. MHC-I molekule se premještaju iz jedne domene u drugu ovisno o konformaciji.
4. Razdvajanje konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula vidljivo je i unutar stanice. Konformirane MHC-I molekule međusobno se u potpunosti kolokaliziraju, posebice molekule K^d i D^d, ali je znatno slabiji stupanj kolokalizacije, ponekad i potpuno odsutan, između konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula.
5. Konformirane MHC-I molekule u stanicu ulaze masovnim putem (*bulk pathway*), dok je endocitoza nekonformiranih MHC-I molekula ovisna o kolesterolu, i vjerojatno se odvija preko lipidnih splavi. Oba načina se razlikuju od mehanizma ulaska TfR (klatrinska endocitoza).
6. Putovi konformiranih i nekonformiranih MHC-I molekula se vrlo brzo spajaju u ranim endosomima, da bi se kasnije ponovo razdvojili. Konformirane MHC-I molekule se nakon izlaska iz ranih endosoma najvjerojatnije recikliraju, za razliku od nekonformiranih molekula.
7. Sve ispitivane molekule dolaze do kasnih (LBPA/Lamp1 pozitivnih) odjeljaka, ali u različitom stupnju (nekonformirane molekule se usmjeravaju većim dijelom u tom pravcu, za razliku od konformiranih).
8. U kasnim endosomima se dio molekula usmjerava u degradaciju, a dio se vjerojatno izbacuje egzocitozom. Pretpostavljamo da su nekonformirane molekule L^d, većim dijelom smještene u graničnim membranama kasnih odjeljaka, a konformirane MHC-I molekule većinom u unutarnjim membranama.
9. Prema gore navedenom, sortiranja površinskih glikoproteina tijekom njihova endocitoznog puta događa se na tri mjesta: plazmatskoj membrani (vrsta endocitoze), ranim endosomima (recikliranje ili kasni odjeljci) i kasnim endosomima (degradacija ili egzocitoza).
10. Endocitozni put i unutarstanični smještaj MHC-I molekula ovisi o funkcionalnom citoskeletu, prvenstveno mikrotubulima).
11. Nekonformirane molekule L^d najvećim dijelom nastaju raspadom konformiranih molekula L^d pri prijelazu iz ranih endosomalnih odjeljaka u kiselije kasne endosome. Pretvorba konformiranih u nekonformirane L^d

molekule može se odvijati i u sekretornom putu, u kiselim cisternama *trans*-Golgijsa. Konformirane molekule L^d najvjerojatnije mogu nastati iz nekonformiranih u kiselim endosomalnim odjeljcima.

12. Nekonformirane molekule L^d se nakupljaju i neko vrijeme zadržavaju u retencijskom odjeljku (ELRC) koji ima sljedeće osobine: kiseli pH lumena (<6,0), nazočnost markera kasnih endosomalnih odjeljaka, odsustvo markera sekretornog i ranog endosomalnog puta, slaba dostupnost (mali stupanj kolokalizacije) konformiranim MHC-I molekulama. Punjenje ELRC nekonformiranim L^d molekulama ovisi o mobilnosti kasnih endosomalnih membrana i sekvenciji kolesterola koju vrši LBPA u početnom dijelu kasnih endosoma. ELRC je retencijski odjeljak koji nastaje endocitoznim usmjeravanjem nekonformiranih molekula L^d a dinamika punjenja i pražnjenja znatno ovisi o mikrotubulima, pH, te o aktivnosti PI(3)K.

7. LITERATURA

1. Pfeffer S. Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell* 2003;112:507-17.
2. Smith CJ, Grigorieff N, Pearse BM. Clathrin coats at 21Å resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors. *EMBO J* 1998;17:4943-53.
3. Anderson RGW, Jacobson K. A role of lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 2002;296:1821-25.
4. London E. How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1746:203-20.
5. Wisniewska A, Draus J, Subczynski WK. Is a fluid-mosaic model of biological membranes fully relevant? Studies on lipid organization in model and biological membranes. *Cell Mol Biol Lett* 2003;8:147-159.
6. Helms JB, Zurzolo C. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* 2004; 5:247-54.
7. Ikonen E. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:470-7.
8. Simons K, Toomre D, Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:31-39.
9. Nichols B. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci* 2003;116:4707-14.
10. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387:569-72.
11. Smaby JM, Momsen M, V.S. Kulkarni VS i Brown RE. Cholesterol-induced interfacial area condensations of galactosylceramide and sphingomyelins with identical acyl chains. *Biochemistry* 1996;35:5696-5704.
12. Silvius JR. Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim Biophys Acta* 2003;1610:174-183.
13. Lucero HA, Robbins PW. Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch Bioch Bioph* 2004;426:208-224.
14. Oliferenko S, Paiha K, Harder T i sur. Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 1999;146:834-54.
15. Goebel J, Forrest K, Flynn D, Rao R, Roszman TL. Lipid rafts, major histocompatibility complex, and immune regulation. *Hum Immunol* 2002;63:813-20.
16. Sedwick CE, Altman A. Ordered just so: lipid rafts and lymphocyte function. *Sci STKE* 2002;122:RE2.
17. Lai EC. Lipid rafts make for slippery platforms. *J Cell Biol* 2003;162:365-70.
18. Mayor S, Rao M. Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic* 2004;:231-40.
19. Melkonian KA, Ostermeyer AG, Chen JZ, Roth MG, Brown DA. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem* 1999;274: 3910-3917.
20. Zhang W, Triple RP, Samelson LE. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 1998;9:239-246.
21. Pike LJ, Casey L. Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J. Biol. Chem* 1996; 271: 26453-26456.
22. Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 1992;68, 533-544
23. Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A, Simons K. Resistance of cell membranes to different detergents. *PNAS USA* 2003;100:5795-800.
24. Chamberlain LH. Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS Lett* 2004;559:1-5.
25. Chamberlain LH, Gould GW. The Vesicle- and Target-SNARE Proteins That Mediate Glut4 Vesicle Fusion Are Localized in Detergent-insoluble Lipid Rafts Present on Distinct Intracellular Membranes. *J Biol Chem* 2002;227:49750-49754.
26. Pike LJ. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* 2003;44:655-67.

27. Rajendran L, Simons K. Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* 2005;18:1099-102.
28. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 2003;422:37-44.
29. Hewlett LJ, Prescott AR, Watts C. The coated pit macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J Cell Biol* 1994;124:689-703.
30. Racoosin EL, Swanson JA. M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages. *J. Cell Sci* 1992;102:867-880.
31. Le Roy C, Wrana JL. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:112-26.
32. Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:121-132.
33. Bonifacino JS, Lippincott-Schwartz J. Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:409-14.
34. Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 2001;11:406-12.
35. Lamaze C, Schmid SL. The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:573-80.
36. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 1992;68:673-82.
37. Pelkmans L, Helenius A. Endocytosis via caveolae. *Traffic*. 2002 May;3(5):311-20.
38. Pfeffer S. Caveolae on the move. *Nat Cell Biol* 2001;3:E108-110.
39. Sandvig K, van Deurs B. Transport of protein toxins into cell: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett* 2002;529:49-53.
40. Torgesen ML, Skretting G, van Deurs B, Sandvig K. Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J Cell Sci* 2001;114:3737-47.
41. Orlandi PA, Fishmann PH. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol* 1998;141:905-15
42. Kirkham M, Fujita A, Chadda R i sur. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *J Cell Biol* 2005;168:465-76.
43. Sofer A, Futterman AH. Cationic amphiphilic drugs inhibit the internalization of cholera toxin to the Golgi apparatus and the subsequent elevation of cyclic AMP. *J Biol Chem* 1995;270(20):12117-22.
44. Spangler BD. Structure and function of the cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J Histochem Cytochem* 1999;47:1005-14.
45. Harder T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K. Domain Structure of the Plasma Membrane Revealed by Patching of Membrane Components. *J Cell Biol* 1998;141:929-942.
46. Spiegel S, Kassis S, Wilchek M, Fishman PH. Direct visualization of redistribution and capping of fluorescent gangliosides on lymphocytes. *J Cell Biol* 1984; 99:1575-1581.
47. Parton RG, Joggerst B, Simons K. Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 1994;127:1199-215.
48. Nabi IR, Le PU. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 2003;161:673-677.
49. Lamaze C, Dujeancourt A, Baba T, Lo CG, Benmearh A, Dautry-Varsat A. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* 2001;7:661-71.
50. Gauthier NC, Monzo P, Kaddai V, Doye A, Ricci V, Boquet P. *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin: a probe for a clathrin-independent and Cdc42-dependent pinocytic pathway routed to late endosomes. *Mol Biol Cell* 2005;16:4852-66.
51. Damke H, Baba T, van der Blik AM, Schmid SL. Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J Cell Biol* 1995;131:69-80.
52. Naslavsky N, Weigert R, Donaldson JG. Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Mol Biol Cell* 2004;15:3542-52.
53. Naslavsky N, Weigert R, Donaldson JG. Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. *Mol Biol Cell* 2003;14:417-31.
54. Huet C, Ash JF, Singer SJ. The antibody-induced clustering and endocytosis of HLA antigens on cultured human fibroblasts. *Cell* 1980;21:429-38.

55. Hansen SH, Sandvig K, van Deurs B. The preendosomal compartment comprises distinct coated and noncoated endocytic vesicle populations. *J Cell Biol* 1991;113:731-41.
56. Gruenberg J, Stenmark H. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:317-23.
57. Gilbert A, Paccaud JP, Foti M, Porcheron G, Balz J, Carpentier JL. Direct demonstration of the endocytic function of caveolae by a cell-free assay. *J Cell Sci* 1999;112:1101-10.
58. Mayor S, Sabharanjak S, Maxfield FR. Cholesterol-dependent retention of GPI-anchored proteins in endosomes. *EMBO J* 1998;17:4626-38.
59. McIntosh DP, Schnitzer JE. Caveolae require intact VAMP for targeted transport in vascular endothelium. *Am J Physiol* 1999;277:H2222-32.
60. van Dyke RW. Effect of cholera toxin and cyclic adenosine monophosphate on fluid-phase endocytosis, distribution, and trafficking of endosomes in rat liver. *Hepatology* 2000;2:1357-69.
61. Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intracellular signalling device. *J Cell Sci* 2000;113:3365-74.
62. van der Goot FG, Gruenberg J. Intra-endosomal membrane traffic. *TRENDS Cell Biol* 2006;16:514-521
63. De Matteis MA, Godi A. PI-3-otog membrane traffic. *Nat Cell Biol* 2004;6:487-492.
64. Presley JF, Mayor S, McGraw TE, Dunn KW i Maxfield FR. Bafilomycin A1 treatment retards transferrin receptor recycling more than bulk membrane recycling. *J Biol Chem* 1997;272:13929-36.
65. Johnson LS, Dunn KW, Pytowski B, McGraw TE. Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif. *Mol Biol Cell* 1993;4:1251-66.
66. Demaurex N. pH homeostasis of cellular organelles. *News Physiol Sci* 2002;17;1-5.
67. Paroutis P, Touret N, Grinstein S. The pH of the secretory pathway: measurement, determinants and regulation. *Physiol* 2004;19:207-215.
68. Miaczynska M, Zerial M. Mosaic organization of the endocytic pathway. *Exp Cell Res* 2002;;272:8-14.
69. Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 2005;122:735-49.
70. Hao M, Mukherjee S, Sun Y, Maxfield FR. Effects of cholesterol depletion and increased lipid unsaturation on the properties of endocytic membranes. *J Biol Chem* 2004;279:14171-8.
71. Radhakrishna H, Donaldson JG. ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J Cell Biol* 1997;139:49-61.
72. Sheff DR, Daro EA, Hull M, Melman I. The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes via different sorting functions. *J Cell Biol* 1999;145:123-39.
73. Hopkins CR, Trowbridge IS. Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A431 cells. *J Cell Biol* 1983;97:508-21.
74. Gruenberg J, Maxfield FR. Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:552-63.
75. Mayor S, Presley JF, Maxfield FR. Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *J Cell Biol* 1993;121:1257-1269.
76. Mallard F, Antony C, Tenza D, Salamero J, Goud B, Johannes L. Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *J Cell Biol* 1998;143:973-90.
77. Johnson AO, Subtil A, Petrush R, Kobylarz K, Keller SR, McGraw TE. Identification of an insulin-responsive, slow endocytic recycling mechanism in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1998;273:17968-77.
78. Wei ML, Bonzelius F, Scully RM, Kelly RB, Herman GA. GLUT4 and transferrin receptor are differentially sorted along the endocytic pathway in CHO cells. *J Cell Biol* 1998;140:565-75.
79. Mukherjee S, Maxfield FR. Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking. *Traffic* 2000;1:203-211.
80. Aniento F, Emans N, Griffiths N, Gruenberg J. Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol* 1993; 123:1373-1388.

81. Zaliauskiene L, Kang S, Brouillette CG, Lebowitz J, Arani RB, Collawn JF. Down-regulation of cell surface receptors is modulated by polar residues within the transmembrane domain. *Mol Biol Cell* 2000;11:2643-55.
82. Lin SX, Mallet WG, Huang AY, Maxfield FR. Endocytosed cation-independent mannose 6-phosphate receptor traffics via the endocytic recycling compartment en route to the trans-Golgi network and a subpopulation of late endosomes. *Mol Biol Cell* 2004;15:721-33.
83. Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze H, Raposo G. The biogenesis and function of exosomes. *Traffic* 2002;3:321-330.
84. Kleijmeer MJ, Escola JM, UytdeHaag FG i sur. Antigen loading of MHC class I molecules in the endocytic tract. *Traffic* 2001;2:124-37.
85. Piper RC, Luzio JP. Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic* 2001;2:612-21.
86. Lebrand C, Corti M, Goodson H i sur. Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *EMBO J* 2002;21:1289-300.
87. Gruenberg J. Lipids in endocytic membrane transport and sorting. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:382-8.
88. Kobayashi T, Beuchat MH, Chevallier J i sur. Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J Biol Chem*. 2002;277:32157-64.
89. Fivaz M, Vilbois F, Thurnheer S i sur. Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. *EMBO J* 2002;21:3989-4000.
90. Fernandez-Borja M, Wubbolts R, Calafat J i sur. Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Curr Biol* 1999;14:55-8.
91. Anderson RG, Brown MS, Beisiegel U, Goldstein JL. Surface distribution and recycling of the low density lipoprotein receptor as visualized with antireceptor antibodies. *J Cell Biol* 1982;92:523-531.
92. Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* 2003;13:137-45
93. van Deurs B, Holm PK, Kayser L, Sandvig K, Hansen SH. Multivesicular bodies in HEp-2 cells are maturing endosomes. *Eur J Cell Biol* 1993;61:208-24.
94. Kobayashi T, Beuchat MH, Lindsay M i sur. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol* 1999; 1:113-118.
95. Gruenberg J, Griffiths G, Howell KE. Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J Cell Biol* 1989 Apr;130:1-16.
96. Mullock BM, Bright NA, Fearon CW, Gray SR, Luzio JP. Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J Cell Biol* 1998;140:591-601.
97. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W i sur. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996;183:1161-72.
98. Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 1998;273:20121-7.
99. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A i sur. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 1998;4:594-600.
100. Sharma DK, Choudhury A, Singh RD, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE. Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling. *J Biol Chem* 2003;278:7564-72.
101. Schapiro FB., Lingwood C, Furuya W, Grinstein S. pH-independent retrograde targeting of glycolipids to the Golgi complex 1998 *Am. J. Physiol*;274; C319-C332.
102. Tran D, Carpentier JL, Sawano F, Gordon P, Orci L. Ligands Internalized through Coated or Noncoated Invaginations Follow a Common Intracellular Pathway 1987 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7957-7961.
103. Gleizes PE, Noaillacdepeyre J, Dupont MA, Gas N. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) is addressed to caveolae after binding to the plasma membrane of BHK cells. 1996 *Eur. J. Cell Biol.* 71, 144-153.
104. Nichols BJ, Kenworthy AK, Polishchuk RS i sur. Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J Cell Biol* 2001;153:529-541.

105. Pelkmans L, Puntener D, Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 2002;296:535-9.
106. Nichols BJ. A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 2002;4:374-8.
107. Sabharanjak S, Sharma P, Parton RG, Mayor S. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell* 2002;2:411-23.
108. D'Souza-Schorey CG, Li G, Colombo MI, Stahl PD. A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science* 1995; 267:1175-1178.
109. Radhakrishna H, Klausner RD, Donaldson JG. Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase. *J. Cell Biol* 1996;134: 935-947.
110. Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12: 575-625.
111. Brown FD, Rozelle AL, Yin HL, Balla T, Donaldson JG. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol* 2001;154:1007-17.
112. Galas MC, Helms JB, Vitale N, Thierse D, Aunis D, Bader MF. Regulated exocytosis in chromaffin cells. A potential role for a secretory granule-associated ARF6 protein. *J Biol Chem* 1997;272:2788-2793.
113. Holttä-Vuori M, Tanhuanpää K, Mobius W, Somerharju P, Ikonen E. Modulation of cellular cholesterol transport and homeostasis by Rab11. *Mol Biol Cell* 2002;13:3107-22.
114. Nilsson T, Lucocq JM, Mackay D, Warren G. The membrane spanning domain of beta-1,4-galactosyltransferase specifies trans Golgi localization. *EMBO J* 1991;10:3567-3575.
115. Cosson P, Lefkir Y, Demolliere C, Letourneur F. New COP1-binding motifs involved in ER retrieval. *EMBO J* 1998;17:6863-6870.
116. Johnson AO, Lampson MA, McGraw TE. A di-leucine sequence and a cluster of acidic amino acids are required for dynamic retention in the endosomal recycling compartment of fibroblasts. *Mol Biol Cell* 2001;12:367-81.
117. Chatterjee S, Smith ER, Hanada K, Stevens VL, Mayor S. GPI anchoring leads to sphingolipid-dependent retention of endocytosed proteins in the recycling endosomal compartment. *EMBO J* 2001;20:1583-92.
118. Keller P, Simons K. Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J. Cell Sci* 1997;110: 3001-3009.
119. Kobayashi T, Vischer UM, Rosnoble C i sur. The tetraspanin CD63/lamp3 cycles between endocytic and secretory compartments in human endothelial cells. *Mol Biol Cell* 2000;11:1829-43.
120. Futter CE, Pearse A, Hewlett LJ, Hopkins CR.. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol* 1996;132:1011-1023.
121. Wilkening G, Linke T, Sandhoff K. Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators. *J Biol. Chem* 1998; 273:30271-30278.
122. Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de Moerloose P, Parton RG, Gruenberg J. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 1998;392:193-197.
123. Brotherus J, Renkonen O, Herrmann J, Fisher W. Novel stereochemical configuration in lysobisphosphatidic acid of cultured BHK cells. *Chem Phys Lipids* 1974;13:178-182.
124. Griffiths G, Hoflack B, Simons K., Mellman I, Kornfeld S. The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* 1988;52:329-341.
125. Heijnen HF, Debili N, Vainchencker W, Breton-Gorius J, Geuze HJ, Sixma JJ . Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood* 1998;91:2313-2325.
126. Kim JH, Johannes L, Goud B i sur. Noninvasive measurement of the pH of the endoplasmic reticulum at rest and during calcium release. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2997-3002.
127. Wu MM, Grabe M, Adams S, Tsien RY, Moore HP, Machen TE. Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. *J Biol Chem* 2001;276:33027-33035.
128. Nishi T, Forgac M. The vacuolar (H⁺)-ATPases-nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:94-103.
129. Barasch J, Al-Awqati Q. Chloride channels, Golgi pH and cystic fibrosis. *Trends Cell Biol* 1992;2:35-37.

130. Chanat E, Huttner WB. Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 1991;115:1505-1519.
131. Puri S, Bachert C, Fimmel CJ, Linstedt AD. Cycling of early Golgi proteins via the cell surface and endosomes upon luminal pH disruption. *Traffic* 2002;3: 641-653.
132. Schmidt WK, Moore HP. Ionic milieu controls the compartment-specific activation of pro-opiomelanocortin processing in AtT-20 cells. *Mol Biol Cell* 1995;6:1271-1285.
133. Sautin YY, Lu M, Gaugler A, Zhang L, Gluck SL. Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated effects of glucose on vacuolar H⁺-ATPase assembly, translocation, and acidification of intracellular compartments in renal epithelial cells. *Mol Cell Biol* 2005;25:575-89.
134. Beyenbach KW, Wieczorek H. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Med*. 2006;209:577-89.
135. Huss M, Ingenhorst G, König S i sur. Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V₀ subunit c. *J. Biol. Chem* 2002.;277:40544 -40548.
136. Harada M, Shakado S, Sakisaka S i sur. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of V-type H⁺-ATPases, inhibits the acidification of endocytic structures and inhibits horseradish peroxidase uptake in isolated rat sinusoidal endothelial cells. *Liver* 1997;17:244-250.
137. Damm EM, Pelkmans L, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Kurzchalia T, Helenius A. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol* 2005;168:477-88.
138. Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I - restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 1998;16:323-58.
139. Früh K, Yang Y. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr Opin Immunol* 1999;11:76-81.
140. Nathenson SG, Uehara H, Ewenstein BM, Kindt TJ, Coligan JE. Primary structural: analysis of the transplantation antigens of the murine H-2 major histocompatibility complex. *Annu Rev Biochem* 1981;50:1025-52.
141. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987;329:506-12.
142. Grommé M, Neeffjes J. Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol* 2002;39:181-202.
143. Bruce Alberts B, Alexander Johnson A, Julian Lewis J, Martin Raff M, Keith Roberts K, Peter Walter P. *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Science: 2002, 1400.
144. Madden DR. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 1995;13:587-622.
145. Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 2000;404:770-774.
146. Reits EA, Vos JC, Grommé M, Neeffjes J. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 2000;404:774-778.
147. Yewdell JW. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol* 2001;11:294-297.
148. Vassilakos A, Cohen-Doyle MF, Peterson PA, Jackson MR, Williams DB. The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *EMBO J* 1996;15:1495-506.
149. Grandea AG 3rd, Van Kaer L. Tapasin: an ER chaperone that controls MHC class I assembly with peptide. *Trends Immunol* 2001;22:194-9.
150. van Endert PM. Genes regulating MHC class I processing of antigen. *Curr Opin Immunol* 1999;11:82-8.
151. Harris MR, Yu YY, Kindle CS, Hansen TH, Solheim JC. Calreticulin and calnexin interact with different protein and glycan determinants during the assembly of MHC class I. *J Immunol* 1998;160:5404-9.
152. Peh CA, Laham N, Burrows SR, Zhu Y, McCluskey J. Distinct functions of tapasin revealed by polymorphism in MHC class I peptide loading. *J Immunol* 2000;164:292-9.
153. Hughes EA, Hammond C, Cresswell P. Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1896-1901.

154. Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED i sur. Nomenclature for factors of the HLA System 1996. *Hum. Immunol* 1997;53:98-128.
155. Hansen T, Balendiran G, Solheim J, Ostrov D, Nathenson S. Structural features of MHC class I molecules that might facilitate alternative pathways of presentation. *Immunol Today* 2000;21:83-8.
156. Balendiran GK, Solheim JC, Young AC, Hansen TH, Nathenson SG, Sacchettini JC. The three-dimensional structure of an H-2L^d-peptide complex explains the unique interaction of L^d with β_2 -microglobulin and peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:6880-5.
157. Mahmutefendic H, Kucic N, Lucin P. Distinct pathways for constitutive endocytosis of fully conformed and non-conformed L^d molecules. *Am J Reprod Immunol* 2002;48:87-95.
158. Mahmutefendic H, Blagojevic G, Kucic N, Lucin P. Constitutive internalization of murine MHC class I molecules. *J Cell Physiol* 2007;210:445-55.
159. Thor G, Sepulveda H, Chada S, Dutton RW. Monoclonal antibody that distinguishes between a phosphorylated, beta 2-microglobulin-associated, and a free, nonphosphorylated, chain of MHC class I. *J Immunol* 1993;151:211-24.
160. Malik P, Klimovitsky P, Deng LW, Boyson JE, Strominger JL. Uniquely conformed peptide-containing beta 2-microglobulin-free heavy chains of HLA-B2705 on the cell surface. *J Immunol* 2002;169:4379-87.
161. Burshtyn DN, Barber BH. Dynamics of peptide binding to purified antibody-bound H-2D^b and H-2D^b beta2-m complexes. *J Immunol* 1993;151:3082 - 3093.
162. Williams DB, Barber BH, Flavell RA, Allen H. Role of beta 2-microglobulin in the intracellular transport and surface expression of murine class I histocompatibility molecules. *J Immunol* 1989;143:2796-2806.
163. Bix M, Raulet D. Functionally conformed free class I heavy chains exist on the surface of beta2-microglobulin negative cells. *J Exp Med* 1992;176:829-34.
164. Cook JR, Myers NB, Hansen TH. The mechanisms of peptide exchange and β_2 -microglobulin exchange on cell surface L^d and K^b molecules are noncooperative. *J Immunol* 1996;157:2256-61.
165. Parker KC, DiBrino M, Hull L, Coligan JE. The beta 2-microglobulin dissociation rate is an accurate measure of the stability of MHC class I heterotrimers and depends on which peptide is bound. *J Immunol* 1992;149:1896 - 1904.
166. Beck JC, Hansen TH, Cullen SE, Lee DR. Slower processing, weaker β_2 -microglobulin association, and lower surface expression of H-2L^d are influenced by its amino terminus. *J Immunol* 1986;137: 916-923.
167. Lie WR, Myers NB, Gorka J, Rubocki RJ, Connolly JM, Hansen TH. Peptide ligand-induced conformation and surface expression of the L^d class I MHC molecule. *Nature* 1990;344:439-41.
168. Schimbeck R, Reimann J. 'Empty' L^d molecules capture peptides from endocytosed hepatitis B surface antigen particles for major histocompatibility complex class I-restricted presentation. *Eur J Immunol* 1996;26:2812-22.
169. Ribaldo RK, Margulies DH. Polymorphism at position nine of the MHC class I heavy chain affects the stability of association with β_2 -microglobulin and presentation of a viral peptide. *J Immunol* 1995;155:3481-93.
170. Lie WR, Myers NB, Connolly JM, Gorka J, Lee DR, Hansen TH. The specific binding of peptide ligand to L^d class I major histocompatibility complex molecules determines their antigenic structure. *J Exp Med* 1991;173:449-59.
171. Hsu VW, Yuan LC, Nuchtern JG, Lippincott-Schwartz J, Hammerling GJ, Klausner RD. A recycling pathway between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus for the retention of unassembled MHC class I molecules. *Nature* 1991;352:441.
172. Townsend ARM, Ohlen C, Bastin J, Ljunggren HG, Foster L, Karre K. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 1989;340:443.
173. Machold RP, Andree S, Van Kaer L, Ljunggren HG, Ploegh HL. Peptide influences the folding and intracellular transport of free major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Exp Med* 1995;181:1111-22.
174. Day PM, Esquivel F, Lukszo J, Bennink JR, Yewdell JW. Effect of TAP on the generation and intracellular trafficking of peptide receptive major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity* 1995;2:137.
175. De Silva AD, Boesteanu A, Song R, Nagy N, Harhaj E, Harding CV, Joyce S. Thermolabile H-2K^b molecules expressed by transporter associated with antigen processing-deficient RMA-S cells are occupied by low-affinity peptides. *J Immunol* 1999;163:4413-20.
176. Neisig A, Melief CJ, Neefjes J. Reduced cell surface expression of HLA-C molecules correlates with restricted peptide binding and stable TAP interaction. *J Immunol* 1998;160:171-9.

177. Menier C, Saez B, Horejsi V i sur. Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: new tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules. *Hum Immunol* 2003;64:315-26.
178. Matko J, Bushkin Y, Wei T, Edidin M. Clustering of class I HLA molecules on the surfaces of activated and transformed human cells. *J Immunol* 1994;152:3353 - 3360.
179. Bodnár A, Bacsó Z, Jenei A i sur. Class I HLA oligomerization at the surface of B cells is controlled by exogenous β_2 -microglobulin: implications in activation of cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 2003;15:331 - 339.
180. Pickl WF, Holter W, Stockl J, Majdic O, Knapp W. Expression of beta 2-microglobulin-free HLA class I alpha-chains on activated T cells requires internalization of HLA class I heterodimers. *Immunology* 1996;88:104-9.
181. Elliott T, Cerundolo V, Elvin J, and Townsend A. Peptide-induced conformational change of the class I heavy chain. *Nature* 1991;351:402-406.
182. Yu YY, Myers NB, Hilbert CM, Harris MR, Balendiran GK, Hansen TH. Definition and transfer of a serological epitope specific for peptide-empty forms of MHC class I. *Int Immunol* 1999;11:1897-906.
183. Hansen TH, Lybarger L, Yu L, Mitaksov V, Fremont DH Recognition of open conformers of classical MHC by chaperones and monoclonal antibodies. *Immunol Rev* 2005;207:100-11.
184. Myers NB, Harris MR, Connolly JM, Lybarger L, Yu YY, Hansen TH. K^b , K^d , and L^d molecules share common tapasin dependencies as determined using a novel epitope tag. *J Immunol* 2000;165:5656-63.
185. Peh CA, Burrows SR, Barnden M i sur. HLA-B27-restricted antigen presentation in the absence of tapasin reveals polymorphism in mechanisms of HLA class I peptide loading. *Immunity* 1998;8:531-42.
186. Machold RP, Ploegh HL. Intermediates in the assembly and degradation of class I major histocompatibility complex (MHC) molecules probed with free heavy chain-specific monoclonal antibodies. *J Exp Med* 1996;184: 2251-2259.
187. Miyazaki J, Appella E, Zhao H, Forman J, Ozato K. Expression and function of a nonglycosylated major histocompatibility class I antigen. *J Exp Med* 1986;163: 856-871.
188. Chew SF, Kanaan C, Tait BD. HLA expression and cancer - 14th IHIWS immunohistochemistry quality control exercise exchange results. *Tissue Antigens* 2007;69:248-51.
189. Sernee MF, Ploegh HL, Schust DJ. Why certain antibodies cross-react with HLA-A and HLA-G: epitope mapping of two common MHC class I reagents. *Mol Immunol* 1998;35:177-188.
190. Beretta A, Grassi F, Pelagi M i sur. HIV env glycoprotein shares a cross-reacting epitope with a surface protein present on activated human monocytes and involved in antigen presentation. *Eur J Immunol* 1987;17:1793-1798.
191. Schnabl E, Stockinger H, Majdic O i sur. Activated human T lymphocytes express MHC class I heavy chains not associated with beta 2-microglobulin. *J Exp Med* 1990;171: 1431-1442.
192. Carven GJ, Chitta S, Hilgert i sur. Monoclonal antibodies specific for the empty conformation of HLA-DR1 reveal aspects of the conformational change associated with peptide binding. *J Biol Chem* 2004;279: 16561-16570.
193. Reid PA, Watts C. Cycling of cell-surface MHC glycoproteins through primaquine-sensitive intracellular compartments. *Nature* 1990;346:655-7.
194. Chiu I, Davis DM, Strominger JL. Trafficking of spontaneously endocytosed MHC proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13944-9.
195. Tse DB, Pernis B. Spontaneous internalization of Class I major histocompatibility complex molecules in T lymphoid cells. *J Exp Med* 1984;159:193-207.
196. Dasgupta JD, Watkins S, Slayter H, Yunis EJ. Receptor-like nature of class I HLA: endocytosis via coated pits. *J Immunol* 1988;141:2577-80.
197. Abdel Motal UM, Zhou X, Joki A, Siddiqi AR, Srinivasa BR, Stenvall K, Dahmen J, Jondal M. Major histocompatibility complex class I-binding peptides are recycled to the cell surface after internalization. *Eur J Immunol* 1993;23:3224-9.
198. Capps GG, Van Kampen M, Ward CL, Zuniga MC. Endocytosis of the class I major histocompatibility antigen via a phorbol myristate acetate-inducible pathway is a cell-specific phenomenon and requires the cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 1989;108:1317-29.
199. Machy P, Truneh A, Gennaro D, Hoffstein S. Major histocompatibility complex class I molecules internalized via coated pits in T lymphocytes. *Nature* 1987;328:724-6.

200. Lee DR, Rubocki RJ, Lie WR, Hansen TH. The murine MHC class I genes, H-2D^a and H-2L^a, are strikingly homologous to each other, H-2L^d, and two genes reported to encode tumor-specific antigens. *J Exp Med* 1988;168:1719-39.
201. Grommé M, Uytdehaag FG, Janssen H, Calafat J, van Binnendijk RS, Kenter MJ, Tulp A, Verwoerd D, Neeffjes J. Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:10326-31.
202. Norbury CC, Chambers BJ, Prescott AR, Ljunggren HG, Watts C. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 1997;27:280-8.
203. Peppelenbosch MP, DeSmedt M, Pynaert G, van Deventer SJ, Grooten J. Macrophages present pinocytosed exogenous antigen via MHC class I whereas antigen ingested by receptor-mediated endocytosis is presented via MHC class II. *J Immunol* 2000;165:1984-91.
204. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;182:389.
205. Machy P, Serre K, Leserman L. Class I-restricted presentation of exogenous antigen acquired by Fc γ receptor-mediated endocytosis is regulated in dendritic cells. *Eur J Immunol* 2000;30:848-57.
206. Liu T, Zhou X, Orvell C, Lederer E, Ljunggren HG, Jondal M. Heat-inactivated Sendai virus can enter multiple MHC class I processing pathways and generate cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. *J Immunol* 1995;154:3147-3155.
207. Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 1997;158:2723-2730.
208. Norbury CC, Hewlett LJ, Prescott AR, Shastri N, Watts C. Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* 1995;3:783-791.
209. Sousa C, Germain RN. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J Exp Med* 1995;182:841-851.
210. Yewdell JW, Bennink JR, Hosaka Y. Cells process exogenous proteins for recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Science* 1988;239:637-640.
211. Schirmbeck R, Reimann J. Peptide transporter-independent, stress protein-mediated endosomal processing of endogenous protein antigens for major histocompatibility complex class I presentation. *Eur J Immunol* 1994;24:1478-1486.
212. Schirmbeck R, Melber K, Reimann J. Hepatitis B virus small surface antigen particles are processed in a novel endosomal pathway for major histocompatibility complex class I-restricted epitope presentation. *Eur J Immunol* 1995;25:1063-1070.
213. Liu T, Chambers B, Diehl AD, Van Kaer L, Jondal M, Ljunggren HG. TAP peptide transporter-independent presentation of heat-killed Sendai virus antigen on MHC class I molecules by splenic antigen-presenting cells. *J Immunol* 1997;159:5364-5371.
214. Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 1993;361:359-362.
215. Song R, and C.V. Harding, Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and β_2 -microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J Immunol* 1996;156:4182-4190.
216. Potter NS, Harding CV. Neutrophils process exogenous bacteria via an alternate class I MHC processing pathway for presentation of peptides to T lymphocytes. *J Immunol* 2001;167:2538-46.
217. Martín-Orozco N, Isibasi A, Ortiz-Navarrete V. Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules via a secretory pathway as a consequence of interferon-gamma activation. *Immunology* 2001;103:41-8.
218. De Bruijn ML, Jackson MR, Peterson PA. Phagocyte-induced antigen-specific activation of unprimed CD8⁺ T cells in vitro. *Eur J Immunol* 1995;25:1274-1285.
219. Vigna JL, Smith KD, Lutz CT, Invariant chain association with MHC class I: preference for HLA class I/ β_2 -microglobulin heterodimers, specificity, and influence of the MHC peptide-binding groove. *J Immunol* 1996;157:4503-4510.
220. Ulmer JB, Donnelly JJ, Liu MA. Presentation of an exogenous antigen by major histocompatibility complex class I molecules. *Eur J Immunol* 1994;24:1590-6.

221. Luft T, Rizkalla M, Tai TY i sur. Exogenous peptides presented by transporter associated with antigen processing (TAP)-deficient and TAP-competent cells: intracellular loading and kinetics of presentation. *J Immunol* 2001;167:2529-37.
222. Abdel Motal UM, Sentman CL, Zhou X, Robinson PJ, Dahmen J, Jondal M. Glycosylphosphatidylinositol-linked D^b does not induce an influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response or recycle membranebound peptides. *Eur J Immunol* 1995;25:1121-1124.
223. Arnold-Schild D, Hanau D, Spohner D i sur. H. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J Immunol* 1999;162:3757-60.
224. Horig H, Young AC, Papadopoulos NJ, DiLorenzo TP, Nathenson SG. Binding of longer peptides to the H-2K^b heterodimer is restricted to peptides extended at their C terminus: refinement of the inherent MHC class I peptide binding criteria. *J Immunol* 1999;163:4434-41.
225. Stober D, Trobonjaca Z, Reimann J, Schimbeck R. Dendritic cells pulsed with exogenous hepatitis B surface antigen particles efficiently present epitopes to MHC class I-restricted cytotoxic T cells. *Eur J Immunol* 2002;32:1099-108.
226. Schimbeck R, Thoma S, Reimann J. Processing of exogenous hepatitis B surface antigen particles for L^d-restricted epitope presentation depends on exogenous beta2-microglobulin. *Eur J Immunol* 1997;27:3471-84.
227. Coscoy L, Ganen D. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8051-8056.
228. Weber M, Blair E, Simpson CV, O'Hara M, Blackburn PE, Rot A, Graham GJ, Nibbs RJ. The chemokine receptor D6 constitutively traffics to and from the cell surface to internalize and degrade chemokines. *Mol Cell Biol* 2004;15:2492-2508.
229. Hasenkrug KJ, Cory JH, Stimofling JH. Monoclonal antibodies defining mouse tissue antigens encoded by the H-2 region. *Immunogenetics* 1987;25:136-9.
230. Ozato K, Mayer NM, Sachs DH. Monoclonal antibodies to mouse major histocompatibility complex antigens. *Transplantation* 1982;34:113-20.
231. Ozato K, Hansen TH, Sachs DH. Monoclonal antibodies to mouse MHC antigens. II. Antibodies to the H-2L^d antigen, the products of a third polymorphic locus of the mouse major histocompatibility complex. *J Immunol* 1980;125:2473-7.
232. Collawn JF, Stangel M, Kuhn LA, Esekogwu V, Jing SQ, Trowbridge IS, Tainer JA. Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell* 1990;63:1061-72.
233. Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* 1993;123:1107-17.
234. Seaman MN, Ball CL, Robinson MS. Targeting and mistargeting of plasma membrane adaptors in vitro. *J Cell Biol* 1993;123:1093-105.
235. Neufeld EB, Cooney AD, Pitha J, Dawidowicz EA, Dwyer NK, Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ. Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J Biol Chem* 1996;271:21604-21613.
236. Ajioka RS, Kaplan J. Intracellular pools of transferrin receptors result from constitutive internalization of unoccupied receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:6445-9.
237. Anderson RG, Falck JR, Goldstein JL, Brown MS. Visualization of acidic organelles in intact cells by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4838-42.
238. van Dam EM, Ten Broeke T, Jansen K, Spijkers P, Stoorvogel W. Endocytosed transferrin receptors recycle via distinct dynamin and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem* 2002;277:48876-83.
239. Cooper JA. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 1987;105:1473-8.
240. Coue M, Brenner SL, Spector I, Korn ED. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett* 1987;213:316-8.
241. Urbanik E, Ware BR. Actin filament capping and cleaving activity of cytochalasins B, D, E, and H. *Arch Biochem Biophys* 1989;269:181-7.
242. Wehland J, Henkart M, Klausner R, Sandoval IV. Role of microtubules in the distribution of the Golgi apparatus: effect of taxol and microinjected anti-alpha-tubulin antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:4286-90.
243. Sonee M, Barron E, Yarber FA, Hamm-Alvarez SF. Taxol inhibits endosomal-lysosomal membrane trafficking at two distinct steps in CV-1 cells. *Am J Physiol* 1998;275:630-9.

244. Weigert R, Yeung AC, Li J, Donaldson JG. Rab22a regulates the recycling of membrane proteins internalized independently of clathrin. *Mol Biol Cell* 2004;15:3758-70.
245. Resh MD. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999;1451:1-16.
246. Ljunggren HN, Stam N, Ohlen C i sur. Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* 1990; 346:476-480.
247. Li Y, Kane T, Tipper C, Spatrick P, Jennes D. Yeast mutants affecting possible quality control of plasma membrane proteins. *Mol Cell Biol* 1999;19:3588-3599.
248. Wilson MH, Highfield H, Limbird L. The role of a conserved inter-transmembrane domain interface in regulating α_{2a} -adrenergic receptor conformational stability and cell-surface turnover. *Mol. Pharmacol* 2001;59:929-938.
249. Fayadat L., Kopito R. Recognition of a single transmembrane degron by sequential quality control checkpoints. *Mol Biol Cell* 2003;14:1268-1278.
250. Sharma M, Pampinella F, Nemes C i sur. Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J Cell Biol* 2004;164:923-33.
251. Arvan PX, Zhao J, Ramos-Castaneda J, Chang A. Secretory pathway quality control operating in Golgi, plasmalemmal, and endosomal systems. *Traffic* 2002;3:771-780.
252. Kiachopoulos S, Heske J, Tatzelt J, Winklhofer KF. Misfolding of the prion protein at the plasma membrane induces endocytosis, intracellular retention and degradation. *Traffic* 2004;5:426-36.
253. Joyce S. Traffic control of completely assembled MHC class I molecules beyond the endoplasmic reticulum. *J Mol Biol* 1997;266:993-1001.
254. Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Ploegh HL, Tonegawa S, *TAP1* mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules and CD4-8⁺ T cells. *Cell* 1992;1:1205-1214.
255. Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K. Extraction of cholesterol with methyl- β -cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cel* 1999;10:961-974.
256. Montesano R, Roth J, Robert A, Orci L. Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature* 1982;296:651-3.
257. Caplan S, Naslavsky N, Hartnell LM i sur. A tubular EHD1-containing compartment involved in the recycling of major histocompatibility complex class I molecules to the plasma membrane. *EMBO J* 2002;21:2557-67
258. Powelka AM, Sun J, Li J i sur. Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11.. *Traffic* 2003;5:20-36.
259. Paterson AD, Parton RG, Ferguson C, Stow JL, Yap AS. Characterization of E-cadherin endocytosis in isolated MCF-7 and chinese hamster ovary cells: the initial fate of unbound E-cadherin. *J Biol Chem* 2003;278:21050-7.
260. Hopkins CR, Trowbridge IS. Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A431 cells. *J Cell Biol* 1983;97:508-521.
261. Yamashiro DJ, Tycko B, Fluss SR, Maxfield FR. Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* 1984;37:789-800.
262. Gruenberg J, Maxfield FR. Membrane transport in the endocytic pathway.. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:552-63.
263. Naslavsky N, Rahajeng J, Sharma M, Jovic M, Caplan S. Interactions between EHD proteins and Rab11-FIP2: a role for EHD3 in early endosomal transport. *Mol Biol Cell* 2006;7:163-77.
264. Pastan I, Willingham WC. Journey to the center of the cell: role of the receptosome. *Science* 1981;214:504-509.
265. Bomsel M, Parton R, Kuznetsov SA, Schroer TA, Gruenberg J. Microtubule and motor dependent fusion *in vitro* between apical and basolateral endocytic vesicles from MDCK cells. *Cell* 1990;62:719-731.
266. Harada A, Takei Y, Kanai Y, Tanaka Y, Nonaka S, Hirokawa N. Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* 1998;141:51-59.
267. Oda H, Stockert RJ, Collins C. i sur. Interaction of the microtubule cytoskeleton with endocytic vesicles and cytoplasmic dynein in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1995;270:15242-15249.
268. Hollenbeck PJ, Swanson JA. Radial extension of macrophage tubular lysosomes supported by kinesin. *Nature* 1990;346:864-866.

269. Wubbolts R, Fernandez-Borja M, Jordens I i sur. Opposing motor activities of dynein and kinesin determine retention and transport of MHC class II-containing compartments. *J Cell Sci* 1990;112:785-795.
270. Chow A, Toomre D, Garrett W, Mellman I. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature* 2002;418:988-994.
271. Neuman E, Huleatt JW, Vargas H, Rupp E, Jack RM. Regulation of MHC class I synthesis and expression by human neutrophils. *J Immunol* 1992;148:3520-3527.
272. Churchward MA, Rogasevskaia T, Hofgen J, Bau J, Coorssen JR. Cholesterol facilitates the native mechanism of Ca²⁺-triggered membrane fusion. *J Cell Sci* 2005;118:4833-48.
273. Lusa S, Blom TS, Eskelinen EL, Kuismanen E, Mansson JE, Simons K, Ikonen E. Depletion of rafts in late endocytic membranes is controlled by NPC1-dependent recycling of cholesterol to the plasma membrane. *J Cell Sci* 2001;114:1893-1900.
274. Stryhn A, Pedersen LO, Romme T i sur. pH dependence of MHC class I-restricted peptide presentation. *J Immunol* 1996;156:4191-7.
275. Smith JD, Myers NB, Gorka J, Hansen TH. Model for the in vivo assembly of nascent L^d class I molecules and for the expression of unfolded L^d molecules at the cell surface. *J Exp Med* 1993;178:2035-46.
276. Jondal M, Schirbeck R, Reimann J. MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* 1996;5:295-302.
277. Muno D, Kominami E, Mizuochi T. Generation of both MHC class I- and class II-restricted antigenic peptides from exogenously added ovalbumin in murine phagosomes. *FEBS Lett* 2000;478:178-82.
278. Sigal LJ, Crotty S, Andino R, Rock KL. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 1999;398:77-80.
279. Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD Jr. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 1996;183:283-7.
280. Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP. Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med* 1996;183:317-22.
281. Wolfers J, Lozier A, Raposo G i sur. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 2001;7:297-303.
282. Cochran JR, Aivazian D, Cameron TO, Stern LJ. Receptor clustering and transmembrane signaling in T cells. *Trends Biochem Sci* 2001; 26:304-310.
283. Fromm SV, Duady-Ben Yaakov S, Schechter C, Ehrlich R. Assembly and cell surface expression of TAP-independent, chloroquine-sensitive and interferon-gamma-inducible class I MHC complexes in transformed fibroblast cell lines are regulated by tapasin. *Cell Immunol* 2002;215:207-18.
284. Fromm SV, Mey-Tal SW, Coligan JE, Schechter C, Ehrlich R. MHC class I heavy chain mRNA must exceed a threshold level for the reconstitution of cell surface expression of class I MHC complexes in cells transformed by the highly oncogenic adenovirus 12. *J Biol Chem* 1998;273:15209-16.
285. Dugani CB, Klip A. Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *EMBO J* 2005;6:1137-1141.
286. Brotherus J, Renkonen O. Isolation and characterisation of bis-phosphatidic acid and its partially deacylated derivatives from cultured BHK-cells. *Chem Phys Lipids* 1974 Aug;13:11-20.

Popis kratica

Stanični odjeljci

- EE – rani endosomi (engl. *early endosomes*)
ELRC – odjeljak u kojem se zadržavaju molekule L^d (engl. *empty L^d retention compartment*)
ER – endoplazmatska mrežica (engl. *endoplasmatic reticulum*)
ERC – endosomalni reciklirajući odjeljak (engl. *endosomal recycling compartment*)
GA – Golgijev aparat (engl. *Golgi apparatus*)
GEEC – endosomalni odjeljak u kojem se nakupljaju GPI-sidreni proteini (engl. *GPI-AP early enriched endosomal compartment*)
LE – kasni endosomi (engl. *late endosomes*)
MTOC – organizirajući centar mikrotubula (engl. *microtubule organizing center*)
MVB – multivezikulatna tjelešca (engl. *multivesicular bodies*)
PM – plazma membrana
SE – sortirajući endosomi (engl. *sorting endosomes*)
TGN – *trans* – Golgijev aparat (trans - Golgi apparatus)

Površinski i glikoproteini i ostale (makro)molekule

- APC – antigen predočna stanica (engl. *antigen presenting cell*)
CTxB – kolera toksin, podjedinica B (engl. *cholera toxin B subunit*)
GPI-AP – glikozil fosfatidil inozitol-sidreni proteini (engl. *glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins*)
HA – hemaglutinin (najčešće iz virusa gripe)
IFN – interferon
IL-2R – interleukin-2 receptor
IRAP – aminopeptidaza ovisna o inzulinu (engl. *insulin regulated aminopeptidase*)
LacCer – laktosil ceramid
LBPA – lizobisfosfatidna kiselina (engl. *lysobisphosphatidic acid*)
LDL – lipoprotein male gustoće (engl. *low density lipoprotein*)
MHC – molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*)
MPR - receptor manozna 6 fosfata (engl. *mannosa -6- phosphate receptor*)
PIK (PIP) – fosfatidil inozitol kinaza (fosfatidil inozitol fosfat (engl. *phosphatidyl-inositol phosphate*)
SL – sfingolipid
TAP – prijenosnik povezan s antigenskim predočavanjem(engl. *transporter associated with antigen processing*)
TCR (BCR) – T (B) stanični receptor (engl. *T (B) cell receptor*)
Tf(R) – transferin(ski receptor) (engl. *transferrin (receptor)*)
 β_2 -m - β_2 -mikroglobulin

Inhibitori endocitoze i vezikularnog transporta

- Baf A₁ – Bafilomicin A1 (Bafilomycin A1)
CHX – Cikloheksimid (Cycloheximide)
Con A – Konkanamicin A (Concanamycin A)
CP - Klorpromazin (Chlorpromazin)
Cyt D – Citochalazin D (Cytochalasin D)
F - Filipin
Lat A – Latrunculin A (Latrunculin A)
Mon - Monenzin (Monensin)
Noc - Nokodazol (Nocodazol)

Membranske mikrodomene

- DRM – membrane otporne na detergente (engl. *detergent resistant membranes*)
DSM – membrane topivive u detergentima (engl. *detergent soluble membranes*)
 L_d - tekuća neuređena (neorganizirana) domena (engl. *liquid disordered domain*)
 L_o - tekuća uređena (organizirana) domena (engl. *liquid ordered domain*)
PH –plekstrinu homologan (engl. *plextrine homologous*)

Ostale kratice

- EM – elektronska mikroskopija
mPt – monoklonsko protutijelo (engl. *monoclonal antibody*)
TM – transmembranski

ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME

Hana Mahmutefendić

DATUM I MJESTO ROĐENJA

06. lipnja 1974. Sarajevo

ZAPOSLENJE

Zavod za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

ŠKOLOVANJE

1980. - 1988. osnovna škola u Rijeci

1988. - 1992. Medicinska škola u Rijeci

1992. - 1997. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, biološki odsjek, smjer - molekularna biologija

1998. - 2000. - Poslijediplomski znanstveni studij "Biomedicina" na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci

AKADEMSKI STUPNJEVI

02. srpnja 1997. diplomirani inženjer biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

23. srpnja 2003. magistar biomedicinskih znanosti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

ZNANSTVENI STUPNJEVI

Od 01. prosinca 1998. do 01. veljače 2000. volontiranje na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

Od 1. veljače 2000. znanstveni novak na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci (projekt br. 006206 pod naslovom "Citomegalovirusni geni za izbjegavanje imunološkog nadzora", glavni istraživač prof. dr. sc. Pero Lučin)

Od 01. listopada 2003. znanstveni novak u istraživačkom zvanju asistent na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci - projekt br. 0062030 pod naslovom "Endocitoza površinskih glikoproteina, virusa i intracelularne bakterije", glavni istraživač prof. dr. sc. Pero Lučin; te od 01. siječnja 2007. projekt br. 062-0620238-0223 pod nazivom «Sortiranje MHC molekula I razreda na staničnoj membrani i endocitoznim odjeljcima», glavni istraživač prof. dr. sc. Pero Lučin

A. ZNANSTVENA DJELATNOST

Kvalifikacijski radovi:

Mahmutefendić H., 2003. Endocitoza i vezikularni transport MHC molekula I. razreda, magistarski rad, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci (mentor: prof. dr. sc. Pero Lučin)

1. Znanstveni radovi:

1.4. Primarni znanstveni rad objavljen u časopisu citiranom u tercijarnim publikacijama

1. Mahmutefendić H, Kučić N, Lučin P. Distinct pathways for constitutive endocytosis of fully conformed and nonconformed L^d molecules. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48:87-95, 2002.
2. Kučić N, Mahmutefendić H, Lučin P. Inhibition of protein kinases C prevents murine cytomegalovirus replication. *J Gen Virol* 2005;86:2153-61.
3. Mahmutefendić H, Blagojević G, Kučić N, Lučin P. Constitutive internalization of murine MHC class I molecules. *J Cell Physiol* 2007;210:445-455.

2. Znanstveni projekti

2.3 Aktivno sudjelovanje u realizaciji znanstvenih projekata

2.3.1. Znanstveni projekt prof. dr. sc. Pere Lučina br. 006206 pod nazivom "Citomegalovirusni geni za izbjegavanje imunološkog nadzora" financiran od strane Ministarstva znanosti i tehnologije Republike Hrvatske.

2.3.2. Znanstveni projekt prof. dr. sc. Pere Lučina br. 0062030 pod nazivom "Endocitoza površinskih glikoproteina, virusa i intracelularne bakterije" (prijavljen 2002. godine za financiranje od strane Ministarstva znanosti i tehnologije Republike Hrvatske).

2.3.3. Znanstveni projekt prof. dr. sc. Pere Lučina br. 062-0620238-0223 pod nazivom «Sortiranje MHC molekula I razreda na staničnoj membrani i endocitoznim odjeljcima» (od 01. siječnja 2007. godine)

2.3.4. Suradnik na međunarodnom projektu Embryo implantation control (EMBIC) funded by European Commission under the Framework 6, Contract No 512040 (LSHM-CT-2004-512040) od 01. listopada 2004.

4. Sudjelovanje na znanstvenim skupovima

4.1. Sudjelovanje na međunarodnim skupovima

1. Hana Mahmutefendić, Natalia Kučić, Pero Lučin. Endocytosis of full and empty L^d molecules on nonpolarized cells. *VIII International congress of reproductive immunology*. Opatija, Croatia, July 2-6, 2001. (poster prezentacija). *Am J Reprod Immunol* 2001; 46 (1):61, (WP4-8)
2. Natalia Kučić, Hana Mahmutefendić, Pero Lučin. Mechanism of murine cytomegalovirus entry into the cell nucleus. *VIII International congress of reproductive immunology*. Opatija, Croatia, July 2-6, 2001. (poster prezentacija) *Am J Reprod Immunol* 2001; 46 (1):60-61, (WP4-7)
3. H. Mahmutefendić, N. Kučić, G. Blagojević, P. Lučin. Spontaneous endocytosis of MHC class I molecules on P815 cells and murine embryonal fibroblasts. *FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference*. Dubrovnik-Cavtat, Croatia, May 21-27, 2004.
4. N. Kučić, H. Mahmutefendić, P. Lučin. Effects of the protein-kinase inhibitor H-7 on the replication of murine cytomegalovirus. *FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference*. Dubrovnik-Cavtat, Croatia, May 21-27, 2004.
5. G. Blagojević, H. Mahmutefendić, N. Kučić, P. Lučin. The effect of inhibitors of endocytosis and vesicular transport of internalization of cholera toxin. *FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference*. Dubrovnik-Cavtat, Croatia, May 21-27, 2004.
6. H. Mahmutefendić, G. Blagojević, N. Kučić, P. Lučin. Nonconformed L^d molecules are sorted into lipid rafts for endocytosis *The first EMBIC summer school*, Malinska, Croatia (June 4-10, 2006., Abstract book, p.60)
7. G. Blagojević, H. Mahmutefendić, N. Kučić, P. Lučin. "Comparison of MHC class I molecules and Cholera toxin B subunit endocytic pathway(s)" *The first EMBIC summer school*, Malinska, Croatia (June 4-10, 2006., Abstract book, p. 61)
8. H. Mahmutefendić, G. Blagojević, N. Kučić, P. Lučin. "Nonconformed and misfolded MHC-I molecules are sorted into lipid rafts" *FEBS Special Meeting Cellular Signaling*, Dubrovnik, Croatia (May 26 - June 1, 2006, Abstract book, P180, page 240)
9. G. Blagojević, H. Mahmutefendić, N. Kučić, P. Lučin. "Cholera toxin uses different trafficking pathways in Balb3T3 and HeLa cells" *FEBS Special Meeting Cellular Signaling*, Dubrovnik, Croatia (May 26 - June 1, 2006, Abstract book, P174, page 234)
10. N. Kučić, H. Mahmutefendić, G. Blagojević, P. Lučin. "Down-modulation of MHC-I molecules by MCMV virus to evade immune recognition" *FEBS Special Meeting Cellular Signaling*, Dubrovnik, Croatia (May 26 - June 1, 2006, Abstract book, P178, page 238)
11. H. Mahmutefendić, G. Blagojević, N. Kučić, P. Lučin. "L^d molecules change their conformation in acid endosomal vesicles" *Second EMBIC summer school*, Pecs, Hungary (July 1st -14th, 2006., Oral presentation, Abstract book, SP12 p.30)
12. G. Blagojević, H. Mahmutefendić, N. Kučić, P. Lučin. "Endocytosis of HLA-G1 molecules in non-polarised cell line (J26)" *Second EMBIC summer school*, Pecs, Hungary (July 1st -14th, 2006., Oral presentation, Abstract book, SP9 p.28)
13. D. Veljković, Laškarin G, Dupor J, Sršen medančić S, Juretić Franković K, H. Mahmutefendić, M. Gašparović, T. Štimac, S. Saito, J. Tabiasco, P. Le Bouteilleer, D. Rukavina. "Granulysin expression and localization in the first trimester pregnancy" *Second EMBIC summer school*, Pecs, Hungary (July 1st -14th, 2006., Poster presentation, Abstract book, P17 p.41)

14. H. Mahmutefendić, G. Blagojević, N. Kučić, P. Lučin. "MHC Class I molecules are recycled after their internalization, but their pathways are conformation dependent" 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology and 16th European Congress of Immunology, Paris, France, September 6-9, 2006 (Abstract book, PA-2160)
15. G. Blagojević, H. Mahmutefendić, N. Kučić, P. Lučin. "Intersection of endocytic pathway(s) of MHC Class I molecules and Cholera toxin B subunit" 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology and 16th European Congress of Immunology, Paris, France, September 6-9, 2006 (Abstract book, PA-2159)
16. N. Kučić, G. Blagojević, H. Mahmutefendić, P. Lučin. "MCMV strategy to evade immune recognition is to down-modulate the expression of MHC-I molecules" 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology and 16th European Congress of Immunology, Paris, France, September 6-9, 2006 (Abstract book, PA-2039)

4.2. Sudjelovanje na domaćim skupovima

1. H. Mahmutefendić, N. Kučić, P. Lučin. Endocytosis of full and empty L^d molecules on nonpolarised cells. *I kongres Hrvatskog društva fiziologa*, Osijek, 14-16. rujna 2000. Knjiga sažetaka, P19 (poster prezentacija)
2. N. Kučić, H. Mahmutefendić, P. Lučin. Inhibicija ulaska mišjeg citomegalovirusa u staničnu jezgru. *Godišnji sastanak Hrvatskog imunološkog društva*, Zagreb, 15. prosinca 2000. (Knjiga sažetaka, str.11).
3. H. Mahmutefendić, N. Kučić, P. Lučin. Comparison of spontaneous and induced endocytotic pathway of H2-d molecules. *Annual meeting 2002, Croatian Immunological Society*, November 22-24, 2002, Trakošćan, (Abstract book, oral presentation 5, P 10, p. 11)
4. H. Mahmutefendić, N. Kučić, G. Blagojević, P. Lučin. Endosomal pathway of full and empty L^d molecules on nonpolarized P815 cell line. *Annual meeting 2003, Croatian Immunological Society*, Brijuni, October 17-19, 2003, (Abstract book, oral presentation 6, P 28, p. 17)
5. G. Blagojević, H. Mahmutefendić, N. Kučić, P. Lučin. Endocytotic pathway of cholera toxin. *Annual meeting 2003, Croatian Immunological Society*, Brijuni, (October 17-19, 2003, Abstract book, P 3, p. 31)
6. H. Mahmutefendić, N. Kučić, G. Blagojević, P. Lučin. Comparison of spontaneous and induced endocytosis of MHC class I molecules on P815 cells and murine embryonal fibroblasts. *Annual meeting 2004, Croatian Immunological Society*, Opatija, October 08-10, 2004, (Abstract book, poster presentation, P 16, p. 50)
7. G. Blagojević, H. Mahmutefendić, N. Kučić, P. Lučin. Intracellular trafficking of cholera toxin. *Annual meeting 2004, Croatian Immunological Society*, Opatija, October 08-10, 2004, (Abstract book, poster presentation, P 14, p. 48)
8. P. Lučin, H. Mahmutefendić, N. Kučić, and G. Blagojević. Sorting of nonconformed and misfolded MHC Class I molecules into lipid rafts. *Annual meeting 2004, Croatian Immunological Society*, Opatija, October 08-10, 2004, (Abstract book, Invited lecture, p. 21)
9. H. Mahmutefendić, G. Blagojević, N. Kučić, P. Lučin. Conformed and nonconformed MHC class I molecules are internalized by different mechanisms, but reach the same endocytotic compartments. *Annual meeting 2005., Croatian Immunological Society, Božava* (29.09. - 02.10.2005., Abstract book, P54, p. 81)
10. G. Blagojević, H. Mahmutefendić, N. Kučić, P. Lučin. Cholera toxin uses multiple trafficking pathways from plasma membrane to Golgi. *Annual meeting 2005., Croatian Immunological Society, Božava* (29.09. - 02.10.2005., Abstract book, P53, p. 80)
11. D. Veljković, G. Laškarin, J. Dupor, S. Sršen Medančić, K. Juretić Franković, H. Mahmutefendić, M. Gašparović, Lj. Randić, S. Saito, D. Rukavina. Granulysin expression in peripheral blood and decidua of the first trimester pregnancy. *Annual meeting 2005., Croatian Immunological Society, Božava* (29.09. - 02.10.2005., Abstract book, P47, p. 74)
12. H. Mahmutefendić, G. Blagojević, N. Kučić, P. Lučin. Endocytic pathway of MHC class I molecules is conformation dependent. *Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology., , Vodice, Croatia* (October 3-7, 2006; Abstract book, OP3, P38, p. 69)
13. P. Lučin, H. Mahmutefendić, G. Blagojević, N. Kučić. Endocytosis and intracellular trafficking of MHC class I molecules. *Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology., , Vodice, Croatia* (October 3-7, 2006; Abstract book, L8, p. 45)

5. Članstva

1. Član sam znanstvenog društva HID (Hrvatsko imunološko društvo) od 1999. godine
2. Član sam stručnog društva HDF (Hrvatsko društvo fiziologa) od 1999. godine

9. Znanstvene nagrade / priznanja

- 9.1. Nagrada za poster pod naslovom "Endocytosis of full and empty L^d molecules on nonpolarized cells" (Hana Mahmutefendić, Natalia Kučić, Pero Lučin) Am J reprod Immunol (WP4-8) na svjetskom kongresu reproduktivne imunologije "VIII International congress of reproductive immunology", Opatija, Croatia, July 2-6, 2001.
- 9.2 Nagrada za najbolji poster na godišnjem skupu Hrvatskog imunološkog društva, pod naslovom "Endosomal pathway of full and empty L^d molecules on nonpolarized P815 cell line." (H. Mahmutefendić, N. Kučić, G. Blagojević, P. Lučin.) *Annual meeting 2003, Croatian Immunological Society, Brijuni, October 17-19, 2003.*

SUDJELOVANJE U ORGANIZACIJI MEĐUNARODNIH SKUPOVA I SVJETSKOG KONGRESA

1. Član Lokalnog organizacijskog odbora za organizaciju kongresa reproduktivne imunologije "VIII International Congress of Reproductive Immunology" koji se održavao od 02. - 06. srpnja 2001.
2. Član Lokalnog organizacijskog odbora za organizaciju ljetne škole - The first EMBIC summer school, Malinska, Croatia, June, 04-10, 2005.

POHAĐANJE TEČAJEVA, LJETNIH ŠKOLA I ZNANSTVENIH RADIONICA

1. Znanstvena radionica pod naslovom: Primjena novih nosača u elektroforezi DNA (VNTR, STR, SSCP, heterodupleks analiza, RFLP) (DNA electrophoresis course), Zagreb, 28. 04. 1999.
2. 1st Croatian-Slovenian FACSUser Meeting, Maribor, May 22-24, 2003.
3. FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference. Dubrovnik-Cavtat, Croatia, May 21-27, 2004.
4. The first EMBIC summer school, Malinska, Croatia, June, 04-10, 2005.
5. FEBS Special Meeting Cellular Signalling, Dubrovnik, Croatia, May 26 - June 1, 2006.

B. NASTAVNA DJELATNOST

4. Autorstvo i suautorstvo skripta

"Priručnik za vježbe iz Fiziologije I. dio", Katedra za fiziologiju, imunologiju i patološku fiziologiju, Medicinski fakultet Rijeka, Sveučilište u Rijeci (ožujak 1999.)

"Priručnik za vježbe iz Fiziologije, Neurofiziologije i Imunologije", Katedra za fiziologiju, imunologiju i patološku fiziologiju, Medicinski fakultet Rijeka, Sveučilište u Rijeci (listopad 1999.)

7. Poslijediplomska nastava

Od 1999. godine obavljam nastavu laboratorijskih vježbi u okviru kolegija "Metode stanične biologije" pod vodstvom prof. dr. sc. Pere Lučina na poslijediplomskom znanstvenom studiju biomedicine, na Katedri za fiziologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

8. Dodiplomska nastava

Od 1999. godine aktivno sudjelujem u nastavi i izvođenju seminara i vježbi iz predmeta Fiziologija, Imunologija, Neurofiziologija i Patofiziologija za studente sveučilišnih studija Opće medicine i Stomatologije, te predmeta Fiziologija s patofiziologijom za Studij diplomiranih sanitarnih inženjera na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Također sudjelujem u izvođenju nastave za stručne studije: Studiju fizioterapije, Studiju za medicinsko - laboratorijske inženjere, Studiju za inženjere medicinske radiologije i Studiju sestrištva iz kolegija Fiziologija s patofiziologijom, Fiziologija, Patofiziologija i Imunologija.

15. Ostale nastavne djelatnosti

15.1. Otvaranje, ustrojstvo i organizacija novih laboratorija, vježbališta, praktikuma i sl.

Sudjelovanje u organizaciji novog programa vježbi iz fiziologije (BIOPAC program).

Sudjelovanje u programu radionice *Diskusija kao nastavna metoda u visokom obrazovanju*. 20. Veljače 2002. Radionica je dio programa *Unapređivanje kvalitete visokoškolske nastave kojega "Universitas"* (Udruga za razvoj visokoga školstva) provodi uz potporu Instituta *Otvoreno društvo - Hrvatska*, a u suradnji sa Sveučilištem u Rijeci.