Ispitivanje utjecaja otopina tripsin i EDTA na stabilnost površinskih biljega stanica MEF, B12, RAW264.7 i DC 2.4 u različitim vremenskim intervalima

Bajt, Patricija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:968796

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Biotehnologija u medicini

Ispitivanje utjecaja otopina tripsin i EDTA na stabilnost površinskih biljega stanica MEF, B12, RAW264.7 i DC 2.4 u različitim vremenskim intervalima

Diplomski rad

Patricija Bajt

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Biotehnologija u medicini

Ispitivanje utjecaja otopina tripsin i EDTA na stabilnost površinskih biljega stanica MEF, B12, RAW264.7 i DC 2.4 u različitim vremenskim intervalima

Diplomski rad

Patricija Bajt

Rijeka, 2020.

Mentor rada: doc. dr. sc. Vanda Juranić Lisnić

UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Graduate programme

Biotechnology in medicine

The effect of trypsin and EDTA solutions on the stability of surface markers of MEF, B12, RAW264.7 and DC 2.4 cells at different time points

Diploma thesis

Patricija Bajt

Rijeka, 2020

Diplomski rad obranjen je dana 28.09.2020. pred povjerenstvom:

1. izv. prof. dr. sc. Antonija Jurak Begonja
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Munitić
3. doc. dr. sc. Vanda Juranić Lisnić
4. dr. sc. Jelena Železnjak

Rad ima 68 stranica, 15 slika, 4 tablice i 50 literaturnih navoda.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Centru za proteomiku i Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci pod mentorstvom doc. dr. sc. Vande Juranić Lisnić i stručnim vodstvom dr. sc. Jelene Železnjak.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Vandi Juranić Lisnić na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za izradu diplomskog rada pod njezinim vodstvom te pomoći pri pisanju diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem komentorici dr.sc. Jeleni Železnjak koja je uvijek našla vremena i strpljenja za sva moja pitanja, koja je pomagala svojim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada te za izvrsnu organizaciju pri izradi diplomskog rada.

Najviše se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na svakodnevnoj podršci u svemu što radim.

Sažetak

Jedan od prvih koraka prilikom analize adherentnih stanica na protočnom citometru je njihovo odljepljivanje od podloge i dobivanje stanične suspenzije, međutim ovaj postupak može utjecati na kompoziciju i integritet molekula ispoljenih na samoj površini stanice. Kako bismo to izbjegli, odlučili smo ispitati utjecaj otopina tripsin i EDTA na izražaj određenih proteina, s obzirom na vrijeme inkubacije. Proteini čija razina je praćena su molekule MHC I, m04 te CD80 na čiji izražaj utječe mišji citomegalovirus (MCMV) kako bi izbjegao prepoznavanje od stanica imunosnog sustava, a njihova regulacija i ekspresija predmet su intenzivnog istraživanja u Centru za proteomiku. Razine navedenih molekula proučavane su na stanicama MEF, B12, DC 2.4 i Raw264.7 s i bez infekcije MCMV-om. Dobiveni rezultati analizom na protočnom citometru pokazali su da je izražaj MHC I i m04 značajno smanjen samo na inficiranim stanicama RAW264.7 nakon tretmana otopinom EDTA 10 minuta, a razina CD80 na neinficiranim i inficiranim stanicama DC2.4 tretmanom s otopinom tripsin 10 minuta. Dobiveni rezultati ukazuju na to da je bitno na vrijeme zaustaviti djelovanje otopina tripsin i EDTA kako bi se dobili točni i pouzdani rezultati u budućim eksperimentima. Osim toga, usporedila se i razina navedenih molekula na stanicama te je pokazana veća razina MHC I i m04 na stanicama RAW264.7 i DC 2.4 što ukazuje na to da je izražaj virusom izmijenjenih MHC I na njihovoj površini vjerojatno veći nego na stanicama MEF i B12. Kakav utjecaj na imunosni sustav ima ovaj fenomen treba još ispitati.

Ključne riječi: tripsin, EDTA, razina molekula, mišji citomegalovirus

Summary

One of the first steps in the analysis of adherent cells on a flow cytometer is their detachment from the substrate and obtaining a cell suspension, however this procedure can affect the composition and integrity of the molecules expressed on the cell surface. To avoid this, we decided to examine the effect of trypsin and EDTA solutions on the expression of certain proteins, given the incubation time. Proteins whose levels were monitored are the molecules MHC I, m04 and CD80, the expression of which is influenced by murine cytomegalovirus (MCMV) to avoid recognition by immune system cells, and their regulation and expression is the subject of intensive research at the Center for Proteomics. Levels of these molecules were studied on MEF, B12, DC 2.4, and Raw264.7 cells with and without MCMV infection. The results obtained by flow cytometer analysis showed that the expression of MHC I and m04 was significantly reduced only on infected RAW264.7 cells after treatment with EDTA solution for 10 minutes, and CD80 levels on uninfected and infected DC2.4 cells after treatment with trypsin solution for 10 minutes. The obtained results indicate that it is important to stop the action of trypsin and EDTA solutions on time in order to obtain accurate and reliable results in future experiments. In addition, the level of these molecules on the cells was compared and a higher level of MHC I and m04 was shown on RAW264.7 and DC 2.4 cells, which indicates that the expression of virus altered MHC I on their surface is probably higher than on MEF and B12 cells. What effect this phenomenon has on the immune system remains to be investigated.

Key words: trypsin, EDTA, levels of molecules, murine cytomegalovirus

Sadržaj

1. UVOD 1
   1.1. Kulture stanica 1
      1.1.1. Primarne kulture 1
      1.1.2. Stanične linije 2
      1.1.3. Adherentne stanice i u suspenziji 3
   1.2. Stanična adhezija 3
   1.3. Metode odvajanja adherentnih stanica 7
      1.3.1. Djelovanje tripsina 8
      1.3.2. Djelovanje EDTA 9
   1.4. Protočna citometrija 11
   1.5. Citomegalovirusi 12
      1.5.1. Mehanizmi kojima citomegalovirusi izbjegavaju imunosni odgovor 13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 16
3. MATERIJALI I METODE 17
   3.1. Materijali 17
      3.1.1. Stanične kulture 17
      3.1.2. Virusi 17
      3.1.3. Mediji, otopine i puferi 18
      3.1.4. Monoklonska protutijela 19
      3.1.5. Ostale kemikalije 21
   3.2. Metode 21
      3.2.1. Odmrzavanje staničnih kultura 21
      3.2.2. Održavanje staničnih kultura 22
      3.2.3. Određivanje broja stanica 22
      3.2.4. Infekcija stanica 23
      3.2.5. Nasađivanje stanica nakon infekcije 23
      3.2.6. Odvajanje stanica pomoću otopina tripsin i EDTA u različitim vremenskim intervalima 25
      3.2.7. Fenotipska analiza stanica protočnom citometrijom 25
      3.2.8. Testiranje protutijela 29

3.2.9. Statistička obrada podataka.....30
4. REZULTATI.....31
4.1. Testiranje optimalnog razrjeđenja protutijela za detekciju molekula H-2K^b i CD80 na stanicama DC 2.4.....31
4.2. Osjetljivost površinske frakcije molekula MHC I i m04 na tretman stanica MEF i B12 tripsinom i EDTA.....33
4.3. Osjetljivost površinske frakcije molekula MHC I i m04 na tretman stanica RAW264.7 i DC 2.4 tripsinom i EDTA.....37
4.4. Usporedba ekspresije molekula MHC I, m04, CD80 na stanicama MEF, B12, RAW264.7 i DC 2.4.....41
5. RASPRAVA.....46
6. ZAKLJUČAK.....50
7. LITERATURA.....51
8. ŽIVOTOPIS.....56

1. UVOD

1.1. Kulture stanica

Tehnika kulture stanica prvi put je razvijena u ranom 20. stoljeću kao metoda proučavanja ponašanja životinjskih stanica *in vitro* (1). Princip kulture stanica uspostavljen je kada je embriolog Roux pokazao da je moguće održavati žive stanice pilećih embrija izvan tijela nekoliko dana u toplom fiziološkom puferu (2). Stoga se kultura stanica definira kao proces kojim se u odgovarajućem umjetno kontroliranom okruženju (*in vitro*) uzgajaju stanice dobivene uklanjanjem iz njihovog prirodnog okruženja (*in vivo*) (1). Danas su kulture stanica našle primjenu u modeliranju bolesti, tehnologiji *in vitro* fertilizacije (IVF), istraživanju matičnih stanica i tumora, proizvodnji monoklonskih protutijela, regeneracijskoj medicini i terapijskoj proizvodnji proteina (2). Kulture stanica dijele se na primarne kulture i stanične linije (3).

1.1.1. Primarne kulture

Prva kultura koja uspješno raste nakon izolacije stanica iz tkiva ili organa je primarna kultura. Izolirane ili primarne stanice mogu dati kulture koje imaju karakteristike vrlo slične izvornom tkivu (4). S obzirom na izvor tkiva, stanice mogu biti fiziološki normalne ili tumorske (5). Primarne kulture najčešće su heterogene jer sadrže populacije različitih vrsta stanica prisutnih u izvornom tkivu (6). Osim toga, postoje značajne varijabilnosti u karakteristikama primarnih stanica zbog toga što su izolirane iz različitih organizama, a ključni parametri su vrsta organizma, starost, spol, vrsta tkiva i status bolesti (4). Kada izolirane stanice postignu visoku koncentraciju u kulturi te se radi toga prestanu dijeliti potrebno ih je pasažirati (1). Pasažiranje, presađivanje ili subkultivacija je prijenos stanica iz jedne posude ili ploče za kulturu u drugu kako bi se omogućio daljnji rast stanica. Nakon prvog presađivanja, primarna kultura postaje poznata kao stanična linija (3). Međutim, dok jedni definiraju primarne kulture kao

kulture koje nisu *in vitro* pasažirane nakon izolacije iz tkiva, drugi navode da su to kulture koje nisu genetski manipulirane (5).

1.1.2. Stanične linije

S obzirom na životni vijek u kulturi, stanične linije mogu biti konačne ili kontinuirane. Stanične linije koje se mogu dijeliti ograničen broj puta (40-60) prije nego što izgube sposobnost dijeljenja nazivaju se konačnima. Gubitak sposobnosti dijeljenja stanica je genetski determiniran događaj poznat kao senescencija ili starenje (3). Konačne stanične linije dobivene su pasažiranjem normalnih primarnih stanica. Iako se normalne stanice podvrgavaju višestrukim staničnim podjelama *in vitro*, zadržavaju svoj genetski integritet, normalnu morfologiju i većinu nativnih staničnih funkcija (5). Međutim, višestruko pasažiranje normalnih stanica može se postići samo za određene vrste stanica kao što su fibroblasti, keratinociti, astrociti i endotelne stanice (4). S obzirom na to da konačne stanične linije imaju ograničen broj dioba, važno je uspostaviti banke stanica kako ne bi došlo do gubitka navedenih staničnih linija (5).

Stanične linije koje imaju neograničen broj staničnih dioba (preko 100) nazivaju se kontinuiranim (3). Kontinuirane odnosno imortalizirane ili besmrtne stanične linije dobivaju se iz tumorskih primarnih stanica ili imortalizacijom konačnih staničnih linija (4). Besmrtnost je karakteristika tumora koja se može dogoditi bilo spontanim mutacijama ili djelovanjem mutagena (7). Iako su prve imortalizirane stanične linije nastajale spontanim mutacijama, danas se za njihovu izradu koristi nekoliko strategija koje uključuju ozračivanje, kemijske kancerogene, viruse te rekombinantne DNA vektore koji izražavaju onkogene (4). Većina kontinuiranih staničnih linija je već uspostavljena te se nalaze u bankama stanica kako bi bile dostupne širom svijeta. Za razliku od konačnih staničnih linija, kontinuirane stanične linije pružaju neograničenu opskrbu materijala jer brzo i kontinuirano rastu u kulturi, te je zbog toga njihov uzgoj i jednostavniji (8).

Zbog navedenih karakteristika, stanične linije se stoga češće upotrebljavaju u istraživanjima u odnosu na primarne stanice (8). Iako su primarne kulture heterogene, nakon nekoliko pasaža stanica, zbog prisiljenih umjetnih kontroliranih uvjeta, uspostavlja se homogena stanična linija najsnažnije vrste stanica što ne mora uvijek predstavljati stanice od interesa (9). Za razliku od toga, unaprijed definirane stanične linije predstavljaju homogenu populaciju stanica, što je korisno jer daju konzistentne uzorke i ponovljive rezultate. Stanične linije su također idealne za genetsku manipulaciju i ubacivanje različitih vektora od interesa s ciljem stvaranja transfektanti. Međutim, svaka manipulacija staničnih linija također može promijeniti njihov fenotip, nativne funkcije i njihovu reakciju na podražaje. Nadalje, serijsko pasažiranje staničnih linija može uzrokovati genotipske i fenotipske varijacije kroz duži vremenski period, a česte su i aneuploidije i poliploidije. Stoga je važno uzeti u obzir da iako se mogu lako uzgajati i genetski manipulirati, stanične linije možda ne predstavljaju adekvatno primarne stanice i mogu dati različite rezultate (8).

1.1.3. Adherentne stanice i u suspenziji

S obzirom na način rasta stanica u kulturi, stanice mogu biti adherentne i u suspenziji. Adherentne stanice su stanice koje za svoj rast zahtijevaju vezanje za površinu ploče ili posude za kulturu (10). S druge strane, stanice koje za svoj rast ne zahtijevaju vezanje na podlogu u kulturi te rastu slobodne u mediju su stanice u suspenziji. Glavne prednosti stanica u suspenziji s obzirom na adherentne stanice su oponašanje prirodne strukture *in vivo* okruženja, subkultura je brža i manje traumatična za stanice jer ne zahtijevaju odvajanje od podloge i međusobno, te se stanice mogu lako izdvojiti iz medija i koristiti za daljnje pokuse (6).

1.2. Stanična adhezija

Adhezija ima ključnu ulogu u staničnoj komunikaciji i regulaciji stanica te je od temeljne važnosti u razvoju i održavanju tkiva. Stanična adhezija je sposobnost stanica da se vežu jedna za drugu ili za izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*, ECM) (12). Vezanje je posredovano preko

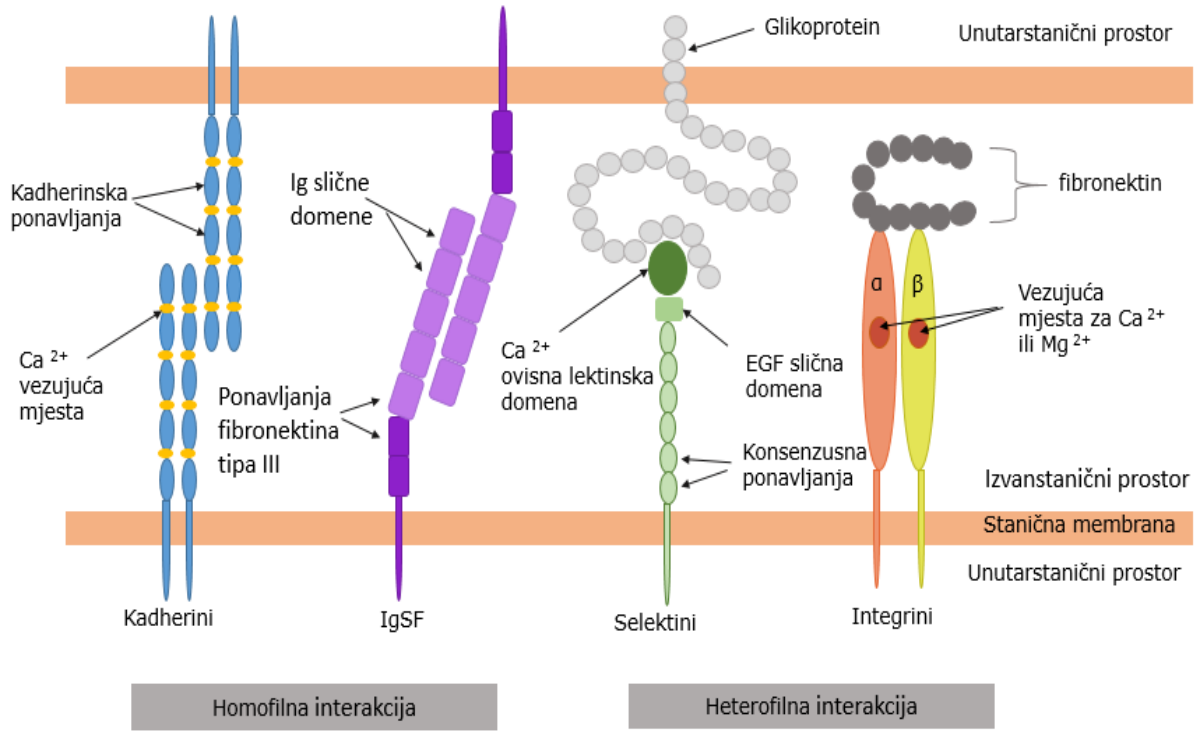
staničnih površinskih proteina koji se nazivaju molekulama stanične adhezije (engl. *cell adhesion molecules*, CAMs) (13). Sve CAMs su integralni membranski proteini koji se sastoje od izvanstanične, transmembranske i citoplazmatske domene. Izvanstanične domene odgovorne su za vezanje s ligandima koji se nalaze na drugim stanicama ili unutar ECM, dok su citoplazmatske domene bitne za interakciju s proteinima citoskeleta kako bi osigurale unutarstanično sidro. Vezanje se može dogoditi između istih adhezijskih molekula (homofilno vezanje), između različitih adhezijskih molekula (heterofilno vezanje) ili putem posredničkog "linkera" koji veže adhezijske molekule. Postoje četiri glavne obitelji CAMs-a: kadherini, selektini, superobitelji imunoglobulina (engl. *immunoglobulin superfamily*, IgSF) te integrini (14).

Međustanična adhezija najčešće je posredovana preko obitelji kadherina čije vezanje je uglavnom homofilno (15). Kadherini su homodimeri s izvanstaničnim dijelom svakog polipeptida smotanog u pet kadherinskih ponavljanja. Između svakog para kadheninskih ponavljanja postoje mjesta za vezanje kalcija (Slika 1) (13). Vezanjem Ca^{2+} iona stabilizira se konformacija izvanstanične domene što omogućava stanici da se poveže sa susjednom stanicom. Dakle, vezanje preko kadherina je ovisno o Ca^{2+} ionima (14). Nadalje, kako bi nastala čvrsta međustanična adhezija, citoplazmatske domene kadherina moraju komunicirati s citoskeletom stanica. Stvaranjem adherentnih spojeva ili dezmosoma, odnosno povezivanjem aktinskih ili intermedijarnih vlakna citoskeleta stanica, kadherini postižu snažnu adheziju (13). Kadherini, kao i integrini i IgSF, se nalaze na mnogim vrstama stanica različitih tkiva gdje doprinose adhezivnim interakcijama. Za razliku od stabilne adhezije posredovane kadherinima, prijelazna međustanična adhezija ovisna o kalcijevim ionima je posredovana preko selektina. Selektini su proteini koji se uglavnom nalaze na leukocitima koji cirkuliraju krvotokom, te prolazno vežu ugljikohidrate na endotelnim stanicama krvnih žila. Tranzijentnim vezanjem selektini omogućavaju leukocitima da migriraju iz krvotoka u ciljno tkivo što

je važno tijekom upale (14). Vezanje je posredovano preko izvanstanične visoko očuvane Ca^{2+}-ovisne lektinske regije. Osim lektinske regije, izvanstanična domena ima i regiju sličnu epidermalnom faktoru rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF) te niz kratkih konsenzusnih ponavljanja što je prikazano na slici 1. IgSF su, za razliku od kadherina i selektina, odgovorni za Ca^{2+} neovisnu međustaničnu adheziju. IgSF se uglavnom vežu homofilno na ligande pomoću niza izvanstaničnih Ig-sličnih regija, koje su strukturno homologne antitijelima (13). Osim Ig-sličnih regija, izvanstanična domena može sadržavati i jednu ili više ponavljajućih regija fibronektina tipa III (Slika 1) (14). Iako se kadherini i članovi obitelji Ig često izražavaju na istim stanicama, adhezije posredovane kadherinima su mnogo jače (13). Za razliku od ostalih CAMs-a, integrini osim što posreduju u tranzijentnoj međustaničnoj adheziji su ključni i za stvaranje stabilne interakcije s proteinima ECM kao što su laminin, kolagen, fibronektin i vitronektin. Integrini su heterodimerni glikoproteini koji se sastoje od nekovalentno vezanih α i β podjedinica (Slika 1) (14). Vezanje integrina na njihove ligande ovisi o prisutnosti dvovalentnih kationa (Ca^{2+} ili Mg^{2+}, ovisno o integrinu), što znači da α i β podjedinice u svojem izvanstaničnom dijelu imaju regije ovisne o dvovalentnim ionima. Integrini su 10 ili 100 puta više izraženi na površini stanica za razliku od ostalih CAMs-a. Poput kadherina i integrini moraju komunicirati s citoskeletom da bi se stanice snažno vezale za matriks. Integrini mogu sa svojim citoplazmatskim domenama povezati ECM s aktinskim vlaknima (fokalna adhezija) ili intermedijarnim vlaknima (hemidezmosomi) te tako praviti stabilnu adheziju (13).

Stanice se u svom prirodnom okruženju pričvršćuju na ECM putem integrinskih receptora koji induciraju niz unutarstaničnih signalnih kaskada koje reguliraju preživljenje, proliferaciju i diferencijaciju stanica (16). S obzirom na to da je ECM vitalan za staničnu adheziju, predstavlja adherentni supstrat za stanice te je potrebno stanicama omogućiti *in vitro* adherentni supstrat na koji će se integrini vezati (17). Najčešće korišteno

posuđe za staničnu kulturu je izrađeno od polistirena zbog vrlo dobrih optičkih svojstava, lakoće oblikovanja, prihvatljive cijene i mogućnosti površinske modifikacije (16). Budući da je polistiren hidrofoban, oksidira se kako bi materijal bio hidrofilan te negativno nabijen. To omogućava uglavnom proteinima ECM iz seruma koji se nalaze u mediju za uzgoj, da se vežu na dnu posude pružajući tako bolju površinu za staničnu adheziju (18). Osim toga, poznato je i da brojne vrste stanica mogu same sintetizirati molekule ECM in vitro. Međutim, različite stanice se različito pričvršćuju na različitim površinama. Za neke tipove stanica oksidirani polistiren je dovoljan za dobru adheziju; za ostale su potrebne posebne izmjene i premazi površine, posebice ako se stanice uzgajaju u mediju bez seruma pa često zahtijevaju posebne površinske premaze za pričvršćivanje (16). Površinski premazi mogu se napraviti pomoću bioloških materijala kao što su proteini izvanstaničnog matriksa, poput kolagena, laminina i fibronektina, te mukopolisaharidi, poput heparan sulfata, hialuronidata i hondroitin sulfata. Osim bioloških materijala, mogu se koristiti i sintetski polimeri, poput poli-D-lizina, kako bi se stvorio pozitivan naboj polistirena (18).



Slika 1. Struktura i interakcije CAMs-a. Na lijevoj strani prikazane su homofilne interakcije koje su posredovane većinom preko kadherina i IgSF, a na desnoj heterofilne interakcije koje su posredovane uglavnom preko selektina i integrina. Modificirano prema: https://www.sabbiotech.com/a-119-Adhesion-Molecules.html

1.3. Metode odvajanja adherentnih stanica

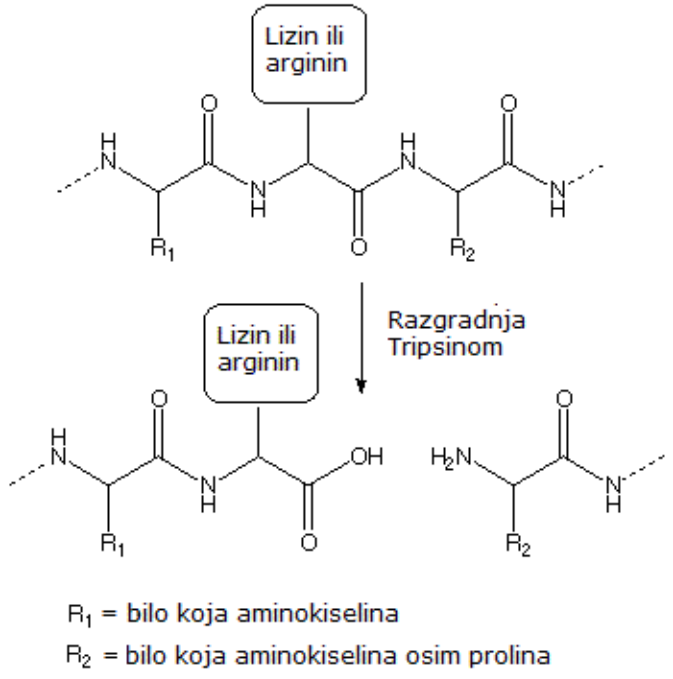
In vitro uzgojene adherentne stanice moraju se odvojiti i prikupiti kako bi se pasažirale, te u svrhu funkcionalnih i fenotipskih analiza. Odvajanje adherentnih stanica može se postići enzimatskim ili neenzimatskim metodama. Enzimatske metode uključuju upotrebu otopina enzima poput tripsina, akutaze, kolagenaze te trypLE. Ove otopine sadrže proteolitičke enzime koji se koriste za razgradnju proteina odgovornih za vezanje (19). Međutim, proteolitički enzimi mogu cijepati proteine stanične površine koji ne sudjeluju u vezanju (20). Kako bi se prevladao ovaj problem razvijene su alternativne metode odvajanja bez upotrebe enzima, poput raznih komercijalno dostupnih pufera za odvajanje (engl. *cell dissociation buffer*, CDB), otopine etilendiamintetraoctene kiseline (engl.

ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), te struganja (21). Metoda odvajanja adherentnih stanica bez enzima pogodna je za nježno odvajanje stanica za studije u kojima su potrebni netaknuti proteini stanične površine (20).

Najčešće korištene otopine za odvajanje adherentnih stanica u našem laboratoriju su tripsin i EDTA.

1.3.1. Djelovanje tripsina

Tripsin je enzim koji je prisutan u probavnom sustavu mnogih kralježnjaka gdje hidrolizira proteine. Nastaje u tankom crijevu aktivacijom proenzima tripsinogena kojeg izlučuju stanice gušterače (22). Ovaj enzim pripada grupi serinskih proteaza, obitelji S1 klana PA, koja ima sposobnost katalizirati cijepanje peptidnih veza na karboksilnom kraju arginina i lizina (23). Međutim, tripsin ne cijepa ove aminokiseline ako se odmah nakon jedne od njih nalazi prolin (Slika 2)(22)



Slika 2. Mehanizam djelovanja enzima tripsina. Modificirano prema: http://worldofbiochemistry.blogspot.com/2014/09/trypsin.html.

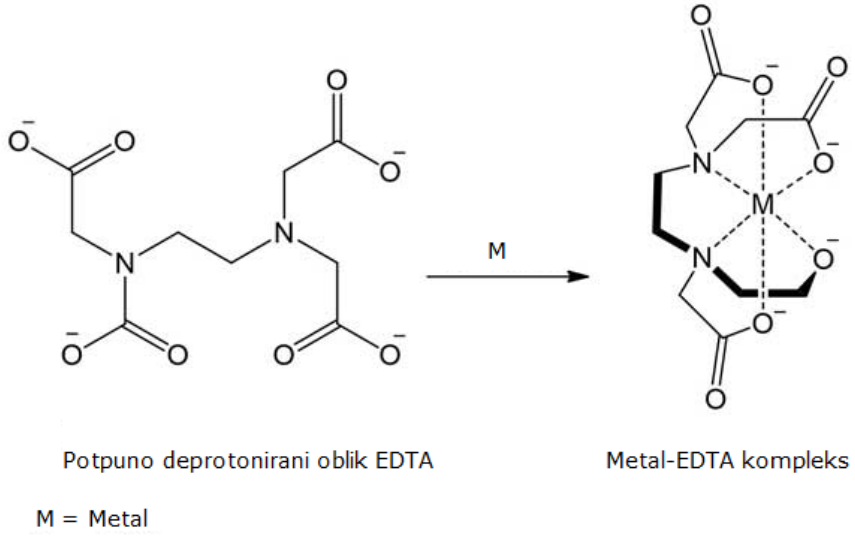
U staničnoj kulturi otopina tripsin djeluje tako da razgrađuje CAMs, što omogućava da se adhezivne stanice odvoje jedna od druge i od podloge plastičnih posuda ili ploča u kojima se uzgajaju. Proces odvajanja stanica tripsinom se naziva tripsinizacija (22). Prednost upotrebe tripsina je brzo odvajanje stanica od površine (unutar 5 minuta) te ekonomičnost (24). Također, osim CAMs-a, utvrđeno je da tripsin može razgraditi i proteine ECM-a (25). Međutim, dugotrajna inkubacija s visokom koncentracijom tripsina može neselektivno ukloniti površinske proteine stanica koji nisu uključeni u adheziju (26). Proteomskim rezultatima pokazano je da tripsinizacija smanjuje izražaj proteina koji su povezani s rastom i metabolizmom stanica te da povećava izražaj proteina povezanih s apoptozom. Gubitak membranskih proteina može rezultirati bilo staničnim disfunkcijama bilo nemogućnošću analize površinskih molekula. Ovaj efekt treba uzeti u obzir kada je tripsin uključen u eksperimentalni dizajn (25). Zbog toga je bitno na vrijeme zaustaviti djelovanje tripsina koje se postiže upotrebom staničnog medija ili neutralizirajuće otopine koja sadrži serum ili kalcijeve ione (27). Osim toga, tripsinizirane stanice mogu obnoviti većinu svojih površinskih proteina u vremenskom razdoblju od 8–24 sata, no za neke proteine je to uklanjanje ireverzibilno (26). Otopina tripsin obično sadrži i kelirajući reagens EDTA koji povećava aktivnost tripsina smanjujući koncentraciju izvanstaničnih metalnih iona odgovornih za inhibiciju enzima (25). EDTA uzrokuje i da izvanstanični dio CAMs-a ovisnih o Ca^{2+} olabavi, dopuštajući tripsinu da učinkovitije djeluje na te molekule (13). Dakle, tripsin i EDTA mogu djelovati sinergistički te se otopina koja sadrži oba reagensa naziva otopina tripsin-EDTA (25).

1.3.2. Djelovanje EDTA

EDTA je molekula formule $(HO_2CCH_2)_2\ NCH_2CH_2N\ (CH_2CO_2H)_2$ koja se uglavnom sintetizira iz 1,2-diaminoetana (etilen-diamina), formaldehida, vode i natrijevog cijanida (28). Glavno svojstvo EDTA, odnosno poliprotične kiseline koja sadrži četiri karboksilne i dvije amino skupine s nesparenim parom elektrona, je sposobnost keliranja ili stvaranja kompleksa s metalnim

ionom u omjeru kompleksa metal-EDTA 1: 1 (Slika 3). Nakon što se vežu s EDTA, ioni metala ostaju u otopini, ali pokazuju smanjenu reaktivnost (29).

U staničnoj kulturi EDTA se može koristi bez tripsina za odvajanje adherentnih stanica od podloge i međusobno, stvarajući kelirajući kompleks s izvanstaničnim kalcijevim (Ca^{2+}) i magnezijevim (Mg^{2+}) ionima (13). Ovi ioni potrebni su CAMs-evima ovisnim o dvovalentnim ionima kako bi stabilizirali njihovu strukturu i omogućili vezanje (4). Također, EDTA uzrokuje zaokruživanje i odvajanje stanica što je vrlo slično učincima tretmana tripsinom. U usporedni s otopinom tripsin-EDTA, sama EDTA uglavnom ne uzrokuje uklanjanje površinskih proteina stanica. Međutim, nedostatak otopine EDTA je to što je sam proces odvajanja adherentnih stanica u jednostanične suspenzije sporiji od otopine tripsin-EDTA, što može rezultirati smanjenom vijabilnošću stanica te slabijim prinosom odlijepljenih stanica (30).



Slika 3. Mehanizam djelovanja molekule EDTA. Modificirano prema: https://pharmafactz.com/medicinal-chemistry-chelation-therapy/

1.4. Protočna citometrija

Protočna citometrija (engl. *flow cytometry*, FC) je visokoprotočna metoda koja omogućava brzu te istovremenu analizu više parametara svake pojedinačne stanice u otopini (31). Iako se najčešće koristi za analizu stanica, FC može analizirati i čestice, poput virusa, jezgara, DNA fragmenata te kromosoma (32). Glavni sustavi protočnog citometra su tekućinski, optički i elektronički. Tekućinski sustav omogućava da stanice pojedinačno protječu kroz mlaz tekućine u susret laserskoj zraci (31). Optički sustav sastoji se od lasera koji osvjetljuje stanice u uzorku te optičkih filtera koji usmjeravaju dobivene signale do odgovarajućih detektora (33). Elektronički sustav detektira signal te ga pretvara u digitalne podatke koji se potom obrađuju pomoću računala. Nadalje, postoje dva različita tipa protočne citometrije: nesortirajući i sortirajući. Nesortirajući tip bilježi kako stanice raspršuju upadnu lasersku svjetlost i emitiraju fluorescenciju, dok sortirajući tip ima dodatnu mogućnost sortiranja stanica (34). Raspršenje vidljive svjetlosti mjeri se u dva različita smjera, u smjeru upadne laserske zrake (engl. *forward scatter,* FSC), koji daje informacije o relativnoj veličini stanice, i pod kutem od 90° u odnosu u na upadnu zraku (engl. *side scatter*, SSC), što ukazuje na unutarnju složenost ili granuliranost stanice (31). Raspršivanje svjetlosti neovisno je o fluorescenciji. Fluorescentni signal dobiva se kada laser osvijetli molekule koje nazivamo fluorokromi, a koji nakon pobuđivanja emitiraju svjetlost valne duljine dulje od one s kojom su pobuđeni (ekscitirani). Fluorokromi se konjugiraju s protutijelima kako bi se mogli koristiti za mjerenja količine proteina ili antigena (na staničnoj površini, u citoplazmi ili jezgri) na koje se protutijelo veže (32). Više različitih protutijela obilježenih različitim fluorokromima može se koristiti kako bi se stanice identificirale i razdvojile na više subpopulacija, u kombinaciji s podacima FSC i SSC, u mješovitoj populaciji stanica. Najčešće korišteni laser koji se koristi u protočnoj citometriji je argonski laser jer 488 nm svjetlo koje emitira, pobuđuje cijeli niz fluorokroma. Koji fluorokromi se mogu zajedno kombinirati ovisi o njihovoj ekscitaciji i emisiji odnosno mogu li se dovoljno razlikovati na

detektorima. Kombinacija fluorescentnog izocijanata (engl. *fluorescein-isothiocyanate*, FITC), koji fluorescira zelenom bojom, te fikoeritrina (engl. *phycoerythrin*, PE), koji fluorescira crvenom bojom, zadovoljava ove kriterije (33). Danas protočni citometri imaju najčešće dva ili tri lasera različitih valnih duljina kako bi se mogli koristiti fluorokromi koji se pobuđuju na različitim valnim duljinama lasera te se tako omogućava istovremena analiza još većeg broja karakteristika stanica. Prednost protočnog citometra je to što omogućava da se stanice pojedinačno analiziraju velikom brzinom (500 do više od 25 000 stanica u sekundi), a dobivene karakteristike velikog broja stanica mogu se nabrojati, povezati i zbrojiti. Nedostatak ove tehnike je što se adherentne stanice ili tkiva trebaju prvo odvojiti kako bi se dobila suspenzija stanica, pri čemu se neke karakteristike pojedinačnih stanica mogu promijeniti te se mogu izgubiti sve informacije o tkivnoj arhitekturi i raspodjeli markera od interesa na stanicama (32).

1.5. Citomegalovirusi

Citomegalovirusi (CMV), pripadnici podobitelji *Betaherpesviridae*, široko su rasprostranjeni virusi obitelji *Herpesviridae*. Morfološki, sastoje se od linearne dvolančane DNA molekule koja se nalazi u ikozaedralnoj kapsidi, koja je okružena proteinskim matriksom nazvanim tegumentom, a zatim lipidnom ovojnicom (35). Poznato je da se CMV može replicirati u različitim tipovima stanica poput fibroblasta, epitelnih, endotelnih te mononuklearnih stanica (36). Svi CMV-i su visoko specifični za svaku vrstu koju inficiraju, ali dijele zajedničke karakteristike infekcije kao što je citomegalični (povećani) oblik inficiranih stanica te uspostava doživotne latentne infekcije u domaćinu (35). Postotak odrasle populacije inficirane humanim CMV-om (HCMV) je velik te u razvijenim zemljama iznosi 40-70%, dok u slabije razvijenim zemljama ta brojka doseže čak i do 100% (36). Primarna infekcija HCMV-om najčešće je asimptomatska u zdravih domaćina jer se kontrolira učinkovito kroz brojne mehanizme urođenog i stečenog imunosnog odgovora. Međutim, kod imunokompromitiranih osoba

(primatelja transplantacije, bolesnika s uznapredovalim AIDS-om) te osoba koje nemaju još razvijen imunosni sustav (novorođenčadi), infekcija HCMV-om može rezultirati teškim, pa čak i letalnim ishodima. Osim toga, HCMV je najčešći virusni uzročnik kongenitalnih infekcija koje mogu uzrokovati niz neurorazvojnih poremećaja koje mogu trajati cijeli život (37). Tretiranje bolesnika s HCMV-om danas najčešće uključuje antiviralnu terapiju ganciklovirom i njegovim derivatima. Međutim, postoji niz nedostataka uporabe antiviralnih lijekova poput toksičnosti, slabije oralne adsorpcije te razvoja rezistencije virusa (38). Zbog nepotpune učinkovitosti terapije te nepostojanja efikasnog cjepiva, danas je razvoj cjepiva protiv HCMV jedan od glavnih fokusa istraživanja. S obzirom na to da je CMV specifičan za svaku vrstu, za istraživanje HCMV-a koriste se životinjski CMV-i. Najčešće korišteni model je mišji citomegalovirus (MCMV) zbog svoje biološke i genomske sličnosti s HCMV-om (37).

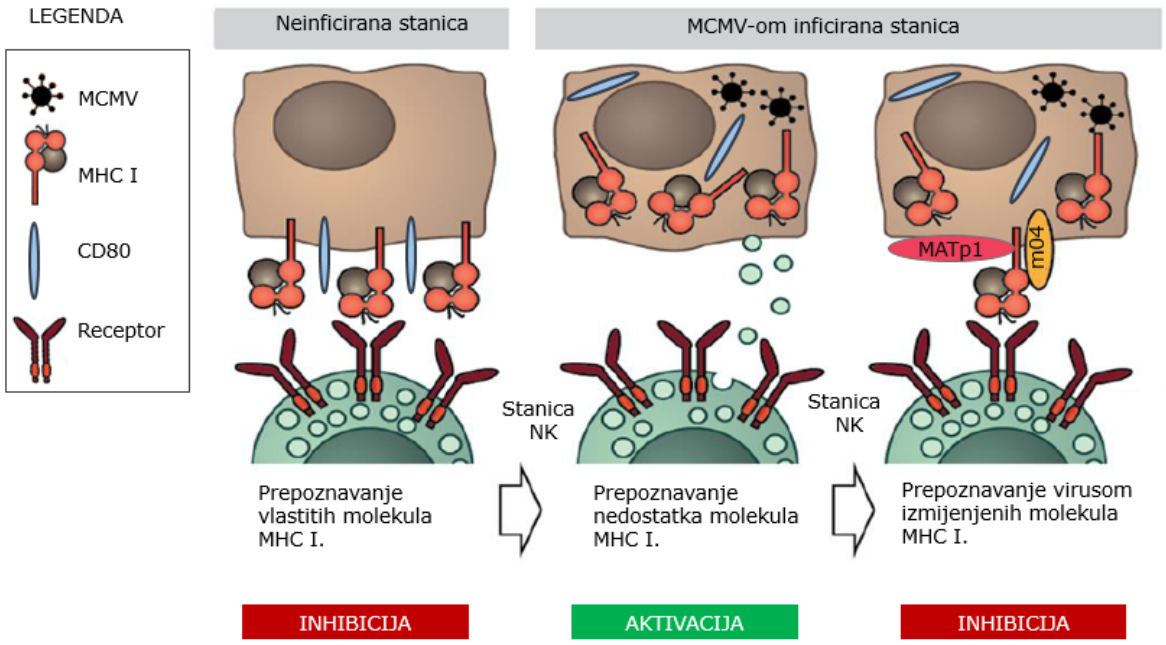
1.5.1. Mehanizmi kojima citomegalovirusi izbjegavaju imunosni odgovor

Urođeni imunosni odgovor prva je linija obrane protiv CMV-a te omogućava domaćinu brzu reakciju na ulazak patogena. Glavnu ulogu u toj obrani imaju prirodno ubilačke stanice (engl. *natural killer cells*, NK) zbog svoje citotoksične aktivnosti i proizvodnje citokina. Aktivnost NK stanica određena je ravnotežom signala širokog repertoara aktivacijskih i inhibicijskih receptora. Navedeni receptori konstitutivno su prisutni na površini NK stanica te mogu prepoznati izmijenjenu ekspresiju proteina na ciljnim stanicama (37). Uz NK stanice, kao kasniji odgovor na virusnu infekciju, dolaze stanice stečene imunosti poput $CD8^+$ stanica T. Efektorske $CD8^+$ stanice T, koje prve nastaju iz stečene imunosti pri susretu s CMV-om, imaju direktnu citotoksičnu aktivnost, ali i kratak životni vijek. Zbog toga su važne memorijske $CD8^+$ stanice T, nastale iz potomaka CD8+ stanica T koje su potaknute antigenom, jer omogućavaju perzistentnu i snažniju imunosnu reakciju pri ponovnome doticaju organizma s CMV-om (39).

S obzirom na dugu ko-evoluciju ovog virusa s domaćinom, ne čudi činjenica da je razvio brojne mehanizme izbjegavanja imunosnog odgovora poput smanjivanja razine liganada na stanicama koje inficira, koji bi inače mogli uzrokovati aktivaciju imunosnog odgovora. Jedan od mehanizama kojim CMV izbjegava imunosni odgovor je interferencija s površinskom ekspresijom imunosno važnih molekula poput molekula MHC I odnosno molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti klase I (engl. *major histocompatibility complex class I*) te molekula CD80 (engl. *cluster of differentiation 80*) (40). Molekula MHC I, koja je izražena na površini svih nukleiranih stanica, ima ulogu prezentiranja peptida svih proteina koji se sintetiziraju u stanici $CD8^+$ limfocitima T. Kako bi izbjegao specifičan odgovor $CD8^+$ stanica T, CMV kodira čak tri proteina kojima regulira izražaj molekula MHC I na površini inficiranih stanica te sprječava njihovu aktivaciju (41). Osim toga, kako bi se $CD8^+$ stanice T u potpunosti aktivirale, uz kontakt sa stranim antigenom preko MHC I molekule, potrebne su i ko-stimulacijske molekule, između ostalog i molekula CD80. Zbog toga, CMV uklanja i ko-stimulatornu molekulu CD80 s površine. CD80 se mogu naći na površini mnogih imunosnih stanica koje uključuju antigen prezentirajuće stanice (APC) poput dendritičkih stanica, B stanice te monocite/ makrofage (42).

Osim kod $CD8^+$ stanica T, molekula MHC I bitna je i kod stanica NK gdje djeluje kao inhibicijski ligand (41). U odsutnosti dovoljne količine molekula MHC I, takvu stanicu mogu prepoznati stanice NK (Slika 4). Naime, kod smanjene ekspresije molekula MHC I dolazi do smanjenog inhibicijskog signaliziranja u stanici NK te se ona uslijed ostalih aktivacijskih signala može aktivirati i ubiti ciljnu stanica. Takvo prepoznavanje ujedno se naziva i „nedostatak vlastitog" (engl. *missing-self*) (43). Kako bi to izbjegao, virus kodira proteine m04 i MATp1 koji se zatim vežu na mali broj molekula MHC I u endoplazmatskom retikulumu (ER) inficiranih stanica stvarajući tako MATp1/m04-promijene molekule MHC I koje odvode do površine stanica. Tamo se takve virusom-promijenjene molekule MHC I vežu za

inhibicijske receptore na stanici NK te ne dolazi do aktivacije stanica NK (Slika 4). Dakle, tijekom infekcije MCMV skida s površine molekule MHC I, ali ostavlja dovoljan broj kako bi osigurao dovoljno jaki inhibicijski signal kako bi izbjegao odgovor stanica NK (37, 43)



Slika 4. MCMV izbjegava imunosni odgovor stanica NK kodiranjem virusnih proteina m04 i MATp1. U fiziološkim uvjetima, zdrava stanica NK inhibirana je zbog toga što preko inhibicijskih receptora veže vlastite molekule MHC I na ciljnoj stanici. Međutim, kada se desi infekcija MCMV-om, virus uklanja molekule MHC I i CD80, kako bi izbjegao odgovor $CD8^+$ stanica T, te potom kodira proteine m04 i mATp1 kako bi spriječio aktivaciju stanica NK (preuzeto i modificirano prema (37).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Prijašnja istraživanja pokazala su da otopine tripsin i EDTA mogu djelovati na izražaj površinskih proteina stanica (30). Međutim, do sada nije ispitan njihov utjecaj na izražaj određenih površinskih molekula na stanicama s i bez infekcije MCMV-om te mijenja li se njihov učinak s vremenom inkubacije. Zbog toga smo u ovome radu odlučili ispitati:

1) djelovanje otopina tripsin i EDTA na izražaj molekula MHC I, CD80 i m04 s obzirom na određeni interval inkubacije (3, 5, 7 i 10 minuta) na fibroblastima (MEF i B12) i stanicama APC (RAW264.7 i DC 2.4.).

2) postoji li razlika u stabilnosti molekula MHC I i m04 između inficiranih i neinficiranih stanica s obzirom na interval inkubacije otopina.

3) postoji li razlika u izražaja tih molekula s obzirom na vrstu stanica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Stanične kulture

U ovom istraživanju korišteni su primarni mišji embrionalni fibroblasti (engl. *mouse embryonic fibroblasts*, MEF). Ove stanice porijeklom su iz mišjeg soja BALB/c koji je uzgojen u Centru za uzgoj i inženjering laboratorijskih miševa (LAMRI) Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Rijeci. Osim primarnih stanica, korištene su i tri stanične linije: imortalizirani fibroblasti – B12, imortalizirani makrofagi - Raw264.7 te imortalizirane dendritičke stanice - DC 2.4. B12 dobiven je transformacijom primarnih fibroblasta Simian virusom 40 (engl. *simian virus 40*, SV-40) (44), Raw264.7 transformacijom primarnih makrofaga Abelson virusom mišje leukemije (engl. *abelson murine leukemia virus*, A-MuLV) (45), a DC 2.4 transformacijom primarnih dendritičkih stanica retrovirusnim vektorima koji eksprimiraju mišji faktor stimulacije kolonije granulocita i makrofaga (engl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) te myc i raf onkogene (46). Primarni fibroblasti i primarni makrofagi korišteni za transformaciju porijeklom su iz soja BALB/c, a primarne dendritičke stanice iz soja C57BL/6. Sve tri vrste staničnih linija održavane su u odgovarajućim uvjetima prema uputama American Type Culture Collection (ATCC). Gledajući haplotip molekula MHC I, primarni MEF, imortalizirane stanice B12 te Raw264.7 su haplotipa H-2D^{d} , dok su stanice DC2.4 H-2K^{b}.

3.1.2. Virusi

Sve stanične kulture inficirane su divljim tipom (engl. w*ild type,* WT) MCMV-a (engl. w*ild type murine cytomegalovirus*, WT MCMV) koji je proizveden koristeći BAC C3X (47).

3.1.3. Mediji, otopine i puferi

Mediji, otopine te puferi korišteni u ovome istraživanju navedeni su u tablici 1.

Tablica 1. Korišteni mediji, otopine i puferi

Mediji za stanične kulture	**Sastav**
Dulbeccov modificirani minimalni esencijalni medij (engl. *Dulbecco's modified Eagle medium*, DMEM)	Medij DMEM (Pan Biotech), 3-10% fetalni teleći serum (engl. *fetal calf serum*, FCS, Pan Biotech), 10 mM HEPES (pH 7.2), 2 mM L-glutamin, 105 U/L Penicilin, 0.1 g/L Streptomicin
RPMI-medij: Kompletni RPMI medij (engl. Roswell park memorial institute medium) + 15% GM-CSF (engl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)	RPMI-medij (Pan Biotech), 10% fetalni teleći serum (FCS, Pan Biotech), 10 mM HEPES (pH 7.2), 2 mM L-glutamin, 10^5 U/L Penicilin, 0.1 g/L Streptomicin, 15% GM-CSF
Medij za smrzavanje stanica	70% RPMI-medij, 20% fetalni teleći serum (FCS), 10% dimetilsulfoksid (DMSO)
Otopine i puferi za stanice i protočnu citometriju	
10x fosfatima puferirana fiziološka otopina (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS)	140 mM natrijev klorid (NaCl), 2.7 mM kalijev klorid (KCl), 6.5 mM natrijev hidrogenfosfat-2-hidrat (Na2HPO4 x 2H2O), 1.5 mM kalijev dihidrogenfosfat (KH2PO4), 0.7 mM kalcijev klorid (CaCl2), 0.7 mM

	magnezijev klorid-6-hidrat ($MgCl_2 \times 6H_2O$)
Pufer za protočnu citometriju (engl. *fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer*)	PBS 0.1%, 1% goveđeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA), 0.1% natrijev azid (NaN_3), 1 mM etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)
Intracelularni pufer za fiksaciju (engl. *intracellular (IC) fixation buffer*)	PBS 0.1%, paraformaldehid 2%

3.1.4. Monoklonska protutijela

U tablici 2 prikazana su sva komercijalna protutijela te protutijela proizvedena u Centru za proteomiku na Medicinskom fakultetu, Sveučilišta u Rijeci, korištena u ovome istraživanju.

Tablica 2. Korištena protutijela

Antigen kojeg protutijelo prepoznaje	Domaćin iz kojeg je protutijelo	Specifičnost	Klon, šifra	Proizvođač	Korišteno razrjeđenje
m04 neobilježeno	Miš	Miš	m04.16	Centar za proteomiku	1:100
m04 neobilježeno	Miš	Miš	m04.17	Centar za proteomiku	1:100
H-2D^d PE	Miš	Miš	34-5-8S	Thermo Fischer Scientific	1:100
H-2K^b APC	Miš	Miš	AF6-88.5	Thermo Fischer Scientific	1:100

CD80 PE	Armenijski hrčak	Miš, pas, svinja	16-10A1	Thermo Fischer Scientific	1:100
CD80 APC	Armenijski hrčak	Miš, pas, svinja	16-10A1	Thermo Fischer Scientific	1:100
VZV ORF1 (IgG2b), izotipska kontrola	Miš	Varicella –zoster virus (VZV)	VZ 1N.03	Centar za proteomiku	1:100
KIR2DL1 (IgG1), izotipska kontrola	Miš	Ljudi	KIR2DL1.03	Centar za proteomiku	1:100
IgG2a kappa izotipska kontrola PE	Miš		eBM2a	Thermo Fischer Scientific	1:50
IgG2a kappa izotipska kontrola APC	Miš		eBM2a	Thermo Fischer Scientific	1:100
IgG Armenijski hrčak izotipska kontrola PE	Armenijski hrčak		eBio299Arm	Thermo Fischer Scientific	1:100
IgG Armenijski hrčak izotipska kontrola APC	Armenijski hrčak		eBio299Arm	Thermo Fischer Scientific	1:100
IgG1 PerCP-eFluor 710 (sekundarno)	Štakor	Miš	M1-14D12	Thermo Fischer Scientific	1:150
IgG2b FITC (sekundarno)	Štakor	Miš	m2b-25G4	Thermo Fischer Scientific	1:100
CD16/CD32 (mišji Fc block)	Štakor	Miš	2.4G2	Centar za proteomiku	1:4

Fiksirajuća boja za detekciju živih stanica eFluor780 (engl. *fixable viability dye eFluor 780*)				Thermo Fischer Scientific	1:1000

3.1.5. Ostale kemikalije

Ostale kemikalije korištene u ovome radu prikazana su u tablici 3.

Tablica 3. Tablica ostalih kemikalija

Ostale kemikalije	Proizvođač
Tripansko modrilo	Biological Industries
Etilendiamintetraoctena kiselina (2mM) (engl. *ethylene diamine tetra acetic acid*, EDTA)	Carl Roth
Tripsin (trypsin 0.5%/ EDTA 0.2%)	Sigma Aldrich

3.2. Metode

3.2.1. Odmrzavanje staničnih kultura

Odmrzavanje stanica provodilo se brzim uranjanjem (<1 minute) u vodenu kupelju na 37°C nakon uzimanja stanica iz pohrane na – 80°C ili tekućeg dušika. Uslijedilo je prebacivanje odmrznutih stanica u 9 mL odgovarajućeg medija, kako bi se spriječilo štetno djelovanje DMSO, koji je komponenta medija za smrzavanje. Potom se stanična suspenzija centrifugirala 5 minuta na 500 *g*, supernatant se uklonio te su se stanice

resuspendirale u svježem mediju. Nakon odmrzavanja, stanice s medijem prebacile su se u Petrijeve zdjelice u kojima je prethodno dodan svježi medij. Stanice su zatim stavljene u inkubator na 37°C kako bi mogle rasti.

3.2.2. Održavanje staničnih kultura

Navedene stanične kulture uzgajane su u staničnom inkubatoru na temperaturi 37°C s 5% CO_2. Primarni MEF uzgajan je u DMEM-u s dodatkom 3% FCS-a, a B12 u DMEM-u s dodatkom 10% FCS-a. S druge strane, za uzgajanje stanica Raw264.7 i DC 2.4 korišten je 10% RPMI u koji se nije dodavao β-merkaptoetanol. Rast stanica praćen je svakih 1-2 dana praćen pod mikroskopom. Kada je gustoća uzgojenih stanica dostigla 70% ili više, stanice su presađene. Presađivanje adherentnih stanica se provodilo tako da se prvo uklonio stari medij, potom su se stanice isprale s PBS-om, te je dodana otopina tripsin, koja je prethodno bila zagrijana na 37°C. Nakon dodatka otopine tripsin, stanice su stavljene u inkubator na 37°C oko 5 minuta kako bi tripsin djelovao. Aktivnost tripsina zaustavljena je dodatkom hranjivog medija. Potom se pod mikroskopom provjerilo jesu li se stanice odvojile od podloge. Uslijedilo je nasađivanje stanica na nove ploče u koje je prethodno dodan svježi medij.

3.2.3. Određivanje broja stanica

Prije nasađivanja stanica za eksperiment, utvrđivao se broj živih stanica te određivao volumen potreban za njihovo nasađivanje. Broj stanica dobio se brojanjem stanica u hemocitometru (Neubauerovoj komorici) pomoću tripanskog modrila. U izračun su uzete samo žive stanice koje se, za razliku od mrtvih, nisu obojile tripanskim modrilom. Ukupan broj živih stanica (R) određen je prema formuli:

$$R = \frac{broj\ izbrojanih\ stanica}{broj\ kvadratića * volumen\ kvadratića} * faktor\ razrjeđenja * ukupan\ volumen\ uzorka$$

pri čemu je volumen kvadratića 0.1 µl, a faktor razrjeđenja ovisi o razrjeđenju uzorka u tripanskom modrilu.

3.2.4. Infekcija stanica

Sve stanične kulture inficirale su se divljim tipom virusa – WT MCMV u dozi od 1.5 PFU/stanici za primarni MEF te 3 PFU/stanici za imortalizirane stanice. Stanice su inficirane u suspenziji tako da je pripremljena suspenzija bila koncentracije $1x10^7$ st/mL u koju je dodan virus. Nakon brojanja živih stanica, volumen stanica namjestio se tako da je koncentracija odgovarala $1x10^7$ st/mL. Zatim se prethodno definirani broj stanica uzeo za grupu koja će ostati neinficirana i onu koja će se inficirati WT MCMV-om. U grupu koja će se inficirati je zatim dodan odgovarajući volumen virusa (V) izračunat prema formuli:

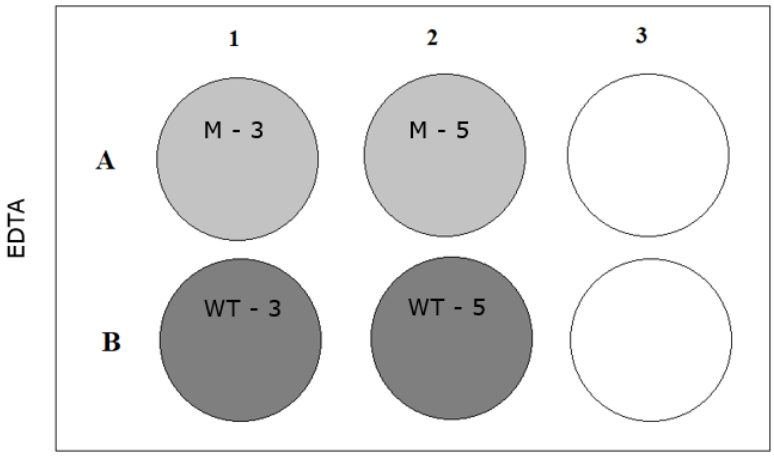
$$V = broj\ stanica * \frac{količina\ virusa\ po\ stanici\ (PFU)}{koncentracija\ virusa\ (\frac{PFU}{ml})}$$

gdje PFU ovisi o tipu stanične kulture. Nakon infekcije, inficirane i neinficirane stanice su inkubirane 30 minuta na 37°C uz miješanje svakih 5-10 minuta.

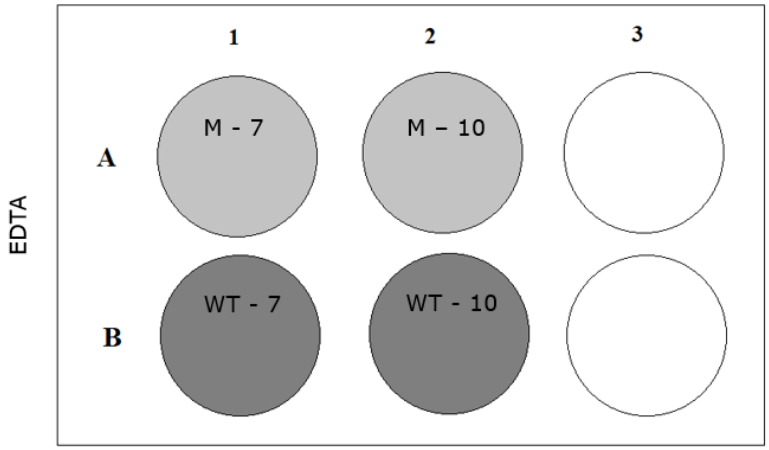
3.2.5. Nasađivanje stanica nakon infekcije

Nakon 30-minutne inkubacije, svaka grupa stanica nasađivala se na ploče sa 6 jažica u koje je prethodno dodan svježi medij. Nasađivanje je provođeno tako da su se na prve dvije ploče sa 6 jažica nasadile inficirane i neinficirane stanice koje će se kasnije odvojiti otopinom tripsin, a na druge dvije otopinom EDTA s obzirom na određeni vremenski interval inkubacije (3, 5, 7 i 10 minuta) (Slika 5). Nakon nasađivanja, stanice su stavljene u inkubator na 37°C te su inkubirane 24 h.

A



B



Slika 5. Shematski prikaz nasađivanja stanica koje će se odvajati otopinom EDTA s obzirom na određeni vremenski period inkubacije. Nasađivanje inficiranih (WT) i neinficiranih (M) stanica se izvodilo tako da su se na jednu ploču nasadile stanice koje će se odvajati otopinom EDTA nakon 3 i 5 minuta inkubacije (**A**), a na drugu one koje će se odvajati nakon 7 i 10 minuta (**B**). U red A svake pločice sa 6 jažica nasađivale su se neinficirane stanice , a u red B inficirane. U svaku odgovarajuću jažicu nasađivao se jednak broj stanica. Isti princip nasađivanja provodio se i za stanice koje će se odvajati otopinom tripsin.

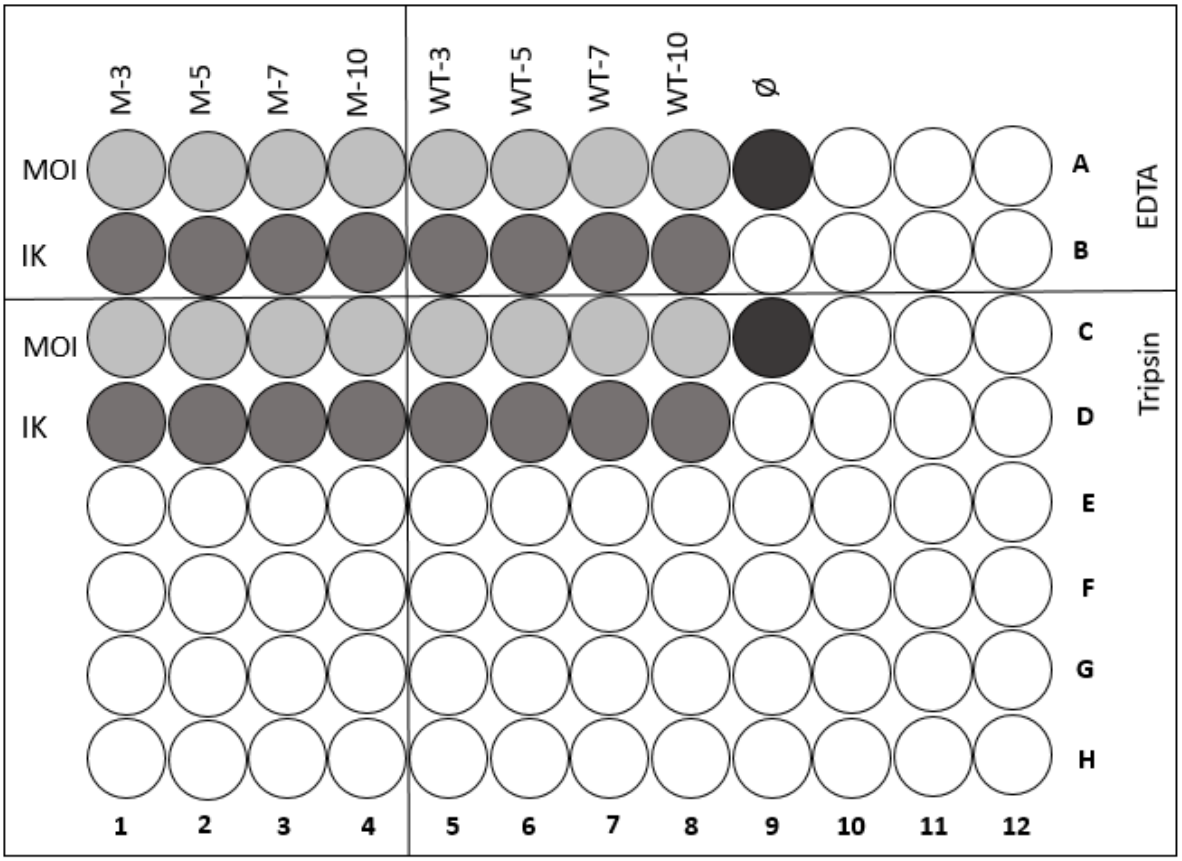
3.2.6. Odvajanje stanica pomoću otopina tripsin i EDTA u različitim vremenskim intervalima

Nakon 24-satne inkubacije ploča sa 6 jažica, u kojima su prethodno bile nasađene inficirane i neinficirane stanice, provodilo se odvajanje stanica od podloge. Odvajanje stanica je izvedeno uklanjanjem starog medija, ispiranjem s PBS-om te dodavanjem otopine tripsin ili EDTA u odgovarajuće jažice. Stanice su potom stavljene u inkubator na 37°C. Djelovanje otopina zaustavljeno je dodatkom svježeg medija u odgovarajuće jažice s obzirom na određeni vremenski interval inkubacije (3, 5, 7 i 10 minuta). Stanice su zatim prikupljene te centrifugirane 5 minuta na 300 *g*. Osim inkubacije, cijeli proces odvajanja stanica proveden je držanjem stanica na 4°C (na ledu) kako bi se zaustavio metabolizam stanica.

3.2.7. Fenotipska analiza stanica protočnom citometrijom

Fenotipska analiza inficiranih i neinficiranih stanica provedena je korištenjem protutijela navedenih u tablici 2 i analizom na protočnom citometru BD FACSAriaIIIu. Nakon centrifugiranja, supernatant se uklonio te su se stanice resuspendirale u 200 µL FACS pufera. Potom su stanice raspoređene u ploču s 96 jažica tako da su se inficirana i neinficirana grupa stanica podijelile na dodatna dva seta (Slika 6). Na jedan set stanica nanosit će se protutijela koja specifično prepoznaju molekule od interesa, a na drugi odgovarajuće izotipske kontrole kao kontrola nespecifičnog vezanja što je prikazano u tablici 4. Stanice su nakon nanošenja na ploču s 96 jažica centrifugirane 5 minuta, na 300 *g* te se maknuo supernatant. Kako antigen prezentirajuće stanice (Raw264.7 te DC2.4) posjeduju Fc-stanične receptore kojim mogu nespecifično vezati protutijela od interesa, stanice su najprije tretirane s protutijelom 2.4G2 specifičnim za Fc-stanični receptor FcγRII/III (CD16/32) 15 minuta na ledu u volumenu od 25 µL. Uslijedilo je dodavanje neobilježenog primarnog protutijela specifičnog za virusni protein m04 na jedan set uzoraka i njegove neobilježene izotipske kontrole na drugi set stanica. Protutijela su bila razrijeđena u FACS-puferu, a na

stanice se dodalo 25 µL FACS pufera s odgovarajućim protutijelom tako da je ukupni volumen bio 50 uL. Kako bi se mrtve stanice isključene iz analize, zajedno s primarnim protutijelima, dodavala se i boja *FVD eFluor780*. Stanice su resuspendirane u smjesi protutijela te je uslijedila 20-minutna inkubacija, na 4°C u tami. Uzorci su zatim isprani u 150 µL FACS puferu i centrifugirani 5 minuta, 300 *g*. U drugom koraku stanice su obojene s odgovarajućim sekundarnim, fluorescentno obilježenim protutijelom specifičnim za izotip neobilježenih primarnih protutijela – IgG1 ili IgG2b. Sa sekundarnim protutijelom dodana su i fluorokromom direktno obilježena primarna protutijela specifična za površinske biljege od interesa kao i njihove izotipske kontrole u FACS mediju. Nakon što su se protutijela razrijedila u FACS-puferu, u jažice se dodavalo 50 µL navedenog pufera s odgovarajućim protutijelom. Također, za svaku grupu stanica korištena je i negativna kontrola u kojoj su stanice inkubirane bez dodatka antitijela (neobojene stanice). Stanice su potom fiksirane tako da se u svaku jažicu dodalo 50 µL IC pufera za fiksaciju te su resuspendirane i inkubirane oko 12-16 h na 4°C u mraku, prekrivene aluminijskom folijom. Nakon 24 satne inkubacije, stanice su isprane sa 150 µL FACS pufera te su resuspendirane u 200 µL istog medija, a zatim analizirane na protočnom citometru FACSAria. Rezultati su analizirani pomoću programa FACSDiva (BD Bioscience) i FlowJo (Tree Star).



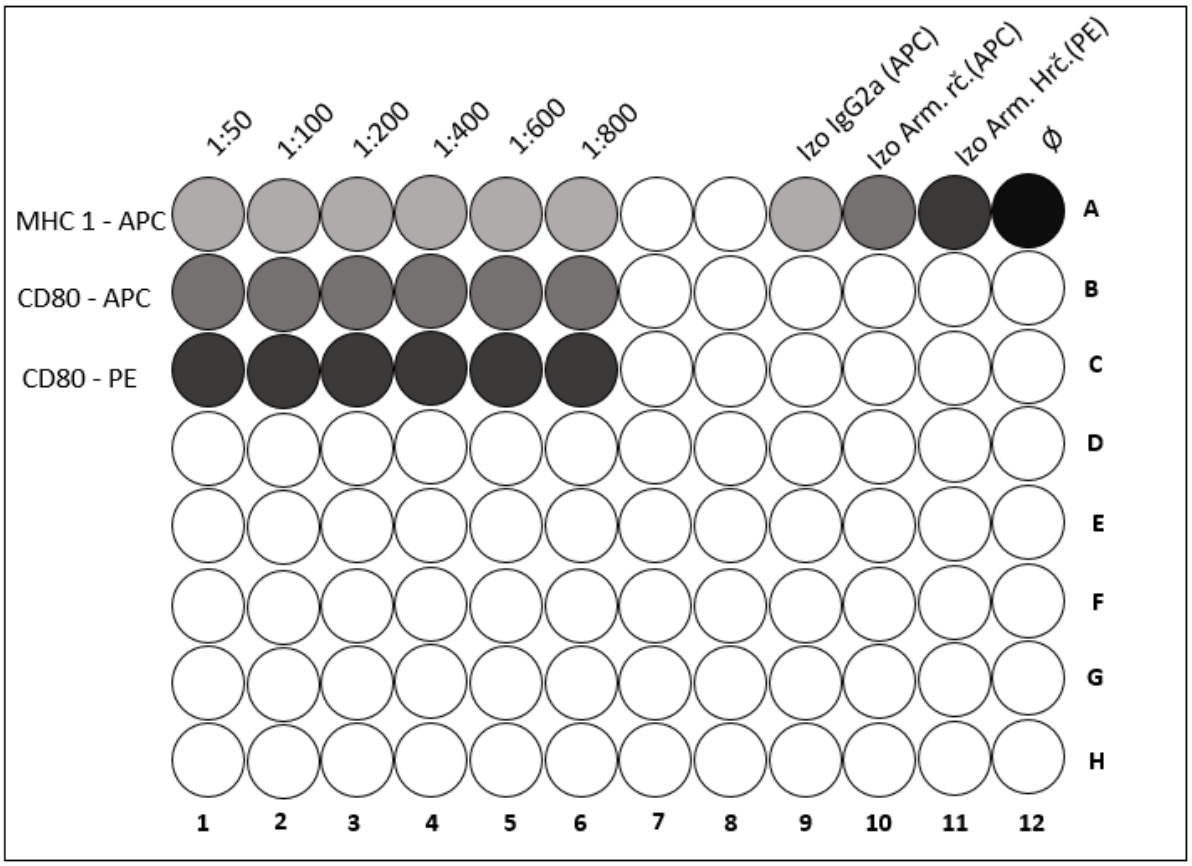
Slika 6. Shematski prikaz raspoređivanja stanica u ploče s 96 jažica. Raspoređivanje se provodilo tako da se svaka grupa stanica koja se odvajala otopinom tripsin ili EDTA podijelila na dodatna dva seta. Neinficirane stanice (M) raspoređene su u stupcima 1-4, a inficirane (WT) u stupce 5-8. Na prvi set stanica u redovima A i C dodavana su specifična protutijela na molekule od interesa (MOI), a stanice nasađene u redu B i D predstavljaju drugi set stanica na koje su dodavane odgovarajuće izotipske kontrole (IK). U dvije jažice stavljene su i negativne kontrole za svaku grupu stanica koje se nisu bojale protutijelima (Ø).

Tablica 4. Prikaz dodavanja odgovarajućih protutijela u svaki set stanica

	Set 1	Set 2 (kontrolni)
Primarni MEF i B12		
1.Korak	m04 (IgG1) + FVD eFluor 780	IgG1 izotipska kontrola + FVD eFluor 780
2.Korak	Sekundarno IgG1 PerCP-eFluor 710 + H-2D^{d} PE (IgG2a)	Sekundarno IgG1 PerCP-eFluor 710 + IgG2a PE izotipska kontrola
Raw264.7		
1.Korak	Fc block + m04 (IgG2b) + FVD eFluor 780	Fc block + IgG2b izotipska kontrola + FVD eFluor 780
2.Korak	Sekundarno IgG2b FITC + H-D^{d} PE + CD80 APC	Sekundarno IgG2b FITC + IgG2a PE izotipska kontrola + Armenijski hrčak APC izotipska kontrola
DC 2.4		
1.Korak	Fc block + m04 (IgG2b) + FVD eFluor 780	Fc block + IgG2b izotipska kontrola + FVD eFluor 780
2.Korak	Sekundarno IgG2b FITC + H-2K^{b} APC + CD80 PE	Sekundarno IgG2b FITC + IgG2a APC izotipska kontrola + Armenijski hrčak PE izotipska kontrola

3.2.8. Testiranje protutijela

Prije početka rada s protutijelima treba odrediti optimalnu koncentraciju protutijela u kojemu protutijelo daje maksimalan i specifičan signal. Testirala su se tri protutijela: anti-H-2K^b APC, anti-CD80 PE i anti-CD80 PE. Svako protutijelo je testirano s obzirom na šest različitih koncentracija (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600 i 1:800). Prvo su pripremljene DC 2.4 stanice raspoređene u 96 well plate (Slika 7). Stanice su potom centrifugirane 5 minuta, na 300 *g* te se maknuo supernatant. Uslijedilo je dodavanje Fc block-a na uzorke te 15-minutna inkubacija na 4°C. Koristeći FACS pufer, pripremljene su potom željene koncentracije primarnih protutijela specifičnih za površinske biljege, koja su direktno obilježena fluorokromom i njihove izotipske kontrole. Također, uz primarna protutijela, dodavala se i boja FVD eFluor 780 u koncentraciji 1:1000. Potom je uslijedilo dodavanje po 25 µl protutijela određene koncentracije u odgovarajuće jažice te 20-minutna inkubacija stanica na 4°C. Osim izotipskih kontrola, kao negativna kontrola korištene su i stanice na koje se nisu dodavala protutijela. Stanice su zatim isprane u 150 µL FACS puferu i centrifugirane 5 minuta, 300 *g*. Uzorci su potom resuspendirani u 200 µL istog medija, a zatim analizirani na protočnom citometru FACSAria. Analiza rezultata je provedena koristeći programe FACSDiva (BD Bioscience) i FlowJo (Tree Star).



Slika 7. Shematski prikaz raspoređivanja stanica za testiranje protutijela. Raspoređivanje se provodilo tako da su se DC 2.4 stanice prvo podijelile u tri grupe. U redu A na stanice su se dodavala protutijela specifična za MHC I H-2K^b obilježena APC fluorokromom (MHC I APC), u redu B protutijela specifična za CD80 obilježena APC fluorokromom (CD80 APC) i u redu C protutijela specifična za CD80 obilježena PE fluorokromom (CD80 PE). U tri dodatne jažice raspoređene su stanice u koje su se dodavale odgovarajuće izotipske kontrole u koncentraciji 1:100. Osim toga, u jednu jažicu stavljena je i negativna kontrola u kojoj je na stanice dodana samo FVD boja.

3.2.9. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka napravljena je koristeći program GraphPad Prism5 i Microsoft Excel softver. Korišten je jednosmjerni ANOVA test s *post-hoc* korekcijom kako bi se odredila statistička značajnost između različitih eksperimentalnih grupa. Razina od $p \leq 0.05$ smatrana je statistički značajnom. Statističke značajnosti označene su zvjezdicama: **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$. Statistička neznačajnost nije označena na grafovima.

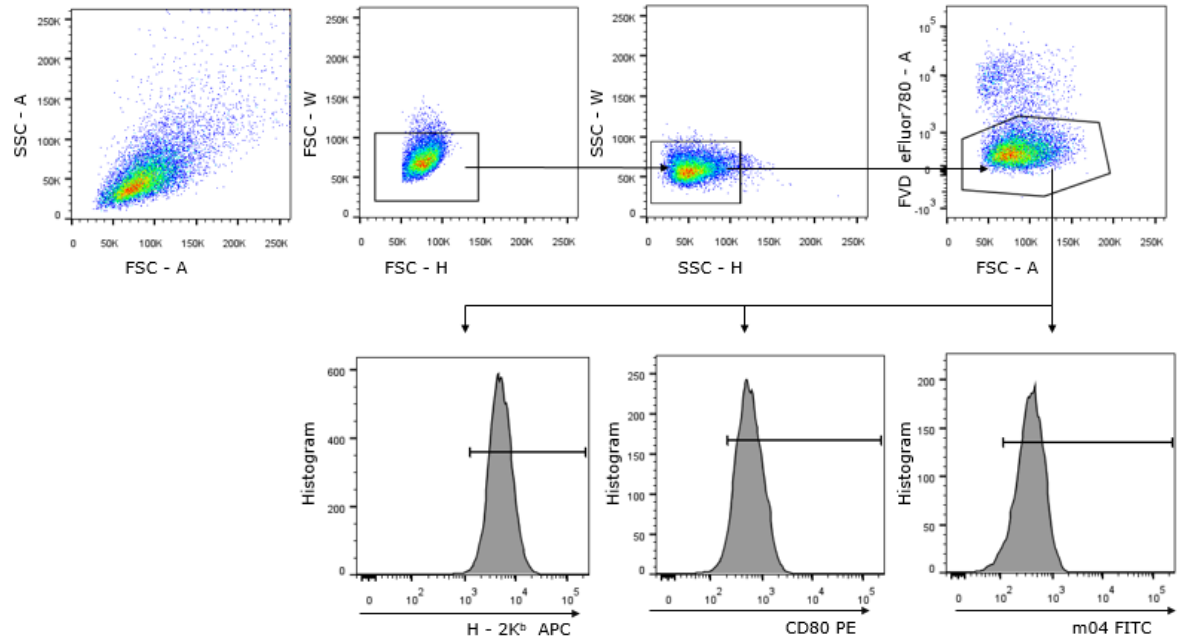
4. REZULTATI

4.1. Testiranje optimalnog razrjeđenja protutijela za detekciju molekula H-2K^b i CD80 na stanicama DC 2.4

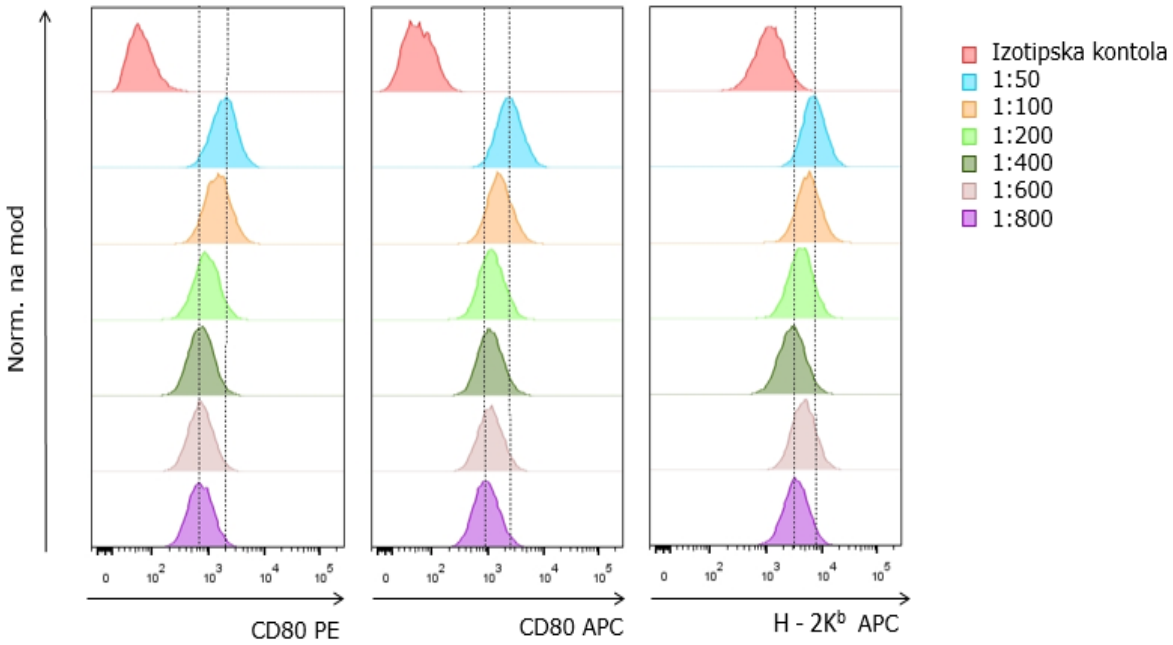
Prije korištenja protutijela u eksperimentu, važno je odrediti optimalno razrjeđenje te potvrditi njihovu specifičnost. Optimalno razrjeđenje protutijela je ona količina protutijela u kojemu se postiže najbolja razlučivost pozitivne i negativne populacije stanica te minimalno nespecifično vezanje. Dakle, testiranje protutijela je bitno kako bi se dobili pouzdani rezultati u budućim eksperimentima (49). Stoga smo kao prvi korak ovog diplomskog rada, odredili optimalno razrjeđenje za sljedeća protutijela: anti-H-2K^b APC, anti-CD80 APC i anti-CD80 PE s obzirom na to da navedena protutijela nisu prethodno bila korištena u Centru za proteomiku.

Za testiranje navedenih protutijela, koristili smo stanice DC 2.4 s obzirom na to da je iz literature poznato da ove stanice ispoljavaju molekule H-2K^b i CD80 (50). Kao negativne kontrole, korištene su stanice koje nisu bile inkubirane s protutijelima te odgovarajuće izotipske kontrole. Za svako protutijelo, testirano je šest različitih koncentracija: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600 te 1:800. Nakon što su stanice DC 2.4 prikupljene te inkubirane s protutijelima određene koncentracije, uslijedila je analiza na protočnom citometru koja je prikazana na Slici 8A-B. Kod sva tri protutijela, koncentracija 1:50 pokazala je najjači pozitivan signal, odnosno najbolje razlikovanje pozitivne i negativne populacije. Kao što se može vidjeti na Slici 8B, kod svih protutijela razrjeđenje 1:100 dalo je dobro razdvajanje od negativne populacije te je odabrano kao optimalno razrjeđenje.

A



B



Slika 8. Protutijela anti-CD80 PE, anti-CD80 APC i anti-H-2K^b APC daju najjači pozitivan signal pri razrjeđenju 1:50 na stanicama DC 2.4. A Strategija ograđivanja populacije stanica: FSC/SSC graf za razlučivanje veličine i granuliranosti stanica, SSC-H/SSC-W i FSC-H/FSC-W grafovi za izdvajanje pojedinačnih stanica, FSC-A/Comp–eFluor780 graf za izdvajanje živih stanica te

Comp-APC i Comp-PE histogrami za određivanje pozitivne populacije s obzirom na molekule H-2K^b i CD80. **B** Grafički prikaz normaliziranog intenziteta fluorescencije uzoraka inkubiranih s protutijelima anti-H-2K^b APC, anti-CD80 APC i anti-CD80 PE koncentracije 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600 i 1:800 te odgovarajućim negativnim kontrolama. Norm. na mod – normalizirano na mod. Fluorescencija je detektirana protočnim citometrom BD FACSAriaIII, a rezultati analizirani softverom FlowJo.

4.2. Osjetljivost površinske frakcije molekula MHC I i m04 na tretman stanica MEF i B12 tripsinom i EDTA

Prije bilo kakve analize, adherentne stanice je potrebno odvojiti od podloge te dobiti suspenziju stanica, pri čemu se u našem laboratoriju koristi otopina tripsin ili EDTA. Poznato je da vrijeme inkubacije navedenih otopina sa stanicama može utjecati na razinu površinskih molekula od interesa, što može rezultirati dobivanjem netočnih rezultata (19). Zbog toga smo odlučili testirati utjecaj otopina za odvajanje na izražaj molekula MHC I i m04 na stanicama MEF i B12. Dodatno, testirali smo i nekoliko različitih vremena inkubacije. Molekule MHC I i m04 odabrane su za testiranje jer MCMV utječe na njihov izražaj kako bi izbjegao prepoznavanje od stanica imunosnog sustava (37), a njihova regulacija i ekspresija predmet su intenzivnog istraživanja u Centru za proteomiku.

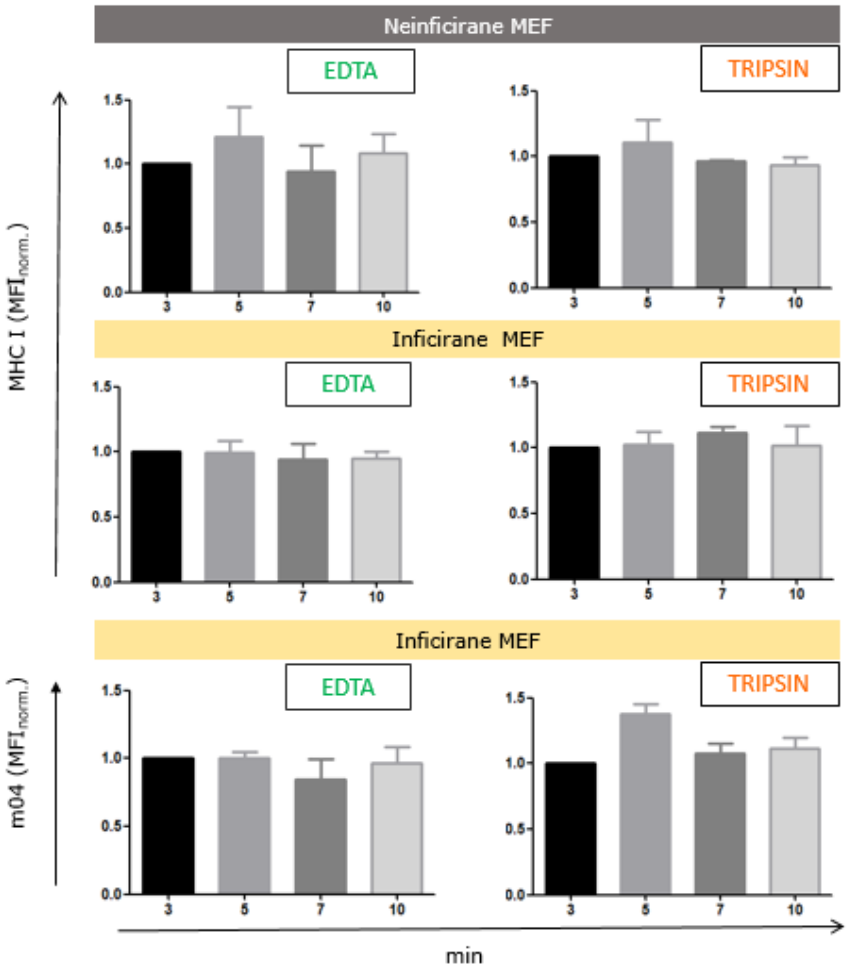
Prijašnja istraživanja pokazala su da MCMV smanjuje količinu te regulira tip molekula MHC I na površini inficiranih stanica (37). Zbog toga su proučavane stanice prvo pojedinačno podijeljene u grupu koja će ostati neinficirana i onu koja će se inficirati WT MCMV-om, kako bi se testirao utjecaj otopina s obzirom na različiti izražaj molekula MHC I. Inficirane stanice su korištene i za analizu proteina m04 koji je protein MCMV-a. Stanice su potom tretirane s otopinom tripsin ili EDTA te je njihovo djelovanje zaustavljeno nakon 3, 5, 7 i 10 minuta, 24 sata nakon infekcije. Navedeni intervali inkubacije odabrani su zbog toga što se djelovanje navedenih otopina najčešće zaustavlja unutar 10 minuta (30). Zatim su stanice inkubirane odgovarajućim protutijelima te je mjeren medijan intenziteta fluorescencije (MFI) testiranih markera. Kao negativne kontrole,

za procjenu specifičnosti protutijela, korištene su neinficirane stanice koje se nisu inkubirale protutijelima te odgovarajuće izotipske kontrole (protutijelo istog izotipa kao i ispitivano protutijelo, ali koje ne prepoznaje niti jedan marker na ispitivanim stanicama). Svaki pokus ponovljen je 2-3 puta, te su vrijednosti MFI normalizirane na uzorak koji je s tripsinom ili EDTA bio inkubiran 3 minute prema formuli:

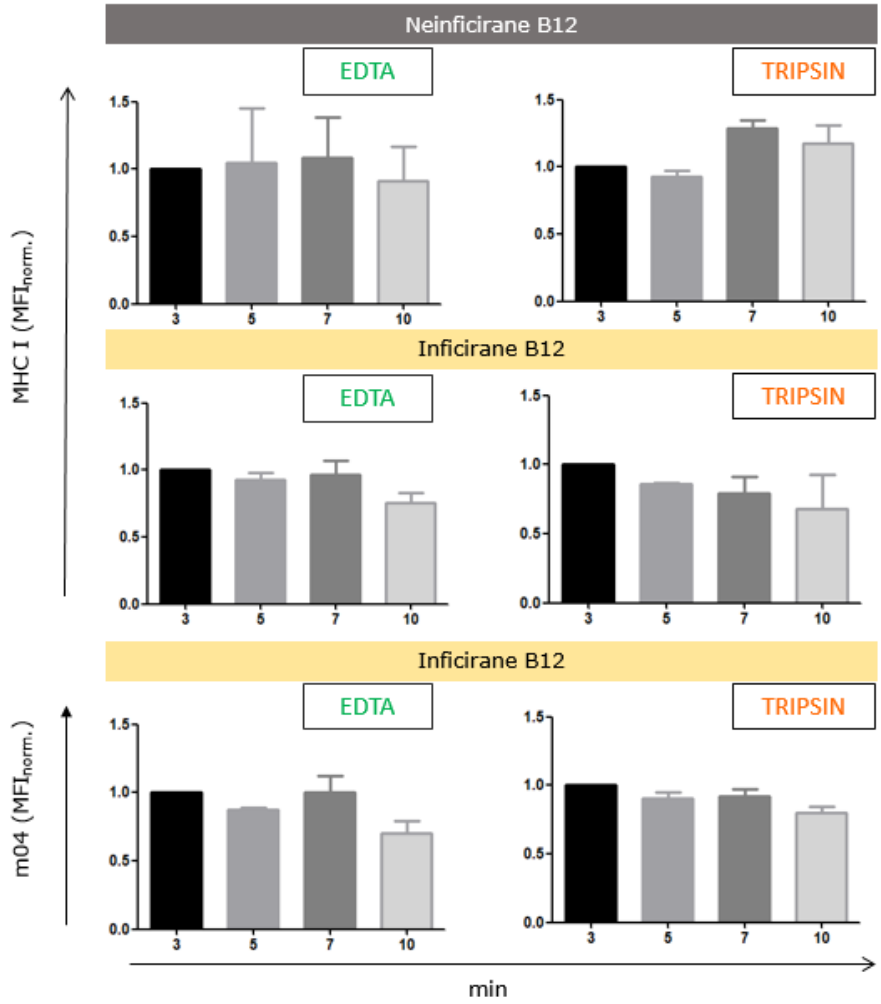
$$\mathrm{MFI}_{\mathrm{norm.}} = \frac{\mathrm{MFI}_{\mathrm{n}} - \mathrm{MFI}_{\text{izotipska kontrola}}}{\mathrm{MFI}_{\mathrm{x}}}$$

pri čemu je n vrijeme zaustavljanja djelovanja otopine za odvajanje (3, 5, 7 i 10 minuta), dok x označava 3-minutnu inkubaciju stanica u otopini za odvajanje.

Protočno-citometrijskom analizom dobiveno je da testirani intervali inkubacije otopina tripsin i EDTA ne utječu statistički značajno na izražaj molekula MHC I na neinficiranim i inficiranim stanicama MEF (Slika 9). Osim toga, testirana vremena inkubacije otopina nisu statistički značajno utjecala niti na izražaj proteina m04 na inficiranim stanicama MEF-a. Kao negativna kontrola za inficiranost MCMV-om korištene su neinficirane stanice zbog toga što ne izražavaju molekule m04 na svojoj površini (37). Nakon testiranja primarnih stanica MEF, sljedeći korak uključivao je ispitivanje utjecaja navedenih otopina na imortaliziranim fibroblastima B12. Međutim, i ova analiza pokazala je da izražaj molekula MHC I i m04 nije značajno promijenjen niti na stanicama B12 s obzirom na testirana vremena inkubacije otopina tripsin i EDTA (Slika 10). Osim toga, uočena je i tendencija pada u razini testiranih molekula u 10. minuti kod inficiranih stanica B12 tretiranih tripsinom ili EDTA. Temeljem ovih rezultata može se zaključiti da površinske molekule MHC I i m04 nisu statistički značajno osjetljive na tretman stanica MEF i B12 otopinom tripsin ili EDTA neovisno o vremenu inkubacije i inficiranosti.



Slika 9. Otopine tripsin i EDTA ne utječu značajno na razinu molekula MHC I i m04 na primarnim stanicama MEF u testiranim intervalima inkubacije. Neinficirane i MCMV-om inficiarne stanice MEF su inkubirane u otopini tripsin ili EDTA 3, 5, 7 i 10 minuta, 24 h nakon njihovog nasađivanja. Izražaj molekula MHC I i m04 mjeren je na protočnom citometru, neposredno nakon inkubacije stanica odgovarajućim protutijelima. Razina izražaja proteina na grafovima prikazana je kao MFI_{norm}. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SEM tri zasebna eksperimenta. Statistička značajnost prikazana je na grafovima, a određena testom ANOVA s Tukey-evim post-hoc testom. **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$.



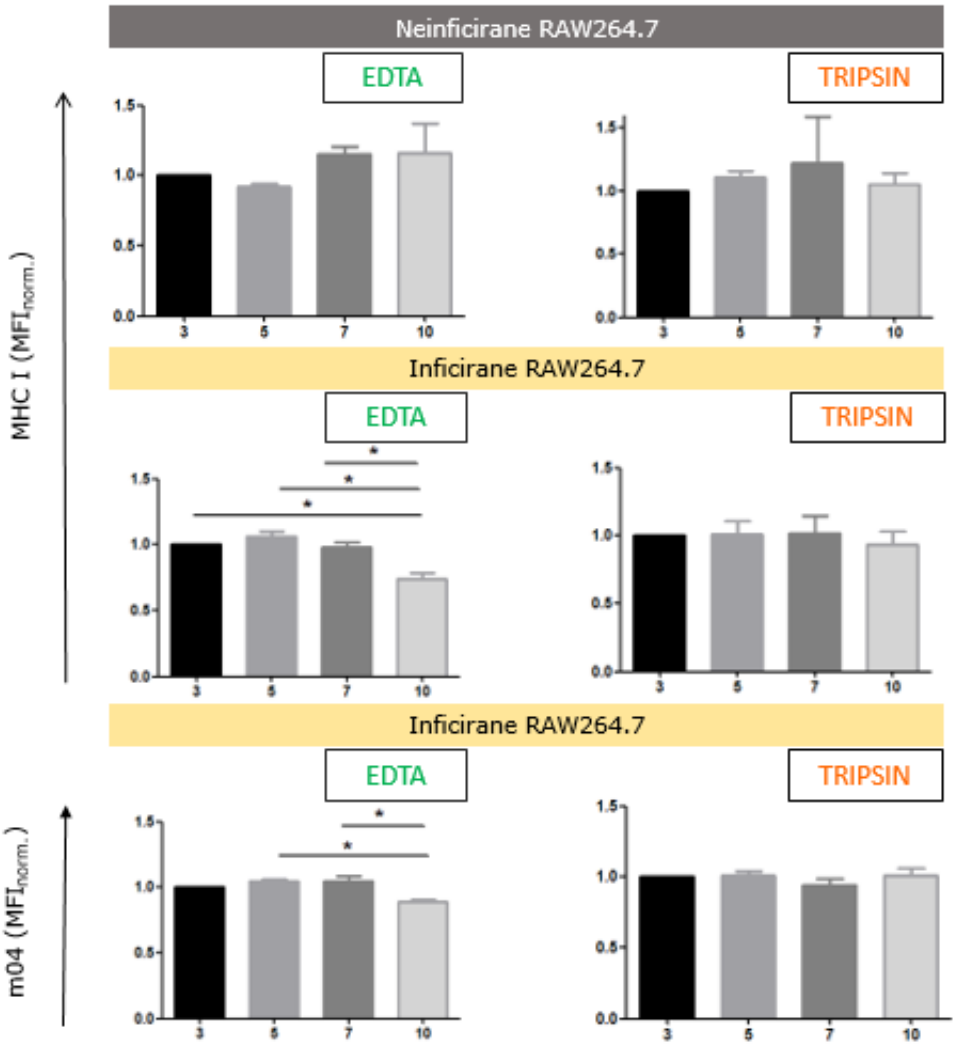
Slika 10. Izražaj molekula MHC I i m04 nije značajno promijenjen na stanicama B12 tretiranim otopinama tripsin i EDTA u testiranim intervalima inkubacije. Neinficirane i inficirane stanice B12 su inkubirane u otopini tripsin ili EDTA 3, 5, 7 i 10 minuta, 24 h nakon njihovog nasađivanja. Na protočnom citometru mjeren je izražaj molekula MHC I i m04, neposredno nakon inkubacije stanica odgovarajućim protutijelima. Razina izražaja proteina na grafovima prikazana je kao MFI_{norm}. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD dva zasebna eksperimenta. Statistička značajnost prikazana je na grafovima, a određena testom ANOVA s Tukey-evim post-hoc testom. **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$.

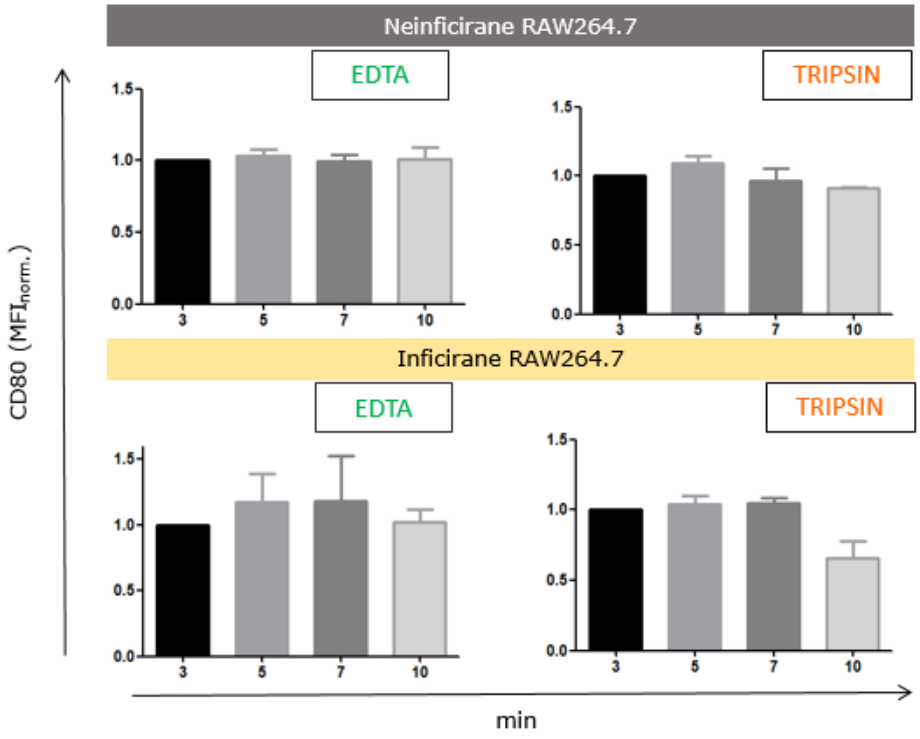
4.3. Osjetljivost površinske frakcije molekula MHC I i m04 na tretman stanica RAW264.7 i DC 2.4 tripsinom i EDTA

Sljedeći korak bilo je na isti način, kao i stanice MEF i B12, testirati utjecaj vremena inkubacije otopina tripsin i EDTA na stanicama APC - Raw264.7 i DC 2.4. Međutim, stanice APC posjeduju Fc-stanični receptor kojim mogu nespecifično vezati protutijela od interesa, za razliku od stanica MEF-a i B12. Zbog toga su testirane stanice APC prije inkubacije s primarnim protutijelima najprije tretirane s protutijelom specifičnim za Fc-stanični receptor, kako bi se spriječilo nespecifično vezanje ispitivanih protutijela na Fc-stanične receptore. Navedene stanice koristile su se za analizu površinskog izražaja molekula MHC I, m04 i CD80. Izražaj molekula CD80 nije analiziran na stanicama fibroblasta MEF i B12 jer se ne nalaze na njihovoj površini. Kao i molekule MHC I, molekule CD80 imaju nižu razinu na stanicama inficiranim WT MCMV-om u odnosu na neinficirane stanice te se na testiranim APC stanicama analizirao i utjecaj otopina s obzirom na različiti izražaj molekula CD80. Molekule CD80 odabrane su za proučavanje jer su zanimljive kao ko-stimulatorne molekule važne za aktivaciju limfocita T, a na čiju ekspresiju djeluje MCMV kako bi izbjegao aktivaciju imunosnog sustava (30).

Rezultati dobiveni protočnim citometrom nisu pokazali značajnu promijenu u izražaju MHC I nakon tretiranja neinficiranih stanica RAW264.7 s otopinom tripsin ili EDTA, u testiranim intervalima inkubacije (Slika 11). Naime, detektirano je značajno smanjene u razini molekula MHC I na inficiranim RAW264.7 ($p<0.05$) u 10. minuti inkubacije s otopinom EDTA, u odnosu na razinu u 3., 5. i 7. minuti. S druge strane, na inficiranim stanicama tretiranim s tripsinom nije uočen značajan pad u razini molekula MHC I neovisno o vremenu inkubacije. Osim razine molekula MHC I na inficiranim stanicama RAW264.7, otopina EDTA značajno je smanjila i razinu molekula m04 ($p<0.05$) u 10. minuti u usporedbi s 5. i 7. minutom. S druge strane, razina m04 nije bila značajno promijenjena na inficiranim stanicama

tretiranim s tripsinom. Nadalje, izražaj molekula CD80 nije bio značajno promijenjen nakon tretiranja neinficiranih i inficiranim stanica RAW264.7 tripsinom ili EDTA, neovisno o vremenu inkubacije.

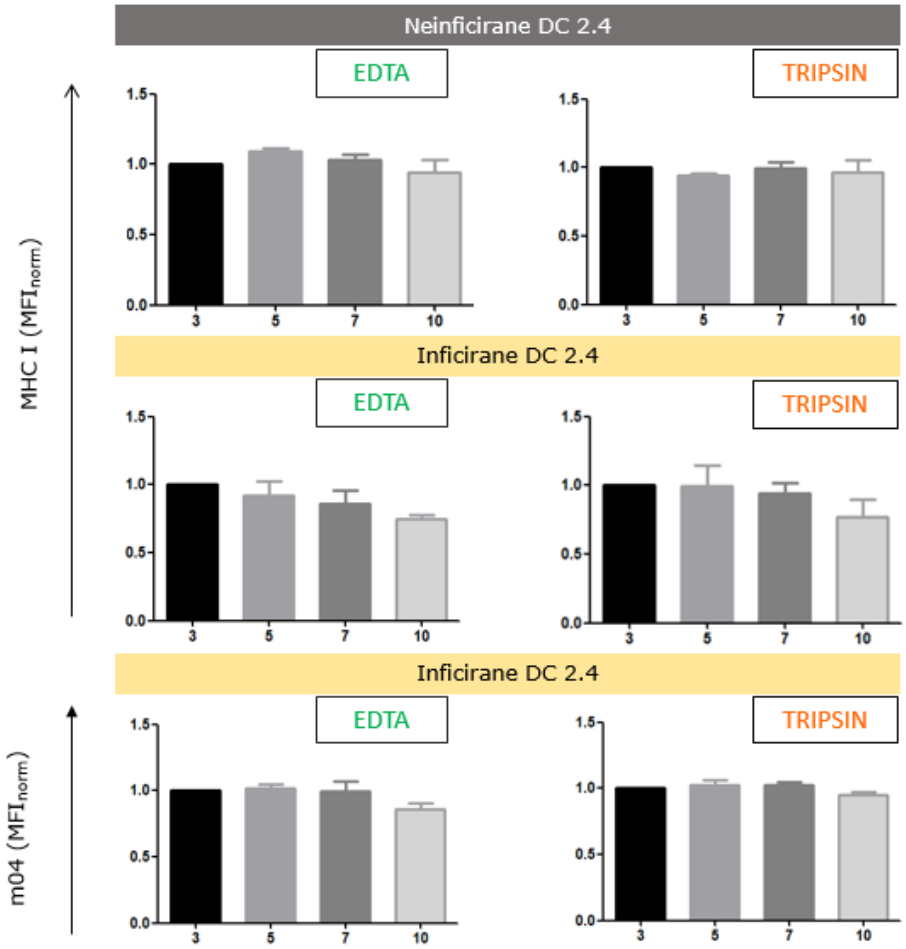


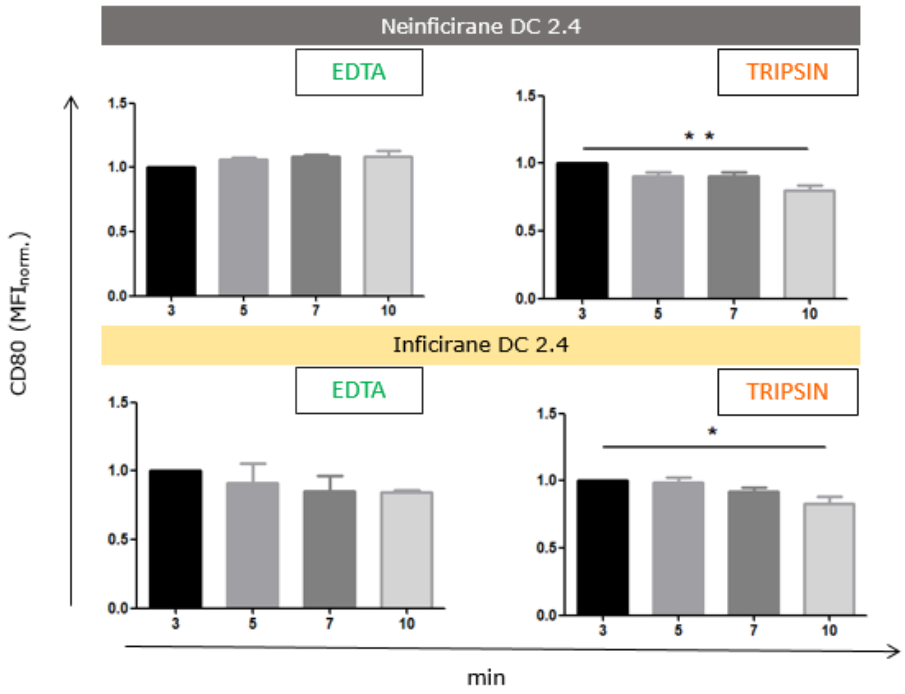


Slika 11. Razina molekula MHC I i m04 je statistički značajno smanjena u 10. minuti inkubacije u otopini EDTA na inficiranim stanica RAW264.7. Stanice RAW264.7 su odvojene nakon 3, 5, 7 i 10 minuta inkubacije s otopinom tripsin ili EDTA, 24 sata nakon infekcije i uspostave kulture. Razine molekula MHC I, CD80 i m04 su potom analizirane protočnim citometrom nakon dodavanja odgovarajućih protutijela na stanice. Razina izražaja proteina na grafovima prikazana je kao MFI_{norm}. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD dva zasebna eksperimenta. Statistička značajnost je prikazana na grafovima, a određena testom ANOVA s Tukey-evim post-hoc testom. **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$.

Zatim su na isti način analizirane stanice DC 2.4. Analizom na protočnom citometru, pokazano je da izražaj molekula MHC I i m04 nije značajno izmijenjen na neinficiranim i inficiranim stanicama tretiranim tripsinom ili EDTA, neovisno o vremenu inkubacije (Slika 12). Međutim, razina molekula CD80 bila je značajno smanjena u 10. minuti inkubacije na neinficiranim ($p<0.01$) i inficiranim ($p<0.05$) stanicama tretiranim tripsinom u odnosu na 3. minutu inkubacije. S druge strane, stabilnost

molekula CD80 nije bila značajno promijenjena nakon tretmana neinficiranih i inficiranih stanica DC 2.4 tripsinom, u testiranim intervalima inkubacije. Osim toga uočen je padajući trend u razini svih testiranim molekula na inficiranim stanicama tretiranim otopinom EDTA koji nije bio statistički značajan. Dobiveni rezultati upućuju na to da otopina EDTA značajno smanjuje razinu MHC I i m04 na inficiranim RAW264.7, a tripsin razinu CD80 na neinficiranim i inficiranim DC2.4 ako se stanice tretiraju s navedenim otopinama 10 minuta.





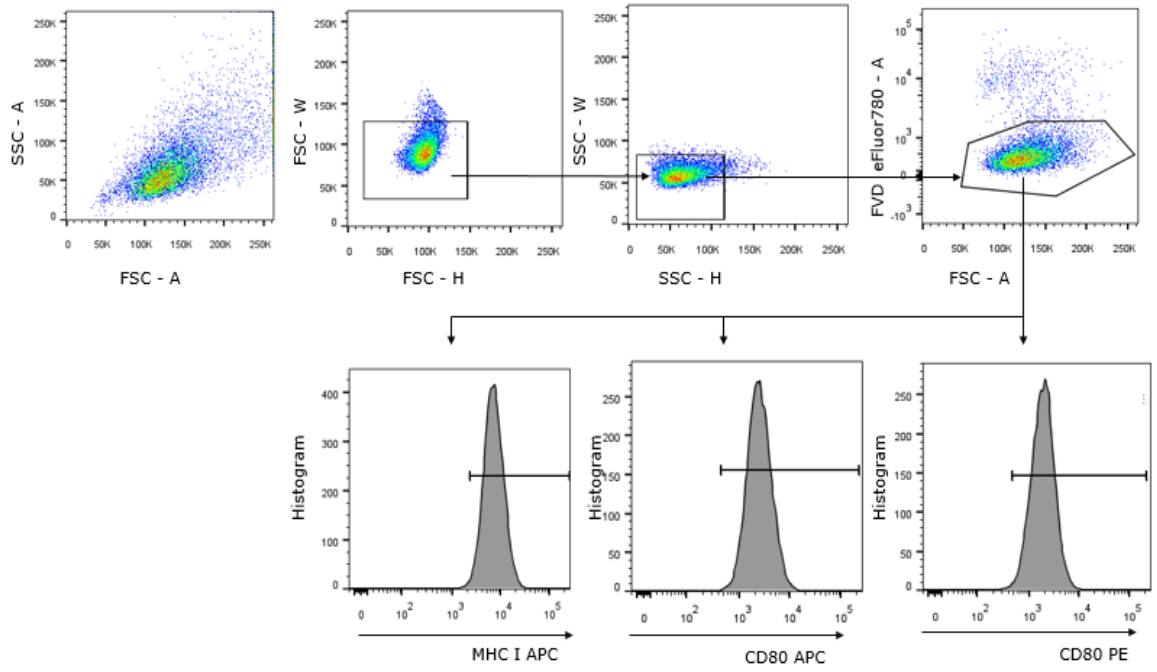
Slika 12. Otopina tripsin značajno utječe na smanjenje razine molekula CD80 u 10. minuti na neinficiranim i inficiranim stanicama DC 2.4. Neinficirane i inficirane stanice DC 2.4 odvojene su s otopinom tripsin ili EDTA nakon 3, 5, 7 i 10 minuta inkubacije, 24 sata nakon infekcije. Izražaj molekula MHC I, CD80 i m04 analiziran je protočnim citometrom nakon inkubacije stanica s odgovarajućim protutijelima. Razina izražaja proteina na grafovima prikazana je kao MFI_{norm}. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SEM tri zasebna eksperimenta. Statistička značajnost prikazana je na grafovima, a određena testom ANOVA s Tukey-evim post-hoc testom. **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$.

4.4. Usporedba ekspresije molekula MHC I, m04, CD80 na stanicama MEF, B12, RAW264.7 i DC 2.4

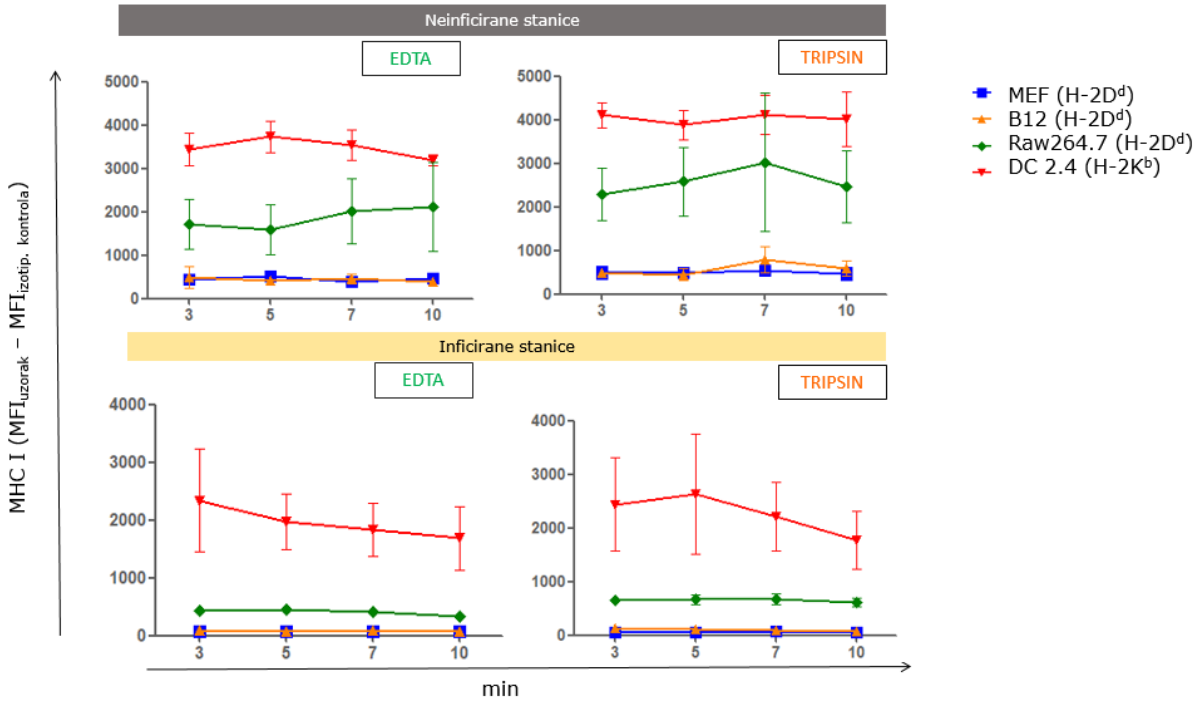
Konačno, zanimala nas je usporedba ekspresije molekula MHC I, CD80 i m04 na različitim tipovima stanica s obzirom na to da takvi podaci ne postoje u literaturi. Nadalje, molekula MHC I izuzetno je bitna imunosna molekula čija razina ispoljavanja može imati velike posljedice na imunosni odgovor posredovan limfocitima CD8 T i stanicama NK. Protočnim citometrom potvrđeno je da je razina ekspresije MHC I na svim inficiranim

stanicama značajno smanjena u odnosu na neinficirane stanice što se slaže s literaturom (Slika 13A-B) (42). Rezultati su pokazali da je razina MHC I veća na stanicama RAW264.7 i DC 2.4 za razliku od primarnih stanica MEF i imortaliziranih stanica B12, i na inficiranim i neinficiranim stanicama tretiranim tripsinom ili EDTA. Stanice MEF i B12 imaju gotovo jednaku razinu MHC I molekula. S druge strane, stanice DC 2.4 za razliku od stanica Raw264.7 imaju veću ekspresiju molekula MHC I na inficiranim i neinficiranih stanica tretiranih tripsinom ili EDTA. Kod svih inficiranih i neinficiranih testiranih stanica, razina MHC I je manja djelovanjem otopine EDTA u odnosu na otopinu tripsin.

A



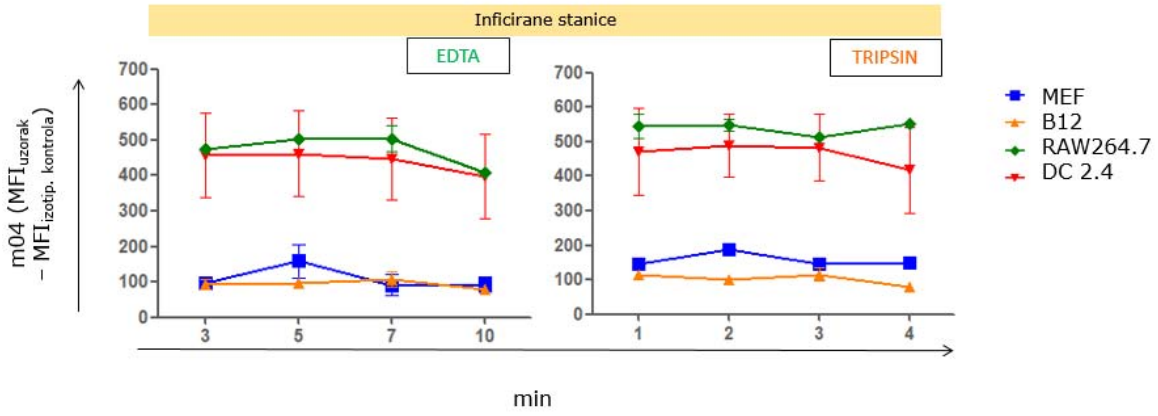
B



Slika 13. Neinficirane i inficirane stanice DC 2.4 i RAW264.7 imaju višu razinu ekspresije molekula MHC I na svojoj površini u odnosu na stanice MEF i B12. A Primjer strategije ograđivanja populacije stanica DC 2.4: FSC/SSC graf za razlučivanje veličine i granuliranosti stanica, SSC-H/SSC-W i FSC-H/FSC-W grafovi za–izdvajanje pojedinačnih stanica, FSC-A/Comp–eFluor780 graf za izdvajanje živih stanica te Comp-APC i Comp-PE i Comp FITC histogrami za određivanje pozitivne populacije s obzirom na MHC I, CD80 i m04 molekule. **B** Grafički prikaz razine MHC I proteina neinficiranih i inficiranih stanica MEF, B12, RAW264.7 i DC 2.4 tretiranih tripsinom ili EDTA nakon 3, 5, 7 i 10 minuta inkubacije. Količina razine proteina je prikazana kao MFI_{uzorak}-$MFI_{izotipska\ kontrola}$. Fluorescencija je detektirana protočnim citometrom BD FACSAriaIIu, a rezultati analizirani softverom FlowJo.

Potom se uspoređivao izražaj molekula m04 na svim testiranim inficiranim stanicama. Rezultati dobiveni protočnim citometrom pokazali su da je razina ekspresije m04, kao i MHC I, veća na stanicama RAW264.7 i DC 2.4 u odnosu na stanice MEF i B12 (Slika 14). Razina izražaja proteina m04 slična je između stanica DC 2.4 i RAW264.7, za razliku od molekula

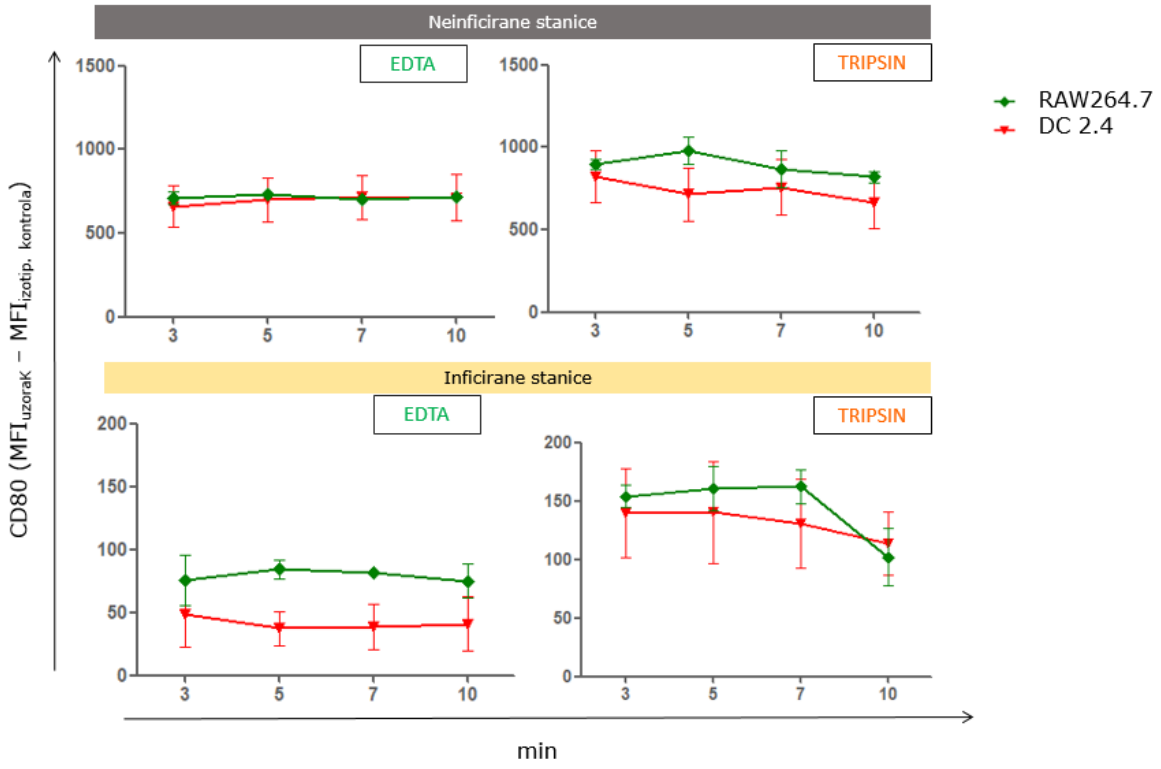
MHC I, te stanica MEF i B12. Kod svih testiranih stanica, razina molekula m04 je niža utjecajem otopine EDTA u odnosu na otopinu tripsin s obzirom na testirana vremena inkubacije.



Slika 14. Inficirane stanice RAW264.7 i DC 2.4 imaju veću razinu površinskih molekula m04 u odnosu na stanice MEF i B12. Grafički prikaz razine m04 proteina inficiranih stanica MEF, B12, RAW264.7 i DC 2.4 tretiranih tripsinom ili EDTA nakon 3, 5, 7 i 10 minuta inkubacije. Količina razine proteina je prikazana kao MFI_{uzorak}-$MFI_{izotipska\ kontrola}$. Fluorescencija je detektirana protočnim citometrom BD FACSAriaIIu, a rezultati analizirani softverom FlowJo.

Zatim je uslijedila usporedba ekspresije molekula CD80, samo na stanicama RAW264.7 i DC 2.4 s obzirom na to da fibroblasti ne ispoljavaju CD80. Kao i za molekule MHC I, uočen je pad u razini molekula CD80 na inficiranim stanicama RAW264.7 i DC 2.4 u odnosu na neinficirane stanice, što je u skladu s literaturom (Slika 15) (30). Izražaj molekula CD80 je viši na neinficiranim i inficiranim stanicama RAW264.7 tretiranim tripsinom ili EDTA u odnosu na stanice DC 2.4. Razina molekula CD80 je niža na stanicama tretiranim s otopinom EDTA u odnosu na stanice tretirane s otopinom tripsin, kod svih testiranih stanica. Rezultati dobiveni usporedbom razine molekula MHC I i m04 na fibroblastima (MEF i B12) i stanicama APC (RAW264.7 i DC 2.4) upućuju na to da je razina navedenim molekula veća kod stanica APC, u odnosu na fibroblaste te da je razina molekula MHC I i

m04 slična između testiranih fibroblasta, a razina molekula CD80 veća na stanicama RAW264.7 u odnosu na DC 2.4 .



Slika 15. Razina molekula CD80 veća je na neinficiranim i inficiranim stanicama RAW264.7 u odnosu na stanice DC 2.4. Grafički prikaz izražaja CD80 molekula na stanicama RAW264.7 i DC 2.4 tretiranim tripsinom ili EDTA u definiranom intervalu inkubacije (3, 5, 7 ili 10 minuta). Količina razine proteina je prikazana kao MFI_{uzorak}-$MFI_{izotipska\ kontrola}$. Fluorescencija je detektirana protočnim citometrom BD FACSAriaIIu, a rezultati analizirani softverom FlowJo.

5. RASPRAVA

Kako bi se stanice pasažirale ili koristile za bilo kakve druge manipulacije potrebno ih je prvo prikupiti. Prije prikupljanja adherentnih stanica, za razliku od stanica u suspenziji, potrebno je stanice odvojiti od podloge i prekinuti međustanične veze. Najčešće se to kidanje veza provodi tretmanom otopine s proteazom tripsinom. Iako se tim postupkom uglavnom uspješno dobiva suspenzija odvojenih stanica, sam tripsin može proteolitički djelovati na površinske proteine stanica te onemogućiti daljnju analizu ovih stanica putem tih površinskih proteina (20). Stoga istraživači često pribjegavaju korištenju otopine EDTA koja nema proteolitičke aktivnosti te se smatra da djeluje manje agresivno na stanice, ali je i postupak odvajanja stanica sporiji (30). Navedene otopine intenzivno se koriste i u istraživanjima u Centru za proteomiku za ispitivanje razine ekspresije molekula MHC I, m04 i CD80 na različitim stanicama s i bez infekcije MCMV-om. Stoga je upravo ispitivanje utjecaja ovih otopina na stanice te duljine inkubacije u njima bio predmet ovog diplomskog rada.

Prvo je analizirana osjetljivost molekula MHC I i m04 na stanicama fibroblasta – MEF i B12. Analizom na protočnom citometru pokazano je da testirane otopine ne utječu na stabilnost molekula MHC I i m04 kako na primarnim stanicama MEF tako i na imortaliziranoj staničnoj liniji B12, u testiranim intervalima inkubacije (3, 5, 7 i 10 minuta). Otpornost molekula MHC I i m04 na tretman tripsinom ili EDTA čak i tijekom najduljeg vremena inkubacije izuzetno je dobra vijest za naš laboratorij s obzirom na to da se B12 često koriste, a veoma teško se odljepljuju s podloge i međusobno. Međutim, pokazana je statistički neznačajna tendencija pada u razini testiranih molekula u 10. minuti na inficiranim stanicama B12 tretiranim otopinom tripsin ili EDTA. Stoga bi se stanice B12 trebale inkubirati s otopinom tripsin ili EDTA najduže 7 minuta. Osim toga, usporedbom razine molekula MHC I i m04 između stanica MEF i B12 primijećena je velika podudarnost u njihovom izražaj što ukazuje na to da imortalizirani B12 predstavljaju dobar model za proučavanje navedenih molekula kao i

primarne stanice MEF. Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da stanice MEF mogu biti inkubirane s otopinom tripsin ili EDTA 10 minuta, a stanice B12 7 minuta kako ne bi došlo do promjene u razini MHC I i m04, te da su stanice B12 dobar model za proučavanje navedenih molekula.

Drugi korak bila je analiza osjetljivosti molekula MHC I, m04 i CD80 na stanicama APC - RAW264.7 i DC 2.4. Za razliku od stanica MEF i B12, testirane molekule na stanicama RAW264.7 i DC 2.4 osjetljive su na duljinu inkubacije u otopini tripsin ili EDTA. Protočno-citometrijskom analizom stanica RAW264.7 pokazano je smanjenje u razini MHC I i m04 samo kod inficiranih stanica RAW264.7 nakon 10-minutne inkubacije u otopini EDTA. Stoga, vrijeme inkubacije otopine EDTA sa stanicama RAW264.7 ne bi trebalo biti duže od 5 minuta ili bi se trebala koristiti otopina tripsin kako ne bi došlo do promjene u izražaju testiranih molekula. Navedene stanice teško je odvojiti otopinom tripsin ili EDTA čak i nakon 10-minutne inkubacije, te se zbog toga koristila strugalica koja može uzrokovati oštećenje površinskih molekula stanica (24). Zbog toga bi se isti eksperiment trebao ponoviti, samo što bi se za odvajanje stanica, umjesto otopina za odvajanje, koristile strugalice. Za razliku od stanica RAW264.7, kod kojih izražaj CD80 nije bio izmijenjen utjecajem testiranih otopina, izražaj molekula CD80 bio je značajno snižen u 10. minuti kod neinficiranih i inficiranih DC 2.4 tretiranih s tripsinom. Zbog toga bi se stanice DC 2.4 trebale inkubirati 5 minuta s otopinom tripsin ili odvajati otopinom EDTA, koja ne utječe na izražaj CD80 molekula. Međutim, uočena je statistički neznačajna tendencija pada u razini svih testiranih molekula na inficiranim stanicama DC 2.4 tretiranih tripsinom, te bi zbog toga vrijeme inkubacije stanica u otopini tripsin trebalo biti najduže 5 minuta. Utjecaj na izražaj molekula MHC i m04 nije bio primijećen na stanicama DC 2.4. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da stanice RAW264.7 mogu biti inkubirane u otopini EDTA 5 minuta ili u otopini tripsin 10 minuta, te stanice DC 2.4 u otopini tripsin ili EDTA 5 minuta kako ne bi došlo do značajne promjene u razini MHC I, m04 i CD80.

Na kraju se usporedila razina molekula MHC I i m04 kod svih testiranih stanica te molekule CD80 kod stanica RAW264.7 i DC 2.4. Izražaj molekula MHC I bio je najviši na stanicama DC 2.4. Međutim, samo je molekula MHC I na stanicama DC 2.4 haplotipa H-2K^b, za razliku od ostalih ispitivanih stanica koje su haplotipa H-2D^d (37). Zbog toga je teško uspoređivati količinu dva različita alela molekula MHC I koristeći dva različita protutijela s različitim specifičnostima. Stoga je najviša razina molekula H-2D^d bila na stanicama RAW264.7 u usporedbi sa stanicama MEF i B12. Dakle, ispitivane RAW264.7 i DC 2.4 imale su veću razinu ekspresije MHC I, za razliku od ostalih testiranih stanica vjerojatno zbog toga što pripadaju profesionalnim stanicama APC. Profesionalne APC, osim molekula MHC I, izražavaju molekule MHC II i ko-stimulatorne molekule te imaju sposobnost prezentirati strane antigene stanicama T, što rezultira njihovim sazrijevanjem i aktivacijom (41). Nadalje, prijašnja istraživanja pokazala su da MCMV kodira virusne proteine m04 i MATp1 u stanicama, koji vežu mali broj molekula MHC I u endoplazmatskom retikulumu te stvaraju virusom izmijenjene MHC I komplekse koji odlaze na površinu stanice. Stvaranjem takvih kompleksa MCMV izbjegava odgovor stanica NK koje su osjetljive na promjene MHC I. Međutim, Železnjak i suradnici analizirali su samo stanice MEF, a ne i profesionalne antigen prezentirajuće stanice (37). U ovom radu uočena je veća razina m04, kao i MHC I, na stanicama RAW264.7 i DC 2.4 u odnosu na stanice MEF i B12, što znači da je vjerojatno i veći broj virusom promijenjenih MHC I molekula prisutan na površini tih stanica. Dakle, moguće je da se na površini MCMV-om inficiranih profesionalnih stanica APC nalazi veći broj m04/MATp1-promijenjenih MHC I molekula. Kakve to posljedice ima na imunosni odgovor, treba još ispitati. Nadalje, razina molekula CD80 bila je veća na RAW264.7 stanicama u odnosu na stanice DC 2.4 vjerojatno iz razloga jer se radi o različitom tipu stanica, makrofagima i dendritičkim stanicama. Osim toga, uspoređivale su se i same otopine za odvajanje koje su se koristile u eksperimentima te je pokazano da EDTA više djeluje na razinu MHC I, CD80 i m04 u odnosu na tripsin. Iako je u većini prijašnjih eksperimenata pokazano da EDTA

uzrokuje manje promjene u izražaju markera stanica nego tripsin, u ovom eksperimentu je pokazano suprotno (30). Daljnje analize su potrebne kako bi se razlučio navedeni fenomen. Ovi rezultati upućuju na to da je razina MHC I i m04 veća na stanicama RAW264.7 i DC 2.4 u odnosu na stanice MEF i B12 te da otopina EDTA ima veći utjecaj na testirane molekule u odnosu na otopinu tripsin.

Sveukupno, ovim istraživanjem pokazala sam da vrijeme inkubacije stanica MEF, B12, RAW264.7 i DC 2.4 u otopini za odvajanje može utjecati na smanjenje razine njihovih površinskih molekula. Zbog toga je bitno na vrijeme zaustaviti djelovanje otopina za odvajanje, kako se ne bi dobili netočni rezultati u budućim eksperimentima. Na temelju dobivenih rezultata predlažem da se odvajanje otopinom tripsin, koja je odabrana zbog bržeg i učinkovitijeg razdvajanja u odnosu na otopinu EDTA, provodi 10 minuta za stanice MEF i RAW264.7 te 7 minuta za stanice B12. Odvajanje otopinom EDTA 5 minuta predlažem za stanice DC 2.4, zbog boljeg odvajanja stanica u navedenoj otopini u odnosu na tripsin. Osim toga, pokazala sam da je razina MHC I i m04 veća na RAW264.7 i DC 2.4 stanicama u odnosu na stanice MEF i B12, što prije nije bilo poznato u literaturi te su potrebna daljnja istraživanja ove opservacije.

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedena je analiza osjetljivosti molekula MHC I, m04 i CD80 na tretman stanica tripsinom ili EDTA, u vremenu inkubacije 3, 5, 7 i 10 minuta. Osim toga, usporedila se i površinska ekspresija navedenih molekula između svih testiranih stanica. Dobiveni su sljedeći rezultati:

1. na stanicama MEF i B12 izražaj molekula MHC I i m04 neovisan je o vremenu inkubacije otopina;
2. na inficiranim stanicama RAW264.7 pokazano je značajno smanjenje u razini molekula MHC i m04 nakon 10-minutne inkubacije u otopini EDTA, u odnosu na inkubaciju u otopini tripsin;
3. izražaj molekula CD80 na RAW264.7 neovisan je o vremenu inkubacije otopina;
4. na neinficiranim i inficiranim stanicama DC 2.4 razina molekula CD80 značajno je snižena nakon 10-minutne inkubacije s otopinom tripsin, u odnosu na inkubaciju u otopini EDTA;
5. razina molekula MHC I i m04 na DC 2.4 neovisna je o vremenu inkubacije otopina;
6. izražaj MHC I i m04 na stanicama RAW264.7 i DC 2.4 veći je u odnosu na stanice MEF i B12.

Dobiveni rezultati ukazuju na to da je bitno na vrijeme zaustaviti djelovanje otopina tripsin i EDTA kako bi se dobili točni i pouzdani rezultati u budućim eksperimentima. Stoga predlažem da se prilikom odvajanja stanica od podloge korištenjem otopine tripsin ili EDTA koriste ova vremena inkubacije:

- 10 minuta otopinom tripsin za stanice MEF i RAW264.7;
- 7 minuta otopinom tripsin za stanice B12;
- 5 minuta otopinom EDTA za stanice DC 2.4.

7. LITERATURA

1 Hudu SA, Alshrari AS, Syahida A, Sekawi Z. Cell culture, technology: Enhancing the culture of diagnosing human diseases. *J Clin Diagnostic Res* 2016; **10**: DE01–DE05.

2 Jedrzejczak-Silicka M. History of Cell Culture. *New Insights into Cell Cult Technol* 2017; 1–42.

3 Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I *et al.* Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer* 2014; **111**: 1021–1046.

4 Stacey G. Primary Cell Cultures and Immortal Cell Lines. *Encycl Life Sci* 2006; 1–6.

5 Pamies D, Bal-Price A, Chesné C, Coecke S, Dinnyes A, Eskes C *et al.* Advanced Good Cell Culture Practice for human primary, stem cell-derived and organoid models as well as microphysiological systems. *ALTEX* 2018; **35**: 353–378.

6 Kumar V. Animal cells as host [Internet]. 2016 [cited 2020 Jul 15]. Available from: https://www.academia.edu/12574409/Animal_cells_as_host.

7 Duesberg P, McCormack A. Immortality of cancers: A consequence of inherent karyotypic variations and selections for autonomy. *Cell Cycle* 2013; **12**: 783–802.

8 Kaur G, Dufour JM. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* 2012; **2**: 1–5.

9 Otero M, Favero M, Dragomir C, Hachem K El, Hashimoto K, Plumb DA *et al.* Human Cell Culture Protocols. 2012; **806**: 301–336.

10 Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V *et al.* 2018_ArchMedSci_2D and 3D cell cultures – a comparison of different.pdf. *Arch Med Sci* 2016; **14**: 910–919.

11 Seluanov A, Hine C, Azpurua J, Feigenson M, Bozzella M, Mao Z *et al.* Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 19352–19357.

12 Khalili AA, Ahmad MR. A Review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *Int J Mol Sci* 2015; **16**: 18149–18184.

13 Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. *Molecular biology of the cell*. 2002.

14 Preedy VR. *Adhesion molecules*. 2016.

15 Goodwin K, Lostchuck EE, Cramb KML, Zulueta-Coarasa T, Fernandez-Gonzalez R, Tanentzapf G. Cell-cell and cell-extracellular matrix adhesions cooperate to organize actomyosin networks and maintain force transmission during dorsal closure. *Mol Biol Cell* 2017; **28**: 1301–1310.

16 Pörtner R, Jandt U, Zeng AP. *Cell culture technology* [Internet]. 2016 [cited 2020 Jul 20]. Available from: doi:10.1002/9783527807833.

17 Rei Sekiguchi KMY. Basement membranes in development and disease Rei. *Physiol Behav* 2018; **176**: 100–106.

18 Ryan JA. Evolution of Cell Culture Surfaces. *BioFiles* 2008; **21**: 8–11.

19 Salzig D, Schmiermund A, P. Grace P, Elseberg C, Weber C, Czermak P. Enzymatic Detachment of Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells Grown on Glass Carriers in a Bioreactor. *Open Biomed Eng J* 2014; **7**: 147–158.

20 Heng BC, Cowan CM, Basu S. Comparison of enzymatic and non-enzymatic means of dissociating adherent monolayers of mesenchymal stem cells. *Biol Proced Online* 2009; **11**: 161–169.

21 Garg A, Houlihan DD, Aldridge V, Suresh S, Li KK, King AL *et al.* Non-enzymatic dissociation of human mesenchymal stromal cells improves chemokine-dependent migration and maintains immunosuppressive function. *Cytotherapy* 2014; **16**: 545–559.

22 Perutka Z, Sebela M. Pseudotrypsin: A little-known trypsin proteoform [Internet]. *Molecules* 2018 [cited 2020 Augl 2]; **23**. Available from: doi:10.3390/molecules23102637.

23 Centre EM, Ziekenhuis T, Centre AM, Veen F Van Der, Medical M, Steures P. Unconventional serine proteases: Variationson the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Sci* 2008; **17**: 2023–2037.

24 Tsuji K, Ojima M, Otabe K, Horie M, Koga H, Sekiya I *et al.* Effects of different

cell-detaching methods on the viability and cell surface antigen expression of synovial mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 2017; **26**: 1089–1102.

25 Mótyán J, Tóth F, Tőzsér J. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules* 2013; **3**: 923–942.

26 Kurashina Y, Imashiro C, Hirano M, Kuribara T, Totani K, Ohnuma K *et al.* Enzyme-free release of adhered cells from standard culture dishes using intermittent ultrasonic traveling waves. *Commun Biol* 2019; **2**: 1–11.

27 Brown MA, Wallace CS, Anamelechi CC, Clermont E, Reichert WM, Truskey GA. The use of mild trypsinization conditions in the detachment of endothelial cells to promote subsequent endothelialization on synthetic surfaces. *Biomaterials* 2007; **28**: 3928–3935.

28 Mohammadi Z, Shalavi S, Jafarzadeh H. Ethylenediaminetetraacetic acid in endodontics [Internet]. *Eur J Dent* 2013 [cited 2020 Aug 25]; **7**. Available at: doi:10.4103/1305-7456.119091.

29 Banfi G, Salvagno GL, Lippi G. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clin Chem Lab Med* 2007; **45**: 565–576.

30 Corver WE, Cornelisse CJ, Hermans J, Fleuren GJ. Limited loss of nine tumor-associated surface antigenic determinants after tryptic cell dissociation. *Cytometry* 1995; **19**: 267–272.

31 Villas BH. Flow cytometry: an overview. *Cell Vis* 1998; **5**: 56–61.

32 Wang L, Gaigalas AK, Yan M. Chapter 3 Quantitative Fluorescence Measurements. *Flow Cytom Protoc Methods Mol Biol* 2011; **699**: 53–65.

33 Marti GE, Stetler-Stevenson M, Bleesing JJH, Fleisher TA. *Introduction to flow cytometry* [Internet]. 2001 [cited 2020 Aug 15]. Available from: doi:10.1053/shem.2001.21921.

34 Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 2017; **37**: 163–176.

35 Shellam GR, Redwood AJ, Smith LM, Gorman S. Murine Cytomegalovirus and Other Herpesviruses. *Mouse Biomed Res* 2007; **2**: 1–48.

36 Seitz R. Human Cytomegalovirus (HCMV)-Revised. *Transfus Med Hemotherapy* 2010; **37**: 365–375.

37 Železnjak J, Lisnić VJ, Popović B, Lisnić B, Babić M, Halenius A *et al.* The complex of MCMV proteins and MHC class I evades NK cell control and drives the evolution of virus-specific activating Ly49 receptors. *J Exp Med* 2019; **216**: 1809–1827.

38 Ahmed A. Antiviral Treatment of Cytomegalovirus Infection. *Infect Disord - Drug Targets* 2012; **11**: 475–503.

39 Smith CJ, Quinn M, Snyder CM. CMV-specific CD8 T cell differentiation and localization: Implications for adoptive therapies. *Front Immunol* 2016; **7**: 1–8.

40 Margulies DH, Revilleza MJ, Wang R, Mans J, Hong M, Natarajan K. How the virus outsmarts the host: Function and structure of cytomegalovirus MHC-I-like molecules in the evasion of natural killer cell surveillance [Internet]. *J Biomed Biotechnol* 2011 [cited 2020 Aug 29]; **2011**. Available from: doi:10.1155/2011/724607.

41 Halenius A, Gerke C, Hengel H. Classical and non-classical MHC i molecule manipulation by human cytomegalovirus: So many targets - But how many arrows in the quiver? *Cell Mol Immunol* 2015; **12**: 139–153.

42 Grigoleit U, Riegler S, Einsele H, Sampaio KL, Jahn G, Hebart H *et al.* Human cytomegalovirus induces a direct inhibitory effect on antigen presentation by monocyte-derived immature dendritic cells. *Br J Haematol* 2002; **119**: 189–198.

43 Babić M, Pyzik M, Zafirova B, Mitrović M, Butorac V, Lanier LL *et al.* Cytomegalovirus immunoevasin reveals the physiological role of 'missing self' recognition in natural killer cell dependent virus control in vivo. *J Exp Med* 2010; **207**: 2663–2673.

44 Amand MM, Hanover JA, Shiloach J. A comparison of strategies for immortalizing mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Methods* 2016; **3**: 41.

45 Raschke WC, Diego S, Baird S, Jolla L. Functional Macrophage Cell Lines Transformed by Abelson Leukemia Virus [Internet]. 1978 [cited 2020 Sep

2]. Available from: doi:10.1016/0092-8674(78)90101-0.

46 Z Shen, G Reznikoff GD and KLR. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *Sci Rep* 1997; **9**: 1–9.

47 Jordan S, Krause J, Prager A, Mitrovic M, Jonjic S, Koszinowski UH *et al.* Virus Progeny of Murine Cytomegalovirus Bacterial Artificial Chromosome pSM3fr Show Reduced Growth in Salivary Glands due to a Fixed Mutation of MCK-2. *J Virol* 2011; **85**: 10346–10353.

48 Borst E-M, Hahn G, Koszinowski UH, Messerle M. Cloning of the Human Cytomegalovirus (HCMV) Genome as an Infectious Bacterial Artificial Chromosome in Escherichia coli: a New Approach for Construction of HCMV Mutants. *J Virol* 1999; **73**: 8320–8329.

49 Voskuil JLA. The challenges with the validation of research antibodies. *F1000Research* 2017; **6**: 1–9.

50 Fuertes Marraco SA, Grosjean F, Duval A, Rosa M, Lavanchy C, Ashok D *et al.* Novel murine dendritic cell lines: A powerful auxiliary tool for dendritic cell research [Internet]. *Front Immunol* 2012 [cited 2020 Sep 10]; **3**. Available from: doi:10.3389/fimmu.2012.00331.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE

Patricija Bajt

(385) 95 721 0996

patricija.bajt9@gmail.com

Bana Emerika Derenčina 2, 34 000 Požega (Hrvatska)

RADNO ISKUSTVO

Praktikantica

Institut za transfuzijsku medicinu i hematologiju [01/08/2019 – 27/09/2019]

Mjesto: Frankfurt na Majni

Zemlja: Njemačka

Rad na projektu "Assessment of stem cell mobility", mentor prof. dr.sc. Richard Schäfer

Praktikantica

Centar za proteomiku i Zavod za histologiju i embriologiju [04/12/2019 – 10/07/2020]

Mjesto: Medicinski fakultet, Rijeka

Zemlja: Hrvatska

Eksperimentalni dio izrade diplomskog rada "Ispitivanje utjecaja otopina tripsin i EDTA na stabilnost površinskih biljega stanica MEF, B12, RAW264.7 i DC 2.4 u različitim vremenskim intervalima", mentorica doc. dr. sc. Vanda Juranić Lisnić

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

Studentica diplomskog studija "Biotehnologija u medicini"

Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci [2019 – Trenutačno]

Rijeka (Hrvatska)

Sveučilišna prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova

Sveučilište u Rijeci [20/07/2015 – 20/09/2018]

Rijeka (Hrvatska)

Razina Europskoga kvalifikacijskog okvira : razina 6 EKO-a

Srednja stručna sprema

Gimnazija Požega [2011 – 2015]

Požega (Hrvatska)

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: **Hrvatski**

Engleski

RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
C1	C1	C1	C1	C1

LABORATORIJSKE VJEŠTINE

Uzgoj staničnih kultura (imortaliziranih staničnih linija i primarnih stanica) *in vitro*, imunomagnetska separacija, migracijski esej, FACS analiza,*in vitro* infekcija stanica, bojanje stanica s protutijelima, testiranje protutijela, testiranje stanica na osjetljivost antibiotika

KOMUNIKACIJSKE I MEĐULJUDSKE VJEŠTINE

Sklona timskom radu, komunikativna

DIGITALNA KOMPETENCIJA

Dobro poznavanje paketa Microsoft Office™.

Osnovne vještine u statističkom programu Statistica.

Osnovne vještine u programima povezanima s molekularnom mehanikom i modeliranjem: UCSF Chimera, PyMol, Avogadro, Spark, VMD.

PROJEKTI

"DVD pokusi za državnu maturu" 2018.

"Ljetna škola kemije SOBRI" 2017.

"Studenti mentori" 2016.-2018.

STIPENDIJA

Stipendist Grada Požege 2018-2020.