

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Barbara Radić

**UBIKVITINILACIJSKI SUSTAV U CITOMEGALOVIRUSNOJ  
INFEKCIJI**

Doktorski rad

Rijeka, 2025.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Barbara Radić

**UBIKVITINILACIJSKI SUSTAV U CITOMEGALOVIRUSNOJ  
INFEKCIJI**

Doktorski rad

Mentorica: prof. dr. sc. Hana Mahmutefendić Lučin, dipl. ing. biol.

Rijeka, 2025.

UNIVERSITY OF RIJEKA  
FACULTY OF MEDICINE

Barbara Radić

**THE UBIQUITINILATION SYSTEM IN A  
CYTOMEGALOVIRUS INFECTION**

Doctoral thesis

Mentor: Professor Hana Mahmutefendić Lučin, PhD

Rijeka, 2025

Mentorica rada: prof. dr. sc. Hana Mahmutefendić Lučin, dipl. ing. biol.

Doktorski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ na Medicinskom fakultetu  
Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

- 1.
- 2.
- 3.

Rad ima \_\_\_\_\_ listova.

UDK: \_\_\_\_\_

## **PREDGOVOR**

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

Istraživanja su izvršena u sklopu projekta: „Reorganizacija sučelja između ranih endosoma i endosomalnog reciklirajućeg odjeljka u ranoj fazi infekcije citomegalovirusom“ (IP-2020-02-2916) pod voditeljstvom prof. dr. sc. Hane Mahmutefendić Lučin, financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost; i projekta „Rab10 u biogenezi endosomalnog reciklirajućeg odjeljka“ (uniri-biomed-18-180), te „MARCH E3 ubikvitin ligaze u citomegalovirusnoj infekciji“ (uniri-iskusni-biomed-23-179) pod voditeljstvom prof. dr. sc. Hane Mahmutefendić Lučin, financiranih od strane Sveučilišta u Rijeci.

## ZAHVALE

*Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Hani Mahmutefendić Lučin, na ukazanom povjerenju, pruženoj prilici i podršci tijekom izrade ovog doktorskog rada, kao i na znanju, strpljenju i svim vještinama koje mi je nesebično prenijela. Zahvaljujem i prof. dr. sc. Peri Lučinu na kontinuiranoj intelektualnoj potpori, korisnim savjetima i vrijednom znanstvenom usmjeravanju tijekom cijelog procesa izrade rada.*

*Posebnu zahvalnost izražavam Igoru za njegovu kontinuiranu pomoć i vrijedne savjete., kao i Kseniji, Tihani i Tatjani na stručnim savjetima i potpori tijekom rada. Također hvala i svim članovima istraživačke grupe na suradnji, pomoći i savjetima. Zahvaljujem kolegama iz Novačke sobi – Ivoni, Vedrani, Marini i Alenu, na svim lijepim trenucima, druženju i smijehu, te moralnoj podršci koja je uvelike olakšala svakodnevni rad. Veliko hvala i cijeloj ekipi „Petkom zajedno“ – Igoru, Nataliji, Marini, Alenu, Vedrani, Ivoni, Kseniji, Hrvoju, Tatjani, Maji, Tihani, Ljerki i Silviji – na vedrini, zajedništvu i svim veselim trenucima koji su rad činili ugodnijim i lakšim. Zahvaljujem i svim ostalim članovima Zavoda koji su mi na bilo koji način pomogli tijekom mog rada.*

*Beskrajno hvala Svenu, koji me svojom ljubavlju i pozitivom ohrabrivao da ustrajem u svakom koraku izrade ovog rada te mi tijekom cijelog procesa bio velika i neizostavna podrška.*

*“Exploration is in our nature. We began as wanderers, and we are wanderers still.”*

*— Carl Sagan*

## SAŽETAK

**Ciljevi istraživanja:** Ubikvitinilacija je ključni regulator gotovo svih fizioloških procesa u stanici, a njenu važnost potvrđuje činjenica da ju neki herpesvirusi, koriste za regulaciju replikacijskog ciklusa. MCMV modulira staničnu ubikvitinilaciju putem nekoliko svojih proteina, poput deubikvitinilazne domene M48 proteina, esencijalnog za replikaciju virusa. Budući da je uloga ubikvitinilacije u replikacijskome ciklusu MCMV-a nedovoljno razjašnjena, cilj ovoga istraživanja je ispitati značaj ubikvitinilacije u životnom ciklusu MCMV-a kroz nekoliko pristupa. Istražit će se značaj deubikvitinilacijske domene M48 proteina, uloga ubikvitinilacije u razvoju i održavanju odjeljka za sklapanje virusnih čestica (AC) te reorganizaciji endosomalnoga sustava domaćina.

**Materijali i metode:** MCMV replikacijski ciklus, razvoj i održavanje AC-a te utjecaj MCMV infekcije na izražaj staničnih ubikvitinilaza i deubikvitinilaza pratili smo na wtMCMV/95.15 MCMV inficiranim NIH3T3 i Balb3T3 fibroblastima protočnom citometrijom, western blotom, konfokalnom mikroskopijom i testom analize plakova na mišjim embrionalnim fibroblastima. Za određivanje statusa ubikvitinilacije proteina proizveli smo inducibilnu NIH3T3 HA-Ub staničnu liniju iz koje smo imunoprecipitali ubikvitinilirane proteine i analizirali ih western blotom. U svrhu onemogućavanja ubikvitinilacije, stanice smo tretirali PYR-41, inhibitorom staničnoga ubikvitin-aktivirajućeg enzima. Ulogu M48 DUB domene MCMV-a u replikacijskom ciklusu pratili smo nakon infekcije stanica M48<sup>C23S</sup> MCMV rekombinantnim virusom.

**Rezultati:** Primjena PYR-41 u trenutku infekcije MCMV-om spriječila je uspostavu infekcije, a dodavanje PYR-41 4 hpi zakočilo je sintezu MCMV proteina, proizvodnju viriona i uspostavu AC-a. Imunofluorescentnom mikroskopijom na fiksiranim preparatima i u živim stanicama nakon inhibicije ubikvitinilacije pokazano je urušavanje ekstenzivne tubulacije te strukture postojećeg AC-a. Funkcionalna mutacija u DUB domeni MCMV proteina M48 nije imala utjecaj na odvijanje virusnoga replikacijskog ciklusa. Međutim, remodeliranje membrana reciklirajućih odjeljka u M48<sup>C23S</sup> MCMV inficiranim stanicama nije bilo učinkovito kao u stanicama inficiranim wtMCMV. Infekcija MCMV-om uzrokovala je promjenu ubikvitinilacije staničnih proteina uključenih u regulaciju recikliranja (WASHC1, Rabex5, EHD1) za koje je otprije poznato da se reguliraju ubikvitinilacijom.

**Zaključak:** Ubikvitinilacija je važna pri uspostavi i progresiji virusnoga replikacijskog ciklusa te proizvodnji infektivnih viriona. Neophodna je i za razvoj i održavanje odjeljka za sklapanje virusnih čestica. Jedan od mehanizama uključuje stvaranje prekomjerno elongiranih tubula u svrhu procesa sekundarnog omatanja, manipulirajući ubikvitinilacijskim statusom staničnih proteina poput WASHC1, EHD1 i Rabex5.

**Ključne riječi:** Citomegalovirus (CMV); Endosomalni reciklirajući odjeljci; Odjeljak za sklapanje virusni čestica (AC); PYR-41; Ubikvitinilacija; WASHC1

## SUMMARY

**Objectives:** Ubiquitinylation is a key regulator of almost all cellular physiological processes and its importance is confirmed by the fact that some herpesviruses use it to regulate their replication cycle. MCMV modulates cellular ubiquitinylation through several of its proteins, such as the deubiquitinylase domain of the M48 protein, essential for virus replication. Since the role of ubiquitinylation in the replication cycle of MCMV is insufficiently clarified, the aim of this research is to examine its significance in the MCMV life cycle through several approaches. The significance of the deubiquitinylation domain of the M48 protein, the role of ubiquitinylation in the development and maintenance of the viral assembly compartment (AC) and the reorganization of the host's endosomal system will be investigated.

**Materials and methods:** MCMV replication cycle, development and sustaining of AC and the influence of MCMV infection on the cellular ubiquitinylase and deubiquitinylase expression were followed on wtMCMV/95.15 MCMV infected NIH3T3 and Balb3T3 fibroblasts by flow cytometry, western blot, confocal microscopy, and plaque assay on mouse embryonic fibroblasts. To determine the protein ubiquitinylation status, we produced inducible NIH3T3 HA-Ub cell line that we immunoprecipitated ubiquitinylated proteins for western blot analysis from. For ubiquitinylation prevention, we treated the cells with PYR-41, an inhibitor of cellular ubiquitin-activating enzyme. The role of the M48 DUB domain in the replication cycle was monitored after infection of cells with M48<sup>C23S</sup> MCMV recombinant virus.

**Results:** Administration of PYR-41 at the time of MCMV infection prevented the establishment of infection, and its addition at 4 hpi inhibited MCMV protein synthesis, virion production and AC establishment. Immunofluorescence microscopy on fixed samples and in living cells after inhibition of ubiquitinylation showed the collapse of extensive tubulation and the existing AC structure. A functional mutation in the DUB domain of M48 protein had no effect on the progression of the viral replication cycle. However, remodeling of recycling compartment membranes in M48<sup>C23S</sup> MCMV-infected cells was not as efficient as in wtMCMV-infected cells. MCMV infection affected the ubiquitinylation of cellular proteins that regulate recycling (WASHC1, Rabex5, EHD1) previously known to be regulated by ubiquitinylation.

**Conclusion:** Ubiquitinylation is important during the establishment and progression of the viral replication cycle and the production of infectious virions. It is also necessary for the development and maintenance of the AC. One mechanism involves the formation of over-elongated tubules for the secondary envelopment, manipulating the ubiquitinylation status of cellular proteins such as WASHC1, EHD1 and Rabex5.

**Keywords:** Cytomegalovirus (CMV); Endosomal recycling compartments; Viral assembly compartment (AC); PYR-41; Ubiquitinylation; WASHC1



## SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. Citomegalovirusna infekcija stanica.....	1
1.1.1. Citomegalovirus.....	2
1.1.1.1. Patogeneza i terapija citomegalovirusne infekcije.....	2
1.1.1.1.1. Antivirusni lijekovi u citomegalovirusnoj infekciji.....	3
1.1.1.1.2. Razvoj cjepiva protiv citomegalovirusne infekcije.....	4
1.1.1.2. Građa citomegalovirusne čestice .....	5
1.1.1.3. Životni ciklus citomegalovirusa.....	6
1.1.1.3.1. Mehanizam ulaska citomegalovirusa u stanicu.....	6
1.1.1.3.2. Životni ciklus ljudskog citomegalovirusa.....	7
1.1.1.3.3. Životni ciklus mišjeg citomegalovirusa .....	8
1.1.1.3.4. Sklapanje novih čestica citomegalovirusa .....	9
1.2. Ubikvitinilacija .....	12
1.2.1. Mehanizmi ubikvitinilacije ciljnih proteina.....	12
1.2.2. Vrste ubikvitinilacije i njihov značaj.....	14
1.2.2.1. Ubikvitinu slični proteini .....	15
1.3. Endosomalni sustav i regulacija endosomalnog prometovanja ubikvitinilacijom.....	16
1.3.1. Endocitoza površinskih molekula.....	16
1.3.2. Endosomalni prijenos internaliziranih molekula .....	17
1.3.2.1. Endosomalni odjeljci .....	17
1.3.2.1.1. Rani endosomi .....	17
1.3.2.1.2. Reciklirajući endosomi i reciklirajući endosomalni odjeljak.....	19
1.3.2.1.3. Kasni endosomi .....	19
1.3.2.2. Regulacija recikliranja i degradacije molekula u endosomima .....	20
1.3.2.2.1. Sortiranje molekula u domene za recikliranje na ranim endosomima .....	20
1.3.2.2.2. WASH kompleks i uloga ubikvitinilacije u stvaranju reciklirajućih tubula .....	23
1.3.2.2.3. Regulacija aktivacije ostalih endosomalnih proteina ubikvitinilacijom .....	24
1.3.2.2.4. Sortiranje molekula u domene za degradaciju na ranim i kasnim endosomima.....	25
1.3.3. Ubikvitinilaze i deubikvitinilaze u endosomalnom sustavu .....	27
1.3.3.1. MARCH ubikvitin ligaze.....	27
1.3.3.2. Deubikvitinilaze i njihova uloga u endosomalnom sustavu .....	28
1.4. Značaj ubikvitinilacije u infekcijama .....	29
1.4.1. Ubikvitinilacija kod infekcija herpesvirusima.....	29

1.4.1.1. M48 protein mišjeg citomegalovirusa .....	31
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	33
3. MATERIJALI I METODE .....	34
3.1. Materijali .....	34
3.1.1. Kemikalije .....	34
3.1.2. Hranjive podloge za uzgoj kultura stanica i puferi .....	37
3.1.3. Laboratorijski pribor i reagensi .....	39
3.1.4. Stanične linije .....	43
3.1.5. Mišji citomegalovirusi .....	43
3.1.6. Plazmidi .....	44
3.2. Metode .....	44
3.2.1. Uzgoj staničnih linija .....	44
3.2.2. Infekcija stanica mišjim citomegalovirusom .....	44
3.2.3. Inhibicija ubikvitinilacije pomoću PYR-41 inhibitora .....	45
3.2.4. Utišavanje izražaja staničnih proteina pomoću siRNA metode .....	45
3.2.5. Analiza infekcije stanica mišjim citomegalovirusom metodom protočne citometrije .....	45
3.2.6. Kvantifikacija recikliranja transferina protočnom citometrijom .....	46
3.2.7. Kratkoročna transfekcija mišjih fibroblasta konstruktima za izražaj rekombinantnih staničnih proteina .....	47
3.2.8. Imunofluorescentna i konfokalna mikroskopija .....	47
3.2.8.1. Kvantifikacija zastupljenosti ispitivanih proteina u AC-u inficirane stanice .....	48
3.2.9. Digitalna holotomografska mikroskopija .....	48
3.2.10. Western blot analiza .....	49
3.2.11. Proizvodnja NIH3T3 stanične linije s inducibilnim izražajem HA-Ub-WT transgena ...	50
3.2.11.1. Subkloniranje konstrukta HA-Ub-WT u lentivirusni vektor pLIX_Kan_PstI .....	50
3.2.11.2. Transformacija bakterije Escherichia coli toplinskim šokom, nasadivanje odabranih bakterijskih kolonija i izolacija plazmidne DNA .....	51
3.2.11.3. Proizvodnja lentivirusa s izražajem HA-Ub-WT transgena i NIH3T3 HA-Ub stanične linije .....	52
3.2.12. Analiza MCMV rasta i izlaska virusnih čestica u in vitro uvjetima .....	52
3.2.13. Statistička analiza i obrada podataka .....	53
4. REZULTATI .....	54
4.1. Ubikvitinilacija u uspostavi MCMV infekcije i odvijanju virusnog replikacijskog ciklusa .....	54
4.1.1. Učinak PYR-41 inhibitora na uspostavljanje MCMV infekcije .....	54
4.1.2. Učinak PYR-41 na kinetiku izražaja i ubikvitinilacije pIE1 .....	57

4.1.2.1	Učinak PYR-41 na izražaj pIE1 u ranoj i kasnoj fazi MCMV infekcije .....	58
4.1.2.2.	Kinetika ubikvitinilacije pIE1 i učinak PYR-41 na ubikvitinilaciju pIE1 .....	59
4.1.3.	Uloga ubikvitinilacije u replikacijskom ciklusu mišjeg citomegalovirusa .....	61
4.1.3.1.	Uloga ubikvitinilacije na izražaj proteina rane i kasne faze replikacijskog ciklusa mišjeg citomegalovirusa.....	61
4.1.3.2.	Uloga ubikvitinilacije na proizvodnju novih virusnih čestica MCMV-a.....	63
4.2.	Značaj ubikvitinilacije u procesima reorganizacije membranskog sustava u svrhu nastanka i održavanja odjeljka za sklapanje virusnih čestica .....	64
4.2.1.	Značaj ubikvitinilacije u procesu nastanka pre-AC-a.....	64
4.2.1.1.	Kinetika razvoja pre-AC u ranoj fazi infekcije mišjim citomegalovirusom.....	64
4.2.1.2.	Učinak PYR-41 na razvoj pre-AC u ranoj fazi infekcije mišjim citomegalovirusom	67
4.2.2.	Učinak PYR-41 na održavanje integriteta pre-AC i nastanak AC u stanicama inficiranim mišjim citomegalovirusom.....	69
4.2.2.1.	Učinak PYR-41 na održavanje integriteta pre-AC u ranoj fazi infekcije mišjim citomegalovirusom.....	69
4.2.2.2.	Učinak PYR-41 na nastanak zrelog AC u stanicama inficiranim mišjim citomegalovirusom.....	70
4.2.3.	Učinak PYR-41 na produkciju infektivnih MCMV viriona u kasnim fazama infekcije mišjim citomegalovirusom.....	72
4.2.4.	Učinak PYR-41 na ekstenzivnu tubulaciju Rab10 - pozitivnih membrana unutar AC-a u stanicama inficiranim mišjim citomegalovirusom .....	73
4.3.	Izražaj ubikvitinilaza i deubikvitinilaza endosomalnoga sustava u infekciji mišjim citomegalovirusom .....	74
4.3.1.	Izražaj staničnih ubikvitinilaza u stanicama inficiranim mišjim citomegalovirusom.....	75
4.3.2.	Izražaj staničnih deubikvitinilaza u stanicama inficiranim mišjim citomegalovirusom....	79
4.4.	Učinak MCMV infekcije na status ubikvitiniliranosti staničnih proteina na EE-ERC sučelju	82
4.5.	Uloga WASHC1 u nastanku AC-a u stanicama inficiranim mišjim citomegalovirusom.....	86
4.6.	Uloga deubikvitinilazne aktivnosti proteina M48 MCMV-a u remodeliranju EE-ERC sučelja i biogenezi AC-a .....	90
4.6.1.	Značaj deubikvitinilazne domene proteina M48 u replikacijskom ciklusu mišjeg citomegalovirusa .....	90
4.6.1.1.	Značaj deubikvitinilazne domene proteina M48 na izražaj proteina neposredno rane, rane i kasne faze infekcije mišjim citomegalovirusom .....	91
4.6.1.2.	Značaj deubikvitinilazne domene proteina M48 na proizvodnju novih virusnih čestica mišjeg citomegalovirusa.....	94
4.6.2.	Značaj deubikvitinilazne domene proteina M48 na nakupljanje Rab10 u području pre-AC .....	96
4.6.3.	Uloga deubikvitinilacijske domene proteina M48 u kinetici recikliranja transferinskog receptora u MCMV inficiranim stanicama .....	97

4.6.4. Uloga deubikvitinilazne domene proteina M48 u regulaciji ubikvitinilacije staničnih proteina koji reguliraju endosomalno recikliranje .....	101
5. RASPRAVA.....	104
5.1. Ubikvitinilacija je važna za uspostavljanje MCMV infekcije i odvijanje virusnog replikacijskog ciklusa .....	104
5.2. Ubikvitinilacija regulira stvaranje i održavanje funkcionalnog AC-a u stanicama inficiranim MCMV-om .....	107
5.3. Uloga ubikvitinilacije u narušavanju endosomalnog recikliranja u MCMV inficiranim stanicama .....	112
5.3.1. Značaj ubikvitinilacije u recikliranju transferinskog receptora u MCMV-inficiranim stanicama .....	114
5.4. Ubikvitinilacijski mehanizmi u modulaciji imunološkog odgovora stanice tijekom infekcije mišjim citomegalovirusom .....	115
6. ZAKLJUČCI .....	118
7. LITERATURA .....	119
ILUSTRACIJE .....	139
Popis slika.....	139
Popis tablica.....	141
POPIS POKRATA .....	142
ŽIVOTOPIS.....	145

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

## 1.1. Citomegalovirusna infekcija stanica

Virusi su metabolički neaktivne čestice koje za opstanak i razmnožavanje trebaju žive organizme. Nakon ulaska u stanicu manipuliraju staničnim sustavima kako bi osigurali replikaciju vlastitoga genoma, sintezu virusnih proteina i sklapanje novih virusnih čestica [1]. Stoga su morali, tijekom dugog perioda evolucijske povijesti, razviti prilagodbe na specifične organizme i stanične mehanizme svojih domaćina [2]. Međunarodni odbor za taksonomiju virusa (ICTV engl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*) viruse svrstava u kategorije reda, obitelji, roda i vrste prema različitim kemijskim i fizikalnim svojstvima, kao što su tip nukleinske kiseline, broj virusnih gena, veličina i oblik virusne čestice, bolesti koje uzrokuju, te vrsta domaćina [3]. Obitelj *Herpesviridae* čine virusi čiji su virioni građeni od ikozaedralne nukleokapside promjera 120 - 200 nm, okružene virusnom ovojnicom unutar koje se nalazi jedna linearna molekula dvolančane deoksiribonukleinske kiseline (DNA, engl. *deoxiribonucleic acid*). Genom herpesvirusa se replicira u jezgri zaražene stanice, a nukleokapside pupaju kroz jezgrinu ovojnicu tijekom procesa primarnog omatanja. Sekundarno omatanje i stvaranje zrele virusne čestice događa se u citoplazmi [4]. Domaćini herpesvirusima mogu biti ptice, gmazovi ili sisavci, a zajedničko obilježje im je uspostavljanje dugoročnih latentnih infekcija. Za vrijeme latentne infekcije virusni genom se zadržava u stanici bez produkcije infektivnih viriona, ali zadržava mogućnost reaktivacije kao odgovor na razne stimulanse [1]. Viruse iz obitelji *Herpesviridae* dijelimo u tri podobitelji: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* i *Gamaherpesvirinae*. Podobitelj *Betaherpesvirinae* podijeljena je u 5 rodova: *Cytomegalovirus*, *Proboscivirus*, *Roseolavirus*, *Muromegalovirus* i *Quwivirus*. U viruse porodice *Alphaherpesvirinae*, koji najčešće mogu zaraziti ljude, ubrajamo herpes simpleks virus 1 (HSV-1) i herpes simpleks virus 2 (HSV-2), kao i varicella zoster virus (VZV). Svi oni ostvaruju latenciju u senzornim neuronima te nakon reaktivacije inficiraju epitelne stanice u sluznicama ili koži [5]. Virusi iz skupine *Betaherpesvirinae* se razlikuju od ostalih članova obitelji *Herpesviridae* po ograničenom spektru domaćina i dugom životnom ciklusu [6]. Period latencije betaherpesvirusa može trajati cijeli životni vijek domaćina, ali može i doći do njihove reaktivacije uslijed narušavanja homeostaze organizma. U potonjem slučaju dolazi do pokretanja litičkog ciklusa i proizvodnje novih virusnih čestica koje se mogu prenositi na nove domaćine [7]. Humani betaherpesvirusi, poput humanog citomegalovirusa (HCMV, engl. *Human cytomegalovirus*), humanog herpesvirusa-6 (HHV-6) i humanog herpesvirusa-7 (HHV-7) uspostavljaju latentnu infekciju u mononuklearnim stanicama, dok humani gamaherpesvirusi Epstein-Barr virus (EBV) i herpesvirus povezan s Kaposijevim sarkomom (KSHV, engl. *Kaposi's sarcoma herpesvirus*) uspostavljaju latenciju u B stanicama [8].

### 1.1.1. Citomegalovirus

Humani citomegalovirus je veliki DNA virus, koji izaziva pretežno asimptomatske infekcije u 50 – 85% svjetske populacije. Najveću prijetnju u smislu razvoja ozbiljnih oblika bolesti virus predstavlja za imunokompromitirane osobe i novorođenčad. HCMV se smatra glavnim uzročnikom urođenih anomalija koje nisu genetskog porijekla, kao i smrtnosti među djecom. Infekcija tijekom trudnoće, osobito u ranoj fazi (prvom tromjesečju), povezana je s povećanim rizikom od teških komplikacija kod novorođenčadi [9]. Brojni molekularni i stanični mehanizmi odgovorni za patofiziološke učinke ovog virusa još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Kod osoba zaraženih HCMV-om, patološke promjene proizlaze iz narušavanja staničnog mikrokruženja, uključujući poremećaje signalnih putova, te imunoloških reakcija i metaboličkih procesa, posebno u kontekstu interakcije majke i fetusa [10]. Unatoč činjenici da je HCMV najdetaljnije proučen betaherpesvirus, osobito kad je riječ o životnom ciklusu virusa i regulaciji virusnih gena, brojne znanstvene studije se ipak oslanjaju na mišji citomegalovirus (MCMV) kao eksperimentalni model. Ova dva virusa vrlo su slična na genetskoj razini, a istraživanje na mišjem modelu je sigurnije, ali i pruža mogućnost mnogih analiza, poput genetskih manipulacija u svrhu istraživanja interakcija domaćina i virusa. Pored toga, MCMV pokazuje i prednost znatno kraćeg replikacijskog ciklusa – nove virusne čestice formiraju se unutar 48 do 72 sata, dok kod HCMV-a taj proces traje između 5 i 7 dana [11–15]

#### 1.1.1.1. Patogeneza i terapija citomegalovirusne infekcije

Infekcija HCMV-om kod imunokompromitiranih pojedinaca može dovesti do ozbiljnih, potencijalno smrtonosnih oboljenja. HCMV u ljudskom organizmu pokazuje izraženu sposobnost infekcije različitih tipova stanica, uključujući fibroblaste, epitelne i endotelne stanice, monocite i makrofage, glatke mišićne stanice, neurone, neutrofile te hepatocite [16]. Virus koristi specifične mehanizme za ulazak ovisno o vrsti stanice koju zaražava [17], a upravo ta raznolikost u staničnoj osjetljivosti (tropizmu) omogućava mu da zarazi brojne organe i tkiva. Ipak, iako virus može prodrijeti u veliki broj ciljnih stanica, uspješno razmnožavanje virusa u laboratorijskim uvjetima (*in vitro*) odvija se prvenstveno u primarnim fibroblastima, stanicama endotela, epitela oka i nekim diferenciranim stanicama mijeloične loze [18–20].

Infekcija citomegalovirusom je kompleksna i može se podijeliti na tri podtipa. Primarna infekcija se pojavljuje kada pojedinac prvi puta dolazi u kontakt s virusom te nema razvijen imunološki odgovor. Nakon toga virus uspostavlja latentnu infekciju iz koje se može reaktivirati, što predstavlja drugi tip infekcije. Treći tip infekcije je ponovna infekcija već ranije inficiranoga pojedinca usprkos već stečenoj prirodnoj imunosti – superinfekcija [21]. Citomegalovirus se prenosi tjelesnim izlučevinama zaraženih osoba kao što su slina i urin, a može se prenositi i spolnim odnosom kroz sjemenu tekućinu ali i transfuzijom krvi ili pri transplantaciji organa [21, 22]. Infekcija zdravih pojedinaca HCMV-om većinom je asimptomatska ali

ponekad može dovesti do razvoja simptoma vrlo sličnih infektivnoj mononukleozu uzrokovanju Epstein-Barr virusom, kao što su vrućica, umor, bolno grlo, otečeni limfni čvorovi [23]. HCMV se smatra najopasnijim oportunističkim patogenom u imunokompromitiranih ljudi, kao što su pacijenti kojima su transplantirani organi ili matične stanice, pacijenti koji primaju kemoterapiju te pacijenti sa sindromom stečene imunodeficijencije (AIDS, engl. *acquired immunodeficiency syndrome*). Primarna infekcija HCMV-om ili reaktivacija infekcije u ovih skupina pacijenata može rezultirati razvojem upale pluća, retinitisa, hepatitisa i encefalitisa [21, 24, 25]. Bitno je napomenuti da je infekcija citomegalovirusom najčešća kongenitalna infekcija u svijetu, a 10 – 15 % zaražene novorođenčadi pokazuje kliničke simptome kao što su visceralna organomegalija, mikrocefalija s intrakranijalnim kalcifikatima, korioretinitis, žutica, mentalna retardacija, sensorineuralni gubitak sluha (SNHL, engl. *sensoryneural hearing loss*) i lezije kože [26]. Zbog težine zdravstvenih komplikacija koje HCMV može izazvati kod ranjivih skupina, postoji snažna potreba za razvojem učinkovitijih i sigurnijih antivirusnih terapija i cjepiva radi suzbijanja ove infekcije [27].

#### ***1.1.1.1.1. Antivirusni lijekovi u citomegalovirusnoj infekciji***

Trenutno ne postoje učinkovita cjepiva protiv niti jednog beta herpesvirusa, a dostupne antivirusne terapije su ograničene učinkovitosti i uzrokuju veliki broj nuspojava. Razlog nedovoljne učinkovitosti lijekova za liječenje bolesti uzrokovanih beta herpesvirusima kod ljudi je i taj što ovi virusi, primjerice u svrhu razmnožavanja, koriste stanične organele za replikaciju genoma i sastavljanje viriona. Stoga je u terapiji teško selektivno ciljati sam virus.

Najčešće korišteni lijekovi za liječenje aktivne infekcije HCMV-om su nukleozidni analozi poput aciklovira, ganciklovira i cidofovira. Oni oponašaju supstrat virusne DNA polimeraze i djeluju kao kompetitivni inhibitori u sintezi virusne DNA. U imunokompromitiranih pacijenata najčešće se koristi ganciklovir. On se unutar stanice fosforilira pomoću virusne kinaze UL97, a potom i staničnih kinaza. Time nastaje ganciklovir trifosfat koji može inhibirati virusnu DNA polimerazu UL54. Aktivacija lijeka od strane virusnoga proteina omogućava selektivnost lijeka za inficirane stanice. Ostali tradicionalni antivirusni lijekovi valganciklovir i foskarnet također su nukleozidni analozi koji inaktiviraju DNA polimerazu što može rezultirati mutacijama i rezistencijom na lijekove [28]. Klinička upotreba navedenih lijekova ograničena je načinom primjene (lijekovi se primjenjuju isključivo intravenozno), toksičnosti lijekova i razvojem rezistencije, što je dovelo do potrebe za razvojem drugih lijekova za liječenje HCMV infekcije. Letermovir i maribavir se koriste za liječenje akutne HCMV infekcije kod pacijenata nakon transplantacije organa ili pacijenata s AIDS-om. U usporedbi s tradicionalnim lijekovima letermovir i maribavir imaju mnoge prednosti: mogu se uzimati oralno, nema potrebe za hospitalizacijom pacijenta i manje su toksični. Obzirom da ne djeluju na DNA polimerazu, ne postoji rizik od nastanka rezistencije [29]. Letermovir djeluje na kompleks virusne terminaze koji je visoko specifičan za herpesviruse, a kako ne postoji analogni kompleks u stanicama sisavaca to ga čini odličnim ciljem za djelovanje antivirusnih lijekova [30]. Maribavir

djeluje na virusnu kinazu UL97 koja je ključna za sastavljanje virusnog tegumenta, formiranje odjeljka za sklapanje virusnih čestica unutar stanice i otpuštanje viriona [31]. Osim antivirusnih lijekova koji ciljaju specifični virusni protein, u kliničkoj praksi primjenjuju se i druge metode liječenja infekcije HCMV-om. Tako se, primjerice, uz terapiju ganciklovikom primjenjuje i pasivna imunizacija protu-CMV IgG protutijelima [32]. Adaptivna terapija T stanicama (ACT, engl. *adaptive T cell therapy*) primjenjuje se kod pacijenata nakon transplantacije organa [33–35]. Svi dosad navedeni antivirusni lijekovi ciljaju HCMV za vrijeme aktivne, litičke infekcije unutar stanica te su stoga neučinkoviti za latentno prisutne viruse u organizmu. Reaktivacija latentne infekcije također predstavlja veliki rizik za imunokompromitirane pacijente ili pacijente nakon transplantacije organa i matičnih stanica. Stoga bi uklanjanje latentnih virusnih čestica iz transplantiranih tkiva bilo od znatne kliničke važnosti [36]. Potencijalni lijekovi za terapiju latentnih infekcija trebali bi ciljati virusne proteine koji se izražavaju tijekom latencije kao što je US28, receptor vezan s G proteinima koji se izražava na površini latentno inficiranih stanica [37].

#### **1.1.1.1.2. Razvoj cjepiva protiv citomegalovirusne infekcije**

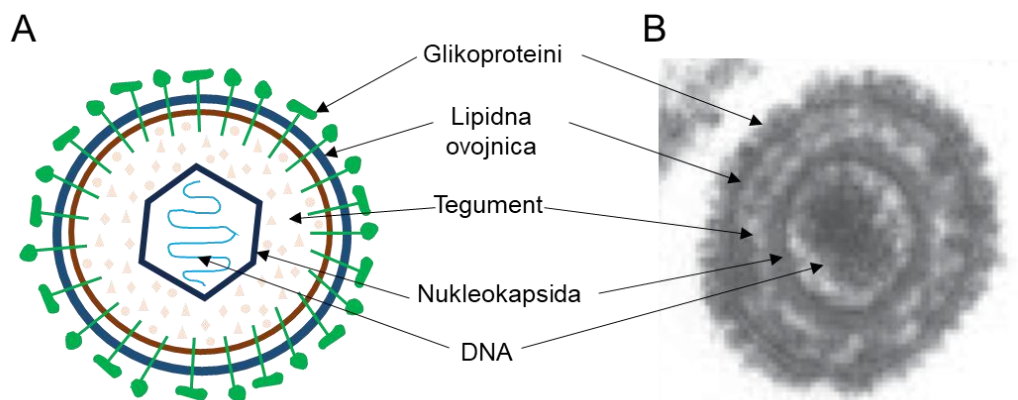
S obzirom na podatke o rezistenciji na ganciklovir, koji se najučestalije koristi u liječenju infekcije HCMV-om, razvoj cjepiva protiv HCMV-a postao je jedan od glavnih javnozdravstvenih prioriteta. Otkriće cjepiva bilo bi značajno kako za žene u reproduktivnoj dobi (u svrhu sprječavanja kongenitalne infekcije HCMV-om) tako i za osobe s transplantiranim organima. Jedan od najvećih izazova pri stvaranju cjepiva je visoka specifičnost CMV-a za vrstu, a time i nepostojanje prikladnog životinjskog modela.

Do danas su razvijena eksperimentalna cjepiva protiv HCMV-a na obrascu živih, oslabljenih varijanti virusa, kao i na rekombinantnim modelima u kojima su modificirani ključni virusni geni [38]. U međuvremenu se pokazalo da cjepiva s oslabljenim varijantama virusa ne uzrokuju dovoljno jaku imunološku reakciju koja bi osigurala zaštitu od buduće infekcije [39]. Adjuvantno proteinsko gB (glikoprotein na površini HCMV-a koji sudjeluje u ulasku virusa u stanicu domaćina) cjepivo, kao i DNA cjepivo temeljeno na gB i pp65, pokazali su pozitivne rezultate u kliničkim studijama [40]. Ipak, kao najbolji kandidat za razvoj cjepiva pokazao se pentamerni kompleks gH/gL/UL128-130-131A, važan za ulazak virusa u stanicu te su neutralizirajuća protutijela koja prepoznaju ovaj kompleks značajno smanjila infekciju epitelnih i endotelnih stanica [41]. U tijeku su i studije koje istražuju replikacijski defektno cjepivo DISC (engl. *disabled single cycle*) [42], živo virusno cjepivo temeljeno na kimernim rekombinantama virusa izvedenim iz Towne i Toledo sojeva HCMV-a [39], eVPL (engl. *virus-like particles*) cjepivo [43], te cjepiva na bazi peptida [44, 45]. Trenutno se čini najboljim pristup kojim bi se kombiniralo djelovanje nekoliko antigena unutar jednog cjepiva. To bi se moglo postići korištenjem vektorskih ili mRNA cjepiva, a ono bi bilo sposobno istovremeno stimulirati nekoliko područja imunološkog sustava. Napredak u razvoju cjepiva koji je postignut u svrhu borbe protiv pandemija SARS-CoV-2 mogao bi poslužiti kao osnova za razvoj cjepiva protiv HCMV-a [41].



### 1.1.1.2. Građa citomegalovirusne čestice

Virusna čestica citomegalovirusa, kao i ostalih herpesvirusa, građena je od četiri glavna dijela: genoma, kapside, tegumenta i virusne ovojnice (slika 1) [46]. Najbolje je istražena i opisana struktura virusne čestice HCMV-a, vrlo slična virusnoj čestici MCMV-a, čiji se virusni replikacijski ciklus istražuje u ovome radu.



**Slika 1. Građa citomegalovirusnog viriona.** Dvolančani DNA genom smješten je unutar kapside te zajedno tvore nukleokapsidu koja vezuje tegument. Cijela virusna čestica obavijena je lipidnom ovojnicom koja sadrži glikoproteine. (A) Shematski prikaz viriona CMV-a (prilagođeno prema [46]). (B) Virion HCMV-a snimljen elektronskim mikroskopom (preuzeto iz [47]).

Virioni CMV-a promjera su oko 200 nm. U unutrašnjosti se nalazi genom (236 kb u HCMV-u i 220 kb u MCMV-u) u obliku linearne dvolančane DNA molekule (dsDNA, engl. *double stranded DNA*), okružen ikozaedralnom nukleokapsidom promjera oko 130 nm. Najčešći proteini nukleokapside su: veliki kapsidni protein, UL86, odnosno MCP (engl. *major capsid protein*) i mali kapsidni protein UL48.5, odnosno SCP (engl. *small capsid protein*). Osim strukturne uloge, važni su i u regulaciji ulaska genomske DNA u kapsidu te vezivanju proteina tegumenta [46]. Tegument je smješten između kapside i ovojnice te predstavlja djelomično organiziranu strukturu građenu od približno 20 različitih proteina. Ti proteini imaju važnu ulogu u različitim fazama virusnog replikacijskog ciklusa – od početnih stadija infekcije, kada sudjeluju u regulaciji transkripcije ili djeluju kao strukturne komponente stabilizirajući kapsidu, pa sve do kasnijih procesa kao što su omatanje i izlazak viriona iz stanice. Određeni tegumentni proteini vežu se za kapside još unutar jezgre, dok se većina njih dodaje u citosolu stanice domaćina. Ovojnica CMV viriona sastoji se od lipidnog dvosloja porijeklom iz unutarstaničnih membrana stanice domaćina, a sadrži i velik broj virusnih glikoproteina. Mnogi od tih glikoproteina imaju ključnu ulogu u inicijalnim fazama infekcije, omogućujući vezanje virusa za stanične receptore i ulazak u ciljnu stanicu [46, 48]. Zanimljivo je da brojni

geni odgovorni za sintezu HCMV kapsidnih, tegumentnih proteina i proteina ovojnice imaju svoje homologne gene i kod MCMV-a [46, 49, 50].

### **1.1.1.3. Životni ciklus citomegalovirusa**

Životni ciklus CMV-a dijeli se na litičku i latentnu fazu, odnosno stanje neaktivne infekcije. Latentna faza može potrajati cijeli život, a najčešće se javlja kod osoba s neoštećenim imunološkim sustavom. U tom slučaju uglavnom prolazi nezapaženo jer je virus pod stalnom kontrolom domaćina. S druge strane, kod osoba oslabljenog imuniteta te novorođenčadi, često dolazi do ponovne aktivacije virusne infekcije tijekom promjenjivog procesa "infekcija-latencija-reaktivacija". U tim slučajevima, virus prelazi u litičku fazu kako bi proizveo nove virusne čestice [51, 52]. Tada virus u stanici domaćina započinje niz događaja koji uključuju dopremanje određenih virusnih komponenti u jezgru i pokretanje transkripcije, što rezultira uspostavom rane i kasne faze izražaja virusnih gena. Ovi stupnjeviti procesi u konačnici omogućuju sintezu novih virusnih čestica te njihovo otpuštanje iz inficirane stanice. CMV se može replicirati unutar različitih tipova stanica, kako *in vivo* tako i *in vitro*, pri čemu njegov izražen stanični tropizam igra ključnu ulogu u učinkovitom širenju virusa unutar jednog organizma, ali i među različitim domaćinima [53]. Virus može zaraziti brojne stanične populacije, uključujući fibroblaste, epitelne i endotelne stanice, glatke mišićne stanice te monocite [54]. U fibroblastima dolazi do intenzivne virusne replikacije, što rezultira stvaranjem velikog broja novih viriona [55].

#### **1.1.1.3.1. Mehanizam ulaska citomegalovirusa u stanicu**

Životni ciklus citomegalovirusa započinje njegovim ulaskom u stanicu. Ulazak virusa se može odvijati na dva načina: (1) pH-neovisnom fuzijom sa staničnom membranom domaćina ili (2) endocitozom/makropinocitozom. Tako je poznato da HCMV ulazi u fibroblaste uglavnom putem fuzijskog mehanizma, nakon vezanja glikoproteina virusne ovojnice na specifične receptore stanica domaćina [56–58], ali je moguć ulazak i makropinocitozom, inače uobičajenim načinom internalizacije virusa u monocite te epitelne i endotelne stanicame [17]. Neovisno o specifičnom putu ulaska, virusni glikoprotein gB ima centralnu ulogu u tom procesu, djelujući kao ključni posrednik interakcije s površinskim molekulama stanice domaćina [59]. Osim gB-a, glikoproteini gH i gL također su esencijalni za uspješnu infekciju, te zajedno s njime čine temeljni fuzijski aparat HCMV-a. Kompleksi u kojima sudjeluju gH i gL definiraju tropizam virusa prema različitim tipovima stanica [60]. Pentamerni kompleks gH/gL/UL128/UL130/UL131 specifično se veže na Neuropilin-2, a njegov izražaj nužan je za ulazak virusa u endotelne, epitelne i mijeloidne stanice [16, 61]. Nasuprot tomu, trimerni kompleks gH/gL/gO usmjerava infekciju fibroblasta vezanjem na receptor faktora rasta izveden iz trombocita (PDGFR, engl. *platelet-derived growth factor receptor*) [17, 62].

Vrlo brzo nakon ulaska viriona, nukleokapside, zajedno s tegumentnim proteinima, dopremaju se iz citoplazme do jezgre uz pomoć mikrotubularne mreže. Ovaj transportni proces posredovan je djelovanjem tegumentnih proteina UL47, UL48 i UL69, kao i glavnim kapsidnim proteinom UL86. Određeni tegumentni proteini HCMV-a, poput pp65 i pp71, ulaze u jezgru neovisno o kapsidi [63, 64]. Po dolasku u jezgru započinje transkripcija te potom replikacija virusnog genoma [49].

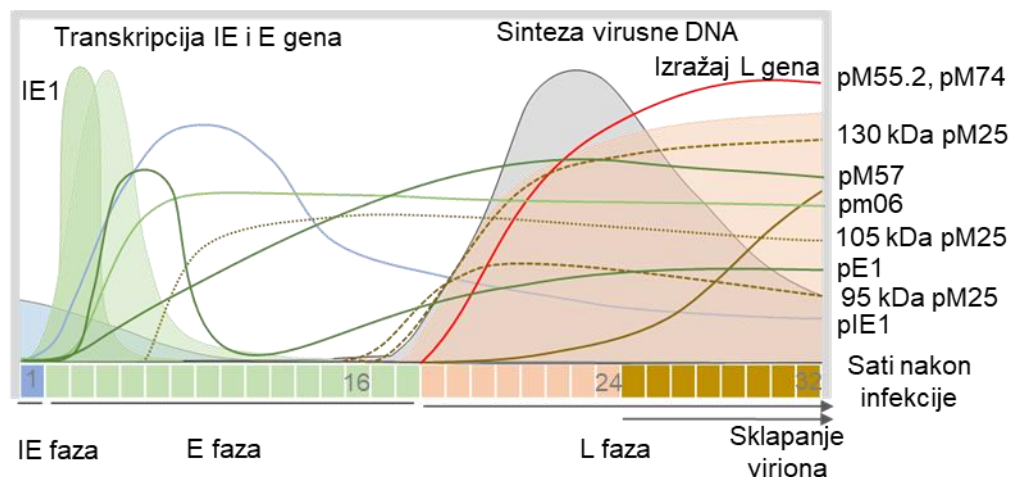
#### **1.1.1.3.2. Životni ciklus ljudskog citomegalovirusa**

Transkripcija virusnih gena tijekom infekcije HCMV-om odvija se kaskadno i vremenski je podijeljena u tri glavne faze: neposredno ranu (IE, engl. *immediate early*), ranu (E, engl. *early*) i kasnu fazu (L, engl. *late*). Geni koji pripadaju neposredno ranoj fazi transkribiraju se odmah nakon ulaska virusa u stanicu. Oni će potom regulirati aktivaciju transkripcije sljedećih virusnih gena, a time će se potaknuti sinteza virusnih proteina i odvijanje replikacijskog ciklusa. Transkripcija ranih gena ovisi o *de novo* sintezi proteina IE, čiji su produkti esencijalni za uspostavu produktivne infekcije [65]. Rani virusni geni uključeni su u procese replikacije genoma, formiranje replikacijskih centara unutar jezgre, kao i u sintezi i regulaciji proteina koji djeluju u modulaciji i izbjegavanju imunološkog odgovora domaćina [66]. Replikacija virusne DNA završava krajem rane faze i preduvjet je za transkripciju gena kasne faze virusnog replikacijskog ciklusa. Geni kasne faze kodiraju proteine uključene u morfogenezu viriona, a njihova ekspresija pokreće kompleksan proces sastavljanja novih virusnih čestica. U ovu skupinu ubrajaju se brojni proteini tegumenta i ovojnice. Značajan dio virusnog transkriptoma čine upravo kasni geni, koji obuhvaćaju sve litičke gene i predstavljaju približno 51 % ukupnih genskih produkata HCMV-a [67].

U ljudskim fibroblastima, transkripcija gena neposredno rane (IE, engl. *immediate early*) i rane (E, engl. *early*) faze odvija se unutar prvih 24 sata od početka infekcije. Dok se razina izražaja IE proteina, primjerice IE1, postupno smanjuje, ekspresija produkata ranih gena uglavnom ostaje konstantna ili se čak progresivno povećava. Sinteza virusne DNA započinje otprilike 24 sata nakon infekcije (hpi, engl. *hours post infection*), a njezina količina kontinuirano raste do postizanja platoa u periodu 72 - 96 hpi. Geni kasne faze (L, engl. *late*) počinju se izražavati u intervalu između 48 i 72 hpi [68]. Tijekom rane faze (oko 24 hpi) započinje reorganizacija membranskog sustava unutar stanice (odjeljak 1.1.1.7.2), što je ključno za formiranje odjeljka za sklapanje virusnih čestica, poznatog kao AC (engl. *assembly compartment*). Ova visoko organizirana struktura, u kojoj se odvija završna faza sazrijevanja i sastavljanja virusnih čestica, postaje jasno oblikovana između 120 i 144 hpi [69].

### 1.1.1.3.3. Životni ciklus mišjeg citomegalovirusa

Replikacijski ciklus MCMV-a (slika 2) pokazuje značajnu sličnost s ciklusom HCMV-a, iako je znatno brži. U mišjim fibroblastima, transkripcija gena IE faze započinje već nakon 1 - 2 hpi. Nakon toga slijedi aktivacija prve skupine E gena, čiji se proteinski produkti detektiraju 2 - 3 hpi, dok se većina produkata gena E faze izražava 4 - 5 hpi [70]. Sinteza virusne DNA započinje pri završetku E faze te se u najvećem dijelu dovršava između 16 i 24 hpi (slika 2) [71]. Citomegalovirusi kodiraju šest proteina koji su nužni za učinkovitu replikaciju virusne DNA. To su: DNA polimeraza (MCMV protein M54; homolog HCMV proteina UL54), pomoćna podjedinica DNA polimeraze (MCMV protein M44; HCMV UL44), primaza (MCMV protein M70; HCMV UL70), helikaza (MCMV protein M105; HCMV UL105), čimbenik povezan s primazom (MCMV protein M102; HCMV UL102) te protein koji se veže za jednolančanu DNA (MCMV protein M57; HCMV UL57) [72, 73]. Kao što je slučaj i kod HCMV-a, potpuna replikacija genoma MCMV-a predstavlja preduvjet za prijelaz u L fazu replikacijskog ciklusa. Transkripcija gena L faze pokreće se 16 hpi, dok se najviša razina izražaja bilježi unutar razdoblja 24 - 48 hpi. Paralelno s time, reorganizacija staničnih membranskih struktura, kao temelj za uspostavljanje ranog odjeljka za sklapanje virusnih čestica (pre-AC), započinje 5 - 6 hpi, a preAC se u većini zaraženih stanica može uočiti između 8 i 10 hpi. Zreli oblik AC-a, karakteriziran nakupljanjem strukturnih virusnih proteina, postaje vidljiv između 16 i 20 hpi, a do 48 hpi prisutan je u otprilike 50 % zaraženih stanica [74–76].

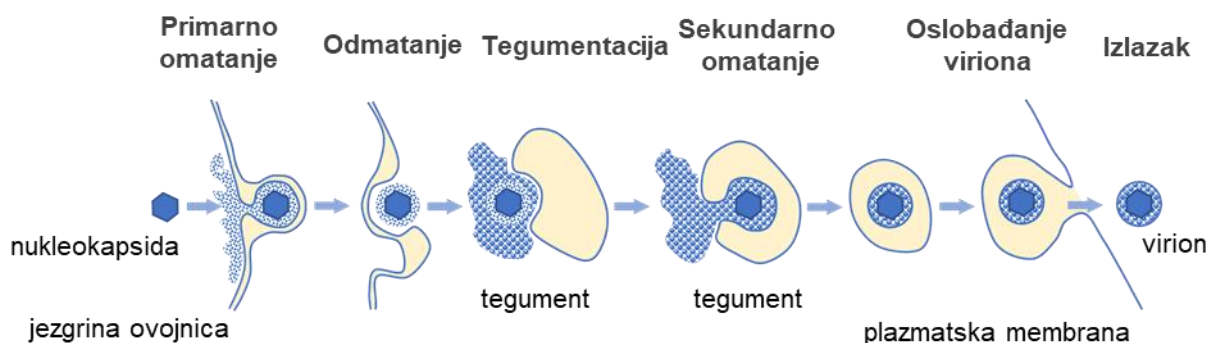


**Slika 2. Životni ciklus MCMV-a i kinetika izražaja MCMV-gena.** Nakon ulaska virusa, u stanici započinje kaskadna ekspresija MCMV gena, prikazana prema vremenskim fazama. Proteini rane faze (IE) označeni su svijetloplavom bojom, proteini rane faze (E) zelenom, a proteini kasne faze (L) narančastom bojom. Proteini faze IE mogu se detektirati već 1 – 2 sata nakon infekcije, nakon čega slijedi sinteza proteina faze E, uključujući pE1, pM57 i pM25 (105 kDa). Usporedno s replikacijom virusne DNA započinje sinteza proteina kasne faze, kao što su pM25 (130 kDa), pM55 i pM74, a potom se pokreće i proces sklapanja novih virusnih čestica. Vremenski intervali prikazani su

pravokutnicima, pri čemu svaki predstavlja jedan sat nakon infekcije. Ovaj prikaz preuzet je i preveden iz izvora [75].

#### 1.1.1.3.4. Sklapanje novih čestica citomegalovirusa

Sklapanje zrelih virusnih čestica citomegalovirusa odvija se u dvije faze: (1) primarno omatanje te (2) sekundarno omatanje. Proces izlaska novostvorenih nukleokapsida iz stanične jezgre naziva se primarno omatanje [77]. Sekundarno omatanje odvija se u preuređenim citoplazmatskim membranskim odjeljcima domaćinske stanice, gdje dolazi do sastavljanja zrelih virusnih čestica. Ovaj proces, iako još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, uključuje interakcije između virusnih proteina tegumenta i ovojnice te komponenti endosomalnog i sekrecijskog sustava stanice (slika 3) [46, 69, 75, 78, 79].



**Slika 3. Proces proizvodnje betaherpesvirusa.** Novosintetizirane nukleokapside, djelomično obavijene tegumentnim proteinima, izlučuju se iz jezgre u citoplazmu putem procesa primarnog omatanja na unutarnjoj membrani jezgre, praćenog odmatanjem na vanjskoj membrani jezgre. Potom nukleokapside dopijevaju do citoplazmatskog odjeljka za sklapanje viriona (AC), gdje stječu konačni tegument i virusnu ovojnicu kroz proces sekundarnog omatanja. Nakon toga, zreli virioni se oslobađaju iz zaražene stanice [79].

Sklapanje virusnih nukleokapsida odvija se unutar jezgre tijekom produktivne infekcije, nakon završetka replikacije virusnog genoma i sinteze strukturnih proteina kapside. Proces uključuje pakiranje virusne genomske DNA u prethodno sastavljene nezrele kapsidne strukture [46], uz istovremeno početno vezivanje ponekih tegumentnih proteina. Unutar jezgre mogu se razlikovati tri morfološki i funkcionalno različita tipa kapsida, označena kao A, B i C. Kapside tipa A predstavljaju najnezreliji oblik te se pod elektronskim mikroskopom prepoznaju kao prazne, neispunjene strukture. Kapside tipa B karakterizira prisutnost skeletnih, odnosno potpornih proteina. Nasuprot tome, kapside tipa C, koje su najzastupljenije u zaraženim stanicama, sadrže pakiranu genomsku DNA i predstavljaju potpuno zreli oblik virusne kapside. Pretpostavlja se da kapside tipa A i B predstavljaju međufaze u procesu njezinog sazrijevanja prema zrelom

tipu C, ali je moguće i da predstavljaju abortivne oblike koji nisu uspjeli uklopiti virusni genom [67, 80, 81].

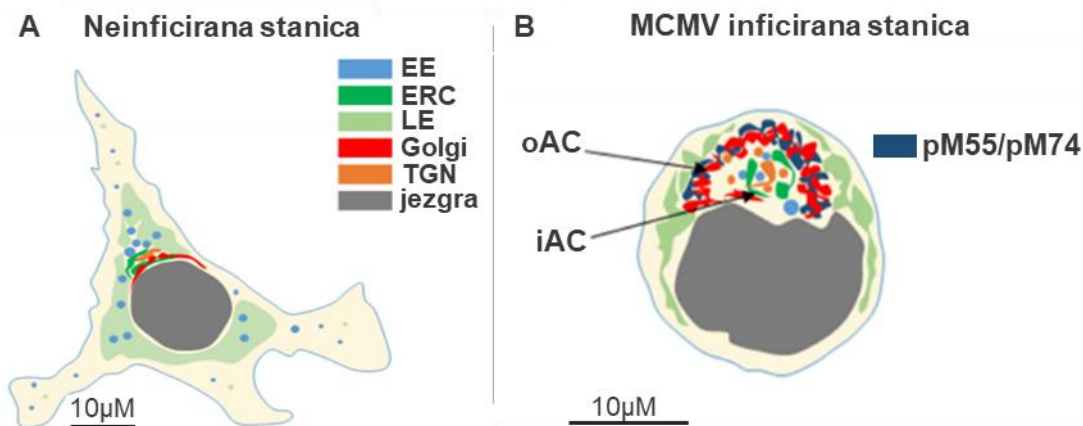
U fazi *primarnog omatanja*, virusne kapside privremeno dobivaju lipidni omotač procesom pupanja kroz unutarnju membranu jezgrine ovojnice, te dospijevaju u perinuklearni prostor. Nakon toga dolazi do fuzije lipidne ovojnice virusne čestice s vanjskom membranom jezgrine ovojnice, čime se gubi dobiveni omotač, a ogoljena kapsida se premješta u citoplazmu stanice (slika 3). Unutar citoplazme, kapside stječu tegumentne proteine te ulaze u proces sekundarnog omatanja [82, 83].

Tijekom procesa *sekundarnog omatanja*, virusne kapside s tegumentnim proteinima prolaze kroz membrane različitih citoplazmatskih odjeljaka domaćinske stanice te stječu svoj konačni omotač. Potom se, kao zrele virusne čestice, prenose do plazmatske membrane i oslobađaju u izvanstanični prostor. Proces sazrijevanja i omatanja zrelih kapsida citomegalovirusa odvija se unutar specijaliziranog odjeljka za sklapanje virusnih čestica [77].

CMV, slično ostalim herpesvirusima, već u ranim fazama infekcije pokreće značajne unutarstanične promjene, među kojima se ističe opsežno remodeliranje staničnih membranskih odjeljaka. Rezultat ove reorganizacije je formiranje AC-a, megastrukture koja se stvara u blizini centra za organizaciju mikrotubula (MTOC; engl. *microtubule organizing center*), i koja djeluje kao unutarstanična „tvornica” za sastavljanje virusa (slika 4). U početku je bio identificiran kao mjesto nakupljanja virusnih proteina, a danas je poznato da u njegov sastav ulazi većina membranskih organela stanice domaćina [63]. Unatoč brojnim istraživanjima usmjerenima na razjašnjavanje biogeneze, strukturnih karakteristika i funkcionalne uloge ovog odjeljka, mehanizmi koji upravljaju njegovim nastankom, kao i precizan slijed događaja koji rezultiraju stvaranjem infektivne virusne čestice, i dalje ostaju nedovoljno razjašnjeni [75, 78, 84, 85].

Morfološka obilježja AC-a u fibroblastima inficiranim HCMV-om i MCMV-om pokazuje visoki stupanj sličnosti, bez značajnijih strukturnih razlika [15, 75, 85]. Središnji dio AC-a obično je organiziran oko MTOC-a, iz kojeg izbijaju mikrotubuli odgovorni za usmjeravanje i pozicioniranje staničnih organela prema središtu. Kao rezultat reorganizacije MTOC-a i nagomilavanja staničnih organela, jezgre inficiranih stanica često poprimaju karakterističan bubrežasti oblik. Unutrašnji dio AC-a (i-AC, engl. *inner AC*) sadrži remodelirane membrane ranih endosoma (EE, engl. *early endosome*), sučelja EE-a i endosomalnog reciklirajućeg odjeljka (ERC, engl. *endosomal recycling compartment*), sam ERC te elemente trans-Golgijeve mreže (TGN, engl. *trans-Golgi network*) (slika 4) [15, 69, 75, 78]. Vanjski prstenasti sloj AC-a (o-AC, engl. *outer AC*) sastoji se primarno od membrana Golgijevog aparata. Značajno je i istiskivanje drugih organela, poput endoplazmatskog retikuluma (ER, engl. *endoplasmic reticulum*) i kasni endosomi (LE, engl. *late endosome*), prema staničnoj periferiji [46, 75]. Ipak, u stanici inficiranoj HCMV-om, i LE

postaju dio AC-a [69, 85]. Nemogućnost stvaranja AC-a rezultira značajnim padom virusne replikacije i smanjenjem broja otpuštenih viriona [78].



**Slika 4. Shematski prikaz zrelog virusnog odjeljka za sklapanje virusnih čestica (AC) u MCMV-inficiranim stanicama.** (A) Smještaj staničnih organela u neinficiranoj stanici (B) U MCMV inficiranoj stanici nastaje AC, koji se sastoji od dva dijela: unutarnjeg (i-AC) i vanjskog (o-AC). Vanjski dio čine cis-Golgi, trans-Golgi i dio TGN-a. Unutrašnji dio sadrži reorganizirane membrane EE, ERC-a i dijela TGN-a. Kasni endosomi (LE) većinom se nalaze izvan Golgijevog prstena. Virusni proteini uključuju strukturne komponente ovojnice (pM55, pM74) i sastavne dijelove tegumenta (pM25). Prevedeno i preuzeto iz [75].

U ranoj fazi infekcije dolazi do preuređenja membrana EE, ERC-a i TGN-a čime se uspostavlja temeljna konstrukcija AC-a nazvana pre-AC. Virus uzrokuje premještanje membrana EE i ERC-a u perinuklearni dio stanice, gdje oni, nakupljanjem oko MTOC-a uzrokuju istiskivanje membranskih cisterni Golgijeva aparata prema periferiji. Tako se u središtu AC-a nalaze remodelirane membrane EE, sučelja EE i ERC te membrane samoga ERC-a, a okružuju ga premještene membrane Golgija koje postaju o-AC. Ipak, bitno je napomenuti da, iako Golgijeve cisterne postaju većinom dio o-AC-a, membranske komponente TGN-a uključuju se i u i-AC (slika 4) [15, 69, 75, 76, 86]. U kasnoj fazi, proteini virusne ovojnice (pM55, pM74, pM75) se uklapaju u membrane o-AC te struktura poprima svoj konačni, zreli oblik i naziva se AC [46]. Ovakva konfiguracija AC-a osigurava sekundarno omatanje viriona, napredovanje prema staničnoj membrani te njihovo pakiranje u membranske vezikule koje omogućavaju izlazak viriona iz stanice [46, 87]. Porijeklo membrana koje čine AC u CMV-inficiranim stanicama utvrđeno je praćenjem prisutnosti specifičnih endosomalnih biljega primjenom imunofluorescencijske mikroskopije, ali i drugih metoda koje ispituju proteinske interakcije. Proteini uključeni u procese reorganizacije endosomalnoga sustava tijekom virusne infekcije strogo su regulirani. Iako su identificirani određeni stanični proteini uključeni u ove mehanizme (poput dinamina, SNX27, sintaksina 5 i Arf-GTPaze), mehanizmi njihove regulacije, kao i točna prostorno vremenska dinamika tih događaja još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni [75, 86, 88–91].

## 1.2. Ubikvitinilacija

Iako se ljudski genom sastoji od oko 20000 gena, njegov proteom je znatno veći. Uzrok tome je alternativno izrezivanje mRNA molekula, ali i posttranslacijske modifikacije proteina [92]. Posttranslacijske modifikacije podrazumijevaju kemijske modifikacije proteina kovalentnim vezanjem funkcionalnih skupina ili malih proteina kao što su fosforilacija, glikozilacija, ubikvitinilacija, sumoilacija, palmitacija i mnoge druge [93]. *Ubikvitinilacija* je otkrivena ranih 1980. godina kao posttranslacijska modifikacija u kojoj se lizinski ostaci ciljnih proteina modificiraju dodavanjem 76 aminokiselinskih ostataka dugog proteina ubikvitina (Ub) teškog otprilike 8,5 kDa. Ubikvitin je evolucijski visoko očuvani protein građen od jedne globularne domene sa čvrsto pakiranim aminokiselinama koja ima gustu hidrofobnu jezgru. Na karboksikraju ubikvitina nalazi se struktura nalik repu koja završava glicinom, bitna u procesu konjugacije ubikvitina na supstrate [94]. Danas je poznato da stanica veliki broj proteina namijenjenih degradaciji obilježava kovalentnim dodavanjem ubikvitina, odnosno poliubikvitinskih lanaca, koji ih usmjeravaju u razgradnju pomoću sustava proteaza ovisnih o adenzin trifosfatu (ATP, engl. *adenosine triphosphate*), poznatih pod nazivom 26S proteasom [95]. U međuvremenu je otkriveno da ubikvitinilacija može imati i regulacijsku ulogu u stanicama mijenjajući strukturu proteina čime utječe na njihovu stabilnost i aktivnost, ali i na interakcije s ostalim proteinima, o čemu će biti više govora u kasnijim poglavljima [96].

### 1.2.1. Mehanizmi ubikvitinilacije ciljnih proteina

Do ubikvitinilacije dolazi stvaranjem kemijske veze između aminokiselinskog ostatka glicina na karboksi terminalnom kraju ubikvitina (G67) i amino skupine lizinskog ostatka na supstratu. Ova reakcija zahtjeva uzastopno djelovanje triju enzima: enzima E1 koji je zaslužan za aktivaciju ubikvitina, pa se stoga i naziva aktivirajući enzim te konjugirajućeg enzima E2, čija je uloga prenošenje aktiviranog ubikvitina do enzima E3 koji djeluje kao protein ligaza [97, 98]. Većina organizama, uključujući i sve kralježnjake, posjeduje samo dva E1 ubikvitin aktivirajuća enzima [99].

Reakcijska kaskada ubikvitinilacije započinje kada enzim E1 katalizira vezivanje ATP-a konjugiranog s magnezijevim ionom (MgATP) i ubikvitina, što dovodi do nastanka međuooblika AMP-Ub (engl. *adenosine monophosphate-ubiquitin*). Katalitički cistein enzima E1 zatim nukleofilno napada AMP-Ub čime dolazi do otpuštanja AMP-a i stvaranja tioesterske veze između E1 i Ub. Svaki E1 enzim veže dvije molekule aktiviranog ubikvitina, jedan u obliku tiol-estera, a drugi u AMP-Ub obliku. U sljedećem koraku enzim E1 vezuje enzim E2 i prebacuje aktivirani Ub na cisteinski ostatak u katalitičkom mjestu enzima E2. Time ponovno nastaje tioesterski međuooblik spreman za prenošenje aktiviranog Ub na supstrat. U usporedbi s enzimima E1, enzimi E2 su mnogo brojniji te ih u stanicama viših životinja nalazimo 40 - 50 [100]. Iako imaju sposobnost prenošenja Ub izravno na supstrat, specifičnost ubikvitinskog sustava osigurava krajnje



djelovanje enzima E3 koji specifično prepoznaju supstrat. Svaki enzim E2 može stvarati interakcije s nekoliko enzima E3. Stoga je specifičnost ubikvitinilacije i posljedica specifičnosti E2 za E3 [101]. Aminokiselinski ostaci koji su zaslužni za kataliziranje reakcije prebacivanja Ub s E1 na E2 nalaze se u aktivnom mjestu E1 enzima, dok je prebacivanje s E2 na supstrat katalizirano aminokiselinskim ostacima u aktivnom mjestu E3 ligaze [102, 103]. E3 ligaze kataliziraju posljednji korak ubikvitinske kaskade, odnosno prijenos Ub sa cisteina iz aktivnog mjesta E2 na lizinski ostatak supstrata. Genom sisavaca kodira nekoliko stotina različitih E3 enzima čime se osigurava potpuna specifičnost i točnost regulacije staničnih procesa ubikvitinilacijom [100]. Tri su kategorije E3 Ub ligaza: (1) HECT E3 ligaze koje posjeduju HECT (engl. *homologous with E6-associated protein C-terminus*) domenu, (2) RING E3 ligaze (engl. *really interesting new gene*) i (3) RBR E3 ligaze (engl. *ring between ring*) [100, 104].

Ljudski genom kodira 28 HECT E3 ligaza koje su građene od domene koja veže supstrat, smještene na N-terminalnom dijelu proteina, i HECT domene, smještene na karboksilnom kraju. HECT E3 ligaza prvi je puta opisana kao protein humanog papilloma virusa (HPV, engl. *human papilloma virus*), povezana s E6-proteinom (E6AP). Mehanizam djelovanja HECT E3 ligaza podrazumijeva da N-terminalni dio HECT domene veže kompleks E2-Ub, dok je C-terminalni dio nositelj katalitičkog mjesta s reaktivnim cisteinskim ostatkom. Nakon vezivanja E2-Ub na HECT domenu dolazi do prebacivanja ubikvitina na katalitički cisteinski ostatak, a zatim se HECT domena pozicionira tako da se Ub može prebaciti na lizinski ostatak supstrata [102, 105, 106]. Točan mehanizam kojim HECT E3 Ub ligaza katalizira prebacivanje Ub s E2 na supstrat nije još razjašnjen. S druge strane, E3 ligaze s RING domenom kataliziraju izravan prijenos ubikvitina s E2 na supstrat bez stvaranja tioesterske veze između Ub i cisteina u katalitičkom mjestu E3. RING domena za pravilno sklapanje zahtjeva prisutnost dvaju cinkovih iona, a aktivnost RING E3 ligaza značajno ovisi o kvartarnoj strukturi proteina. RING ligaze mogu djelovati kao monomeri ili kao oligomeri, ali i kao dio velikih kompleksa građeni od nekoliko podjedinica [103, 107, 108]. Točan mehanizam prijenosa Ub s enzima E2 na supstrat kataliziran RING E3 ligazama još nije razjašnjen. Međutim, poznato je da RING domena veže enzim E2 te izoleucin (I36) na površini Ub, dok se karboksi terminalni rep Ub pozicionira na način da omogućuje napad na E2-Ub tioestersku vezu od strane nadolazećeg lizinskog ostatka supstrata [109, 110]. Postoji i još dodatna E4 kategorija enzima u ubikvitinskoj kaskadi, a čije je uloga pomaganje E3 ligazama u sintezi dugih ubikvitinskih lanaca [100, 111].

Kako bi se u stanici održalo stanje homeostaze, ubikvitinilirani proteini moraju se u konačnici (prije razgradnje) deubikvitinilirati kako bi se održala zaliha Ub u stanici. Ubikvitin se sa supstrata uklanja djelovanjem ubikvitin hidrolaza poznatijih kao deubikvitinilaze (DUB, engl. *deubiquitinase*) [100]. Opisano je šest strukturno različitih razreda DUB enzima uključujući pet razreda cisteinskih proteaza i jedan razred metaloproteaza. U cisteinske proteaze ubrajamo: ubikvitin specifične proteaze (USP, engl. *ubiquitin specific proteases*), tumorske proteaze jajnika (OTP, engl. *ovarian tumor proteases*), C-terminalne ubikvitin

proteaze (UCP, engl. *ubiquitin C-terminal proteases*), Josephin obitelj proteaza i MINDY (engl. *motif interacting with ubiquitin (MIU) containing novel DUB family*) proteaze, dok JAMM (JAB1/MPN/MOV34 DUB) predstavlja o cinku ovisnu obitelj metaloproteaza [112–114]. Deubikvitinilaze kataliziraju hidrolizu na karboksi terminalnom kraju ubikvitina, kojega prepoznaju zahvaljujući površinskom hidrofobnom aminokiselinskom ostatku Ile44 [112, 113]. Poznata su dva različita načina kojima DUB mogu uklanjati Ub sa supstrata: (1) endo-izrezivanjem, koje za posljedicu ima otpuštanje cijelog ubikvitinskog lanca, a nakon čega mora uslijediti njegovo daljnje procesiranje u svrhu ponovnog dobivanja monoubikvitina, i (2) egzo-izrezivanjem, koje izravno rezultira nastankom slobodnoga monoubikvitina, s napomenom da DUB mora djelovati nekoliko puta kako bi se uklonio cijeli poliubikvitinski lanac [115].

### 1.2.2. Vrste ubikvitinilacije i njihov značaj

Ubikvitin na svojoj površini ima sedam lizinskih ostataka (Lys48, Lys63, Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33). Oni mogu djelovati kao adaptori za druge molekule ubikvitina čime nastaju različiti ubikvitinski polimeri. Prema tome, u stanicama nalazimo monoubikvitinilirane proteine koji vezuju samo po jedan ubikvitin, multimonoubikvitinilirane proteine koji prenose po jedan ubikvitin na nekoliko lizinskih ostataka i poliubikvitinske lance različitih konformacija ovisno o lizinskom ostatku korištenom u produživanju lanca. Svaka od navedenih vrsta ubikvitinilacije određuje različite fiziološke uloge [116].

*Monoubikvitinilacija*, odnosno vezanje jedne molekule Ub na supstrat, može se smatrati početnim korakom za sastavljanje poliubikvitinskih lanaca, a E2 enzim koji katalizira monoubikvitinilaciju razlikuje se od enzima koji katalizira dodavanje ostalih molekula ubikvitina u lancu. Monoubikvitinilacija može, kao i K63 poliubikvitinilacija, sudjelovati u regulaciji aktivnosti proteina PCNA (engl. *proliferating-cell nuclear antigen*) u procesu popravljavanja DNA [117–119]. *Multi-monoubikvitinilacija* površinskih staničnih receptora potiče njihovu internalizaciju te zatim ili degradaciju u lizosomima, čiji je glavni posrednik endosomalni sortirajući kompleksi potrebni za prometovanje (ESCRT, engl. *endosomal sorting complex required for transport*) kompleks (odjeljak 1.3.2.2.1.) ili recikliranje receptora natrag na staničnu površinu [120]. U konačnici, *poliubikvitinilacija* ciljnog proteina može značiti signal za njegovu degradaciju ili aktivaciju. Konačni ishod najčešće ovisi o mjestu lizina u molekuli ubikvitina na koji se vezuje sljedeći ubikvitin u poliubikvitinskom lancu. Tako je vrlo rano otkriveno da je proteasomalna degradacija proteina potaknuta polimernim lancima ubikvitina vezanima preko Lys48 (K48) te se stoga ova posttranslacijska modifikacija naziva K48 ubikvitinilacija. Pri tome su u poliubikvitinskom lancu potrebna najmanje 4 ubikvitina kako bi se ciljni protein usmjerio u proteasome i potom razgradio. Ubikvitinilirani proteini u proteasomima nailaze na ubikvitinske receptore i ubikvitin vezujuće domene (UBD, engl. *ubiquitin binding domain*) na deubikvitinilazama koje oslobađaju molekule ubikvitina i spašavaju ih od degradacije [113, 121,

122]. Za razliku od K48 ubikvitinilacije, druga najčešća vrsta poliubikvitinilacije u stanici, K63 ubikvitinilacija, sudjeluje u regulaciji procesa endosomalnog prometovanja (odjeljak 1.3.2.2.2.), u staničnom odgovoru na oštećenja DNA te u procesima staničnog signaliziranja. Preostale vrste poliubikvitinilacija manje su istražene. Ipak, poznata je povezanost K6 poliubikvitinilacije s odgovorom na oštećenje DNA, ali i u procesu autofagije mitohondrija (mitofagije) [123, 124]. Modifikacija proteina K11 poliubikvitinskim lancima je također važna za odgovor na oštećenje DNA, regulaciju staničnog ciklusa ali i proteasomalnu degradaciju [125–127]. Nasuprot tome K27 lanci sudjeluju u regulaciji NF- $\kappa$ B i IRF puteva urođenog imunološkog odgovora [128, 129]. dok je K29 poliubikvitinilacija uključena u razne signalne puteve uključujući i Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put čiji poremećaji dovode do razvoja karcinoma i neurodegenerativnih bolesti u ljudi [130].

Velika je raznolikost proteina koji posjeduju UBD te stoga stvaraju interakcije s raznim ubikvitiniliranim proteinima, ovisno o čemu obavljaju različite funkcije u stanicama [131]. Stoga ubikvitinilacija predstavlja bitan mehanizam kojim se kontrolira aktivnost proteina koji reguliraju endosomalno prometovanje. Time djeluju ne samo na dinamiku membranskih odjeljaka, već i na sudbinu internaliziranih molekula u smislu recikliranja ili degradacije.

### 1.2.2.1. Ubikvitinu slični proteini

Ubikvitinu slični proteini (Ubl, engl. *ubiquitin-like protein*) pripadaju obitelji malih proteina uključenih u posttranslacijske modifikacije. Danas je poznato osam takvih obitelji, od kojih su najviše zastupljene i najbolje istražene obitelji SUMO (engl. *small ubiquitin-related modifier*) i NEDD8 (engl. *neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 8*) [132]. NEDDilacija podrazumijeva reverzibilnu posttranslacijsku modifikaciju u kojoj enzimi E1, E2 i E3 kovalentno konjugiraju NEDD8 protein na lizinske ostatke supstrata u kaskadi vrlo sličnoj ubikvitinskoj. Rezultat konjugacije NEDD8 na supstrat je promjena konformacije proteina, promjena unutarstanične lokalizacije te enzimatska aktivacija ili inhibicija. Protein NEDD8 se također može ukloniti sa supstrata djelovanjem enzima denedilaza, koje su analogne enzimima DUB [98, 133–135]. NEDDilacija je, između ostalog, bitna i za aktivaciju Cullin-RING E3 ubikvitin ligaza koje reguliraju stanični ciklus, popravljavanje DNA, ali i aktivnost određenih signalnih molekula. Osim toga sudjeluje i u regulaciji urođene imunosti [136, 137]. SUMOilacija je najčešća Ubl-posttranslacijska modifikacija, koja se odvija vezivanjem proteina SUMO, veličinom i strukturom sličnog ubikvitinu. Podrazumijeva kovalentno dodavanje jedne ili više podjedinica SUMO na lizinske ostatke u kaskadnom slijedu djelovanjem enzima E1, E2 i E3. Time proces SUMOilacije nalikuje onome koji se odvija tijekom ubikvitinilacije. Proteini SUMO mogu stvarati i duge lance, a u tom slučaju kao elongator lanaca djeluje enzim E4. SUMOilacija se također može poništiti djelovanjem deSUMOilirajućih enzima. SUMOilacija je prisutna većinom u jezgri stanice gdje igra važnu ulogu u odgovoru na oštećenje DNA, održavanju integriteta genoma, regulaciji transkripcije te održavanju

stabilnosti proteina [138–141]. SUMOilaciju mogu prepoznati i pojedine Ub E3 ligaze, nakon čega šalju SUMOilirane proteine u proteasomalnu degradaciju [141]. Ipak, treba naglasiti da, za razliku od ubikvitinilacije, SUMOilacija i NEDDilacija ne obilježavaju proteine za direktnu razgradnju već ih modificiraju kako bi promijenili njihovo djelovanje, lokalizaciju ili stabilnost. Međutim, te modifikacije mogu utjecati na međusobnu dinamiku unutarstaničnih molekula stvarajući složenu regulatornu mrežu esencijalnu za održavanje stanične homeostaze i odgovora na stres.

### **1.3. Endosomalni sustav i regulacija endosomalnog prometovanja ubikvitinilacijom**

Unutrašnjost stanice je premrežena složenim skupom membranskih struktura koje, zajedno s plazmatskom membranom, čine membranski sustav stanice. Taj sustav je izrazito promjenjiv i dinamičan te ga karakterizira stalna komunikacija različitih unutarstaničnih odjeljaka, posredovana vezikularnim transportom. Nastajanje, fuzioniranje, razdvajanje i kretanje membranskih vezikula predstavljaju temeljne obrasce koji upravljaju osnovnim i specijaliziranim funkcijama neophodnim za život stanice. U te funkcije ubrajaju se ključni stanični procesi poput unosa tvari u stanicu, prijenosa hranjivih tvari za potrebe metaboličkih procesa, usmjeravanja novosintetiziranih molekula prema različitim unutarstaničnim organelima, prijenos signalnih tvari te komunikacije unutar stanice s njezinom okolinom [142, 143]. Neprekidan promet vezikula unutar staničnog sustava odvija se kroz specijalizirane puteve, poznate kao putevi membranskog prometovanja. Ovaj oblik prometovanja bitan je za očuvanje unutarnje stabilnosti stanice – homeostaze [143, 144], a s obzirom na smjer kretanja, dijeli se na dva osnovna i međusobno povezana puta: endocitozu (ulazak tvari u stanicu) i egzocitozu (izlazak tvari iz stanice) [142].

#### **1.3.1. Endocitoza površinskih molekula**

Endocitoza je visoko reguliran biološki proces internalizacije tvari ključnih za homeostazu i funkcionalnost stanice. Pored važnosti za unos hranjivih tvari, endocitoza sudjeluje i u nizu ključnih staničnih procesa, uključujući signalne puteve, neutralizaciju patogena, prijenos živčanih impulsa i remodeliranje plazmatske membrane [14, 145, 146].

Na morfološkoj i mehanističkoj razini, endocitoza se dijeli u tri osnovne podvrste: fagocitoza, pinocitoza i receptorom posredovana endocitoza. Fagocitoza je proces internalizacije velikih čestica ( $> 0,5 \mu\text{m}$ ), specifičan za fagocitne stanice kao što su makrofagi, monociti i neutrofilni [147, 148]. Pinocitoza podrazumijeva nespecifičan unos manjih čestica ili tekućina, koja se dijeli na mikropinocitozu (vezikule promjera  $\sim 0,1 \mu\text{m}$ ) i makropinocitozu ( $0,5 - 5 \mu\text{m}$ ) [149]. Receptorom posredovana endocitoza visoko je

specifičan oblik internalizacije koji uključuje vezivanje liganda za receptore na površini membrane. Ovaj oblik obuhvaća više mehanistički različitih puteva: klatrin-ovisnu (CME, engl. *clatrin mediated endocytosis*), kaveolin-ovisnu, flotilin-ovisnu, Arf6-, RhoA-, CLIC-GEEC (engl. *clathrin-independent endocytosis-GPI-anchored proteins enriched compartments*) i CDC42-ovisnu endocitozu [149, 150]. Neovisno o tipu, svi oblici endocitoze prolaze kroz osnovne faze: invaginaciju membrane, formiranje vezikularnih struktura te njihov transport staničnim endomembranskim putevima (endosomi, lizosomi, trans-Golgi mreža, endoplazmatski retikulum i dr.), što se odvija uz sudjelovanje niza regulatornih proteina i kompleksa (npr. GTP-aza, adaptornih proteina, te tzv. *tethering* i *docking* kompleksa) [151, 152].

### **1.3.2. Endosomalni prijenos internaliziranih molekula**

Bez obzira na mehanizam unosa, endocitirane molekule usmjeravaju se u stanične odjeljke iz kojih se mogu reciklirati na membranu ili degradirati, pri čemu u kiselim odjeljcima poput LE može doći i do njihove strukturne modifikacije. Iako su identificirani brojni proteini uključeni u regulaciju unutarstaničnog transporta, mehanizmi prometovanja između odjeljaka još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Dvije glavne hipoteze uključuju: (1) vezikularni transport, koji podrazumijeva prijenos putem vezikula ili tubula, te (2) maturacijsku teoriju, prema kojoj odjeljci sazrijevaju promjenom svojstava poput pH-a i funkcionalnih proteina na njihovoj površini, ali i u unutrašnjosti. Dostupni podaci upućuju na to da se ti mehanizmi najvjerojatnije međusobno preklapaju [153–155].

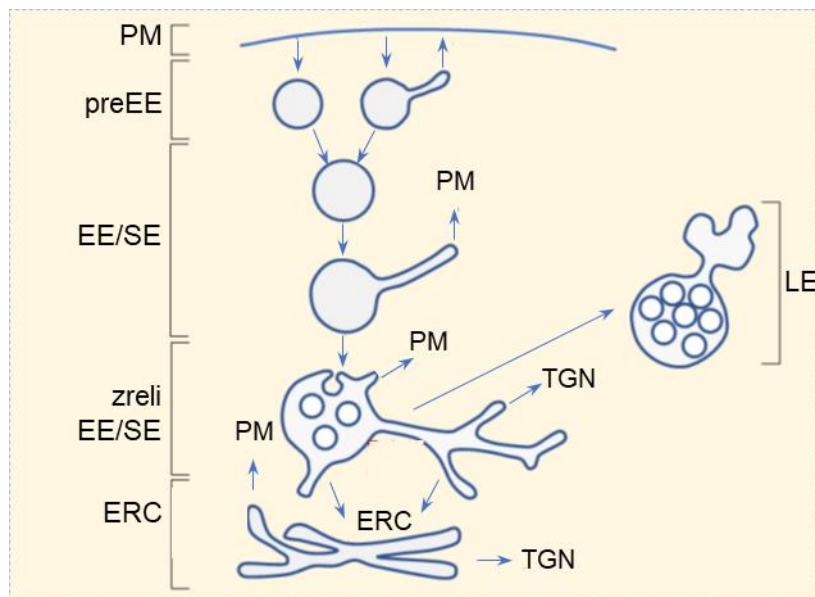
#### **1.3.2.1. Endosomalni odjeljci**

Endomembranski sustav eukariotskih stanica obuhvaća različite unutarstanične membranske strukture koje sudjeluju u biosintezi, sortiranju, transportu i razgradnji staničnih molekula. Svaki od ovih odjeljaka specifičnog je sastava koji određuje njegovu funkcionalnu specifičnost. U ključne organele ovog sustava ubrajamo: endoplazmatsku mrežicu/retikulum, Golgijev aparat, TGN, endosome i lizosome. Ovi su odjeljci međusobno povezani dinamičnim, dvosmjernim prometom membrana, koji se primarno odvija putem vezikularnog transporta. U unutarstaničnom sortiranju središnju ulogu imaju endosomi [156, 157].

##### **1.3.2.1.1. Rani endosomi**

Neposredno nakon endocitoze (nakon 1 - 5 minuta), materijal sa stanične površine dopijeva u pre-rane endosome (pre-EE, engl. *pre-early endosome*) te potom u rane endosome (EE, engl. *early endosomes*) (slika 5). Rani endosomi prolaze nekoliko ciklusa homotipske fuzije, koji su potom praćeni nizom procesa cijepanja, spajanja i razdvajanja. Pri tome se, tijekom sazrijevanja EE-a, materijal usmjeren za recikliranje sortira od materijala namijenjenog razgradnji [158, 159]. Unutar stanice, EE su smješteni periferno, s time da se najnezreliji oblici nalaze u subplazmalemalnom području, dok se one zrelije uočavaju u perinuklearnom dijelu. U literaturi se često može naći i naziv sortirajući endosomi (SE, engl. *sorting*

*endosome*), koji označava upravo zreli oblik ovog odjeljka, najviše zaduženog za sortiranje internaliziranog materijala (slika 5) [159, 160]. Prilikom sazrijevanja, EE pričvršćeni za stanične mikrotubule kreću se prema središtu stanice te povećavaju svoj volumen, ali i stupanj tubulacije (slika 5). U tubularne dijelove EE-a sortiraju se molekule koje će se dalje usmjeravati u različite dijelove stanice ili reciklirati prema staničnoj membrani [58, 154, 161]. Ostatak materijala koji nije namijenjen reciklirajućem putu nakuplja se u intraluminalnim vezikulama (ILV, engl. *intraluminal vesicles*) unutar EE, koji time maturiraju u multivezikularna tjelešca (MVB, engl. *multivesicular bodies*) i kasne endosome (LE), kao što će biti opisano kasnije. Glavni protein na EE je mala GTP-aza Rab5 koja regrutira nekoliko važnih efektorskih proteina koji pomažu u održavanju integriteta i funkcije organela. Uz to Rab5 je glavni regulator pretvorbe EE u LE [154, 162].



**Slika 5. Shematski prikaz staničnog endosomalnog sustava.** Putem endocitoze s plazma membrane (engl. *plasma membrane*, PM) većina materijala se prenosi kroz pre-rane endosome (engl. *pre-early endosomes*, *pre-EE*) u rane endosome (EE). Nakon niza koraka sazrijevanja, EE se pretvaraju u heterogenu mješavinu endosoma te se sortiraju oko staničnog centra kao sortirajući endosomi (engl. *sorting endosomes*, SE). SE su veliki odjeljci iz kojih se mnoge internalizirane molekule upućuju na degradaciju u kasnim endosomima (LE) ili na recikliranje natrag na PM, bilo direktno ili indirektno preko endosomalnog reciklirajućeg odjeljka (ERC). Preuzeto iz projektnog prijedloga HRZZ-IP-2020-02-2916 „Reorganizacija sučelja između ranih endosoma i endosomalnog reciklirajućeg odjeljka u ranoj fazi infekcije citomegalovirusom“ [163].

### **1.3.2.1.2. Reciklirajući endosomi i reciklirajući endosomalni odjeljak**

Mehanizam nastanka reciklirajućih endosoma (RE, engl. *recycling endosome*), iako intenzivno istraživano, još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Jedni od najvažnijih biljega reciklirajućih membrana i reciklirajućih endosoma su proteini Rab4 i Rab11, ali značajnu ulogu imaju i Rab8, Rab10, Rab14 te Rab15. Endosomalni reciklirajući odjeljak (ERC, engl. *endosomal recycling compartment*) predstavlja najpoznatiju staničnu organelu iz koje se događa recikliranje (slika 5). Sastoji se od složenog sustava tubularnih membrana u perinuklearnom području stanice, a najvjerojatnije nastaje iz membrana koje se odvajaju od EE i usmjeravaju prema reciklirajućim membranama u blizini MTOC-a [15, 164, 165].

Reciklirajući endosomi omogućuju povrat značajnog dijela internaliziranog materijala na plazmatsku membranu. Ova ruta je ključna za održavanje funkcionalnog sastava membranskih organela te za recikliranje molekula potrebnih za specifične stanične procese. Kako je ranije i navedeno, RE su uglavnom lokalizirani u jukstanuklearnom području, gdje tvore ERC iz kojeg se kontinuirano odvajaju reciklirajući tubuli [58, 165].

Recikliranje internaliziranog materijala prema plazmatskoj membrani može se odvijati na dva načina: brzim i sporim putem (slika 6), pri čemu svaki koristi različite skupine regulatornih proteina. Brza ruta uključuje recikliranje iz EE, a najbolje je istraženo ono iz tubularnih sortirajućih endosoma (TRE, engl. *tubular sorting endosomes*), tj. tubula koji se stvaraju na njihovim membranama (odjeljak 1.3.2.2.2. ). Suprotno tome, spora ruta uključuje dulju obradu materijala s povratom iz ERC-a smještenog u jukstanuklearnom području [14, 166, 167]. Transferinski receptor (TfR, engl. *transferrin receptor*) jedan je od najdetaljnije proučavanih primjera recikliranih molekula. Nakon internalizacije putem CME, TfR dopijeva u EE, odakle može biti vraćen na membranu brzim ( $t_{1/2} \sim 5$  min) ili sporim putem putem ERC-a ( $t_{1/2} \sim 15 - 30$  min) [76].

### **1.3.2.1.3. Kasni endosomi**

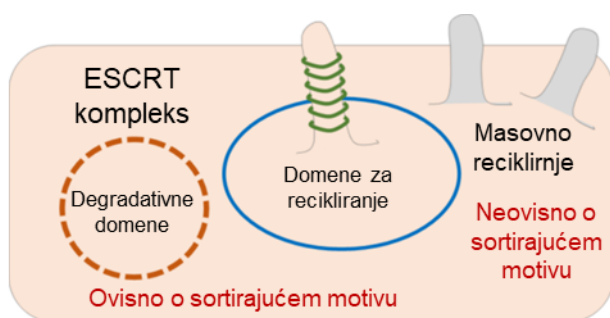
Kao što je ranije napomenuto, tijekom sazrijevanja EE dolazi do invaginacije njegovih membrana u lumen organele čime se stvaraju ILV (intraluminalne vezikule). Nakupljanjem ILV i daljnjim sazrijevanjem EE-a nastaju MVB (multivezikularna tijela). Oni potom maturiraju u kasne endosome (LE, engl. *late endosome*) ili dolazi do njihove fuzije s membranama LE u procesu koji još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Ključan događaj u tranziciji iz EE u LL je zamjena Rab5 s Rab7 (Rink et al, Cell, 2005). Kasni endosomi su smješteni u perinuklearnom području stanice i predstavljaju visoko dinamičnu mrežu vezikularnih membranskih struktura koje posreduju transportu sadržaja prema lizosomima radi razgradnje, ili prema TGN-u radi ponovne integracije u sekretorni put. U nekim slučajevima, dio materijala iz LE se može modificirati ili reciklirati natrag na plazmatsku membranu [14, 15].

### 1.3.2.2. Regulacija recikliranja i degradacije molekula u endosomima

Usmjeravanje proteina iz ranih endosoma se može vršiti prema: (1) plazmatskoj membrani brzim reciklirajućim putem, (2) plazmatskoj membrani sporim reciklirajućim putem preko ERC-a, (3) kasnim endosomima i lizosomima nakon obilježavanja za degradaciju i (4) retrogradnim putem u TGN-a (slika 5). Iako se još istražuju, u posljednjih 15 godina otkriveni su mnogi proteini i proteinski kompleksi koji sudjeluju u regulaciji endosomalnog sortiranja. Stoga je njihovo poznavanje od velikog značaja za razumijevanje ovih procesa [153, 154].

#### 1.3.2.2.1. Sortiranje molekula u domene za recikliranje na ranim endosomima

Rani endosomi predstavljaju glavno mjesto sortiranja internaliziranih membranskih proteina. Tijekom boravka u EE, molekule se mogu usmjeriti ili prema domenama namijenjenima degradaciji, iz kojih odlaze u ILV i LE, ili pak u reciklirajuće domene, iz kojih se dalje šalju prema PM, ERC-u ili TGN-u [142]. Dio reciklirajućih molekula, poput TfR, prolazi kroz tzv. "bulk" recikliranje, koje se temelji na principu geometrijske separacije. S druge strane, molekule koje nose specifične sortirajuće motive usmjeravaju se u reciklirajuće domene posredstvom signalnih receptora (slika 6) [153, 155]. Ovaj selektivni put zahtijeva preciznu koordinaciju između brojnih staničnih proteina sposobnih za prepoznavanje sortirajućih signala i koncentriranje odgovarajućih receptora u definiranim domenama. U tom kontekstu ključnu ulogu imaju sortirajući neksini (SNX, engl. *sorting nexin*), uključujući SNX3, SNX5, SNX17 i SNX27 [168], zatim kompleksi retromer i retriiver u suradnji s CCC kompleksom, te WASH (engl. *Wiskott–Aldrich Syndrome Protein and SCAR Homolog*) kompleks, neophodan za regulaciju elongacije aktinske citoskeletne mreže potrebne za nastanak reciklirajućih tubula i njihovo odcjepljivanje [169–171].

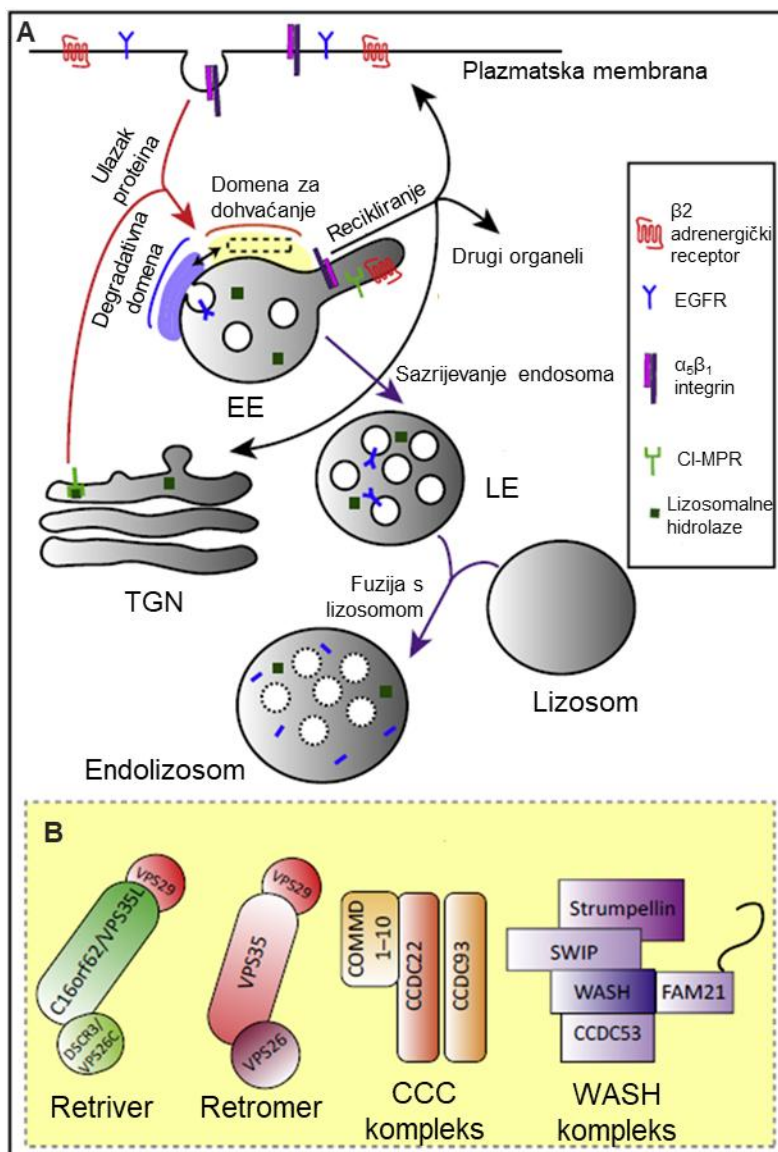


**Slika 6. Molekule se na membrani ranog endosoma mogu usmjeravati u domene za degradaciju ili u domene za recikliranje.** Na površini EE molekule se usmjeravaju u domene za degradaciju i dalje u ILV i LE. S druge strane, jedan dio proteina se usmjerava u domene za recikliranje nakon prepoznavanja odgovarajućih sortirajućih motiva u njihovim citoplazmatskim repovima, ili podliježe masovnom recikliranju prema principu geometrijskog sortiranja. Prilagođeno i prevedeno prema [153].



U *sortirajuće neksine* ubrajamo veliku grupu proteina koji imaju važnu ulogu u prepoznavanju specifičnih sortirajućih motiva na staničnim receptorima te u započinjanju stvaranja reciklirajućih tubula. Na temelju strukturnih domena, SNX proteini se klasificiraju u tri osnovne podskupine: (1) SNX-PX proteini, koji sadrže isključivo PX domenu, primjerice SNX3; (2) SNX-BAR proteini, koji pored PX posjeduju i BAR (engl. *Bin/Amphiphysin/Rvs*) domenu, kao što su SNX1/2 i SNX5/6; te (3) SNX-FERM proteini, koji sadrže kombinaciju PX i FERM domena. Unutar posljednje skupine ističe se SNX27, koji dodatno sadrži i PDZ domenu [168, 172, 173]. PX domena esencijalna je za vezanje na fosfatidilinozitol-3-fosfat (PI(3)P, engl. *phosphatidylinositol 3-phosphate*), lipid specifičan za membranu EE, dok PDZ i FERM domene imaju presudnu ulogu u specifičnom prepoznavanju receptora i njihovih adaptorskih proteina. Time sortirajući neksini sudjeluju u preciznoj organizaciji reciklirajućih domena i formiranju transportnih tubula unutar endosomalnog sustava [168].

U procesu prepoznavanja proteina za recikliranje, važnu ulogu ima i retromer. Radi se o velikom multiproteinskom kompleksu koji ima ključnu ulogu u sortiranju transmembranskih receptora u reciklirajuće domene EE, kao i u formiranju odgovarajućih transportnih tubula (slika 7). Izvorno je identificiran kao kompleks koji sudjeluje u retrogradnom transportu receptora, poput manoza-6-fosfatnog (CI-MPR) receptora, iz perifernih endosoma natrag u TGN [153]. Međutim, neka istraživanja ukazuju i na njegovu važnu ulogu u usmjeravanju određenih molekula prema plazmatskoj membrani [174]. Retromer se sastoji od dvaju funkcionalno odvojenih podkompleksa: (1) sortirajući kompleks (CSC, engl. *cargo selective complex*), kojeg čine proteini Vps35, Vps26 i Vps29, te (2) SNX-BAR dimer, kojeg čine sortirajući neksini SNX1 ili SNX2 u kombinaciji sa SNX5 ili SNX6 [175].



**Slika 7. Sortiranje i recikliranje unutarstaničnih proteina u endosomima.** (A) Molekule tereta iz biosintetskih puteva (npr. CI-MPR) ili s plazma membrane (npr. β<sub>2</sub>-adrenergički receptor, α<sub>5</sub>β<sub>1</sub> integrin, EGFR) ulaze u endosome gdje se sortiraju za lizosomalnu razgradnju ili se vraćaju na plazmatsku membranu, trans-Golgijevu mrežu ili druge organele. Retriever, retromer, CCC kompleks i WASH kompleks se lokaliziraju u specifične poddomene za recikliranje, prostorno različite od degradativne domene u kojima se nalaze ESCRT kompleksi. ESCRT kompleksi dalje prepoznaju molekule koje se sortiraju za razgradnju (npr. aktivirani EGFR) i pakiraju ih u intraluminalne vezikule. U konačnici, razgradnja se odvija nakon fuzije endosoma i lizosoma. (B) Shematski prikaz građe glavnih proteinskih kompleksa uključenih u endosomalno recikliranje. Preuzeto i prevedeno iz [176]

Uz retromer, nedavno je identificiran i drugi multiproteinski kompleks koji neovisnim putem sudjeluje u koncentriranju transmembranskih molekula unutar reciklirajućih domena EE. Riječ je o heterotrimernom

kompleksu koji se naziva retriever, a sastoji se od proteina C16orf162 (poznatog i kao Vps35L), Vps29 i DSCR3 (Vps26C) [170, 176]. Retriever djeluje u uskoj interakciji s CCC kompleksom, kojeg čine proteini CCDC22, CCDC93 i jedan od članova obitelji COMMD proteina (COMMD1–10) (slika 7B) [169, 199].

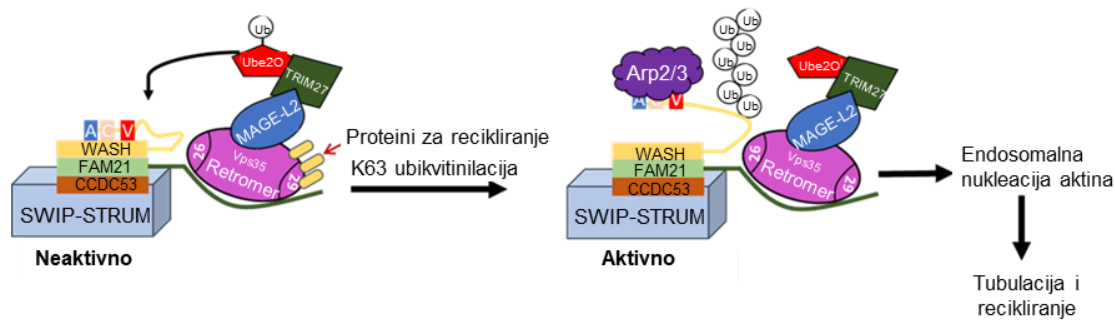
Kompleksi retromera i retrievera ostvaruju specifične interakcije s adaptorima za teretne proteine, retriever sa SNX17, a retromer sa SNX27. Time omogućuju selektivno prepoznavanje i uključivanje teretnih proteina u neovisne puteve endosomalnog recikliranja. Još jedna važna zajednička karakteristika oba kompleksa jest njihova funkcionalna ovisnost o WASH kompleksu. Retromer ostvaruje vezu s WASH kompleksom putem Vps35 podjedinice, dok retriever ovu interakciju ostvaruje posredstvom CCC kompleksa. Iako je utvrđeno da se WASH kompleks može vezati za endosomalne membrane neovisno o prisutnosti retromera i retrievera, mehanizam koji omogućuje takvu vezu još uvijek nije razjašnjen. Postojanje funkcionalno različitih, ali prostorno preklapajućih puteva recikliranja u kojima sudjeluju retromer - WASH i retriever - WASH kompleksi dodatno naglašava ključnu ulogu WASH kompleksa u organizaciji i djelovanju endosomalne mreže [168, 170, 172, 175].

#### **1.3.2.2.2. WASH kompleks i uloga ubikvitinilacije u stvaranju reciklirajućih tubula**

WASHC1 protein pripada WASP (engl. *Wiskott-Aldrich syndrome protein*) obitelji, koja uključuje WSP/N-WASP, WAVE, WHAMM, JMY i WASH proteine. Kao i ostali članovi ove obitelji, WASHC1 posjeduje karboksi-terminalnu VCA domenu odgovornu za vezanje aktina i Arp2/3 kompleksa, čime potiče nukleaciju aktinskih filamenata. Sam protein djeluje unutar makromolekularnog kompleksa poznatog kao SHRC (engl. *WASH regulatory complex*), odnosno WASH kompleks, koji se sastoji od pet komponenti: CCDC53, FAM21, SWIP, Strumpellin i WASHC1 (slika 7B). Regrutacija WASH kompleksa na endosomalne membrane posredovana je interakcijom FAM21 domene s Vps35 podjedinicom retromera [168, 169, 171, 176]. Interakcija retromera s proteinima predodređenima za recikliranje potiče njegovu regrutaciju na membrane endosoma. Retromer potom sudjeluje u mobilizaciji i aktivaciji WASH kompleksa, čime se omogućuje nukleacija aktina i elongacija tubula. Proces nukleacije aktinskih filamenata na endosomalnim membranama ključan je za formiranje i održavanje reciklirajućih domena unutar endosoma, u kojima se koncentriraju proteini predodređeni za recikliranje [168, 169, 174]. Tubuli nastali uslijed nukleacije aktina posredovane WASH kompleksom, mogu zahtijevati i prisutnost EHD1 proteina (engl. *Eps-15 homology domain 1*) za stabilnost, a smatra se da EHD1 također ostvaruje interakcije s retromerom [174]. Nadalje, CCC kompleks, koji djeluje u suradnji s retriever kompleksom, također ostvaruje interakcije s FAM21 domenom WASH kompleksa, čime djeluje kao funkcionalni most između WASH kompleksa i retrievera.

Aktivacija WASHC1 proteina odvija se putem K63-vezane poliubikvitinacije VCA domene na lizinskom ostatku K220. Ovu modifikaciju katalizira E3 ubikvitin-ligaza TRIM27, čija se aktivnost ostvaruje uz

pomoć proteina MAGE-L2 (engl. *melanoma antigen gene L2*). Ubikvitinilacija inducira prostornu reorganizaciju WASHC1 unutar WASH kompleksa, pri čemu dolazi do oslobađanja VCA domene iz autoinhibiranog stanja. Oslobođena VCA domena potom može ostvariti interakciju s Arp2/3 kompleksom, čime se omogućuje inicijacija nukleacije aktinskih filamenata (slika 8). Ova aktivacija je reverzibilna; specifični DUB enzimi uklanjaju poliubikvitinske lance, vraćajući WASHC1 protein u autoinhibirano stanje i tako prekidajući njegovu aktivnu funkciju [169].



**Slika 8. Mehanizam aktivacije WASHC1 proteina ubikvitinilacijom.** TRIM27 Ub ligaza uz pomoć MAGE-L2 proteina ubikvitinilira WASHC1 na K220 što dovodi do oslobađanja VCA domene i vezanja Arp2/3 proteina koji potiče nukleaciju aktina i tubulaciju membrane EE. WASH kompleks se može inaktivirati djelovanjem Ube2O DUB enzima koji ga vraća u početno neubikvitinilirano stanje. Preuzeto i prevedeno iz [169].

Prema tome, ubikvitinilacija i deubikvitinilacija WASH kompleksa predstavljaju bitan regulatorni mehanizam endosomalnoga recikliranja.

### 1.3.2.2.3. Regulacija aktivacije ostalih endosomalnih proteina ubikvitinilacijom

Sortiranje proteina na membranama endosoma pomoću retromer kompleksa također podliježe regulaciji putem ubikvitinilacije. Funkcionalna aktivnost retromera može biti modulirana direktnom ubikvitinilacijom njegove Vps35 podjedinice, kao i ubikvitinilacijom pomoćnih proteina, uključujući Rab7a [177, 178]. Tako je Vps35 podložan ne-degradativnoj ubikvitinilaciji koju katalizira E3 ubikvitin ligaza Parkin [195]. Ova posttranslacijska modifikacija zahvaća najmanje tri lizinska ostatka u C-terminalnom dijelu Vps35 proteina, regiji esencijalnoj za interakciju s Vps29, kao i za vezanje FAM21 domene WASH kompleksa. Stoga ubikvitinilacija Vps35 doprinosi stabilizaciji interakcija između retromera i njegovih efektora [179]. Rab7a, također sudjeluje u funkcionalnom usmjeravanju retromera na endosomalne membrane, a može biti supstrat Parkin E3 ligaze. Nakon ubikvitinilacije, Rab7 stječe sposobnost povećane interakcije s retromer kompleksom, čime se pospješuje elongacija tubula. Identificirano je nekoliko lizinskih ostataka na kojima Rab7 može biti ubikvitinilirano. Za regulaciju endosomalnog prometa ključna je K38 ubikvitinilacija, koja omogućuje retromer-ovisnu tubulaciju membrana LE [168, 177–179].

Rab5, koji se nalazi i na plazmatskoj membrani i na membranama EE, ima centralnu ulogu u inicijaciji endocitoze i regulaciji membranskog transporta. Poznato je da se Rab5 može ubikvitinilirati na tri lizinska ostatka: K116, K140 i K165, pri čemu monoubikvitinilacije na K140 i K165 negativno utječu na njegovu funkciju. Konkretno, ubikvitinilacija K140 onemogućuje interakciju s nishodnim efektorima kao što su Rabaptin5 i rani endosomalni antigen 1 (EEA1, engl. *early endosomal antigen 1*), dok modifikacija na K165 ometa vezanje s GEF proteinom Rabex5, čime se inhibira aktivacija Rab5 i blokira progresija endosomalnog puta [180, 181]. Naime, Rabex5 i Rabaptin5 djeluju kao ključni regulatori homotipske i heterotipske fuzije ranih endosoma. Pri tome, Rabex5 posjeduje UBD kojom prepoznaje ubikvitinilirane citosolne domene transmembranskih proteina plazmatske membrane, nakon čega se mobilizira na membrane ranih endosoma. Na EE membranama Rabex5 djeluje kao GEF za Rab5, čime ga aktivira i time potiče fuziju endosomalnih mjehurića. Nakon aktivacije Rab5 i vezivanja molekule Rabex5 za membranu EE, dolazi do monoubikvitinilacije samog Rabex-5 proteina, što potiče njegovo otpuštanje s membrane u citosol. Kako bi Rabex5 ponovno mogao prepoznati ubikvitinirane proteine, mora se deubikvitinilirati, čime se obnavlja funkcionalnost njegove UBD domene [182–184].

Osim prethodno spomenutih malih GTP-aza, sve je više dokaza koji ukazuju na to da je aktivnost brojnih Rab proteina uključenih u regulaciju endosomalnog prometovanja podložna regulaciji putem ubikvitinilacije. Jedan od takvih primjera je Rab11a, koji ima ključnu ulogu u recikliranju membranskih receptora s površine stanice. Njegova aktivacija ovisi o ubikvitinilaciji na lizinskom ostatku K145, pri čemu dolazi do disocijacije Rab11a od regulatornih inhibitora. Time se protein oslobađa i postaje dostupan za vezanje gvanozin-trifosfata (GTP). Ova konformacijska promjena omogućuje njegovu aktivaciju u svrhu regulacije recikliranja. Pored Rab11a, i drugi članovi Rab obitelji, kao što su Rab6a i Rab8a, također podliježu ubikvitinilacijskoj regulaciji. Oba proteina poznata su kao važni modulatori u endosomalnom prometovanju, pri čemu specifične ubikvitinilacijske modifikacije utječu na njihovu lokalizaciju, vezanje s efektorskim proteinima te aktivnost u kontekstu unutarstanične dinamike vezikularnog transporta [181, 185].

#### **1.3.2.2.4. Sortiranje molekula u domene za degradaciju na ranim i kasnim endosomima**

Endocitirani receptori koji se ne uspiju spasiti od degradacije, a posttranslacijski su modificirani ubikvitinom, usmjeravaju se u domene za degradaciju pomoću endosomalnih sortirajućih kompleksa potrebnih za transport (ESCRT, engl. *endosomal sorting complexes required for transport*): ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II i ESCRT-III. ESCRT kompleksi djeluju na membranama EE i MVB, gdje se membranski proteini namijenjeni degradaciji internaliziraju u unutrašnjost endosoma i tvore intraluminalne vezikule (ILV). Proteini ESCRT kompleksa imaju ulogu u selekciji proteina za degradaciju, deformaciju membrane endosoma, sortiranje proteina u ILV te stvaranje suženja na mjestu pupanja kako bi se ILV odvojila u lumen endosoma [120, 172, 186, 187]. Svi kompleksi ESCRT sustava su heteromeri građeni od

dvije do četiri proteinske podjedinice. Proteini ranih ESCRT kompleksa (ESCRT-0, ESCRT-I i ESCRT-II) nose UBD za prepoznavanje ubikvitiniliranog tereta. ESCRT-0 građen je od jedne Hrs (engl. *hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*) i jedne STAM1/2 (engl. *signal transducing adaptor molecule 1/2*) podjedinice. Hrs podjedinica sadrži FYVE (engl. *Fab-1, YGL023, Vps27 and EEA1*) domenu koja prepoznaje i vezuje fosfatidilinozitol-3-fosfat (PtdIns(3)P, (engl. *phosphatidylinositol 3-phosphate*), molekulu značajno izraženu na membranama EE-a. Pored toga, Hrs posjeduje i UBD, a time i sposobnost vezivanja ubikvitina, odnosno ubikvitinilarnih proteina namijenjenih degradaciji [120, 188]. Najvažnija uloga ESCRT-0 kompleksa je stoga prepoznavanje, vezanje i nakupljanje ubikvitiniliranih proteina u domenama za degradaciju na membranama EE-a. Nadalje, ESCRT-0 na endosomalnu membranu regrutira ESCRT-I, koji potom, zajedno s ESCRT-II pokreće invaginaciju membrane endosoma i započinje stvaranje ILV. ESCRT-I i -II također posjeduju i domene za interakciju s ubikvitinom čija uloga još nije dovoljno razjašnjena. Na mjestu gdje je započela deformacija endosomalne membrane regrutiraju se i sastavljaju podjedinice ESCRT-III kompleksa koje potiču daljnju progresiju nastanka ILV te njezino odcjepljivanje u lumen endosoma još nerazjašnjenim mehanizmom. ESCRT-III kompleks također je zaslužan za regrutaciju DUB enzima koji sa staničnih membranskih proteina uklanjaju Ub molekule kako bi se održala homeostaza ubikvitina u stanici. Nakon što je ESCRT-III odigrao svoju ulogu, otpušta se s membrane endosoma. U tom procesu se koristi energija dobivena djelovanjem Vps4 ATP-aze, koja veže ESCRT-III na C terminalnom kraju [120, 188, 189].

Proteini ESCRT kompleksa mogu također ulaziti u interakcije s Ub-ligazama i DUB enzimima. Stoga su i sami podložni ubikvitinilaciji koja time može imati i regulacijsku ulogu u djelovanju ESCRT-a. Tako je ESCRT-0 kompleks reguliran ubikvitinilacijom od strane Nedd4 HECT E3 ligaze. Pri tome se Hrs domena monoubikvitinilira te biva prepoznata od druge Hrs molekule u kompleksu. Stoga takav kompleks više ne može vezati ubikvitinilirane proteine i postaje katalitički neaktivan. Nadalje, protein ESCRT-0 kompleksa STAM, također se ubikvitinilira od strane Nedd4. STAM je inače bitan za interakciju s endosomalnim deubikvitinilazama, poput AMSH i USP8, koje moduliraju ubikvitinilacijski status proteina za sortiranje. AMSH je zaslužan za regulaciju aktivnosti ESCRT-0 kompleksa dok USP8, štiteći ga od proteasomalne degradacije, održava strukturni integritet kompleksa [190–194].

Za funkciju ESCRT-I kompleksa vrlo je bitna količina i lokalizacija proteina TSG101, čija se razina regulira ubikvitinilacijom na tri različita načina: (1) MDM2 (engl. *mouse double minute 2 homolog*) E3 ligaza obilježava ovu domenu za proteasomalnu degradaciju, (2) TAL (engl. *TSG101-associated ligase*) monoubikvitinilira TSG101 na raznim lizinskim ostacima što dovodi do premiještana membranski vezanog aktivnog oblika proteina u citosol gdje postaje neaktivan, (3) MGRN1 (engl. *Mahogunin ring finger-1*) također ubikvitinilira TSG101 na višestrukim mjestima što dovodi do promjene u prometovanju i funkcionalnosti ovoga proteina [195–198].

U konačnici, ILV nastale djelovanjem ESCRT sustava dovode do nastanka MVB, koji u služe kao podloga nastanka kasnih endosoma i lizosoma, odjeljaka u kojima se, između ostalog, odvija razgradnja proteina djelovanjem enzima hidrolaza i proteaza [199].

### **1.3.3. Ubikvitinilaze i deubikvitinilaze u endosomalnom sustavu**

Ubikvitin ligaze i deubikvitinilaze, usprkos suprotnim ulogama u smislu regulacije vezivanja ubikvitina za proteine koji sudjeluju u endosomalnom prometovanju, zajedno koordiniraju ravnomjernu degradaciju i recikliranje membranskih proteina. Pri tome, E3 ubikvitin ligaze obilježavaju transmembranske proteine za lizosomalnu degradaciju u multivezikularnim tjelešcima, potiču tubulaciju endosoma i stvaranje transportnih vezikula, a monoubikvitinilacijom potiču i internalizaciju nekih proteina stanične membrane. S druge strane, DUB proteini uklanjanjem ubikvitinskog signala mogu zaustaviti degradaciju prethodno obilježenih proteina ali i mijenjati njihovu aktivnost.

#### **1.3.3.1. MARCH ubikvitin ligaze**

U regulaciji endosomalnog prometovanja najviše do izražaja dolaze, zbog svoje građe a samim time i lokalizacije, membranske MARCH (engl. *membrane associated RING-CH*) E3 ubikvitin ligaze. Otkrivene su kao virusni proteini najprije KSHV-a, a kasnije su homologni proteini pronađeni i u porodicama *Poxviridae* i *Orthomyxoviridae*. Tada je pokazano da, smanjenjem izražaja MHC-I molekula na površini stanice, omogućuju izbjegavanje imunološkog odgovora domaćina. Obzirom da su kasnije otkrivene i stanične MARCH ubikvitinilaze, pretpostavlja se da su virusni homolozi nastali od gena preuzetih od domaćina tijekom koevolucije virusa i domaćina.

Ljudske MARCH ligaze čine obitelj od 11 članova, od kojih je 9 transmembraniskih proteina. Sve ubikvitiniliraju proteine na citoplazmatskoj strani membrane na kojoj se nalaze. Ovisno o lizinskom ostatku ciljnog proteina, MARCH ligaze mogu usmjeravati proteine u degradaciju, putem sustava za degradaciju povezanoga s endoplazmatskim retikulumom (ERAD, engl. *ER-associated degradation*) ili lizosomalnu degradaciju, putem MVB, kako je ranije opisano [200–203]. Djelujući kao katalizatori ubikvitinilacije raznih imunoloških receptora, MARCH ligaze su bitni regulatori imunološkog odgovora stanice. Pokazno je da nekoliko MARCH proteina sudjeluje u regulaciji izražaja MHC-I molekula na staničnoj površini. MARCH4 i MARCH9 kataliziraju ubikvitinilaciju citosolnog dijela MHC-I, što dovodi do njihove internalizacije i potom degradacije, ili usmjeravanju u posebne endosomalne odjeljke u svrhu križnog predočavanja [204, 205]. Jednako tako, MARCH1 i MARCH8 kontroliraju izražaj MHC-II molekula na površini antigen predočnih stanica [206, 207]. MARCH3 i MARCH8 mogu modulirati imunološki odgovor stanice stimulirajući ubikvitinilaciju, a time i degradaciju interleukina-1 (IL-1) [208, 209]. MARCH 1 i 8 također sudjeluju u regulaciji izražaja CD86, regulatora imunološkog odgovora izraženog na antigen

predočnim stanica [210]. Nadalje, imunološki receptor ICAM-1, koji ima važnu ulogu u transepitelnoj migraciji aktiviranih limfocita u upalnim procesima, također se regulira ubikvitinilacijom od strane MARCH9 te se potom usmjerava u degradaciju [211]. Stoga, obzirom na njihovu ulogu u regulaciji prometovanja imunoloških receptora MARCH proteini imaju ulogu u antivirusnim i provirusnim procesima. Mogu inhibirati virusne infekcije ciljajući virusne proteine za razgradnju ili ometajući sastavljanje virusnih čestica, kao što je viđeno kod HIV-1, hepatitis-B virus (HBV, engl. *hepatitis-B virus*), Ebola virus (EBOV, engl. *Ebola virus*) i virus epidemijskog proljeva svinja (PEDV, engl. *Porcine epidemic diarrhea virus*). Suprotno tome, neki virusi iskorištavaju MARCH proteine za modificiranje vlastitih proteina u svrhu pojačavanja infektivnosti ili potiču degradaciju imunoloških molekula u svrhu izbjegavanja imunološkog odgovora [212].

### 1.3.3.2. Deubikvitinilaze i njihova uloga u endosomalnom sustavu

U svrhu održavanja stanične homeostaze i dinamike receptorske signalizacije ključnu ulogu imaju i deubikvitinilaze. One reguliraju prometovanje membranskih proteina uklanjanjem ubikvitina s ubikvitiniliranih molekula, a time, između ostalog, uravnotežuju odnos lizosomalne degradacije i recikliranja na PM. Poznato je da neki od DUB enzima usko surađuju s komponentama ESCRT sustava, poput AMSH E3 ubikvitin ligaze koja katalizira rastavljanje K63 poliubikvitinskoga lanca. Pri tome na proteinu za sobom ostavlja nekoliko ubikvitinskih ostataka koji osiguravaju napredovanje ubikvitiniliranoga proteina kroz ESCRT sustav [213–215]. Nekoliko deubikvitinilaza djeluje u endosomalnom sustavu potičući endocitozu i internalizaciju membranskih receptora, poput receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR, engl. *epidermal growth factor receptor*). EGFR se internalizira većinom klatrinskom endocitozom, a pri višim koncentracijama epidermalnog faktora rasta (EGF, engl. *epidermal growth factor*) i klatrin-neovisnom endocitozom. Nakon endocitoze, može se reciklirati natrag na PM ili degradirati u lizosomu. USP17 je DUB koja potiče klatrinsku endocitozu EGFR-a, dok, s druge strane USP9X blokira klatrinsku endocitozu EGFR-a deubikvitinilirajući adptorske proteine koji ju potiču. Deubikvitinilaza USP2a spašava EGFR od razgradnje tako što ga deubikvitinilira i omogućava njegovo recikliranje natrag na plazmatsku membranu (PM, engl. *plasma membrane*) [213, 215]. AMSH i USP8 također upravljaju prometovanjem EGFR. Pri tome, USP8 smanjuje količinu EGFR u stanici, dok AMSH djeluje suprotno, potičući njegovo recikliranje sa SE [216].

Točno mjesto i trenutak u kojem se neki membranski protein deubikvitinilira nakon ulaska u endosomalni sustav vrlo je bitan jer upravo on određuje sudbinu internaliziranoga proteina, a time i rezultat same signalizacije. Ako se protein deubikvitinilira tek na MVB, on se usmjerava u lizosomalnu razgradnju te dolazi do nishodne regulacije receptora s površine stanice. Ako se protein deubikvitinilira već na EE/SE, on će se reciklirati natrag na PM i biti dostupan za vezanje novog liganda i pokretanje signalnoga puta.



## 1.4. Značaj ubikvitinilacije u infekcijama

Samim time što regulira gotovo sve stanične procese koji su ključni u infekciji, ubikvitinilacija igra važnu ulogu u modulaciji interakcija domaćina i patogena. Pri tome su E3 ubikvitin ligaze i deubikvitinirajući enzimi domaćina od izuzetne važnosti u regulaciji urođenih i stečenih imunoloških odgovora te pomažu u orkestriranju promjena u dinamici organela, citoskeletnoj arhitekturi i staničnom metabolizmu tijekom infekcije. Tako E3 ligaza MARCH8 pokazuje cijeli spektar antivirusnih svojstava u kontekstu infekcije HIV-1 i infekcije virusom Ebole gdje blokira umetanje glikoproteina u novosintetizirane virione sprječavanjem glikozilacije i obrade proteina na Golgijevu aparatu [217]. S druge strane, ubikvitinilacija je često bitna i za ulazak virusa, kao u slučaju dengue virusa, koji zahtjeva ubikvitinilaciju TIM-1 receptora (engl. *T cell immunoglobulin and mucin family receptor 1*) kako bi ušao u stanicu i HSV-1, koji za ulazak u stanicu treba ubikvitinilaciju receptora Nectin-1 od strane Cbl E3 ligaze [218, 219]. Patogeni poput bakterije *Legionella pneumophila* iskorištavaju ubikvitinski sustav primjenom efektorskih proteina, npr. SidE, koji djeluje kao E3 ligaza, i Lem27 koji djeluje kao DUB. Time modificiraju Rab GTP-aze domaćina te narušavaju endosomalni promet stanice domaćina [220, 221]. Virusi poput HIV-a i Ebole putem motiva L domene (engl. *late assembly domain*), koji se nalazi u virusnim Gag proteinima, regrutiraju ESCRT komponente i E3 ligaze NEDD4 na mjesto izlaska viriona te time potiču njihovo otpuštanje [222, 223]. Također, i MARCH8 E3 ligaza može imati proviralna svojstva. Tako u članova virusne porodice *Flaviviridae* koja uključuje HCV, Dengue virus i Zika virus, ubikvitinilacijom virusnih proteina pomaže virusnom replikacijskom ciklusu [224].

### 1.4.1. Ubikvitinilacija kod infekcija herpesvirusima

Citomegalovirus može iskorištavati ubikvitinilacijski sustav stanice na različite načine: direktnom modulacijom (kodiranjem vlastitih ubikvitin ligaza i deubikvitinilaza) [225, 226], indirektnom modulacijom (djelujući na domaćinske ligaze i deubikvitinilaze) [227, 228] te korištenjem ubikvitinilacije za regulaciju količine virusnih proteina [229, 230]. Prvi otkriveni slučaj herpesvirusa koji kodira vlastite proteine koji imaju direktnu ulogu u ubikvitinilacijskom sustavu stanice bio je HSV-1, za čiji je tegumentni protein UL36 pokazano da posjeduje DUB ulogu. Kasnije je otkriven odgovarajući homologni protein u citomegalovirusa, UL48 kod HCMV-a odnosno M48 kod MCMV-a. Radi se o velikom tegumentnom proteinu koji je esencijalan za replikaciju virusa, što nije jasno potvrđeno i za njegovu DUB domenu. [225, 231]. Nadalje, pIE1 protein HCMV-a može djelovati kao E3 ubikvitin ligaza, čije djelovanje smanjuje izražaj proteina bitnog u održavanju nediferenciranog i proliferativnog stanja neuralnih prekursorskih stanica, Hes1 (engl. *Hairy and Enhancer of split*). Pored toga, izražaj Sp100A, proteina čije se antiviralno djelovanje očituje u regulaciji interferonom stimuliranih gena, smanjen je za vrijeme HCMV infekcije, najvjerojatnije uslijed

ubikvitinilacije od strane pIE1 [232, 233]. Također, poznato je da određeni proteini herpesvirusa, primjerice HSV-1 i HCMV-a, ulaze u interakcije sa staničnim E3 ligazama u svrhu manipuliranja njihovom aktivnosti. Jedan od njih je HCMV protein UL42 koji mijenjanjem aktivnosti i lokalizacije Nedd4 ligaze smanjuje ubikvitinilaciju gB i spašava ga od razgradnje [228, 234]. Kao što je ranije navedeno, virus može djelovati i na količinu vlastitih proteina u stanici te u tu svrhu koristi deubikvitinilacijsku domenu proteina UL48. Funkcionalnost UL48 DUB domene važna je za napredovanje virusnog replikacijskog ciklusa te održavanje stabilnog izražaja tegumentnih proteina poput pp150, pUL47, pUL45, pUL88 i pUL69, ali i samoga UL48. [235].

CMV modulira stanični imunološki odgovor korištenjem virusnih E3 ubikvitin ligaza i deubikvitinilaza, čime se može kontrolirati stabilnost virusnog proteoma, ali i proteina domaćina te manipulirati imunološkom signalizacijom i antigenskim predočavanjem. Aktivacijski status Toll-like receptora (TLR), osobito TLR3 i TLR4, igra presudnu ulogu u početnom stadiju replikacijskog ciklusa i kontrolira virusnu perzistenciju. CMV proteini US7 i US8 ciljano remete funkciju TLR3 i TLR4. Pri tome US7 koristi komponente ERAD sustava za poticanje ubikvitinacije i degradacije ovih receptora, dok US8 ometa vezanje TLR3 s UNC93B1, a TLR4 usmjerava prema lizosomima za brzu razgradnju. Na taj način US7 i US8 djeluju kao ključni inhibitori TLR-signalizacije u ljudskim fibroblastima [236].

S druge strane, STING (engl. *stimulator of interferon genes*) predstavlja ključni čimbenik urođene stanične imunosti koji se aktivira u prisutnosti virusne DNA u stanici, pokrećući signalni put odgovoran za poticanje izražaja interferona tipa I i upalnih citokina. Aktivnost STING signalnog puta regulirana je posttranslacijskim modifikacijama, prvenstveno fosforilacijom i ubikvitinilacijom, koje određuju intenzitet i trajanje imunološkog odgovora. Virusni proteini UL138 i UL122 pokreću degradaciju STING proteina putem lizosomalnog i proteasomalnog puta, čime se smanjuje njegova dostupnost i inhibira aktivacija interferonskog odgovora [237]. Nadalje, HCMV IE2 protein (IE86) također posreduje proteasomsku degradaciju STING-a, dodatno potiskujući izražaj interferona i proupalnih citokina, što omogućuje virusu uspješniju replikaciju i izbjegavanje imunološkog nadzora. Ovi mehanizmi regulacije i ciljane degradacije STING-a predstavljaju ključnu točku interakcije između virusa i domaćina s izravnim utjecajem na učinkovitost urođene imunosti i ishod virusne infekcije [238].

NF- $\kappa$ B signalni put, ključan za regulaciju urođenog imunološkog odgovora, također predstavlja važan cilj djelovanja citomegalovirusa. Iako dolazi do aktivacije NF- $\kappa$ B u ranim fazama infekcije, kasnije virus potiskuje njegovu aktivaciju kako bi spriječio prekomjernu upalnu reakciju [239]. Virusni protein US31 djeluje kao E3 ubikvitin ligaza koja promovira ubikvitinaciju fosforiliranog p100 proteina, ključnog faktora u NF- $\kappa$ B signalnom putu, čime se aktivira NF- $\kappa$ B2 put u početnim fazama infekcije [240]. S druge strane, kasni protein M45 (UL45) sudjeluje u kočenju mehanizme urođene imunosti [241, 242], kao i M48 (i UL48)

koji, svojom deubikvitinilaznom domenom, inhibira aktivaciju NF- $\kappa$ B. Aktivnost deubikvitinaza M48 i UL48 sudjeluje i u kontroli izražaja virusnog protupalnog kemokina MCK2, što regulira upalu, ali i virusnu replikaciju i diseminaciju [231, 243]. Ova precizna regulacija ubikvitinacijskih modifikacija omogućuje citomegalovirusu uspostavljanje ravnoteže između imunostimulacije i imunosupresije, čime virus osigurava uspješnu replikaciju i perzistenciju unutar zaražene stanice.

Citomegalovirus dodatno narušava imunološku obranu posredovanu TRIM obitelji E3 ubikvitin ligaza, pri čemu je posebno značajan TRIM19-NB, ključan posrednik urođene imunosti u odgovoru na patogene. Virusni protein pIE1 veže se za TRIM19, inhibirajući njegovu SUMOizaciju na ključnim lizinskim ostacima, poput K160, što dovodi do deSUMOizacije i smanjenja antiviralne funkcije TRIM19. Ova interakcija rezultira slabljenjem unutarstaničnih obrambenih mehanizama, čime se virusu omogućuje izbjegavanje prepoznavanja i uništenja od strane domaćinskog imunološkog sustava [244, 245].

Prema svemu navedenom, vidljivo je da citomegalovirusi koriste složene strategije temeljene na ubikvitinaciji modulirajući ključne komponente urođenog imunološkog sustava, uključujući TLR-ove, STING, NF- $\kappa$ B signalizaciju i imunost posredovanu TRIM proteinima, čime učinkovito potiskuju imunološki odgovor domaćina i osiguravaju dugotrajnu perzistenciju.

#### **1.4.1.1. M48 protein mišjeg citomegalovirusa**

Protein M48 MCMV-a ima deubikvitinirajuću domenu te sudjeluje u modulaciji stabilnosti virusnih proteina i izbjegavanju imunološkog odgovora tijekom infekcije, a konzerviran je među članovima porodice  $\beta$ -herpesvirusa [235, 243]. Kristalna struktura M48 otkriva da posjeduje nabor sličan papainu tipičan za cisteinske proteaze, te se on stoga svrstava u skupinu cisteinskih proteaza s deubikvitinirajućom aktivnosti. Cistein aktivnog mjesta DUB domene tvori kovalentnu vezu s ubikvitinom, što čini molekularnu osnovu njegovog katalitičkog mehanizma. Struktura M48 također pokazuje da njegova DUB domena stupa u interakcije s ubikvitinom i pomoću karakteristične  $\beta$ -ukosnice, doprinoseći specifičnosti domene, koja se razlikuje od ostalih deubikvitinaza. Ovaj jedinstveni strukturni raspored objašnjava specifičnost njegove enzimatske aktivnosti pri uklanjanju ubikvitina s virusnih i staničnih proteina (M48 DUB domena specifično katalizira uklanjanje ubikvitina dok većina staničnih deubikvitinilaza može katalizirati i uklanjanje Ubl s proteina) [226, 246]. M48 protein MCMV-a ubikvitin-specifična proteazna aktivnost sprječavanjem proteasomalne razgradnje virusnog kemokina MCK2 sudjeluje u regulaciji njegovih razina, što utječe na ugradnju MCK2 u zrele virione i širenje virusa te imunološki odgovor domaćina. Gubitak DUB aktivnosti M48 dovodi do povećane upale i slabljenja replikacije *in vivo*. Funkcionalno, M48 je homologan proteinu UL48 HCMV-a, koji dijeli sličnu DUB aktivnost koja skromno doprinosi replikaciji virusa u staničnoj kulturi [225, 231].

Očuvanje enzimske uloge ovoga proteina naglašava njegovu važnost u biologiji citomegalovirusa, gdje fino podešavanje procesa ovisnih o ubikvitinu regulira stabilnost virusnih proteina, imunomodulaciju i patogenezu. Stoga, razumijevanje aktivnosti M48 DUB domene pruža ključne uvide u interakcije citomegalovirusa i domaćina.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Istražiti mehanizme kojima citomegalovirus (CMV) remeti ubikvitinilacijske procese u stanici, čime narušava regulaciju aktivacije kontrolnih molekula endosomalnog prijenosa.
2. Identificirati stanične proteine čija je regulacija ubikvitinom bitna za nastanak ranog odjeljka za stvaranje virusnih čestica (preAC; engl. *(pre)assembly compartment*).
3. Utvrditi značaj M48 MCMV proteina i njegove deubikvitinilazne uloge za nastanak AC.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

Tablica 1. Kemikalije korištene u radu.

Kemikalija	Proizvođač
10 x koncentrirani MEM medij	Gibco, SAD
30 % akrilamid/bisakrilamid otopina	Carl Roth, Njemačka
Agaroz	Sigma Aldrich, SAD
Ampicilin (ampicilin natrijeva sol)	Carl Roth, Njemačka
APS (amonijev persulfat)	Sigma Aldrich, SAD
beta-merkaptotanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Sigma Aldrich, SAD
Biotin	Sigma Aldrich, Njemačka
Bromfenol modriilo (engl. bromphenol blue)	Merck, Njemačka
BSA, albumin iz goveđeg seruma (engl. bovine serum albumin)	Sigma Aldrich, SAD
CloneAmp HiFi PCR Premix (kit za PCR)	Clontech, SAD
Complete tablete (tablete proteaznih inhibitora)	Roche, Švicarska
DABCO (1,4-Diazabicyclo [2.2.2.] octane, Triethzlenediamine)	Sigma Aldrich, Njemačka
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	Thermo Scientific, SAD
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Merck, Njemačka
Di-natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O)	Kemika, Hrvatska
DMEM medij	PAN-Biotech, Njemačka
Etanol	Etil promet d.o.o., Hrvatska
Fetalni goveđi serum (FCS, engl. fetal bovine serum)	PAN-Biotech, Njemačka
Fenilmetanosulfonil fluorid (PMSF, engl. phenylmethanesulfonyl fluoride)	Sigma Aldrich, Njemačka
Fenol crveno (engl. phenol red)	Sigma Aldrich, Njemačka
Gel Star Nucleic Acid Gel Stain 10 000 x (boja za detekciju DNA)	Lonza, Švicarska
Glicerol	Kemika, Hrvatska

Glicin	Carl Roth, Njemačka
HEPES	Carl Roth, Njemačka
Kalcijev klorid (CaCl <sub>2</sub> )	Kemika, Hrvatska
Kalijev dihidrogenfosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Kemika, Hrvatska
Kalijev klorid (KCl)	Kemika, Hrvatska
Kanamycin sulfat	Carl Roth, Njemačka
Kloridna kiselina	Kemika, Hrvatska
L-glutamin	PAN-Biotech, Njemačka
Lipofectamine 3000 transfekcijski reagens	Invitrogen (Thermo Scientific), SAD
Luria Broth (LB) agar	Carl Roth, Njemačka
Luria Broth (LB) medij	Carl Roth, Njemačka
Magnezijev klorid heksahidrat (MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O)	Merck, Njemačka
Magnezijev klorid monohidrat (MgCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O)	Merck, Njemačka
MEM medij	Gibco, SAD
Metanol	Kemika, Hrvatska
Metil-celuloza	Fluka Biochemika, Švicarska
Mowiol	Sigma Aldrich, SAD
Natrijev azid (NaN <sub>3</sub> )	Difco, SAD
Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	Kemika, Hrvatska
Natrijev etilendiamintetraacetat (EDTA, engl. ethylenediaminetetraacetic-Na <sub>2</sub> salt)	Carl Roth, Njemačka
Natrijev fluorid (NaF)	Kemika, Hrvatska
Natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Kemika, Hrvatska
Natrijev hidroksid (NaOH)	Kemika, Hrvatska
Natrijev karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Kemika, Hrvatska
Natrijev klorid (NaCl)	Carl Roth, Njemačka
Natrijev ortovanadat (Na <sub>3</sub> CO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich, SAD
NEBuilder HiFi DNA Assembly (kit za kloniranje)	New England Biolabs, SAD
Neutravidin agarozna	Thermo Fisher Scientific, SAD

NucleoBond PC 100 (Midi kit for transfection-grade plasmid DNA) kit za izolaciju plazmidne DNA (MidiPrep)	Macherey Nagel, Njemačka
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (za pročišćavanje DNA fragmenata iz agaroznog gela)	Clontech Laboratories, SAD
NucleoSpin Plasmid DNALB (Mini kit for plasmid DNA) kit za izolaciju plazmidne DNA (MiniPrep)	Macherey Nagel, Njemačka
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (marker veličine proteina)	Thermo Fisher Scientific, SAD
Paraformaldehid	Sigma Aldrich, Njemačka
Penicilin 10000 U/mL - streptomycin 10 mg/mL	PAN - Biotech, Njemačka
Ponceau S	Sigma Aldrich, SAD
Propidijev jodid	Serva, Njemačka
Puromicin	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Purple 6x Gel Loading Dye (za nanošenje DNA uzoraka na gel)	New England BioLabs, SAD
PVDF membrane 0.45 µM	Millipore, SAD
Restriksijski enzim, BamH1-HF	New England BioLabs, SAD
Restriksijski enzim, EcoR1	New England BioLabs, SAD
Restriksijski enzim, Pst1-HF	New England BioLabs, SAD
Restriksijski enzim, Xcm1	New England BioLabs, SAD
RIPA pufer	Thermo Fisher Scientific, SAD
RNA iMAX Lipofectamine	Invitrogen, SAD
RPMI 1640 medij	PAN - Biotech, Njemačka
Saharoza	Kemika, Hrvatska
SDS (natrij dodekasulfat)	Sigma Aldrich, SAD
SignalFire Elite ECL Reagent (reagens za kemiluminiscenciju)	Cell Signaling, SAD
SignalFire Plus ECL Reagent (reagens za kemiluminiscenciju)	Cell Signaling, SAD
SOC medij	Thermo Scientific, SAD
Standardi dužine odsječka DNA (100 bp, 1 kb)	New England Biolabs, SAD
TEMED (C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> ),	Sigma Aldrich, SAD



Tripansko modriilo	Serva, Njemačka
Tripsin	Gibco, SAD
Tris baza (tris hidroksimetil aminometan)	Boehringer Mannheim, Njemačka
Tris-HCl	Carl Roth, Njemačka
Triton X-100	Rhom&Haas, SAD
Tween-20 (polioksietilen sorbitan monolaureat)	Sigma Aldrich, Njemačka
Western reagens za blokiranje 10 x	Roche, Švicarska

### 3.1.2. Hranjive podloge za uzgoj kultura stanica i puferi

Tablica 2. Hranjive podloge i puferi korišteni u radu.

Medij/otopina	Sastav
Agarozni gel	0,8 % (w/v): 0,8 g agaroze, 80 ml 1X TAE pufera
Fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS, engl. phosphate buffered saline)	pH 7,4 140 mM NaCl, 2,7 mM kalijev klorid (KCl), 6,5 mM natrijev – hidrogenfosfat dihidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), 1,5 mM kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0,7 mM kalcijev klorid ( $\text{CaCl}_2$ ) i 0,7 mM magnezijev klorid heksahidrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )
Fiziološka otopina puferirana s tris-bazom (engl. tris buffered saline, TBS) pH 7,6	20 mM Tris baza, 150 mM NaCl
Kompletan DMEM medij za uzgoj mišjih embrionalnih fibroblasta i imortalizirane adherentne stanične linije	Medij DMEM, 2 mM L-glutamin, $1 \times 10^5$ U/L penicilin, 0,1 g/l streptomycin sulfat i 5 % (v/v) odnosno 10 % (v/v) FCS
Kompletan RPMI 1640 medij Medij RPMI 1640	2 mM L-glutamin, $1 \times 10^5$ U/L penicilin, 0,1 g/l streptomycin sulfat i 10 % (v/v) FCS
Luria Broth medij (LB tekući medij za uzgoj bakterija)	5 g LB medija (w/v) u 200 ml $\text{H}_2\text{O}$
Luria Broth agar (LB ploče za kultivaciju bakterija)	10 g LB agar u 250 ml $\text{H}_2\text{O}$ , ampicilin (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

Medij za metodu protočne citometrije (engl. fluorescence – activated cell sorting, FACS)	PBS, 10 mM EDTA, 20 mM Hepes (pH 7,2), 2 % (v/v) FBS i 0,1 % (v/v) natrijev azid (NaN <sub>3</sub> )
Medij s metil – celulozom	0,022 g/ml metilceluloze, 26 mM natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO <sub>3</sub> ), 10 x koncentrirani MEM, 3 % (v/v) FBS, 1 x 10 <sup>5</sup> U/L penicilin; 0,1 g/l streptomicin sulfat
Medij za smrzavanje stanica	10 % (v/v) dimetil sulfoksid (DMSO), 20 % (v/v) FBS i 70 % (v/v) RPMI medij
Otopina saharoze za centrifugiranje virusa	15 % (w/v) saharoza otopljena u puferiranom fosfatnom puferu (PBS)
Otopina SDS-a	Natrij dodecilsulfat (SDS) 10 % (w/v) u H <sub>2</sub> O
Otopina za denaturaciju proteina	0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 % SDS (w/v), 0,1 % bromfenol modriilo (w/v), 30 % glicerol (v/v)
Otopina za razaranje (lizu) stanica	RIPA pufer, 25 x Complete inhibitor tableta (w/v), 0,1 M PMSF (Fenilmetilsulfonil fluorid)
Otopina za blokiranje membrana	Western reagens za blokiranje Roche (Roche 1 x (v/v) u TBS - u; Odmašćeno mlijeko u prahu (5 % mlijeko u prahu (w/v) u TBST-u
Otopina za ispiranje membrana (TBST)	Tween-20 0,05 % (v/v) u TBS-u
Goveđi serumski albumin	BSA 3 % (w/v); 3 g BSA, 100 ml PBS
Otopina za vizualizaciju proteina na membrani	Ponceau S 0,5 % (w/v) u 1 % (v/v) octenoj kiselini
Otopina za razrijeđivanje primarnih protutijela (za Western blot analizu)	Western reagens za blokiranje Roche (Roche 0,5 x (v/v) u TBS - u) Goveđi serumski albumin (BSA 5 % (w/v); 5 g BSA, 100 ml TBST)
Otopina za razdvajajući gel za SDS-PAGE	30 % (v/v) akrilamid/bisakrilamid, 1.5 M Tris-HCl (pH 8,8), 10 % (v/v) SDS, 10 % (v/v) APS, 0,04 % (v/v) TEMED
Otopina za sabijajući gel za SDS-PAGE	30 % (v/v) akrilamid/bisakrilamid, 1.0 M Tris-HCl (pH 6,8), 10 % (v/v) SDS, 10 % (v/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED
Paraformaldehid za fiksiranje stanica	40 g/L paraformaldehid, 0,01 M natrijev hidroksid (NaOH)

Permeabilizacijski pufer Tween-20 (0,5%, v/v)	0,5 % (v/v) Tween-20 u PBS-u
Permeabilizacijski pufer Tween-20 (1%, v/v)	1 % (v/v) Tween-20 u PBS-u
Permeabilizacijski pufer Triton X-100 (0,5 %, v/v)	0,5 % (v/v) Triton X-100 u PBS-u
Pufer za elektroforezu DNA (1 x TAE, od tris-acetat-EDTA) pH 8,0	40 mM TRIS baza, 20 mM octena kiselina, 1 mM EDTA
Pufer za SDS-PAGE	25 mM TRIS baza, 192 mM glicin, 0,1 % (w/v) SDS
TBS (fiziološka otopina puferirana TRIS-om)	20 mM TRIS baza; 0,5 M NaCl; pH 7,5
TBS - T (fiziološka otopina puferirana TRIS-om s Tween-om-20)	20 mM TRIS baza; 0,5 M NaCl; 0,05 % ili 0,1 % (v/v) Tween-20; pH 7,5
Transfer pufer za western blot	25 mM Tris baza, 192 mM glicin, 20 % (v/v) metanol
Tripsin	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,25 g EDTA, 0,456 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,25 g Tripsin, 0,016 g fenol crveno, 1 L destilirane vode
Uklopno sredstvo za fluorescentne mikroskopske preparate (Mowiol)	2,4 g Mowiol, 6 mL glicerol, 0,2 M Tris, 2,5 % DABCO

### 3.1.3. Laboratorijski pribor i reagensi

Tablica 3. Laboratorijski pribor korišten u radu

Pribor	Proizvođač
Ampule za smrzavanje stanica	Greiner Bio-One, Austrija
Bočice za ultracentrifugiranje	Thermo Scientific, SAD
Epruvete od 0,5, 1,5 i 2 mL	Greiner Bio-One, Austrija
Epruvete za PCR	Greiner Bio-One, Austrija
Epruvete za FACS	Falcon, SAD
Epruvete za uzgoj bakterija	Sarstedt Thermo Scientific, SAD
Filter papir za prijenos proteina u western blot analizi	Cytiva Amersham, Velika Britanija

Nastavci za pipete 10 - 1000 $\mu$ l	Greiner, Frichenhausen, Njemačka
Mehaničke automatske pipete	Gilson, SAD i Eppendorf, Njemačka
Odmjerne menzure i tikvice	Neolab, Njemačka
Petrijeve posude za uzgoj kulture stanica (10 cm)	Greiner Bio-One, Austrija
Petrijeve posude za uzgoj kulture stanica (15 cm)	Greiner Bio-One, Austrija
Petrijeve posude za uzgoj kulture stanica (6 cm)	Greiner Bio-One, Austrija i TPP, Švicarska
Pipete, sterilne plastične od 10 mL	Greiner Bio-One, Austrija
Ploče za kultivaciju bakterija (10 cm)	Greiner Bio-One, Austrija
Ploče za uzgoj kulture stanica s 6 rupica (za adherentne stanične kulture)	Greiner Bio-One, Austrija
Ploče za uzgoj kulture stanica s 24 rupica (za adherentne stanične kulture)	Greiner Bio-One, Austrija
Ploče za uzgoj kulture stanica s 48 rupica (za adherentne stanične kulture)	Greiner Bio-One, Austrija
Ploče za staničnu kulturu u supenziji s 12 rupica	Greiner Bio-One, Austrija
Ploče za uzgoj kulture stanica s 12 rupica (za adherentne stanične kulture)	Greiner Bio-One, Austrija
Ploče za staničnu kulturu u supenziji s 24 rupice	Greiner Bio-One, Austrija
Pokrovna stakalca 12 mm	Thermo Scientific, SAD
Pokrovna stakalca 18 mm	Thermo Scientific, SAD
Predmetna stakalca za mikroskopiju	Detalab, Španjolska
Transfer membrana za prijenos proteina PVDF 0,45 $\mu$ M	Merck Milipore, Njemačka
Staklene boce (100 - 1000 ml)	Schott, Njemačka
Sterilne epruvete od 50 mL	Greiner Bio-One, Austrija
Strugač za stanice	Greiner Bio-One, Austrija

**Tablica 4. Popis primarnih protutijela koja prepoznaju MCMV proteine.**

MCMV protein	Razred protutijela	Organizam u kojem je protutijelo proizvedeno	Izotip protutijela	Klon hibridoma	Kataloški broj	Proizvođač i pohrana hibridoma
m123/pIE1	monoklonsko protutijelo	miš	IgG1	klon CROMA 101, supernatant hibridomske kulture		Sveučilište u Rijeci, Zavod za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju
m123/pIE1	monoklonsko protutijelo	miš	IgG2a	klon IE1.01.	HR-MCMV-12	Sveučilište u Rijeci, Centar za proteomiku
pM112-113/E1	monoklonsko protutijelo	miš	IgG1	klon CROMA 103, supernatant hibridomske kulture		Sveučilište u Rijeci, Zavod za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju
pM112-113/E1	monoklonsko protutijelo	miš	IgG1	klon CROMA 103	HR-MCMV-07	Sveučilište u Rijeci, Centar za proteomiku
pM57	monoklonsko protutijelo	miš	IgG1	klon M57.02	HR-MCMV-06	Sveučilište u Rijeci, Centar za proteomiku
pm06	monoklonsko protutijelo	miš	IgG1	klon CROMA229, supernatant hibridomske kulture		Sveučilište u Rijeci, Zavod za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju
pm06	monoklonsko protutijelo	miš	IgG1	klon CROMA229	HR-MCMV-02	Sveučilište u Rijeci, Centar za proteomiku
pM55/gB	monoklonsko protutijelo	miš	IgG2a	klon M55.02	HR-MCMV-14	Sveučilište u Rijeci, Centar za proteomiku
pM55/gB	monoklonsko protutijelo	miš	IgG2b	klon M55.01	HR-MCMV-05	Sveučilište u Rijeci, Centar za proteomiku
pm74	monoklonsko protutijelo	miš	IgG1	klon M74.01		Sveučilište u Rijeci, Centar za proteomiku

**Tablica 5. Popis sekundarnih protutijela korištenih u ovom radu.**

Sekundarno protutijelo	Organizam u kojem je proizvedeno protutijelo	Konjugat	Kataloški broj	Proizvođač
Protu-kuniđji IgG	koza	Peroksidaza	111-035-003	Jackson Laboratories, SAD
Protu-kuniđji IgG	koza	Alexa Fluor 488	A11008	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), SAD
Protu-kuniđji IgG	koza	Alexa Fluor 555	A21429	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), SAD
Protu-kuniđji IgG	koza	Alexa Fluor 594	A11012	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), SAD
Protu-mišđji IgG	koza	Peroksidaza	115-035-003	Jackson Laboratories, SAD
Protu-mišđji IgG1	koza	Alexa Fluor 488	A21121	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), SAD
Protu-mišđji IgG1	koza	Alexa Fluor 555	A21127	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), SAD
Protu-mišđji IgG1	koza	Alexa Fluor 594	A21125	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), SAD
Protu-mišđji IgG2a	koza	Alexa Fluor 488	A21131	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), SAD
Protu-mišđji IgG2a	koza	Alexa Fluor 555	A21137	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), SAD
Protu-mišđji IgG	koza	fluorescein izotiocijanat (FITC)	554001	Pharmingen (BD Scientific), SAD

**Tablica 6. Popis siRNA korištenih u ovom radu.**

Specifičnost / siRNA	Kataloški broj	Proizvođač
Nespecifična / negativna kontrolna siRNA (scrambled siRNA)	1022076	Qiagen, Njemačka

Rab11	S100211729	Qiagen, Njemačka
WASHC1	L-054931-01-0005	Dharmacon, SAD

### 3.1.4. Stanične linije

Istraživanje je provedeno na dvije vrste mišjih fibroblasta. Tako su korištene imortalizirane NIH3T3 (ATCC CRL-1658) stanice i mišji embrionalni fibroblasti (MEF). Stanice su uzgajane u plastičnim Petrijevim posudama s hranjivim medijem DMEM (Dulbeccov modificirani Eagleov medij, (PAN - Biotech, Aidenbach, Njemačka)) na temperaturi od 37 °C i uz prisutnost 5 % CO<sub>2</sub>. Medij je nadopunjen s 2 mM L-glutaminom, 1 x 10<sup>5</sup> U/L penicilina, 0,1 g/L streptomycin sulfata te 5 % (v/v) (MEF) ili 10 % (v/v) (NIH3T3) fetalnog goveđeg seruma (FBS, engl. *fetal bovine serum*, PAN- Biotech, Aidenbach, Njemačka). Za proizvodnju lentivirusa sa stabilnim izražajem HA-Ub WT transgena (odjeljak 3.2.11.5.) korištena je HEK293T stanična linija (ATCC CRL-3216, Manassas, VA, USA) u 10 % FBS DMEM-u bez antibiotika.

### 3.1.5. Mišji citomegalovirusi

U ovom radu je u većini eksperimenata korišten C3X WT MCMV (wt MCMV, divlji tip, soj Smith, ATCC VR-194), ako nije drugačije navedeno. Pored toga, korišteno je i nekoliko rekombinantnih mišjih citomegalovirusa: Δm138-MCMV (ΔMC95.15), C3X GFP-MCMV i C3X ΔM48 (C23S) MCMV. Δm138MCMV (ΔMC95.15) rekombinantni je virus s delecijom *fer1* (m138) gena koji kodira za virusni protein nalik na Fc-receptor. Stoga ovaj virus ne može vezivati Fc-fragment imunoglobulina G (IgG) te je time spriječeno nespecifično vezivanje protutijela pri korištenju metoda koje koriste princip vezivanja protutijela i antigena, što nam je posebno bilo bitno kod imunofluorescentnih tehnika [247]. U svrhu praćenja učinkovitosti MCMV-replikacije metodom protočne citometrije korišten je rekombinantni virus C3X GFP-MCMV (MCMV GFP) koji je proizveden na kalupu wt MCMV-a kojemu je dodana kazeta s genom za izražaj zelenog fluorescentnog proteina (GFP, engl. *green fluorescent protein*). Kazeta je smještena uzvodno od *ie2* gena i pod kontrolom je HCMV IE promotora MIEP (engl. *major IE enhanced promotor*) [248]. Kako bi se utvrdila uloga ubikvitinilacije u replikacijskom ciklusu MCMV-a korišten je C3X ΔM48 (C23S) MCMV (M48<sup>C23S</sup> MCMV) kojemu je cistein u katalitičkom mjestu deubikvitinilacijske domene (DUB) proteina M48 promijenjen u serin. Ovaj mutantni virus proizveden je u Centru za proteomiku Medicinskog fakulteta u Rijeci SNP mutagenom (C23S) kao što je prethodno opisano [231] standardnom metodom BAC rekonstitucije [249].

Uvjeti infekcije su bili standardizirani obzirom na broj virusnih čestica koji je iznosio 0,1 – 5 PFU (PFU, engl. *plaque forming units*) i povećanja učinkovitosti infekcije za 10 puta (MOI, engl. *multiplicity of infection*) što se postiže centrifugiranjem na 4 °C, 15 minuta na 800 x g u oba smjera ploče [250].

### 3.1.6. Plazmidi

**Tablica 7. Bakterijski plazmidi**

Naziv plazmida	Primjena plazmida	Porijeklo plazmida
pRK5-HA-Ubiquitin-WT	Plazmid koji omogućuje izražaj fuzijskog proteina HA-Ub	Addgene plazmid # 17608 (donacija Ted Dawson)
pLIX_Kan-PstI	Lentivirusni vektor koji omogućuje doksiciklin inducibilnu ekspresiju transgena	donacija dr. Martin Masserle
P8.91	Plazmid koji omogućuje pakiranje i stvaranje lentivirusa	Addgene plazmid # 187441
P-CMV-VSV-G	Plazmid koji omogućuje stvaranje omotača tijekom produkcije lentivirusa	Addgene plazmid # 8454 (donacija dr. Simon Davis)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Uzgoj staničnih linija

Mišji fibroblasti uzgajani su u adherentnim plastičnim Petrijevim posudama promjera 10 cm u DMEM-mediju obogaćenom 5 % FBS-om (MEF) ili 10 % FBS-om (NIH3T3), na temperaturi od 37 °C uz 5 % CO<sub>2</sub>. Nakon što su fibroblasti postigli 80 % konfluentnosti, tripsinizirani su u nove ploče, gdje se uzgajanje nastavilo do željene gustoće.

### 3.2.2. Infekcija stanica mišjim citomegalovirusom

Adherentne stanice su uzgajane u odgovarajućim pločama te inficirane dodavanjem 1 PFU MCMV virusa u hladnom kompletnom DMEM mediju kada su bile oko 60 – 80 % konfluentne (ovisno o uvjetima eksperimenta). Uvjeti infekcije standardizirani su obzirom na broj virusnih čestica i uvjeta za povećanje učinkovitosti infekcije za oko 10 MOI, što se postiže centrifugiranjem na 4 °C, 15 minuta na 800 x g u oba smjera ploče [250]. Po završetku centrifugiranja, stanice su inkubirane u CO<sub>2</sub> inkubatoru na 37 °C. Ta vremenska točka se koristila za postavljanje početnog vremena infekcije 0 hpi. Učinkovitost infekcije stanica najčešće je praćena detekcijom unutarstaničnog pIE1 proteina [76].



### 3.2.3. Inhibicija ubikvitinilacije pomoću PYR-41 inhibitora

PYR-41 (4-[4-[(5-nitro-2-furanil) metilen]-3,5-diokso-1-pirazolidinil] benzojeva kiselina etil ester), dobiven od Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf, Njemačka; kat. br. 000135538), otopljen je u DMSO-u (Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf, Njemačka). Kada je korišten PYR-41, kontrolne (lažno tretirane) stanice su inkubirane s odgovarajućom koncentracijom DMSO-a (0,04 % DMSO za 10  $\mu$ M, 0,06 % DMSO za 15  $\mu$ M i 0,08 % DMSO za 20  $\mu$ M PYR - 41).

### 3.2.4. Utišavanje izražaja staničnih proteina pomoću siRNA metode

Metodom RNA utišavanja uklonili smo izražaj proteina od interesa, bitnih za fiziologiju staničnih odjeljaka. NIH3T3 stanice transficirane su kontrolnom (scr, engl. *scrambled*) i gen-specifičnom siRNA u odgovarajućim koncentracijama i uz pomoć komercijalnog transfekcijskog reagensa Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific, SAD). Koristili smo obrnuti (engl. *reverse*) transfekcijski protokol. U skladu s tim, u rupice Petrijeve ploče za stanične kulture je najprije dodan Opti-MEM medij (volumen je ovisio o veličini ploče) te zatim siRNA od interesa ili mješavina nespecifičnih tj. kontrolnih siRNA. Smjesa je inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi, te je zatim u svaku jažicu dodan transfekcijski reagens prema uputama proizvođača. Nakon toga, ploča je dodatno inkubirana na sobnoj temperaturi 20 minuta kako bi se stvorili kompleksi siRNA i nosača. Nakon inkubacije u svaku rupicu je dodana suspenzija stanica u 10 % DMEM mediju bez antibiotika. Nakon 48 sati, stanice su podvrgnute daljnjem eksperimentu. Za određivanje optimalne siRNA koncentracije, svaka siRNA je prethodno testirana u koncentracijama od 20 – 100 nM metodom imunofluorescencije i western blot analize.

### 3.2.5. Analiza infekcije stanica mišjim citomegalovirusom metodom protočne citometrije

Stanice su inficirane rekombinantnim C3X GFP-MCMV virusom (MOI = 10) te je izražaj GFP fluorescentnog signala praćen protočnom citometrijom. U različitim vremenskim točkama nakon infekcije, stanice su odvojene od podloge kratkom tripsinizacijom, centrifugirane 5 min na 300 x g (centrifuga Thermo Scientific Heraeus, SAD ili Hettich Zentrifugen Rotina 420R, Njemačka), isprane u FACS puferu te resuspendirane u 300  $\mu$ l 1  $\mu$ g/ml propidij jodida i zatim analizirane na protočnom citometru FACS Calibur (Becton-Dickinson, SAD). Mrtve stanice isključene su iz analize na osnovu emisije crvene svjetlosti propidijevog jodida te je u konačnu analizu bilo uključeno 5000 vijabilnih stanica. Naime, poznato je da propidijev jodid ulazi jedino u mrtve stanice i samim time se koristi kao diskriminativna varijabla za mrtve stanice [251]. Kako ovaj virus sadrži kazetu s genom za izražaj zelenog fluorescentnog proteina (GFP, engl. *green fluorescent protein*) koji je pod kontrolom HCMV IE promotora MIEP [248], dobivena vrijednost

intenziteta fluorescencije (MFI, engl. *mean fluorescence intensity*) GFP u određenoj staničnoj populaciji predstavlja ujedno i mjeru uspostavljene infekcije. Analiza stanica provedena je pomoću CellQuestPro programa (CellQuestPro software, Becton-Dickinson), dok je grafička obrada rezultata vršena u WinMDI 2.8 programu.

Rezultati su prikazani kao histogrami učestalosti broja stanica u odnosu na intenzitet fluorescencije (MFI), odnosno kao grafički prikaz postotka zastupljenosti GFP pozitivnih stanica. Pri obradi podataka, srednji intenzitet fluorescencije bio je umanjnjen za odgovarajuću vrijednost negativne kontrole (uzorak stanica neposredno nakon infekcije).

### **3.2.6. Kvantifikacija recikliranja transferina protočnom citometrijom**

Model internalizacije i prometovanja transferinskog receptora (TfR) uobičajeno se koristi za ispitivanje puteva internalizacije ovisnih o klatrinu i kinetike recikliranja iz ranih i reciklirajućih endosoma. Transferinski receptor na staničnoj površini veže željezom zasićen transferin ( $\text{Fe}_2\text{Tf}$ ), nakon čega nastaje  $\text{Fe}_2\text{Tf:TfR}$  kompleks koji se potom internalizira uz pomoć klatrinom obloženih vezikula. Vezikule s  $\text{Fe}_2\text{Tf:TfR}$  se potom upućuju u pre-EE i EE [252]. Kiseli uvjeti ranih endosoma uzrokuju otpuštanje željeza iz internaliziranog kompleksa, nakon čega se kompleks Tf:TfR reciklira ili iz ranih endosoma (EE) ili iz reciklirajućih endosoma (RE) natrag na staničnu površinu gdje se nezasićeni Tf (apo-Tf) otpušta u medij, a TfR ponovno veže novi  $\text{Fe}_2\text{Tf}$  [253].

Kvantitativna analiza recikliranja provedena je na neinficiranim i inficiranim fibroblastima prema ranije opisanom protokolu [254]. Na početku eksperimenta, stanice su odvojene od ploče na kojima su uzgajane inkubacijom u tripsinu 1 – 2 minute na 37 °C. Zatim su u 10 % DMEM-u prebačene u epruvete od 50 mL, gdje su najprije izdvojene odgovarajuće kontrole, a ostatak je centrifugiran 5 minuta na 300 x g (centrifuga Thermo Scientific Heraeus, SAD). Nakon centrifugiranja na talog stanica dodan je Tf-AF<sup>488</sup> (33,3 µg/ml) te su stanice inkubirane 45 minuta u CO<sub>2</sub> inkubatoru na 37 °C kako bi se omogućila internalizacija Tf-AF<sup>488</sup>. Nakon isteka pojedine inkubacije, internalizacija je zaustavljena naglim hlađenjem na ledu. Stanice su potom dva puta isprane s hladnim DMEM-om čime je otklonjen višak nevezanog transferina konjugiranog s fluorescentnom bojom. Na stanice je zatim dodana odgovarajuća količina toplog 10 % DMEM-a, talog je resuspendiran i jednaki volumni udjeli suspenzije odvojeni su u zagrijane FACS epruvete za svaku od praćenih vremenskih točaka. Srednji intenzitet fluorescencije (MFI, engl. *mean fluorescence intensity*) uzoraka u različitim kinetikama određen je na protočnom citometru FACSCalibur (Becton Dickinson, SAD). Recikliranje transferina u pojedinoj vremenskoj točki kvantificirano je na osnovu gubitka detekcije početnog fluorescentnog signala određenog nakon internalizacije transferina konjugiranog sa

fluorokromom. Postotak recikliranja transferina određen je prema sljedećoj formuli:  $(1 - (MFI_{rec.tx} / MFI_{int.} \times 100))$ .

### **3.2.7. Kratkoročna transfekcija mišjih fibroblasta konstruktima za izražaj rekombinantnih staničnih proteina**

NIH3T3 stanice su naseljene u pločama s 12 ili 24 rupica na pokrovnim stakalcima ili bez njih u 10 % DMEM - u bez antibiotika. Nakon što je konfluentnost iznosila oko 70 % (u pravilu sutradan), stanice su tranzijentno (kratkoročno) transficirane pRK5-HA-Ubikvitin-WT konstruktom (tablica 8) upotrebom transfekcijskog reagensa Lipofectamine 3000 (Invitrogen, SAD) prema uputama proizvođača. Ukratko, pripremljene su otopina A (1  $\mu$ l Lipofectamina 3000 u Opti-MEM-u) i otopina B (1  $\mu$ g plazmidne DNA i 1  $\mu$ l P3000, također u Opti-MEM-u). Otopine su pomiješane, inkubirane na sobnoj temperaturi 15 minuta i potom polako dodane na stanice. Nakon 30 sati stanice su inficirane MCMV-om i dalje tretirane prema eksperimentalnom protokolu, kako je navedeno.

### **3.2.8. Imunfluorescentna i konfokalna mikroskopija**

Za praćenje unutarstaničnog izražaja i lokalizacije virusnih i staničnih proteina koristili smo metodu imunofluorescentne i konfokalne mikroskopije. U tu svrhu, neinficirani i inficirani fibroblasti su uzgajani na pločama sa steriliziranim pokrovnim stakalcima. Nakon odgovarajućeg tretmana (inhibitori, transfekcija sa siRNA ili plazmidom) i MCMV infekcije, stanice su isprane PBS-om i fiksirane u 4 % PFA 20 minuta na sobnoj temperaturi. Za permeabilizaciju smo koristili 1 % Tween-20 u PBS-u tijekom 20 minuta na 37 °C. Primarno protutijelo dodano je u 1 % Tweenu i inkubirano 90 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon što su stanice tri puta isprane PBS-om, dodano im je odgovarajuće sekundarno protutijelo obilježeno odgovarajućim fluorokromom, razrijeđeno u 1 % Tweenu i inkubirano 60 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Stanice su ponovo isprane tri puta PBS-om. Za bojanje jezgre stanica koristili smo DAPI (5 mg/ml) razrijeđen u PBS-u. Nakon ispiranja, stanice su uklopljene uz pomoć Mowiola.

Preparati stanica slikani su na invertnim konfokalnim mikroskopima: Olympus Fluoview FV300 konfokalnom mikroskopu opremljenom s Ar 488, He/Ne 543 i He/Ne 633 laserima (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) i Leica DMI8 (konfokalna jedinica: TCS SP8; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), opremljenim UV (diode 405), Ar 488, DPSS 561 i He/Ne 633 laserima, te sa 4 detektora (2  $\times$  PMT and 2  $\times$  HyD). Korišten je HC PLAPO CS2 (63x/1.40 oil) uljni objektiv. Za dobivanje slika (515 x 515 piksela) korišten je LAS (Leica Application Suite) X software (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), u sekvencijskom načinu rada u kojem je pomak po z osi iznosio 0,5  $\mu$ m, a povećanja: 0,75x

(veličina piksela 481,47 x 481,47 nm), 1,5x (veličina piksela 240,74 x 240,74 nm), 3x (veličina piksela 120,37 x 120,37 nm), i 6x (veličina piksela 60,18 x 60,18 nm). Analiza slika dobivenih korištenjem konfokalnog mikroskopa Olympus odrađena je korištenjem računalnog programa Fluoview, verzija 4.3 FV 300 (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan), objektivna PLAPO60xO, odgovarajućih filtera i PMT detektora. Konfokalni otvor postavljen je na 2. Z-serije optičkih presjeka od 0,5  $\mu\text{m}$  snimljene su uzastopno srednjom brzinom skeniranja (1,65 s/sken). Svaki eksperiment je očitavan pod jednakim parametrima, u odnosu na kontrolne preparate.

### **3.2.8.1. Kvantifikacija zastupljenosti ispitivanih proteina u AC-u inficirane stanice**

Nakon tretmana MCMV-inficiranih NIH3T3 fibroblasta odgovarajućim inhibitorom, siRNA ili plazmidnom DNA, ispitivani stanični proteini imunofluorescentno su obilježeni, a njihova prisutnost u AC - u definirana je kao koncentrirani perinuklearni fluorescentni signal unutar kuta  $\alpha \leq 90^\circ$ . Zastupljenost ispitivanog proteina u AC - u izbrojana je u svim stanicama unutar 10 vidnih polja po uzorku, a pokus je ponovljen 3 ili više puta. Preparati su vizualizirani fluorescentnim mikroskopom Olympus BX51 (digitalna kamera DP72CCD, povećanje 400x) koristeći UPlanFL N 40x/0,75 objektiv i računalni softver CellSens 1.15 (Olympus Optical Company, Japan).

### **3.2.9. Digitalna holotomografska mikroskopija**

Snimanje živih stanica digitalnom holotomografskom mikroskopijom (engl. *digital holotomographic* microscopy, DHTM) u kombinaciji s epifluorescencijom provedeno je korištenjem 3D Cell-Explorer Fluo (Nanolive, Ecublens, Švicarska) s objektivom za zrak x 60 na valnoj duljini od  $\lambda = 520$  nm. Pobuda fluorescencije osigurana je CoolLED pE-300 Ultra sa standardnim DAPI/FITC/TRITC filterima. Zračenje lasera bilo je 0,2 nW/ $\mu\text{m}^2$ , a vrijeme akvizicije po slici iznosilo je 45 ms. Za održavanje fizioloških uvjeta tijekom snimanja živih stanica, uključujući konstantnu temperaturu od 37 °C, relativnu vlažnost 90 % i koncentraciju CO<sub>2</sub> od 5 %, korišten je inkubator (Okolab, Pozzuoli, Italija) s grijanim staklenim poklopcem kako bi se izbjegla kondenzacija. Za dobivanje snimki, 100 000 EGFP-Rab10 NIH3T3 stanica zaraženih MCMV-om (MOI od 10) nasadeno je u  $\mu$  - Slide I Luer (Ibidi GmbH, Njemačka) s površinskom modifikacijom ibi-Treat i visinom kanala 0,8 mm. Kanalsko staklo je postavljeno u inkubacijsku komoru radi aklimatizacije prije snimanja. Snimanje je započelo 16 sati nakon infekcije, a slike su snimane svakih deset sekundi tijekom jednog sata. PYR-41 je dodan u kanal jednu minutu nakon početka snimanja. Slike snimljene ubrzanom tempom spremljene su i izvezene u 2D TIFF formatu pomoću STEVE softvera (Nanolive SA, Ecublens, Švicarska), koji kontrolira 3D Cell Explorer mikroskop. Izvezene slike su spojene i pretvorene u .avi format pomoću FIJI-ja [255].

### 3.2.10. Western blot analiza

Na ploču sa 12 rupica naseljeno je 70000 NIH3T3 stanica po rupici koje su sljedeći dan inficirane prema eksperimentalnom protokolu. Uzorci su skupljani prema predviđenoj kinetici, kratkom tripsinizacijom uglavnom 0, 6, 24 i 48 hpi te isprani PBS-om. Na talog stanica dodano je 20  $\mu$ L pufera za lizu (RIPA pufer, Thermo Scientific, SAD) uz dodatak inhibitora degradacije proteina PMSF-a i koktela inhibitora (Roche, Švicarska). Inkubacijom 45 minuta na ledu uz vorteksiranje svakih 10 - 15 minuta dobiven je stanični lizat proteina. Nakon centrifugiranja na maksimalnoj brzini od 13200 okretaja (4 °C, 15 minuta), supernatant je pokupljen i podvrgnut denaturaciji na 95 °C tijekom 10 minuta u otopini za denaturaciju u reducirajućim uvjetima dodatkom 5 % 2-merkaptetanola.

Poliakrilamidni gelovi pripremljeni su koristeći MiniPROTEAN Tetra (BIO - RAD) sustav za izlivanje gela. Korišteni su gelovi u rasponu koncentracija 8 – 15 %, gdje je gustoća gela ovisila o veličini proteina. Proteini iz staničnih lizata razdvojeni su elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) pri električnom naponu od 100 V, kroz sabijajući (engl. *stacking*) gel i 130 V kroz razdvajajući (engl. *running*) gel (Bio-Rad PowerPac Universal, Hercules, USA). Za kontrolu molekularne mase analiziranih proteina korištena je obojana mješavina proteina poznatih molekularnih masa (PageRuler™, Thermo Scientific, SAD).

PVDF (engl. *polyvinylidene fluoride*) membrana za blotiranje (Milipore) aktivirana je u metanolu (20 sekundi), isprana u bidestiliranoj vodi (2 minute) i ekvilibrirana u transfer puferu. Zatim je složen “sendvič” za mokri blotting koji se sastojao od filter papira, poliakrilamidnog gela i PVDF membrane. Sendvič za blotting je potom uronjen u kadicu sa transfer puferom te blotiran tijekom 1,5 do 2 sata pri konstantnom naponu od 70 - 80 V, ovisno o veličini proteina.

PVDF membrana je blokirana upotrebom otopine za blokiranje Roche Diagnostics GmbH, Njemačka, a potom inkubirana sa specifičnim primarnim protutijelima preko noći na 4 °C. Membrane su zatim ispirane s tri ciklusa ispiranja u otopini 0,05 % v/v Tween-20 u TBS-u te inkubirane 60 minuta na sobnoj temperaturi odgovarajućim sekundarnim protutijelima konjugiranim peroksidazom (POD).

Kemiluminiscentni signal vizualiziran je nakon inkubacije sa odgovarajućim reagensom za razvijanje kemiluminiscencije (SignalFire (™) Plus ECL Reagent ili Signal Fire (™) Elite ECL Reagent (Cell Signaling)) na uređaju Transilluminator Alliance 4.7 11 (Uvitec Ltd., UK); ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare, Švedska) ili ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Švedska). Kvantitativna analiza kemiluminiscentnog signala provedena je pomoću softvera Image J 1.53 i ImageQuantTL, verzija 10.2., Cytiva. Sve vrijednosti su normalizirane s obzirom na signal  $\beta$ -aktina ili tubulina, korištenog kao kontrola nanosa proteina.

### 3.2.11. Proizvodnja NIH3T3 stanične linije s inducibilnim izražajem HA-Ub-WT transgena

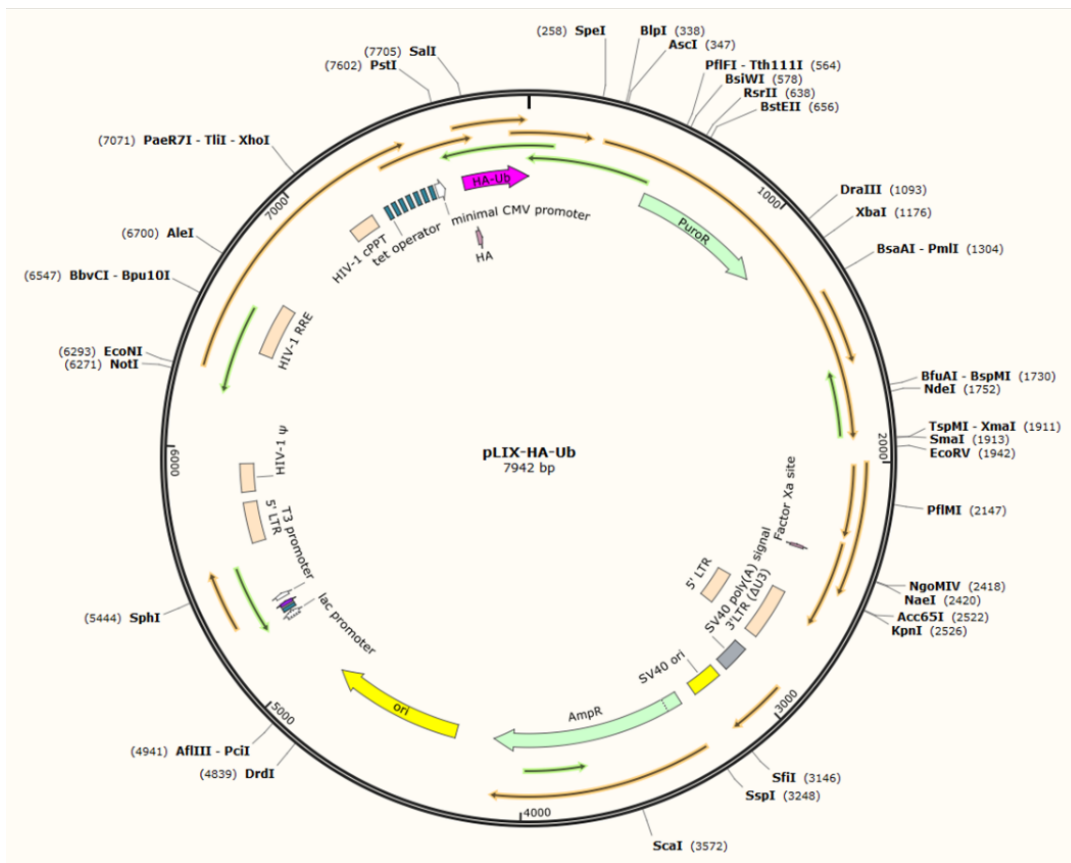
#### 3.2.11.1. Subkloniranje konstrukta HA-Ub-WT u lentivirusni vektor pLIX\_Kan\_PstI

HA – Ub - WT ORF subkloniran je iz pRK5 – HA – Ubiquitin - WT plazmida (pRK5-HA-Ubiquitin-WT ustupljen od strane Teda Dawsona (Addgene plasmid # 17608; [http://n2t.net/addgene:17608;RRID:Addgene\\_17608](http://n2t.net/addgene:17608;RRID:Addgene_17608)) u pLIX\_Kan-PstI lentiviralni vektor s doksiciklin-inducibilnom ekspresijom transgena, ustupljenog od strane dr. Martina Messerlea (Institut za virologiju, Medicinski fakultet Hannover, Hannover, Njemačka) [256, 257]. pLIX\_Kan\_Pst vektor pocijepan je s PstI/BamHI enzimima kako bi se KanR kazeta (koja omogućuje rezistentnost na kanamicin) izbacila i zamijenila HA-Ub-WT ORF sekvencama umnoženima pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR; engl. *polymerase chain reaction*) [prednja početnica: 5'-CGCCTGGAGAATTGGCTGCAGCCCCGAACCGACAGTCGGT-3' (G dodan da se očuva PstI mjesto) i stražnja početnica 5'-AAGGCGCAACCCCAACCCCGTCAACCACCTCTGAGACGG -3']. Specifične početnice dizajnirane su prema sekvencama originalnog plazmida pRK5-HA-Ubiquitin-WT, s time da se na krajeve fragmenata dodalo 15 - 30 baza homolognih s bazama na krajevima lineariziranog pLIX\_Kan - PstI vektora. Kloniranje je provedeno koristeći NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (kat. br. E5520S; New England Biolabs Inc., SAD), prema uputama proizvođača.

Pocijepani pLIX\_Kan - PstI i amplificirani HA-Ub-WT ulomci (inserti) nanoseni su na 0,8 % agarozni gel pomoću boje za nanošenje na gel (Purple 6x), kako bi se elektroforezom u gelu agaroze provjerila duljina dobivenih produkata. Agaroznom gelu je, također, bila dodana fluorescentna boja za detekciju DNA (GelStar Nucleic Acid Gel Stain). Elektroforeza u agaroznom gelu vožena je na 120 V (uređaj nanoPac 300, Cleaver Scientific Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo) nakon čega su DNA fragmenti u gelu bili vizualizirani na transiluminatoru Clear View UV Transiluminator (Cleaver Scientific Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo). Nakon što je veličina provjerena, fragmenti i linearizirani vektor izrezani su skalpelom iz gela, prebačeni u 1,5 mL epruvete i purificirani NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitom prema uputama proizvođača. Koncentracija izoliranih DNA izmjerena je na BioDrop Duo spektrofotometru (BioDrop Technologies, Ujedinjeno kraljevstvo) pri valnoj duljini 260 nm (A260) i izražena je u ng/μl odnosno u μg/μl.

Nakon izmjerenih koncentracija, u omjeru 1 : 1,5 pripremljene su količine umetka (HA-Ub-WT) i lineariziranog pLIX\_Kan-PstI vektora za reakciju kloniranja. Omjer je prethodno bio izračunat koristeći *web alat* NEBicalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>, pristup poveznici zadnji put 9. 4. 2025.) prema uputstvima navedenim u protokolu. Općenito, za cjelokupnu reakciju kloniranja uvjeti su prilagođeni prema uputama proizvođača koristeći NEBuilder HiFi DNA Assembly kit za kloniranje. Kao negativna kontrolna reakcija korišten je linearizirani vektor bez dodanog inserta, a sama pozitivna kontrola

dobivena je unutar navedenog kita. Reakcije su napravljene u ukupnom volumenu od 20  $\mu\text{l}$  i inkubirane 15 minuta na 50  $^{\circ}\text{C}$ . Konačni plazmid (slika 9) korišten je za transformaciju *E. coli* bakterija.



Slika 9. Predvideni Ub-HA konstrukt u Plix lentiviralnom vektoru korišten za proizvodnju NIH3T3 HA-Ub stabilne stanične linije.

### 3.2.11.2. Transformacija bakterije *Escherichia coli* toplinskim šokom, nasađivanje odabranih bakterijskih kolonija i izolacija plazmidne DNA

Alikvoti bakterijskih stanica od 50  $\mu\text{l}$  (NEB 5-alpha kompetentne *E. coli*, New England Biolabs, SAD) transformirani su s 2  $\mu\text{l}$  produkta pojedine NEBuilder HiFi reakcije (slika 9) (pLIX\_HA-Ub-WT, negativna i pozitivna kontrola). Nakon toga alikvoti bakterija inkubirani su najprije 30 minuta na ledu te potom 10 - 30 sekundi na 42  $^{\circ}\text{C}$  u vodenoj kupelji (tzv. "heat shock"). Transformirane bakterije prenesene su u epruvete za uzgoj bakterija s dodatnih 950  $\mu\text{l}$  SOC medija i inkubirane 1 h na 37  $^{\circ}\text{C}$  u tresilici za bakterije (KS 4000 ic control, IKA, Njemačka). Nakon inkubacije, 50 - 100  $\mu\text{l}$  transformiranih bakterija nanoseno je na LB ploče koje su zatim inkubirane preko noći na 37  $^{\circ}\text{C}$ . Od naraslih bakterijskih kolonija (na pločama s nasađenim bakterijama transformiranima s pLIX-HA-Ub-WT) odabrano je otprilike 10 kolonija koje su potom preko noći inkubirane na 37  $^{\circ}\text{C}$  u 4 ml LB tekućeg medija s dodatkom ampicilina. Iz dobivenih

bakterijskih kultura dio je pohranjen u 30 % glicerolu na -80 °C dok je iz preostalog dijela kulture izolirana plazmidna DNA koristeći NucleoSpin Plasmid (Mini kit for plasmid DNA) prema uputama proizvođača. Nakon izolacije izmjerena je koncentracija DNA kao što je prethodno objašnjeno. Integritet svih kloniranih sekvenci bio je provjeren reakcijama cijepanja odabranim restriktivnim enzimima te sekvenciranjem (GATC Biotech, Njemačka) onih koje su se pokazale pozitivne nakon restrikcije.

### **3.2.11.3. Proizvodnja lentivirusa s izražajem HA-Ub-WT transgena i NIH3T3 HA-Ub stanične linije**

Konstruirani lentivirusni plazmid pLIX-HA-Ub-WT (slika 9) korišten je za proizvodnju stanične linije koju smo nazvali NIH3T3-HA-Ub, a izražava HA-Ub-WT konstrukt u doksiciklinom stimuliranim stanicama. U tu svrhu je najprije trebalo proizvesti lentivirusne čestice koje izražavaju HA-Ub-WT konstrukt. Za proizvodnju lentivirusa, 5 µg pLIX-HA-Ub-WT pomiješano je s 10 µg p8.91 (ustupljen od dr. Simona Davisa (Addgene plazmid # 187441; <http://n2t.net/addgene:187441>; RRID:Addgene\_187441) (Sušac et al Cell, 2022) i 0,5 µg plazmida p-CMV-VSV-G (ustupljen od dr. Boba Weinberga (Addgene plazmid # 8454; <http://n2t.net/addgene:8454>; RRID:Addgene\_8454) (Stewart et al RNA 2003) u 1,5 ml Optimema (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD; (kat. br. 31-985-070)). S druge strane, pripremljena je i otopina u kojoj je u 1,5 ml Optimema dodan 41 µl Lipofectamina 3000. Nakon miješanja ovih otopina, konačna smjesa dodana je kap po kap u Petrijeve zdjelice od 10 cm u kojima su se prethodno uzgojene HEK293T stanice (American Type Culture Collection, klon A31, ATCC CRL-3216, Manassas, VA, USA), do 80 - 85% konfluentnosti, u 10% FBS DMEM-u bez antibiotika. Supernatanti stanične kulture s lentivirusom sakupljeni su nakon 24 h, 30 h i 48 h, centrifugirani (5 min, 2000 okretaja u minuti), filtrirani pomoću 0,45 µM filtera i korišteni za transdukciju NIH3T3 stanica. NIH3T3 HA - Ub stanice su u konačnici selekcionirane nakon kultivacije u 10 % DMEM - s puromicinom (2,5 µg/ml) kao selekcijskim markerom.

### **3.2.12. Analiza MCMV rasta i izlaska virusnih čestica u in vitro uvjetima**

Za usporedbu količine proizvedenih virusnih čestica, MEF i Balb3T3 stanice su uzgojene u pločama za kulturu tkiva s 24 jažice (približno  $9 \times 10^4$  stanice po jažici) te inficirane wt MCMV-om (1 PFU/stanici). U vremenima 0 hpi, 4 hpi i 48 hpi stanice su isprane tri puta s 10 % DMEM medijem i dodan im je svježi medij koji je sadržavao 15 µM PYR-41, i inkubacija je nastavljena sljedeća četiri dana. Supernatanti inficiranih kultura sakupljeni su svakodnevno tijekom ta četiri dana infekcije (24, 48, 72 i 96 hpi) i uvijek su nakon sakupljanja očišćeni od staničnih ostataka kratkim centrifugiranjem na 300 x g 5 min (centrifuga Eppendorf, Eppendorf, Njemačka). Potom su zaleđeni na -80 °C do analize kvantifikacije oslobođenih viriona. Zajedno sa prikupljanjem supernatana, preostale inficirane stanice odlijepljene su na ploči kratkim tretmanom s tripsinom, resuspendirane u 1 mL svježeg medija i podvrgnute trima ciklusima smrzavanja i



odmrzavanja kako bi se naposljetku mogli kvantificirati unutarstanični virioni. Kvantifikacije su provedene testom virusnih plakova na MEF stanicama. Stanicama su dodani serijski razrijeđeni prikupljeni supernatanti ili razrijeđeni uzorci stanica, koji su nakon centrifugiranja inkubirani tijekom 4 sata u CO<sub>2</sub> inkubatoru na 37 °C. Stanice su zatim prekrivene viskoznim metil-celuloznim medijem te inkubirane kroz 4 dana, nakon čega su plakovi prebrojani na invertnom mikroskopu (Olympus DP50 CKX41, Olympus Optical Company, Japan). Svaki eksperiment bio je ponovljen 3 - 4 puta.

### **3.2.13. Statistička analiza i obrada podataka**

U svrhu ispitivanja učinka virusa, kao i različitih ciljanih inhibicija regulatornih staničnih molekula i procesa na izražaj ispitivanih proteina u različitim kinetičkim studijama, kao i za uspoređivanje stupnja kolokalizacija, eksperimenti su bili neovisno napravljeni najmanje tri puta, te prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistička značajnost je testirana parametrijskim Student t-testom uporabom Microsoft Office Excel programa (Microsoft, SAD). Za određivanje statističke značajnosti kod testa virusnih plakova iznimno je korišten Mann–Whitney (U) test (MedCalc, version 19.7.2). Statistički značajna razlika određena je na temelju p vrijednosti, tako da u slučajevima kada je  $p < 0,05$ , postoji statistička značajnost. Izračunata značajnost prikazana u svakom grafikonu kategorizirana je prema broju zvjezdica (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Ilustracije su napravljene u programu BioRender.com (Toronto, Ontario, Kanada).

## 4. REZULTATI

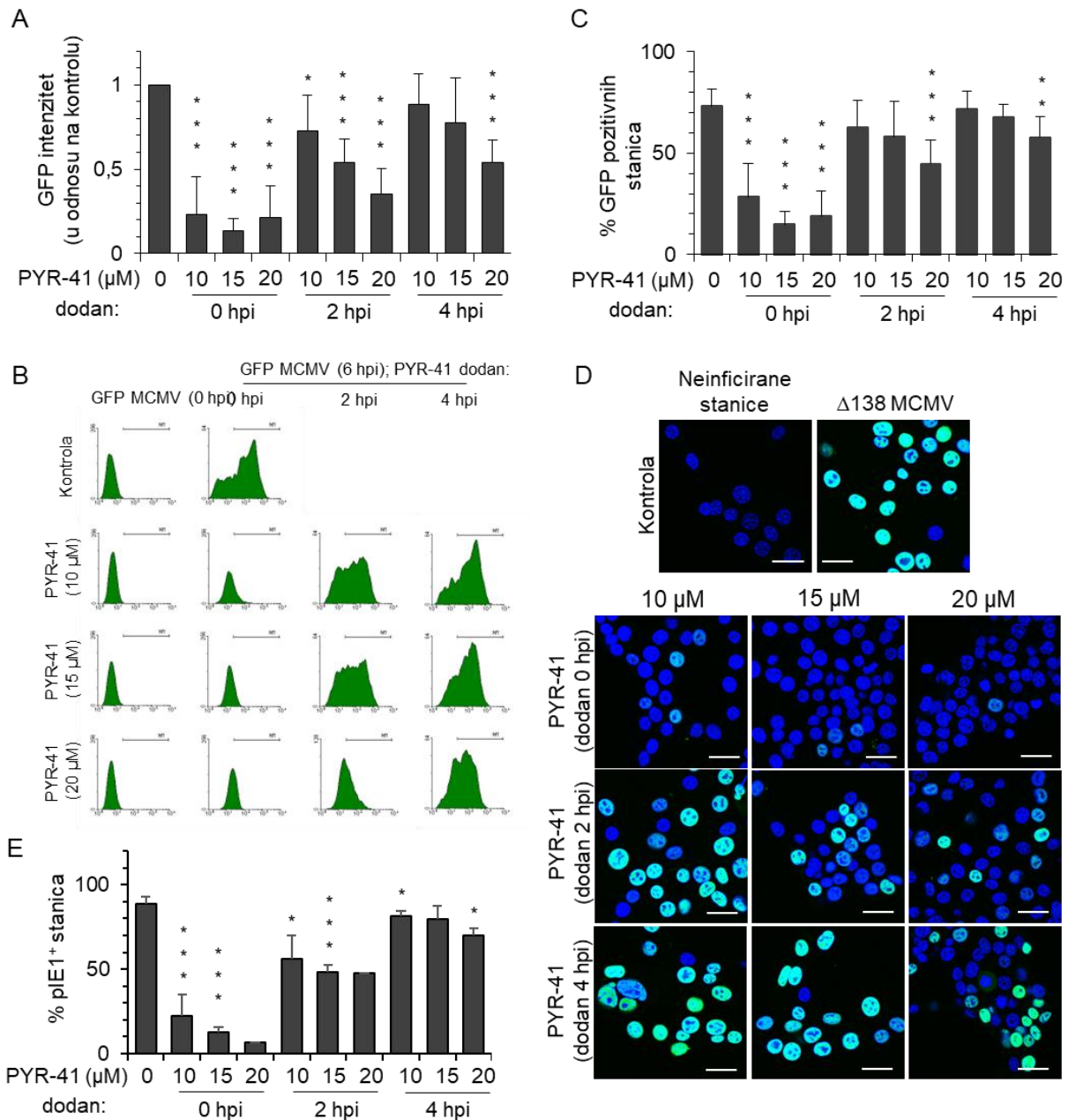
### 4.1. Ubikvitinilacija u uspostavi MCMV infekcije i odvijanju virusnog replikacijskog ciklusa

Ubikvitinilacija je bitna u mnogim staničnim procesima koji reguliraju endosomalno prometovanje, imunološke reakcije i virusne infekcije, a mehanizmi njezinog djelovanja se intenzivno istražuju (odjeljak 1.2.1. i 1.2.2.). Kako bismo ispitali ulogu ubikvitinilacije u MCMV infekciji, ubikvitinski sustav smo inhibirali koristeći PYR-41 (4[4-(5-nitro-furan-2-il-metilen)-3,5-dioekso-pirazolidin-1-il]-benzojeve kiseline etil ester) ireverzibilni i stanično permeabilni inhibitor enzima koji aktivira ubikvitin (E1) [258]. S obzirom na to da aktivacija E1 predstavlja prvi korak u procesu ubikvitinilacije, a kod sisavaca je otkriven samo jedan esencijalni E1 protein [259, 260], PYR-41 snažno koči ubikvitinilaciju proteoma u tretiranim stanicama, a time inhibira i mnoge stanične procese. Navedeni inhibitor smo koristili u svrhu utvrđivanja uloge ubikvitinilacije u procesu razvoja i održavanja AC-a. Međutim, najprije smo morali ispitati njegov učinak na uspostavljanje MCMV infekcije, napredovanje replikacijskog ciklusa MCMV-a i ukupni učinak na proizvodnju viriona.

#### 4.1.1. Učinak PYR-41 inhibitora na uspostavljanje MCMV infekcije

Kako bismo uspostavili protokol i najbolju koncentraciju inhibitora za primjenu u daljnjim eksperimentima, MCMV inficirane NIH3T3 stanice tretirali smo 10, 15 i 20  $\mu$ M koncentracijom PYR-41 u različitim vremenima infekcije. Učinak inhibitora na uspostavljanje infekcije smo ispitali koristeći dva pristupa. Prvi pristup je podrazumijevao upotrebu rekombinantnoga MCMV C3X-GFP-MCMV-a (MCMV-GFP) koji u inficiranim stanicama izražava GFP, a drugi pristup je uključivao izravno praćenje izražaja proteina neposredno – rane faze infekcije pIE1, produkta gena m123 te pokazatelja uspješnog ulaska MCMV-a u stanicu i započinjanja virusnog replikacijskog ciklusa.

Infekcija stanica C3X-GFP-MCMV (MCMV-GFP) rekombinantnim virusom, u kojem je GFP gen umetnut uzvodno od gena ie2 i nalazi se pod kontrolom HCMV-MIEP-a (glavni promotor neposredno ranih gena HCMV-a, engl. *major immediate early promotor*) [247], rezultira ekspresijom GFP-a u zaraženoj stanici. Intenzitet GFP izražaja (slike 10A i 10C) te zastupljenost GFP-pozitivnih stanica u populaciji (slika 10B) kvantificirali smo na razini pojedinačne stanice metodom protočne citometrije. Rezultat pokazuje da je tretman stanica sa sve tri različite koncentracije PYR-41 u trenutku infekcije (0 hpi) rezultirao gotovo potpunim gašenjem izražaja GFP-a, što je utvrđeno praćenjem i kvantifikacijom fluorescentnog signala protočnom citometrijom 6 hpi (slike 10A i 10C). Izrazito slab fluorescentni signal mogao se detektirati u relativno malom udjelu stanica (između 15 i 28 % stanica; slike 10A-C).



**Slika 10. Inhibitor ubiquitinacije PYR-41 snažno utječe na infekciju NIH3T3 stanica MCMV-om.** NIH3T3 fibroblasti tretirani su naznačenim koncentracijama PYR-41 dodanih 0 hpi (zajedno s virusom), 2 hpi ili 4 hpi C3X GFP MCMV (10 MOI). Nakon 6 hpi, izražaj GFP-a određen je protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao (A) grafovi intenziteta fluorescencije (MFI, engl. *mean fluorescence intensity*) GFP-a normaliziranog prema kontroli (stanice zaražene MCMV-om, ali netretirane) ili (C) postotak GFP-pozitivnih stanica. (B) Osim toga, prikazani su reprezentativni profili histograma dobiveni protočnom citometrijom. (D) NIH3T3 stanice tretirane su naznačenim koncentracijama PYR-41 i zaražene Δ138 MCMV (10 MOI) u naznačenim vremenskim točkama. Nakon 6 hpi, stanice su fiksirane, permeabilizirane i izražaj pIE1 (zeleno) detektiran je zajedno s DAPI. (E) Rezultati su prikazani kao postotak prebrojanih pIE1-pozitivnih stanica (srednja vrijednost ± SD šest neovisnih pokusa, 10 vidnih polja po

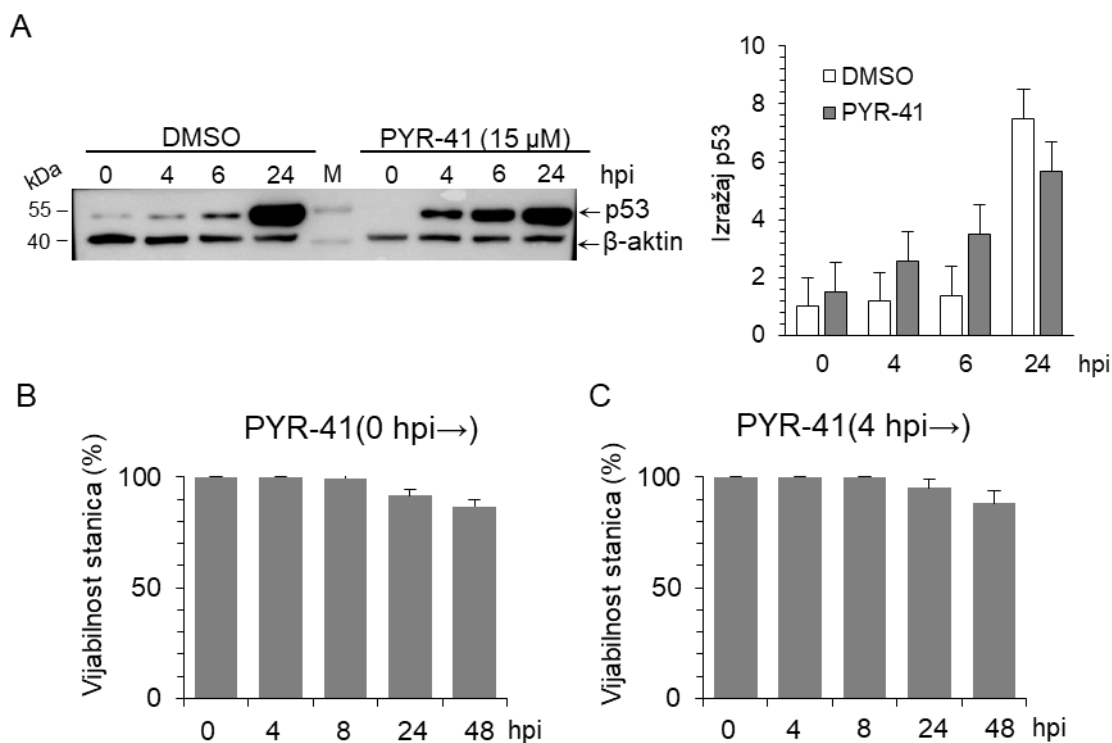
pokusu). Statistička značajnost određena je dvostranim sparenim Studentovim t-testom (\*\*p < 0,001; \*p < 0,01; \*p < 0,05).

. Stoga ovi podaci ukazuju na to da je funkcionalni ubikvitinilacijski sustav stanice domaćina potreban za uspostavljanje infekcije i započinjanje transkripcije genoma MCMV-a. Dodavanje PYR-41 2 hpi dalje je uzrokovalo smanjenje izražaja GFP-a ovisno o koncentraciji inhibitora, 10 i 15  $\mu\text{M}$  PYR-41 doveo je do smanjenja izražaja GFP-a za oko 25 – 40 %, dok je 20  $\mu\text{M}$  koncentracija smanjila izražaj za više od 60 % (slike 10A-C), sugerirajući da inhibicija Ub sustava u ovoj fazi i dalje blokira izražaj gena IE faze i progresiju u E fazu infekcije. Dodavanje PYR-41 nakon izražaja  $\beta 2$  podskupine E gena (4 hpi), imalo je vrlo mali učinak na sintezu GFP-a pri koncentracijama od 10 i 15  $\mu\text{M}$  ( smanjenje izražaja za 10 – 20 %) (slika 10A i 10B). Koncentracija od 20  $\mu\text{M}$  je kočila izražaj GFP-a u živim stanicama (smanjenje izražaja za oko 40 %) (slika 10A i 10B), međutim gotovo polovica stanica izražavala je i propidij jodid (biljeg mrtvih stanica) (podatci nisu pokazani), ukazujući da se radi o graničnoj koncentraciji.

S obzirom na heterogenost staničnu heterogenost NIH3T3 stanične linije i neusklađenost u napredovanju kroz E fazu infekcije, analizirali smo izražaj pIE1 i izravno, metodom imunofluorescencije (slike 10D i 10E). U PYR-41 netretiranim, ali stanicama inficiranim MCMV-GFP rekombinantnim virusom, pIE1 je detektiran u 90 % stanica, što je u skladu s razinom infekcije uočenom u prethodnim studijama pri MOI 10 [89, 261]. U skladu s gore prikazanim rezultatima, nakon infekcije MCMV-GFP rekombinantnim virusom (slike 10A – C), tretman stanica s PYR-41 nakon 2 hpi, ali ne i nakon 4 hpi, smanjio je udio pIE1 – pozitivnih stanica ( smanjenja izražaja GFP-a za 40 – 50 % ovisno o koncentraciji) (slike 10D i 10E). Stoga ovi rezultati zajednički ukazuju da primjena inhibitora PYR-41 u trenutku dodavanja virusa snažno koči infekciju. Međutim ako je inhibitor ubikvitinilacije bio dodan 4 hpi, učinak na izražaj MCMV gena neposredno – rane faze je slab.

Funkcionalnost PYR-41 inhibitora u koncentraciji od 15  $\mu\text{M}$  potvrdili smo praćenjem izražaja proteina p53. Naime, poznato je da PYR-41 uzrokuje nakupljanje p53 [259] u stanicama. Praćenjem izražaja p53 u MCMV inficiranim NIH3T3 stanicama tretiranim PYR-41 pokazali smo kako inhibitor uistinu uzrokuje povećanje njegovog izražaja (slika 11A). Pojačan izražaj p53 u kontrolnim stanicama (inficirane ali netretirane PYR-41 inhibitorom), uočljiv 24 hpi, već je ranije opisana pojava koja se događa kao posljedica CMV infekcije [262]. U inhibitorom tretiranim wtMCMV inficiranim NIH3T3 stanicama dolazi do postupnog nakupljanja p53 nakon dodavanja inhibitora (2 hpi) koje se nastavlja sve do kraja rane faze infekcije. Kako bismo potvrdili pouzdanost rezultata nakon korištenja PYR-41, provjerili smo vijabilnost stanica nakon dulje primjene inhibitora. Brojanjem tripanskim modrilom obojanih mrtvih stanica nakon infekcije MCMV-om i tretmana 15  $\mu\text{M}$  PYR-41 utvrdili smo kako ta koncentracija inhibitora ipak dopušta

dobro preživljavanje stanica do kasnih faza infekcije (90 – 95 % vijabilnih stanica) (slike 11B i 11C), što nije bio slučaj nakon korištenja koncentracije od 20  $\mu\text{M}$  (samo oko 50% vijabilnih stanica (nije prikazano)).



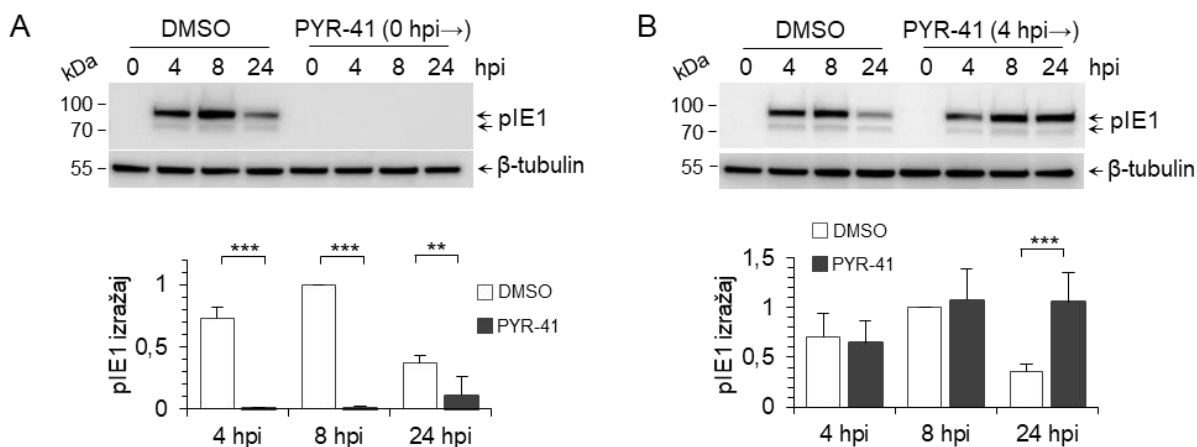
**Slika 11. PYR-41 povećava izražaj p53 u tretiranim stanicama.** (A) NIH3T3 stanice su zaražene wtMCMV-om (10 MOI), a PYR-41 (15  $\mu\text{M}$ ) je dodan 2 hpi. Nakon izolacije proteina u naznačenim vremenskim točkama, elektroforeze u denaturirajućim uvjetima te transfera na membranu, provedena je imunodetekcija p53 kemiluminiscencijom.  $\beta$ -aktin je korišten kao kontrola nanosa. Signali su analizirani u ImageJ programu i normalizirani prema kontroli nanosa. Graf prikazuje promjenu izražaja p53 u odnosu na početno vrijeme u kontrolnim uzorcima. Srednje vrijednosti  $\pm$  SD dva neovisna pokusa prikazane su na grafovima. (B-C) NIH3T3 stanice su zaražene wtMCMV-om (10 MOI), a PYR-41 (15  $\mu\text{M}$ ) je dodan 0 hpi (B) ili 4 hpi (C). Mrtve stanice obojene su tripanskim modrilom te prebrojane na svjetlosnom mikroskopu. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD iz tri neovisna eksperimenta za PYR-41 dodan pri 0 hpi i deset neovisnih eksperimenata za PYR-41 dodan 4 hpi.

#### 4.1.2. Učinak PYR-41 na kinetiku izražaja i ubikvitinilacije pIE1

Kako bismo bolje razumjeli značaj ubikvitinilacije u kontroli replikacije MCMV-a, u sljedećem koraku željeli smo detaljnije ispitati učinak njezinog kočenja na izražaj i moguću funkciju pIE1 proteina tijekom rane i početka kasne faze replikacijskog ciklusa MCMV-a.

#### 4.1.2.1 Učinak PYR-41 na izražaj pIE1 u ranoj i kasnoj fazi MCMV infekcije

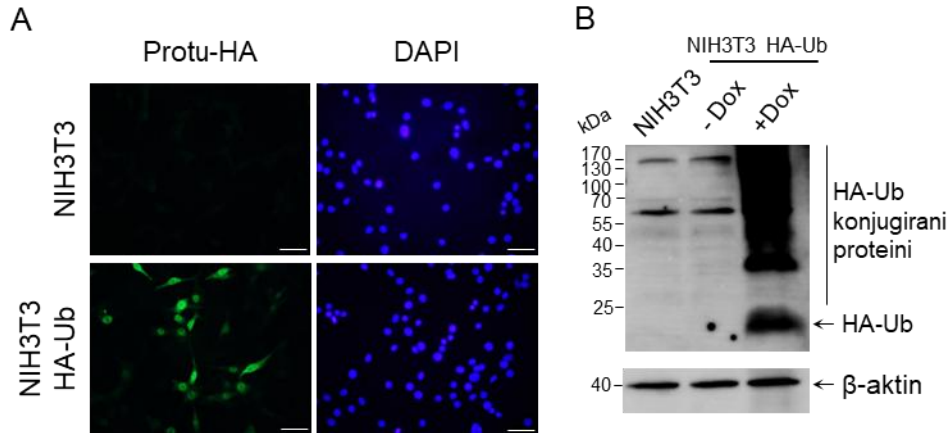
Na temelju dobivenih podataka, u daljnjim smo pokusima koristili koncentraciju PYR-41 od 15  $\mu$ M, kod koje je vijabilnost zaraženih stanica ostala zadovoljavajuća sve do 48 hpi (slika 11B i 11C). Kinetiku izražaja pIE1 smo pratili western blotom u kinetikama 0 hpi, 4 hpi, 8 hpi i 24 hpi, u kontrolnim stanicama (DMSO) i nakon tretmana s PYR-41 dodanog zajedno s virusom (0 hpi), te 4 hpi. U inficiranim stanicama bez dodatka inhibitora, izražaj pIE1 dosegnuo je plato nakon 8 hpi te se smanjio nakon 24 hpi (slike 12A i 12B), u skladu s poznatom kinetikom izražaja pIE1 u NIH3T3 stanicama [71, 263]. Tretman stanica s 15  $\mu$ M PYR-41, dodanog istodobno s virusom (0 hpi) očekivano je rezultirao smanjenjem količine pIE1 do ispod razine detekcije western blota, što je prikazano reprezentativnim western blotom (slika 12A, gornji panel) i kvantitativnom analizom pet neovisnih eksperimenata (slika 12A, donji panel). Međutim, kada smo stanice tretirali s 15  $\mu$ M PYR-41 nakon 4 hpi, izražaj pIE1 nakon 8 hpi bio je sličan kao u inhibitorom netretiranim stanicama, ali se naglo povećao nakon 24 hpi (slika 12B), upućujući da primjena inhibitora utječe na razine pIE1 u zaraženim stanicama.



**Slika 12. PYR-41 utječe na kinetiku izražaja pIE1 u stanicama zaraženim MCMV-om.** NIH3T3 stanice su zaražene s wtMCMV-om (10 MOI), a PYR-41 (15  $\mu$ M) je dodan pri 0 hpi (A) ili 4 hpi (B). Nakon izolacije proteina u naznačenim vremenskim točkama, elektroforeze u denaturirajućim uvjetima te transfera na membranu, provedena je imunodetekcija pIE1 i  $\beta$ -tubulina kemiluminiscencijom. Signali dobiveni western blotom su analizirani u ImageJ-u i normalizirani prema izražaju  $\beta$ -tubulina. Grafovi prikazuju kinetiku promjene izražaja pIE1 u odnosu na vremensku točku s najvećim izražajem pIE1 u uzorcima netretiranim inhibitorom. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD od pet (PYR-41 dodan 0 hpi) i sedam (PYR-41 dodan 4 hpi) pokusa. Statistička značajnost između kontrolnih (DMSO (0,06 %) tretiranih) i uzoraka tretiranih PYR-41 u istoj kinetici određena je dvostranim sparenim Studentovim t-testom (\*\*p < 0,001; \*p < 0,01; \*p < 0,05).

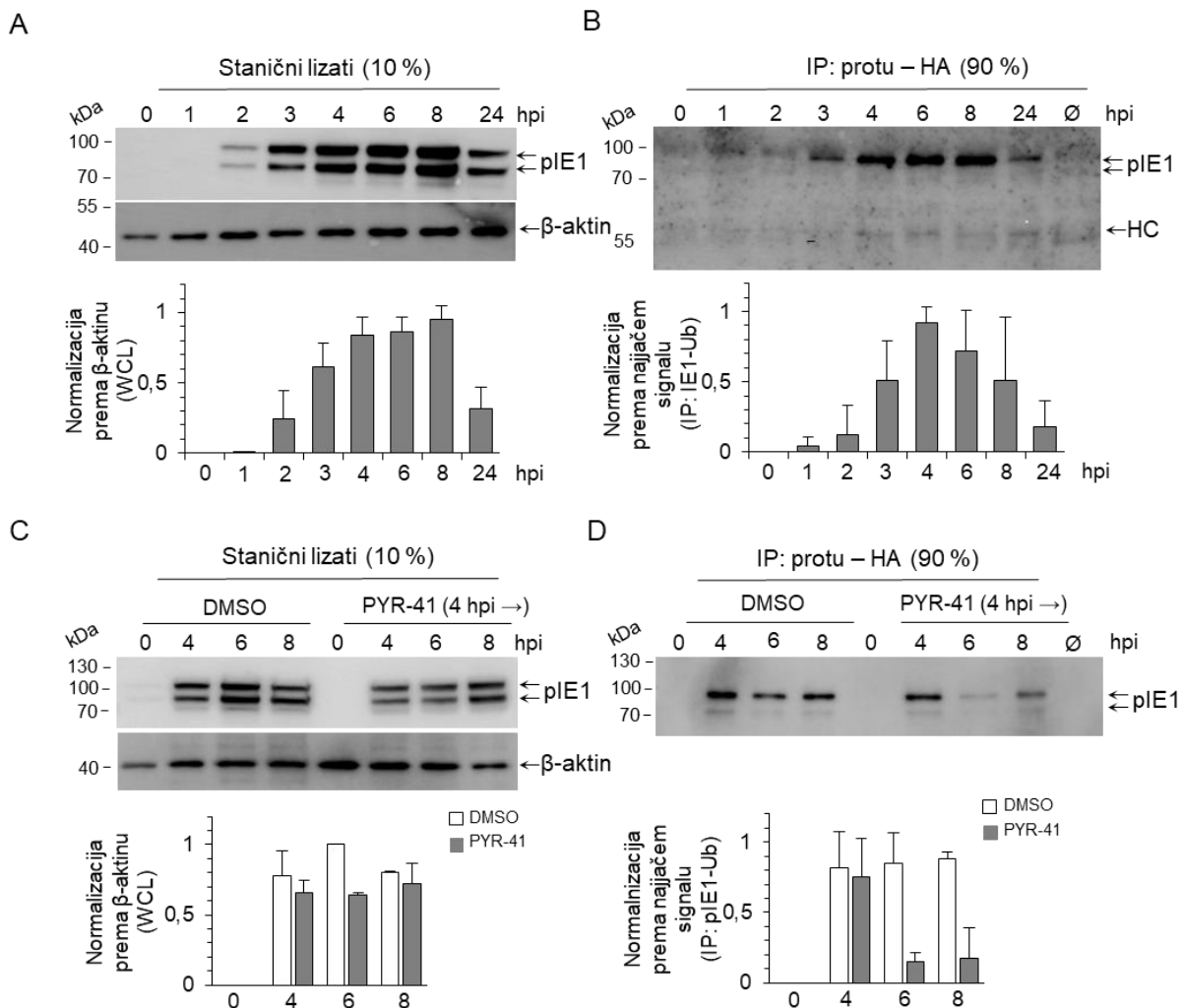
#### 4.1.2.2. Kinetika ubikvitinilacije pIE1 i učinak PYR-41 na ubikvitinilaciju pIE1

Budući da western blot analiza kinetike izražaja pIE1 ukazuje na značaj ubikvitinilacije u mehanizmu koji kontrolira količinu pIE1 u zaraženim stanicama, odlučili smo istražiti da li se i sam pIE1 ubikvitinira tijekom infekcije. U tu svrhu smo generirali NIH3T3 staničnu liniju s inducibilnim izražajem HA-Ub (NIH3T3 HA-Ub) te, nakon indukcije doksiciklinom ( 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , tijekom 48 sati ), potvrdili sintezu HA-Ub konstrukta metodom imunofluorescentne mikroskopije i Western blota (slika 13).



**Slika 13. Stanična linija NIH3T3 HA-Ub s inducibilnim izražajem HA-Ub konstrukata.** NIH3T3 HA-Ub stanice tretirane su doksiciklinom (Dox; 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), a izražaj HA-Ub konstrukta analiziran je nakon 48 sati. (A) HA-Ub na NIH3T3 HA-Ub stanicama vizualiziran je zečjim protu-HA pAb i Alexa Fluor<sup>488</sup>-konjugiranim protu-zečjim sekundarnim protutijelom. Mjerna crta – 50  $\mu\text{m}$  (B) Vizualizacija HA-Ub (očekivani Mr ~10,6 kDa(HA-Ub)) na NIH3T3 i NIH3T3 HA-Ub (sa ili bez Dox) stanicama.

Potom nas je zanimalo, da li se, i kada se pIE ubikvitinilira tijekom MCMV infekcije. Stoga smo NIH3T3 HA-Ub staničnu liniju 48 sati inducirali doksiciklinom u svrhu stimulacije sinteze HA-Ub, nakon čega smo stanice zarazili wt MCMV-om i analizirali izražaj pIE1 western blotom izravno iz staničnih lizata (ukupan izražaj pIE1) (slika 14A) ili nakon imunoprecipitacije proteina zečjim protu-HA protutijelom (ubikvitiniliran pIE1) (slika 14B). U ukupnom lizatu, pIE1 smo vizualizirali 2 hpi, a njegova razina se postupno povećavala kako je E faza napredovala, ali se smanjila na 10 – 20 % maksimalnog signala na početku kasne faze infekcije (24 hpi) (slika 14A). Nakon imunoprecipitacije HA-Ub označenih proteina ubikvitinirani pIE1 detektiran je već 3 hpi i zadržava se u ubikvitiniranom obliku tijekom E faze (slika 14B), što ukazuje na to da zaražena stanica regulira ili količinu ili funkciju pIE1 ubikvitinilacijom. Tretman stanica s PYR-41 nakon 4 hpi nije povećao količinu pIE1 u kinetici 8 hpi (slika 14C), ali je uzrokovao inhibiciju njegove ubikvitinilaciju (slika 14D). Navedeni rezultati ukazuju da se, u inficiranim stanicama, ubikvitinilacija koristi kao mehanizam za regulaciju količinu ili funkcije pIE1, što može biti važno za normalno napredovanje replikacijskog ciklusa MCMV-a.



**Slika 14. pIE1 se ubikvitinira u stanicama zaraženim MCMV-om.** (A-B) NIH3T3 HA-Ub stanice (Dox, 48 h) su inficirane wtMCMV (10 MOI), a uzorci su lizirani u navedenim vremenskim točkama (10 % stanica u RIPA puferu za stanične lizate (WCL, engl. *whole cell lysate*) (A) i 90 % stanica u 1 % NP40 za imunoprecipitate (IP) ubikvitiniranih proteina (B). Nakon izolacije proteina u naznačenim vremenskim točkama, elektroforeze u denaturirajućim uvjetima te transfera na membranu, provedena je imunodetekcija pIE1 i  $\beta$ -aktina kemiluminiscencijom. Signali su analizirani u ImageJ programu, normalizirani prema izražaju  $\beta$ -aktina te izraženi kao normalizacija kontrolnog signala koji predstavlja najjači signal pIE1. Srednje vrijednosti  $\pm$  SD od 7 (WCL) i 4 (IP) pokusa prikazane su na grafovima. (C-D) NIH3T3 HA-Ub (Dox, 48 h) stanice su inficirane s wt MCMV (10 MOI), te je jednom dijelu dodan PYR-41 (15  $\mu$ M) 4 hpi. U navedenim vremenskim točkama, stanice su lizirane u svrhu dobivanja ukupnih staničnih lizata (C) ili za IP ubikvitiniranih proteina (D). Signali su normalizirani prema izražaju  $\beta$ -aktina te izraženi kao normalizacija kontrolnog signala koji predstavlja najjači signal pIE1 u stanicama tretiranim DMSO. Srednje vrijednosti  $\pm$  SD od dva nezavisna pokusa su prikazane na grafovima.

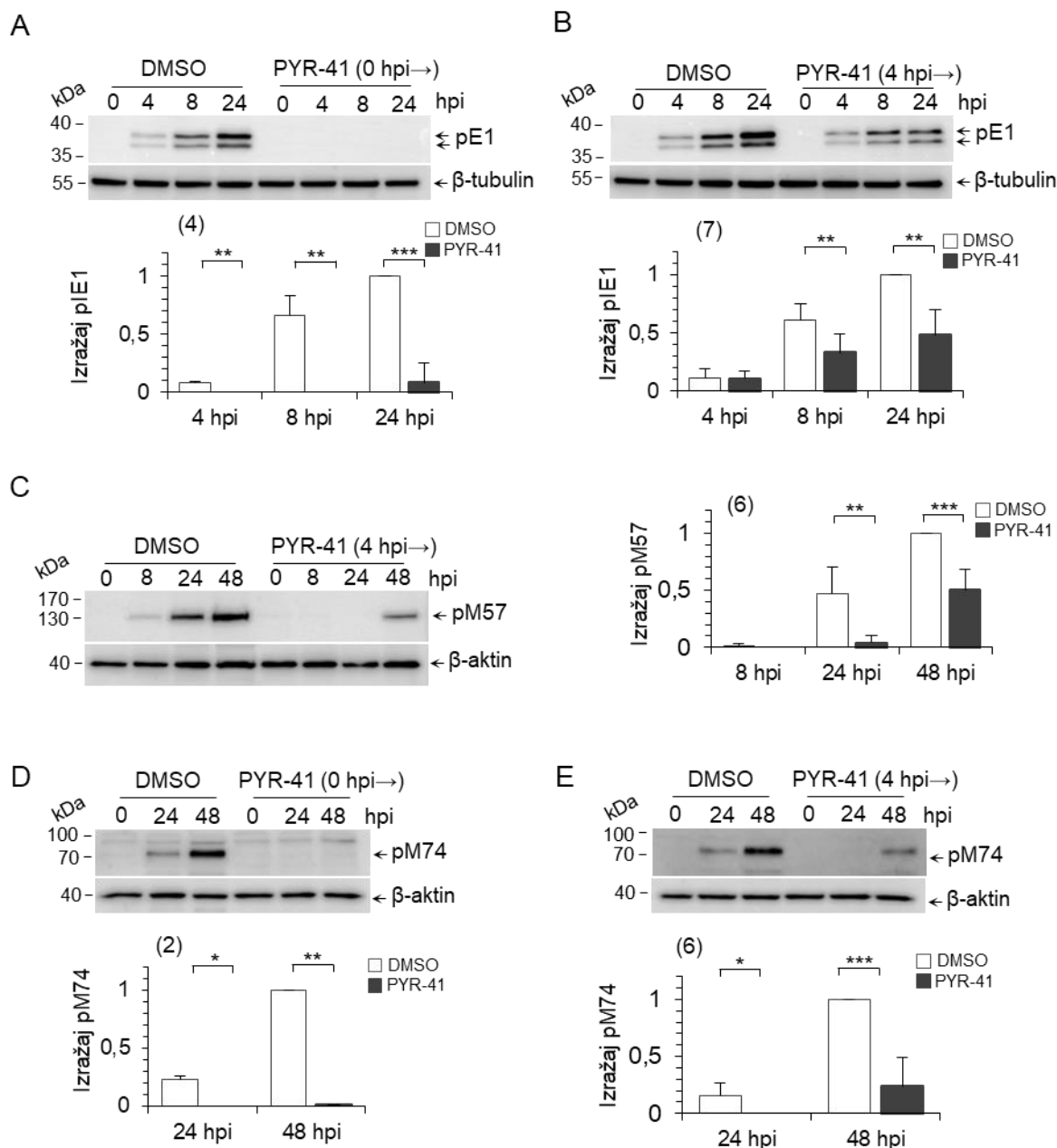


### 4.1.3. Uloga ubikvitinilacije u replikacijskom ciklusu mišjeg citomegalovirusa

Kočenje infekcije MCMV-om nakon djelovanja PYR-41, kao i prisustvo ubikvitiniliranih pIE1 molekula u ranoj fazi infekcije ukazuju na značaj ubikvitinilacije za odvijanje normalnog replikacijskog ciklusa virusa. Stoga smo u sljedećim eksperimentima pratili učinak tretmana inhibitorom ubikvitinilacije na napredovanje replikacijskog ciklusa MCMV-a.

#### 4.1.3.1. Uloga ubikvitinilacije na izražaj proteina rane i kasne faze replikacijskog ciklusa mišjeg citomegalovirusa

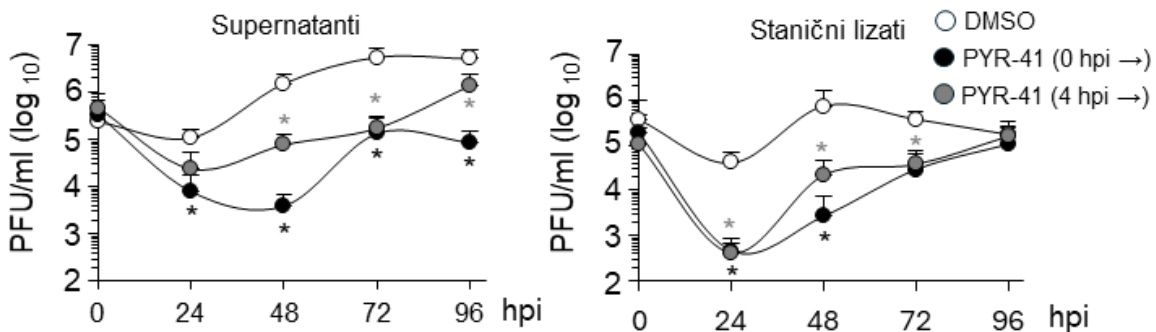
NIH3T3 stanice inficirane su wtMCMV-om te tretirane 15  $\mu$ M PYR-41 (dodan 0 hpi i 4 hpi), ili su ostale netretirane, u svrhu praćenja izražaja reprezentativnih MCMV proteina western blotom. Pored pIE1, koji je ispitan u ranije opisanim pokusima, ispitani su sljedeći proteini: (1) pE1, produkt gena m112 i predstavnik  $\beta$ 1 podskupine E gena, koji djeluje kao organizator nuklearnih replikacijskih centara (NRC, engl. *nuclear replication center*), (2) pM57, glavni virusni protein koji veže DNA, a kodiran je genom M57  $\beta$ 3 podskupine E gena, te (3) pM74 virusni glikoprotein, produkt gena M74 iz  $\gamma$ 1 podskupine L gena [263]. U kontrolnim stanicama (lažno tretiranim, samo DMSO), pE1 je detektiran nakon 4 hpi i nakupljao se kako je E faza napredovala (8 hpi) prema početku L faze (24 hpi), pM57 je bio slabo detektiran nakon 8 hpi, ali se progresivno nakupljao na početku L faze (24 hpi) i u uznapredovaloj L fazi (48 hpi). S druge strane, pM74 se nije bio detektibilan u E fazi, i znatno se vizualizirao tek u L fazi (slika 15D-E, kontrola). Nadalje, u skladu s našim ranijim rezultatima (slika 12), tretman stanica s PYR-41 nakon 0 hpi spriječio je izražaj ispitivanih virusnih proteina, što je prikazano analizom pE1 (slika 15A) i pM74 (slika 15D). S druge strane, iako inkubacija s PYR-41 4 hpi nije u potpunosti spriječila izražaj pE1 (slika 15B), pM57 (slika 15C) i pM74 (slika 15E), ipak je uzrokovala značajno smanjenje njihove sinteze u zaraženim stanicama (slika 15B, 15C i 15E). Ovi rezultati upućuju na to da je ubikvitinilacija bitna za regulaciju izražaja gena MCMV i progresiju kroz replikacijski ciklus te su u skladu s prethodnim zaključcima o njezinoj ulozi u regulaciji IE proteina.



**Slika 15. PYR-41 koči sintezu pE1, pM57 i pM74 proteina MCMV-a.** NIH3T3 stanice su inficirane wt MCMV-om (10 MOI), a PYR-41 (15  $\mu$ M) je dodan pri 0 hpi (A, D) ili 4 hpi (B, C, E). Nakon izolacije proteina u naznačenim vremenskim točkama, elektroforeze u denaturirajućim uvjetima te transfera na membranu, provedena je imunodetekcija pE1 (A-B), pM57 (C) i pM74 (D-E) kemiluminiscencijom.  $\beta$ -tubulin ili  $\beta$ -aktin su korišteni kao kontrola nanosa. Intenziteti signala su analizirani u ImageJ programu i normalizirani prema kontroli nanosa. Vrijednosti su izražene kao „normalizacija prema kontroli“, pri čemu kontrole predstavljaju najjači signal u kontrolnim (DMSO (0,06 %) tretiranim) uzorcima. Srednje vrijednosti  $\pm$  SD prikazane su na grafovima. Statistička značajnost između kontrolnih (DMSO) i uzoraka tretiranih PYR-41 u istoj kinetici određena je Student t-testom (\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ). Broj neovisnih pokusa naveden je u zagradama.

#### 4.1.3.2. Uloga ubikvitinilacije na proizvodnju novih virusnih čestica MCMV-a

Obzirom da je očekivano da smanjen izražaj virusnih gena uzrokuje i smanjenu razinu proizvodnje viriona, u sljedećem pokusu smo proveli standardnu analizu proizvodnje viriona, uspoređujući nastanak plakova između PYR-41 tretiranih i netretiranih stanica. Kao što se uočava na slici 16, inhibicija ubikvitinilacije u NIH3T3 stanicama dodavanjem PYR-41 (15  $\mu$ M) u trenutku infekcije rezultirala je drastičnim smanjenjem broja infektivnih viriona u zaraženim stanicama, kao i viriona oslobođenih iz stanice. Nakon 24 hpi, u staničnom lizatu se virusne čestice gotovo nisu mogle detektirati, a vrlo malo ih je bilo prisutno i u supernatantu. Nakon 48 hpi, količina u potpunosti sklopljenih viriona u stanicama, kao i onih oslobođenih u stanični supernatant gotovo je 300 puta bila niža nego u lažno tretiranim stanicama (slika 16). U kasnijim vremenskim točkama, količina infektivnih viriona u stanicama tretiranim inhibitorom postupno se povećavala te je 96 hpi dosegla kontrolnu razinu (slika 16, stanični lizati). Sličan učinak uočen je i kod dodavanja PYR-41 u stanice 4 hpi, što je rezultiralo 12 puta manjim brojem infektivnih viriona (slika 16). Prema tome, možemo zaključiti da, iako je količina virusnih proteina znatno smanjena u zaraženim stanicama, količina dostupnih proteina je dovoljna za stvaranje novih viriona, iako u manjem broju, odnosno u sporijoj kinetici. Ovi rezultati upućuju na to da je ubikvitinilacija bitna u procesima sklapanja virusnih čestica, ali i mehanizmima koji sudjeluju u oslobađanju viriona.



**Slika 16. Inhibicija ubikvitinilacije ometa stvaranje viriona.** NIH3T3 stanice su inficirane wt MCMV-om (10 MOI), a PYR-41 (15  $\mu$ M) je dodan pri 0 hpi ili 4 hpi. Supernatanti ili stanični lizati sakupljeni su nakon 0, 24, 48, 72 i 96 hpi, a krivulje rasta određene su analizom plakova na mišjim emd+brionalnim fibroblastima. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD iz 3 različita pokusa. Statistička značajnost između kontrolnih (DMSO) i uzoraka tretiranih PYR-41 u istoj kinetici određena je Student t-testom (\*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ).

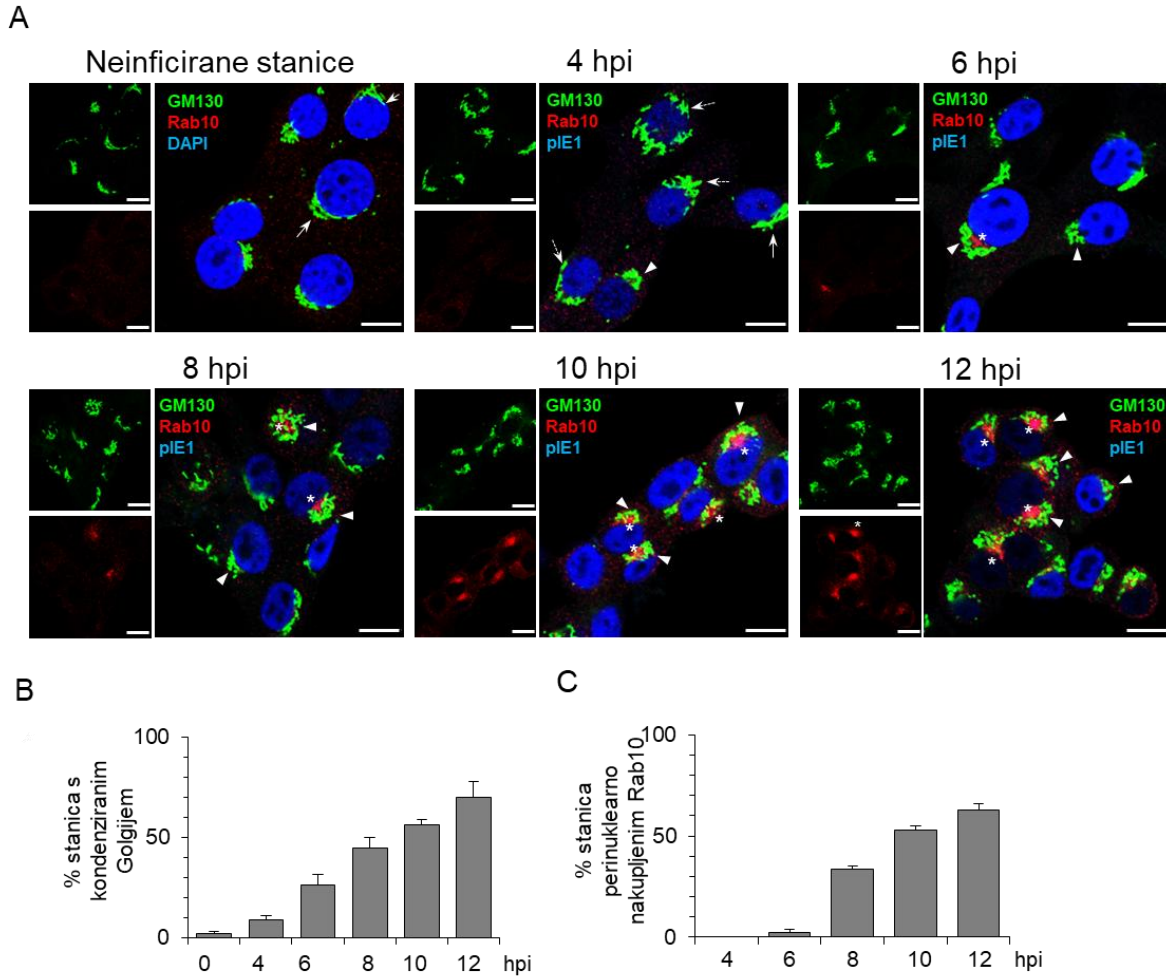
## **4.2. Značaj ubikvitinilacije u procesima reorganizacije membranskog sustava u svrhu nastanka i održavanja odjeljka za sklapanje virusnih čestica**

Jedan od važnih događaja u inficiranoj stanici koji prethodi uspješnom nastanku infektivnih viriona CMV-a je složena reorganizacija unutarstaničnih membrana inficirane stanice, čime nastaje odjeljak za sklapanje virusnih čestica (odjeljak 1.1.1.3.4.). Obzirom da je dinamika prometovanja kroz unutarstanične odjeljke, a posebice ona koja zahtijeva tubulaciju, između ostaloga, ovisna i o ubikvitinilaciji [153, 169, 171], dalje smo istražili važnost funkcionalnih ubikvitinilacijskih procesa u procesima nastanka i održavanja AC – a u MCMV inficiranim stanicama.

### **4.2.1. Značaj ubikvitinilacije u procesu nastanka pre-AC-a**

#### **4.2.1.1. Kinetika razvoja pre-AC u ranoj fazi infekcije mišjim citomegalovirusom**

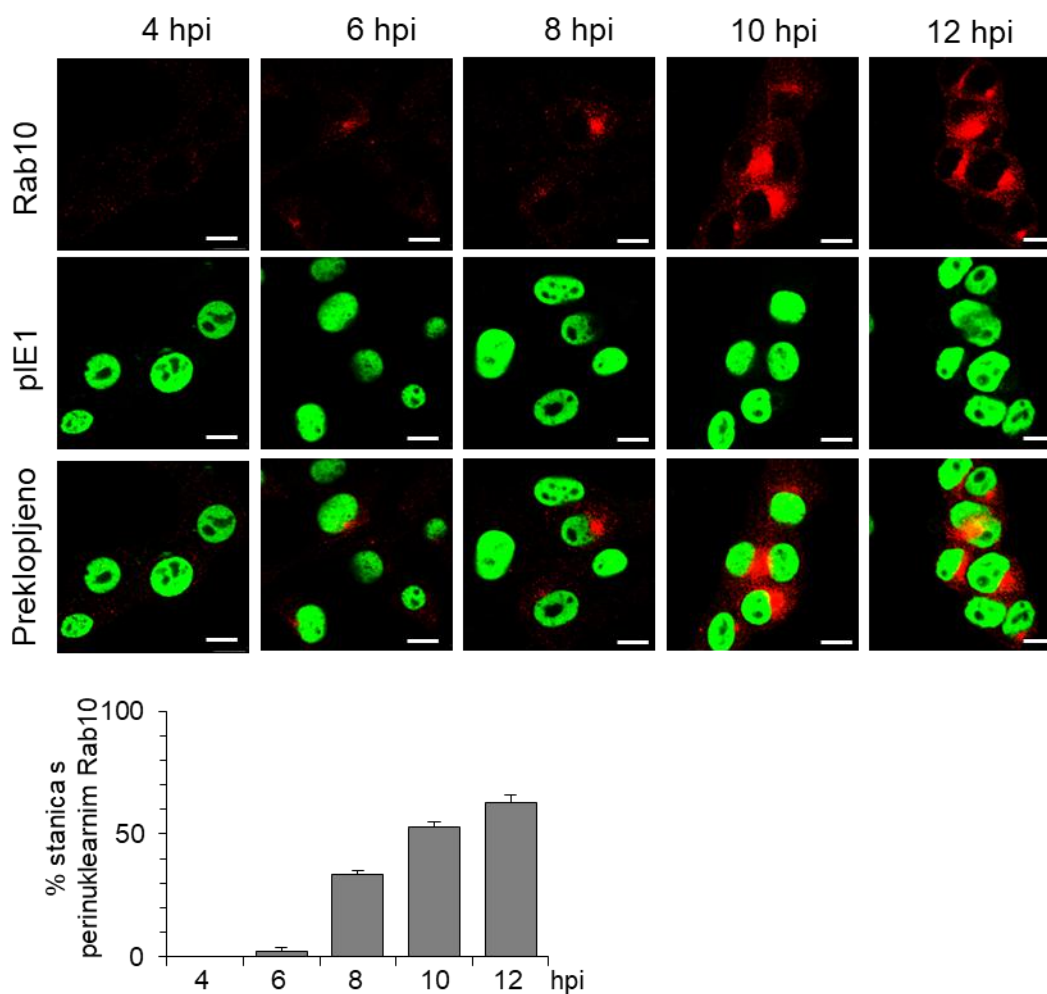
Ranije studije pokazuju da reorganizacija membranskog sustava i uspostavljanje pre-AC-a započinje na početku rane faze infekcije [75, 76, 90, 91, 261]. U Balb3T3 stanicama, osnovna konfiguracija pre-AC-a uključuje dislokaciju Golgijevog aparata, čime nastaje vanjski pre-AC te ekspanziju EE-RE/ERC-TGN odjeljaka, čime nastaje unutarnji pre-AC. Time je ova struktura uspostavljena u većini stanica u razdoblju 5 – 6 hpi, nakon infekcije s MOI 10 [91, 261]. Iako se u NIH 3T3 stanica ovaj proces odvija nešto sporije, osnovna konfiguracija je ista (slika 17). Praćenjem nakupljanja Rab10 i kondenzacije Golgijeva aparata utvrđeno je da je struktura vanjskog AC-a uspostavljena je u 70 % stanica u razdoblju od 8 – 12 hpi (slika 17B). U tim stanicama, reorganizacija Golgijeva aparata započinje 4 hpi, što je prikazano vizualizacijom biljega Golgijevog aparata GM130 u vanjskom pre-AC-u, dok ekspanzija membrana koje sadrže Rab10 (marker endosoma) (Rab10 pozitivnih domena, Rab10-PD) započinje u unutarnjem pre-AC-u nakon 6 – 7 hpi (slika 17A). U ranoj fazi infekcije (4 hpi) dolazi do odvajanja i proširenja Golgijevih cisterni (slika 17A, isprekidane strelice), a kako infekcija odmiče (6 hpi →), dolazi do njihove kondenzacije u području vanjskoga pre-AC-a (slika 17A, vrškovi strelica). Istodobno se u unutrašnjosti strukture počinju nakupljati Rab10-PD (slika 17A, zvjezdice). Do 12 hpi Rab10 PD su nakupljene u području unutarnjeg AC-a u 65 % analiziranih stanica (slika 17C).



**Slika 17. Kinetika stvaranja pre-AC u MCMV inficiranim NIH3T3 stanicama.** (A) NIH3T3 stanice su inficirane s  $\Delta$ FcR MCMV (10 MOI), fiksirane i permeabilizirane prema naznačenoj kinetici. GM130 (zeleno), Rab10 (crveno) i pIE1 su vizualizirani odgovarajućim primarnim i fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelima. DAPI u neinficiranim stanicama (plavo) označava stanične jezgre. Strelice označavaju prošireni Golgijev aparat (pune strelice za normalne Golgijeve cisterne i isprekidane strelice za nepovezane/proširene Golgijeve cisterne), vrhovi strelica označavaju kondenzirani Golgijev aparat, a zvjezdice označavaju perinuklearni Rab10 u pre-AC. (B) Kvantifikacija broja stanica s kondenziranim GM130 u pre-AC. (C) Kvantifikacija broja stanica s kondenziranim Rab10 u pre-AC-u. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD tri neovisna eksperimenta. Mjerna crta – 10  $\mu$ m.

Razlika između rezultata dobivenih na Balb3T3 i NIH3T3 staničnim linijama nije bila povezana s vrstom korištenog virusa, budući da je ista kinetika uočena nakon infekcije rekombinantnim virusom kojem nedostaje gen m138 ( $\Delta$ FcR MCMV) (slika 17) i virusom divljeg tipa (wt MCMV) (slika 18). Gen m138 kodira sintezu proteina koji djeluje kao virusni Fc-receptor i dovodi do nespecifičnog vezivanja protutijela izotipa IgG<sub>2a</sub>, što može dovesti do nespecifičnih rezultata prilikom označavanja proteina metodom imunofluorescencije. Stoga smo u pokusima koji koriste imunofluorescentnu mikroskopiju te zahtijevaju

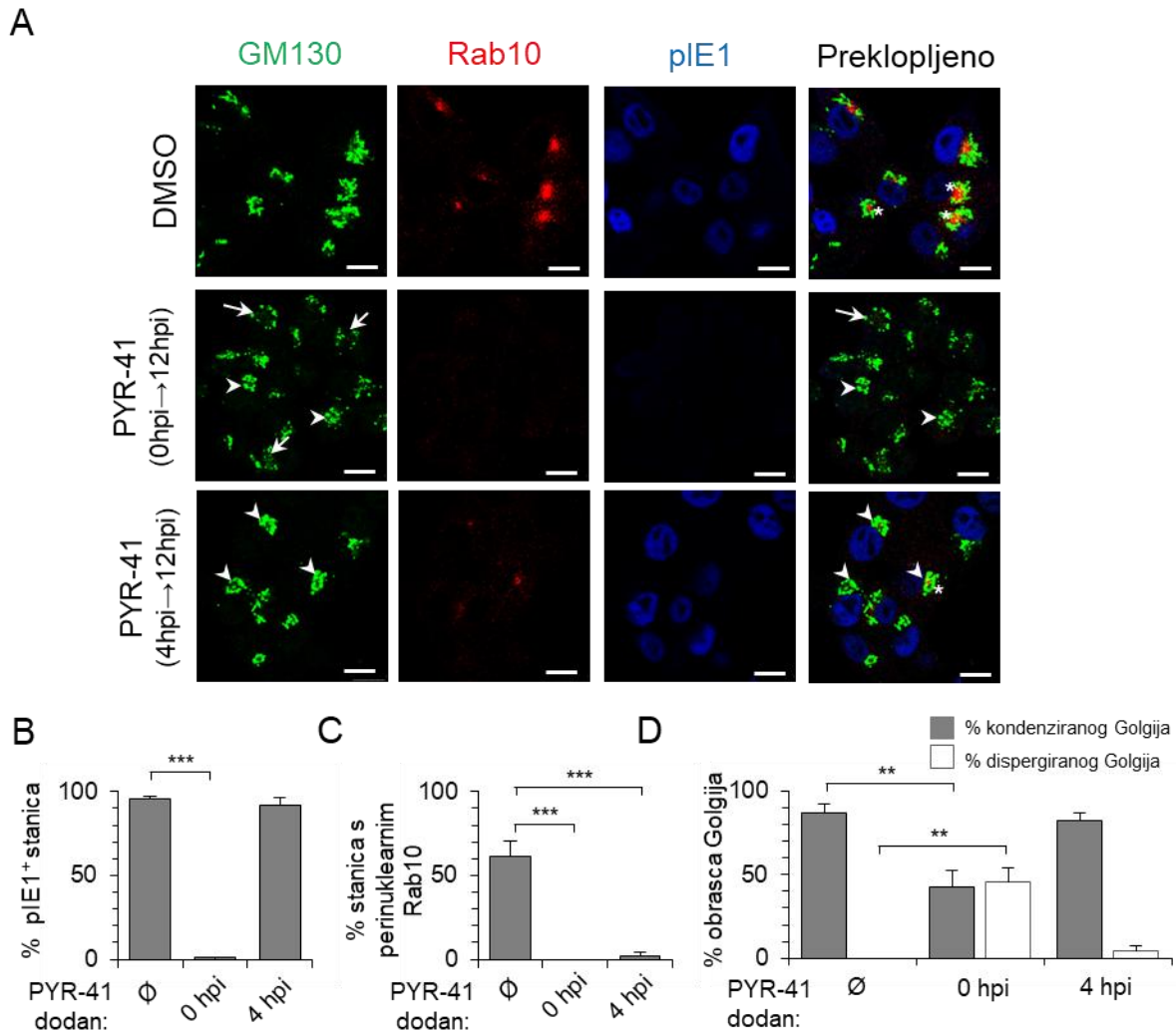
primjenu ovog izotipa protutijela, kao na slici 18, za infekciju koristili  $\Delta$ FcR MCMV. Kako bismo potvrdili da nedostatak gena m138 neće poremetiti proces razvoja pre-AC, ispitali smo kinetiku nakupljanja Rab10 PD i u stanicama inficiranim wt MCMV. Ako usporedimo rezultate dobivene na slikama 17 i 18 možemo vidjeti da nema razlike između stanica inficiranih wt MCMV-om i stanica inficiranih  $\Delta$ FcR MCMV-om. Nadalje, obrazac uspostavljanja osnovne konfiguracije pre-AC u stanicama inficiranim  $\Delta$ FcR MCMV-om u skladu je s prethodno objavljenim analizama na MCMV inficiranim stanicama [90, 91, 261], ali i procesima uočenim u stanicama zaraženim HCMV-om, gdje je cijeli proces mnogo sporiji i traje dva dana [1, 79, 85].



**Slika 18. Kinetika stvaranja pre-AC u NIH3T3 stanicama inficiranim wtMCMV-om.** NIH3T3 stanice su inficirane wtMCMV-om (10 MOI), fiksirane i permeabilizirane prema naznačenoj kinetici. Rab10 (crveno) i pIE1 (zeleno) su vizualizirani odgovarajućim primarnim i fluorescentno obilježenim sekundarnim antitijelima. Kvantifikacija broja stanica s kondenziranim Rab10 u pre-AC-u. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD tri neovisna eksperimenta. Mjerna crta – 10  $\mu$ m.

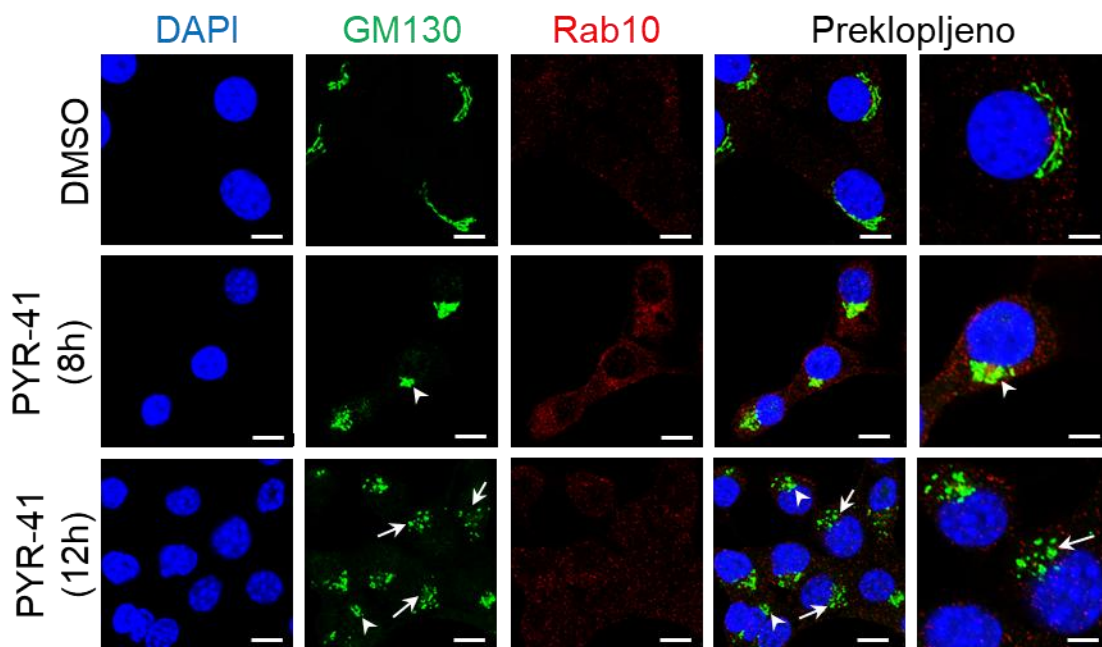
#### 4.2.1.2. Učinak PYR-41 na razvoj pre-AC u ranoj fazi infekcije mišjim citomegalovirusom

U sljedećim pokusima ispitali smo učinak inhibicije stanične ubikvitinilacije na nastanak pre-AC (slike 20 i 21).



**Slika 19. PYR-41 inhibira stvaranje pre-AC-a u stanicama zaraženim MCMV-om.** (A) NIH3T3 stanice su zaražene s  $\Delta$ FcR MCMV (10 MOI), a PYR-41 (15  $\mu$ M) je dodan 0 hpi ili 4 hpi ili je stanicama dodan samo 0,06% DMSO (kontrola). Potom su 12 hpi, stanice fiksirane i permeabilizirane, a GM130 (zeleno), Rab10 (crveno) i pIE1 (plavo) su vizualizirani s odgovarajućim primarnim i fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelima. Strelice označavaju kondenzirani, a vrškovi strelica dispergirani Golgi. Zvezdice označavaju Rab10 u pre-AC-u. Mjerna crta – 10  $\mu$ m. (B-D) Omjer pIE1<sup>+</sup> stanica (B), stanica s perinuklearnim Rab10 (C) i kondenziranih/dispergiranih Golgijevih obrazaca (D) u uzorcima tretiranim PYR-41 i uzorcima netretiranim PYR-41. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD sedam neovisnih pokusa za PYR-41 dodan 4 hpi i tri neovisna pokusa za PYR-41 dodan 0 hpi. Statistička značajnost određena je Student t-testom (\*\*\*) $p < 0,001$ ; \*\*) $p < 0,01$ ; \*) $p < 0,05$ .

U skladu s prethodnim rezultatima, istodobno dodavanje PYR-41 zajedno s virusom (0 hpi), zakočilo je izražaj pIE1 u jezgri (slika 19A i 19B), ali i ekspanziju Rab10-PD (slika 19A i 19C). Ipak, Golgijev aparat bio je fragmentiran i premješten u perinuklearno područje neovisno o tretmanu inhibitorom (slika 19A i 19D). Naime, GM130-pozitivni odjeljci pronađeni su nepovezani (fragmentirani) i kondenzirani u perinuklearnim područjima u polovici stanica ( $42,57 \pm 9,75$  %) (slika 19A, vrhovi strelica) ili raspršeni u malim vezikulama ( $45,7 \pm 8,47$  %) u drugoj polovici stanica (slika 19A, strelice). Iako bi ovaj rezultat ukazivao da vanjski dio pre-AC može nastati neovisno o ubikvitinilaciji, važno je napomenuti da je, nakon osmosatnog tretmana s PYR-41, Golgijev aparat i u neinficiranim stanicama uočen fragmentiran i kondenziran (slično kao u kontrolnim inficiranim stanicama), dok je nakon 12 sati tretmana neinficiranih NIH3T3 stanica inhibitorom u polovici stanica bio fragmentiran, ali i dispergiran (slika 20).



**Slika 20.** Učinak PYR-41 na izražaj Rab10 i GM130 u neinficiranim NIH3T3 stanicama. NIH3T3 stanice tretirane su s PYR-41 ( $15 \mu\text{M}$ ) tijekom 8 ili 12 sati ili su lažno tretirane (kontrola, 0,06 % DMSO). Nakon fiksacije i permeabilizacije, GM130 (zeleno), Rab10 (crveno) i DAPI (plavo) vizualizirani su odgovarajućim primarnim i fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelima. Vrškovi strelica označavaju kondenzirani, a strelice dispergirani Golgijev aparat. Mjerna crta -  $10 \mu\text{m}$ .

Prema tome, izgleda da je fragmentacija Golgija posljedica nefunkcionalne ubikvitinilacije, čak i u neinficiranim stanicama. Stoga konačan rezultat ukazuje da PYR-41 sprječava stvaranje pre-AC-a, kada je ubikvitinilacija zakočena u vrijeme dodavanja virusa, što je u skladu s činjenicom da PYR-41 pri 0 hpi blokira infekciju i sprječava sintezu MCMV gena. Nadalje, u slučaju kada je PYR-41 bio dodan 4 hpi,



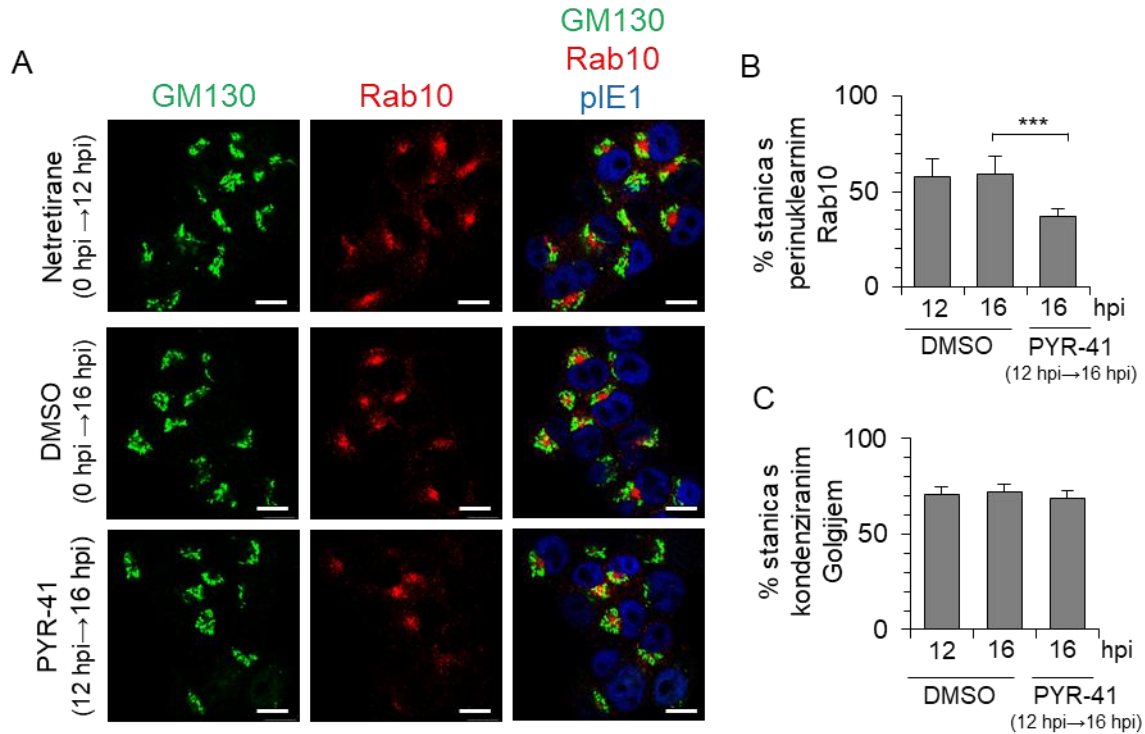
Golgijev aparat je uočen kondenziran, ali perinuklearno nakupljanje Rab10 nije bilo vidljivo (slike 19A i 19C) (samo  $2,1 \pm 2,09$  % u stanicama tretiranim PYR-41 i stanicama zaraženim MCMV-om u usporedbi s  $61,19 \pm 9,27$  % u kontrolnim stanicama). Gotovo sve stanice su bile zaražene, što je potvrđeno vizualizacijom pIE1 (slika 19A i 19B). Kako bismo potvrdili da PYR-41 nije utjecao na dinamiku Rab10, testirali smo njegov izražaj na neinficiranim stanicama tretiranim PYR-41 te nismo pronašli razliku u usporedbi između tretiranih i kontrolnih stanica (slika 20). Stoga se nedostatak nakupljanja Rab10-PD može prihvatiti kao pouzdan rezultat koji ukazuje na odsutnost razvoja pre-AC u stanicama tretiranim PYR-41 na početku rane faze MCMV infekcije.

#### **4.2.2. Učinak PYR-41 na održavanje integriteta pre-AC i nastanak AC u stanicama inficiranima mišjim citomegalovirusom**

Prethodno smo pokazali da PYR-41 sprječava nastanak pre-AC ako je dodan zajedno s virusom, ili na početku rane faze infekcije (prije nego što se pre-AC počeo formirati). Sljedeće nas je zanimalo kako kočenje ubikvitinilacije u stanici utječe na već stvoreni pre-AC, te na stvaranje zrelog AC-a.

##### **4.2.2.1. Učinak PYR-41 na održavanje integriteta pre-AC u ranoj fazi infekcije mišjim citomegalovirusom**

U sljedećem koraku smo istražili je li ubikvitinilacija potrebna za održavanje integriteta prethodno formiranog pre-AC-a, posebno njegovog unutarnjeg dijela, koji se sastoji od brojnih proširenih tubula čije se formiranje i održavanje kontrolira ubikvitinilacijom više različitih regulatornih proteina derivirani [171, 264, 265]. Jednom dijelu stanica smo 12 hpi, kada je pre-AC u potpunosti uspostavljen, dodali PYR-41, dok smo drugi dio lažno tretirali s DMSO i inkubirali do 16 hpi, što predstavlja period prije nego što je započela replikacija virusne DNA, ekspresija L gena i sazrijevanje pre-AC-a u AC [15, 75]. Nakon vizualizacije pre-AC, praćenjem izražaja i lokalizacije GM130 (markera Golgijevog aparata) možemo uočiti da PYR-41 nije uzrokovao značajnu promjenu u konfiguraciji Golgijevog aparata (slike 21A i 21B), što ukazuje da funkcionalna ubikvitinilacija nije bitna za održavanje vanjskog pre-AC-a. S druge strane, iako je postotak stanica u kojima se Rab10 nakupio u perinuklearnoj regiji kontrolnih stanica bio sličan 12 hpi ( $57,6 \pm 9,3\%$ ) i 16 hpi ( $59,3 \pm 8,9\%$ ), broj se značajno smanjio kada je PYR-41 bio prisutan od 12 – 16 hpi ( $37,2 \pm 3,4\%$ ) (slika 21A i 21B). Treba napomenuti da je, u nekim stanicama, gubitak Rab10 signala također bilo značajno (slika 21A; PYR-41 12-16 hpi), što ukazuje na rasipanje unutarnjeg pre-AC-a i odvajanje Rab10 od njegovih membrana. Ovi rezultati ukazuju da je ubikvitinilacija potrebna za održavanje tubularnog obrasca pre-AC-a u ranoj fazi infekcije.

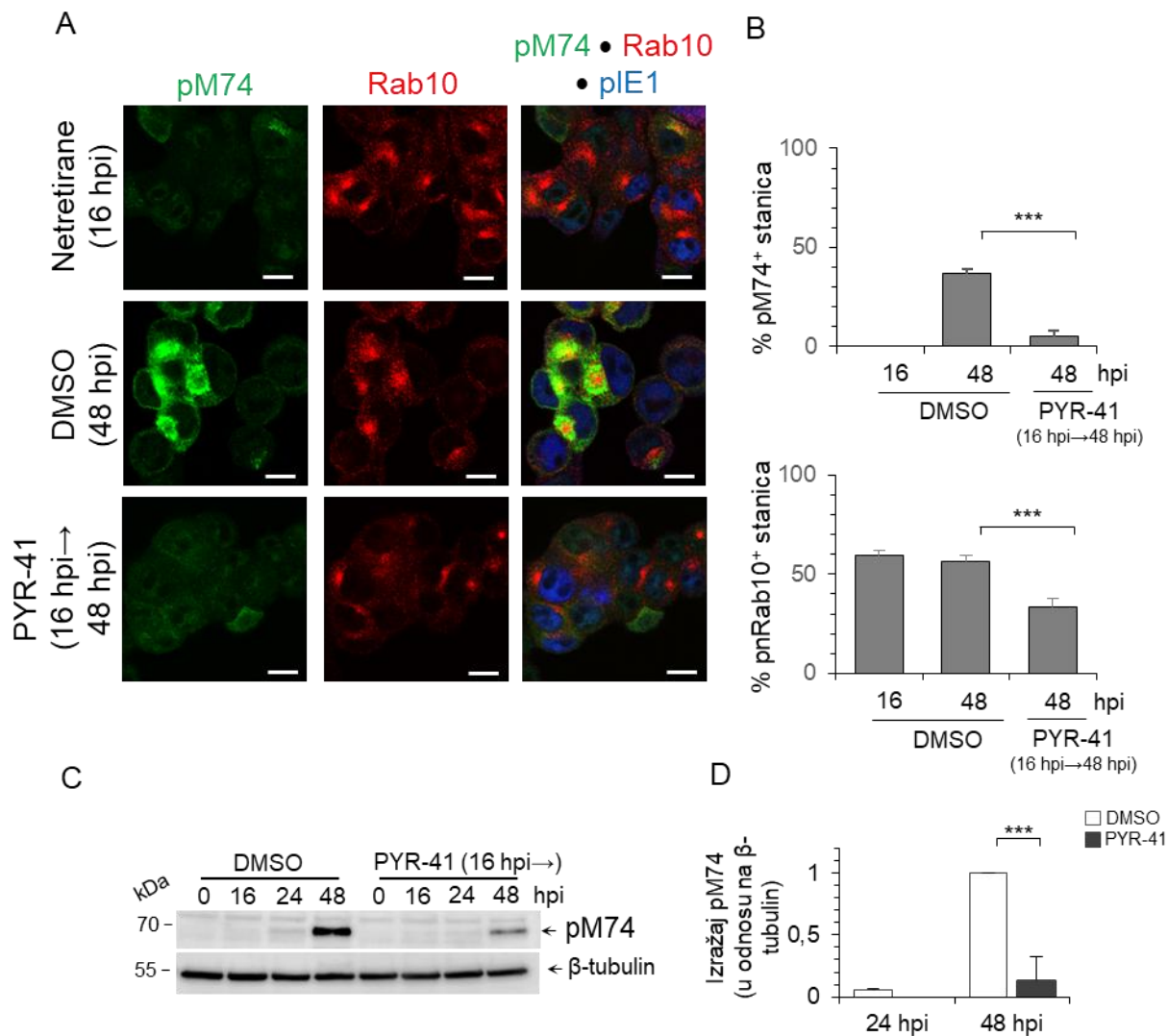


**Slika 21. PYR-41 narušava strukturu prethodno stvorenog pre-AC u stanicama zaraženim MCMV-om.** (A) NIH3T3 stanice su zaražene s  $\Delta$ FcR MCMV (10 MOI), te 12 hpi fiksirane. Potom je ostatak stanica tretiran s 15  $\mu$ M PYR-41, ili im je dodan 0,06 % DMSO. 16 hpi, stanice su fiksirane i permeabilizirane. GM130 (zeleno), Rab10 (crveno) i pIE1 (plavo) su vizualizirani odgovarajućim primarnim i fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelima. Mjerna crta – 10  $\mu$ m, desni kraj slike 5  $\mu$ m. (B-C). Postotak prebrojanih stanica (10 vidnih polja) s perinuklearnim Rab10 u uzorcima tretiranim PYR-41 i kontrolnim uzorcima. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD šest neovisnih pokusa. Statistička značajnost određena je Student t-testom (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

#### 4.2.2.2. Učinak PYR-41 na nastanak zrelog AC u stanicama inficiranim mišjim citomegalovirusom

Kako bismo istražili utječe li PYR-41 na integritet i formiranje zrelog AC-a, inhibitor je dodan na početku L faze infekcije (16 hpi) (slika 22). Unutarnji AC je obilježen pomoću Rab10, dok je zreli vanjski AC praćen izražajem proteina L faze pM74, kako je prethodno opisano [75, 90]. Kao što je i bilo očekivano, na početku eksperimenta (16 hpi) Rab10–pozitivne membrane su se nakupile u unutarnjem pre-AC-u u pola inficiranih stanica ( $59,28 \pm 2,32$  % stanica), dok pM74 još nije bio sintetiziran (slika 22A). Kako je infekcija napredovala (48 hpi), zreli AC je konačno uspostavljen, a vizualiziran je nakupljanjem proteina pM74 u njegovom vanjskom dijelu ( $36,85 \pm 2,2$  % stanica) koji okružuje Rab10 – pozitivne membrane unutarnjeg AC-a ( $56,6 \pm 2,9$  % stanica) (slike 22A i 22B). Međutim, tretman s PYR-41 spriječio je sintezu pM74 te su pM74–pozitivne membrane pronađene u samo  $5,01 \pm 3,0$  % stanica (slika 22A i 22B). Nadalje, Rab10–pozitivne membrane, smještene u unutarnjem AC-u dijelom su se dezintegrirale, što je rezultiralo s  $33,3 \pm$

4,7 % stanica s Rab10–pozitivnim signalnom u AC-u 48 hpi (slike 22A i 22B). Smanjenje količine pM74 nakon dodavanja PYR-41 na 16 hpi potvrdili smo i western blot analizom (slike 22C i 22D).



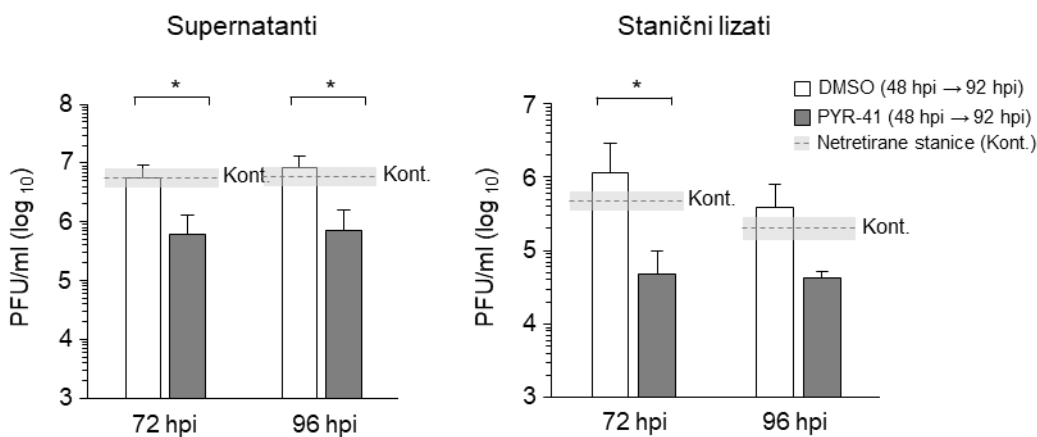
**Slika 22. PYR-41 koči nastanak zrelog AC.** (A) NIH3T3 stanice su inficirane  $\Delta$ FcR MCMV (MOI 10) te je dio stanica fiksiran 16 hpi. Potom je ostatak stanica tretiran s 15  $\mu$ M PYR-41, ili im je dodan samo 0,06 % DMSO (kontrola). 48 hpi, stanice su fiksirane i permeabilizirane. pM74 (zeleno), Rab10 (crveno) i pIE1 (plavo) su vizualizirani s odgovarajućim primarnim i fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelima. Mjerna crta – 10  $\mu$ m. (B) Postotci stanica pozitivnih na pM74, odnosno perinuklearni Rab10 prikazani su kao srednje vrijednosti  $\pm$  SD, iz četiri (Rab10) odnosno tri (pM74) neovisna eksperimenta. Statistička značajnost određena je Student t-testom (\*\*\*)  $p < 0,001$ . (C) NIH3T3 stanice su zaražene s wtMCMV (MOI od 10) i tretirane 15  $\mu$ M PYR-41 ili DMSO (0,06 %). Nakon izolacije proteina u naznačenim vremenskim točkama, elektroforeze u denaturirajućim uvjetima te transfera na membranu, provedena je imunodetekcija pM74 i  $\beta$ -tubulina kemiluminiscencijom  $\beta$ -tubulin je korišten kao kontrola nanosa. (D) Signali su analizirani pomoću ImageJ programa i normalizirani u odnosu na  $\beta$ -tubulin.

Vrijednosti su izražene kao „normalizacija prema kontroli“, pri čemu kontrole predstavljaju najjači signal u kontrolnim (DMSO tretiranim) uzorcima. Srednje vrijednosti  $\pm$  SD prikazane su na grafovima. Statistička značajnost između kontrolnih (netretiranih) i uzoraka tretiranih PYR-41 u istoj kinetici određena je Student t-testom (\*\*p < 0,001).

Stoga možemo zaključiti da je funkcionalna ubikvitinilacija u zaraženoj stanici potrebna za pravilnu sintezu kasnih MCMV proteina nužnih za nastanak zrelog AC-a, što ukazuje da je ubikvitinilacija uključena u regulaciju izražaja kasnih MCMV gena ali i u održavanje strukturnog integriteta AC-a.

#### 4.2.3. Učinak PYR-41 na produkciju infektivnih MCMV viriona u kasnim fazama infekcije mišjim citomegalovirusom

U prethodnim pokusima smo pokazali da tretman PYR-41 inhibira proizvodnju viriona u stanicama kada se doda prije stvaranja pre-AC-a (slika 16). Nadalje, budući da naši rezultati ukazuju da je funkcionalna ubikvitinilacija važna, barem djelomično, za održavanje integriteta uspostavljenog AC-a (slika 21), testirali smo učinak inhibicije ubikvitinilacije započete 48 hpi na proizvodnju viriona u MCMV zaraženim stanicama. Kako bi se smanjio utjecaj viriona sintetiziranih do 48 hpi na rezultate, stari mediji za staničnu kulturu zamijenjeni su svježim medijima nakon 48 hpi, nakon čega je dodan 15  $\mu$ M PYR-41 te su testom analize plakova kvantificirane oslobođene (supernatant) i stanično – povezane (stanični lizati) zarazne čestice nakon 72 i 96 hpi. U skladu s rezultatima prikazanim na slici 23, tretman s PYR-41 smanjio je količinu infektivnih čestica i unutar stanica, ali i onih oslobođenih u stanični medij približno 10 puta (slika 23).



**Slika 23. Funkcionalna ubikvitinilacija u kasnoj fazi infekcije važna je za proizvodnju infektivnih MCMV viriona.** NIH3T3 stanice su inficirane s wtMCMV (10 MOI). Nakon 48 hpi medij za kulturu stanica zamijenjen je svježim.

PYR-41 (15  $\mu$ M) je dodan dijelu uzoraka, dok su kontrolni inkubirani samo u 0,06% DMSO. Supernatanti i stanični lizati su sakupljeni nakon 72 i 96 hpi, a proizvodnja viriona izračunata je testom analize plakova na mišjim embrionalnim fibroblastima. Srednje vrijednosti  $\pm$  SD iz 4 različita pokusa su prikazane grafički. Statistička značajnost određena je Mann-Whitneyjevim testom (\* $p < 0,05$ ). Kont.-kontrolna razina proizvodnje virusa u netretiranim stanicama bez zamjene medija za kulturu stanica 48 hpi.

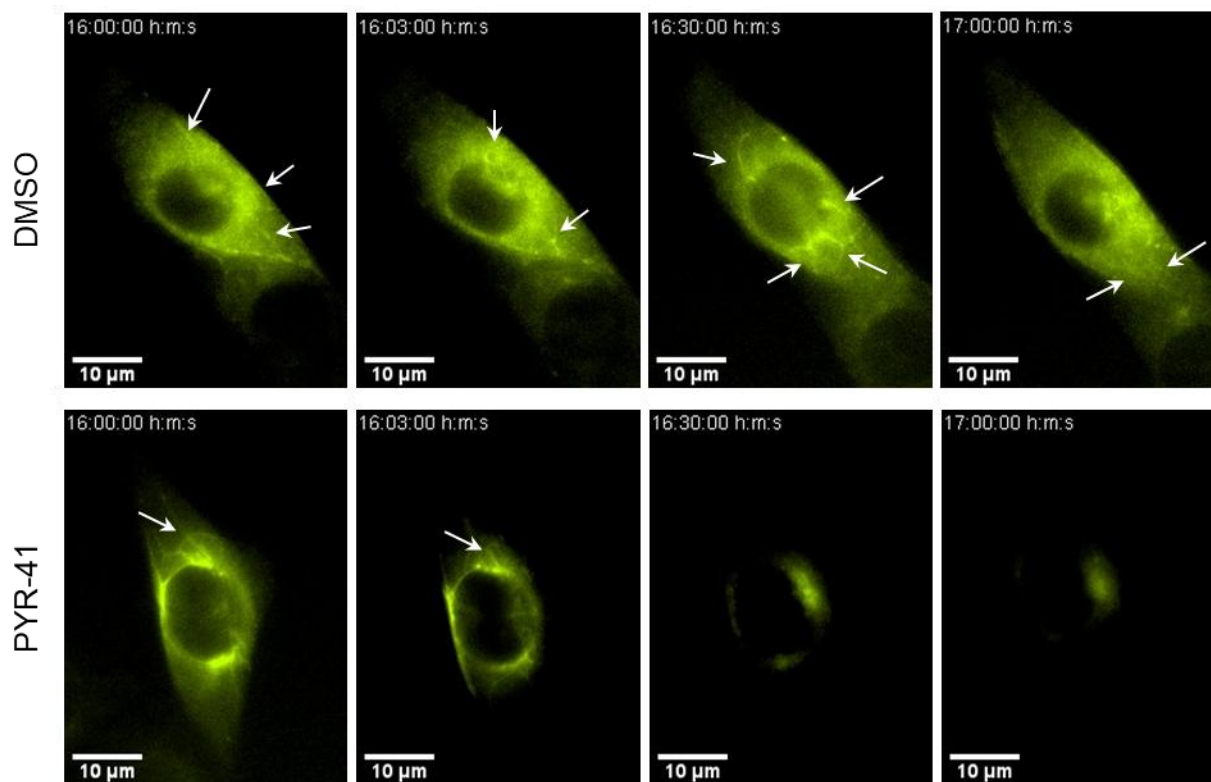
To sugerira da je funkcionalna ubikvitinilacija potrebna za proizvodnju viriona čak i u razdoblju nakon potpunog uspostavljanja AC i sinteze proteina kasne faze. Iako ovi rezultati ukazuju da PYR-41 ometa sekundarno omatanje viriona, ne može se isključiti i mogućnost smanjenja količine dostupnih sastavnica potrebnih za izgradnju zaraznih čestica, odnosno kasnih proteina.

#### **4.2.4. Učinak PYR-41 na ekstenzivnu tubulaciju Rab10 - pozitivnih membrana unutar AC-a u stanicama inficiranim mišjim citomegalovirusom**

Rezultati ranije objavljenih studija ukazuju da se konačno omatanje CMV čestice događa na membranama porijeklom iz endosomalnih odjeljaka [266–269], koje u MCMV i HCMV zaraženim stanicama znatno ekspanziraju i tvore AC [15, 69, 75]. Nadalje, naši nedavno objavljeni rezultati pokazuju ekspanziju Rab10 – pozitivnih tubularnih membrana u MCMV inficiranim stanicama, čiji je nastanak ovisan o regrutaciji SNX27:Retromer:ESCPE1 kompleksa na EE domenama [90, 91]. Upravo je ovo povećanje Rab10 pozitivnih membrana TRE-a koristan marker za ranu biogenezu AC-a [91]. Pored toga, ova tubulacija predstavlja vrlo dinamičan proces koji se nastavlja odvijati i unutar potpuno formiranog AC-a u L-fazi infekcije, što je pokazano dugotrajnim snimanjem MCMV-om zaraženih NIH3T3 EGFP-Rab10 stanica korištenjem fluorescentne digitalne holotomografske mikroskopije (DHTM) [91].

Budući da smo u prethodnim pokusima uočili da PYR-41 uzrokuje dezintegraciju Rab10 – pozitivnih membrana unutar AC-a (slike 21 i 22), odlučili smo dalje istražiti da li je funkcionalna ubikvitinilacija potrebna za tubulaciju Rab10-pozitivnih membrana. U tu svrhu napravili smo pokuse gdje smo snimali fluorescentno obilježene Rab10-pozitivne tubule (EGFP-Rab10) pomoću DHTM-a, tj. na živim MCMV – inficiranim NIH3T3 EGFP-Rab10 stanicama [91], u kojima je sinteza EGFP-Rab10 bila potaknuta doksiciklinom 48 sati prije početka pokusa. Bitno je napomenuti da je u neinficiranim stanicama izraženi EGFP-Rab10 uglavnom smješten u citosolu i regrutira se samo na nekim membranama u jukstanuklearnoj regiji, što rezultira slabim fluorescentnim signalom, dok se tek nakon infekcije nakuplja na membranama TRE [91]. Ovdje smo pokazali da se, 16 hpi, EGFP-Rab10 nalazi koncentriran u perinuklearnoj regiji koja predstavlja AC, s vidljivim dinamičnim tubulima koji izlaze iz rubova strukture (slika 24, strelice).

Međutim, gotovo odmah nakon dodavanja 15  $\mu$ M PYR-41 (3 minute), ove EGFP-Rab10 – pozitivne tubularne strukture su počele kolabirati. Štoviše, ukupni fluorescentni signal postupno je slabio i gotovo se potpuno ugasio nakon otprilike 1 sata (slika 24, donji panel). Ovaj rezultat je u skladu s našim prethodnim opažanjima koja ukazuju na to da nedostatak funkcionalne ubikvitinilacije utječe na integritet AC-a (slika 21). Nadalje, brzi učinak PYR-41 na kolaps izduženih tubula AC-a ukazuje da ovaj učinak može biti važan u procesu konačne dezintegracije strukture AC-a koji je vidljiv u nekim stanicama (slika 21, slika 22 i slika 24).



**Slika 24. PYR-41 narušava proces Rab10-povezane tubulacije u uspostavljenom AC-u stanicama zaraženim wtMCMV-om.** NIH3T3 EGFP-Rab10 stanice (inducirane doksiciklinom) su zaražene s wtMCMV-om (10 MOI), a PYR-41 (15  $\mu$ M) je dodan 16 hpi dijelu stanica, dok je drugi dio inkubiran samo u prisustvu 0,06 % DMSO (početna točka DHTM analize). Prikazane su snimke zaslona u naznačenim vremenskim točkama. Strelice označavaju izdužene EGFP-Rab10-pozitivne tubule u AC-u.

### 4.3. Izražaj ubikvitinilaza i deubikvitinilaza endosomalnoga sustava u infekciji mišjim citomegalovirusom

Ubikvitinilacija je uključena u regulaciju širokog spektra staničnih procesa uključujući i one presudne za obrambene mehanizme domaćina tijekom virusnih infekcija. U kontekstu MCMV infekcije,

Ub ligaze i DUB postaju posebno relevantni enzimi koji imaju ulogu u kontroli djelovanja imunoloških receptora regulacijom njihovog ukupnog izražaja unutar stanice, ali i izražaja na staničnoj površini. Paralelno s time, endosomalni sustav domaćina, unutar kojega se odvijaju procesi poput sekundarnog omatanja virusnih čestica, također je podložan regulaciji posredstvom E3 ubikvitin ligaza i deubikvitinilaza [75, 77, 215, 270]. Ovi enzimi ne samo da usmjeravaju promet proteina unutar endosomalnog sustava i reguliraju njihove interakcije s drugim staničnim sustavima, nego i značajno utječu na dinamiku citoskeletne arhitekture te stanični metabolizam. Takvi učinci imaju presudnu ulogu u omogućavanju učinkovite virusne replikacije te u oblikovanju imunološkog odgovora domaćina [228, 231]. Stoga istraživanje doprinosa ovih enzima u sklopu MCMV infekcije može pridonijeti razumijevanju mehanizama kojima virus modulira endosomalne procese i izbjegava imunološki nadzor, čime osigurava vlastito preživljavanje i umnažanje unutar stanice domaćina. U svrhu ispitivanja mogućeg značaja staničnih ubikvitinilaza i deubikvitinilaza tijekom MCMV infekcije, primijenjena je Western blot analiza kako bi se utvrdio utjecaj infekcije na ukupnu razinu izražaja odabranih proteina.

#### 4.3.1. Izražaj staničnih ubikvitinilaza u stanicama inficiranim mišjim citomegalovirusom

Ubikvitin ligaze predstavljaju specifičnu skupinu enzima koji kataliziraju ubikvitinilaciju staničnih proteina te time djeluju kao ključni regulatori brojnih staničnih procesa, uključujući imunološki odgovor i održavanje stanične homeostaze (tablica 9). Unutar ove skupine, posebno se ističu MARCH (engl. *Membrane – Associated RING-CH*) ligaze, koje imaju važnu ulogu u modifikaciji imunoloških receptora, čime neposredno utječu na regulaciju staničnog odgovora tijekom virusnih infekcija [201, 203, 204].

**Tablica 8. Popis ispitivanih staničnih ubikvitinilaza i njihove uloge.**

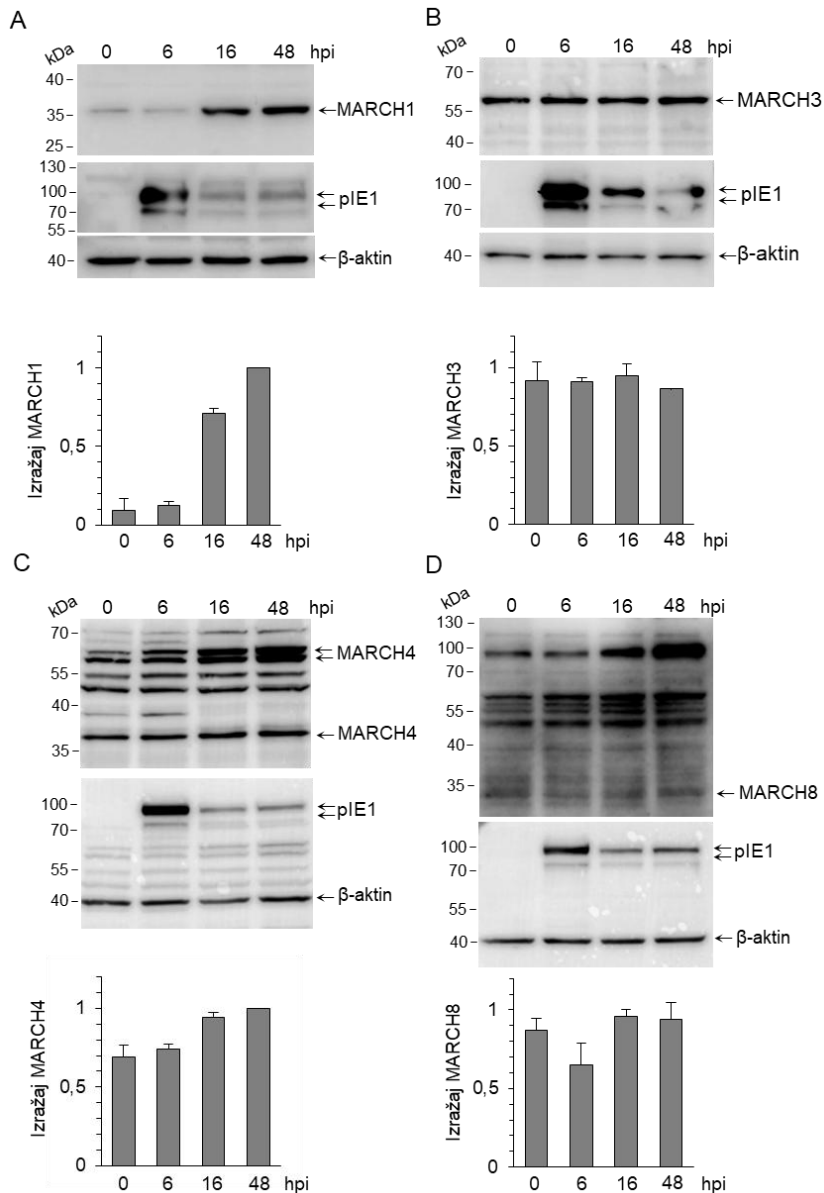
Ubikvitinilaza	Uloga proteina
MARCH1	Katalizira ubikvitinilaciju proteina poput MHC razreda II i CD86, usmjeravajući ih za razgradnju na u endosomalnim odjeljcima, čime se smanjuje njihova prisutnost na plazmatskoj membrani [271].
MARCH3	Katalizira K48 ubikvitinilaciju citokinskih receptora poput interleukina-1, te ih usmjerava prema proteasomalnoj razgradnji. Na taj način regulira provođenje signala. Osim toga, interakcija MARCH3 s endosomalnim proteinima, poput sintaksina 6, ukazuje na njegov doprinos regulaciji vezikularnog prometa [271].
MARCH4	Ubikvitinilira citosolni rep MHC-I molekula te MULT1 receptor i smanjuje njihov izražaj na membrani. Sudjeluje u regulaciji puteva urođene imunosti [271, 272].

MARCH8	Ubikvitinilira citosolni rep MHC-I molekula i smanjuje njihov izražaj na membrani. Ubikvitinilira transferinski receptor i pokreće njegovu internalizaciju, te sudjeluje u modulaciji urođenih imunoloških odgovora [209, 271].
RFFL	Ubikvitinilira efektore Rab11 GTPaze: Rab11-FIP1C, Rab11-FIP2, Rab11-FIP5, EHD1, MICAL-L1 koji su važni za normalnu funkciju ERC-a [264].
Rabex5	GEF za Rab5. Sudjeluje u regulaciji prometovanja iz EE i pretvorbu EE u LE. Mobilizira USP8 staničnu DUB na membrane EE [182, 273].

S obzirom na značaj obitelji MARCH ligaza u regulaciji imunološkog odgovora [271], Western blotom smo pratili utjecaj MCMV infekcije na izražaj MARCH1, MARCH3, MARCH4 i MARCH8 u uzorcima staničnih lizata prikupljenih 0, 6, 16 i 48 nakon infekcije NIH3T3 stanica wtMCMV-om. U svim opisanim pokusima kao kontrola nanosa korištena je detekcija  $\beta$ -aktina, a kao kontrola infekcije detektiran je pIE1. Izražaj MARCH1 (slika 25A) naglo je porastao krajem rane faze infekcije (nakon 16hpi) te nastavio sve do kasne faze (48 hpi). Zanimljivo je da je jednak rezultat pokazan ranije kod infekcije HCMV-om gdje MARCH1 sudjeluje najvjerojatnije kao regulator izražaja TfR u zaraženoj stanici [274]. Izražaj MARCH4, koji je zaslužan za smanjenje površinskog izražaja MHC-I (tablica 9), također počinje rasti na kraju E faze infekcije i nastavlja se do L faze (slika 25C), ali njegov rast je nešto umjereniji u usporedbi s MARCH1 (slika 25A). Stoga je moguće da njegov porast negativno djeluje na izražaj MHC-I. S druge strane MCMV infekcija nije imala utjecaja na izražaj MARCH3 i MARCH8 ligaze (slika 25B i 25D), koje također sudjeluju u regulaciji urođenog, ali i stečenog imunološkog odgovora (tablica 9).

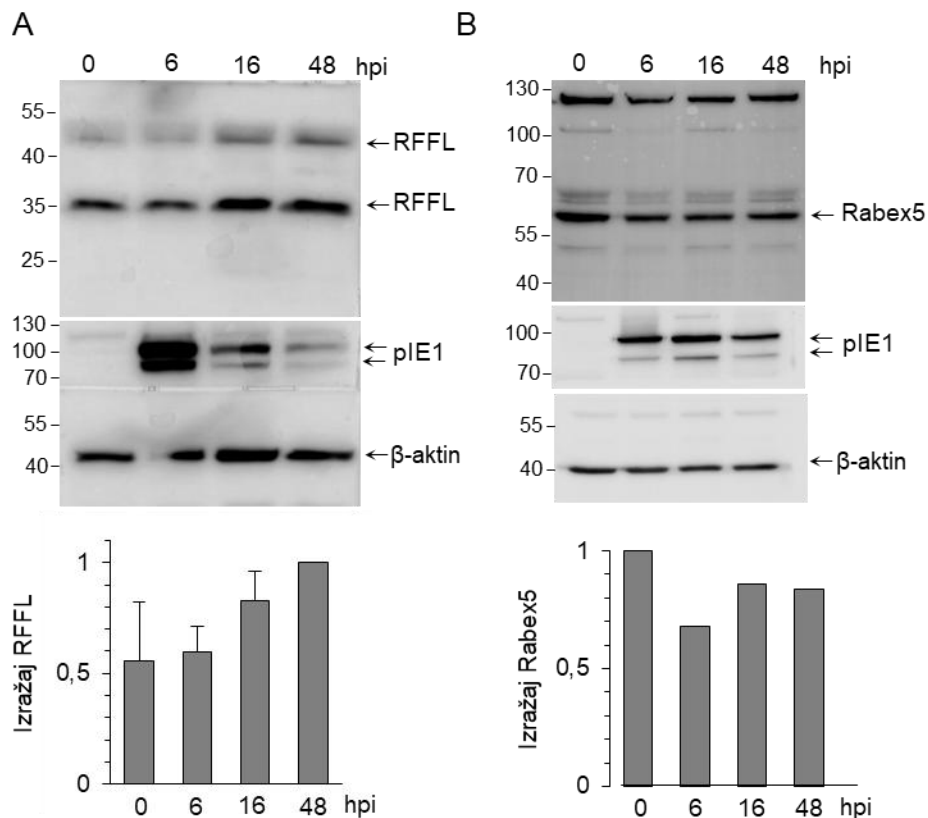
Ovi rezultati upućuju na dodatne mehanizme koje MCMV, pri završetku rane faze infekcije, koristi u svrhu supresije imunološkog sustava stanice, a koji ostaju prisutni i tijekom kasne faze infekcije. U ovom slučaju, učinak bi se mogao ostvarivati povećanjem izražaja ubikvitinilaza koji posreduju usmjeravanje površinskih MHC-I i MHC-II molekula, važnih za stečeni imunski odgovor, u degradaciju, dok bi istodobno umjereno mogao pridonositi smanjenju aktivnosti urođene imunosti.





**Slika 25. Kinetika izražaja MARCH ubikvitinilaza tijekom MCMV infekcije.** NIH3T3 stanice su inficirane wt MCMV (10 MOI). Nakon izolacije proteina u naznačenim vremenskim točkama, elektroforeze u denaturirajućim uvjetima te transfera na membranu, provedena je imunodetekcija MARCH1 (A), MARCH3 (B), MARCH4 (C) i MARCH8 (D) kemiluminiscencijom. Detekcija β-aktina je korištena kao kontrola nanosa, a pIE1 kao kontrola infekcije. Kvantifikacija je napravljena u ImageJ programu, vrijednosti su normalizirane prema izražaju β-aktina i izražene u odnosu na najjači signal u kinetici. Grafički su prikazane srednje vrijednosti ± SD u odnosu na uzorak s najvećim izražajem.

Kako bismo stekli potpuniji uvid u ulogu staničnih ubikvitinilaza u procesima reorganizacije endosomalnog sustava tijekom MCMV infekcije, analizirali smo utjecaj infekcije na izražaj RFFL i Rabex5, dviju E3 ligaza uključenih u regulaciju aktivnosti proteina odgovornih za endosomalno prometovanje (tablica 9). Praćenje je provedeno u ranoj (E, 6 – 16 hpi) i kasnoj (L, 48 hpi) fazi infekcije. Utvrdili smo da MCMV uzrokuje pojačanje izražaja RFFL Ub ligaze, zaslužne za regulaciju funkcije proteina koji sudjeluju u nastanku i odcjepljivanju tubula na membranama EE (tablica 9). Ovaj porast se također događa na kraju E faze infekcije (16 hpi) i nastavlja se tijekom kasne faze (slika 26A), kao i u slučaju MARCH1 i MARCH4 (slika 25A i 25B). Izražaj Rabex5, koji, pored ubikvitinilazne uloge djeluje i kao GEF za Rab5 (Rab5 GEF) ostao je nepromijenjen uslijed infekcije MCMV-om (slika 26B).



**Slika 26. Kinetika izražaja RFFL i Rabex5 ubikvitinilaza tijekom MCMV infekcije.** NIH3T3 stanice su inficirane wt MCMV (10 MOI). Nakon izolacije proteina u naznačenim vremenskim točkama, elektroforeze u denaturirajućim uvjetima te transfera na membranu, provedena je imunodetekcija RFFL (A) i Rabex5 (B) kemiluminiscencijom. Detekcija  $\beta$ -aktina je korištena kao kontrola nanosa, a pIE1 kao kontrola infekcije. Kvantifikacija je napravljena u ImageJ programu, vrijednosti su normalizirane prema izražaju  $\beta$ -aktina i izražene u odnosu na najjači signal u kinetici. Grafički su prikazane srednje vrijednosti  $\pm$  SD u odnosu na uzorak s najvećim izražajem (3 nezavisna pokusa za RFFL, 1 pokus za Rabex5).

Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da MCMV, krajem rane faze infekcije, modulacijom izražaja RFFL ligaze indirektno ometa formiranje transportnih vezikula, odnosno proces odcjepljivanja tubula s membrana endosoma. Ova opažanja u skladu su s ranije prikazanim rezultatima koji potvrđuju da je ubikvitinilacija ključan mehanizam u procesu prekomjerne elongacije Rab10-pozitivnih tubula unutar pre-AC-a (slika 24). Nadalje, iako se izražaj Rabex5 nije promijenio tijekom infekcije, treba imati u vidu da se njegova aktivacija može regulirati i autoubikvitinilacijom, te ispitivanje ubikvitinilacijskog statusa znatno doprinosi razumijevanju njegove funkcije u infekciji. Ove pokuse ćemo kasnije opisati (odjeljak 4.4.)

### 4.3.2. Izražaj staničnih deubikvitinilaza u stanicama inficiranim mišjim citomegalovirusom

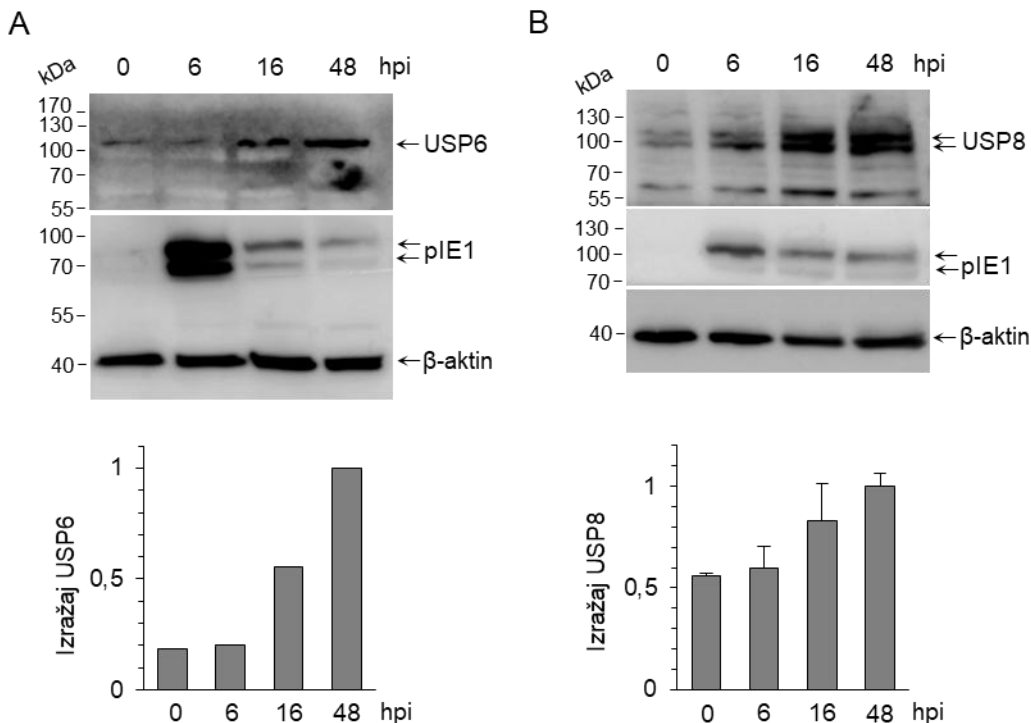
Pored ubikvitin ligaza, važnu ulogu u regulaciji procesa unutar endosomalnog sustava imaju i deubikvitinilaze, odnosno proteaze koje uklanjaju ubikvitinske molekule s ciljnih proteina. One su ključne za održavanje homeostaze aktivnosti proteina endosomalnog sustava, regulaciju sudbine proteina namijenjenih degradaciji te očuvanje stalne zalihe ubikvitina u stanici. Deubikvitinilaze stoga predstavljaju važne regulatore endosomalnog prometovanja, budući da mogu mijenjati aktivnost proteina podložnih ubikvitinilaciji, ali i sudbinu proteina namijenjenih degradaciji u bilo kojem koraku njihova putovanja kroz endosomalni sustav [216]. Polazeći od rezultata koji upućuju na to da MCMV koristi stanične E3 ligaze radi reorganizacije endosomalnog sustava, odlučili smo ispitati iskorištava li virus i aktivnost staničnih deubikvitinilaza u procesu formiranja AC-a.

**Tablica 9. Popis ispitivanih staničnih deubikvitinilaza i njihove uloge.**

Protein	Uloga proteina
USP6	Deubikvitinilira neke supstrate MARCH ligaza (kao što su MHC-I, CD44) i na taj način potiče njihovo recikliranje umjesto degradacije. Djeluje oprečno MARCH ligazama. Regulira endosomalno recikliranje potičući regrutaciju Arf6 na membrane endosoma te njegovu aktivaciju [275, 276].
USP8	Djeluje s ESCRT-0 kompleksom [216]. Rekrutira se na Rab5 pozitivne membrane stvarajući interakcije s Rabex5. Deubikvitinilira Rabex5 i na taj način ga uklanja s membrane, prekidajući time i mobilizaciju Rab5. Istovremeno stvara interakcije sa GEF-om Rab7 GTP – aze i potiče pretvorbu EE u LE [273].
USP10	Stabilizira SNX3 i na taj način pozitivno regulira endosomalno prometovanje. Nalazi se na EE gdje kolokalizira s Rab5 i Rab11 [277].
USP15	Stvara interakcije s RFFL E3 ligazom. Ima ulogu u normalnoj funkciji ERC-a [264].
AMSH	Potiče prebacivanje ubikvitiniliranih receptora s jednog na drugi ESCRT kompleks rastavljajući K63 poliubikvitinski lanac [214].

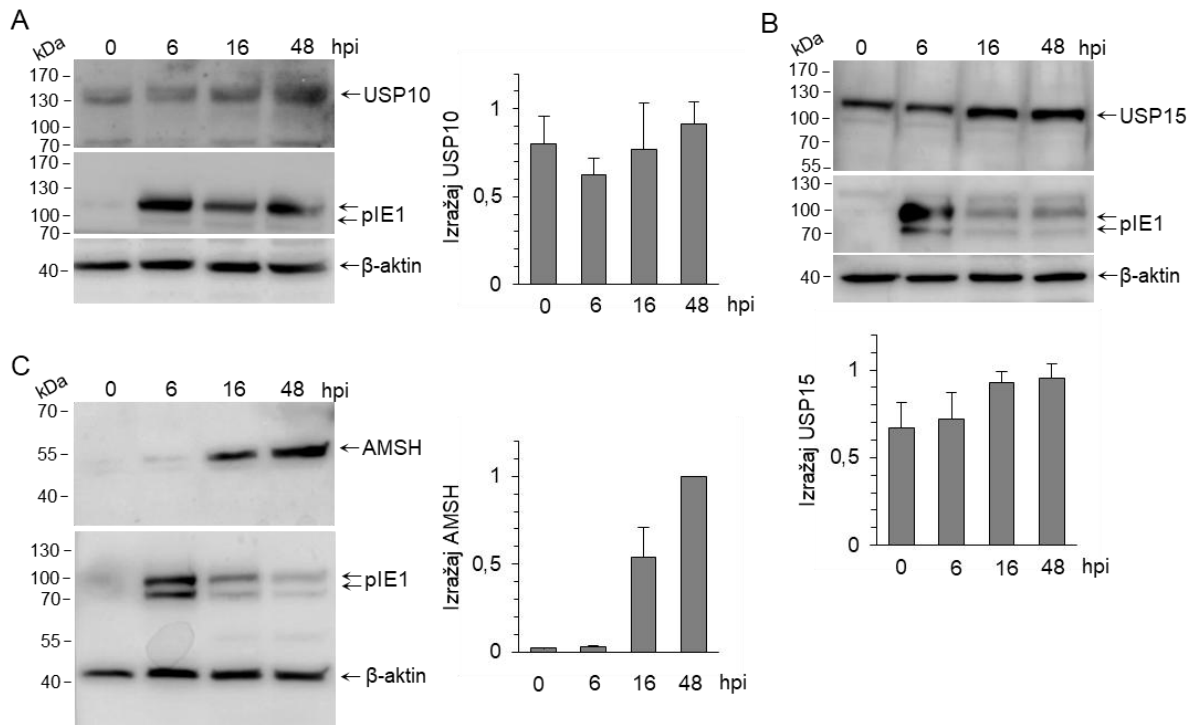
U ovom radu smo western blot analizom pratili promjenu izražaja nekoliko DUB kroz E (6 hpi i 16 hpi) i L (48 hpi) fazu infekcije MCMV-om, a vrijednosti smo usporedili s početnim izražajem (0 hpi) (slika 27 i 28). Zanimljivo je što smo uočili da se u MCMV inficiranoj stanici povećava izražaj većine ispitivanih deubikvitinilaza. Tako smo pokazali da MCMV potiče pojačanje izražaja USP6 (slika 27A), koji djeluje na deubikvitinilaciju MHC-I molekula (tablica 10), i USP8, koji deubikvitinilira Rabex5 te time negativno djeluje na aktivaciju Rab5 (slika 27B). Oba pojačanja izražaja se događaju na kraju E faze infekcije MCMV-

om (16 hpi) te se nastavljaju kroz L fazu (48 hpi). Analizom izražaja pIE1 potvrdili smo učinkovitost infekcije, a izražaj  $\beta$ -aktina koristili smo kao kontrolu nanosa.



**Slika 27. Kinetika izražaja USP6 i USP8 tijekom MCMV infekcije.** NIH3T3 stanice su inficirane wtMCMV (10 MOI). Nakon izolacije proteina u naznačenim vremenskim točkama, elektroforeze u denaturirajućim uvjetima te transfera na membranu, provedena je imunodetekcija USP6 (A) i USP8 (B) kemiluminiscencijom. Detekcija  $\beta$ -aktina je korištena kao kontrola nanosa, a pIE1 kao kontrola infekcije. Kvantifikacija je napravljena u ImageJ programu, vrijednosti su normalizirane prema izražaju  $\beta$ -aktina i izražene u odnosu na najjači signal u kinetici. Grafički su prikazane srednje vrijednosti  $\pm$  SD u odnosu na uzorak s najvećim izražajem (iz 1 pokusa za USP6, 3 nezavisna pokusa za USP8).

Potom smo pratili promjenu izražaja deubikvitinilaza AMSH, USP10 i USP15. Dok se izražaj USP10 (slika 28A) nije značajnije mijenjao, izražaj USP15 (slika 28B) se povećavao uslijed MCMV infekcije. USP15 djeluje na RFFL ligazu i indirektno utječe na njezine supstrate koji sudjeluju u regulaciji odcjepljivanja tubula, dodatno ometajući te procese (tablica 10). Izražaj AMSH (slika 28C), koji sudjeluje u regulaciji degradacije proteina pomoću ESCRT sustava (tablica 10), pojačava se uslijed MCMV infekcije, kao i u slučaju prethodnih proteina na kraju E faze infekcije kada je započela sinteza virusne DNA. Porast izražaja se nastavlja kroz L fazu (48 hpi). Analizom izražaja pIE1 potvrdili smo učinkovitost infekcije, a izražaj  $\beta$ -aktina koristili smo kao kontrolu nanosa.



**Slika 28. Kinetika izražaja USP10, USP15 i AMSH tijekom MCMV infekcije.** NIH3T3 stanice su inficirane wtMCMV (10 MOI). Nakon izolacije proteina u naznačenim vremenskim točkama, elektroforeze u denaturirajućim uvjetima te transfera na membranu, provedena je imunodetekcija USP10 (A), USP15 (B) i AMSH (C) kemiluminiscencijom. Detekcija  $\beta$ -aktina je korištena kao kontrola nanosa, a pIE1 kao kontrola infekcije. Kvantifikacija je napravljena u ImageJ programu, vrijednosti su normalizirane prema izražaju  $\beta$ -aktina i izražene u odnosu na najjači signal u kinetici. Grafički su prikazane srednje vrijednosti  $\pm$  SD iz 3 nezavisna pokusa.

Rezultati ukazuju da MCMV ciljano modulira izražaj određenih staničnih E3 ubikvitin ligaza i deubikvitinilaza tijekom infekcije, posebice krajem rane faze, a ti se učinci održavaju i u kasnoj fazi. Povećani izražaj MARCH1, MARCH4 i RFFL ligaze, kao i USP6, USP8, USP15 i AMSH DUB enzima, upućuje na koordinirano djelovanje virusa u kontroli izražaja MHC molekula na staničnoj površini, ometanju endosomalnog prometovanja te modulaciji procesa vezanih uz formiranje transportnih vezikula što bi moglo dovesti do prekomjernog izduživanja tubula unutar pre-AC-a i AC-a. Iako se trebaju još dodatno sustavno istražiti, ovi rezultati podupiru hipotezu da MCMV koristi kombiniranu regulaciju ubikvitinilacije i deubikvitinilacije kako bi preoblikovao endosomalni sustav domaćina i potisnuo imunološki odgovor.

#### 4.4. Učinak MCMV infekcije na status ubikvitiniliranosti staničnih proteina na EE-ERC sučelju

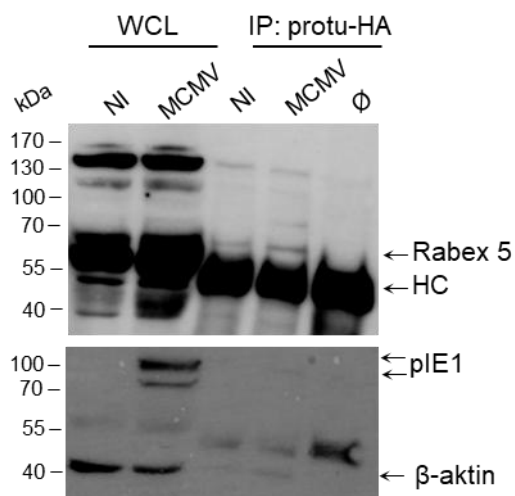
Ubikvitinilacija predstavlja ključni mehanizam regulacije aktivnosti efektorskih proteina unutar endosomalnog sustava. Ova posttranslacijska modifikacija omogućuje modulaciju aktivnosti proteina smještenih na membranama endosoma kroz dinamične cikluse dodavanja i uklanjanja ubikvitina. Takva regulacija osigurava preciznu prostorno-vremensku kontrolu endosomalnog prometovanja, signalizacije i formiranja tubula, što u konačnici čini temelj endosomalnog recikliranja [169, 171, 182, 264]. Od ranije je poznato da CMV može ometati unutarstanične procese narušavanjem ubikvitinilacije različitih staničnih proteina [235, 246, 278]. Stoga se nameće pitanje djeluje li MCMV na funkciju nekog od ključnih regulatora endosomalnog prometovanja promjenom njihova ubikvitinilacijskog statusa. U ovome radu istražili smo učinak infekcije MCMV-om na status ubikvitinilacije odabranih proteina koji imaju središnju ulogu u regulaciji prometovanja s endosomalnih membrana (tablica 11).

**Tablica 10. Popis ispitivanih staničnih proteina koji sudjeluju u reguliranju endosomalnoga prometovanja.**

Protein	Uloga proteina
Rabex5	GEF za Rab5. Sudjeluje u regulaciji prometovanja iz EE i pretvorbu EE u LE. Mobilizira USP8 na membrane EE [182, 273].
EHD1	Sudjeluje u tubulaciji i fisiji na EE; regulira prometovanje: EE→ERC i ERC→PM. Vjerojatan supstrat RFFL ubikvitinilaze [264, 279].
Rab11-FIP1	Efektorski protein Rab11 GTP-aze. Vjerojatan supstrat RFFL ligaze [264].
WASHC1	Uloga u poticanju nukleacije aktina na membranama endosoma čime se potiče nastanak endosomalnog tubula i odcjepljivanje transportne vezikule [169, 171].

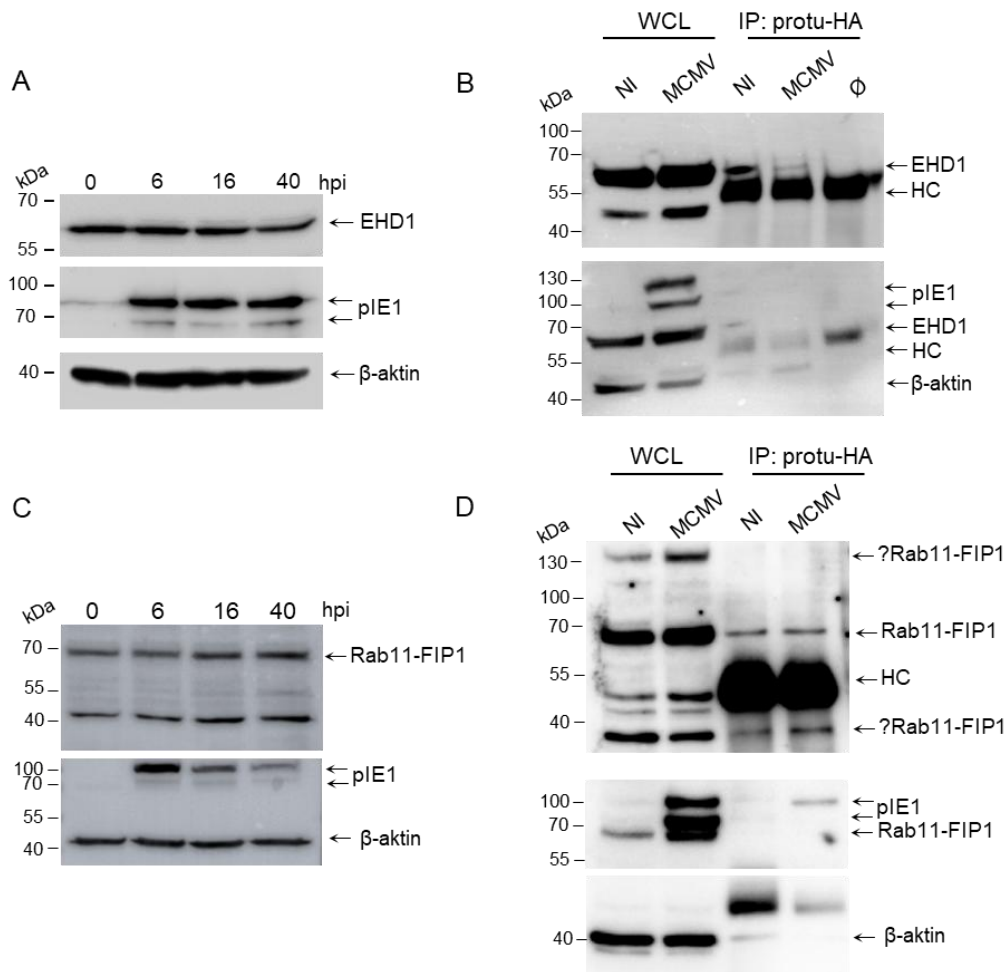
Ubikvitiniliranost smo testirali na NIH3T3 HA-Ub staničnoj liniji (slika 13), koristeći princip imunoprecipitacije svih ubikvitiniliranih proteina iz citosolnih lizata i vizualizaciju ispitivanog proteina Western blotom. Jedan od proteina koji smo istražili bio je Rabex5, GEF za Rab5. Za njega je poznato da može regulirati vlastitu aktivnost autoubikvitinilacijom [182]. U fiziološkim uvjetima Rabex5 djeluje kao GEF za Rab5, omogućavajući stvaranje njegovog aktivnog oblika, Rab5 GTP [280]. Prekomjerna ubikvitinilacija Rabex5 dovodi do pojačane aktivacije Rab5 što onemogućava pravilno sortiranje i pretvorbu u LE, ali i dovodi do ekspanzije EE [273]. Ovdje prikazani rezultati, dobiveni imunoprecipitacijom HA-Ub proteina iz, doksiciklinom inducirane, NIH3T3 Ha-Ub stanične linije pokazuju da je Rabex5 ubikvitinilaran i u neinficiranim (NI) stanicama, kao i u E fazi MCMV infekcije (slika 29, IP). Analizom izražaja pIE1 potvrdili smo učinkovitost infekcije, a izražaj  $\beta$ -aktina koristili smo kao kontrolu nanosa. Obzirom da je ukupni izražaj proteina u inficiranim stanicama uglavnom nepromijenjen u usporedbi s neinficiranim (slike

26B i slika 29, WCL), to nas navodi na zaključak da ubikvitinilacija, u ovome slučaju, ne djeluje kao signal za razgradnju već se radi o regulacijskoj modifikaciji. Nadalje, zastupljenost ubikvitiniliranog Rabex5 je u infekciji samo malo povećana. Kao što smo ranije naveli, pojačanjem ubikvitinilacije Rabex5 narušava se ravnoteža ubikvitiniliranoga i neubikvitiniliranoga oblika unutar stanice što u konačnici ometa pravilno usmjerenje, odnosno funkcioniranje proteina ovisnih o Rabex5 i dovodi do ekspanzije EE odjeljaka [182, 273]. Stoga, učinak povećanja ubikvitinilacije Rabex5 u infekciji, kao jedan od mehanizama narušavanja recikliranja unutarstaničnih molekula, ne može biti isključen.



**Slika 29. Ubikvitinilacija Rabex5 u neinficiranim stanicama, te u ranoj fazi infekcije s wt MCMV.** NIH3T3 HA-Ub stanice su inducirane doxycyclinom (2 µg/ml) te su nakon 24 sata inficirane wt MCMV (10 MOI ), ili su ostale neinficirane. Nakon 16 sati, 10 % pojedinog uzorka je lizirano je pomoću RIPA pufera (WCL - ukupni stanični lizat), dok je ostalih 90 % lizirano u 0,5 ml 1 % NP40 pufera za lizu i korišteno za imunoprecipitaciju Ub molekula pomoću protu-HA protutijela. Western blotom je analiziran izražaj ukupnih (WCL) te ubikvitiniliranih (IP) Rabex5 molekula pomoću protu-Rabex5 protutijela i HRP-konjugiranog sekundarnog protu-kuničjeg protutijela. Izražaj pIE1 je korišten kao kontrola infekcije, a izražaj β-aktina kao kontrola nanosa. Prikazan je reprezentativni rezultat od 2 neovisna pokusa. (HC – engl. *heavy chain* predstavlja teške lance protu-HA protutijela u uzorcima koji su bili imunoprecipitirani); Ø - kontrolni uzorak - NP40 bez stanica, samo protu-HA i protein-A sefaroza.

Pored Rabex5, u poticanju endosomalnog recikliranja sudjeluju i proteini EHD1 te Rab11-FIP1, čija je aktivnost također podložna regulaciji ubikvitinilacijom. Oba proteina ubikvitinilira RFFL E3 ubikvitin ligaza, što je, prema nekim autorima, preduvjet odvijanja normalnog procesa endosomalnog recikliranja (tablica 9) [264, 279]. Ranije smo pokazali da MCMV infekcija potiče porast izražaja RFFL ligaze (slika 26A), dok ovi rezultati pokazuju utjecaj infekcije na status ubikvitinilacije EHD1 i Rab11-FIP1 (slika 30).



**Slika 30. Ubikvitinilacija EHD1 i Rab11-FIP1 u neinficiranim stanicama i u ranoj fazi infekcije s wtMCMV.** (A, C) Kinetika ukupnog izražaja EHD1 (A) i Rab11-FIP1 (C) proteina u NIH3T3 stanicama inficiranim MCMV-om. Lizati su skupljeni u navedenim vremenskim točkama, a ispitivani proteini su vizualizirani pomoću odgovarajućih primarnih i sekundarnih protu-kunićjih HRP-konjugiranih protutijela. (B, D) NIH3T3 HA-Ub stanice su inducirane doksiciklinom (2 µg/ml). te su nakon 24 sata inficirane wtMCMV (10 MOI), ili su ostale neinficirane. Nakon 16 sati, 10 % pojedinog uzorka je lizirano je pomoću RIPA pufera (WCL - ukupni stanični lizat), dok je ostalih 90 % lizirano u 0,5 ml 1 % NP40 pufera za lizu i korišteno za imunoprecipitaciju Ub molekula pomoću protu-HA protutijela. Western blotom je analiziran izražaj ukupnih (WCL), te ubikvitiniliranih (IP) EHD1 (B), ili Rab11-FIP1 (D) molekula pomoću odgovarajućih primarnih i sekundarnih protu-kunićjih HRP-konjugiranih protutijela. Izražaj pIE1 je korišten kao kontrola infekcije, a izražaj β-aktina kao kontrola nanosa. Prikazan je reprezentativni rezultat od 4 neovisnih pokusa za EHD1, odnosno 3 neovisna pokusa za Rab11-FIP1. (HC – engl. *heavy chain* predstavlja teške lance protu-HA protutijela u uzorcima koji su bili imunoprecipitirani); ∅ - kontrolni uzorak - NP40 bez stanica, samo protu-HA i protein-A sefaroza.

Iako se ukupni izražaj EHD1 ne mijenja značajno u MCMV inficiranim stanicama (slika 30A), možemo uočiti zamjetno smanjenje ubikvitinilacije EHD1 u uzorcima dobivenima nakon 16 sati MCMV infekcije



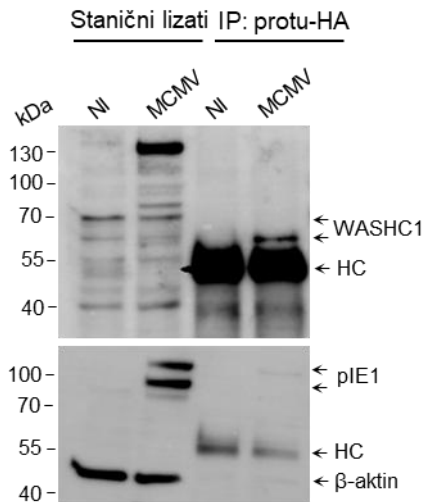
(slika 30B). Održavanje stalne količine proteina u stanicama tijekom svih faza infekcije i istovremena promjena ubikvitinilacijskoga statusa upućuje, kao i kod Rabex5, na regulacijsku prirodu prisutne posttranslacijske modifikacije. Stoga rezultat ukazuje da se u MCMV infekciji smanjuje ubikvitinilacija EHD1 proteina, što za posljedicu može imati njegovu smanjenu funkciju u procesu endosomalnog recikliranja.

S druge strane, ukupni izražaj Rab11-FIP1 također se značajno ne mijenja tijekom infekcije MCMV-om (slika 30C), ali niti njegov ubikvitinilacijski status (slika 30D). Stoga možemo pretpostaviti da promjena aktivnosti Rab11-FIP1 putem ubikvitinilacijskog statusa nije jedan od mehanizama kojima MCMV remeti endosomalno recikliranje.

WASHC1 predstavlja ključni regulator endosomalne tubulacije te kao dio SHRC (WASH) kompleksa djeluje u suradnji s retromerom i Arp2/3 kako bi potaknuo nukleaciju aktina na mjestu deformacije membrane i omogućio elongaciju, a kasnije i otcjepljivanje reciklirajućeg tubula (tablica 11). Aktivacija WASHC1 se odvija putem K63-vezane ubikvitinilacije pomoću TRIM 27 ligaze, dok deubikvitinilaciju WASHC1 provodi USP7. Održavanje uravnotežene ubikvitinilacije i deubikvitinilacije WASHC1 proteina nužno za normalno funkcioniranje endosomalnog reciklirajućeg sustava [169, 171]. Naši rezultati ukazuju na nepromijenjenu razinu ukupnog WASHC1 u MCMV inficiranim stanicama tijekom rane faze infekcije (slika 31, WCL), što je slično kao i kod drugih praćenih proteina. Međutim, imunoprecipitacija iz lizata inficiranih NIH3T3 HA-Ub stanica otkrila je značajno povišenje razine ubikvitiniliranog WASHC1 u MCMV-inficiranim stanicama u odnosu na neinficirane stanice (slika 31, IP). S obzirom na stabilne razine ukupnog WASHC1, zaključujemo da povišena ubikvitinilacija ne predstavlja signal za razgradnju, već regulacijsku posttranslacijsku modifikaciju. Stoga ovaj rezultat sugerira da MCMV modulira ubikvitinilacijski status WASHC1 proteina, čime narušava aktivnost WASH kompleksa i onemogućava odcjepljivanje tubula te nastanak transportnih vezikula. Ovakva modulacija bi time pogodovala retenciji membrana endosomalnog sustava unutar područja AC-a, osiguravajući virusu strukturne komponente potrebne za procese sekundarnog omatanja [90].

Općenito, navedeni rezultati ukazuju da MCMV selektivno mijenja ubikvitinilacijski status proteina ključnih za endosomalno recikliranje, pri čemu promjene nisu posljedica varijacija u njihovoj ukupnoj razini unutar stanice. Iako nismo uočili promjenu ubikvitinilacije Rab11-FIP1 proteina, pojačana ubikvitinilacija Rabex5 i smanjena ubikvitinilacija EHD1 tijekom rane faze infekcije upućuju na njihovu ulogu u narušavanju recikliranja proteina ovisnih o tim efektorima. Nadalje, pojačana ubikvitinilacija WASHC1 proteina upućuje na narušavanje procesa nastanka i odcjepljivanja endosomalnih tubula u MCMV – inficiranim stanicama. Naime, potrebno je naglasiti da ubikvitinilacija WASHC1 djeluje poput reostata – i prevelika i premala ubikvitinilacija narušava njegovu ulogu u elongaciji i otcjepljivanju tubula [265]. Stoga pretpostavljamo da virus koristi ciljanu modulaciju ubikvitinilacije kao strategiju za preoblikovanje

endosomalnog sustava domaćina na način koji odgovara sklapanju AC-a i osiguravanju materijala za sekundarno omatanje viriona. U tom procesu WASHC1 bi mogao imati značajnu ulogu te smo ga odlučili dodatno istražiti.

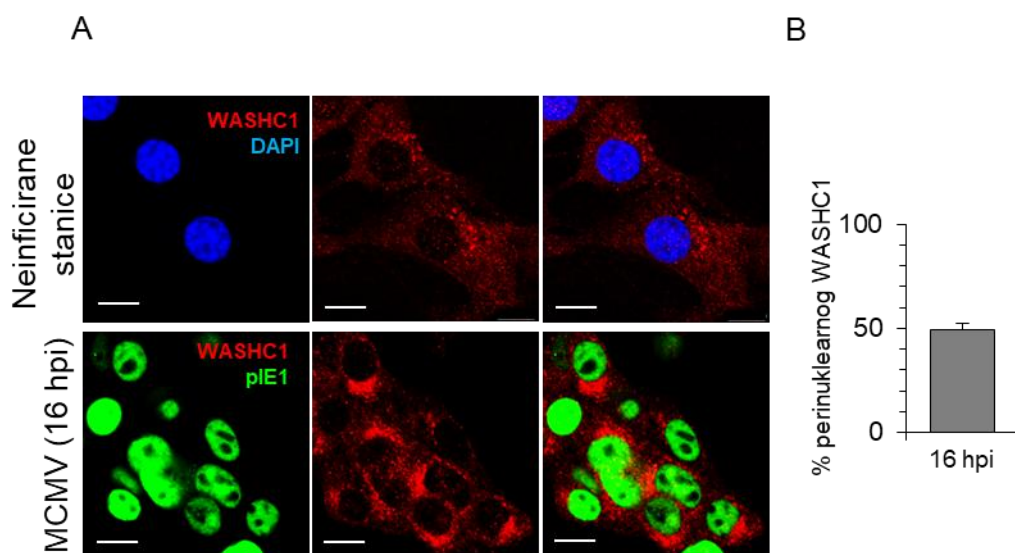


**Slika 31. Ubikvitinilacija WASH1 u neinficiranim stanicama, te u ranoj fazi infekcije s wtMCMV.** NIH3T3 HA-Ub stanice su inducirane doksiciklinom (2 µg/ml), te su nakon 24 sata inficirane wt MCMV (10 MOI), ili su ostale neinficirane. Nakon 16 sati, 10% pojedinog uzorka je lizirano je pomoću RIPA pufera (WCL-ukupni stanični lizat), dok je ostalih 90 % lizirano u 0,5 ml 1 % NP40 pufera za lizu i korišteno za imunoprecipitaciju Ub molekula pomoću anti-HA protutijela. Western blotom je analiziran izražaj ukupnih (WCL), te ubikvitiniliranih (IP) WASHC1 molekula pomoću protu-WASHC1 protutijela i HRP-konjugiranog sekundarnog protu-mišjeg protutijela. Izražaj pIE1 je korišten kao kontrola infekcije, a izražaj β-aktina kao kontrola nanosa. Prikazan je reprezentativni rezultat od 6 neovisnih pokusa. (HC – engl. *heavy chain* i predstavlja teške lance protu-HA protutijela u uzorcima koji su bili imunoprecipitirani); Ø - kontrolni uzorak - NP40 bez stanica, samo protu-HA i protein-A sefaroza.

#### 4.5. Uloga WASHC1 u nastanku AC-a u stanicama inficiranim mišjim citomegalovirusom

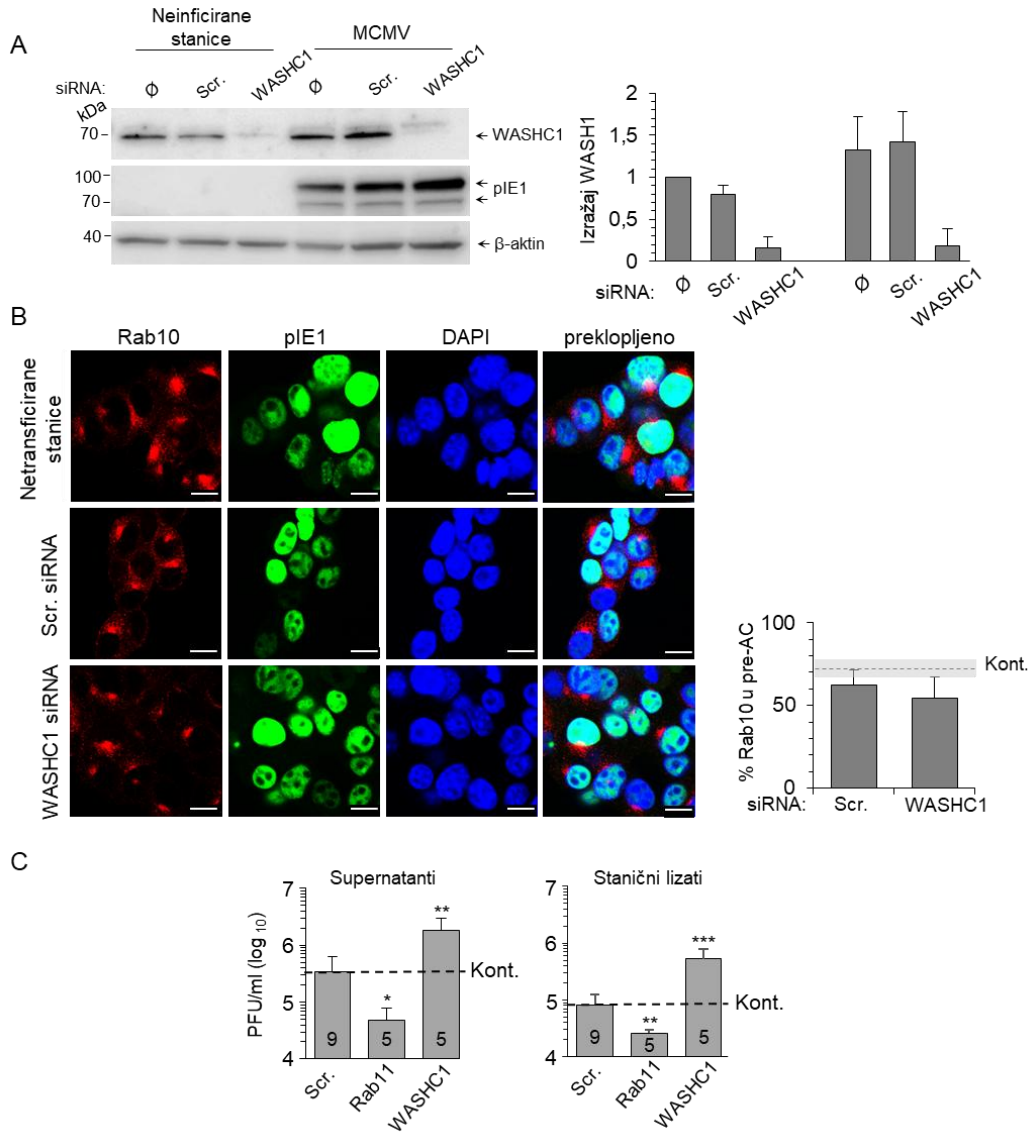
U našim ranijim istraživanjima smo pokazali da jedan od ključnih mehanizama uključenih u stvaranje AC-a uključuje prekomjerno stvaranje Rab10-pozitivnih elongiranih tubula na endosomalnim membranama, u procesu koji je potaknut djelovanjem SNX27:Retromer:ESCPE-1 kompleksa [90]. U fiziološkim uvjetima, tubuli nastali ovim putem odcjepljuju se uz pomoć WASHC1, koji potiče polimerizaciju aktina, produljenje tubula te njihovo odvajanje od membrane [169, 265]. S obzirom na prethodno pokazano povećanje ubikvitinilacije proteina WASHC1 u MCMV-inficiranim stanicama, odlučili smo utišavanjem njegovog izražaja pomoću siRNA tehnologije ispitati njegov značaj u procesu nastanka AC-a.

U tu svrhu, najprije smo imunofluorescentnom i konfokalnom mikroskopijom pratili promjenu smještaja WASHC1 u ranoj fazi MCMV infekcije u usporedbi sa neinficiranim stanicama. U skladu s očekivanjima, WASHC1 je u oko 50% inficiranih stanica bio nakupljen perinuklearno, odnosno vizualiziran u području pre-AC-a (slika 32). To je najvjerojatnije posljedica pojačanog vezivanja WASHC1 proteina na endosomalne membrane u području pre-AC-a, što je u skladu s pretpostavkom da WASHC1, kao dio WASH multiproteinskog kompleksa, međudjeluje sa VPS35 komponentom retromera za koji je također ranije pokazano da se nakuplja u tom dijelu [90].



**Slika 32. Nakupljanje WASHC1 u perinuklearnom području MCMV inficiranih NIH3T3 stanica.** (A) NIH3T3 stanice su inficirane s wtMCMV-om (10 MOI), ili su ostale neinficirane. Nakon 16 sati, stanice su fiksirane i permeabilizirane, te su pIE1 (zeleno), WASHC1 (crveno) i jezgra (DAPI-plavo) vizualizirani odgovarajućim primarnim i sekundarnim fluorescentno obilježenim protutijelima. Mjerna crta – 10  $\mu$ m. (B) Kvantifikacija perinuklearno nakupljenog WASHC1. Rezultat je prikazan kao srednja vrijednost  $\pm$  SD iz tri neovisna pokusa (prebrojano 10 vidnih polja).

Potom smo odlučili pomoću siRNA metode utišati izražaj WASHC1 u MCMV inficiranim i neinficiranim NIH3T3 stanicama kako bismo utvrdili ima li WASHC1 ulogu u biogenezi AC-a. Prethodno smo Western blotom potvrdili učinkovitost utišavanja prikazivanjem izražaja WASHC1 proteina u neinficiranim i MCMV-inficiranim stanicama u usporedbi sa netransficiranim stanicama i stanicama tretiranim kontrolnom (Scr., engl. *scrambled*) siRNA (slika 33A). Analizom izražaja pIE1 potvrdili smo učinkovitost infekcije, a izražaj  $\beta$ -aktina koristili smo kao kontrolu nanosa.



**Slika 33. Utjecaj WASHC1 na nakupljanje Rab10 u području pre-AC-a.** (A-C) NIH3T3 stanice su transficirane sa scr. siRNA, WASHC1 siRNA ili ostavljene netransficirane. Nakon 48 sati zaražene su ili ne s MCMV-om te po isteku dodatnih 16 sati lizirane za analizu western blotom (A) ili fiksirane i permeabilizirane za analizu konfokalnom mikroskopijom (B-C). (A) Nakon izolacije proteina u naznačenim vremenskim točkama, elektroforeze u denaturirajućim uvjetima te transfera na membranu, provedena je imunodetekcija WASHC1, pIE1 i β-aktina kemiluminiscencijom. Detekcija β-aktina je korištena kao kontrola nanosa, a pIE1 kao kontrola infekcije. Graf prikazuje srednje vrijednosti ± SD signala u odnosu na neinficirane i netretirane uzorke (dva neovisna pokusa). (B) IF analizom vizualizirani su Rab10 (crveno), pIE1 (zeleno) i DAPI (plavo). (C) Postotak stanica zaraženih MCMV-om (pIE1-pozitivne) s perinuklearnim nakupljanjem Rab10 u stanicama tretiranim Scr. siRNA i WASHC1 siRNA 16 hpi, prikazano kao srednja vrijednost ± SD iz 4 nezavisna pokusa (10 vidnih polja). Mjerna crta – 10 μm. (D) Nakon 48 sati djelovanja Scr. siRNA, WASHC1 siRNA i Rab11 siRNA stanice su zaražene MCMV-om (MOI 10) te su nakon dodatnih 48 hpi prikupljeni supernatanti i stanični lizati. Brojnost infektivnih viriona određena je

pomoću testa analize plakova na mišjim embrionalnim fibroblastima. Prikazana je srednja vrijednost  $\pm$  SD. Broj nezavisnih pokusa je prikazan unutar stupaca. Statistička značajnost određena je Mann-Whitneyjevim testom (\*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001). Kont. - netransf. stanice.

Stoga smo dalje nastavili s testiranjem utjecaja WASHC1 na nastanak AC-a. Metodom imunofluorescentne konfokalne mikroskopije ispitali smo kako će utišavanje WASHC1 djelovati na nakupljanje Rab10 u perinuklearnom području stanice, odnosno području koje u inficiranim stanicama odgovara pre-AC-u. NIH3T3 stanice su transficirane sa scr. siRNA, WASHC1 siRNA ili su ostavljene netransficirane, a zatim inficirane MCMV-om. 16 hpi su fiksirane i permeabilizirane te su pripadajućim primarnim i sekundarnim fluorescentno obilježenim protutijelima vizualizirani Rab10 (crveno), IE1 (zeleno) i jezgra (DAPI – plavo) (slika 33B). Rezultat pokazuje da nije došlo do promjene zastupljenosti inficiranih stanica s Rab10 – pozitivnim nakupljanjem, kao biljegom pre-AC-a, između stanica koje nisu izražavale WASHC1 protein u usporedbi s kontrolnim stanicama. Stoga smo zaključili da WASHC1 nije nužan u procesu biogeneze AC-a, odnosno u onoj fazi njegovog razvoja koji podrazumijeva ekstenzivnu tubulaciju Rab10 – pozitivnih membrana. U sljedećem koraku smo željeli vidjeti da li WASHC1 ima neku ulogu u završnom procesu sklapanja viriona. U tu svrhu smo pomoću siRNA utišali WASHC1, ali i Rab11, GTP-azu koja je bitna u reguliranju prometovanja vezikula kroz ERC i prometovanja prema Golgijevu aparatu [264, 281]. Produkciju infektivnih MCMV viriona smo pratili testom analize plakova (slika 33C). Može se uočiti da je utišavanje WASHC1 čak i povećalo produkciju virusnih čestica otprilike pet puta u usporedbi s netransficiranim i scr. siRNA transficiranim stanicama (slika 33C). S druge strane, utišavanje Rab11 GTP-aze pomoću siRNA dovelo je do značajnog pada proizvodnje infektivnih MCMV viriona, u usporedbi s inficiranim netransficiranim i scr siRNA stanicama (slika 33C).

Dobiveni rezultati pokazuju da WASHC1 nije nužan za samu biogenezu AC-a, unatoč povećanoj ubikvitinilaciji WASHC1 proteina u MCMV – inficiranim stanicama, što narušava njegovu sposobnost tubulacije i otejepljivanja reciklirajućih tubula, te njegovom nakupljanju u području pre-AC-a. Naime, utišavanje njegova izražaja pomoću siRNA nije utjecalo na učestalost formiranja AC-a. Nasuprot tome, uzrokovalo je značajno povećanje proizvodnje infektivnih virusnih čestica. To sugerira da se virus, u svrhu povećane tubulacije endosomalnih membrana može aktivirati druge mehanizme koji, možda i jače potiču tubulaciju. Dapače, WASHC1 može djelovati kao ograničavajući faktor u kasnijim fazama virusnog ciklusa, osobito tijekom sklapanja viriona. Nasuprot tome, utišavanje Rab11 GTP-aze, ključnog regulatora reciklirajućeg endosomalnog prometa, rezultiralo je značajnim padom produkcije infektivnih čestica, potvrđujući njegovu ključnu ulogu u osiguravanju membranskih i proteinskih sastavnica potrebnih za učinkovito sklapanje viriona. Općenito, ovi rezultati upućuju na da MCMV modulira ubikvitinilacijski

status WASHC1 proteina ne kako bi potaknuo formiranje AC-a, već kako bi prilagodio dinamiku endosomalnog prometa i time optimizirao vlastitu replikaciju.

## **4.6. Uloga deubikvitinilazne aktivnosti proteina M48 MCMV-a u remodeliranju EE-ERC sučelja i biogenezi AC-a**

Poznato je da humani i mišji CMV izražavaju tegumentne proteine UL48 (HCMV), odnosno M48 (HCMV) koji posjeduju deubikvitinilaznu aktivnost [225, 231, 235]. UL48 ima sposobnost cijepanja K48 i K63 poliubikvitinskih lanaca, pri čemu pokazuje izraženiji afinitet prema K63 lancima [225]. Ova činjenica upućuje na mogućnost da DUB domena ima važnu ulogu u zaštiti, vjerojatno virusnih proteina, od degradacije, te značajnije utječe na modulaciju regulatornih svojstava ubikvitinilacijskih modifikacija. S druge strane, M48 protein MCMV-a pokazuje veći afinitet prema K48 poliubikvitinskim lancima [225], što upućuje na različite uloge ovih analognih domena unutar replikacijskog ciklusa. U svrhu istraživanja uloge deubikvitinilazne domene M48 proteina MCMV-a, odlučili smo ispitati njezin značaj u citopatogenim učincima u inficiranoj stanici te replikacijskom ciklusu virusa. Dosadašnja istraživanja su potvrdila neophodnost proteina UL48, za uspješnu replikaciju HCMV-a [78, 225]. Nadalje, iako je objavljeno da C24S mutacija u DUB regiji UL48 proteina HCMV-a 10 puta smanjuje stvaranje novih viriona [225], nakon analogne mutacije M48 proteina (C23S) potvrđeno je samo umjereno smanjenje replikacije M48<sup>C23S</sup> MCMV-a u usporedbi s wt MCMV-om [231].

U našem istraživanju smo uspoređivali učinak M48<sup>C23S</sup> MCMV-a (virus s mutacijom u DUB domeni koja narušava njegovu aktivnost) i wt MCMV-a na inficiranim fibroblastima. Pri tome smo imunoprecipitacijom, Western blot analizom i konfokalnom mikroskopijom pratili izražaj ključnih proteina virusnog replikacijskog ciklusa, učinkovitost nastanka pre-AC, ubikvitinilacijski status proteina uključenih u regulaciju endosomalnog prometovanja te učinkovitost endosomalnog recikliranja.

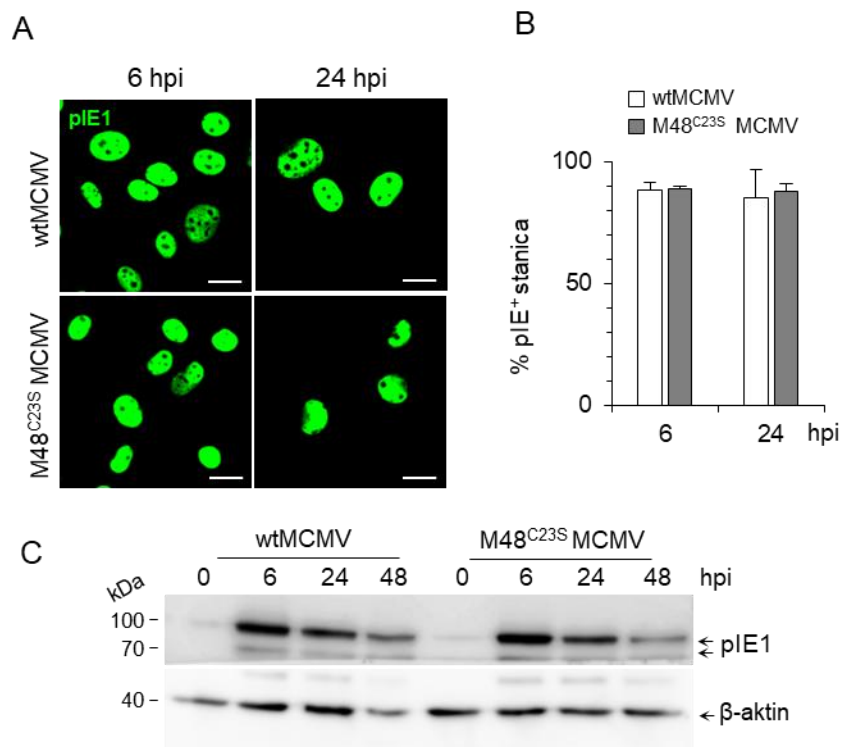
### **4.6.1. Značaj deubikvitinilazne domene proteina M48 u replikacijskom ciklusu mišjeg citomegalovirusa**

Kako bismo istražili učinak mutacije unutar funkcionalne DUB domene M48 proteina na replikacijski ciklus MCMV-a, pratili smo izražaj reprezentativnih proteina neposredno rane, rane i kasne faze replikacijskog ciklusa, te proizvodnju infektivnih viriona u M48<sup>C23S</sup> MCMV inficiranim stanicama.

#### 4.6.1.1. Značaj deubikvitinilazne domene proteina M48 na izražaj proteina neposredno rane, rane i kasne faze infekcije mišjim citomegalovirusom

Balb3T3 stanice inficirane su wtMCMV-om i M48<sup>C23S</sup> MCMV-om te je postotak stanične zastupljenosti ispitivanih proteina rane faze konfokalnom mikroskopijom praćen 6 i 24 hpi, dok je zastupljenost pM55, proteina kasne faze, praćena 48 hpi. Kinetika ukupnog izražaja virusnih proteina je praćena Western blotom, u vremenskim točkama koje pokrivaju početak infekcije, te ranu i kasnu fazu infekcije (6, 24 i 48 hpi).

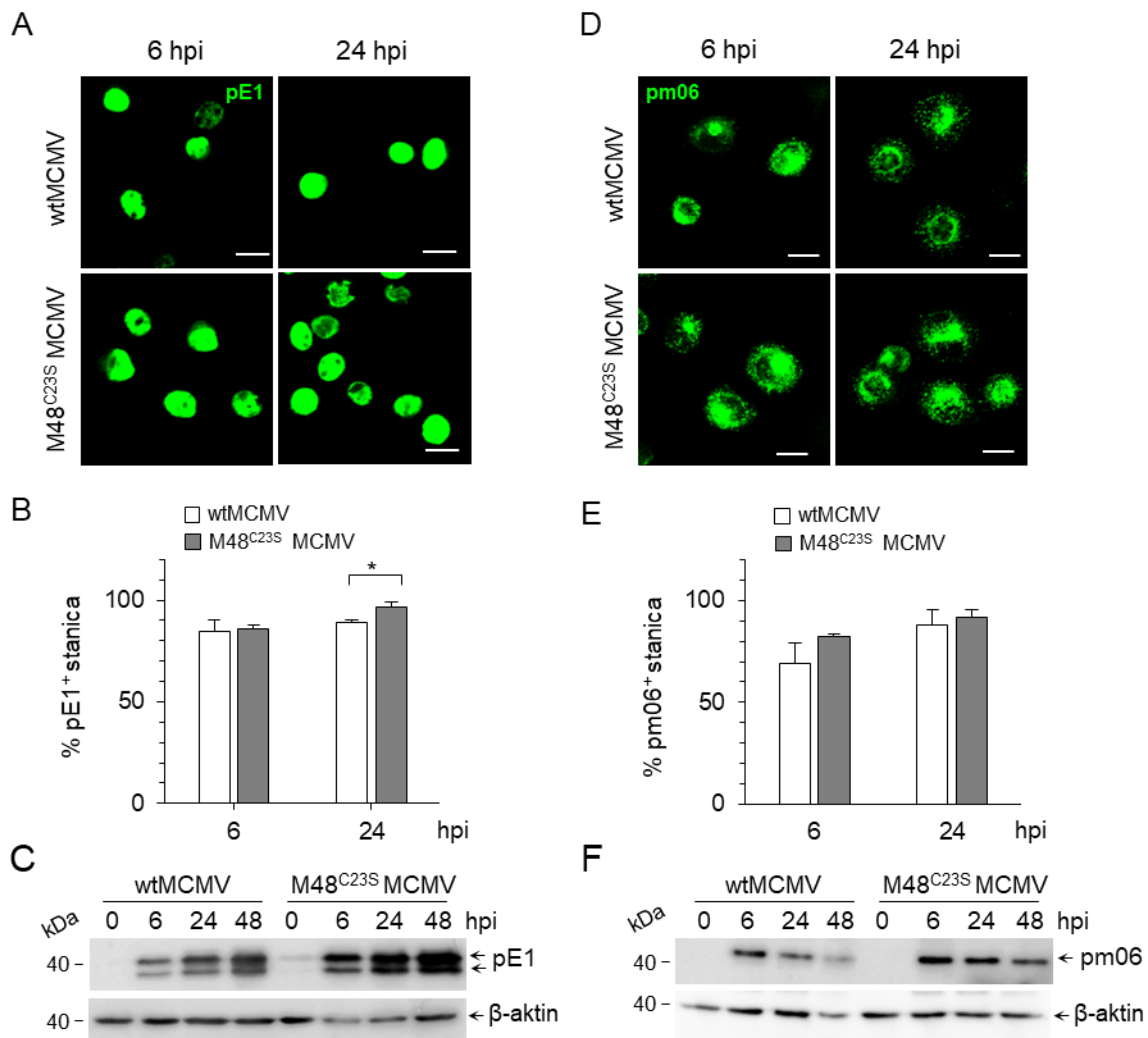
Naši rezultati pokazuju da funkcionalna mutacija u DUB domeni M48 proteina nije imala učinka na zastupljenost proteina neposredno rane faze infekcije, pIE1 (88,2 % pIE1 – pozitivnih stanica nakon infekcije wt MCMV-om te 88,8 % pIE1 – pozitivnih stanica nakon infekcije M48<sup>C23S</sup> MCMV-om) (slika 34A i 34B).



**Slika 34. Izražaj proteina pIE1 nakon infekcije stanica M48<sup>C23S</sup> MCMV-om.** (A) Balb3T3 stanice su inficirane wtMCMV, odnosno M48<sup>C23S</sup> MCMV (MOI 10). Nakon fiksacije i permeabilizacije, 6 hpi i 24 hpi, vizualiziran je izražaj pIE1 proteina imunofluorescentnom i konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta – 20 μm (B) Postotak stanica pozitivnih na izražaj pIE1 je prikazan grafički kao srednja vrijednost ± SD iz tri nezavisna pokusa. (C) Kinetika izražaja pIE1 metodom western blota. Nakon izolacije proteina u naznačenim vremenskim točkama, elektroforeze u denaturirajućim uvjetima te transfera na membranu, provedena je imunodetekcija pIE1 i β-aktina kemiluminiscencijom. Detekcija β-aktina je korištena kao kontrola nanosa. Prikazan je reprezentativan od 3 nezavisna pokusa.

Time rezultat ukazuje da funkcionalna DUB domena proteina M48 nije nužna za infekciju fibroblasta MCMV-om. Također, kinetika izražaja pIE1 je bila slična između wtMCMV i M48<sup>C23S</sup> MCMV inficiranih stanica, što je potvrđeno Western blotom tijekom 48 – satnog praćenja. Analizom izražaja pIE1 potvrdili smo učinkovitost infekcije, a izražaj β-aktina koristili smo kao kontrolu nanosa. (slika 34C).

Značajnije promjene nisu uočene niti nakon praćenja proteina rane i kasne faze MCMV infekcije (slika 35).



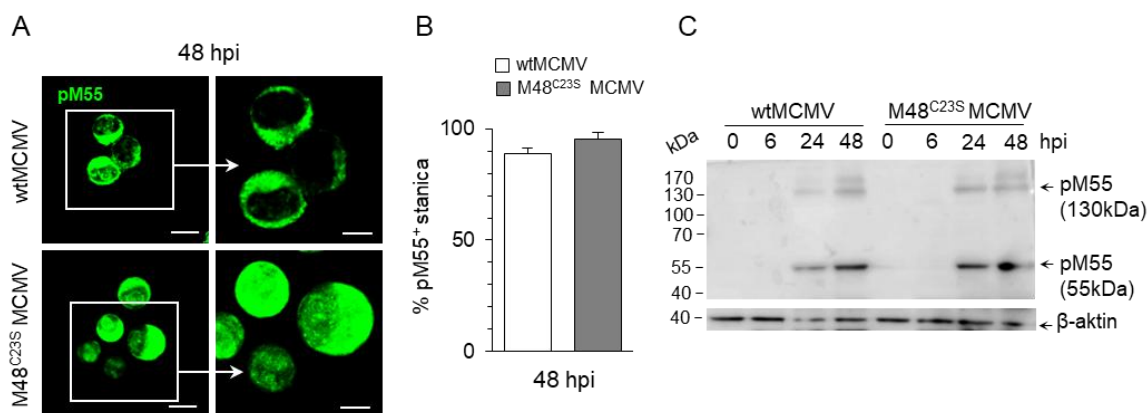
**Slika 35. Izražaj proteina pE1 i pm06 nakon infekcije stanica M48<sup>C23S</sup> MCMV-om.** (A, E) Balb3T3 stanice su inficirane wtMCMV, odnosno M48<sup>C23S</sup> MCMV (MOI 10). Nakon fiksacije i permeabilizacije, 6 hpi i 24 hpi, vizualiziran je izražaj proteina pE1 (A) i pm06 (D) imunofluorescentnom i konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta – 20 μm (B, E) Postotak stanica pozitivnih na izražaj pE1 (B), odnosno pm06 (E) prikazan je grafički kao srednja vrijednost ± SD iz tri nezavisna pokusa. (C, F) Nakon izolacije proteina u naznačenim vremenskim točkama, elektroforeze u



denaturirajućim uvjetima te transfera na membranu, provedena je imunodetekcija pE1, pm06 i  $\beta$ -aktina kemiluminiscencijom. Detekcija  $\beta$ -aktina je korištena kao kontrola nanosa. Prikazan je reprezentativan rezultat od 4 nezavisna pokusa.

Protein rane faze pE1 je izražavalo 84,8 % wt MCMV inficiranih stanica i 86 % M48<sup>C23S</sup> MCMV inficiranih stanica (6 i 24 hpi) (slike 35A i 35B), a Western blotom je pokazano samo malo povećanje izražaja pE1 (24 hpi) u stanica inficiranih M48<sup>C23S</sup> MCMV-om u usporedbi sa stanicama zaraženih kontrolnim virusom wt MCMV (slika 35C). Što se tiče pm06, proteina odgođene rane faze, utvrdili smo da je 68,8 % stanica zaraženih wt MCMV-om bilo pozitivno na izražaj pm06, u usporedbi s 82,1 % pm06 – pozitivnih stanica zaraženih mutantom M48<sup>C23S</sup> MCMV (slike 35D i 35E). U konačnici, Western blot analiza, kao i kod pE1 proteina je pokazala manje povećanje izražaja u uzorcima dobivenih iz stanica zaraženih virusom sa mutacijom u DUB domeni proteina M48 (slika 35F).

Na kraju smo pratili postotak zastupljenosti u inficiranim stanicama, kao i kinetiku izražaja proteina pM55 koji je inače sastavni dio virusne ovojnice, a izražava se u kasnoj fazi infekcije [75] (slika 36). Ponovno nismo uočili značajnije promjene u Balb3T3 stanicama zaraženima mutantom M48<sup>C23S</sup> MCMV. Tako je 48 hpi pM55 bio pozitivan u 88,6 % wt MCMV i 95,2 % M48<sup>C23S</sup> MCMV inficiranih stanica (slike 36A i 36B), dok western blot analiza nije ukazala na veću razliku u kinetici izražaja (slika 36C).

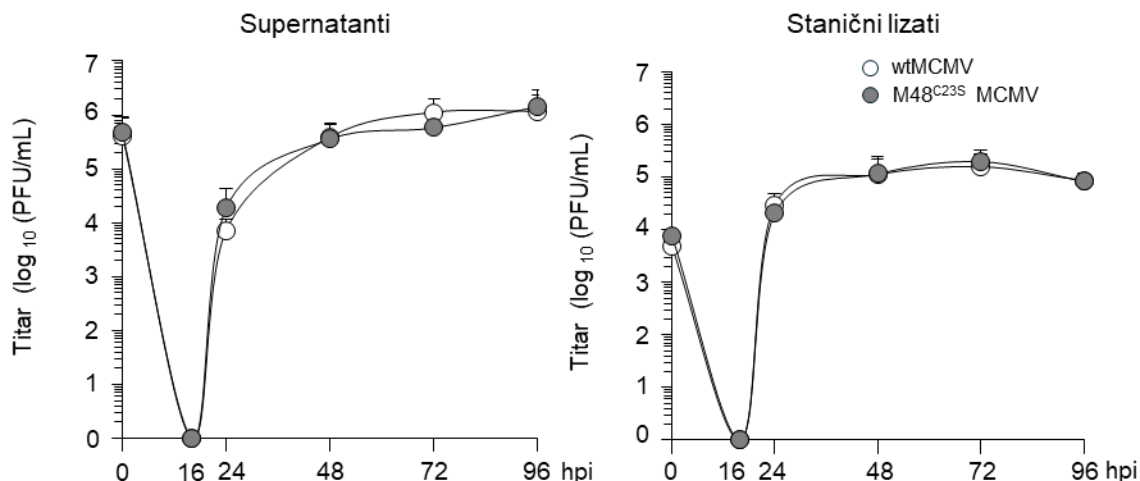


**Slika 36. Izražaj proteina pM55 nakon infekcije stanica M48<sup>C23S</sup> MCMV-om.** (A) Balb3T3 stanice su inficirane wt MCMV, odnosno M48<sup>C23S</sup> MCMV (MOI 10). Nakon 48 sati, stanice su fiksirane i permeabilizirane, a izražaj pM55 proteina vizualiziran je imunofluorescentnom i konfokalnom mikroskopijom. Mjerna crta – 20  $\mu$ m (B) Postotak stanica pozitivnih na izražaj pM55 je prikazan grafički kao srednja vrijednost  $\pm$  SD iz tri nezavisna pokusa (10 vidnih polja). (C) Nakon izolacije proteina u naznačenim vremenskim točkama, elektroforeze u denaturirajućim uvjetima te transfera na membranu, provedena je imunodetekcija pM55 i  $\beta$ -aktina kemiluminiscencijom. Detekcija  $\beta$ -aktina je korištena kao kontrola nanosa. Prikazan je reprezentativan rezultat od 4 nezavisna pokusa.

Iako smo u ovom dijelu istraživanja koristili samo neke reprezentativne MCMV proteine neposredno rane (pIE1), rane (pE1), odgođene rane (pm06) i kasne (pM55), dobiveni rezultati ukazuju da funkcionalna DUB domena proteina M48 nije nužna za samu infekciju te pokretanje i progresiju replikacijskog ciklusa virusa. Ipak, obzirom na blaga povećanja izražaja virusnih proteina u stanicama inficiranima M48<sup>C23S</sup> MCMV-om, nije isključeno da bi M48 mogao imati neku indirektnu ulogu u održavanju zalihe virusnih proteina. U svakom slučaju biti će potrebna daljnja istraživanja kako bi se detaljnije utvrdila uloga M48 DUB domene u ubikvitinilaciji i razgradnji virusnih proteina.

#### **4.6.1.2. Značaj deubikvitinilazne domene proteina M48 na proizvodnju novih virusnih čestica mišjeg citomegalovirusa**

Do sada prikazani rezultati upućuju da DUB domena proteina M48 nije ključna ni za uspostavu infekcije, niti za napredovanje virusnog replikacijskog ciklusa. Preostali ključni događaj u tijeku infekcije jest sklapanje i oslobađanje infektivnih virusnih čestica. Kako bi se istražila uloga DUB domene u procesu omatanja i izlaska infektivnih viriona, metodom analize plakova je procijenjen broj i infektivnost oslobođenih virusnih čestica prisutnih u supernatantima, u kojima su stanice uzgajane, ali i neoslobođenih viriona iz staničnih lizata. Balb3T3 stanice inficirane su wt MCMV-om i M48<sup>C23S</sup> MCMV-om te su stanični lizati i supernatanti skupljeni u različitim vremenima tijekom 96 – satne kinetike. Stanice MEF-a su potom inficirane prikupljenim uzorcima, a nakon 4 dana su se brojali nastali plakovi. Pri tome je pretpostavljeno da formiranje jednog plaka uzrokuje jedna infektivna jedinica virusnoga inokuluma (1 PFU, engl. *plaque forming unit*). Vrijednosti dobivene prebrojavanjem plakova prikazali smo krivuljama rasta MCMV – a iz kojih je vidljivo da se kinetike rasta wt MCMV i M48<sup>C23S</sup> MCMV značajnije ne razlikuje ni u slučaju otpuštenih viriona (slika 37, supernatanti), niti u slučaju sastavljenih ali neotpuštenih viriona (slika 37, stanični lizati). Dobiveni rezultati upućuju nas na zaključak da funkcionalnost DUB domene proteina M48 nije nužna za sekundarno omatanje viriona, kao ni za njihovo oslobađanje iz stanica.



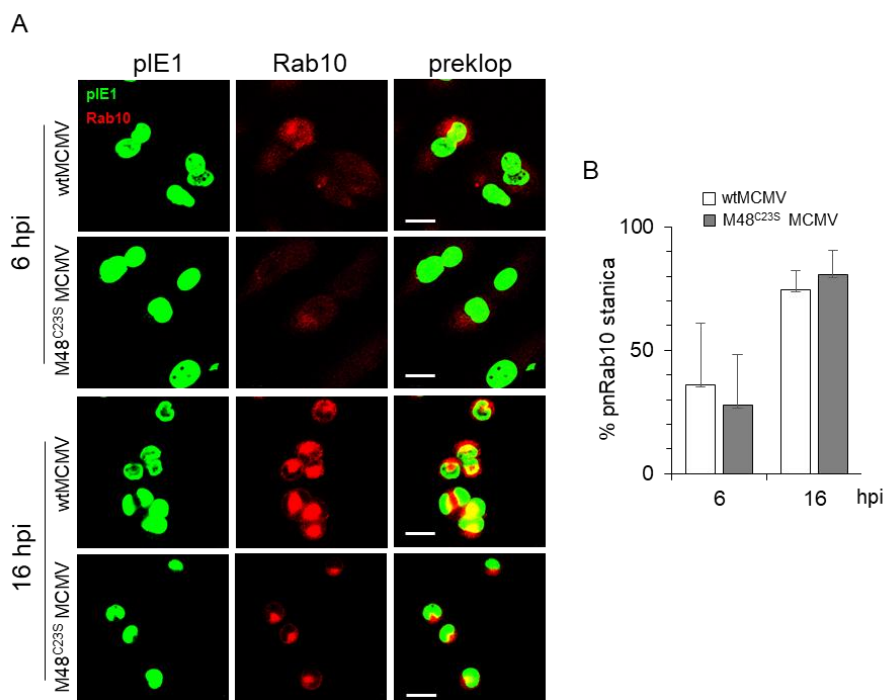
**Slika 37. Kinetika produkcije virusnih čestica nakon infekcije wt MCMV i M48<sup>C23S</sup> MCMV virusima.** Balb3T3 stanice su inficirane wt MCMV, odnosno M48<sup>C23S</sup> MCMV (10 MOI) virusima, te su u navedenim kinetikama prikupljeni supernatanti i stanični lizati. Proizvodnja viriona je određena je testom analize plakova na primarnim mišjim embrionalnim fibroblastima. Prikazane su srednje vrijednosti ± SD iz tri nezavisna pokusa, a statistička značajnost određena je Student-t testom.

Provedena istraživanja pokazala su da funkcionalnost DUB domene M48 proteina MCMV-a nije od presudne važnosti za uspješno odvijanje ključnih koraka virusnog replikacijskog ciklusa. Naime, mutacija u DUB domeni nije imala utjecaja na zastupljenost te obrazac i kinetiku izražaja ni ranih niti kasnih virusnih proteina. Također, rezultati analize plakova ukazuju da DUB domena nije nužna za odvijanje procesa sekundarnog omatanja viriona, kao niti za njihovo oslobađanje iz stanica, budući da nije bilo razlike između kinetika rasta wt i M48<sup>C23S</sup> MCMV-a.

Općenito, dobiveni podaci podupiru hipotezu da DUB domena M48 proteina MCMV-a nije esencijalna za produktivnu infekciju. Unatoč tomu, blago povišeni izražaj pojedinih virusnih proteina u stanicama inficiranim virusom s nefunkcionalnom DUB domenom otvara mogućnost da ona ipak ima modulacijsku ulogu u održavanju homeostaze virusnih proteina. Dodatna istraživanja usmjerena na interakcije M48 proteina s ubikvitinilacijskim putevima potrebna su da bi razjasnili potencijalnu regulatornu funkciju ove domene u finom podešavanju virusne replikacije.

#### **4.6.2. Značaj deubikvitinilazne domene proteina M48 na nakupljanje Rab10 u području pre-AC**

Prethodni rezultati ukazuju da DUB domena MCMV proteina M48 nema značajniju ulogu u odvijanju replikacijskog ciklusa mišjeg citomegalovirusa. Prema tome, za očekivati je i da se opsežno remodeliranje endosomanih membrana, koje se odvija u svrhu nastanka pre-AC i AC, provodi nesmetano čak i u stanicama zaraženima M48<sup>C32S</sup> MCMV-om. Naime, pravilan razvoj pre-AC je preduvjet za sintezu virusne DNA, a nastanak AC je neophodan za konačno sklapanje infektivnih viriona [90]. Ipak, kako bismo potvrdili našu pretpostavku, istražili smo učinkovitost nastanka pre-AC-a u M48<sup>C32S</sup> MCMV inficiranim stanicama, tijekom rane faze infekcije koristeći Rab10 GTP-azu kao biljeg odjeljka [75, 89, 91]. U tu svrhu, Balb 3T3 stanice smo inficirali wt MCMV-om i M48<sup>C32S</sup> MCMV-om, te smo konfokalnom mikroskopijom vizualizirali nakupljanje Rab10 u perinuklearnom području, uz istovremeno praćenje izražaja pIE1 proteina kao kontrole infekcije. Nakon 6 i 16 hpi prebrojane su inficirane stanice s perinuklearno nakupljenim Rab10. Rezultati pokazuju da je 6 hpi Rab10 bio prisutan u području pre-AC-a u 36 % wt MCMV inficiranih stanica te u 27 % M48<sup>C32S</sup> MCMV inficiranih stanica (slika 38). U vremenskoj točki 16 hpi, nakupljanje Rab10 u pre-AC području zabilježeno je u 74 % wt MCMV inficiranih stanica i 80 % M48<sup>C32S</sup> MCMV inficiranih stanica (slika 38). Statistička analiza nije pokazala značajne razlike u broju formiranih AC-a između stanica inficiranih wt MCMV-om i M48<sup>C32S</sup> MCMV-om. Ipak, treba napomenuti da je signal Rab10-PD bio nešto slabiji u stanicama inficiranim MCMV mutantom s nefunkcionalnom aktivnošću deubikvitinilaze. Prema tome, na temelju navedenih podataka možemo zaključiti da DUB domena proteina M48 nije nužna u procesu formiranja funkcionalnog AC-a u MCMV inficiranim stanicama, iako nije isključeno da ima određenu ulogu u dinamici Rab10 – pozitivnih membrana na EE-ERC sučelju tijekom njihove ekspanzije i remodeliranja.



**Slika 38. Nakupljanje Rab10 u područje pre-AC u ranoj fazi infekcije M48C23S MCMV-om.** (A) Balb3T3 stanice su inficirane wtMCMV, odnosno M48<sup>C23S</sup> MCMV (10 MOI). Stanice su fiksirane i permeablizirane 6 i 16 hpi, te je vizualiziran Rab10 (crveno) s pIE1 (zeleno, biljeg infekcije). Mjerna crta – 10  $\mu$ m. (B) Postotak inficiranih stanica kod kojih se Rab10 vizualizira u perinuklearnom (pn) području koje odgovara pre-AC. Prikazani su srednja vrijednost  $\pm$  SD tri nezavisna pokusa (10 vidnih polja).

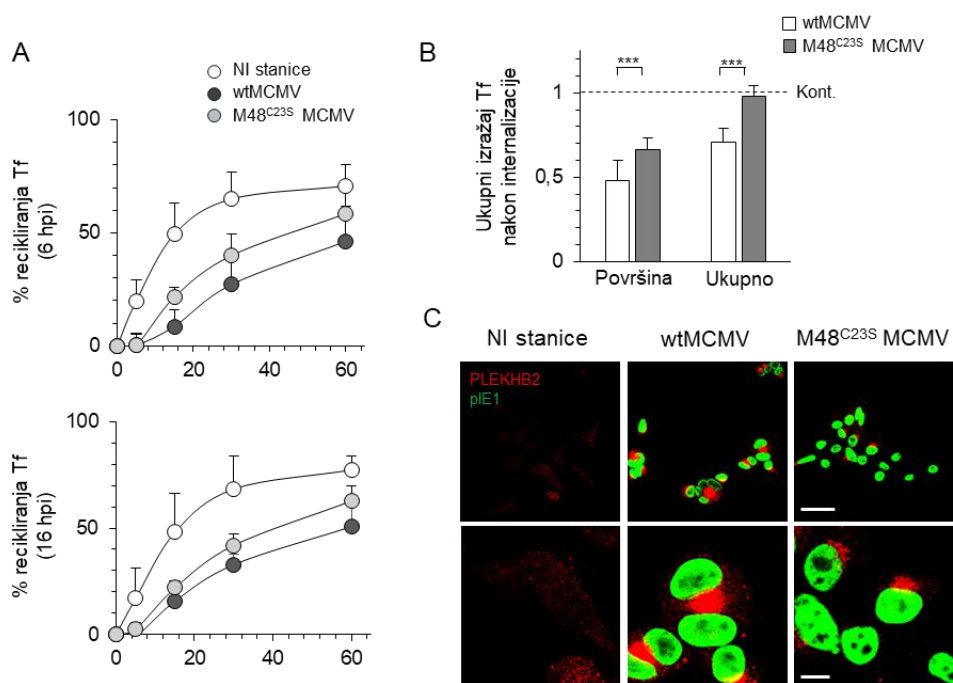
#### 4.6.3. Uloga deubikvitinilacijske domene proteina M48 u kinetici recikliranja transferinskog receptora u MCMV inficiranim stanicama

Recikliranje transferina ključan je proces u održavanju stanične homeostaze željeza jer omogućuje unos i preraspodjelu željeza vezanog za transferin. Nakon klatrinom posredovane endocitoze kompleksa transferina i njegova receptora (Tf-TfR), dolazi do njegova sortiranja i vraćanja na plazmatsku membranu dvama putevima: brzim, Rab4 – posredovanim putem iz ranih endosoma, ili sporim, Rab11 – reguliranim putem kroz ERC [254, 282]. Budući da ovi putevi zahtijevaju preciznu regulaciju endosomalnog prometa, recikliranje transferina često se koristi kao modelni sustav za proučavanje funkcionalnosti klatrin – ovisne internalizacije i recikliranja te kao pokazatelj disregulacija povezanih s različitim patofiziološkim stanjima, uključujući virusne infekcije.

Iz naših ranijih istraživanja je poznato da infekcija stanica MCMV-om dovodi do drastičnog usporavanja recikliranja transferina [74, 76]. Stoga smo analizirali kinetiku recikliranja fluorescentno konjugiranog transferina (AF<sup>488</sup> Tf) na wt MCMV i M48<sup>C23S</sup> MCMV inficiranim stanicama i to: 6 hpi, kada stvaranje pre-

AC-a tek započinje, i 16 hpi, kada je pre-AC prisutan u većini stanica [75]. Ukratko, u vremenima 6, odnosno 16 hpi, stanice su odvojene i inkubirane na 37 °C sa Tf-AF<sup>488</sup> (33,3 µg/ml) kako bi se unutarstanični odjeljci napunili ovim ligandom. Nakon određenih kinetika, tijekom kojeg smo dopustili recikliranje (0, 5, 15, 30 i 60 minuta), protočnom citometrijom smo kvantificirali preostali fluorescentni signal Tf-AF<sup>488</sup> u stanicama (slika 39). Recikliranje Tf-AF<sup>488</sup> u neinficiranim stanicama je korišteno kao dodatna kontrola. Učinkovitost recikliranja je kvantificirana gubitkom detekcije fluorescentnog signala u usporedbi s početnim signalom (t = 0'), koje je određen odmah nakon internalizacije Tf-AF<sup>488</sup>. Rezultati su prikazani kao promjena srednjeg intenziteta fluorescencije (MFI, engl. *mean fluorescent intensity*) za određeno vremensko razdoblje [254].

Rezultati dobivenim praćenjem intenziteta fluorescencije protočnom citometrijom pokazuju kako je brzina recikliranja transferina u fibroblastima inficiranim wt MCMV-om u usporedbi s neinficiranim stanicama drastično usporena (slika 39A), što je poznato i od prije [76]. Ipak, u stanicama inficiranim M48<sup>C23S</sup> MCMV uočeno je djelomično ubrzanje recikliranja u usporedbi s vrijednostima određenim u wt MCMV tretiranim stanicama.



**Slika 39. Kinetika recikliranja transferina u wtMCMV i M48<sup>C23S</sup> MCMV inficiranim fibroblastima.** Balb3T3 fibroblasti su inficirani wtMCMV, odnosno M48<sup>C23S</sup> MCMV (10 MOI), ili su ostali neinficirane. 6 hpi, odnosno 16 hpi, stanice su inkubirane u prisutnosti Tf-Alexa Fluor<sup>488</sup> (33,3 µg/ml, 45 min., 37 °C). Potom je dodan novi medij bez Tf (37 °C, 10 % FCS) kako bi se dopustilo recikliranje molekula Tf određeno vrijeme. Postotak recikliranih molekula određen je protočnom citometrijom, i kvantificiran prema sljedećoj formuli (% Tf<sub>Rec. (tx)</sub> = 100 – (MFI Tf<sub>t0</sub> – MFI Tf<sub>tx</sub>) / 100, a prikazana je statistička obrada 3 neovisna eksperimenta (sred. vrij. ± SD) (A). Nadalje, u istim

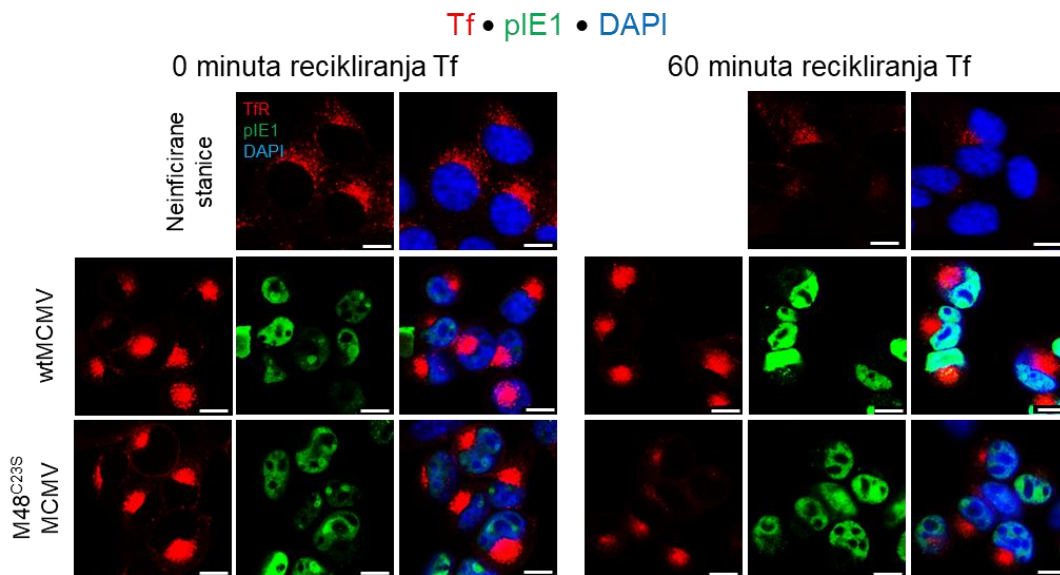
eksperimentima, protočnom citometrijom je određen površinski i ukupni izražaj internaliziranog transferina u neinficiranim stanicama, kao i nakon infekcije wtMCMV, odnosno M48<sup>C23S</sup> MCMV 6 hpi (B). Statistička značajnost određena je student t-testom (\*\*p<0.001). (C) Balb3T3 fibroblasti su inficirani wtMCMV, odnosno M48<sup>C23S</sup> MCMV (10 MOI), ili su ostali neinficirane. 16 hpi, stanice su inkubirane u prisutnosti Tf- Alexa Fluor<sup>555</sup> (33,3 µg/ml, 45 min., 37 °C). Nakon fiksacije i permeabilizacije stanica konfokalnom mikroskopijom vizualiziran je unutarstanični izražaj PLEKB2 (crveno) i pIE1 (zeleno). Mjerna crta: 50 µm (gornji red), 10 µm (donji red).

Za usporedbu, protočnom citometrijom smo također usporedili ukupni i površinski izražaj transferina nakon njegove internalizacije, također u neinficiranim stanicama te stanicama inficiranim wt MCMV-om i M48<sup>C23S</sup> MCMV-om tijekom 6 sati (slika 39B). Ovaj rezultat kvantifikacije izražaja Tf na njegovoj površini, ali i unutrašnjosti je posljedica učinkovitosti recikliranja Tf-TfR kompleksa u stanici. Naime, on zahtjeva oslobađanje neobilježenog staničnog Tf iz recikliranog Tf-TfR kompleksa uz istodobno vezivanje fluorescentnog Tf-AF<sup>488</sup> na površini. Pri tome smo pokazali kako su razine i površinskog i ukupnoga transferina smanjene kod stanica inficiranih wt MCMV-om i M48<sup>C23S</sup> MCMV-om, što ukazuje na poremećaj u reciklirajućem putu. Ipak, taj inhibicijski učinak je bio manji kod stanica inficiranim virusom s nefunkcionalnom DUB domenom (slika 39B).

Rezultat praćenja kinetike transferinskog recikliranja, kao i rezultat praćenja vezivanja Tf-AF<sup>488</sup> na transferinske receptore oslobođene od staničnog transferina, ukazuju da narušavanje DUB funkcije M48 proteina na neki način uzrokuje ubrzanje kinetike transferinskog recikliranja u usporedbi s wt MCMV inficiranim stanicama., iako te vrijednosti još ne dostižu one kod kontrolnih, odnosno neinficiranih stanica. Ranije smo pokazali pomoću konfokalne mikroskopije da funkcionalna DUB domena M48 proteina nije ključna za nastanak pre-AC, iako se ne smije zanemariti činjenica da je nakupljanje Rab10-PD bilo slabije nego u stanicama inficiranim wt MCMV (slika 38). Stoga smo kao biljeg pre-AC dodatno koristili protein PLEKHB2 (marker RE) [75]. Slično kao i u pokusu gdje se Rab10 koristio kao biljeg pre-AC pokazali smo da se pre-AC razvija u ranoj fazi infekcije u stanicama inficiranim s M48<sup>C23S</sup> MCMV, ali nakupljanje PLEKHB2 je ponovo bilo slabije nego u kontrolnim stanicama, što ukazuje da se pre AC slabije razvija nego nakon infekcije wt MCMV-om (slika 39C). Stoga, jedan od razloga učinkovitijeg recikliranja transferina u ranoj fazi infekcije s M48<sup>C23S</sup> MCMV može biti i manja ekspanzija EE-ERC membrana koja nastaje u svrhu nastanka pre-AC.

Iako smo kvantificirali da se recikliranje Tf slabije odvija u stanicama inficiranim MCMV mutantom sa nefunkcionalnom DUB domenom, željeli smo učinak provjeriti i konfokalnom mikroskopijom. Stoga smo stanice inficirali wt MCMV-om ili M48<sup>C23S</sup> MCMV-om, ili su ostale neinficirane. 6 sati kasnije, inficirane stanice smo inkubirali s Tf-AF<sup>555</sup> (33,3 µg/ml) kako bi došlo do internalizacije fluorescentno obilježenog

transferina. Nakon internalizacije dio stanica smo fiksirali (početno vrijeme, 0 minuta), a ostatak stanica smo dodatno inkubirali u čistom mediju narednih 60 minuta. Nakon 60 minuta, većina Tf-AF<sup>488</sup> je izreciklirala iz neinficiranih stanica, za razliku od stanica inficiranih wt MCMV-om gdje se Tf-AF<sup>488</sup> i dalje uočava znatno nakupljen u području pre-AC-a, što je posljedica kočenja funkcije reciklirajućih odjeljaka. S druge strane, u M48<sup>C23S</sup> MCMV inficiranim stanica zaostalo vidno manje Tf-AF<sup>488</sup> (slika 40), što ukazuje da M48 DUB domena ima određenu ulogu u narušavanju staničnih puteva zaduženih za transferinsko recikliranje i potvrđuje rezultat dobiven protočnom citometrijom.



**Slika 40. Kinetika recikliranja transferina u wt MCMV i M48<sup>C23S</sup> MCMV inficiranim fibroblastima.** Balb3T3 fibroblasti su inficirani wtMCMV, odnosno M48<sup>C23S</sup> MCMV (10 MOI), ili su ostali neinficirane. 6 hpi stanice su inkubirane u prisutnosti Tf-Alexa Fluor<sup>555</sup> (33,3 µg/ml, 45 min., 37 °C) te je nakon isteka inkubacije dio stanica fiksiran i permeabiliziran. Ostatku stanica dodan je novi medij bez Tf (37 °C, 10 % FCS, 60 min.) kako bi se dopustilo recikliranje. Nakon fiksacije i permeabilizacije stanica konfokalnom mikroskopijom vizualiziran je unutarstanični izražaj Tf- Alexa Fluor<sup>555</sup> (crveno), pIE1 (zeleno) i DAPI (plavo). Mjerna crta – 10 µm.

Stoga možemo pretpostaviti da DUB aktivnost proteina M48 ima određenu ulogu u modulaciji endosomalnog reciklirajućeg aparata od strane MCMV-a. Taj učinak se može djelomično odnositi na ekspanziju reciklirajućih odjeljaka u svrhu nastanka pre-AC, iako učinak na ubikvitinilaciju staničnih proteina koji reguliraju recikliranje nije isključen.



#### **4.6.4. Uloga deubikvitinilazne domene proteina M48 u regulaciji ubikvitinilacije staničnih proteina koji reguliraju endosomalno recikliranje**

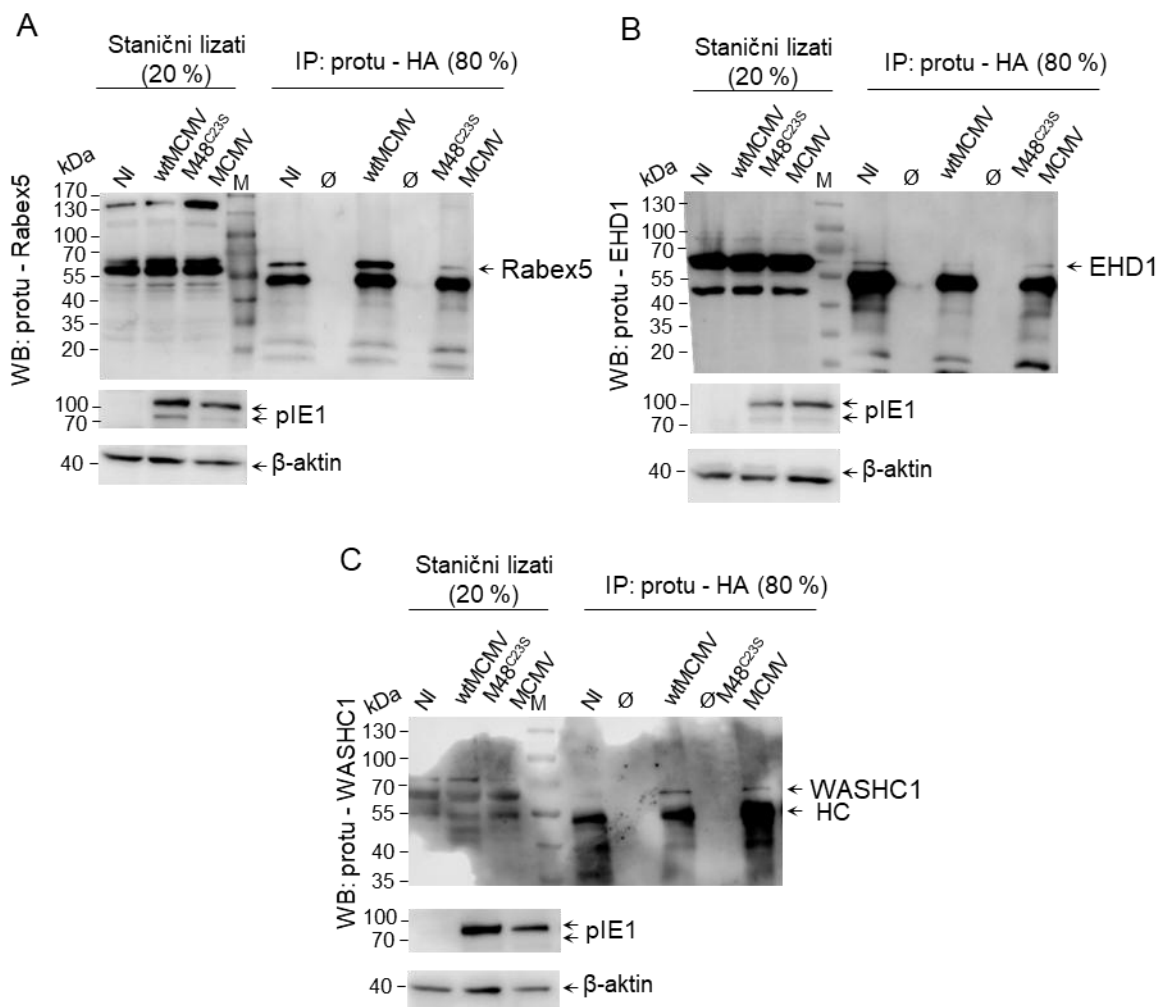
Dobiveni rezultati ukazuju kako deubikvitinilacijska domena proteina M48 sudjeluje u reorganizaciji membrana endosomalnog sustava u svrhu nastanka pre-AC-a, što se očituje djelomičnim ubrzanjem recikliranja transferina u M48<sup>C23S</sup> MCMV inficiranim stanicama (slika 39). Kako smo ranije naglasili, nije isključeno da upravo MCMV protein M48 može regulirati i ubikvitinilacijski status, a time i aktivaciju određenih staničnih proteina koji reguliraju endosomalno recikliranje. Naime, ranije smo pokazali smo da se razina ubikvitinilacije može mijenjati u određenim endosomalnim proteinima kao posljedica infekcije wtMCMV-om (slika 29, 30 i 31). Stoga se postavlja pitanje sudjeluje li deubikvitinilazna domena M48 proteina u toj modulaciji ubikvitinilacije.

U tu svrhu usporedili smo ubikvitinilacijski status Rabex5, EHD1 i WASHC1 proteina u wtMCMV i M48<sup>C23S</sup> MCMV inficiranim NIH3T3 stanicama, dok su neinficirane stanice korištene kao kontrola. NIH3T3 fibroblasti su transficirani s pRK5-Ub-HA wt plazmidom, te su nakon 24 sata stanice inficirane ili su ostale neinficirane. Potom su, iz staničnih lizata, pomoću protu-HA protutijela imunoprecipitirani ubikvitinilirani proteini, odnosno proteini koji su u međuvremenu vezali HA-Ub konstrukt, a western blotom vizualizirani su ispitivani proteini.

Možemo uočiti da wtMCMV pojačava ubikvitinilacijski status Rabex5 proteina u ranoj fazi infekcije (16 hpi) (slika 40A). S druge strane, infekcija stanica s M48<sup>C23S</sup> MCMV rekombinantom koja kodira za M48 protein s nefunkcionalnom DUB domenom, uzrokovala je smanjenje ubikvitinilacije Rabex5 proteina, čak i ispod razine u neinficiranim stanicama (slika 41A). Ovaj rezultat je neočekivan, iako se ne može isključiti mogućnost da DUB domena proteina M48 na neki način indirektno utječe na ubikvitinilaciju, a time i na učinak Rabex5 proteina. Naime, kako je ranije napomenuto, u neinficiranim stanicama Rabex5 održava ravnotežu između ubikvitiniliranoga i neubikvitiniliranog oblika koja je potrebna za normalnu fiziologiju ranih endosoma [273]. Prema ovom rezultatu, infekcija MCMV-om povećava udio ubikvitiniliranog oblika Rabex5 u stanici, što bi moglo uzrokovati narušavanje njegove funkcije i posljedično dovesti do poremećaja normalnog sortiranja proteina namijenjenih recikliranju, a posljedično i smanjenog recikliranja Tf-TfR kompleksa, što smo pokazali u prošlom odjeljku. Ipak, bitno je napomenuti, da smo u ovom modelu transfekcije NIH3T3 stanica pRK5-Ub-HA wt plazmidom uočili veću razinu ubikvitinilacije Rabex5 nego u NIH3T3 HA-Ub staničnoj liniji (slika 29), što bi mogla biti i posljedica pristupa.

Sljedeći protein čiji smo ubikvitinilacijski status analizirali u ovisnosti o funkcionalnosti DUB domene proteina M48 bio je EHD1, poznat regulator formiranja i odcjepljivanja reciklirajućih tubula [264, 279]. U neinficiranim NIH3T3 stanicama transficiranim pRK5-Ub-HA wt plazmidom dio EHD1 proteina prisutan

je u ubikvitiniliranom obliku. Infekcija NIH3T3 HA-Ub stanica MCMV-om, osobito u kasnoj ranoj fazi (16 hpi), dovela je do deubikvitinilacije EHD1 proteina (slika 30B), što posljedično narušava njegovu funkcionalnost na membrani endosoma, a isto je potvrđeno i u ovom pokusu nakon transfekcije NIH3T3 fibroblasta pRK5-Ub-HA wt plazmidom (slika 41B). Stoga nije isključeno da MCMV pomoću proteina M48 deubikvitinilira EHD1 protein i time narušava njegovu funkciju u stvaranju reciklirajućih tubula, time i ometa endosomalno recikliranje. Naime, u stanicama inficiranim virusom s mutacijom u DUB domeni M48 proteina opažamo pojačanu ubikvitiniranost EHD1 u odnosu na stanice inficirane wtMCMV-om.



**Slika 41. Ubikvitinilacija staničnih proteina u neinficiranim stanicama, te u ranoj fazi infekcije wt MCMV i M48<sup>C23S</sup> MCMV-om.** NIH3T3 su transficirane s pRK5-Ub-HA wt plazmidom, te su nakon 24 sata inficirane wt MCMV, odnosno M48<sup>C23S</sup> MCMV (10 MOI), ili su ostale neinficirane. Nakon 16 sati, 20 % pojedinog uzorka je lizirano pomoću RIPA pufera (WCL-kompletni stanični lizat), dok je ostalih 80 % lizirano u 0,2 ml 1 % NP40 pufera za lizu i korišteno za imunoprecipitaciju pomoću protu-HA protutijela i protein-A sefaroze za imunoprecipitaciju (IP) ubikvitiniliranih molekula. Izražaj ukupnih (lijevi dio membrane), te ubikvitiniliranih Rabex5 (A), EHD1 (B) i

WASHC1 (C) molekula (desni dio membrane) vizualiziran je odgovarajućim primarnim i sekundarnim POD-konjugiranim protutijelom i kemiluminiscencijom. Nadalje, u WCL je detektiran i izražaj pIE1 (kontrola infekcije) i  $\beta$ -aktina. (*HC* – *heavy chain* predstavlja teške lance protu HA protutijela). Naime protu-HA protutijelo (koje se koristilo u IP) je iz kunića, pa se ono, tijekom detekcije EHD1, WASH1 i Rabex5 (također kunićjim protutijelima i na kraju protu-kunićjom POD) detektira na membrani (M-marker,  $\emptyset$  – bez nanosa) .

U konačnici smo ispitali učinak funkcionalne mutacije u DUB domeni proteina M48 proteina na ubikvitinilaciju WASHC1, jednog od bitnih regulatora endosomalnoga prometovanja čija se aktivnost regulira ubikvitinilacijom [169, 171]. Prijašnji rezultati pokazuju da MCMV pojačava ubikvitinilacijski status WASHC1 proteina u NIH3T3 HA-Ub wt MCMV inficiranim stanicama (slika 31), čime narušava ravnotežu ubikvitiniliranoga i neubikvitiniliranoga WASHC1 proteina i time remeti dinamiku odcjepljivanja reciklirajućih tubula (odjeljak 2.1.2.2.2.). Povećanje ubikvitinilacije WASHC1 u pRK5-Ub-HA wt transficiranim i wt MCMV inficiranim NIH3T3 fibroblastima je potvrđeno i u ovom sustavu (slika 41C). Nadalje, ubikvitinilacijski status WASHC1 bio je sličan u wt i M48<sup>C23S</sup> MCMV-om inficiranim stanicama, ukazujući da M48 DUB domena ne smanjuje ubikvitinilaciju WASHC1 proteina (slika 41C).

Dobiveni rezultati ukazuju da postoji mogućnost da DUB domena M48 proteina sudjeluje u remodeliranju membrana endosomalnog sustava i kočenja recikliranja internaliziranih molekula modulacijom ubikvitinilacijskog statusa i narušavanjem funkcije pojedinih regulatornih proteina. Pokazali smo da MCMV infekcija mijenja ubikvitinilaciju Rabex5 i EHD1 proteina, pri čemu DUB domena M48 proteina ima važnu ulogu u održavanju njihove funkcionalne ravnoteže. Za razliku od toga, DUB aktivnost M48 proteina očekivano ne utječe na ubikvitinilacijski status WASHC1 proteina. Ovi rezultati upućuju da M48 posredovano moduliranje ubikvitinilacije endosomalnih regulatora predstavlja važan mehanizam kojim MCMV narušava endosomalno recikliranje i omogućuje reorganizaciju membrana tijekom formiranja pre-AC-a i AC-a.

## 5. RASPRAVA

U ovome radu istraživali smo značaj i ulogu ubikvitinilacije u različitim aspektima MCMV infekcije pri čemu smo se posebno usredotočili na događaje uključene u sklapanje AC-a i održavanje njegove strukture i funkcionalnosti, ali isto tako smo pratili i ulogu ubikvitinilacije u virusnom replikacijskom ciklusu te produkciji infektivnih viriona. U našim istraživanjima koristili smo dva pristupa: (1) inhibicija ubikvitinilacije pomoću PYR-41, kojom smo utvrdili ulogu ubikvitinilacije u odvijanju virusnoga replikacijskoga ciklusa, formiranju i održavanju funkcionalnosti AC-a, te sastavljanju i izlasku infektivnih virusnih čestica iz stanice, te (2) infekcija M48<sup>C23S</sup> MCMV-om s funkcionalnom mutacijom u DUB domeni M48 proteina, čime smo ispitali ulogu virusne deubikvitinilaze u replikacijskome ciklusu, te reorganizaciji membrana endosomalnoga sustava u svrhu nastanka AC-a. Time smo dobili bolji uvid u mehanizme kojima MCMV iskorištava ubikvitin-proteasomalni sustav (UPS, engl. *ubiquitin proteasoma system*) stanice kako bi poboljšao učinkovitost replikacije ali vjerojatno i izbjegao prepoznavanje od strane imunološkoga sustava domaćina.

### 5.1. Ubikvitinilacija je važna za uspostavljanje MCMV infekcije i odvijanje virusnog replikacijskog ciklusa

Ubikvitinilacija predstavlja važan mehanizam regulacije aktivnosti proteina koji kontroliraju endosomalno prometovanje [169, 171, 182]. Kako MCMV za stvaranje AC-a koristi membrane endosomalnoga sustava odlučili smo ispitati ulogu ubikvitinilacije u nastanku AC-a, ali i u ostalim fazama MCMV infekcije. U tu svrhu značajno smo inhibirali staničnu ubikvitinilaciju koristeći mali kemijski inhibitor E1 ubikvitin aktivirajućeg enzima, PYR-41 [259] te smo zatim pratili sposobnost virusa da uspostavi produktivnu infekciju. Obzirom na potvrđenu učinkovitost u kontrolnim (inhibicija degradacije p53 [260]) (slika 11A), ali i radnim uzorcima (slika 10), te zbog zadovoljavajuće vijabilnosti (slika 11B), u većini pokusa koristili smo koncentraciju PYR-41 od 15  $\mu$ M. Naime, uslijed inhibicije degradacije p53 i inhibicije aktivacije NF- $\kappa$ B puta u tretiranim stanicama se može potaknuti apoptoza [259], što smanjuje vijabilnost kod većih koncentracija. Općenito su rezultati ukazali na sudjelovanje ubikvitinilacije u svim vremenskim točkama virusnoga replikacijskog ciklusa, ali i u održavanju stabilnosti i funkcionalnosti AC-a.

Najprije, kako bismo utvrdili značaj ubikvitinilacije u uspostavi infekcije, pratili smo izražaj GFP proteina u PYR-41 tretiranim i MCMV-GFP inficiranim stanicama, u kojima se GFP nalazi pod kontrolom promotora gena IE1 [248]. Nadalje, izravno smo vizualizirali i izražaj MCMV proteina neposredno-rane faze, pIE1 u uvjetima inhibicije s PYR-41. Rezultati pokazuju kako primjena PYR-41 istodobno sa virusom gotovo u

potpunosti koči izražaj pIE1, čak i kod infekcije visokim količinama MCMV-a (10 MOI) (slika 11). To je djelomično u suprotnosti s prijašnjim istraživanjima koja su pokazala da MG132, inhibitor ubikvitin-proteasomalnoga sustava, sprječava izražaj pIE1 u HCMV inficiranim stanicama pri niskim (0,01 - 0,5), ali ne i pri visokim MOI vrijednostima (5 - 10) [258, 283]. Razlog ovog razilaženja rezultata kod infekcije većim MOI vrijednostima, može biti razlika u virusu, ali i korištenje različitih inhibitora. Naime, MG132 inhibira proteasomalni sustav [284], dok PYR-41 masovno inhibira ubikvitinilaciju u stanicama te samim time zahvaća širi spektar staničnih procesa [169, 171, 182]. Nadalje, istraživanja utjecaja MLN4924, inhibitora Cullin-RING ubikvitin ligaze, koji značajno inhibira replikacijski ciklus HCMV-a i MCMV-a, pokazuju da ovaj inhibitor ima utjecaj na izražaj pIE1 samo pri niskim MOI vrijednostima [258, 285, 286]. Stoga možemo pretpostaviti da uspostavljanje MCMV infekcije, kao i pokretanje sinteze pIE1 ne ovise o proteasomalnom sustavu, već o drugim staničnim procesima reguliranim ubikvitinilacijom koji ne uključuju Cullin-RING E3 ligaze.

Nekoliko je mogućih argumenata koji bi mogli objasniti mehanizam kojim bi ubikvitinilacija mogla biti ključna za pokretanje infekcije i sinteze novog pIE1 u stanici inficiranoj citomegalovirusom. Poznato je da je izražaj pIE1 reguliran MIEP (engl. *major immediate early promoter*) promotorom kojega neaktivnim održava kompleks represijskoga faktora Daxx, ali i histon deacetilaze (HDAC, engl. *histone deacetylase*) čija se aktivnost kontrolira ubikvitinilacijom [287]. S jedne strane, virusni tegumentni protein pp71 suprotstavlja se ovim antiviralnim mehanizmima. On usmjerava Daxx u proteasomalnu razgradnju, iako najvjerojatnije neovisnu o ubikvitinu [288, 289]. S druge strane, zanimljiva je činjenica je da sam pIE1 djeluje na uklanjanje represora s MIEP promotora i disocijaciju histona H2B s virusnog genoma [288]. Stoga možemo pretpostaviti da pIE1, koji dolazi ugrađen u infektivne virione, a sam pokazuje E3 ligaznu aktivnost [233], označava Daxx ubikvitinom te ga potom usmjerava prema proteasomu. Kao posljedica toga, dolazi do sinteze novih pIE1 koji dodatno poništavaju supresiju MIEP-a. Ovaj mehanizam pozitivne povratne sprege omogućava MCMV-u sintezu sve veće količine pIE1. Stoga pretpostavljamo da PYR-41 sprječava pIE1 posredovanu ubikvitinilaciju Daxx, čime se blokira daljnja transkripcija i sinteza novog pIE1. Moguće je i da izostanak sinteze pIE1 u stanicama s inhibiranom ubikvitinilacijom proizlazi iz činjenice da histon H2B, koji sprječava vezanje RNA polimeraze II, za otpuštanje s DNA zahtijeva monoubikvitinilaciju [233, 288, 290]. Pretpostavljamo da zbog inhibicije ubikvitinilacije, H2B ne disocira s genoma te tako blokira transkripciju i onemogućava sintezu pIE1.

Nažalost, zbog nedostupnosti specifičnog pIE3 protutijela, koji kontrolira pokretanje transkripcije ostalih MCMV gena [248, 263], nismo mogli ispitati učinak PYR-41 na njegovu sintezu, što bi moglo objasniti inhibiciju sinteze virusnih proteina rane i kasne faze, poput pE1, pM55 i pM74 (slika 15). Naime, pokazali smo da u uvjetima inhibirane ubikvitinilacije na početku rane faze infekcije (PYR-41 dodan 4 hpi) dolazi do zaustavljanja sinteze virusnih proteina rane i kasne faze (slika 15), dok se ranije sintetizirani proteini,

poput pIE1 nakupljaju jer se ne mogu razgraditi (slika 14). Time se blokira napredovanje replikacijskog ciklusa i smanjuje produkcija novih infektivnih čestica (slika 16). To je u skladu s ranijim istraživanjima u kojima su autori pratili učinak inhibitora proteasoma (MG132, Laktacistin) [258] i Cullin-RING ligaza (MLN4924) [285] na izražaj HCMV i MCMV proteina tijekom replikacijskog ciklusa virusa. Onemogućavanje degradacije i nakupljanje ranije sintetiziranog pIE1 u PYR-41 tretiranim stanicama 4 hpi, ukazuje da je i sam izražaj pIE1 reguliran ubikvitinilacijom. Pri tome bi intenzitet njegovog izražaja u određenoj kinetici bio konačni rezultat razlike sinteze i degradacije potaknute ubikvitinilacijom. Tako u ranoj fazi infekcije, kada sinteza pIE1 dominira u odnosu na degradaciju, njegova ukupna količina raste ili ostaje ista, iako se već tada uočavaju ubikvitinilirane pIE1 molekule. Međutim, na kraju rane faze, odnosno početku kasne faze infekcije, sinteza pIE1 se smanjuje, a prevladava degradacija. Stoga se 24 hpi uočava pad izražaja pIE1 (slika 14).

Sam mehanizam ubikvitinilacije proteina pIE1 mogao bi biti posredovan staničnim, ali i virusnim ubikvitinilazama. Naime, poznato je da neki virusni proteini citomegalovirusa mogu djelovati kao ubikvitinilaze, ali i deubikvitinilaze i time mijenjati ubikvitinilacijski status staničnih i virusnih proteina. Tako stanične Itch i Nedd4 E3 ligaze ubikvitiniraju gB glikoprotein virusne ovojnice (pM55 MCMV, UL55 HCMV) u svrhu njegove degradacije, dok UL42 HCMV-a sprječava ovu modifikaciju razgradnjom spomenutih ligaza, čime pridonosi stabilnosti proteina gB [235]. Nadalje, nije isključeno da su i drugi glikoproteini, poput pm74/UL74, ciljevi djelovanja staničnih E3 ligaza. Pored UL42, virus posjeduje i druge mehanizme zaštite, među kojima su M48 (MCMV), odnosno UL48 (HCMV) proteini s deubikvitinilacijskom aktivnošću. Naime, istraživanja na UL48 proteinu HCMV-a pokazala su da DUB domena sudjeluje u održavanju stabilnosti virusnih proteina [231, 235]. Tako deubikvitinilazna aktivnost UL48 štiti virusne proteine, poput pp150, ali i samog UL48, od razgradnje ubikvitin-proteasomalnim putem [235], ukazujući da bi ubikvitinilacija mogla djelovati kao važan regulator replikacije HCMV-a i MCMV-a. Međutim, prema našim rezultatima, u fibroblastima inficiranim M48<sup>C23S</sup> MCMV-om, mutantom s nefunkcionalnom DUB domenom, nije došlo do očekivanog smanjenja izražaja virusnih proteina, a analiza krivulje rasta također ukazuje da DUB domena M48 nije nužna za stvaranje infektivnih MCMV viriona (slika 37). S druge strane, treba ipak napomenuti da su slični eksperimenti pokazali umjereno smanjenje produkcije viriona u stanicama inficiranim M48<sup>C23S</sup> MCMV-om [231], odnosno UL48 ΔDUB HCMV-om [225]. Kod usporedbe s rezultatima kod HCMV-a, moguće objašnjenje podrazumijeva razlike u tipu virusa i vrsti mutacije. Nadalje, ne smije se zanemariti da DUB domene UL48 i M48 ne djeluju identično u virusnom ciklusu [225, 231]. Drugo objašnjenje podrazumijeva razliku u eksperimentalnim uvjetima. Naime, kako bi ovi pokusi bili usporedivi s ostalima u našem radu, mi smo koristili više MOI vrijednosti (MOI 10) nego autori nakon infekcije M48<sup>C23S</sup> MCMV-om, odnosno UL48 ΔDUB HCMV-om, u navedenim

ranijim istraživanjima (MOI 0,1 – 3 ili 5) [231, 291]. Stoga nije isključeno postojanje nekog kompenzacijskog mehanizma koji se događa pri visokom MOI kod mutiranog oblika MCMV-a.

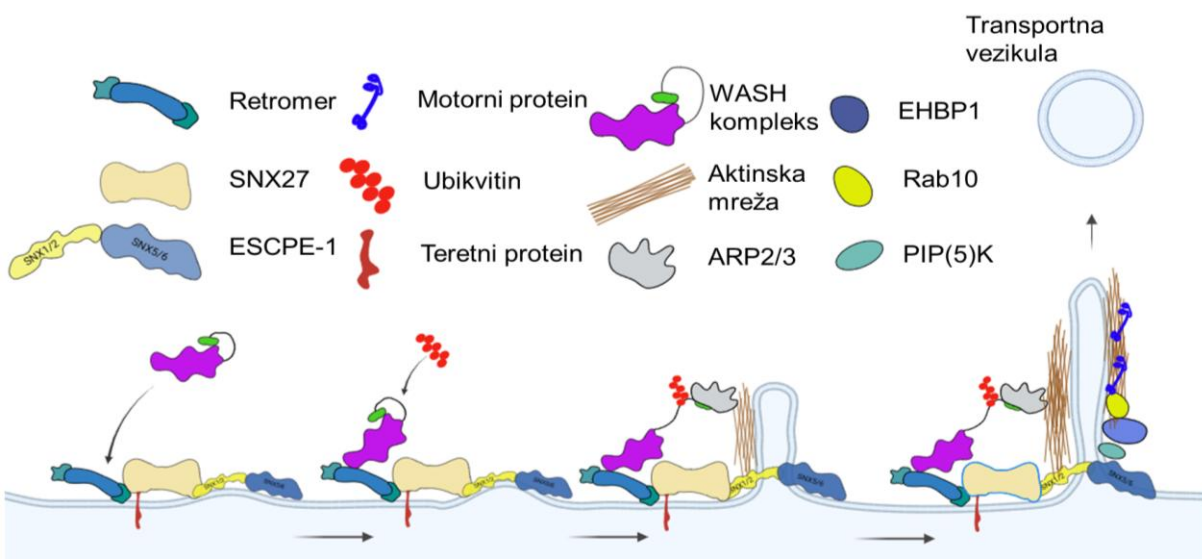
Pored DUB aktivnosti nekih virusnih proteina, jedan od mogućih mehanizama kojima MCMV održava stabilnost svojih proteina u inficiranoj stanici mogao bi biti i povećanje izražaja staničnih deubikvitinilaza. Naši rezultati pokazuju povišene razine USP8, koji djeluje u sklopu ESCRT-0 kompleksa [216], ali i porast USP6, USP15 i AMSH enzima, uključenih u regulaciju endosomalnog recikliranja, u MCMV inficiranim stanicama (slike 27 i 28). Obzirom da remodelirane membrane endosomalnog sustava čine važan dio odjeljka za sklapanje virusnih čestica (AC-a), možemo pretpostaviti da upravo pojačano djelovanje ovih DUB enzima sudjeluje u reorganizaciji membrana ovog kompleksnog sustava i nastanku AC-a. Nadalje, možemo spekulirati i da, čak i u odsutnosti funkcionalne M48 DUB domene, povećan izražaj barem nekih od ovih staničnih deubikvitinilaza, može štititi virusne proteine od stanične ubikvitinilacije i osigurati njihovu dovoljnu količinu za odvijanje replikacijskog ciklusa i sastavljanje viriona. Prema tome, pretpostavljamo da DUB domena M48 proteina ipak nije ključna za stabilnost virusnih proteina niti za uspješnu replikaciju, iako blago povećanje izražaja MCMV proteina rane i kasne faze u stanicama inficiranim M48<sup>C23S</sup> MCMV sugerira da bi mogla imati ulogu u regulaciji njihovog izražaja.

U konačnici, na temelju naših rezultata s PYR-41 i M48<sup>C23S</sup> MCMV-om, kao i prethodnih istraživanja, može se zaključiti da MCMV već u ranoj fazi infekcije reorganizira ubikvitin-proteasomalni sustav stanice u vlastitu korist kako bi osigurao kontinuitet virusnog replikacijskog ciklusa.

## **5.2. Ubikvitinilacija regulira stvaranje i održavanje funkcionalnog AC-a u stanicama inficiranim MCMV-om**

Ključni proces u nastanku pre-AC-a je reorganizacija i ekspanzija membrana EE-ERC-Golgi sustava u kompleksnu megastrukturu koja je temelj za nastanak zrelog odjeljka za sklapanje novih MCMV čestica [90, 261]. Jedan od prvih pokazatelja uspješnog stvaranja pre-AC je vizualizacija dinamičnih tubularnih Rab10 pozitivnih domena (Rab10-PD) u perinuklearnom području, a taj fenotip se održava i u zrelog AC-u. U neinficiranoj stanici, tubulacija započinje regrutacijom SNX27 na površinu membrane EE-a. Osim što može vezati internalizirane proteine koji će se reciklirati, SNX27 regrutira i kompleks retromera vezujući njegovu podjedinicu Vps35. Upravo time i započinje deformacija i zakrivljenje membrane EE-a, kao začetak reciklirajućeg tubula. S druge strane, SNX27 svojom FERM domenom vezuje SNX1 ili SNX2 protein koji stvara heterodimer s proteinom SNX5 ili SNX6. Ovaj heterodimer se naziva još i ESCPE-1 kompleks (engl. *endosomal sorting complex for promoting exit 1*). Sortirajuće neksine ESCPE-1 kompleksa ubrajamo u podobitelj SNX-BAR proteina jer sadrže BAR (engl. *bin, amphiphysin and Rvs161/167*) domenu koja također zakrivljuje membranu [292, 293]. Stoga je ovaj novonastali SNX27:Retromer:ESCPE-

1 kompleks izuzetno važan za pupanje membrane i stvaranje reciklirajućih tubula na domenama EE-a (slika 42) [153]. Dodatnoj tubulaciji, koja će omogućiti elongaciju i konačno otcjepljivanje reciklirajućeg tubula, znatno pridonosi i regrutiranje WASH kompleksa od strane proteina retromera [169, 292]. Točan mehanizam mobilizacije Rab10 preko SNX27:Retromer:ESCPE-1 kompleksa na rastuće tubule još nije razjašnjen. Ipak, poznato je da se SNX5 iz ESCPE-1 povezuje s jednom vrstom PIP(5)K koja omogućuje stvaranje PI(4,5)P<sub>2</sub> [294]. Na ovaj način se stvara platforma za regrutaciju EHBP1, koji se vezuje na PI(4,5)P<sub>2</sub> obogaćene membrane i regrutira Rab10 [295]. Rab10 i EHBP1 također posreduju tubulaciji. Dok EHBP1 može regrutirati molekule aktina i potaknuti rast aktinskog citoskeleta koji pokreće tubulaciju [295], Rab10 se povezuje s motornim proteinom KIF13A koji pokreće mikrotubule i dovodi do izduživanja reciklirajućih tubula [294–297] (slika 42).



**Slika 42. Mehanizam nastanka transportne vezikule posredovan SNX27:Retromer:ESCPE-1 kompleksom i Rab10.** SNX27:Retromer:ESCPE-1 kompleks potiče tubulaciju endosomalne membrane, te dolazi do regrutacije WASH kompleksa od strane retromera, aktivacija WASH kompleksa ubikvitinilacijom uzrokuje produljivanje tubula. SNX5/6 komponenta ESCPE-1 kompleksa regrutira PIP(5) kinazu koja omogućava vezanje EHBP i Rab10 što dovodi do dodatne elongacije tubula. Krajnji rezultat ovoga procesa je odcjepljivanje transportne vezikule koja omogućava recikliranje [90].

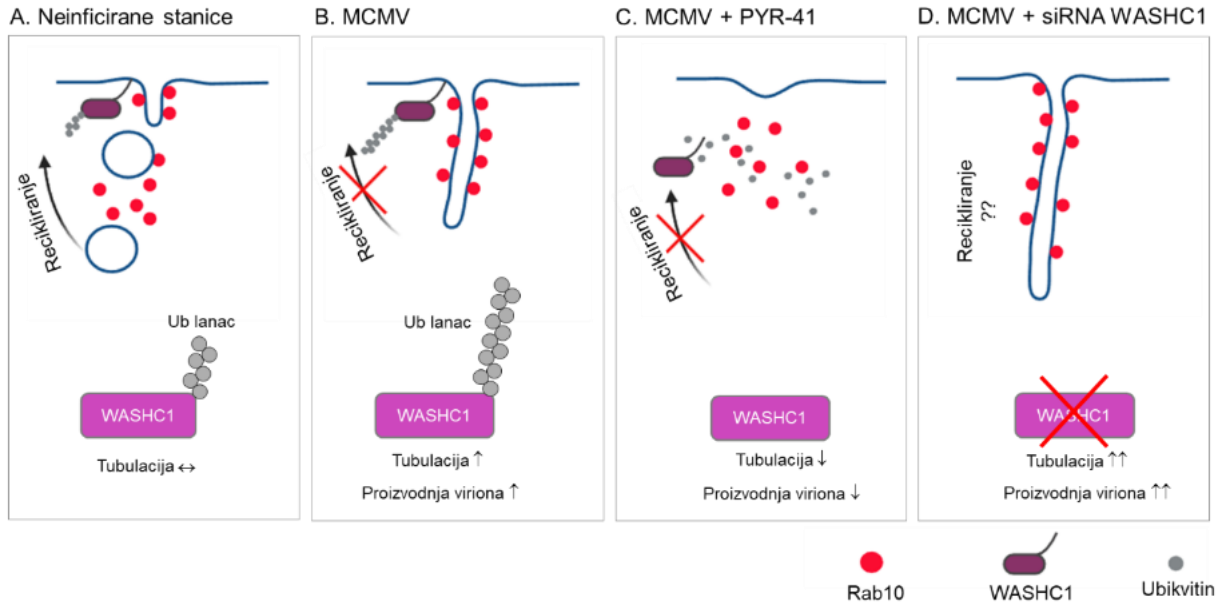
Za konačni nastanak transportne vezikule potrebno je odcijepiti nastali tubul. Odcjepljivanje je posljedica sužavanja tubula pri korijenu djelovanjem proteina kao što su dinamin, a vjerojatno i EHD1 [171, 297]. Međutim, važnu ulogu u otcjepljivanju tubula ima upravo WASHC1 komponenta WASH kompleksa koja, nakon K63 ubikvitinilacije mobilizira Arp2/3 protein, važan za rast aktinskih filamenata i izduženje tubula (slika 8 i 42). Time dolazi do značajnog sužavanja tubula na njegovom korijenu, što olakšava konačno otcjepljivanje uz pomoć ranije spomenutih proteina poput dinamina i EHD1. Aktivnost WASHC1 regulirana



je reostatskim mehanizmom ubikvitinilacije i deubikvitinilacije, premalo ili previše ubikvitinilacije može ometati normalno funkcioniranje WASHC1 (slika 8) [169].

Veliki dio naših istraživanja posvećen je upravo mehanizmima nastanka pre-AC i AC u citomegalovirusnoj infekciji. Naši nedavni rezultati ukazuju da je funkcionalan SNX27:Retromer:ESCPE-1 kompleks neophodan za ekspanziju membrana EE-ERC (slika 42), što se može vidjeti nakupljanjem Rab10 u području pre-AC [90]. Također, pokazali smo da se Rab10 na membrane pre-AC regrutira preko molekule EHBP1 [91], koja je također važna za tubulaciju membrana [295]. U ovom istraživanju posebno smo se usredotočili na ulogu i značaj ubikvitinilacije u procesima reorganizacije membrana endosomalnoga sustava, tj. u procesima stvaranja i održavanja integriteta i funkcije pre-AC i AC, za koje se pretpostavlja da su važni u procesu sekundarnog omatanja viriona.

Kao što je ranije objašnjeno, proces stvaranja pre-AC-a započinje odvajanjem, dislokacijom i reorganizacijom Golgijevih cisterni u perinuklearnu prstenastu strukturu koja, u konačnici, okružuje ekspanzirane membrane EE-a, ERC-a i TGN-a [75, 90]. Istraživanja su pokazala kako je ubikvitinilacija bitna u održavanju strukture Golgijevog aparata u neinficiranim stanicama [298, 299] što potvrđuju i naši rezultati (slika 18). Stoga promjenu strukture Golgijevog aparata nismo mogli koristiti u svrhu praćenja nastanka pre-AC nakon dodavanja PYR-41 i inhibicije ubikvitinilacije. Međutim, vizualizacija Rab10 PD u ekspanziranim odjeljcima na EE-ERC sučelju nam je poslužila kao pouzdan biljeg pre-AC i AC (slika 17 i 18), kojeg smo mogli pratiti različitim protokolima za testiranje važnosti ubikvitinilacije. Kao što smo ranije napomenuli, u većini neinficiranih stanica Rab10 se, nakon odcjepljivanja endosomalnih tubula, brzo uklanja s membrane [300], dok se u MCMV inficiranim stanicama zadržava na membranama, zbog čega se već u ranoj fazi infekcije nakuplja u pericentriolarnom području zajedno sa strukturama TRE i ERC-a [91] (slika 43).



**Slika 43. Uloga WASHC1 proteina u regulaciji nastanka i odcjepljivanja tubularnih Rab10-PD i njihov značaj u MCMV infekciji.** (A) U neinficiranim stanicama ubikvitinilacija WASHC1 je kontrolirana te zajedno s ostalim proteinima omogućuje tubulaciju i odcjepljivanje reciklirajućih tubula. (B) U wt MCMV inficiranim stanicama WASHC1 je hiperubikvitiniliran čime se njegova funkcija narušava. Nastaju elongirani tubuli koji se ne mogu odcijepiti zbog nefunkcionalnog WASHC1. (C) Neselektivnom staničnom inhibicijom ubikvitinilacije (PYR-41) općenito se narušava tubulacija i onemogućuje recikliranje. (D) U uvjetima nedostatka WASHC1 nastaju prekomjerno elongirani tubuli koji se ne mogu odcijepiti. U inficiranim stanicama se uočava da je razina tubulacije proporcionalna količini proizvedenih infektivnih viriona.

Učinak inhibicije ubikvitinilacije na AC u MCMV inficiranim stanicama pratili smo pomoću PYR-41 na dvije razine: (1) učinak PYR-41 na nastanak pre-AC, i (2) učinak PYR-41 na integritet i funkcionalnost već formiranog pre-AC i AC. Iako je primjena PYR-41 4 hpi, tj. neposredno prije početka preoblikovanja unutarstaničnih membrana u svrhu nastanka pre-AC, potpuno spriječila perinuklearno nakupljanje Rab10 kao biljega i-pre-AC (slika 19), moramo uzeti u obzir mogućnost da je nedostatak formiranja pre-AC-a posljedica zaustavljanja virusnoga replikacijskoga ciklusa u trenutku dodavanja inhibitora (4 hpi) (slika 19). Međutim, pokazali smo da je ubikvitinilacija bitna za održavanje integriteta i funkcije već ranije stvorenih pre-AC i AC. Naime, konfokalna mikroskopija je pokazala da je dodavanje PYR41 na kraju rane faze infekcije (12 i 16 hpi) uzrokovalo djelomičnu dezintegraciju pre-AC, odnosno Rab10 PD unutar pre-AC-a (slika 21 i 24), što ukazuje da je ubikvitinilacija potrebna za održavanje stabilnosti ekspanziranih Rab10 PD. Jednako pokazuju i snimke EGFP Rab10 membrana u MCMV inficiranim živim stanicama, na kojima se vidi da, ubrzo nakon dodavanja PYR-41, dolazi do kolapsa i nestajanja ekspanziranih Rab10-pozitivnih tubula (slika 24). Da kočenje ubikvitinilacije narušava funkciju pre-AC upućuje i rezultat koji pokazuje da

je sinteza pm74, MCMV proteina kasne faze, bila također zakočena kada je inhibitor dodan 16 hpi (slika 22). Obzirom da smo ranije pokazali da progresija MCMV replikacijskog ciklusa u smislu replikacije virusne DNA i ulaska u kasnu fazu ovisi o pravilno sklopljenom pre-AC i AC [89, 90], nije isključeno da je PYR-41 uzrokovana dezintegracija pre-AC, barem djelomično odgovorna za kočenje sinteze kasnih proteina. U konačnici, posebno zanimljiv rezultat smo dobili praćenjem učinkovitosti virusne replikacije nakon inhibicije ubikvitinilacije 48 hpi, tj. kada je inficirana stanica već počela proizvoditi infektivne virione. Uočljivo je drastično smanjenje broja novostvorenih infektivnih viriona (slika 23). Prema tome, mogli bismo zaključiti da je ubikvitinilacija bitna za održavanje fiziologije AC-a tijekom procesa sekundarnoga omatanja, ali ne možemo zanemariti mogućnost smanjene količine virusnih proteina, koja bi, u ovom slučaju, mogla biti nedovoljna za sintezu novih viriona.

Sekundarno omatanje MCMV-a nije u potpunosti razjašnjen proces. Budući da istraživanja pokazuju da u sekundarnom omatanju sudjeluju membrane endosomalnoga sustava [75, 301], neki autori smatraju da bi tegumentirane kapside mogle stjecati membrane pupanjem u multivezikularna tijela ili membranskim omatanjem citoplazmatskih kondenzata [1, 87, 302, 303]. S druge strane, nije isključeno da MCMV koristi membrane tubularnih reciklirajućih endosoma za omatanje kapsida, mehanizmom koji bi nalikovao procesu stvaranja fagofore tijekom makroautofagije [301, 304]. U tom slučaju se može pretpostaviti da bi broj sklopljenih viriona trebao biti proporcionalan količini tubula dostupnih za sekundarno omatanje [71]. Sukladno s ovom hipotezom smanjenje izražaja čimbenika koji potiču rast tubula unutar AC-a, kao i onih koji održavaju stabilnost tih tubula, trebalo bi smanjivati proizvodnju viriona. U prilog ovoj hipotezi govore i rezultati koji pokazuju smanjenje proizvodnje viriona uslijed utišavanja Rab11, proteina ključnog za održavanje stabilnosti TRE i ERC. S druge strane, iako potiče tubulaciju, utišavanje WASHC1 je uzrokovalo povećanje sinteze infektivnih virusnih čestica (slika 30). Ovaj rezultat ukazuje da se elongacija tubula može odvijati neovisno o WASHC1. Dapače, povećano stvaranje viriona je najvjerojatnije posljedica kompenzacijskog mehanizma koji dovodi do povećane aktivacije tubulacijskih proteina, poput Rab10, EHBP1, EHD1, MICALL1 i PACSIN2, a time i povećane virusne produkcije. Nadalje, iako nije neophodan za rast tubula, WASHC1 ima važnu ulogu u njihovom odcjepljivanju. Stoga njegov nedostatak također doprinosi povećanoj elongaciji tubula [265], odnosno stvara se više materijala za sekundarno omatanje virusa (slika 43). Nadalje, treba imati u vidu da je aktivnost WASHC1 regulirana ubikvitinilacijom po principu reostata, tj. prekomjerna ili preslaba ubikvitinilacija narušava njegovu funkciju (slika 8) [169, 171, 265]. Kako naši rezultati pokazuju pojačanu ubikvitinilaciju WASHC1 proteina u MCMV inficiranim stanicama (slika 31) te uzimajući u obzir pretpostavku da se rast tubula može odvijati i bez WASHC1 kompleksa, ali ne i njihovo odcjepljivanje [293], možemo pretpostaviti da je svrha ove disregulacije omogućavanje nastanka prekomjerno izduženih tubula koji će poslužiti za sekundarno omatanje i proizvodnju novih viriona (slika 43).

Stoga ovi rezultati upućuju na važnu ulogu ubikvitinilacije u formiranju i održavanju strukture pre-AC-a i AC-a te u procesu sekundarnog omatanja MCMV-a. Trenutno nismo još u mogućnosti u potpunosti razumjeti učinak PYR-41 na narušavanje strukture AC-a. Iako je moguće da inhibirajući sintezu virusnih proteina onemogućujemo njezino održavanje, nije isključeno niti da kočenje ubikvitinilacije WASHC1 narušava njegovu funkciju, ali i funkciju ostalih proteina važnih za endosomalnu tubulaciju. S druge strane, hiperubikvitinilacija proteina WASHC1 tijekom produktivne infekcije, vjerojatno ima za cilj poticanje elongacije tubula i stvaranje funkcionalnog AC-a.

### **5.3. Uloga ubikvitinilacije u narušavanju endosomalnog recikliranja u MCMV inficiranim stanicama**

Prema opisanim rezultatima možemo zaključiti da MCMV koristi ubikvitinilaciju kako bi reorganizirao membrane endosomalnoga sustava i održao funkcionalnost AC-a. Obzirom da u sastavni dio pre-AC-a i AC-a velikim dijelom ulaze i membrane reciklirajućih odjeljaka, za očekivati je i da recikliranje internaliziranih molekula bude poremećeno u inficiranim stanicama, što smo i pokazali u našim ranijim istraživanjima [74, 76]. Precizan mehanizam koji dovodi do narušavanja mehanizma recikliranja još nije poznat, ali sasvim je sigurno da uključuje poremećaj u funkciji staničnih regulatornih proteina. Osim toga, aktivacija nekih proteina koji sudjeluju u procesima neophodnima za recikliranje, kao što su tubulacija i otcjepljivanje tubula, ali i regrutacija novih proteina, može se regulirati i ubikvitinilacijom. Ranije smo objasnili mogući značaj hiperubikvitinilacije WASHC1 u stvaranju izrazito elongiranih tubula tijekom MCMV infekcije (slika 43), što također može uzrokovati poremećaj recikliranja, a ovdje ćemo objasniti rezultate analize statusa ubikvitinilacije nekih od staničnih proteina za koje znamo da reguliraju recikliranje iz EE i ERC, poput EHD1, Rabex5 i Rab11-FIP1.

Nedavna istraživanja na humanim adherentnim stanicama su pokazala da je EHD1, zajedno s MICAL-L1 i Rab11 efektorima, odnosno proteinima iz Rab11-FIP obitelji razreda I, supstrat RFFL E3 ubikvitin ligaze. Nadalje, prekomjeran izražaj dominantno negativne (DN, engl. *dominant negative*) RFFL E3 ligaze je uzrokovao perinuklearno nakupljanje navedenih regulatornih proteina kao i usporavanje recikliranja transferinskog receptora [264]. S druge strane, nije isključeno da ubikvitinilaciju EHD1, MICAL-L1, Rab11 efektorima, a moguće i nekih drugih proteina regulira više Ub ligaza, uključujući i RFFL. Naime, isti autori prikazuju da se u stanicama sa RFFL KO fenotipom smanjuje ubikvitinilacija jedino Rab11-FIP1 proteina, dok ubikvitinilacija EHD1, MICAL-L1 i Rab11-FIP2 ostaje uglavnom nepromijenjena, kao i kinetika recikliranja TfR [264]. Neovisno o tome, najprije smo ispitali bi li MCMV mogao djelovati na nishodnu regulaciju izražaja RFFL kako bi se smanjila ubikvitinilacija njegovih supstrata te na taj način zakočilo

recikliranje. Nasuprot očekivanjima, MCMV je uzrokovao pojačanje izražaja RFFL ligaze (slika 26) ukazujući da najvjerojatnije ima neku drugu ulogu u infekciji. Međutim, unatoč povećanom izražaju RFFL-a u MCMV infekciji, utvrdili smo da se ubikvitinilacija EHD1 smanjuje u inficiranim stanicama (slika 30 i 40). Smanjenje ubikvitinilacije EHD1 unatoč porastu RFFL ligaze možemo objasniti izravnim djelovanjem deubikvitinilazne aktivnosti virusnog proteina M48, obzirom da je razina ubikvitinilacije proteina EHD1 jednaka u neinficiranim i M48<sup>C23S</sup> MCMV inficiranim stanicama (slika 41). Naime, poznato je da M48 protein MCMV-a sadrži deubikvitinilaznu domenu [231] koja je nefunkcionalna kod mutante M48<sup>C23S</sup> MCMV. Prema tome, moguće je da MCMV pomoću svog proteina M48 deubikvitinilira EHD1 čime smanjuje njegovu funkcionalnost, koja ne uključuje samo proces tubulacije, već i otejepljivanje reciklirajućih tubula [264, 279]. Iako se stupanj ubikvitinilacije Rab11-FIP1 nije značajnije mijenjao u infekciji (slika 30), ne možemo isključiti da M48 svojom deubikvitinilaznom aktivnosti sudjeluje u regulaciji aktivnosti i drugih efektora endosomalnoga prometovanja.

Jedan od efektorskih proteina koji reguliraju prometovanje u ranim endosomima je i Rabex5. Rabex5 i sam može djelovati kao E3 ubikvitin ligaza, a regulira se autoubikvitinilacijom [182]. Na membrani ranog endosoma, ubikvitinilirani Rabex5 vezuje Rab5 i djeluje kao njegov GEF, omogućavajući procese sortiranja, tubulacije, ali i samog sazrijevanja EE-a [273, 280]. Međutim, prekomjerna količina ubikvitiniliranoga Rabex5 uzrokuje nagomilavanje aktiviranog oblika Rab5 GTP-aze (Rab5 GTP) čime se onemogućava zamjena Rab5 s Rab7. Rani endosomi pri tome nekontrolirano bubre, a prelazak u LE je onemogućen. Kako bi se izbjegao ovaj scenarij, u normalnim stanicama Rabex5 regrutira USP8 deubikvitinilazu koja ga deubikvitinilira te time deaktivira i oslobađa s membrane, posredno zaustavljajući i djelovanje Rab5 [273]. Obzirom da smo u našim istraživanjima zamijetili povećanje volumena ranih endosoma u MCMV inficiranim stanicama [305], pretpostavili smo da bi promjena aktivnosti Rabex5 mogla biti jedan od mehanizama kojima MCMV ometa normalne fiziološke procese koji se događaju u EE. Zaista, rezultati koje smo dobili na NIH3T3 stanicama s kratkoročnom transfekcijom pRK5-Ub-HA wt plazmida pokazuju da MCMV infekcija pojačava ubikvitinilaciju Rabex5 (slika 29). Ipak, trebamo naglasiti da smo na NIH3T3 HA-Ub staničnoj liniji dobili samo umjereno ubikvitiniliranog Rabex5, pa rezultat treba još dodatno ispitati. Ovi rezultati ukazuju da MCMV selektivno modulira ubikvitinilaciju ključnih efektor (EHD1, Rabex5, WASHC1) kako bi spriječio pravilno stvaranje i otejepljivanje reciklirajućih tubula, stimulirajući njihovu elongaciju kako bi održao priljev membrana potrebnih za replikaciju i sekundarno omatanje viriona.

### 5.3.1. Značaj ubikvitinilacije u recikliranju transferinskog receptora u MCMV-inficiranim stanicama

Rezultati analize perinuklearnog nakupljanja Rab10, kao biljega pre-AC-a, u stanicama inficiranim wt MCMV i M48<sup>C23S</sup> MCMV ukazuju da DUB domena M48 proteina MCMV-a nije nužna za biogenezu AC-a. Međutim, treba napomenuti da je signal Rab10-PD bio je vidno slabiji u stanicama inficiranim M48<sup>C23S</sup> MCMV-om, nego u wt MCMV inficiranim stanicama (slika 38). To može ukazivati da bi M48 DUB domena mogla imati određenu ulogu u reorganizaciji i ekspanziji Rab10 pozitivnih tubula u MCMV inficiranim stanicama.

Mogući značaj M48 DUB domene u reorganizaciji membrana endosomalnog sustava potvrđuju i rezultati analize recikliranja transferinskog receptora na wt MCMV i M48<sup>C23S</sup> MCMV inficiranim stanicama. Praćenjem oslobađanja Tf-AF<sup>488</sup> iz recikliranog Tf-AF<sup>488</sup>-TfR kompleksa na staničnoj površini, utvrdili smo da narušavanje DUB funkcije M48 proteina uzrokuje ubrzanje kinetike transferinskog recikliranja u usporedbi s wt MCMV inficiranim stanicama, iako te vrijednosti još ne dostižu one kod neinficiranih stanica. Mogući razlozi mogu uključivati manju tubulaciju, remodeliranje i ekspanziju EE-ERC odjeljaka u svrhu nastanka pre-AC i AC. To bi za posljedicu moglo imati slabije narušavanje funkcije reciklirajućih puteva u M48<sup>C23S</sup> MCMV inficiranim stanicama. Jedan od razloga bi mogao biti i izostanak učinka M48 DUB domene na ubikvitinilaciju proteina koji reguliraju endosomalno recikliranje.

Navedene rezultate slabijeg kočenja recikliranja transferina u M48<sup>C23S</sup> MCMV inficiranim stanicama u usporedbi s onima inficiranim wt MCMV-om, potvrdili smo i konfokalnom mikroskopijom (slika 40). U početnom vremenu, iako je internalizirani transferin bio jasno vidljiv u svim stanicama, obrasci njegovog izražaja su se razlikovali između inficiranih i neinficiranih stanica. Naime, dok je u neinficiranim stanicama Tf uočen u ranim endosomima i ERC tubulima, u inficiranim stanicama je bio vizualiziran kao koncentrirana nakupina u području pre-AC-a (slika 40). Nakon 60 minuta bilo je vidljivo da je iz neinficiranih stanica transferin gotovo u potpunosti bio uklonjen recikliranjem, dok je u inficiranim stanicama i dalje ostao nakupljen u području pre-AC-a. Ipak zaostala količina transferina bila je manja u stanicama inficiranim virusom s nefunkcionalnom DUB domenom, što potvrđuje raniju pretpostavku da M48 DUB domena ima ulogu u narušavanju staničnih puteva recikliranja.

Ovi rezultati naglašavaju moguću ulogu DUB domene M48 proteina u modulaciji staničnih proteina endosomalnoga sustava koji sudjeluju u tubulaciji i odcjepljivanju transportnih vezikula. Konačni učinak je inhibicija recikliranja iz EE/ERC odjeljaka te nastanak elongiranih tubula u svrhu stvaranja funkcionalnoga AC-a i osiguravanja membrana za sekundarno omatanje viriona.

Zadržavanje transferina u stanici moglo bi, osim smanjenoga recikliranja, biti posljedica i izravnog djelovanje virusa. Neki su autori u svojim istraživanjima pokazali kako HCMV pojačanjem izražaja MARCH1 E3 ubikvitin ligaze, odgovorne za ubikvitinilaciju i internalizaciju transferinskoga receptora

[306], smanjuje izražaj TfR na staničnoj membrani, a zadržava Tf unutar stanice [274]. U skladu s time su i naši rezultati koji pokazuju da MCMV infekcija također dovodi do pojačanog izražaja MARCH1 u ranoj fazi infekcije (slika 25). S jedne strane, porast količine transferina u stanici virusu bi mogao biti koristan zbog potrebe za željezom u procesu replikacije DNA. S druge strane, ne može se isključiti mogućnost da je pojačana internalizacija transferina predstavlja stanični odgovor na infekciju. Povećana koncentracija željeza u stanicama dovodi do nastanka reaktivnih kisikovih jedinki i posljedično uzrokuje stanični stres. Time bi se porast željeza u stanici mogao objasniti i kao pokušaj stanice da pokrene procese koji dovode do apoptoze [274].

Iz svega navedenog možemo zaključiti da MCMV djelujući na ubikvitinski sustav u svrhu reorganizacije endomembranskoga sustava dovodi do narušavanja procesa recikliranja staničnih receptora. Također je moguće i da izravno djeluje na njihovu internalizaciju što za posljedicu ima njihovo nakupljanje unutar stanice kao u slučaju transferina.

#### **5.4. Ubikvitinilacijski mehanizmi u modulaciji imunološkog odgovora stanice tijekom infekcije mišjim citomegalovirusom**

Citomegalovirusi su razvili širok spektar strategija izbjegavanja imunološkog sustava koje im omogućuju uspostavljanje trajnih infekcija unatoč snažnom antivirusnom odgovoru domaćina [307, 308]. Mehanizmi kojima CMV zaobilazi imuni odgovor domaćina su raznoliki, a jedan od njih uključuje i njegovu sposobnost da manipulira ubikvitin-proteasomalnim sustavom (UPS). Naime, UPS kontrolira stabilnost i prometovanje ključnih imunoloških receptora endosomalnim transportom, a može djelovati i na njihovu aktivaciju učinkom na različite signalne puteve [231, 236]. U ovim procesima važnu ulogu imaju MARCH ubikvitin ligaze, transmembranski proteini otkriveni u herpesvirusa. Kao i virusne, stanične MARCH ligaze sudjeluju u nishodnoj regulaciji izražaja MHC-I molekula, ali i drugih imunoloških receptora sa stanične površine [203, 271]. Za razliku od ostalih herpesvirusa, kao što je KSHV, MCMV ne kodira vlastite MARCH ligaze pa možemo pretpostaviti da za modulaciju izražaja imunoloških receptora iskorištava stanične MARCH ligaze [212]. Naime, MARCH ligaze posreduju ubikvitinilaciju receptora koji ulaze u stanicu uglavnom endocitozom neovisom o klatrinu, od kojih mnoge imaju određenu ulogu u imunološkom odgovoru, poput MHC-I i MHC-II, te CD44, CD98 i CD81 [272]. Za neke od njih, poput MHC-I, od ranije je poznato da se uklanjaju pod djelovanjem MCMV-a, što znatno doprinosi slabljenju imunološke reakcije domaćina [74]. Mehanizmi nishodne regulacije MHC-I molekula u MCMV infekciji su višestruki. MCMV može smanjiti njihov izražaj na staničnoj površini sprječavanjem izlaska novosintetiziranih molekula iz sekretornoga puta, što je posljedica njihovog zadržavanja u području ERGIC-a djelovanjem pm152 virusnoga proteina [309]. One molekule koje su uspjele izbjeći pm152, bivaju preusmjerene u LE pomoću

pm06 gdje se razgrađuju [308, 310]. Međutim, obzirom da poluživot mišjih MHC-I molekula iznosi 12 – 24 h [311], a pokazano je da MCMV infekcija dovodi do smanjenja izražaja MHC-I molekula već u vrlo ranoj fazi infekcije (6 – 8 hpi) [74], logično je da postoje i dodatni mehanizmi. Jedan od njih je svakako reorganizacija reciklirajućih membrana u svrhu nastanka pre-AC koja se započinje vrlo rano u infekciji (4 – 6 hpi) (slika 17 i 18) [89], a uzrokuje zadržavanje MHC-I molekula u pre-AC [74, 76]. S druge strane, poznato je da određene MARCH ubikvitin ligaze, poput MARCH4 i MARCH8, u fiziološkim uvjetima ubikvitiniliraju i potiču internalizaciju molekula MHC-I [272]. Stoga smo pretpostavili da MCMV potiče pojačani izražaj ovih ligaza te smo ispitali njihov izražaj u MCMV infekciji. Pri tome smo pokazali samo umjereno povećanje izražaja MARCH4 tijekom rane faze MCMV infekcije (slika 25) koje ostavlja otvorenu mogućnost da bi jedan od mehanizama nishodne regulacije MHC-I molekula mogao biti i njihova pojačana internalizacija potaknuta ubikvitinilacijom. S druge strane, poznato je da se proteini MHC-I endocitiraju Arf6 posredovanom endocitozom neovisnom o klatrinu. U ekspaniranim Arf6-reguliranim vezikulama HCMV-inficiranih stanica vizualizirana je i USP6/TRE17 deubikvitinilaza [312]. Ona inače uklanja ubikvitin sa molekula ubikvitiniliranih MARCH E3 ligazama, uključujući i MHC [313]. Suprotno očekivanjima, naši rezultati pokazuju da MCMV uzrokuje rast izražaja USP6, pa smo pretpostavili da postoji mogućnost djelomičnog poništavanja ubikvitinilacije MHC-I u inficiranim stanicama. Nije isključeno da virus na ovaj način regulira površinski izražaj MHC-I molekula kako bi ga održao dovoljno niskim i spriječio prepoznavanje citotoksičnim limfocitima T, ali ne toliko niskim da bi došlo do aktivacije NK stanica [314, 315]. Prijašnja istraživanja pokazuju kako, u neinficiranim stanicama, MARCH4 potiče i nishodnu regulaciju izražaja Mult1 [271], liganda NKG2D receptora NK stanica [316], ali i molekula CD44 i CD86 [203]. Ranije je pokazano da je površinska nestabilnost Mult1 u MCMV infekciji, upravo u svrhu izbjegavanja njegove interakcije s NKG2D posljedica djelovanja glikoproteina kodiranog m145 genom [317, 318].

Osim regulacije izražaja imunoloških receptora, MCMV može izravno ometati i lučenje citokina. Smatra se da su CMV proteini UL48/M48, putem svoje deubikvitinilazne domene, uključeni ne samo u održavanju stabilnosti virusnih proteina već i u promjeni citokinskog odgovora domaćina, čime se smanjuje učinkovitost imunološke reakcije. Istraživanja pokazuju kako HCMV deubikvitinilacijskom domenom UL48 proteina te MCMV DUB domenom homolognog proteina M48, djeluju zajedno s UL45 (M45) te inhibiraju aktivaciju NFκB signalnoga puta. Na taj način sprječavaju lučenje proinflammatoryh citokina [243]. Osim djelovanja UL45 i UL48 kasnih virusnih proteina pokazan je i utjecaj ranoga proteina UL26 na aktivaciju NFκB signalnoga puta, što znači da HCMV koristi najmanje tri virusna proteina za modulaciju UPS kako bi spriječio imunološki odgovor stanice [243]. Pored ometanja lučenja citokina, pokazano je da MCMV M48 protein svojom DUB domenom kontrolira virusnu replikaciju regulirajući razine virusnoga kemokina MCK2, ali i njegovu ugradnju u novosintetizirane virione. Poznato je da virioni s povećanom



količinom MCK2 u stanicu ulaze endocitozom što dovodi do odgođenog izražaja virusnih gena. MCK2 je neophodan za diseminaciju virusa u organizmu, a fina regulacija njegova izražaja je vrlo bitna za pravilno odvijanje virusnoga replikacijskog ciklusa [231].

Zajedno, ovi procesi naglašavaju sofisticirani način na koji MCMV manipulira ubikvitinskom signalizacijom kako bi kontrolirao imunološki odgovor, istovremeno modulirajući izražaj imunoloških receptora i citokinski odgovor.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Ubikvitinilacija je nužna za uspostavu infekcije mišjim citomegalovirusom neovisno o primijenjenoj količini virusnih čestica.
2. Ubikvitinilacija je bitna za napredovanje virusnog replikacijskog ciklusa, ali i za formiranje te održavanje strukture i fiziologije AC-a.
3. Ubikvitinilacija ima ulogu u stvaranju prekomjerno elongiranih tubula iz membrana reciklirajućih endosoma, koje najvjerojatnije kasnije služe kao izvor membrana za sekundarno omatanje.
4. MCMV narušava izražaj staničnih ubikvitinilaza i deubikvitinilaza u ranoj i kasnoj fazi infekcije.
5. MCMV selektivno modulira ubikvitinilaciju ključnih efektora endosomalnoga sustava uključenih u stvaranje reciklirajućih tubula (EHD1, Rabex5, WASHC1), stimulirajući njihovu elongaciju.
6. Deubikvitinilacijska domena proteina M48 nije ključna za stabilnost virusnih proteina niti za uspješnu replikaciju, ali bi mogla imati ulogu u regulaciji izražaja virusnih proteina i učinkovitosti remodeliranja EE-ERC membrana u svrhu nastanka AC.
7. Protein M48 deubikvitinilira stanični protein EHD1 te time najvjerojatnije narušava njegovu funkciju.

## 7. LITERATURA

- [1] Wofford AS, McCusker I, Green JC, et al. Betaherpesvirus assembly and egress: Recent advances illuminate the path. In: *Advances in Virus Research*. Academic Press Inc., 2020, pp. 337–392.
- [2] Modrow S, Falke D, Truyen U, et al. Viruses: Definition, Structure, Classification. In: *Molecular Virology*. Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 17–30.
- [3] Louten J. Virus Structure and Classification. In: *Essential Human Virology*. Elsevier, 2016, pp. 19–29.
- [4] Hellberg T, Paßvogel L, Schulz KS, et al. Nuclear Egress of Herpesviruses. 2016, pp. 81–140.
- [5] Cohen JI. Herpesvirus latency. *Journal of Clinical Investigation* 2020; 130: 3361–3369.
- [6] Duan S, Li Z, Zhang X, et al. Novel betaherpesviruses and gammaherpesviruses in bats from central China. *Sci Rep* 2024; 14: 10651.
- [7] Gugliesi F, Coscia A, Griffante G, et al. Where do we stand after decades of studying human cytomegalovirus? *Microorganisms*; 8. Epub ahead of print 1 May 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8050685.
- [8] McGeoch DJ, Dolan A, Ralph AC. *Toward a Comprehensive Phylogeny for Mammalian and Avian Herpesviruses*, <http://jvi.asm.org/> (2000).
- [9] Leruez-Ville M, Foulon I, Pass R, et al. Cytomegalovirus infection during pregnancy: state of the science. *Am J Obstet Gynecol* 2020; 223: 330–349.
- [10] Gugliesi F, Pasquero S, Griffante G, et al. Human Cytomegalovirus and Autoimmune Diseases: Where Are We? *Viruses* 2021; 13: 260.
- [11] Brizić I, Lenac Roviš T, Krmpotić A, et al. MCMV avoidance of recognition and control by NK cells. *Semin Immunopathol* 2014; 36: 641–650.
- [12] Krmpotić A, Bubić I, Polić B, et al. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect* 2003; 5: 1263–1277.
- [13] Krstanović F, Britt WJ, Jonjić S, et al. Cytomegalovirus Infection and Inflammation in Developing Brain. *Viruses* 2021; 13: 1078.
- [14] Lučin P, Mahmutefendić H, Blagojević Zagorac G, et al. Cytomegalovirus immune evasion by perturbation of endosomal trafficking. *Cell Mol Immunol* 2015; 12: 154–169.
- [15] Lučin P, Karelušić L, Blagojević Zagorac G, et al. Cytomegaloviruses Exploit Recycling Rab Proteins in the Sequential Establishment of the Assembly Compartment. *Front Cell Dev Biol*; 6. Epub ahead of print 4 December 2018. DOI: 10.3389/fcell.2018.00165.
- [16] Nguyen CC, Kamil JP. Pathogen at the Gates: Human Cytomegalovirus Entry and Cell Tropism. *Viruses* 2018; 10: 704.
- [17] Hetzeneker S, Helenius A, Krzyzaniak MA. <sc>HCMV</sc> Induces Macropinocytosis for Host Cell Entry in Fibroblasts. *Traffic* 2016; 17: 351–368.

- [18] Hanson LK, Slater JS, Karabekian Z, et al. Replication of Murine Cytomegalovirus in Differentiated Macrophages as a Determinant of Viral Pathogenesis. *J Virol* 1999; 73: 5970–5980.
- [19] Weng C, Lee D, Gelbmann CB, et al. Human Cytomegalovirus Productively Replicates *In Vitro* in Undifferentiated Oral Epithelial Cells. *J Virol*; 92. Epub ahead of print 15 August 2018. DOI: 10.1128/JVI.00903-18.
- [20] Sinzger C, Digel M, Jahn G. Cytomegalovirus Cell Tropism. 2008, pp. 63–83.
- [21] Atabani SF, Smith C, Atkinson C, et al. Cytomegalovirus Replication Kinetics in Solid Organ Transplant Recipients Managed by Preemptive Therapy. *American Journal of Transplantation* 2012; 12: 2457–2464.
- [22] Staras SAS, Flanders WD, Dollard SC, et al. Influence of Sexual Activity on Cytomegalovirus Seroprevalence in the United States, 1988–1994. *Sex Transm Dis* 2008; 35: 472–479.
- [23] Griffiths P. The direct and indirect consequences of cytomegalovirus infection and potential benefits of vaccination. *Antiviral Res* 2020; 176: 104732.
- [24] Boeckh M, Nichols WG. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood* 2004; 103: 2003–2008.
- [25] Deayton JR, Sabin CA, Johnson MA, et al. Importance of cytomegalovirus viraemia in risk of disease progression and death in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *The Lancet* 2004; 363: 2116–2121.
- [26] Schleiss MR. Cytomegalovirus Vaccine Development. 2008, pp. 361–382.
- [27] Griffiths P, Reeves M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. *Nat Rev Microbiol* 2021; 19: 759–773.
- [28] LISCHKA P, ZIMMERMANN H. Antiviral strategies to combat cytomegalovirus infections in transplant recipients. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8: 541–548.
- [29] Chou S. A third component of the human cytomegalovirus terminase complex is involved in letermovir resistance. *Antiviral Res* 2017; 148: 1–4.
- [30] Ligat G, Cazal R, Hantz S, et al. The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: a close-up view. *FEMS Microbiol Rev* 2018; 42: 137–145.
- [31] Goldberg MD, Honigman A, Weinstein J, et al. Human Cytomegalovirus UL97 Kinase and Nonkinase Functions Mediate Viral Cytoplasmic Secondary Envelopment. *J Virol* 2011; 85: 3375–3384.
- [32] Schulz U, Solidoro P, Müller V, et al. CMV Immunoglobulins for the Treatment of CMV Infections in Thoracic Transplant Recipients. *Transplantation* 2016; 100: S5–S10.
- [33] Smith C, Beagley L, Rehan S, et al. Autologous Adoptive T-cell Therapy for Recurrent or Drug-resistant Cytomegalovirus Complications in Solid Organ Transplant Recipients: A Single-arm Open-label Phase I Clinical Trial. *Clinical Infectious Diseases* 2019; 68: 632–640.

- [34] Macesic N, Langsford D, Nicholls K, et al. Adoptive T Cell Immunotherapy for Treatment of Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Disease in a Renal Transplant Recipient. *American Journal of Transplantation* 2015; 15: 827–832.
- [35] Pierucci P, Malouf M, Glanville AR, et al. Novel autologous T-cell therapy for drug-resistant cytomegalovirus disease after lung transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2016; 35: 685–687.
- [36] Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Hematol Oncol Clin North Am* 2011; 25: 151–169.
- [37] Krishna BA, Spiess K, Poole EL, et al. Targeting the latent cytomegalovirus reservoir with an antiviral fusion toxin protein. *Nat Commun* 2017; 8: 14321.
- [38] Farrell HE, Bruce K, Stevenson PG. A Live Olfactory Mouse Cytomegalovirus Vaccine, Attenuated for Systemic Spread, Protects against Superinfection. *J Virol*; 95. Epub ahead of print 13 October 2021. DOI: 10.1128/JVI.01264-21.
- [39] Adler SP, Manganello A-M, Lee R, et al. A Phase 1 Study of 4 Live, Recombinant Human Cytomegalovirus Towne/Toledo Chimera Vaccines in Cytomegalovirus–Seronegative Men. *Journal of Infectious Diseases* 2016; 214: 1341–1348.
- [40] Smith L, Wloch M, Chaplin J, et al. Clinical Development of a Cytomegalovirus DNA Vaccine: From Product Concept to Pivotal Phase 3 Trial. *Vaccines (Basel)* 2013; 1: 398–414.
- [41] Scarpini S, Morigi F, Betti L, et al. Development of a Vaccine against Human Cytomegalovirus: Advances, Barriers, and Implications for the Clinical Practice. *Vaccines (Basel)* 2021; 9: 551.
- [42] Choi KY, El-Hamdi NS, McGregor A. Inclusion of the Viral Pentamer Complex in a Vaccine Design Greatly Improves Protection against Congenital Cytomegalovirus in the Guinea Pig Model. *J Virol*; 93. Epub ahead of print 15 November 2019. DOI: 10.1128/JVI.01442-19.
- [43] Kirchmeier M, Fluckiger A-C, Soare C, et al. Enveloped Virus-Like Particle Expression of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Antigen Induces Antibodies with Potent and Broad Neutralizing Activity. *Clinical and Vaccine Immunology* 2014; 21: 174–180.
- [44] Anderholm KM, Bierle CJ, Schleiss MR. Cytomegalovirus Vaccines: Current Status and Future Prospects. *Drugs* 2016; 76: 1625–1645.
- [45] Nakamura R, Rosa C La, Longmate J, et al. Viraemia, immunogenicity, and survival outcomes of cytomegalovirus chimeric epitope vaccine supplemented with PF03512676 (CMVPepVax) in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: randomised phase 1b trial. *Lancet Haematol* 2016; 3: e87–e98.
- [46] Close WL, Anderson AN, Pellett PE. Betaherpesvirus Virion Assembly and Egress. 2018, pp. 167–207.
- [47] Schottstedt V, Bluemel J, Burger R, et al. Human Cytomegalovirus (HCMV) – Revised. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2010; 37: 365–375.
- [48] RSHELLAM G, JREDWOOD A, MSMITH L, et al. Murine Cytomegalovirus and Other Herpesviruses. In: *The Mouse in Biomedical Research*. Elsevier, 2007, pp. 1–48.

- [49] Guo H, Shen S, Wang L, et al. Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress. *Protein Cell* 2010; 1: 987–998.
- [50] Kalejta RF. Functions of Human Cytomegalovirus Tegument Proteins Prior to Immediate Early Gene Expression. 2008, pp. 101–115.
- [51] Poole E, Sinclair J. Understanding HCMV Latency Using Unbiased Proteomic Analyses. *Pathogens* 2020; 9: 590.
- [52] Reyda S, Büscher N, Tenzer S, et al. Proteomic Analyses of Human Cytomegalovirus Strain AD169 Derivatives Reveal Highly Conserved Patterns of Viral and Cellular Proteins in Infected Fibroblasts. *Viruses* 2014; 6: 172–188.
- [53] Sinzger C, Kahl M, Laib K, et al. Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *Journal of General Virology* 2000; 81: 3021–3035.
- [54] Gerna G, Kabanova A, Lilleri D. Human Cytomegalovirus Cell Tropism and Host Cell Receptors. *Vaccines (Basel)* 2019; 7: 70.
- [55] Kalejta RF. Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2008; 72: 249–265.
- [56] Compton T, Nepomuceno RR, Nowlin DM. Human cytomegalovirus penetrates host cells by PH-independent fusion at the cell surface. *Virology* 1992; 191: 387–395.
- [57] Bodaghi B, Slobbe-Van Drunen MEP, Topilko A, et al. *Entry of Human Cytomegalovirus into Retinal Pigment Epithelial and Endothelial Cells by Endocytosis.*
- [58] Mercer J, Schelhaas M, Helenius A. Virus Entry by Endocytosis. *Annu Rev Biochem* 2010; 79: 803–833.
- [59] Wille PT, Wisner TW, Ryckman B, et al. Human Cytomegalovirus (HCMV) Glycoprotein gB Promotes Virus Entry In *Trans* Acting as the Viral Fusion Protein Rather than as a Receptor-Binding Protein. *mBio*; 4. Epub ahead of print July 2013. DOI: 10.1128/mBio.00332-13.
- [60] Vanarsdall AL, Howard PW, Wisner TW, et al. Human Cytomegalovirus gH/gL Forms a Stable Complex with the Fusion Protein gB in Virions. *PLoS Pathog* 2016; 12: e1005564.
- [61] Wang D, Shenk T. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005; 102: 18153–18158.
- [62] Stegmann C, Hochdorfer D, Lieber D, et al. A derivative of platelet-derived growth factor receptor alpha binds to the trimer of human cytomegalovirus and inhibits entry into fibroblasts and endothelial cells. *PLoS Pathog* 2017; 13: e1006273.
- [63] Sanchez V, Greis KD, Sztul E, et al. Accumulation of Virion Tegument and Envelope Proteins in a Stable Cytoplasmic Compartment during Human Cytomegalovirus Replication: Characterization of a Potential Site of Virus Assembly. *J Virol* 2000; 74: 975–986.
- [64] Cantrell SR, Bresnahan WA. Human Cytomegalovirus (HCMV) UL82 Gene Product (pp71) Relieves hDaxx-Mediated Repression of HCMV Replication. *J Virol* 2006; 80: 6188–6191.

- [65] Spector DH. Activation and Regulation of Human Cytomegalovirus Early Genes. *Intervirology* 1996; 39: 361–377.
- [66] Adamson CS, Nevels MM. Bright and Early: Inhibiting Human Cytomegalovirus by Targeting Major Immediate-Early Gene Expression or Protein Function. *Viruses* 2020; 12: 110.
- [67] Omoto S, Mocarski ES. Cytomegalovirus UL91 Is Essential for Transcription of Viral True Late ( $\gamma$ 2) Genes. *J Virol* 2013; 87: 8651–8664.
- [68] Sanchez V, Britt W. Human Cytomegalovirus Egress: Overcoming Barriers and Co-Opting Cellular Functions. *Viruses* 2021; 14: 15.
- [69] Das S, Vasanthi A, Pellett PE. Three-Dimensional Structure of the Human Cytomegalovirus Cytoplasmic Virion Assembly Complex Includes a Reoriented Secretory Apparatus. *J Virol* 2007; 81: 11861–11869.
- [70] Lacaze P, Forster T, Ross A, et al. Temporal Profiling of the Coding and Noncoding Murine Cytomegalovirus Transcriptomes. *J Virol* 2011; 85: 6065–6076.
- [71] Mahmutefendić Lučin H, Lukanović Jurić S, Marčić M, et al. Membraneless Compartmentalization of Nuclear Assembly Sites during Murine Cytomegalovirus Infection. *Viruses* 2023; 15: 766.
- [72] Boehmer PE, Nimmonkar A V. Herpes virus replication. *IUBMB Life* 2003; 55: 13–22.
- [73] Schmid M, Speiseder T, Dobner T, et al. DNA Virus Replication Compartments. *J Virol* 2014; 88: 1404–1420.
- [74] Tomaš MI, Kučić N, Mahmutefendić H, et al. Murine Cytomegalovirus Perturbs Endosomal Trafficking of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules in the Early Phase of Infection. *J Virol* 2010; 84: 11101–11112.
- [75] Lučin P, Jug Vučko N, Karleuša L, et al. Cytomegalovirus Generates Assembly Compartment in the Early Phase of Infection by Perturbation of Host-Cell Factors Recruitment at the Early Endosome/Endosomal Recycling Compartment/Trans-Golgi Interface. *Front Cell Dev Biol*; 8. Epub ahead of print 11 September 2020. DOI: 10.3389/fcell.2020.563607.
- [76] Karleuša L, Mahmutefendić H, Tomaš MI, et al. Landmarks of endosomal remodeling in the early phase of cytomegalovirus infection. *Virology* 2018; 515: 108–122.
- [77] Karleusa L. Cytoplasmic virion assembly compartment of betaherpesviruses. *Period Biol* 2020; 121–122: 97–106.
- [78] Das S, Ortiz DA, Gurczynski SJ, et al. Identification of Human Cytomegalovirus Genes Important for Biogenesis of the Cytoplasmic Virion Assembly Complex. *J Virol* 2014; 88: 9086–9099.
- [79] Marcinowski L, Lidschreiber M, Windhager L, et al. Real-time Transcriptional Profiling of Cellular and Viral Gene Expression during Lytic Cytomegalovirus Infection. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002908.
- [80] Benyesh-Melnick M, Probstmeyer F, McCombs R, et al. Correlation Between Infectivity and Physical Virus Particles in Human Cytomegalovirus. *J Bacteriol* 1966; 92: 1555–1561.
- [81] Tandon R, Mocarski E, Conway J. The A, B, Cs of Herpesvirus Capsids. *Viruses* 2015; 7: 899–914.

- [82] Severi B, Landini MP, Govoni E. Human Cytomegalovirus morphogenesis: an ultrastructural study of the late cytoplasmic phases. *Arch Virol* 1988; 98: 51–64.
- [83] Pignatelli S, Dal Monte P, Landini MP, et al. Cytomegalovirus Primary Envelopment at Large Nuclear Membrane Infoldings: What’s New? *J Virol* 2007; 81: 7320–7322.
- [84] Close WL, Glassbrook JE, Gurczynski SJ, et al. Infection-Induced Changes Within the Endocytic Recycling Compartment Suggest a Roadmap of Human Cytomegalovirus Egress. *Front Microbiol*; 9. Epub ahead of print 22 August 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01888.
- [85] Das S, Pellett PE. Spatial Relationships between Markers for Secretory and Endosomal Machinery in Human Cytomegalovirus-Infected Cells versus Those in Uninfected Cells. *J Virol* 2011; 85: 5864–5879.
- [86] Pavišić V, Mahmutefendić Lučin H, Blagojević Zagorac G, et al. Arf GTPases Are Required for the Establishment of the Pre-Assembly Compartment in the Early Phase of Cytomegalovirus Infection. *Life* 2021; 11: 867.
- [87] Schauflinger M, Villinger C, Mertens T, et al. Analysis of human cytomegalovirus secondary envelopment by advanced electron microscopy. *Cell Microbiol* 2013; 15: 305–314.
- [88] Alwine JC. The Human Cytomegalovirus Assembly Compartment: A Masterpiece of Viral Manipulation of Cellular Processes That Facilitates Assembly and Egress. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002878.
- [89] Štimac I, Jug Vučko N, Blagojević Zagorac G, et al. Dynamin Inhibitors Prevent the Establishment of the Cytomegalovirus Assembly Compartment in the Early Phase of Infection. *Life* 2021; 11: 876.
- [90] Štimac I, Marčelić M, Radić B, et al. SNX27:Retromer:ESCPE-1-mediated early endosomal tubulation impacts cytomegalovirus replication. *Front Cell Infect Microbiol*; 14. Epub ahead of print 18 September 2024. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1399761.
- [91] Mahmutefendić Lučin H, Štimac I, Marčelić M, et al. Rab10-associated tubulation as an early marker for biogenesis of the assembly compartment in cytomegalovirus-infected cells. *Front Cell Dev Biol*; 12. Epub ahead of print 10 January 2025. DOI: 10.3389/fcell.2024.1517236.
- [92] Muñoz J, Heck AJR. From the Human Genome to the Human Proteome. *Angewandte Chemie International Edition* 2014; 53: 10864–10866.
- [93] Khoury GA, Baliban RC, Floudas CA. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci Rep* 2011; 1: 90.
- [94] Monia BP, Ecker DJ, Crooke ST. New Perspectives on the Structure and Function of Ubiquitin. *Nat Biotechnol* 1990; 8: 209–215.
- [95] Varshavsky A. The early history of the ubiquitin field. *Protein Science* 2006; 15: 647–654.
- [96] Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2004; 1695: 55–72.



- [97] Hershko A, Heller H, Elias S, et al. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *Journal of Biological Chemistry* 1983; 258: 8206–8214.
- [98] Dye BT, Schulman BA. Structural Mechanisms Underlying Posttranslational Modification by Ubiquitin-Like Proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2007; 36: 131–150.
- [99] Jin J, Li X, Gygi SP, et al. Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging. *Nature* 2007; 447: 1135–1138.
- [100] Neutzner M, Neutzner A. Enzymes of ubiquitination and deubiquitination. *Essays Biochem* 2012; 52: 37–50.
- [101] Pickart CM. Mechanisms Underlying Ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 503–533.
- [102] Huang L, Kinnucan E, Wang G, et al. Structure of an E6AP-UbcH7 Complex: Insights into Ubiquitination by the E2-E3 Enzyme Cascade. *Science (1979)* 1999; 286: 1321–1326.
- [103] Zheng N, Wang P, Jeffrey PD, et al. Structure of a c-Cbl-UbcH7 Complex. *Cell* 2000; 102: 533–539.
- [104] Toma-Fukai S, Hibi R, Naganuma T, et al. Crystal structure of GCN5 PCAF N-terminal domain reveals atypical ubiquitin ligase structure. *Journal of Biological Chemistry* 2020; 295: 14630–14639.
- [105] Verdecia MA, Joazeiro CAP, Wells NJ, et al. Conformational Flexibility Underlies Ubiquitin Ligation Mediated by the WWP1 HECT Domain E3 Ligase. *Mol Cell* 2003; 11: 249–259.
- [106] Ogunjimi AA, Briant DJ, Pece-Barbara N, et al. Regulation of Smurf2 Ubiquitin Ligase Activity by Anchoring the E2 to the HECT Domain. *Mol Cell* 2005; 19: 297–308.
- [107] Buetow L, Huang DT. Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17: 626–642.
- [108] Mace PD, Linke K, Feltham R, et al. Structures of the cIAP2 RING Domain Reveal Conformational Changes Associated with Ubiquitin-conjugating Enzyme (E2) Recruitment. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283: 31633–31640.
- [109] Plechanovová A, Jaffray EG, Tatham MH, et al. Structure of a RING E3 ligase and ubiquitin-loaded E2 primed for catalysis. *Nature* 2012; 489: 115–120.
- [110] Dou H, Buetow L, Sibbet GJ, et al. BIRC7–E2 ubiquitin conjugate structure reveals the mechanism of ubiquitin transfer by a RING dimer. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19: 876–883.
- [111] Hoppe T. Multiubiquitylation by E4 enzymes: ‘one size’ doesn’t fit all. *Trends Biochem Sci* 2005; 30: 183–187.
- [112] Clague MJ, Barsukov I, Coulson JM, et al. Deubiquitylases From Genes to Organism. *Physiol Rev* 2013; 93: 1289–1315.
- [113] Komander D, Clague MJ, Urbé S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 550–563.

- [114] Abdul Rehman SA, Kristariyanto YA, Choi S-Y, et al. MINDY-1 Is a Member of an Evolutionarily Conserved and Structurally Distinct New Family of Deubiquitinating Enzymes. *Mol Cell* 2016; 63: 146–155.
- [115] Ye Y, Akutsu M, Reyes-Turcu F, et al. Polyubiquitin binding and cross-reactivity in the USP domain deubiquitinase USP21. *EMBO Rep* 2011; 12: 350–357.
- [116] Peng J, Schwartz D, Elias JE, et al. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 921–926.
- [117] Petroski MD, Zhou X, Dong G, et al. Substrate Modification with Lysine 63-linked Ubiquitin Chains through the UBC13-UEV1A Ubiquitin-conjugating Enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282: 29936–29945.
- [118] Rodrigo-Brenni MC, Morgan DO. Sequential E2s Drive Polyubiquitin Chain Assembly on APC Targets. *Cell* 2007; 130: 127–139.
- [119] Hoeghe C, Pfander B, Moldovan G-L, et al. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 2002; 419: 135–141.
- [120] Williams RL, Urbé S. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 355–368.
- [121] Trempe J-F, Brown NR, Lowe ED, et al. Mechanism of Lys48-linked polyubiquitin chain recognition by the Mud1 UBA domain. *EMBO J* 2005; 24: 3178–3189.
- [122] Finley D. Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 477–513.
- [123] Durcan TM, Tang MY, Pérusse JR, et al. USP 8 regulates mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from parkin. *EMBO J* 2014; 33: 2473–2491.
- [124] Ordureau A, Heo J-M, Duda DM, et al. Defining roles of PARKIN and ubiquitin phosphorylation by PINK1 in mitochondrial quality control using a ubiquitin replacement strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015; 112: 6637–6642.
- [125] Grice GL, Lobb IT, Weekes MP, et al. The Proteasome Distinguishes between Heterotypic and Homotypic Lysine-11-Linked Polyubiquitin Chains. *Cell Rep* 2015; 12: 545–553.
- [126] Zhang J, Wan L, Dai X, et al. Functional characterization of Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) E3 ubiquitin ligases in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2014; 1845: 277–293.
- [127] Paul A, Wang B. RNF8- and Ube2S-Dependent Ubiquitin Lysine 11-Linkage Modification in Response to DNA Damage. *Mol Cell* 2017; 66: 458-472.e5.
- [128] Li Z, Fan S, Wang J, et al. Zebrafish F-box Protein fbxo3 Negatively Regulates Antiviral Response through Promoting K27-Linked Polyubiquitination of the Transcription Factors irf3 and irf7. *The Journal of Immunology* 2020; 205: 1897–1908.
- [129] Yu Y, Hayward GS. The Ubiquitin E3 Ligase RAUL Negatively Regulates Type I Interferon through Ubiquitination of the Transcription Factors IRF7 and IRF3. *Immunity* 2010; 33: 863–877.

- [130] Tauriello DVF, Maurice MM. The various roles of ubiquitin in Wnt pathway regulation. *Cell Cycle* 2010; 9: 3724–3733.
- [131] Ikeda F, Dikic I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. *EMBO Rep* 2008; 9: 536–542.
- [132] Cappadocia L, Lima CD. Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism. *Chem Rev* 2018; 118: 889–918.
- [133] Abidi N, Xirodimas DP. Regulation of cancer-related pathways by protein NEDDylation and strategies for the use of NEDD8 inhibitors in the clinic. *Endocr Relat Cancer* 2015; 22: T55–T70.
- [134] Sundqvist A, Liu G, Mirsaliotis A, et al. Regulation of nucleolar signalling to p53 through NEDDylation of L11. *EMBO Rep* 2009; 10: 1132–1139.
- [135] Enchev RI, Schulman BA, Peter M. Protein neddylation: beyond cullin–RING ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16: 30–44.
- [136] Mao H, Lin X, Sun Y. Neddylation Regulation of Immune Responses. *Research*; 6. Epub ahead of print 7 January 2023. DOI: 10.34133/research.0283.
- [137] Zou T, Zhang J. Diverse and pivotal roles of neddylation in metabolism and immunity. *FEBS J* 2021; 288: 3884–3912.
- [138] Zhao X. SUMO-Mediated Regulation of Nuclear Functions and Signaling Processes. *Mol Cell* 2018; 71: 409–418.
- [139] Eisenhardt N, Chaugule VK, Koidl S, et al. A new vertebrate SUMO enzyme family reveals insights into SUMO-chain assembly. *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22: 959–967.
- [140] Müller S, Ledl A, Schmidt D. SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene* 2004; 23: 1998–2008.
- [141] Jackson SP, Durocher D. Regulation of DNA Damage Responses by Ubiquitin and SUMO. *Mol Cell* 2013; 49: 795–807.
- [142] Muro S. Alterations in Cellular Processes Involving Vesicular Trafficking and Implications in Drug Delivery. *Biomimetics* 2018; 3: 19.
- [143] Kumar A, Ahmad A, Vyawahare A, et al. Membrane Trafficking and Subcellular Drug Targeting Pathways. *Front Pharmacol*; 11. Epub ahead of print 27 May 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.00629.
- [144] Cheung AY, de Vries SC. Membrane Trafficking: Intracellular Highways and Country Roads. *Plant Physiol* 2008; 147: 1451–1453.
- [145] Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19: 313–326.
- [146] Scott CC, Vacca F, Gruenberg J. Endosome maturation, transport and functions. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 31: 2–10.
- [147] Sharma P, Vijaykumar A, Raghavan JV, et al. Particle uptake driven phagocytosis in macrophages and neutrophils enhances bacterial clearance. *Journal of Controlled Release* 2022; 343: 131–141.

- [148] Uribe-Querol E, Rosales C. Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens. *Front Immunol*; 8. Epub ahead of print 24 October 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01368.
- [149] Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003; 422: 37–44.
- [150] Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 603–612.
- [151] Alberts B., Johnson A., Lewis J., et al. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. W.W. Norton & Company, 2007.
- [152] Sørensen K, Neufeld TP, Simonsen A. Membrane Trafficking in Autophagy. 2018, pp. 1–92.
- [153] Cullen PJ, Steinberg F. To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19: 679–696.
- [154] Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J* 2011; 30: 3481–3500.
- [155] Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 121–132.
- [156] Mizuno-Yamasaki E, Rivera-Molina F, Novick P. GTPase Networks in Membrane Traffic. *Annu Rev Biochem* 2012; 81: 637–659.
- [157] Contento AL, Bassham DC. Structure and function of endosomes in plant cells. *J Cell Sci* 2012; 125: 3511–3518.
- [158] Sachse M, Ramm G, Strous G, et al. Endosomes: multipurpose designs for integrating housekeeping and specialized tasks. *Histochem Cell Biol* 2002; 117: 91–104.
- [159] Poteryaev D, Datta S, Ackema K, et al. Identification of the Switch in Early-to-Late Endosome Transition. *Cell* 2010; 141: 497–508.
- [160] Mahmutefendić H, Zagorac GB, Maćešić S, et al. Rapid Endosomal Recycling. In: *Peripheral Membrane Proteins*. InTech, 2018. Epub ahead of print 25 July 2018. DOI: 10.5772/intechopen.75685.
- [161] Bonifacino JS, Rojas R. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 568–579.
- [162] Bucci C, Parton RG, Mather IH, et al. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 1992; 70: 715–728.
- [163] prof. dr. sc. Hana Mahmutefendić Lučin. IP-2020-02-2916, projekt Hrvatske zaklade za znanost „Reorganizacija sučelja između ranih endosoma i endosomalnog reciklirajućeg odjeljka u ranoj fazi infekcije citomegalovirusom“.
- [164] Kobayashi H, Etoh K, Ohbayashi N, et al. Rab35 promotes the recruitment of Rab8, Rab13 and Rab36 to recycling endosomes through MICAL-L1 during neurite outgrowth. *Biol Open* 2014; 3: 803–814.
- [165] Strick DJ, Elferink LA. Rab15 Effector Protein: A Novel Protein for Receptor Recycling from the Endocytic Recycling Compartment. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 5699–5709.
- [166] Gruenberg J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 721–730.

- [167] Grant BD, Donaldson JG. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 597–608.
- [168] Gallon M, Cullen PJ. Retromer and sorting nexins in endosomal sorting. *Biochem Soc Trans* 2015; 43: 33–47.
- [169] Hao Y-H, Doyle JM, Ramanathan S, et al. Regulation of WASH-Dependent Actin Polymerization and Protein Trafficking by Ubiquitination. *Cell* 2013; 152: 1051–1064.
- [170] McNally KE, Faulkner R, Steinberg F, et al. Retriever is a multiprotein complex for retromer-independent endosomal cargo recycling. *Nat Cell Biol* 2017; 19: 1214–1225.
- [171] Derivery E, Sousa C, Gautier JJ, et al. The Arp2/3 Activator WASH Controls the Fission of Endosomes through a Large Multiprotein Complex. *Dev Cell* 2009; 17: 712–723.
- [172] Chi RJ, Harrison MS, Burd CG. Biogenesis of endosome-derived transport carriers. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2015; 72: 3441–3455.
- [173] Simonetti B, Guo Q, Giménez-Andrés M, et al. SNX27–Retromer directly binds ESCPE-1 to transfer cargo proteins during endosomal recycling. *PLoS Biol* 2022; 20: e3001601.
- [174] Seaman MNJ. The retromer complex – endosomal protein recycling and beyond. *J Cell Sci*. Epub ahead of print 1 January 2012. DOI: 10.1242/jcs.103440.
- [175] Seaman MN, Freeman CL. Analysis of the Retromer complex-WASH complex interaction illuminates new avenues to explore in Parkinson disease. *Commun Integr Biol* 2014; 7: e29483.
- [176] McNally KE, Cullen PJ. Endosomal Retrieval of Cargo: Retromer Is Not Alone. *Trends Cell Biol* 2018; 28: 807–822.
- [177] Song P, Trajkovic K, Tsunemi T, et al. Parkin Modulates Endosomal Organization and Function of the Endo-Lysosomal Pathway. *The Journal of Neuroscience* 2016; 36: 2425–2437.
- [178] Sapmaz A, Berlin I, Bos E, et al. USP32 regulates late endosomal transport and recycling through deubiquitylation of Rab7. *Nat Commun* 2019; 10: 1454.
- [179] Williams ET, Glauser L, Tsika E, et al. Parkin mediates the ubiquitination of VPS35 and modulates retromer-dependent endosomal sorting. *Hum Mol Genet* 2018; 27: 3189–3205.
- [180] Shin D, Na W, Lee J-H, et al. Site-specific monoubiquitination downregulates Rab5 by disrupting effector binding and guanine nucleotide conversion. *Elife*; 6. Epub ahead of print 2 October 2017. DOI: 10.7554/eLife.29154.
- [181] Lei Z, Wang J, Zhang L, et al. Ubiquitination-Dependent Regulation of Small GTPases in Membrane Trafficking: From Cell Biology to Human Diseases. *Front Cell Dev Biol*; 9. Epub ahead of print 1 July 2021. DOI: 10.3389/fcell.2021.688352.
- [182] Mattera R, Bonifacino JS. Ubiquitin binding and conjugation regulate the recruitment of Rabex-5 to early endosomes. *EMBO J* 2008; 27: 2484–2494.
- [183] Haas AK, Fuchs E, Kopajtich R, et al. A GTPase-activating protein controls Rab5 function in endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 887–893.

- [184] Lippé R, Miaczynska M, Rybin V, et al. Functional Synergy between Rab5 Effector Rabaptin-5 and Exchange Factor Rabex-5 When Physically Associated in a Complex. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 2219–2228.
- [185] Lachance V, Degrandmaison J, Marois S, et al. Ubiquitination and activation of a Rab GTPase promoted by a  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor/HACE1 complex. *J Cell Sci*. Epub ahead of print 1 January 2013. DOI: 10.1242/jcs.132944.
- [186] Henne WM, Stenmark H, Emr SD. Molecular Mechanisms of the Membrane Sculpting ESCRT Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: a016766–a016766.
- [187] Frankel EB, Audhya A. ESCRT-dependent cargo sorting at multivesicular endosomes. *Semin Cell Dev Biol* 2018; 74: 4–10.
- [188] Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD. The ESCRT Pathway. *Dev Cell* 2011; 21: 77–91.
- [189] Mayers JR, Audhya A. Vesicle formation within endosomes: An ESCRT marks the spot. *Commun Integr Biol* 2012; 5: 50–56.
- [190] Niendorf S, Oksche A, Kisser A, et al. Essential Role of Ubiquitin-Specific Protease 8 for Receptor Tyrosine Kinase Stability and Endocytic Trafficking In Vivo. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 5029–5039.
- [191] Sierra MI, Wright MH, Nash PD. AMSH Interacts with ESCRT-0 to Regulate the Stability and Trafficking of CXCR4. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285: 13990–14004.
- [192] McCullough J, Row PE, Lorenzo Ó, et al. Activation of the Endosome-Associated Ubiquitin Isopeptidase AMSH by STAM, a Component of the Multivesicular Body-Sorting Machinery. *Current Biology* 2006; 16: 160–165.
- [193] Katz M, Shtiegman K, Tal-Or P, et al. Ligand-Independent Degradation of Epidermal Growth Factor Receptor Involves Receptor Ubiquitylation and Hgs, an Adaptor Whose Ubiquitin-Interacting Motif Targets Ubiquitylation by Nedd4. *Traffic* 2002; 3: 740–751.
- [194] Ren J, Kee Y, Huijbrechtse JM, et al. Hse1, a Component of the Yeast Hrs-STAM Ubiquitin-sorting Complex, Associates with Ubiquitin Peptidases and a Ligase to Control Sorting Efficiency into Multivesicular Bodies. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 324–335.
- [195] Ferraiuolo R-M, Manthey KC, Stanton MJ, et al. The Multifaceted Roles of the Tumor Susceptibility Gene 101 (TSG101) in Normal Development and Disease. *Cancers (Basel)* 2020; 12: 450.
- [196] Li L, Liao J, Ruland J, et al. A TSG101/MDM2 regulatory loop modulates MDM2 degradation and MDM2/p53 feedback control. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; 98: 1619–1624.
- [197] Amit I, Yakir L, Katz M, et al. Tal, a Tsg101-specific E3 ubiquitin ligase, regulates receptor endocytosis and retrovirus budding. *Genes Dev* 2004; 18: 1737–1752.
- [198] Kim BY, Olzmann JA, Barsh GS, et al. Spongiform Neurodegeneration-associated E3 Ligase Mahogunin Ubiquitylates TSG101 and Regulates Endosomal Trafficking. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 1129–1142.

- [199] Liese S, Wenzel EM, Kjos I, et al. Protein crowding mediates membrane remodeling in upstream ESCRT-induced formation of intraluminal vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2020; 117: 28614–28624.
- [200] Cadwell K, Coscoy L. The Specificities of Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded E3 Ubiquitin Ligases Are Determined by the Positions of Lysine or Cysteine Residues within the Intracytoplasmic Domains of Their Targets. *J Virol* 2008; 82: 4184–4189.
- [201] Wang X, Herr RA, Hansen T. Viral and cellular MARCH ubiquitin ligases and cancer. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 441–450.
- [202] Früh K, Bartee E, Gouveia K, et al. Immune evasion by a novel family of viral PHD/LAP-finger proteins of gamma-2 herpesviruses and poxviruses. *Virus Res* 2002; 88: 55–69.
- [203] Bartee E, Eyster CA, Viswanathan K, et al. Membrane-Associated RING-CH Proteins Associate with Bap31 and Target CD81 and CD44 to Lysosomes. *PLoS One* 2010; 5: e15132.
- [204] Bartee E, Mansouri M, Hovey Nerenberg BT, et al. Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I by Human Ubiquitin Ligases Related to Viral Immune Evasion Proteins. *J Virol* 2004; 78: 1109–1120.
- [205] De Angelis Rigotti F, De Gassart A, Pforr C, et al. MARCH9-mediated ubiquitination regulates MHC I export from the TGN. *Immunol Cell Biol* 2017; 95: 753–764.
- [206] De Gassart A, Camosseto V, Thibodeau J, et al. MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; 105: 3491–3496.
- [207] von Rohrscheidt J, Petrozziello E, Nedjic J, et al. Thymic CD4 T cell selection requires attenuation of March8-mediated MHCII turnover in cortical epithelial cells through CD83. *Journal of Experimental Medicine* 2016; 213: 1685–1694.
- [208] Lin H, Gao D, Hu M-M, et al. MARCH3 attenuates IL-1 $\beta$ -triggered inflammation by mediating K48-linked polyubiquitination and degradation of IL-1RI. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018; 115: 12483–12488.
- [209] Chen R, Li M, Zhang Y, et al. The E3 ubiquitin ligase MARCH8 negatively regulates IL-1 $\beta$ -induced NF- $\kappa$ B activation by targeting the IL1RAP coreceptor for ubiquitination and degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012; 109: 14128–14133.
- [210] Baravalle G, Park H, McSweeney M, et al. Ubiquitination of CD86 Is a Key Mechanism in Regulating Antigen Presentation by Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 2011; 187: 2966–2973.
- [211] Hoer S, Smith L, Lehner PJ. MARCH-IX mediates ubiquitination and downregulation of ICAM-1. *FEBS Lett* 2007; 581: 45–51.
- [212] Zheng C, Tang Y-D. When MARCH family proteins meet viral infections. *Virol J* 2021; 18: 49.
- [213] McCann AP, Scott CJ, Van Schaeybroeck S, et al. Deubiquitylating enzymes in receptor endocytosis and trafficking. *Biochemical Journal* 2016; 473: 4507–4525.

- [214] Davies CW, Paul LN, Das C. Mechanism of Recruitment and Activation of the Endosome-Associated Deubiquitinase AMSH. *Biochemistry* 2013; 52: 7818–7829.
- [215] Wright MH, Berlin I, Nash PD. Regulation of Endocytic Sorting by ESCRT–DUB-Mediated Deubiquitination. *Cell Biochem Biophys* 2011; 60: 39–46.
- [216] Millard SM, Wood SA. Riding the DUBway: regulation of protein trafficking by deubiquitylating enzymes. *J Cell Biol* 2006; 173: 463–468.
- [217] Tada T, Zhang Y, Koyama T, et al. MARCH8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins. *Nat Med* 2015; 21: 1502–1507.
- [218] Dejarnac O, Hafirassou ML, Chazal M, et al. TIM-1 Ubiquitination Mediates Dengue Virus Entry. *Cell Rep* 2018; 23: 1779–1793.
- [219] Deschamps T, Dogrammatzis C, Mullick R, et al. Cbl E3 Ligase Mediates the Removal of Nectin-1 from the Surface of Herpes Simplex Virus 1-Infected Cells. *J Virol*; 91. Epub ahead of print 15 June 2017. DOI: 10.1128/JVI.00393-17.
- [220] Qiu J, Sheedlo MJ, Yu K, et al. Ubiquitination independent of E1 and E2 enzymes by bacterial effectors. *Nature* 2016; 533: 120–124.
- [221] Liu S, Luo J, Zhen X, et al. Interplay between bacterial deubiquitinase and ubiquitin E3 ligase regulates ubiquitin dynamics on Legionella phagosomes. *Elife*; 9. Epub ahead of print 2 November 2020. DOI: 10.7554/eLife.58114.
- [222] Meng B, Lever AML. The Interplay between ESCRT and Viral Factors in the Enveloped Virus Life Cycle. *Viruses* 2021; 13: 324.
- [223] Chung H-Y, Morita E, von Schwedler U, et al. NEDD4L Overexpression Rescues the Release and Infectivity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Constructs Lacking PTAP and YPYL Late Domains. *J Virol* 2008; 82: 4884–4897.
- [224] Kumar S, Barouch-Bentov R, Xiao F, et al. MARCH8 Ubiquitinates the Hepatitis C Virus Nonstructural 2 Protein and Mediates Viral Envelopment. *Cell Rep* 2019; 26: 1800-1814.e5.
- [225] Kim ET, Oh SE, Lee Y-O, et al. Cleavage Specificity of the UL48 Deubiquitinating Protease Activity of Human Cytomegalovirus and the Growth of an Active-Site Mutant Virus in Cultured Cells. *J Virol* 2009; 83: 12046–12056.
- [226] Schlieker C, Weihofen WA, Frijns E, et al. Structure of a Herpesvirus-Encoded Cysteine Protease Reveals a Unique Class of Deubiquitinating Enzymes. *Mol Cell* 2007; 25: 677–687.
- [227] Thiel N, Keyser KA, Lemmermann NAW, et al. The Mouse Cytomegalovirus Gene m42 Targets Surface Expression of the Protein Tyrosine Phosphatase CD45 in Infected Macrophages. *PLoS Pathog* 2016; 12: e1006057.
- [228] Koshizuka T, Kondo H, Kato H, et al. Human cytomegalovirus UL42 protein inhibits the degradation of glycoprotein B through inhibition of Nedd4 family ubiquitin E3 ligases. *Microbiol Immunol* 2021; 65: 472–480.
- [229] Gao Y, Colletti K, Pari GS. Identification of Human Cytomegalovirus UL84 Virus- and Cell-Encoded Binding Partners by Using Proteomics Analysis. *J Virol* 2008; 82: 96–104.



- [230] Zimmermann C, Büscher N, Krauter S, et al. The Abundant Tegument Protein pUL25 of Human Cytomegalovirus Prevents Proteasomal Degradation of pUL26 and Supports Its Suppression of ISGylation. *J Virol*; 92. Epub ahead of print 15 December 2018. DOI: 10.1128/JVI.01180-18.
- [231] Hilterbrand AT, Boutz DR, Marcotte EM, et al. Murine Cytomegalovirus Deubiquitinase Regulates Viral Chemokine Levels To Control Inflammation and Pathogenesis. *mBio*; 8. Epub ahead of print 8 March 2017. DOI: 10.1128/mBio.01864-16.
- [232] Dong H, Wu W, Li J, et al. PML Body Component Sp100A Is a Cytosolic Responder to IFN and Activator of Antiviral ISGs. *mBio*; 13. Epub ahead of print 20 December 2022. DOI: 10.1128/mbio.02044-22.
- [233] Liu X-J, Yang B, Huang S-N, et al. Human cytomegalovirus IE1 downregulates Hes1 in neural progenitor cells as a potential E3 ubiquitin ligase. *PLoS Pathog* 2017; 13: e1006542.
- [234] Koshizuka T, Kobayashi T, Ishioka K, et al. Herpesviruses possess conserved proteins for interaction with Nedd4 family ubiquitin E3 ligases. *Sci Rep* 2018; 8: 4447.
- [235] Kwon KM, Kim YE, Lee MK, et al. Human Cytomegalovirus UL48 Deubiquitinase Primarily Targets Innermost Tegument Proteins pp150 and Itself To Regulate Their Stability and Protects Virions from Inclusion of Ubiquitin Conjugates. *J Virol*; 95. Epub ahead of print 9 November 2021. DOI: 10.1128/JVI.00991-21.
- [236] Park A, Ra EA, Lee TA, et al. HCMV-encoded US7 and US8 act as antagonists of innate immunity by distinctively targeting TLR-signaling pathways. *Nat Commun* 2019; 10: 4670.
- [237] Albright ER, Mickelson CK, Kalejta RF. Human Cytomegalovirus UL138 Protein Inhibits the STING Pathway and Reduces Interferon Beta mRNA Accumulation during Lytic and Latent Infections. *mBio*; 12. Epub ahead of print 21 December 2021. DOI: 10.1128/mBio.02267-21.
- [238] Lee J-K, Kim J-E, Park BJ, et al. Human cytomegalovirus IE86 protein aa 136–289 mediates STING degradation and blocks the cGAS-STING pathway. *Journal of Microbiology* 2020; 58: 54–60.
- [239] Krause E, de Graaf M, Fliss PM, et al. Murine Cytomegalovirus Virion-Associated Protein M45 Mediates Rapid NF- $\kappa$ B Activation after Infection. *J Virol* 2014; 88: 9963–9975.
- [240] Guo G, Ye S, Xie S, et al. The cytomegalovirus protein US31 induces inflammation through monomacrophages in systemic lupus erythematosus by promoting NF- $\kappa$ B2 activation. *Cell Death Dis* 2018; 9: 104.
- [241] Chen H, Hu Q, Wen T, et al. Arteannuin B, a sesquiterpene lactone from *Artemisia annua*, attenuates inflammatory response by inhibiting the ubiquitin-conjugating enzyme UBE2D3-mediated NF- $\kappa$ B activation. *Phytomedicine* 2024; 124: 155263.
- [242] Fliss PM, Jowers TP, Brinkmann MM, et al. Viral Mediated Redirection of NEMO/IKK $\gamma$  to Autophagosomes Curtails the Inflammatory Cascade. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002517.
- [243] Kwon KM, Oh SE, Kim YE, et al. Cooperative inhibition of RIP1-mediated NF- $\kappa$ B signaling by cytomegalovirus-encoded deubiquitinase and inactive homolog of cellular ribonucleotide reductase large subunit. *PLoS Pathog* 2017; 13: e1006423.

- [244] Schilling E-M, Scherer M, Reuter N, et al. The Human Cytomegalovirus IE1 Protein Antagonizes PML Nuclear Body-Mediated Intrinsic Immunity via the Inhibition of PML *De Novo* SUMOylation. *J Virol*; 91. Epub ahead of print 15 February 2017. DOI: 10.1128/JVI.02049-16.
- [245] Scherer M, Klingl S, Sevana M, et al. Crystal Structure of Cytomegalovirus IE1 Protein Reveals Targeting of TRIM Family Member PML via Coiled-Coil Interactions. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004512.
- [246] Schlieker C, Korbel GA, Kattenhorn LM, et al. A Deubiquitinating Activity Is Conserved in the Large Tegument Protein of the *Herpesviridae*. *J Virol* 2005; 79: 15582–15585.
- [247] Crnković-Mertens I, Messerle M, Milotić I, et al. Virus Attenuation after Deletion of the Cytomegalovirus Fc Receptor Gene Is Not due to Antibody Control. *J Virol* 1998; 72: 1377–1382.
- [248] Angulo A, Ghazal P, Messerle M. The Major Immediate-Early Gene *ie3* of Mouse Cytomegalovirus Is Essential for Viral Growth. *J Virol* 2000; 74: 11129–11136.
- [249] Tischer BK, Smith GA, Osterrieder N. En Passant Mutagenesis: A Two Step Markerless Red Recombination System. 2010, pp. 421–430.
- [250] Brizić I, Lisnić B, Brune W, et al. Cytomegalovirus Infection: Mouse Model. *Curr Protoc Immunol* 2018; 122: e51.
- [251] Sasaki DT, Dumas SE, Engleman EG. Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence. *Cytometry* 1987; 8: 413–420.
- [252] Kalaidzidis I, Miaczynska M, Brewińska-Olchowik M, et al. APPL endosomes are not obligatory endocytic intermediates but act as stable cargo-sorting compartments. *Journal of Cell Biology* 2015; 211: 123–144.
- [253] Vale-Costa S, Amorim M. Recycling Endosomes and Viral Infection. *Viruses* 2016; 8: 64.
- [254] Blagojević Zagorac G, Mahmutefendić H, Maćešić S, et al. Quantitative Analysis of Endocytic Recycling of Membrane Proteins by Monoclonal Antibody-Based Recycling Assays. *J Cell Physiol* 2017; 232: 463–476.
- [255] Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; 9: 676–682.
- [256] Kutle I, Sengstake S, Templin C, et al. The M25 gene products are critical for the cytopathic effect of mouse cytomegalovirus. *Sci Rep* 2017; 7: 15588.
- [257] Kutle I, Szymańska-de Wijs KM, Bogdanow B, et al. Murine Cytomegalovirus M25 Proteins Sequester the Tumor Suppressor Protein p53 in Nuclear Accumulations. *J Virol*; 94. Epub ahead of print 29 September 2020. DOI: 10.1128/jvi.00574-20.
- [258] Kaspari M, Tavalai N, Stamminger T, et al. Proteasome inhibitor MG132 blocks viral DNA replication and assembly of human cytomegalovirus. *FEBS Lett* 2008; 582: 666–672.
- [259] Yang Y, Kitagaki J, Dai RM, et al. Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer Res* 2007; 67: 9472–9481.
- [260] Fang S, Weissman AM. Ubiquitin-proteasome system. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 61. Epub ahead of print June 2004. DOI: 10.1007/s00018-004-4129-5.

- [261] Caragliano E, Bonazza S, Frascaroli G, et al. Human cytomegalovirus forms phase-separated compartments at viral genomes to facilitate viral replication. *Cell Rep* 2022; 38: 110469.
- [262] Chen Z, Knutson E, Wang S, et al. Stabilization of p53 in human cytomegalovirus-initiated cells is associated with sequestration of HDM2 and decreased p53 ubiquitination. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282: 29284–29295.
- [263] Lodha M, Muchsin I, Jürges C, et al. Decoding murine cytomegalovirus. *PLoS Pathog* 2023; 19: e1010992.
- [264] Sakai R, Fukuda R, Unida S, et al. The integral function of the endocytic recycling compartment is regulated by RFFL-mediated ubiquitylation of Rab11 effectors. *J Cell Sci*; 132. Epub ahead of print 1 February 2019. DOI: 10.1242/jcs.228007.
- [265] Hao Y-H, Fountain MD, Fon Tacer K, et al. USP7 Acts as a Molecular Rheostat to Promote WASH-Dependent Endosomal Protein Recycling and Is Mutated in a Human Neurodevelopmental Disorder. *Mol Cell* 2015; 59: 956–969.
- [266] Cepeda V, Esteban M, Fraile-Ramos A. Human cytomegalovirus final envelopment on membranes containing both *trans* -Golgi network and endosomal markers. *Cell Microbiol* 2010; 12: 386–404.
- [267] Mahmutefendić Lučin H, Blagojević Zagorac G, Marčelić M, et al. Host Cell Signatures of the Envelopment Site within Beta-Herpes Virions. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 9994.
- [268] Fraile-Ramos A, Cepeda V, Elstak E, et al. Rab27a Is Required for Human Cytomegalovirus Assembly. *PLoS One* 2010; 5: e15318.
- [269] Archer MA, Brechtel TM, Davis LE, et al. Inhibition of endocytic pathways impacts cytomegalovirus maturation. *Sci Rep* 2017; 7: 46069.
- [270] Sapmaz A, Berlin I, Bos E, et al. USP32 regulates late endosomal transport and recycling through deubiquitylation of Rab7. *Nat Commun* 2019; 10: 1454.
- [271] Lin H, Li S, Shu HB. The Membrane-Associated MARCH E3 Ligase Family: Emerging Roles in Immune Regulation. *Frontiers in immunology* 2019; 10: 1751.
- [272] Eyster CA, Cole NB, Petersen S, et al. MARCH ubiquitin ligases alter the itinerary of clathrin-independent cargo from recycling to degradation. *Mol Biol Cell* 2011; 22: 3218–3230.
- [273] Miao Y, Du Y, Wang B, et al. Spatiotemporal recruitment of the ubiquitin-specific protease USP8 directs endosome maturation. *Elife*; 13. Epub ahead of print 22 November 2024. DOI: 10.7554/elife.96353.
- [274] Martin M, Sandhu P, Kumar R, et al. The Immune-Specific E3 Ubiquitin Ligase MARCH1 Is Upregulated during Human Cytomegalovirus Infection to Regulate Iron Levels. *J Virol*; 96. Epub ahead of print 23 March 2022. DOI: 10.1128/jvi.01806-21.
- [275] Funakoshi Y, Chou MM, Kanaho Y, et al. TRE17/USP6 regulates ubiquitylation and trafficking of cargo proteins that enter cells by clathrin-independent endocytosis. *J Cell Sci* 2014; 127: 4750–4761.

- [276] Martinu L, Masuda-Robens JM, Robertson SE, et al. The TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16) Domain Protein TRE17 Regulates Plasma Membrane-Endosomal Trafficking through Activation of Arf6. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 9752–9762.
- [277] Bomberger JM, Barnaby RL, Stanton BA. The Deubiquitinating Enzyme USP10 Regulates the Post-endocytic Sorting of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Airway Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284: 18778–18789.
- [278] Liu X-J, Yang B, Huang S-N, et al. Human cytomegalovirus IE1 downregulates Hes1 in neural progenitor cells as a potential E3 ubiquitin ligase. *PLoS Pathog* 2017; 13: e1006542.
- [279] Caplan S. A tubular EHD1-containing compartment involved in the recycling of major histocompatibility complex class I molecules to the plasma membrane. *EMBO J* 2002; 21: 2557–2567.
- [280] Horiuchi H, Lippé R, McBride HM, et al. A Novel Rab5 GDP/GTP Exchange Factor Complexed to Rabaptin-5 Links Nucleotide Exchange to Effector Recruitment and Function. *Cell* 1997; 90: 1149–1159.
- [281] Naslavsky N, Caplan S. The enigmatic endosome – sorting the ins and outs of endocytic trafficking. *J Cell Sci*; 131. Epub ahead of print 1 July 2018. DOI: 10.1242/jcs.216499.
- [282] Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 1983; 97: 329–339.
- [283] Tran K, Mahr JA, Spector DH. Proteasome Subunits Relocalize during Human Cytomegalovirus Infection, and Proteasome Activity Is Necessary for Efficient Viral Gene Transcription. *J Virol* 2010; 84: 3079–3093.
- [284] DeMeritt IB, Milford LE, Yurochko AD. Activation of the NF- $\kappa$ B Pathway in Human Cytomegalovirus-Infected Cells Is Necessary for Efficient Transactivation of the Major Immediate-Early Promoter. *J Virol* 2004; 78: 4498–4507.
- [285] Le-Trilling VTK, Megger DA, Katschinski B, et al. Broad and potent antiviral activity of the NAE inhibitor MLN4924. *Sci Rep* 2016; 6: 19977.
- [286] Tran K, Mahr JA, Spector DH. Proteasome Subunits Relocalize during Human Cytomegalovirus Infection, and Proteasome Activity Is Necessary for Efficient Viral Gene Transcription. *J Virol* 2010; 84: 3079–3093.
- [287] Zou C, Mallampalli RK. Regulation of histone modifying enzymes by the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 2014; 1843: 694–702.
- [288] Winkler LL, Kalejta RF. The 19S Proteasome Activator Promotes Human Cytomegalovirus Immediate Early Gene Expression through Proteolytic and Nonproteolytic Mechanisms. *J Virol* 2014; 88: 11782–11790.
- [289] Hwang J, Kalejta RF. Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells. *Virology* 2007; 367: 334–338.
- [290] Liu X, Yan S, Abecassis M, et al. Establishment of Murine Cytomegalovirus Latency In Vivo Is Associated with Changes in Histone Modifications and Recruitment of Transcriptional Repressors to the Major Immediate-Early Promoter. *J Virol* 2008; 82: 10922–10931.

- [291] Kim Y-E, Oh SE, Kwon KM, et al. Involvement of the N-Terminal Deubiquitinating Protease Domain of Human Cytomegalovirus UL48 Tegument Protein in Autoubiquitination, Virion Stability, and Virus Entry. *J Virol* 2016; 90: 3229–3242.
- [292] Harbour ME, Breusegem SY, Seaman MNJ. Recruitment of the endosomal WASH complex is mediated by the extended ‘tail’ of Fam21 binding to the retromer protein Vps35. *Biochemical Journal* 2012; 442: 209–220.
- [293] Gopaldass N, Chen K-E, Collins B, et al. Assembly and fission of tubular carriers mediating protein sorting in endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2024; 25: 765–783.
- [294] Tan X, Thapa N, Choi S, et al. Emerging roles of PtdIns(4,5) P<sub>2</sub> – beyond the plasma membrane. *J Cell Sci* 2015; 128: 4047–4056.
- [295] Wang P, Liu H, Wang Y, et al. RAB-10 Promotes EHBP-1 Bridging of Filamentous Actin and Tubular Recycling Endosomes. *PLoS Genet* 2016; 12: e1006093.
- [296] Etoh K, Fukuda M. Rab10 regulates tubular endosome formation through KIF13A/B motors. *J Cell Sci*. Epub ahead of print 1 January 2019. DOI: 10.1242/jcs.226977.
- [297] Farmer T, Xie S, Naslavsky N, et al. Defining the protein and lipid constituents of tubular recycling endosomes. *Journal of Biological Chemistry*; 296. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1074/JBC.RA120.015992.
- [298] Buzuk L, Hellerschmied D. Ubiquitin-mediated degradation at the Golgi apparatus. *Frontiers in Molecular Biosciences*; 10. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1197921.
- [299] Kulkarni-Gosavi P, Makhoul C, Gleeson PA. Form and function of the Golgi apparatus: scaffolds, cytoskeleton and signalling. *FEBS Letters* 2019; 593: 2289–2305.
- [300] Babbey CM, Ahktar N, Wang E, et al. Rab10 Regulates Membrane Transport through Early Endosomes of Polarized Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 3156–3175.
- [301] Puri C, Gratian MJ, Rubinsztein DC. Mammalian autophagosomes form from finger-like phagophores. *Dev Cell* 2023; 58: 2746-2760.e5.
- [302] Fraile-Ramos A, Pelchen-Matthews A, Kledal TN, et al. Localization of HCMV UL33 and US27 in Endocytic Compartments and Viral Membranes. *Traffic* 2002; 3: 218–232.
- [303] Flomm FJ, Soh TK, Schneider C, et al. Intermittent bulk release of human cytomegalovirus. *PLoS Pathog* 2022; 18: e1010575.
- [304] Puri C, Rubinsztein DC. Mammalian phagophores with finger-like shapes emerge from recycling endosomes. *Autophagy* 2024; 20: 1189–1191.
- [305] Marcelić M, Lučin HM, Begonja AJ, et al. Endosomal Phosphatidylinositol-3-Phosphate-Associated Functions Are Dispensable for Establishment of the Cytomegalovirus Pre-Assembly Compartment but Essential for the Virus Growth. *Life* 2021; 11: 859.
- [306] Fujita H, Iwabu Y, Tokunaga K, et al. Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. *J Cell Sci* 2013; 126: 2798–2809.

- [307] Lučin P, Mahmutefendić H, Blagojević Zagorac G, et al. Cytomegalovirus immune evasion by perturbation of endosomal trafficking. *Cell Mol Immunol* 2015; 12: 154–169.
- [308] Jonjic S. CMV immunology. *Cell Mol Immunol* 2015; 12: 125–127.
- [309] Ziegler H, Thäle R, Lucin P, et al. A Mouse Cytomegalovirus Glycoprotein Retains MHC Class I Complexes in the ERGIC/cis-Golgi Compartments. *Immunity* 1997; 6: 57–66.
- [310] Hengel H, Reusch U, Gutermann A, et al. *Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse*. 1999.
- [311] Mahmutefendić H, Blagojević G, Kučić N, et al. Constitutive internalization of murine MHC class I molecules. *J Cell Physiol* 2007; 210: 445–455.
- [312] Zeltzer S, Zeltzer CA, Igarashi S, et al. Virus control of trafficking from sorting endosomes. *mBio*; 9. Epub ahead of print 1 July 2018. DOI: 10.1128/mBio.00683-18.
- [313] Funakoshi Y, Chou MM, Kanaho Y, et al. TRE17/USP6 regulates ubiquitination and trafficking of cargo proteins that enter cells by clathrin-independent endocytosis. *J Cell Sci*. Epub ahead of print 1 January 2014. DOI: 10.1242/jcs.156786.
- [314] Wu Y, Sun Z, Xia L, et al. MHC-I pathway disruption by viruses: insights into immune evasion and vaccine design for animals. *Frontiers in Immunology*; 16. Epub ahead of print 2025. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1540159.
- [315] Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, et al. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986; 319: 675–678.
- [316] Nice TJ, Deng W, Coscoy L, et al. Stress-Regulated Targeting of the NKG2D Ligand Mult1 by a Membrane-Associated RING-CH Family E3 Ligase. *The Journal of Immunology* 2010; 185: 5369–5376.
- [317] Hiršl L, Brizić I, Jenuš T, et al. Murine CMV expressing the high affinity NKG2D ligand MULT-1: A model for the development of cytomegalovirus-based vaccines. *Front Immunol*; 9. Epub ahead of print 7 May 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00991.
- [318] Krmpotic A, Hasan M, Loewendorf A, et al. NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145. *Journal of Experimental Medicine* 2005; 201: 211–220.

## ILUSTRACIJE

### Popis slika

Slika 1. Građa citomegalovirusnog viriona.....	5
Slika 2. Životni ciklus MCMV-a i kinetika izražaja MCMV-gena.....	8
Slika 3. Proces proizvodnje betaherpesvirusa.....	9
Slika 4. Shematski prikaz zrelog virusnog odjeljka za sklapanje virusnih čestica (AC) u MCMV- inficiranim stanicama.....	11
Slika 5. Shematski prikaz staničnog endosomalnog sustava.....	18
Slika 6. Molekule se na membrani ranog endosoma mogu usmjeravati u domene za degradaciju ili u domene za recikliranje.....	20
Slika 7. Sortiranje i recikliranje unutarstaničnih proteina u endosomima.....	22
Slika 8. Mehanizam aktivacije WASHC1 proteina ubikvitinilacijom.....	24
Slika 9. Predviđeni Ub-HA konstrukt u Plix lentiviralnom vektoru korišten za proizvodnju NIH3T3 HA- Ub stabilne stanične linije.....	51
Slika 10. Inhibitor ubikvitinilacije PYR-41 snažno utječe na infekciju NIH3T3 stanica MCMV-om.....	55
Slika 11. PYR-41 povećava izražaj p53 u tretiranim stanicama.....	57
Slika 12. PYR-41 utječe na kinetiku izražaja pIE1 u stanicama zaraženim MCMV-om.....	58
Slika 13. Stanična linija NIH3T3 HA-Ub s inducibilnim izražajem HA-Ub konstrukata.....	59
Slika 14. pIE1 se ubikvitinira u stanicama zaraženim MCMV-om.....	60
Slika 15. PYR-41 koči sintezu pE1, pM57 i pM74 proteina MCMV-a.....	62
Slika 16. Inhibicija ubikvitinilacije ometa stvaranje viriona.....	63
Slika 17. Kinetika stvaranja pre-AC u MCMV inficiranim NIH3T3 stanicama.....	65
Slika 18. Kinetika stvaranja pre-AC u NIH3T3 stanicama inficiranim wtMCMV-om.....	66
Slika 19. PYR-41 inhibira stvaranje pre-AC-a u stanicama zaraženim MCMV-om.....	67
Slika 20. Učinak PYR-41 na izražaj Rab10 i GM130 u neinficiranim NIH3T3 stanicama.....	68
Slika 21. PYR-41 narušava strukturu prethodno stvorenog pre-AC u stanicama zaraženim MCMV-om.....	70
Slika 22. PYR-41 koči nastanak zrelog AC.....	71

Slika 23. Funkcionalna ubikvitinilacija u kasnoj fazi infekcije važna je za proizvodnju infektivnih MCMV viriona.....	72
Slika 24. PYR-41 narušava proces Rab10-povezane tubulacije u uspostavljenom AC-u stanicama zaraženim wtMCMV-om.....	74
Slika 25. Kinetika izražaja MARCH ubikvitinilaza tijekom MCMV infekcije. ....	77
Slika 26. Kinetika izražaja RFFL i Rabex5 ubikvitinilaza tijekom MCMV infekcije. ....	78
Slika 27. Kinetika izražaja USP6 i USP8 tijekom MCMV infekcije. ....	80
Slika 28. Kinetika izražaja USP10, USP15 i AMSH tijekom MCMV infekcije. ....	81
Slika 29. Ubikvitinilacija Rabex5 u neinficiranim stanicama, te u ranoj fazi infekcije s wt MCMV.....	83
Slika 30. Ubikvitinilacija EHD1 i Rab11-FIP1 u neinficiranim stanicama i u ranoj fazi infekcije s wtMCMV.....	84
Slika 31. Ubikvitinilacija WASH1 u neinficiranim stanicama, te u ranoj fazi infekcije s wtMCMV. ....	86
Slika 32. Nakupljanje WASHC1 u perinuklearnom području MCMV inficiranih NIH3T3 stanica. ....	87
Slika 33. Utjecaj WASHC1 na nakupljanje Rab10 u području pre-AC-a. ....	88
Slika 34. Izražaj proteina pIE1 nakon infekcije stanica M48 <sup>C23S</sup> MCMV-om. ....	91
Slika 35. Izražaj proteina pE1 i pm06 nakon infekcije stanica M48 <sup>C23S</sup> MCMV-om.....	92
Slika 36. Izražaj proteina pM55 nakon infekcije stanica M48 <sup>C23S</sup> MCMV-om.....	93
Slika 37. Kinetika produkcije virusnih čestica nakon infekcije wt MCMV i M48C23S MCMV virusima.95	
Slika 38. Nakupljanje Rab10 u područje pre-AC u ranoj fazi infekcije M48C23S MCMV-om.....	97
Slika 39. Kinetika recikliranja transferina u wtMCMV i M48 <sup>C23S</sup> MCMV inficiranim fibroblastima. ....	98
Slika 40. Kinetika recikliranja transferina u wt MCMV i M48 <sup>C23S</sup> MCMV inficiranim fibroblastima. ...	100
Slika 41. Ubikvitinilacija staničnih proteina u neinficiranim stanicama, te u ranoj fazi infekcije wt MCMV i M48 <sup>C23S</sup> MCMV-om.....	102
Slika 42. Mehanizam nastanka transportne vezikule posredovan SNX27:Retromer:ESCPE-1 kompleksom i Rab10. ....	108
Slika 43. Uloga WASHC1 proteina u regulaciji nastanka i odcjepljivanja tubularnih Rab10-PD i njihov značaj u MCMV infekciji.....	110



## Popis tablica

Tablica 1. Kemikalije korištene u radu.....	34
Tablica 2. Hranjive podloge i puferi korišteni u radu.....	37
Tablica 3. Laboratorijski pribor korišten u radu.....	39
Tablica 4. Popis primarnih protutijela koja prepoznaju MCMV proteine. ....	41
Tablica 5. Popis sekundarnih protutijela korištenih u ovom radu. ....	42
Tablica 6. Popis siRNA korištenih u ovom radu. ....	42
Tablica 7. Bakterijski plazmidi.....	44
Tablica 8. Popis ispitivanih staničnih ubikvitinilaza i njihove uloge. ....	75
Tablica 9. Popis ispitivanih staničnih deubikvitinilaza i njihove uloge.....	79
Tablica 10. Popis ispitivanih staničnih proteina koji sudjeluju u reguliranju endosomalnoga prometovanja. .....	82

## POPIS POKRATA

AC - odjeljak za sklapanje virusnih čestica (engl. *assembly compartment*)

ACT - adaptivna terapija T stanicama (engl. *adaptive T cell therapy*)

AIDS - sindrom stečene imunodeficijencije (engl. *acquired immunodeficiency syndrome*)

AMP-Ub - anozin monofosfat-ubikvitin (engl. *adenosine monophosphate-ubiquitin*)

ATP - adenzin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

BAR - (engl. *Bin/Amphiphysin/Rvs*)

CLIC-GEEC - klatrin neovisna endocitoza – GPI sidrenih proteina (engl. *clathrin-independent endocytosis-GPI-anchored proteins enriched compartments*)

CME-klatrin-ovisna endocitoza (engl. *clathrin mediated endocytosis*)

CSC - sortirajući kompleks (engl. *cargo selective complex*)

DISC - (engl. *disabled single cycle*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

dsDNA - dvonalčana deoksiribonukleinska kiselina (engl. *double stranded DNA*)

DUB - deubikvitinilaza (engl. *deubiquitinase*)

E - rano (engl. *early*)

EBV - Epstein-Barr virus (engl. *Epstein-Barr virus*)

EBOV - ebola virus (engl. *Ebola virus*)

EE - rani endosom (engl. *early endosome*)

EEA1 - rani endosomalni antigen 1 (engl. *early endosomal antigen 1*)

EGF - epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*)

EGFR - receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

ER - endoplazmatski retikulum (engl. *endoplasmic reticulum*)

ERC - sučelje ranih endosoma i endosomalnog reciklirajućeg odjeljka (engl. *endosomal recycling compartment*)

ESCRT - endosomalni sortirajući kompleksi potrebni za prometovanje (engl. *endosomal sorting complex required for transport*)

GFP - zeleni fluorescentni protein (engl. *green fluorescent protein*)

HBV - Hepatitis-B virus (engl. *hepatitis-B virus*)

HCMV - humani citomegalovirus (engl. *human cytomegalovirus*)

HECT - domene homologne s E6-povezanim proteinom na C-kraju (engl. *homologous with E6-associated protein C-terminus*)

HHV-6 - humanog herpesvirusa-6 (engl. *human herpesvirus 6*)

HHV-7 - humanog herpesvirusa-7 (engl. *human herpesvirus 7*)

HPV - humani papiloma virus (engl. *human papilloma virus*)

HSV-1 - herpes simpleks virus 1 (engl. *herpes simplex virus 1*)

HSV-2 - herpes simpleks virus 2 (engl. *herpes simplex virus 2*)

i-AC - unutrašnji dio odjeljka za sklapanje virusnih čestica (engl. *inner assembly compartment*)

ICTV - Međunarodni odbor za taksonomiju virusa (eng. *International Committee on Taxonomy of Viruses*)

IE - neposredno rano (engl. *immediate early*)

ILV - intraluminalne vezikule (engl. *intraluminal vesicles*)

KSHV - Herpesvirus povezan s Kaposijevim sarkomom (engl. *Kaposi's sarcoma herpesvirus*)

L – kasno (engl. *late*)

LE - kasni endosomi (engl. *late endosome*)

MCMV - mišji citomegalovirus (engl. *murine cytomegalovirus*)

MCP - glavni kapsidni protein (engl. *major capsid protein*)

MOI - pojačanje infekcije (engl. *multiplicity of infection*)

MTOC - centar za organizaciju mikrotubula (engl. *microtubule organizing center*)

MVB - multivezikularna tjelešca (engl. *multivesicular bodies*)

o-AC - vanjski dio odjeljka za sklapanje virusnih čestica (engl. *outer assembly compartment*)

OTP - tumorske proteaze jajnika (engl. *ovarian tumor proteases*)

PCNA - jezgrin antigen proliferirajućih stanica (engl. *proliferating-cell nuclear antigen*)

PDGFR - receptor faktora rasta izveden iz trombocita (engl. *platelet-derived growth factor receptor*)

PEDV - virus epidemijskog proljeva svinja (engl. *porcine epidemic diarrhea virus*)

PFU - plak formirajuća jedinica (engl. *plaque forming units*)

PI(3)P - fosfatidilinozitol-3-fosfat (engl. *phosphatidylinositol 3-phosphate*)

PM - plazmatska membrana (engl. *plasma membrane*)

pre-AC - rani odjeljak za sklapanje virusnih čestica (engl. *pre-assembly compartment*)

pre-EE - pre-rani endosomi (engl. *pre-early endosome*)

RE - reciklirajući endosomi (engl. *recycling endosome*)

SE - sortirajući endosomi (engl. *sorting endosome*)

SNHL - senzorneuralni gubitak sluha (engl. *sensoryneural hearing loss*)

SNX - sortirajući neksini (engl. *sorting nexin*)

TfR - transferinski receptor (engl. *transferrin receptor*)

TGN - trans-Golgijska mreža (engl. *trans-Golgi network*)

TRE - tubularni sortirajući endosomi (engl. *tubular sorting endosomes*)

Ub - ubikvitin (engl. *ubiquitin*)

UBD - ubikvitin vezujuće domene (engl. *ubiquitin binding domain*)

Ubl - ubikvitinu slični proteini (engl. *ubiquitin-like protein*)

UCP - C-terminalne ubikvitin proteaze (engl. *ubiquitin C-terminal proteases*)

USP - ubikvitin specifične proteaze (engl. *ubiquitin specific proteases*)

VZV - varicela zoster virus (engl. *varicella zoster virus*)

WASH (engl. *Wiskott–Aldrich Syndrome Protein and SCAR Homolog*)

# ŽIVOTOPIS

## Barbara Radić

Datum rođenja: 04/10/1996.

e-mail: [barbara.radic@uniri.hr](mailto:barbara.radic@uniri.hr)

### Obrazovanje

2021. – 2024.

Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij "Biomedicina"

Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

2019. – 2021.

Magistra biologije (mag. biol.)

Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2015. – 2019.

Sveučilišna prvostupnica biologije (univ. bacc. biol.)

Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

### Radno iskustvo

11. 2021. – danas

Asistent/doktorand

Sveučilište u Rijeci, Zavod za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju

Projekt Hrvatske zaklade za znanost (IP-2020-02-2916, " Reorganizacija sučelja ranih endosoma i endosomalnog reciklirajućeg odjeljka u ranoj fazi infekcije citomegalovirusom") – Suradnik u sklopu „Projekta razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti”

### Članstva

Hrvatsko Imunološko Društvo

Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju

Hrvatsko društvo fiziologa

## **Znanstvena djelatnost**

### **Znanstveni radovi:**

- Radić, B., Štimac, I., Omerović, A., Viduka, I., Marčelić, M., Zagorac, G.B., Lučin, P., Mahmutefendić Lučin, H. Ubiquitination Regulates Reorganization of the Membrane System During Cytomegalovirus Infection. *Life* 2025, 15, 1212. <https://doi.org/10.3390/life15081212>
- Mahmutefendić Lučin H, Štimac I, Marčelić M, Skočaj M, Lisnić B, Omerović A, Viduka I, Radić B, Karleuša L, Blagojević Zagorac G, Deželjin M, Jurak Begonja A and Lučin P (2025) Rab10-associated tubulation as an early marker for biogenesis of the assembly compartment in cytomegalovirus-infected cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 12:1517236. doi: 10.3389/fcell.2024.1517236
- Štimac I, Marčelić M, Radić B, Viduka I, Blagojević Zagorac G, Lukanović Jurić S, Rožmanić C, Messerle M, Brizić I, Lučin P, Mahmutefendić Lučin H. SNX27:Retromer:ESCPE-1-mediated early endosomal tubulation impacts cytomegalovirus replication. *Front Cell Infect Microbiol.* 2024 Sep 18;14:1399761. doi: 10.3389/fcimb.2024.1399761. PMID: 39359939; PMCID: PMC11445146.

### **Kongresna priopćenja:**

- Barbara Radić, Igor Štimac, Omerović Alen, Viduka Ivona, Gordana Blagojević Zagorac, Pero Lučin, Hana Mahmutefendić Lučin; Pyr-41 inhibited ubiquitination impairs the formation but also the maintenance of assembly compartment intergity in murine cytomegalovirus – infected cells (9<sup>th</sup> European Congress of Virology 2025, 27. – 30. travnja, 2025)
- Barbara Radić, Igor Štimac, Gordana Blagojević Zagorac, Pero Lučin, Hana Mahmutefendić Lučin; Extensive disruption of ubiquitination processes bc Pyr41 delays murine cytomegalovirus replication cycle in infected fibroblasts (18<sup>th</sup> Congress of the International Union of Microbiological Societies, 23. – 25. listopada, 2024)
- Barbara Radić, Igor Štimac, Marina Marčelić, Gordana Blagojević Zagorac, Pero Lučin, Hana Mahmutefendić Lučin; Murine cytomegalovirus disrupts endosomal recycling by changing the ubiquitination status of EHD1 and MICALL1 (Power of Viruses 2024, 25. – 28. rujna, 2024)
- Barbara Radić, Igor Štimac, Marina Marčelić, Gordana Blagojević Zagorac, Pero Lučin, Hana Mahmutefendić Lučin; Murine cytomegalovirus affects the activation of WASH1 protein for regulation of endosomal recycling by hiperubiquitination ( Science and Us, 16. – 18. svibnja 2024)
- Barbara Radić, Tina Ružić, Igor Štimac, Berislav Lisnić, Gordana Blagojević Zagorac, Pero Lučin, Hana Mahmutefendić Lučin; Murine cytomegalovirus M48 protein deubiquitynilates EHD1 and Rab11-FIP1 proteins and inhibits transferrin recycling- poster prezentacija (12 th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS 2023) 20. – 23. listopada, 2023)
- Barbara Radić, Tina Ružić, Igor Štimac, Berislav Lisnić, Gordana Blagojević Zagorac, Pero Lučin, Hana Mahmutefendić Lučin; Ubiquitination of Rab5 guanine nucleotide exchange factor (GEF) Rabex5 and deubiquitination of Rab11FIP1 affects transferrin recycling in MCMV infected cells - poster prezentacija (Annual Meeting of the Croatian Immunological Society Brijuni, 5. - 7. listopada, 2023)

- Igor Štimac, Barbara Radić, Gordana Blagojević Zagorac, Marina Marčelić, Berislav Lisnić, Pero Lučin, Hana Mahmutefendić Lučin; EHBP1 and Rabin8 GTPase recruit Rab10 GTPase in Murine cytomegalovirus assembly compartment – poster prezentacija (Annual Meeting of the Croatian Immunological Society Brijuni, 5. - 7. listopada, 2023.)

- Barbara Radić, Tina Ružić, Igor Štimac, Berislav Lisnić, Silvija Lukanović Jurić, Gordana Blagojević Zagorac, Pero Lučin, Hana Mahmutefendić Lučin; Deubiquitination function of murine cytomegalovirus M48 protein influence remodeling of WASH1 endosomal network in the early phase of infection – poster prezentacija (3<sup>rd</sup> Regional Congress of Physiological Societies and 5<sup>th</sup> Congress of Croatian Physiological Society, 22 – 24 rujan 2022)

- Barbara Radić, Tina Ružić, Igor Štimac, Berislav Lisnić, Silvija Lukanović Jurić, Gordana Blagojević Zagorac, Pero Lučin, Hana Mahmutefendić Lučin; Murine cytomegalovirus M48 protein deubiquitylation function is important in recycling processes in host cells – poster prezentacija (46<sup>th</sup> International Herpesvirus Workshop, 25 – 26 srpnja 2022)

## **Stručna djelatnost**

### Suradnik u realizaciji znanstvenoistraživačkih projekata:

- Projekt Sveučilišta u Rijeci „MARCH E3 ubikvitin ligaze u citomegalovirusnoj infekciji“ - uniri-iskusni-biomed-23-179, voditelj: prof. dr. sc. Hana Mahmutefendić Lučin

- IP-2020-02-2916, projekt Hrvatske zaklade za znanost „Reorganizacija sučelja između ranih endosoma i endosomalnog reciklirajućeg odjeljka u ranoj fazi infekcije citomegalovirusom“, voditelj: prof. dr. sc. Hana Mahmutefendić Lučin

- Projekt Sveučilišta u Rijeci „Rab10 u biogenezi endosomalnog reciklirajućeg odjeljka“ - uniri-biomed-18-180, voditelj: prof. dr. sc. Hana Mahmutefendić Lučin

### Stručna aktivnost:

- Radionica: Approaches to Single-Cell Analysis and Imaging

Radionicu je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom ”Imunoregulatorna uloga proteina PrPC u imunološkom antivirusnom odgovoru i otpornosti na citomegalovirusnu infekciju” (IP-2020-02-6617) Rijeka, Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Centar za proteomiku '