



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

TÜRK BİYOKİMYA DERNEĞİ LABORATUVAR YÖNETİMİ SEMPOZYUMU
KALİTE - STANDARDİZASYON - AKREDİTASYON

JC Poliomavirus'un Agno Proteini Enfekte Hücreler Tarafından Salgılanır: Enfekte Olmayan Komşu Hücreler Tarafından Hücre İçine Alınımın Kanıtlanması

Önder OTLU-18 Ekim 2014



Contents lists available at ScienceDirect

Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yviro



Brief Communication

The agnoprotein of polyomavirus JC is released by infected cells: Evidence for Its cellular uptake by uninfected neighboring cells

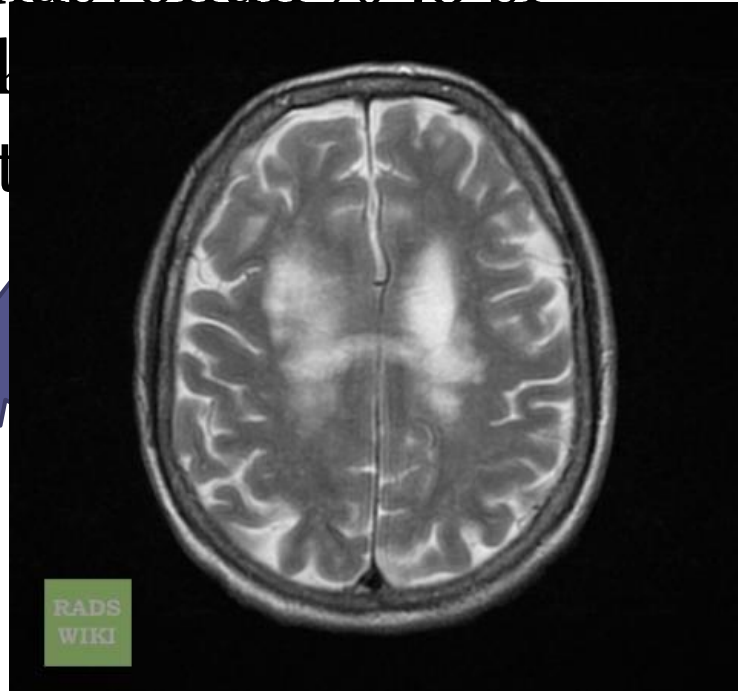


Onder Otlu¹, Francesca Isabella De Simone¹, Yolanda-Lopez Otalora, Kamel Khalili, Ilker Kudret Sariyer*

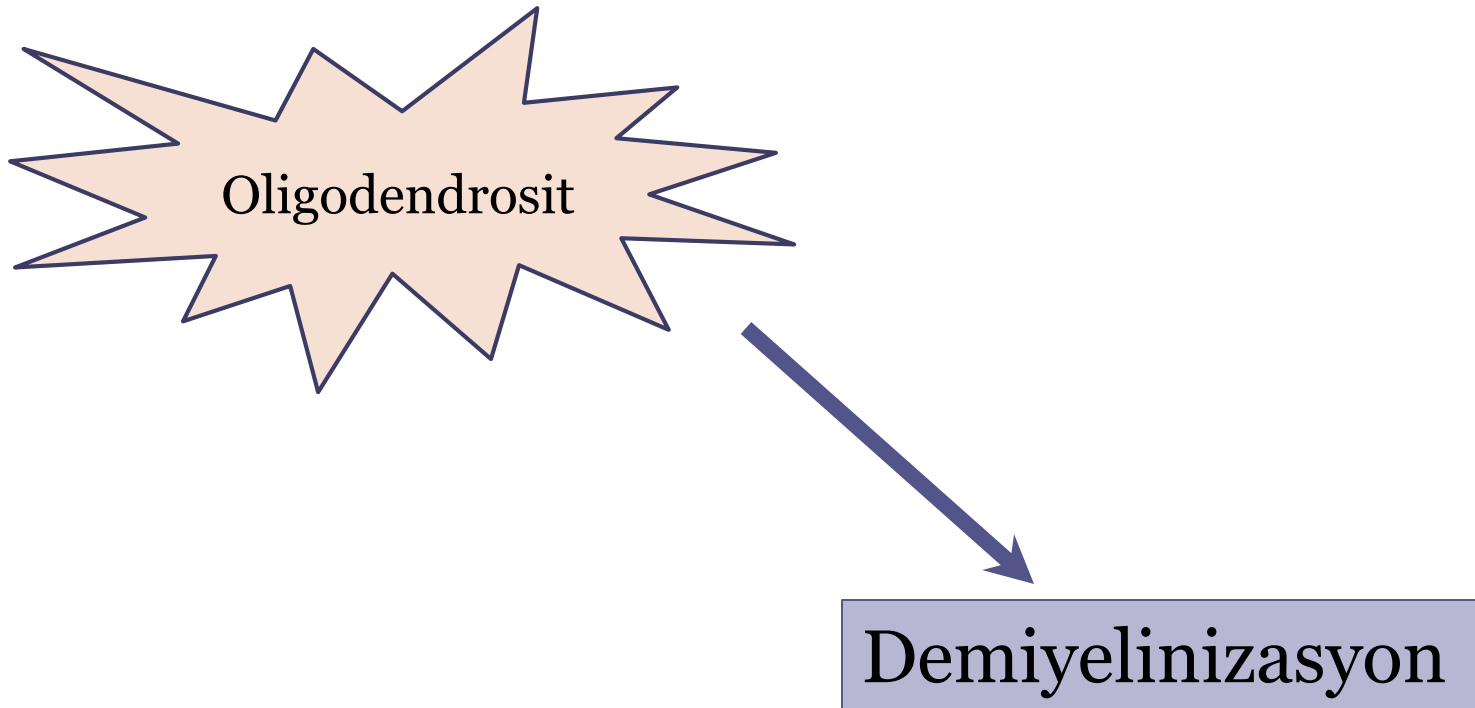
Department of Neuroscience, Center for Neurovirology, Temple University School of Medicine, 3500 North Broad Street, 7th Floor, Philadelphia, PA 19140 USA

GİRİŞ

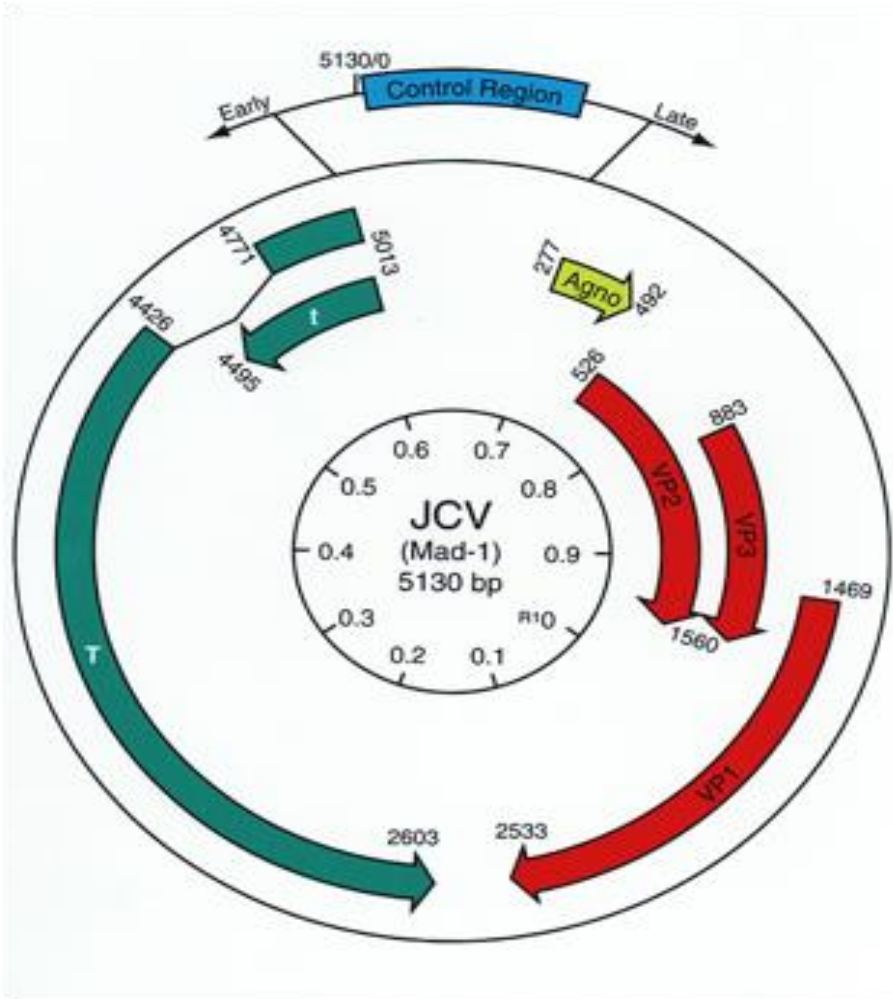
- JC virus (JCV), popülasyonun %50'si enfeksiyonu çocukluk
- Sağlıklı bireylerde lat
- İmmun sistem
- Glial hücreler
- Progresif Multifokal Lökoensefalopati (PML)



Progresif Multifokal Lökoensefalopati (PML)



JCV (John Cunningham Virus)



- Non-coding kontrol bölgesi
- Early ve Late kodlama bölgeleri

Agno Protein (71aa)

- T-antijeninin replikasyon orijinine bağlanmasını artırır.
- Sitoplazmik ve peri nükleer alanda lokalizasyon
- Endoplazmik retikulumda viroporin olarak işlev
- Agno (-) mutant JCV çoğalamıyor.

Neden Agno Protein?

- Basit yapısı
- Perinükleer alanda ve E.R'da lokalizasyonu
- Hücre içi lipid membranlarla ilişkisi

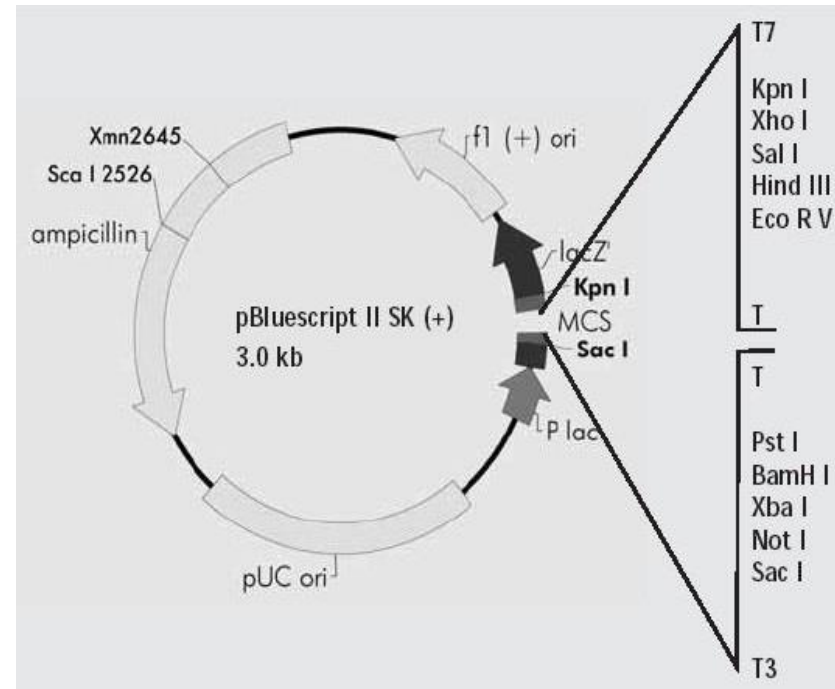
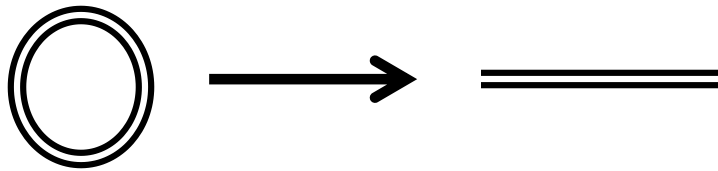
- Sonuçlarımız;
 - İnfekte kültürlerde hücresiz süpernatant fraksiyonunda (Media)
 - Viral litik infeksiyon olmaksızın agnoprotein sentezleyen glial hücre serilerinde

Ekstraselüler agno proteinin varlığını göstermiştir.

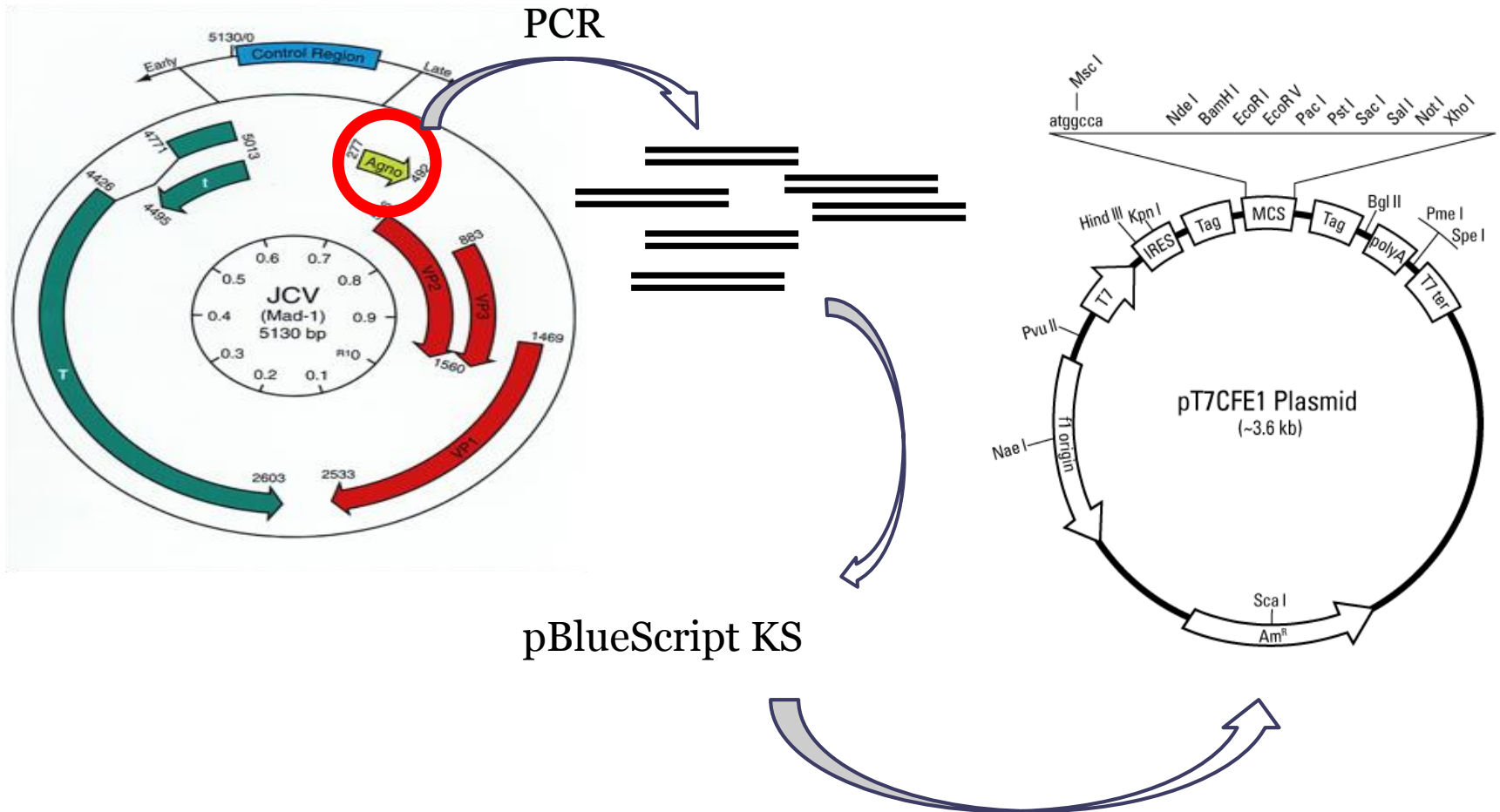
MATERYAL ve METOD

JCV Genomik suşları, Plazmid yapılar

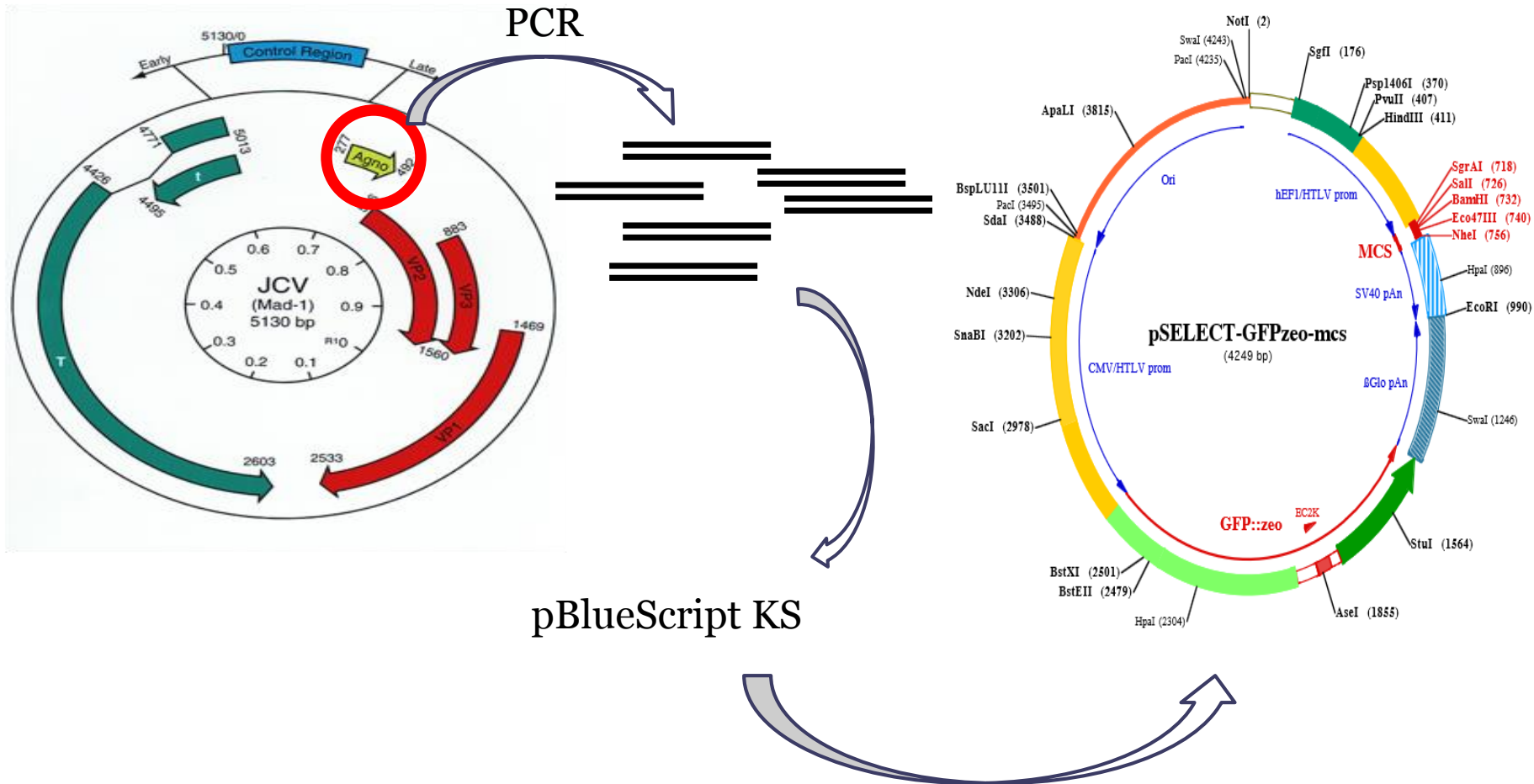
Mad1 + BamH I →



- pCGT7-Agno Vektör;

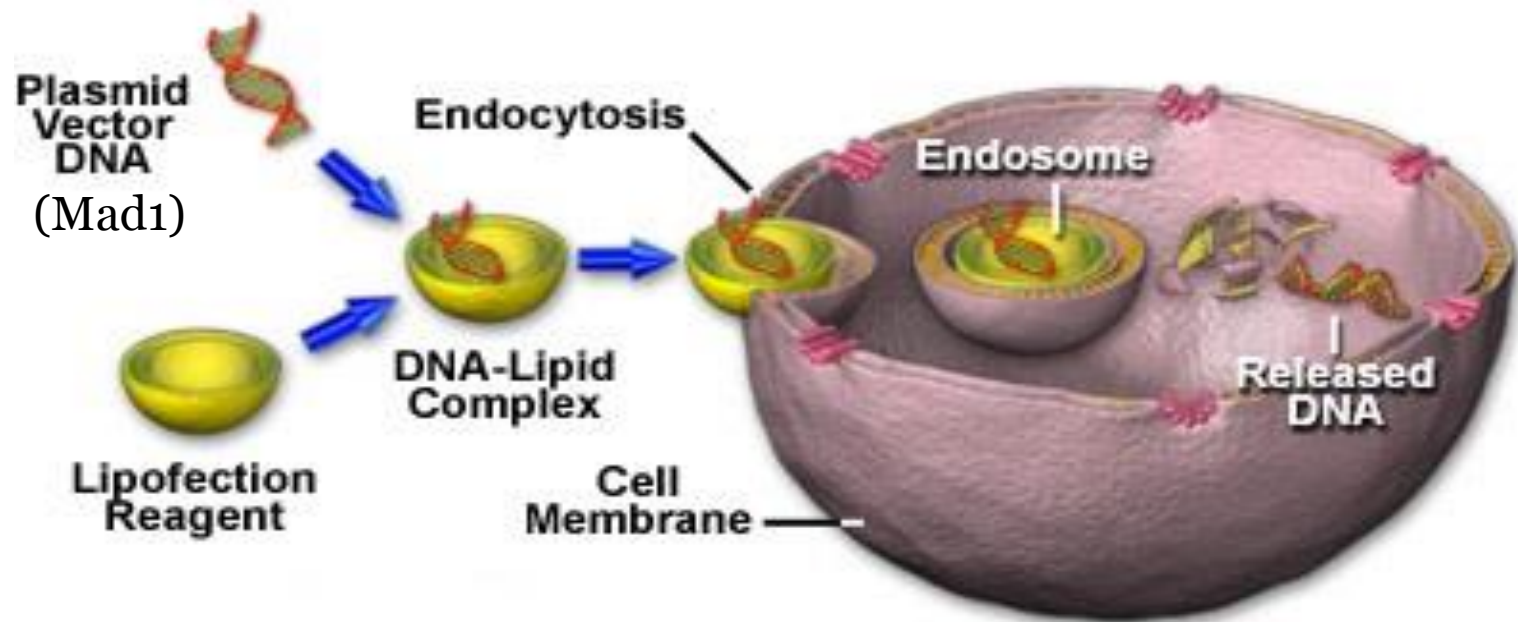


- pSELECT-GFPzeo-Agno Vektör;

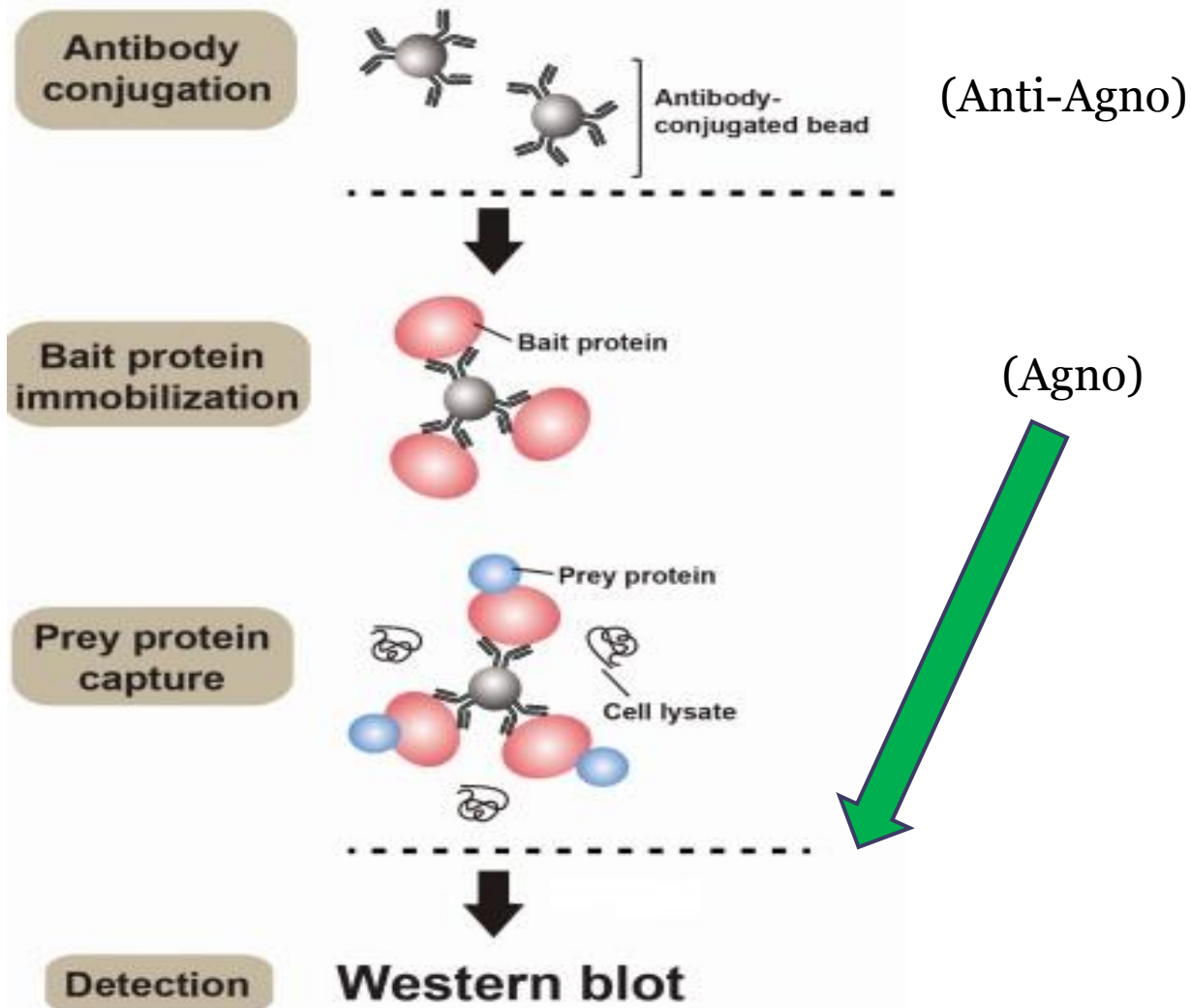


JCV Enfeksiyonu

- Transfection/İnfection

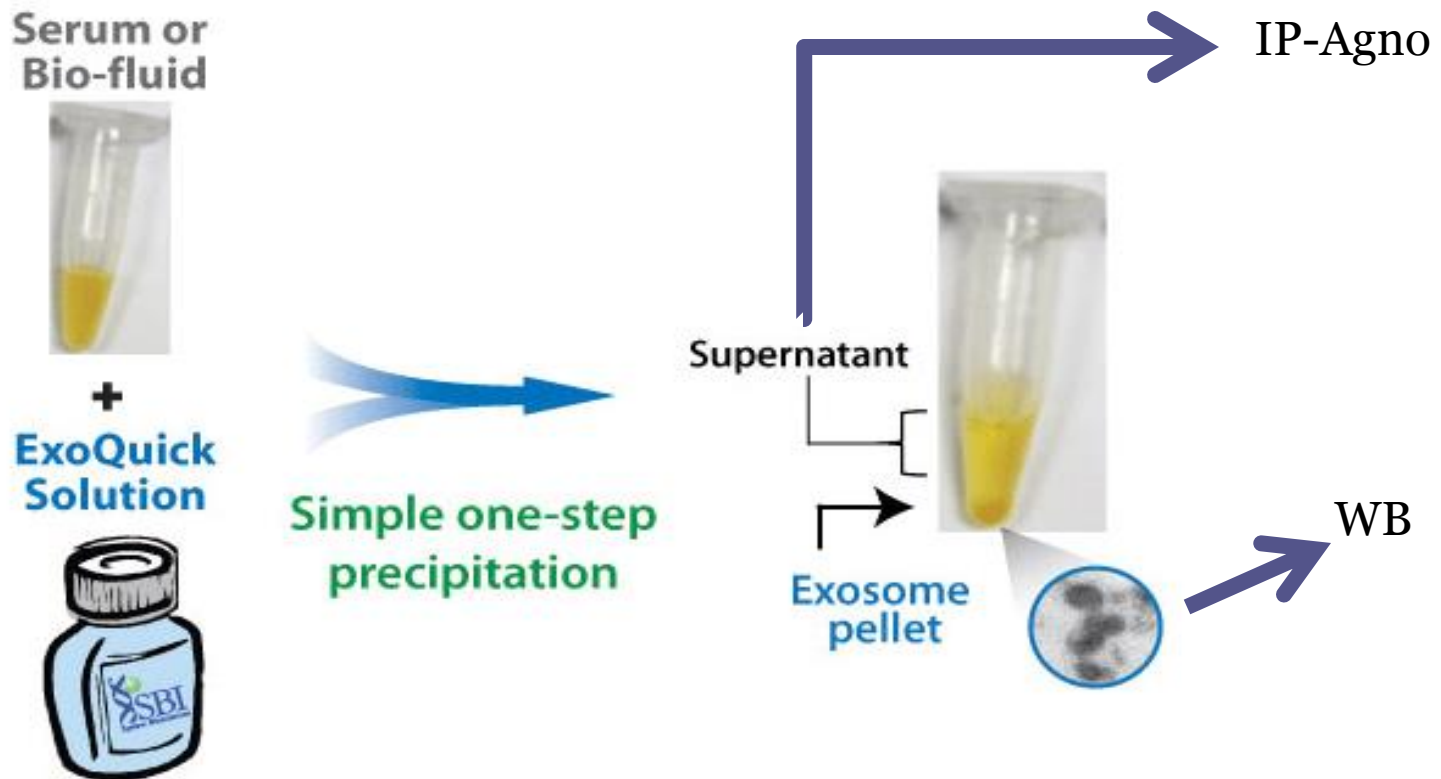


Immunoprecipitation (IP)



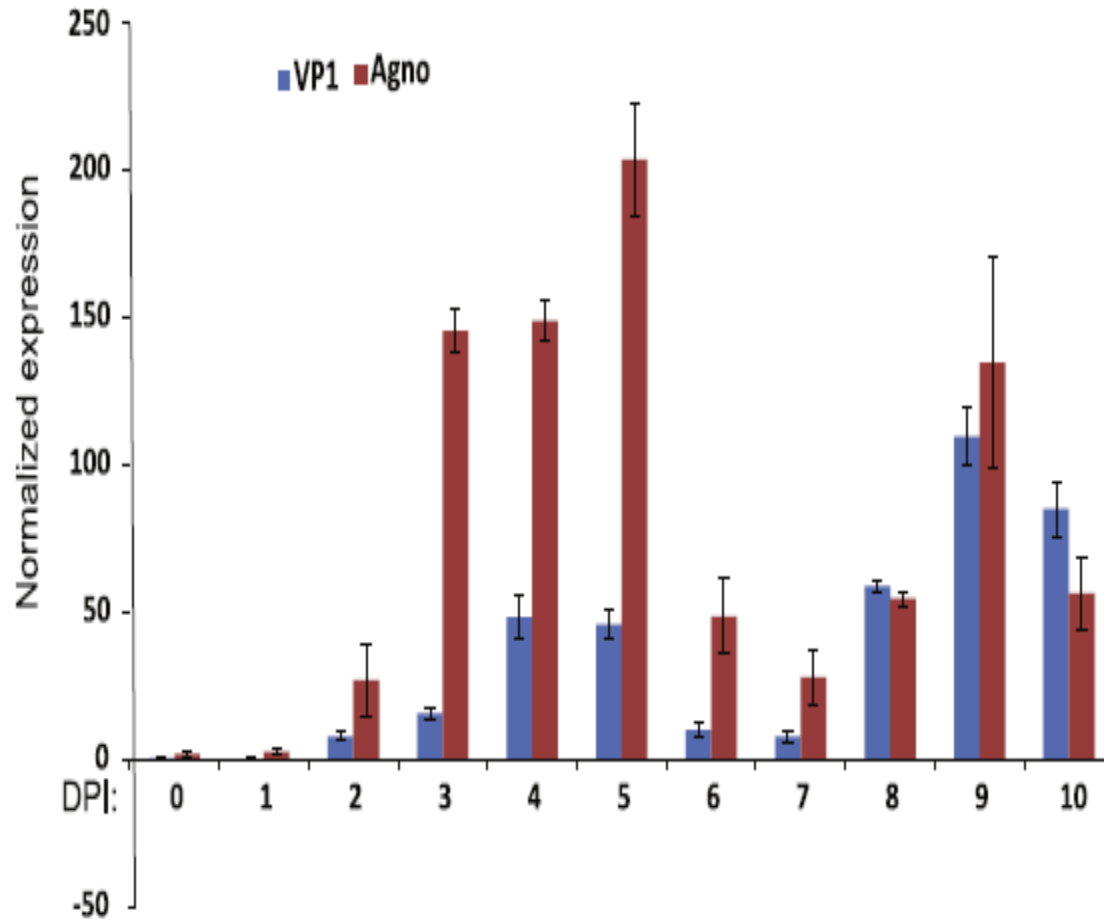
Eksozom Saflaştırma

- ExoQuick eksozom çöktürücü solüsyon,



- 10 gün boyunca 24 saat aralıklarla media ve protein ekstraktları toplandı.
- 4dpi ve 8 dpi'da 5ml media eklendi.
- Protein Ekstraktları → WB
- Media → IP ve Q-PCR

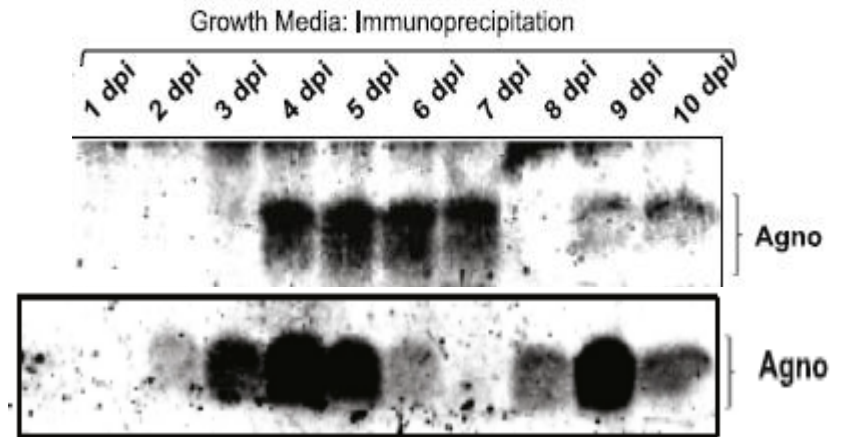
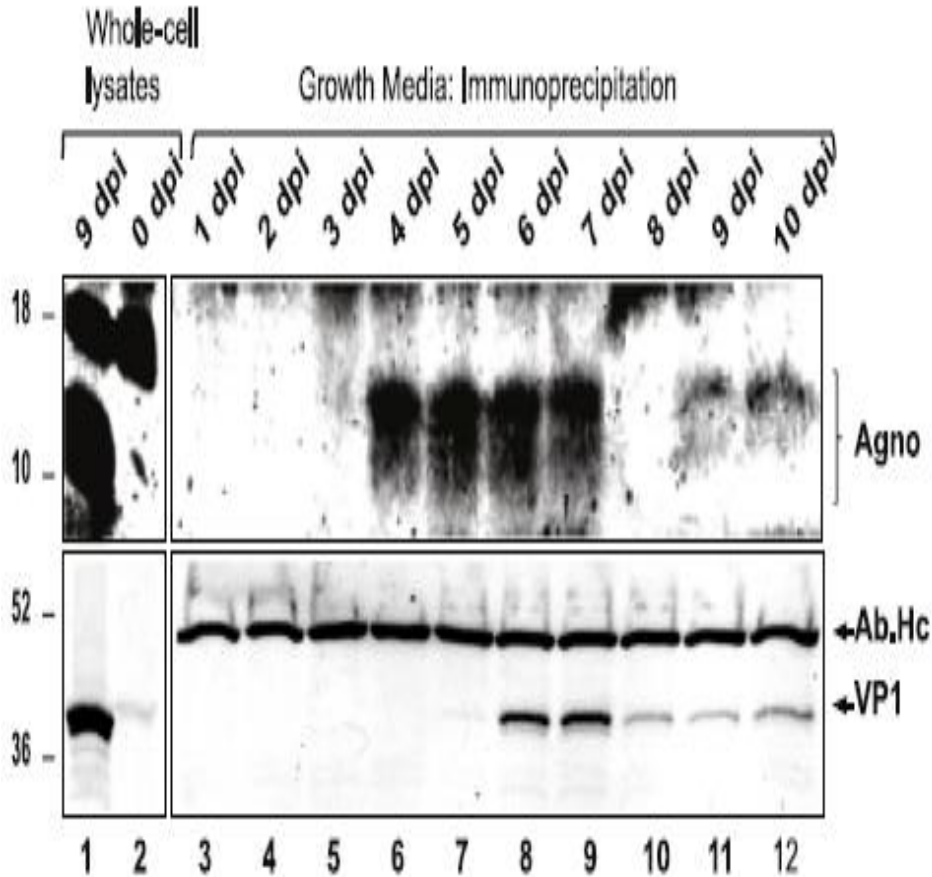
SONUÇLAR



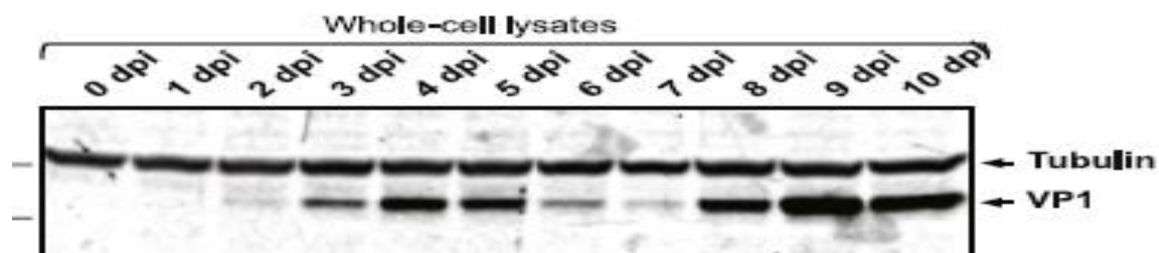
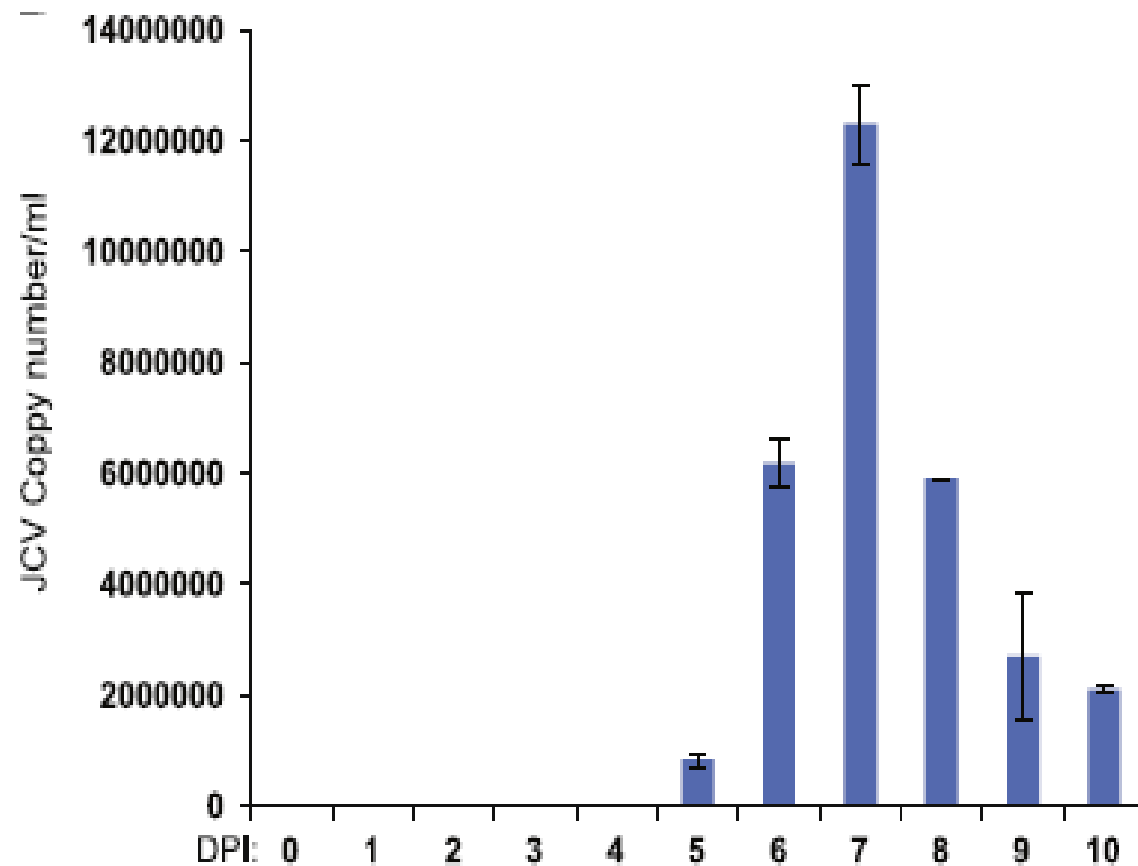
- SVG-A
- Mad1
Transfection/Infection
- 2dpi
- 4 dpi
- 6-7 dpi
- 9- 10 dpi

Agnoprotein Hücre İçi Sentez Dinamiğinin Belirlenmesi

- Enfeksiyon sonrası media toplandı
- IP-Agno
- 4 dpi
- 6-7 dpi
- 8 dpi

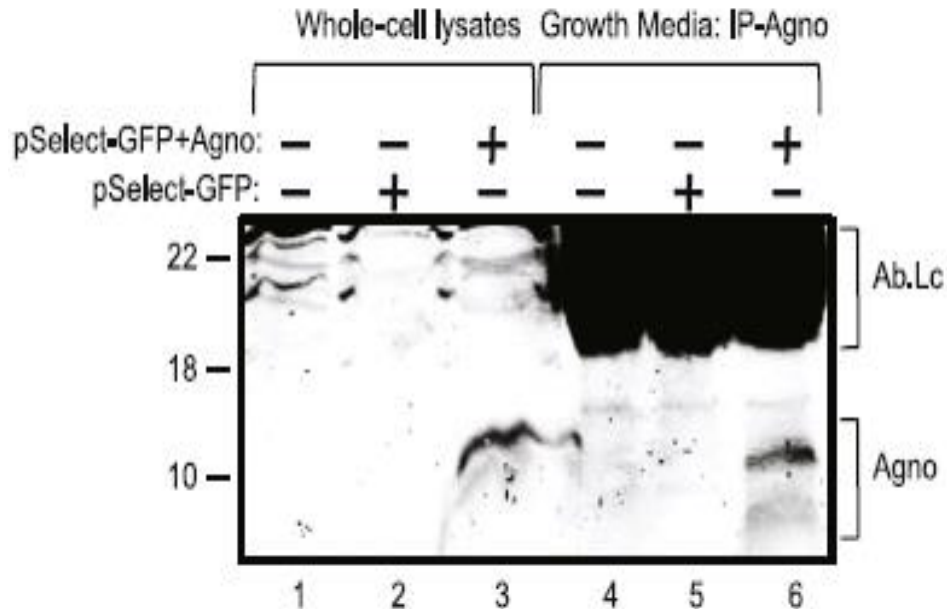


Agnoprotein Hücre Dışı Salınımının Belirlenmesi



- Bu sonuçlar, enfekte hücrelerden mediaya **agnoprotein salınımının JCV litik yaşam döngüsünden önce** olduğunu göstermiştir.

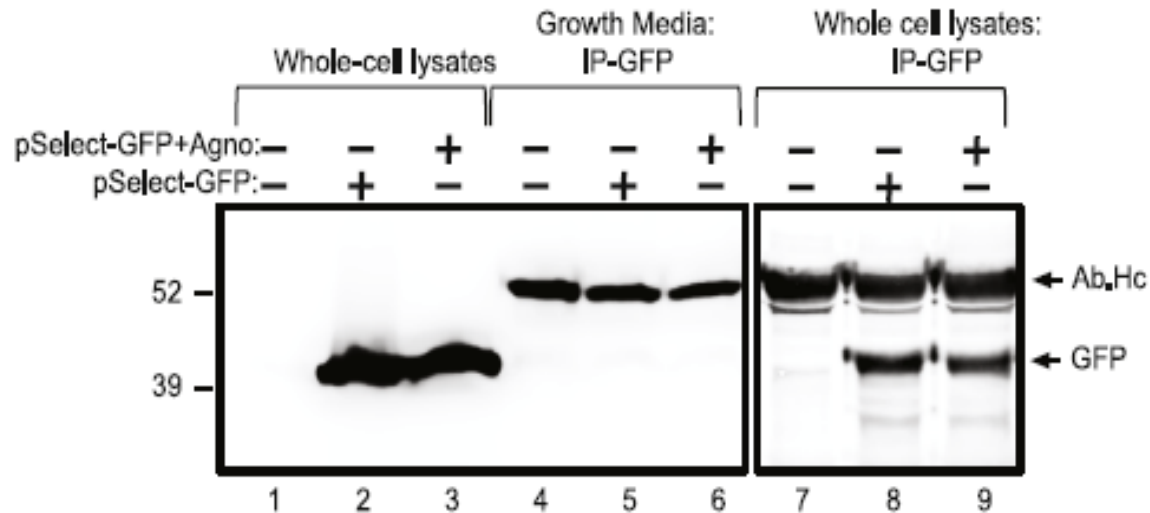
• LİTİK ENFEKSİYON?



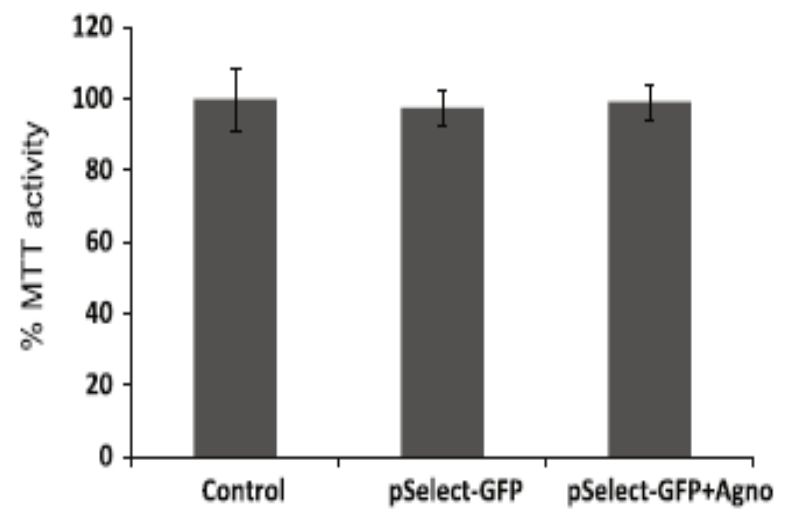
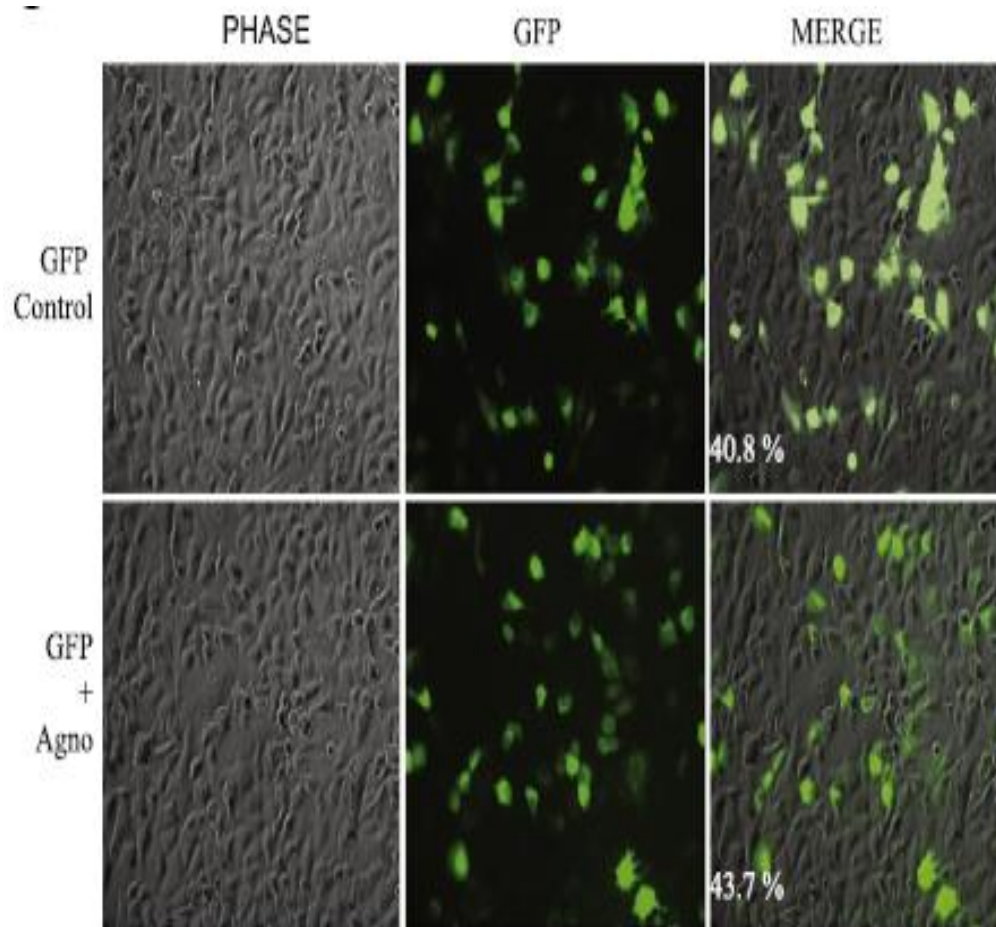
•T98G

•pSELECT-GFPzeo

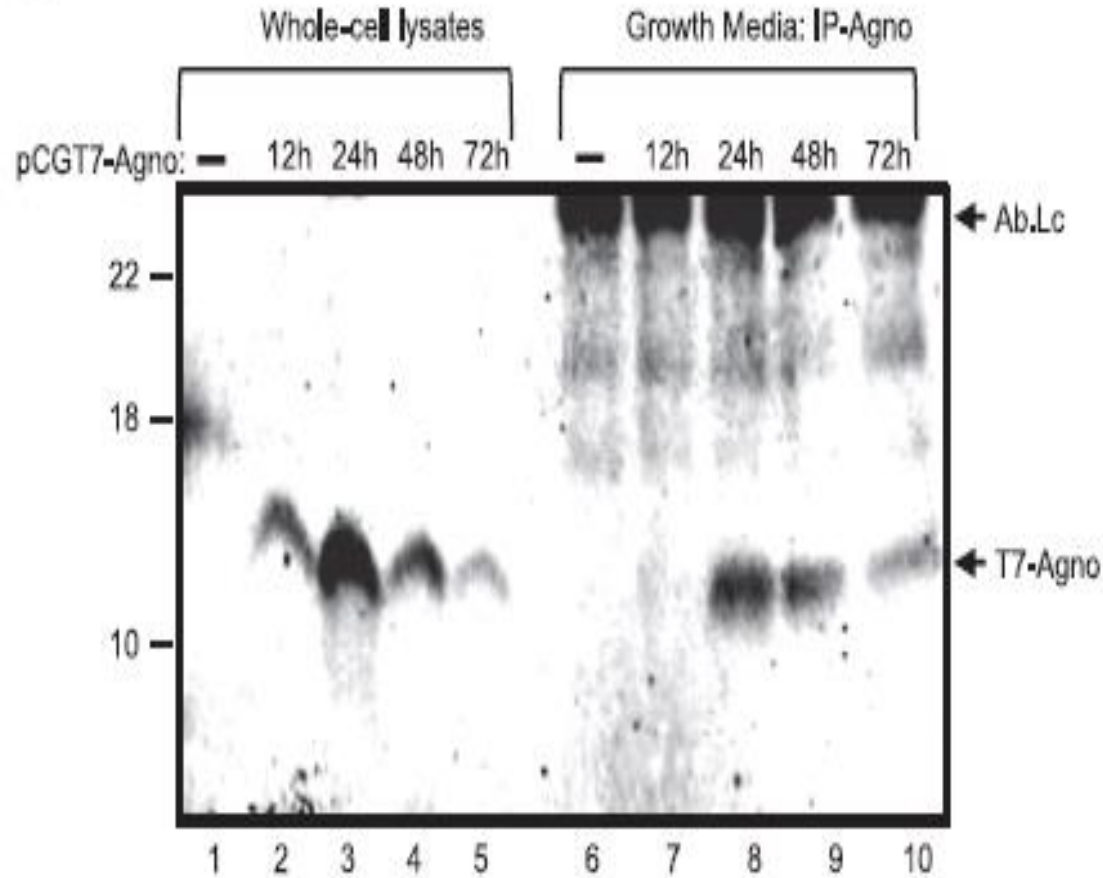
•48 saat



Agnoprotein Salınımında Hücresel Lizisin Rolünün Araştırılması



- Agnoprotein ve GFP aynı plazmid yapıdan eksprese edilmesine rağmen,
 - hücre dışı fraksiyonlarda sadece agnoprotein'e rastlanması
 - GFP bulaşısı olmaması
- agnoprotein'in glial hücrelerden salındığını düşündürmektedir.



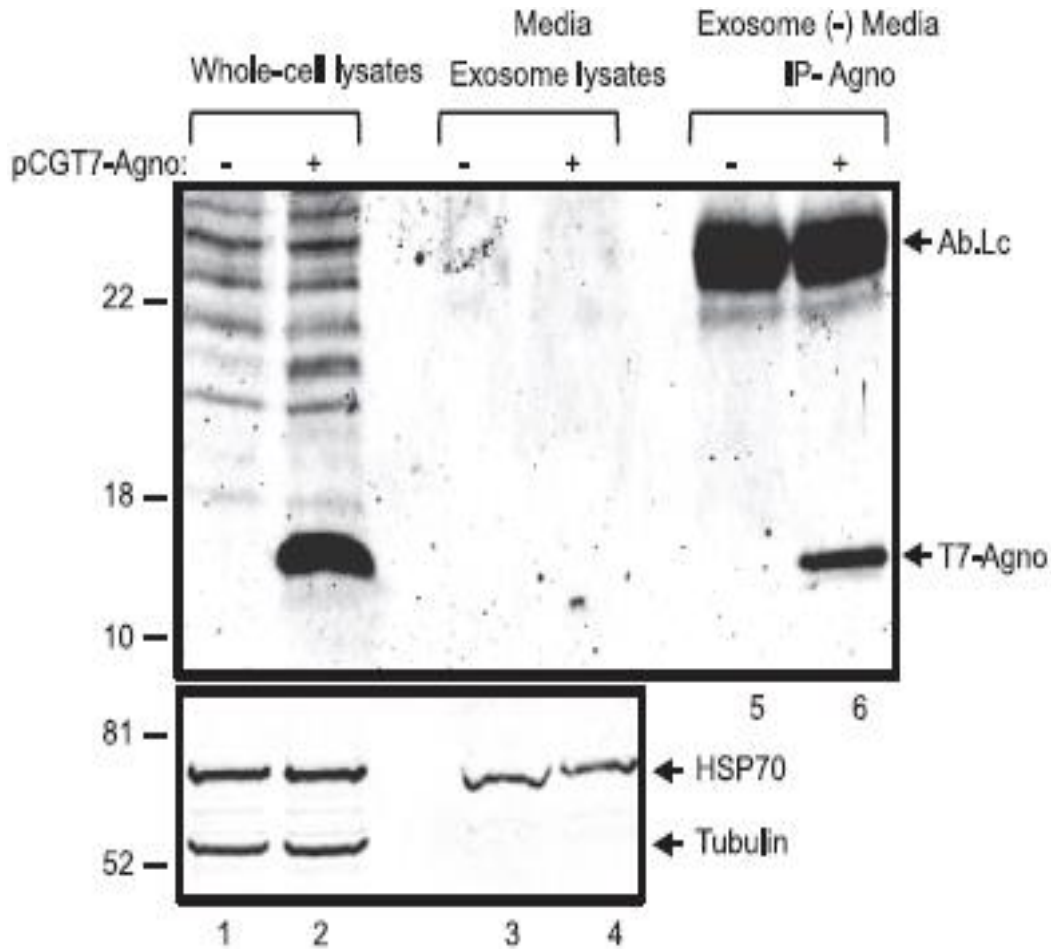
- T98G

- pCGT7

- 12, 24, 48, 72
saat

- WB, IP

Agnoprotein Salınımının T7 Antikorlarla Doğrulanması



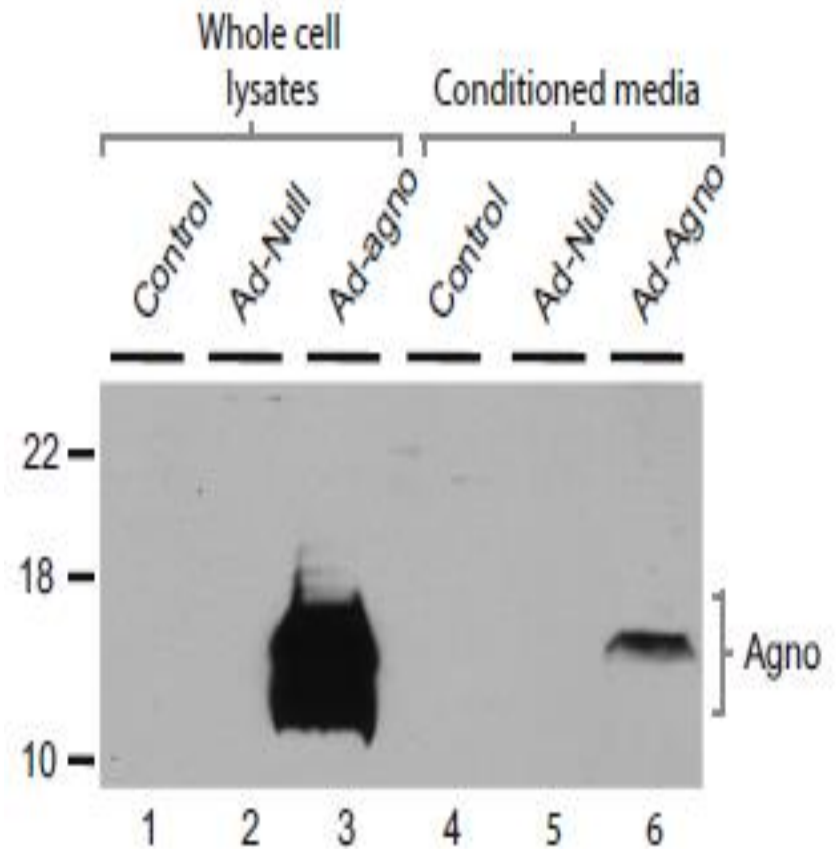
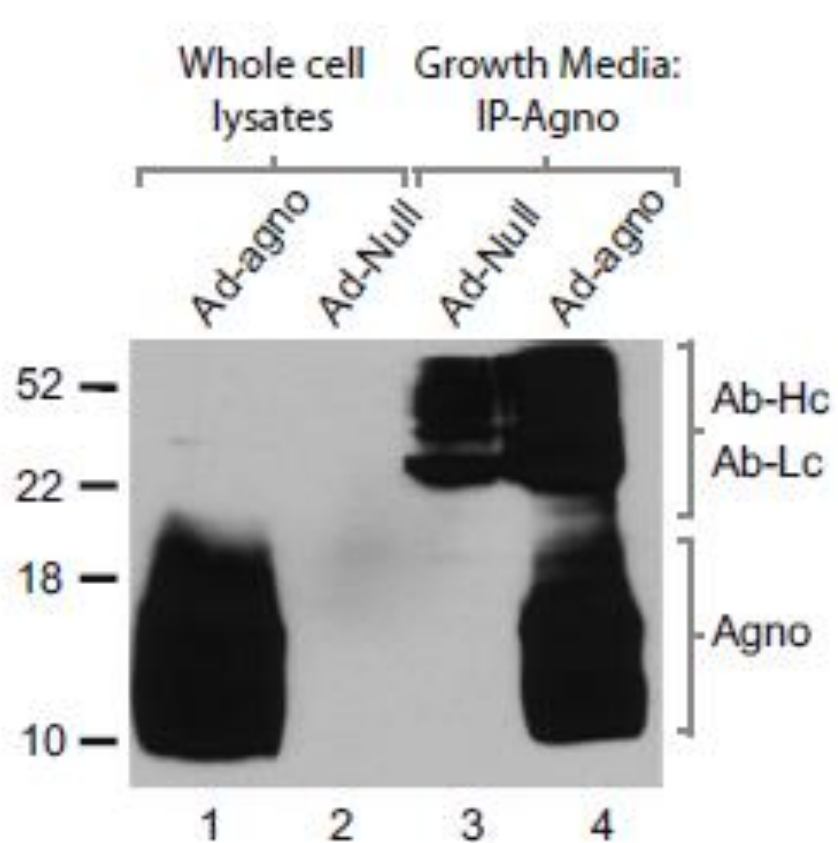
•T98G

•pCGT7-Agno

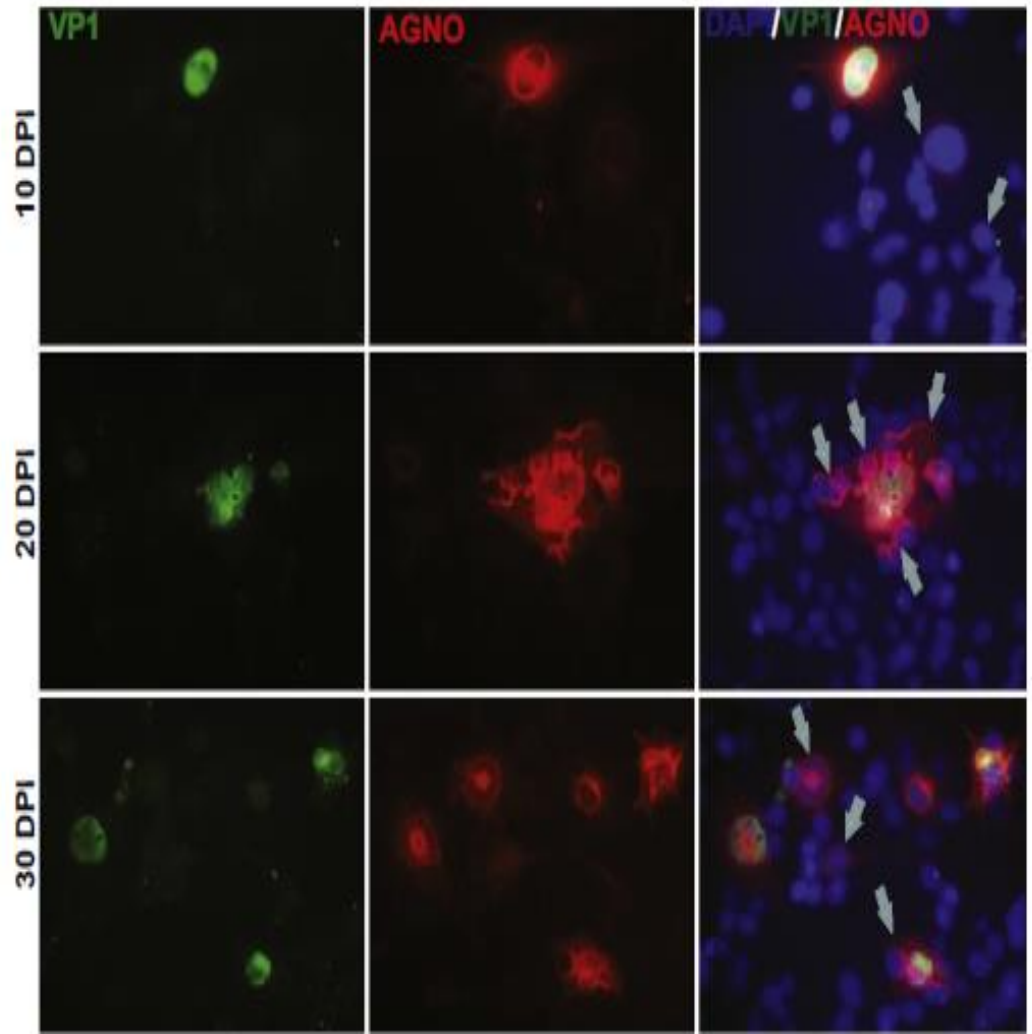
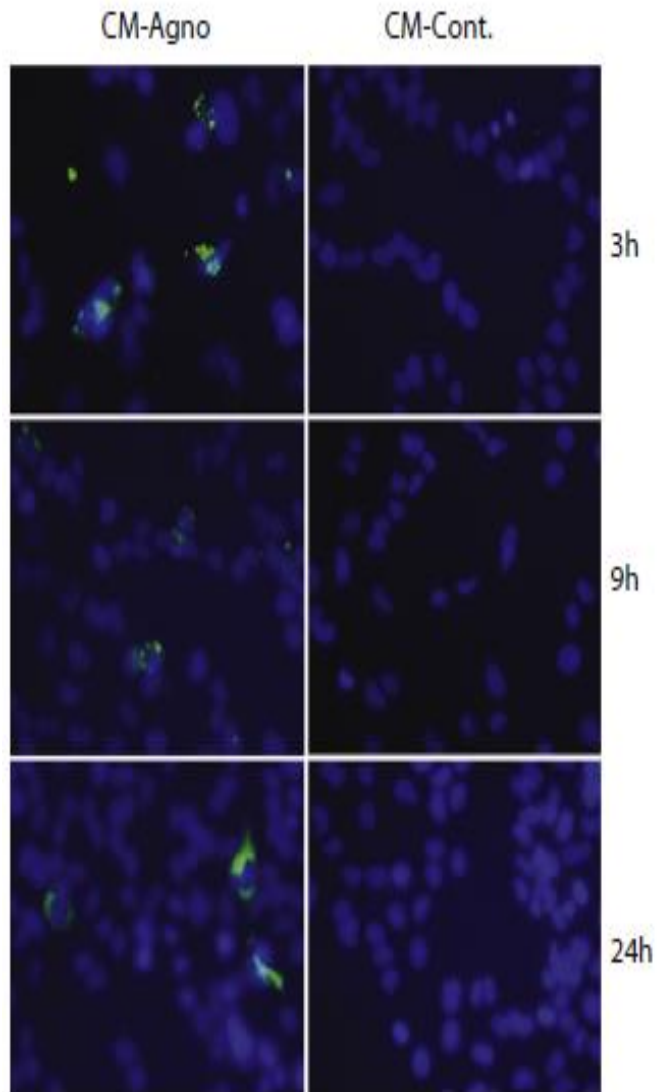
•24 saat

•Eksozom saflaştırma
ve liziz

Agnoprotein Salınımında Eksozomların Rolünün Araştırılması



Agnoproteinini Enfekte Olmayan Hücrelerde Tespiti (Agno-Uptake)



Agno-Uptake, immunohistokimya ile

Sonuç olarak...

- Pekçok ökaryotik virus kendi replikasyon periyotları ve hastalığın seyrinde temel fonksiyonlar üstlenen **küçük sekretör proteinler** sentezlemektedir.
- Agnoprotein, JC virusun küçük düzenleyici bir proteindir ve virusun aktif olarak sentezlendiği hücrelerde bulunmak zorundadır.

- Sonuçlarımız enfekte glial kültürlerin hücresiz fraksiyonlarında da agnoprotein bulunduğunu ortaya çıkardı.
- Agnoprotein'in mediada bulunması sadece virusun litik enfeksiyonun sonucu değildi.
- VP1 mediada 6dpi görülmekteyken Agnoprotein 3-4dpi görülmekte.
- Bu sonuç agnoprotein sekresyonunun virion salınımından önce meydana gelebileceğini açıkça ortaya koymaktadır.
 - Dual-promoter GFP plazmid
 - Adenovirus+Agno enfeksiyonu

- Agnoprotein'in ekstraselüler matrikste bulunması, agnoprotein'in JCV enfeksiyonunun moleküler patogeneğinde **yeni bir rolü** olduğunu düşündürmektedir.
- Sekrete edilen agnoprotein'in olası rollerinden biri ekstraselüler modülatör olarak **virusun enfekte dokuya girişini kolaylaştırmak** olabilir.
 - Miksomavirus M-T7 (37kDa)
 - Vaccinia complement control protein (VCP)

- PML çoğu zaman ölümcül bir hastalıktır ve latent periyotdan patolojik evreye geçiş hakkında çok az şey bilinmektedir.
- PML'de ölüm oranı ↑
 - Tanı, hastalığın geç evrelerinde
 - Erken tanı markırı yok
- JCV agnoproteini sadece enfekte hücreler tarafından sentezlenip ekstraselüler matrikse salgılandığı için klinik numunelerde agnoprotein tespiti erken tanı markırı olarak hizmet edebilir.

- Sonuç olarak yaptığımız çalışma agnoproteininin enfekte glial hücreler tarafından sekrete edildiğini ve ekstra selüler matrikste bulunduğunu göstermiştir.
- Ayrıca agnoproteininin enfekte olmayan komşu hücreler tarafından alındığını kanıtlayan veriler de elde ettik.
- Bu durum hastalığın ilerlemesi ve virusun patogenezi için önemli roller oynuyor olabilir.
- Bu sonuçlar JCV'nin patogenezinin anlamakta yeni araştırmalar için olanaklar sağlayabilir.

TEŞEKKÜRLER....



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ



TEMPLE
UNIVERSITY®

Assc. Prof. İlker Kudret Sarıyer
I.Francesca De Simone, PhD