

# Uloga herpesvirusnih gena u izbjegavanju imunološkog nadzora posredovanog limfocitima T i NK-stanicama in vivo

---

Krmpotić, Astrid

Doctoral thesis / Disertacija

2001

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:172486>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#) / [Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Astrid Krmpotić**

**ULOGA HERPESVIRUSNIH GENA U IZBJEGAVANJU  
IMUNOLOŠKOG NADZORA POSREDOVANOG LIMFOCITIMA T  
I NK-STANICAMA *IN VIVO***

**Doktorska disertacija**

**Rijeka, 2001.**

## I AUTOR

---

Ime i prezime : Astrid Krmpotić

Datum i mjesto rođenja.: 12. kolovoza 1964. Vinkovci

Završeni fakultet : Medicinski fakultet Zagreb, 1991.

Posdiplomski studij: Medicinski fakultet u Rijeci 1998

Sadašnje zaposlenje: asistent Medicinskog fakulteta u Rijeci

---

## II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA

---

Naslov rada: ULOGA HERPESVIRUSNIH GENA U IZBJEGAVANJU  
IMUNOLOŠKOG NADZORA POSREDOVANOG LIMFOCITIMA T I NK-  
STANICAMA IN VIVO

Broj str.132,sl. 31,tab. 7, bibliografskih podataka: 160

Ustanova ili mjesto gdje je disertacija izrađena: Medicinski fakultet u Rijeci

Znanstveno područje: BIOMEDICINA I ZDRAVSTVO

Znanstveno polje: Temeljne medicinske znanosti

Znanstvena grana: Imunologija i imunoematologija

Mentori: prof.dr.sc. Stipan Jonjić

Fakultet na kojem je obranjena: Medicinski fakultet Rijeka

---

## III OCJENA I OBRANA

---

Datum prijave teme: 2. travnja 1999.

Datum predaje rad: 4. srpnja 2001.

Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen: 23. listopada 2001.

Sastav Povjerenstva koje je rad ocijenilo

prof.dr.sc. Pero Lučin, prof.dr.sc. Nada Čikeš i prof.dr.sc. Stipan Jonjić

Datum obrane : 13. studeni 2001.

Sastav Povjerenstva pred kojim je rad obranjen: I s t i

---

Mentor rada: Prof. dr. sc. Stipan Jonjić

Doktorska disertacija obranjena je dana \_\_\_\_\_ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Pero Lučin
2. Prof. dr. sc. Nada Čikeš
3. Prof. dr. sc. Stipan Jonjić

Rad ima 132 lista.

UDK klasifikacija: 612.017:578.825.1:57.083.3(043)

Rad je izrađen na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Rad je financijski potpomognut sredstvima Ministarstva znanosti i tehnologije Republike Hrvatske (projekti broj 006204 i 006205, glavni istraživač prof. dr. sc. Stipan Jonjić).

Iskreno se zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Stipanu Jonjiću na vodstvu, brojnim savjetima i konstruktivnim razgovorima te podršci pri izradi ovog rada.

Hvala svim članovima Zavoda za histologiju i embriologiju na razumijevanju. Posebno se zahvaljujem dr. med. Ivanu Bubiću, Dijani Rumora i Miljani Krička bez čije bi pomoći i požrtvornosti ovaj rad bilo teško ostvariti.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Bojanu Poliću na prijateljskoj podršci i pomoći te angažmanu u pribavljanju NKG2D-tetramera.

Posebno hvala mojim roditeljima koji su u mene uvijek vjerovali i nesebično mi pomagali.

Najveću zahvalnost dugujem svojim dečkima: Ivici, Alanu, Goranu i Marinu. Hvala im što se nikada nisu žalili niti mi prigovarali zbog moje zaokupljenosti ovim radom. Hvala im što me podupiru i vole.

Astrid Krmpotić

## SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Ispitati ulogu herpesvirusnih (citomegalovirusnih) gena u izbjegavanju imunološkog nadzora posredovanog limfocitima T i NK-stanicama.

**Materijal i metode:** Rekombinante mišjeg citomegalovirusa (MCMV) s delecijom pojedinih imunomodulacijskih gena (*m04*, *m06* ili *m152* gena) testirali smo u različitim mišjim sojevima (BALB/c, C57BL/6, A/J, DBA/2, *nu/nu* BALB/c, BALB.B6-*Cmv1*<sup>f</sup>, intra-NK-kompleks (intra-NKC) rekombinantni miševi). Koristili smo dva protokola infekcije citomegalovirusom: intraperitonealna infekcija miševa pročišćenim virusima ili intravensko injiciranje inficiranih mišjih embrionalnih fibroblasta. Miševima smo depletirali NK-stanice ili smo ih ostavili netretirane, te smo ih žrtvovali 3. dana poslije infekcije. Protočnim citometrom pomoću NKG2D tetramera smo analizirali ispoljavanje liganda za NKG2D na inficiranim stanicama.

**Rezultati:** *m152*-delecijska mutanta osjetljivija je na nadzor posredovan CD8<sup>+</sup> limfocitima T u usporedbi s revertantnim i divljim tipom MCMV-a (Krmptić i sur. J Exp Med 1999;190:1285). Sličan učinak ima i delecija *m06* gena čiji produkt snažno narušava MHC-I ekspresiju, dok delecija *m04* gena nema utjecaja na osjetljivost virusa na CD8<sup>+</sup> limfocite T. Suprotno očekivanju, delecija *m152* gena čini virus osjetljivijim i na nadzor posredovan NK-stanicama. Delecija *m04* gena također čini virus osjetljivijim na nadzor posredovan NK-stanicama, dok delecija *m06* gena ne utječe na osjetljivost virusa na NK-stanice. Učinak *m152* gena na NK-stanice ovisan je o mišjem soju (u BALB/c i DBA/2 miševa NK-stanice su inhibirane djelovanjem *m152* gena, dok su C57BL/6 i BALB.B6-*Cmv1*<sup>f</sup> miševi rezistentni na taj inhibicijski učinak). Pomoću intra-NKC rekombinantnih miševa ustanovili smo da je gen koji određuje osjetljivost/otpornost na NK-inhibiciju posredovanu *m152* genom smješten u NK-kompleksu unutar lokusa *Cd94*, *Ly49* i *Cmv1*. Injiciranjem inficiranih fibroblasta rezistentnog mišjeg soja u osjetljivi soj pokazali smo da je za inhibicijski učinak *m152* gena važan i ligand na ciljnoj stanici. Protočnim citometrom pomoću NKG2D tetramera smo ustanovili da je molekula na inficiranim stanicama čije ispoljavanje modulira *m152/gp40* ligand NKG2D receptora i da se najvjerojatnije radi o molekuli H60.

**Zaključak:** Ovim radom po prvi put je pokazano da jedan imunomodulacijski gen (*m152* gen MCMV-a) može omogućiti virusu izbjegavanje i CD8<sup>+</sup> limfocita T i NK-stanica.

**Ključne riječi:** Citomegalovirus; Limfociti T; *m152*, *m06*, *m04*, gen; NKG2D; NK-stanice.

## SUMMARY

**Objectives:** To investigate the role of immunomodulatory murine cytomegalovirus (MCMV) genes in evasion of immune control mediated by T lymphocytes and NK cells *in vivo*.

**Material and Methods:** We tested recombinant MCMV strains harboring deletion of either *m04*, *m06* or *m152* gene in different mouse strains (BALB/c, C57BL/6, A/J, DBA/2, *nu/nu* BALB/c, BALB.B6-*Cmv1<sup>r</sup>*, intra-NKC recombinant mice). Two different experimental protocols of cytomegaloviral infection were used: intraperitoneally infection of mice with purified viruses or intravenous injection of infected mouse embryonic fibroblasts. Mice were either depleted of NK cells or left untreated, and virus titers were determined 3 days post infection. Using NKG2D-tetramer we analyzed the expression of ligand for NKG2D on infected cells by flow cytometry.

**Results:** *m152*-deletion mutant strain is more susceptible to control by CD8<sup>+</sup> T lymphocytes compared to revertant virus strain and wild type MCMV (Krmpotić et al. J Exp Med 1999;190:1285). Similar effect has the deletion of *m06* gene. In contrast to the expectation that the lack of *m152* gene should enhance MHC I expression and thereby increase NK resistance, deletion of *m152* gene augments the susceptibility of the virus to control by NK cells. While deletion of *m04* gene renders virus more susceptible to control by NK cells as well, *m06* gene, despite its strong influence on the expression of MHC I molecules, has no impact on virus sensitivity to NK cells. The NK-inhibitory effect of *m152* gene is mouse strain dependent (in BALB/c and DBA/2 mice the NK cell response is strongly attenuated by the expression of *m152* gene while in C57BL/6 and BALB.B6-*Cmv1<sup>r</sup>* replication of both, the *m152* deletion mutant and the revertant virus, is efficiently controlled by NK cells). NK-complex gene within the loci encompassing *Cd94*, *Ly49* and *Cmv1* determines sensitivity/resistance to *m152*-mediated inhibition of NK cell activity. Transfer studies of MCMV infected cells from resistant into sensitive strains reveal that the NK inhibition by *m152* is defined at the level of NK cell ligand as well. Flow cytometry analyses of NKG2D-ligand on infected cells indicate that H60 is molecule which expression is modulated by *m152/gp40*.



**Conclusion:** We showed for the first time that the herpesvirus gene (MCMV *m152* gene) can downmodulate both the adaptive and the innate immune response.

**Key words:** *Cytomegalovirus; m152, m06, m04, gene; NK cells; NKG2D; T lymphocytes*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Općenito o citomegalovirusima</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Imunološki nadzor CMV infekcije</b>	<b>2</b>
1.2.1. Uloga limfocita T u nadzoru CMV infekcije	3
1.2.1.1. Presentacija antigena	4
1.2.1.1.1. Presentacija MCMV antigena	6
1.2.2. Uloga NK-stanica u nadzoru MCMV infekcije	8
1.2.2.1. NK-stanični receptori	10
1.2.2.1.1. Receptori iz imunoglobulinske superobitelji	10
1.2.2.1.2. Receptori iz superobitelji lektina C tipa	12
1.2.2.1.3. Razlika između inhibicijskih i aktivacijskih NK-receptora	15
<b>1.3. Izbjegavanje imunološkog nadzora</b>	<b>17</b>
1.3.1. Interferencija citomegalovirusa s preradom i prezentacijom antigena u kontekstu MHC molekula razreda I	17
1.3.1.1. HCMV i ometanje antigenske prezentacije	19
1.3.1.1.1. <i>UL83</i> gen	19
1.3.1.1.2. <i>US6</i> gen	19
1.3.1.1.3. <i>US2</i> i <i>US11</i> geni	20
1.3.1.1.4. <i>US3</i> gen	21
1.3.1.2. MCMV i ometanje prezentacije antigena	22
1.3.1.2.1. <i>m152</i> gen	23
1.3.1.2.2. <i>m06</i> gen	26
1.3.1.2.3. <i>m04</i> gen	26
1.3.2. CMV i izbjegavanje imunološkog nadzora posredovanog NK-stanicama	27
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	<b>31</b>

<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	<b>33</b>
3.1. Uređaji	33
3.2. Plastično laboratorijsko posuđe	33
3.3. Kemikalije	34
3.4. Mediji za uzgoj stanica	35
3.5. Pufferi	36
3.6. Monoklonska protutijela i poliklonski serumi	37
3.7. Virusi	38
3.7.1. MCMV rekombinantni virusi	38
3.7.2. Umnožavanje virusa	39
3.7.3. Infekcija miševa virusom	39
3.8. Laboratorijske životinje	40
3.8.1. Testiranje $\beta 2m^{-/-}$ , $H-2K^{b/-}D^{b/-}$ i $TAP1^{-/-}$ miševa	41
3.9. Stanice	42
3.9.1. Mišji embrionalni fibroblasti	43
3.9.2. B12 i YAC-1 stanice	44
3.9.3. Priprema inficiranih stanica	44
3.9.4. Hibridomi	45
3.9.4.1. Uzgoj hibridoma u eksperimentalnim životinjama	45
3.9.4.2. Precipitacija protutijela iz ascitesa pomoću amonijevog sulfata	46
3.9.4.3. Određivanje koncentracije protutijela	46
3.9.4.4. Provjera specifičnosti monoklonskih protutijela	48
3.9.4.5. Protokol selektivne imunodeplecije staničnih populacija <i>in vivo</i>	48
3.10. Proizvodnja kunićjeg protuseruma na AGM1 antigen	49
3.10.1. Testiranje kunićjeg protuseruma na AGM1 antigen	50
3.11. Određivanje titra virusa u tkivima	52
3.11.1. Test virusnih čistina	52
3.12. NK-citotoksični test	53
3.13. Statističke metode	54

<b>4. REZULTATI</b>	<b>55</b>
4.1. Produkt <i>m06</i> gena inhibira imunološki odgovor posredovan CD8 <sup>+</sup> limfocitima T	55
4.2. Osjetljivost MCMV-a na NK-stanice ovisna je o soju miševa	58
4.3. Atenuacija <i>m152</i> -delecijske mutante u <i>nu/nu</i> BALB/c miševima	60
4.4. <i>m152/gp40</i> inhibira antivirusni učinak NK-stanica <i>in vivo</i>	61
4.5. Inhibicijski učinak <i>m152/gp40</i> na aktivnost NK-stanica nije ispoljenu C57BL/6 miševa	67
4.6. Inhibicija NK-stanica posredovana produktom <i>m152</i> gena neovisna je o funkciji limfocita T	70
4.7. Gen odgovoran za rezistenciju prema inhibicijskom učinku <i>m152/gp40</i> smješten je unutar NK-kompleksa	72
4.8. Mapiranje lokusa gena unutar NK-kompleksa odgovornog za osjetljivost/otpornost na inhibicijski učinak <i>m152/gp40</i>	75
4.9. Učinak <i>m152</i> gena na ispoljavanje liganda za NK-receptore na ciljnim stanicama	80
4.9.1. Inhibicijski učinak <i>m152</i> gena na NK-stanice ovisan je i o ligandu za NK-receptore na inficiranim stanicama	81
4.9.2. Izostanak NK-inhibicije posredovane s <i>m152/gp40</i> nakon injiciranja inficiranih stanica deficitnih za TAP1 molekulu ili $\beta$ 2-mikroglobulin	83
4.9.3. NK-inhibicijski učinak <i>m152</i> gena nije određen L <sup>d</sup> molekulom	88
4.9.4. <i>m152</i> gen inhibira ispoljavanje liganda za NKG2D na inficiranim stanicama	92
4.10. NK-inhibicijski učinak <i>m152</i> gena <i>in vitro</i>	97
<b>5. RASPRAVA</b>	<b>99</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b>	<b>111</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>112</b>

## 1. UVOD

### 1.1. Općenito o citomegalovirusima

Citomegalovirusi (CMV) su svrstani u  $\beta$  podobitelj herpesvirusa. Kao i kod ostalih herpesvirusa srž njihovog viriona sadrži dvolančanu DNA koja je okružena kapsidom (proteinskim omotačem) ikozaedrične simetrije. Kapsidu tvori 12 pentameričkih i 150 heksameričkih kapsomera, a izvana je obavijena tegumentom. Tegument je asimetrična ovojnica izgrađena od amorfne tvari. Oko tegumenta nalazi se dvoslojna lipidna ovojnica u koju su uloženi glikoproteini koji strše s površine viriona. Veličina zrelog viriona iznosi 150-200 nm.

Citomegalovirusi su specifični za vrstu, pokazuju tropizam za različite stanice, imaju dug replikacijski ciklus te polagano rastu u kulturi stanica. Inficirane stanice postaju povećane (citomegalične) i sadrže tipične nuklearne i citoplazmatske inkluzije. Stvaranjem novih virusa dolazi do ireverzibilne destrukcije inficirane stanice. Nakon primarne infekcije viralni genom ostaje doživotno prisutan u domaćinu uspostavljajući stanje latencije iz kojeg se virus može reaktivirati (1).

Primarna infekcija s humanim citomegalovirusom (HCMV) kod imunokompetentnog domaćina obično prolazi klinički nezamjetno. Manifestna bolest nastaje nakon infekcije imunološki nezrelih ili imunološki kompromitiranih osoba (intrauterina infekcija koja uzrokuje kongenitalne malformacije, infekcija oboljelih od AIDS-a, bolesnika na imunosupresivnoj terapiji) (2). Budući ove infekcije imaju veliki značaj u suvremenoj patologiji biološka su svojstva HCMV-a dobro proučena, a i dalje se vrše brojna istraživanja. Međutim zbog već navedene specifičnosti za vrstu otežano je vršiti ispitivanja HCMV-a na animalnom modelu. Iz tog razloga, a zbog velike sličnosti u biološkim osobitostima samih virusa te u mehanizmima imunološkog nadzora, razvijen je animalni model infekcije miševa s mišjim citomegalovirusom (MCMV) (3).

Proces infekcije stanice citomegalovirusom vrlo je složen. Virus prvo prijanja na površinu stanice, te dolazi do fuzije virusne ovojnice i stanične membrane nakon

čega virion prodire u stanicu. Nukleokapsida se zatim postupno razgrađuje i prenosi do jezgre stanice u kojoj započinje proces prepisivanja gena s virusne DNA (4).

Citomegalovirusi imaju najveći genom od svih herpesvirusa te njegova veličina iznosi 230-240 kbp kod HCMV-a i MCMV-a. Izražavanje citomegalovirusnih gena odvija se kaskadno te je cijeli replikacijski ciklus virusa podijeljen u tri razdoblja: vrlo rano razdoblje (*engl.* immediate early, IE), rano razdoblje (*engl.* early, E) i kasno razdoblje (*engl.* late, L), a u skladu s tim i CMV geni su podijeljeni u tri skupine (1).

Vrlo rano razdoblje replikacijskog ciklusa citomegalovirusa započinje neposredno nakon prijenosa viralne DNA u jezgru inficirane stanice te traje 2 sata kod infekcije s MCMV-om. Geni ovog razdoblja kodiraju nestrukturane regulacijske bjelančevine koje induciraju izražavanje gena ranog razdoblja. Rano razdoblje kod infekcije s MCMV-om traje 14 sati, a funkcija gena ovog razdoblja replikacije virusa jest stvaranje uvjeta za replikaciju virusne DNA i nakon toga morfogenezu viriona (1,5). Tijekom ranog razdoblja izražavaju se i geni uključeni u mehanizme kojima virus nastoji izbjeći imunološki nadzor domaćina (*m152*, *m06* gen MCMV-a) (6,7). Posljednje razdoblje ciklusa umnažanja virusa je kasno razdoblje koje kod MCMV-a traje 8 sati, a za vrijeme kojega se prepisuju uglavnom strukturni glikoproteini i umnaža virusna DNA (5). Prijelazom tako formirane nukleokapside u citoplazmu od amornog matriksa nastaje tegument koji ju omata. U vezikularnom sustavu citoplazme inficirane stanice virus se oblaže lipoproteinskom ovojnicom (5).

## 1.2. Imunološki nadzor CMV infekcije

Učinkoviti imunološki nadzor zaslužan je za nedostatak kliničkih simptoma CMV infekcije imunokompetentnih domaćina. Pri tom dolazi kako do produkcije specifičnih protuvirusnih protutijela tako i do aktivacije mehanizama stanične imunosti.

Pokusi provedeni na mišjem modelu (na transgeničnim  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševima kojima uslijed isjecanja iz genoma membranskog egzona za imunoglobulinski  $\mu$

lanac nedostaju limfociti B (8)) pokazali su da protutijela nisu neophodna za nadzor akutne MCMV infekcije (9). Davanje imunog seruma novorođenčadi oboljeloj od CMV bolesti ublažilo je simptome bolesti, ali nije suzbilo replikaciju virusa u tkivima (10). Na mišjem modelu je pokazano da protutijela također ne mogu spriječiti pojavu rekurentnog virusa, ali mogu ograničiti njegovo širenje (11). I kod ljudi je uočeno da se simptomi CMV bolesti kod imunokompromitiranih osoba javljaju unatoč prisutnosti specifičnih protuvirusnih protutijela (12). Iz navedenog se može zaključiti da glavnu ulogu u nadzoru akutne, ali i rekurentne CMV infekcije imaju stanični imunološki mehanizmi.

### 1.2.1. Uloga limfocita T u nadzoru CMV infekcije

Pokusi na atimičnim (*nude*) miševima ustanovili su pojačanu osjetljivost ovih životinja bez limfocita T na MCMV infekciju u odnosu na normalne eutimične miševe, ukazujući na značaj limfocita T u nadzoru infekcije (13). Nadalje se pokušalo razlučiti koliki je pri tome udio pojedinih subpopulacija limfocita T.

Uloga CD8<sup>+</sup> limfocita T u akutnoj MCMV infekciji izučavana je na modelu adoptivnog prijenosa ovih stanica ili njihovom deplecijom.

Na modelima profilaktičkog i terapijskog adoptivnog prijenosa imunih CD8<sup>+</sup> limfocita T iz imunokompetentnih miševa tijekom akutne MCMV infekcije (ali i prijenosom memorijskih limfocita T latentno inficiranih miševa) u imunosuprimirane, inficirane singenične primatelje dokazano je da su upravo CD8<sup>+</sup> limfociti T najvažnija populacija stanica u imunološkoj kontroli MCMV-a te eliminaciji virusa iz tkiva (14,15). Pri tom je ustanovljeno da je antivirusni učinak CD8<sup>+</sup> stanica neovisan o pomoći CD4<sup>+</sup> limfocita T. Iako najvažniji, CD8<sup>+</sup> limfociti T nisu i nezamjenjivi, odnosno postoji velika mogućnost prilagodbe imunološkog sustava. Naime kod  $\beta 2m^{-/-}$  miševa (kojima uslijed nedostatka  $\beta 2$ -mikroglobulina nedostaju i MHC molekule razreda I te stoga ne dolazi niti do pozitivne selekcije CD8<sup>+</sup> stanica) (16,17) kinetika klirensa MCMV-a ne razlikuje se u odnosu na kontrolne miševe (18). Također nakon deplecije CD8<sup>+</sup> limfocita T infektivni virus je bio eliminiran iz tkiva i

organa s kinetikom sličnom onoj kod nedepletiranih životinja (19). Kompenzatornu funkciju preuzeli su pritom  $CD4^+$  limfociti T i druge stanice.

Za razliku od većine tkiva i organa u kojima je dominantna zaštitna uloga  $CD8^+$  limfocita T, u žlijezdama slinovnicama MCMV infekciju nadziru  $CD4^+$  stanice (20). U slučaju dugotrajne deplecije  $CD4^+$  limfocita T, unatoč prisutnosti  $CD8^+$  stanica, u žlijezdama slinovnicama dolazi do uspostave perzistentne infekcije. Za protektivni učinak  $CD4^+$  limfocita T u žlijezdama slinovnicama zaslužna je Th1 subpopulacija limfocita T i to vjerojatno djelovanjem citokina koje ove stanice luče, prvenstveno  $IFN\gamma$  i  $TNF\alpha$  (21,22).

Unatoč učinkovitom imunološkom nadzoru citomegalovirusi nakon akutne infekcije ostaju doživotno prisutni u organizmu domaćina uspostavljajući latenciju. Latencija je stanje kada je virusni genom prisutan u pojedinim stanicama domaćina, ali izostaje produktivna infekcija. Reaktivacija virusa iz latencije dešava se najčešće u uvjetima kada su narušeni mehanizmi stanične imunosti (11). Na mišjem modelu je pokazano da pojedinačno uklanjanje subpopulacija limfocita T i NK-stanica ne narušava nadzor rekurentnog virusa.  $CD8^+$  limfociti T mogu samostalno nadzirati rekurentni virus u svim organima, a za razliku od njih  $CD4^+$  limfociti T ne mogu samostalno nadzirati rekurentni virus niti u jednom organu. Uloga NK-stanica u nadzoru rekurentnog virusa (osim u slezeni) ovisna je o  $CD4^+$  limfocitima T. Od citokina u nadzoru rekurentne infekcije najvažniji je  $IFN\gamma$  (11).

Da bi limfociti T mogli ispoljiti svoj antivirusni potencijal neophodno je da na površini inficirane stanice budu predočeni virusni antigeni u kontekstu MHC molekula.

#### **1.2.1.1. Prezentacija antigena**

Da bi se bilo koji antigen predočio na staničnoj površini u kontekstu MHC molekula, potrebno je da u stanici prođe proces prerade do antigeničnog peptida. Postoje dva tipa MHC molekula i dva puta prerade i prezentacije antigena.



MHC molekule razreda I na sebe vežu te na površini stanice predočuju peptide nastale iz proteina koje sintetizira sama stanica, ali također i virusne peptide (ili peptide nekih drugih intracelularnih mikroorganizama) dobivene od virusnih proteina sintetiziranih u citosolu. Antigene prezentirane na površini stanice u kontekstu s MHC molekulama razreda I prepoznaju  $CD8^+$  (citotoksični) limfociti T, a ovaj put prerade i prezentacije antigena naziva se citosolni ili endogeni. Krajnji rezultat prepoznavanja inficirane stanice je njeno uništenje izravnim djelovanjem citotoksičnih limfocita T. Za razliku od  $CD8^+$  stanica,  $CD4^+$  (pomoćnički) limfociti T prepoznaju antigen prezentiran u kontekstu s MHC molekulama razreda II, a uglavnom se radi o peptidima porijeklom od ekstracelularnih mikroorganizama i njihovih produkata koji su bili internalizirani u stanicu i degradirani u vezikularnom odjeljku stanice. Stoga se ovaj put prezentacije antigena naziva endosomalni ili egzogeni. Pomoćnički limfociti T obično zatim djeluju posredno potičući limfocite B na produkciju protutijela (Th1 subpopulacija) ili aktivirajući makrofage da unište bakteriju (Th2 subpopulacija) (23,24).

Kao što je već navedeno virusni antigeni prerađuju se endogenim putem i predočuju u kontekstu s MHC molekulama razreda I na površini inficirane stanice. Ovaj put prezentacije obuhvaća čitav niz zbivanja. Kao prvo potrebno je da se proteini sintetizirani u citosolu razgrade u manje peptide, budući se zna da se na MHC molekule razreda I obično vežu peptidi dužine 8-10 aminokiselina. Glavnu ulogu pri tome igraju multikatalitički kompleksi proteaza tzv. proteasomi. Dvije podjedinice proteasoma, LMP2 i LMP7 kodiraju geni unutar MHC genskog kompleksa, a njihova se ekspresija može inducirati interferonom (kao i ekspresija MHC molekula razreda I i TAP molekula). Da bi se tako nastali peptidi vezali na MHC molekule neophodno je da iz citosola budu transportirani u endoplazmatski retikulum (ER), budući su MHC molekule, poput ostalih proteina stanične membrane, nakon sinteze smješteni sa svojom ekstracelularnom domenom u ER-u. Za prijenos peptida u ER zaslužni su proteini nazvani ATP-ovisni transporteri peptida povezani s preradom antigena 1 i 2 (TAP1 i TAP2), koji formiraju heterodimer (25). Geni koji kodiraju ove proteine smješteni su također unutar MHC lokusa. Važnu ulogu na daljnjem putu procesiranja antigena imaju čaperoni: kalneksin, kalretikulin i tapasin

(26,27). Novosintetizirani  $\alpha$  lanac MHC molekule razreda I u ER-u je vezan za kalneksin. Nakon što se udruži s  $\beta$ 2-mikroglobulinom, tako nastali heterodimer odvaja se od kalneksina i veže s proteinskim kompleksom koji se sastoji od kalretikulina s jedne i tapasina s druge strane. Preko tapasina MHC molekula razreda I je posredno povezana s TAP1 molekulom, budući je tapasin udružen s TAP1, te na taj način tapasin tvori most između MHC-I i TAP1 molekule. Tako vezana MHC molekula razreda I čeka odgovarajući peptid, nakon čijeg se vezanja odvaja od kompleksa TAP-tapasin-kalretikulina te putuje dalje kroz Golgijev kompleks (u medijalnom Golgiju postaje otporna na endoglikozidazu H) do stanične površine gdje se peptidi predočuju citotoksičnim  $CD8^+$  limfocitima T (23,28).

Za razliku od molekula razreda I, na MHC molekule razreda II u endoplazmatskom retikulumu se veže nevarijabilni  $\gamma$  lanac, te tako spriječava vezanja peptida. Nevarijabilni lanac usmjeruje MHC molekulu razreda II u endosome koji sadržavaju proteine internalizirane iz stanične okoline. U endosomima se nevarijabilni lanac degradira, te ostaje samo njegov dio, tzv. CLIP, vezan i dalje na MHC molekulu. CLIP se razgradi i odvaja od MHC molekule razreda II tek kad se ona veže na čaperon DM, nakon čega se na molekulu razreda II može vezati peptid dobiven degradacijom internaliziranog proteina u endosomu. Tako nastali kompleks odvaja se od DM čaperona te odlazi na površinu stanice, gdje se peptidi predočuju  $CD4^+$  limfocitima T (29).

#### **1.2.1.1.1. Prezentacija MCMV antigena**

Za izučavanje imunološkog nadzora infekcije, a također i za eventualno kreiranje odgovarajućeg antivirusnog cjepiva važno je odrediti imunodominantni antigen. U slučaju MCMV infekcije BALB/c miševa (H-2<sup>d</sup> haplotip) pokazano je da većina  $CD8^+$  citotoksičnih limfocita T specifičnih za MCMV na površini inficirane stanice prepoznaje antigen nastao preradom proteina IE razdoblja umnažanja virusa (30). Daljnim analizama ustanovljeno je da se radi o peptidu dobivenom od nestrukturnog transaktivacijskog fosfoproteina pp89, kodiranog od *ie1* gena, koji se

predočuje na površini inficirane stanice spregnuto s L<sup>d</sup> molekulom MHC razreda I (31,32,33). Prijenos CD8<sup>+</sup> limfocita T davatelja senzibiliziranih s MCMV-*ie1*-VAC (rekombinantni virus vakcinije s *ie-1* genom u svom genomu) ograničio je replikaciju virusa u subletalno ozračenih primatelja inficiranih s MCMV-om, ukazujući na zaštitni učinak CD8<sup>+</sup> stanica usmjerenih na pp89 (34). Budući se u kontekstu MHC molekula razreda I na površini stanice prezentiraju peptidi veličine 7-9 aminokiselina, napravljene su različite delecije mutante *ie-1* gena, klonirane u virusu vakcinije te je ispitivana njihova antigeničnost (33). Osim na taj način i skriningom sintetskih peptida (35) te identifikacijom između peptida koji se prerađuju u inficiranim stanicama (36,37) utvrđeno je da su za induciranje protuvirusnog zaštitnog učinka CD8<sup>+</sup> limfocita T najvažnije sekvence između 161 i 179 aminokiseline, odnosno IE-1 nonapeptid od 168-176 aminokiseline (sekvenca YPHFMPTNL) prezentiran na površini inficirane stanice u kontekstu L<sup>d</sup> molekule (38).

Navedeni nonapeptid porijeklom iz IE-1 proteina pp89, ispoljava se na površini inficirane stanice tijekom IE te L razdoblja ciklusa umnažanja virusa, ali ne i tijekom E faze. Ova pojava može se objasniti ekspresijom gena kojima virus ometa imunološki nadzor domaćina, a koji su mahom geni E razdoblja (39). Međutim već je i u prvim istraživanjima ustanovljeno postojanje antivirusnih klonova citotoksičnih limfocita T koji prepoznaju ciljne stanice E razdoblja, te antigene prezentirane u kontekstu K<sup>d</sup> i D<sup>d</sup>, a ne samo L<sup>d</sup> molekula, što bi sugeriralo postojanje i drugih antigeničnih virusnih peptida, a ne samo IE-1 nonapeptida (37,39,40,41). Najnovijim istraživanjima identificiran je antigenični nonapeptid (243-251 aminokiselina) porijeklom iz gp34, prezentiran u kontekstu MHC molekule razreda I D<sup>d</sup> (42). Glikoprotein 34 (gp34) kodiran je genom E razdoblja *m04* (43) i prvi je E protein MCMV-a za kojeg je potvrđeno da uspijeva izbjeći virusne mehanizme ometanja imunološkog nadzora domaćina. Na modelu adoptivnog prijenosa imunih limfocita T u imunodeficitne primatelje pokazano je da citotoksični limfociti T specifični za *m04* nonapeptid pružaju *in vivo* zaštitni učinak identičan učinku citotoksičnih limfocita T specifičnih za IE-1 nonapeptid (42).

Daljnja istraživanja vjerojatno će dovesti do identifikacije do sad nepoznatih imunodominantnih antigeničnih peptida MCMV-a, jer ih sigurno postoji nekoliko, a

različite MHC-I molekule mogu selekcionirati različite peptide. Postoje naznake o postojanju peptida E razdoblja koji se prezentira spregnuto s MHC molekulom razreda I K<sup>d</sup> (42), a ustanovljeno je i postojanje još jednog antigeničnog E peptida kodiranog genom *M84* za MCMV soj K181 (44).

### 1.2.2. Uloga NK-stanica u nadzoru MCMV infekcije

Iako neosporno najvažniju ulogu u imunološkom nadzoru MCMV infekcije imaju limfociti T, važna je i uloga mehanizama prirodne imunosti, pogotovo kad se zna da je za potpuni antivirusni učinak putem mehanizama stečene imunosti potrebno da protekne nekoliko dana od trenutka same infekcije. U tom ranom periodu svoj antivirusni učinak ispoljavaju NK-stanice.

Ubrzo nakon virusne infekcije dolazi do pojačanog lučenja interleukina 12 (IL-12) te interferona  $\alpha$  i  $\beta$  (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ ) od strane aktiviranih makrofaga i fibroblasta (45). Tijekom MCMV infekcije, IFN $\alpha/\beta$  induciraju NK-staničnu citotoksičnost i NK-blastogenezu, neovisno o povišenoj razini IL-12, a ovaj odgovor je udružen i s promjenama u prometu i distribuciji NK-stanica u različitim organima. Neovisno o IFN $\alpha/\beta$ , povišena razina IL-12 djeluje na NK-stanice na način da inducira njihovu produkciju IFN $\gamma$ , te su upravo NK-stanice u početku MCMV infekcije najvažniji izvor ovog antivirusnog citokina (46,47,48,49). Iz navedenog je očito da NK-stanice mogu nadzirati MCMV infekciju putem dva različita mehanizma: citotoksičnim, znači izravnim ubijanjem inficirane stanice i djelovanjem citokina koje luče, prvenstveno IFN $\gamma$ . Mehanizam antivirusnog djelovanja NK-stanica ne mora biti identičan u različitim organima, te je pokazano da je u slezeni C57BL/6 miševa posredovan perforinom, znači citotoksičan, a u jetri inficirane životinje produkcija IFN $\gamma$  je dominantan mehanizam nadzora MCMV infekcije od strane ovih stanica (50). Aktivnost NK-stanica najizrazitija je 3-5. dana infekcije, dakle u vrlo ranom razdoblju, da bi nakon toga ona postupno slabila. Nasuprot tome aktivnost citotoksičnih limfocita T postupno se povećava te dominira od 7-9. dana. Prema do sada poznatim podacima izgleda da upravo aktivacija protuvirusnog odgovora limfocita T

na neki način "isključuje" NK-stanični odgovor, moguće je lučenjem transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$  (*engl.* transforming growth factor  $\beta$ , TGF $\beta$ ), kojeg luče makrofazi pod utjecajem signala iz aktiviranih limfocita T (51).

Provedena su brojna istraživanja te postoje primjeri iz kliničke prakse kojima je ustanovljena važnost NK-stanica tijekom CMV infekcije. Selektivni nedostatak NK-stanica kod ljudi vrlo je rijedak, ali nekoliko opisanih slučajeva bolesnika s nedostatkom NK-stanica te inficiranih s HCMV-om ili HSV-om bili su udruženi s vrlo teškim simptomima bolesti (52). Na homozigotnim *beige* miševima (*bg/bg*), kod kojih postoji nedostatak NK-stanične citotoksičnosti uočena je povećana osjetljivost na MCMV infekciju. Prijenosom stanica koštane srži normalne životinje uspostavlja se normalna NK-stanična aktivnost te otpornost ovih miševa na MCMV (53,54). Atimični (*nude*) miševi, iako bez limfocita T, mogu do određene razine nadzirati MCMV. Nakon deplecije NK-stanica njihova sposobnost kontrole infekcije izrazito opada (55). SCID (*engl.* severe combined immunodeficiency) miševi također predstavljaju dobar model za proučavanje uloge NK stanica tijekom virusne infekcije (56). Naime ovim miševima nedostaju i limfociti T i limfociti B, te je stoga kod njih moguće proučavati NK-stanice i njihovu važnost u nadzoru MCMV-a, bez uplitanja mehanizama stečene imunosti. MCMV infekcija SCID miševa uzrokuje povišenu razinu proliferacije i aktivacije NK-stanica, koja ostaje prisutna i kasnije tijekom infekcije, kada kod miševa s normalnim mehanizmima stečene imunosti nadzor nad infekcijom preuzmu limfociti T. Iako ove životinje nisu u stanju u potpunosti odstraniti virus iz tkiva i organa, već se kod njih razvija perzistentna infekcija, deplecijom NK-stanica one postaju još osjetljivije na virusnu infekciju (57,58). Uloga NK-stanica u nadzoru MCMV infekcije potvrđena je i njihovim adoptivnim prijenosom u netom okoćene inficirane miševe te u odrasle, inficirane i ozračene miševe pri čemu je došlo do smanjenja smrtnosti, te ograničenja replikacije virusa (59).

Mehanizam prepoznavanja inficirane stanice od strane NK-stanica (neophodan da bi NK-stanica citotoksično djelovala) razlikuje se od načina na koji to rade citotoksični limfociti T, a ovisan je o čitavom nizu receptora prisutnih na površini NK-stanica (60). Za razliku od limfocita T, da bi NK-stanice ispoljile svoj citotoksični

potencijal nije potrebno da na površini stanice budu prezentirani specifični (virusni) antigeni.

### **1.2.2.1. NK-stanični receptori**

Da bi razlučile koje ciljne stanice treba, a koje ne treba lizirati, na površini NK-stanica ispoljavaju se dvije funkcionalne skupine receptora: aktivacijski i inhibicijski receptori. Aktivacijski receptori do nedavno su bili slabo karakterizirani, dok su istovremeno vršena brojna istraživanja inhibicijskih receptora, specifičnih za MHC molekule razreda I. Ova istraživanja bila su u skladu s "missing self" hipotezom, prema kojoj NK-stanice (preko svojih inhibicijskih receptora) prepoznaju na površini stanice vlastite MHC-I molekule, a u slučaju njihovog nedostatka ("missing self") ili ekspresije njihove abnormalne forme (tijekom infekcije ili tumorogeneze) NK-stanice takvu stanicu ubijaju (61). Novija istraživanja, napose aktivacijskih receptora, nužno zahtijevaju promjenu ovako simplificiranog objašnjenja djelovanja NK-stanica, budući je očito da je funkcija NK-stanica regulirana složenije, integracijom signala inhibicijskih i aktivacijskih receptora. Unatoč velikoj razlici u djelovanju, ove dvije funkcionalne skupine NK-staničnih receptora ne mogu se razlikovati strukturno. Naime receptori na NK-stanicama mogu se podijeliti u dvije strukturne skupine: receptori iz imunoglobulinske superobitelji te receptori iz superobitelji lektina C tipa, ali se u svakoj od navedenih strukturnih skupina mogu naći i aktivacijski i inhibicijski receptori. Geni koji kodiraju NK-stanične receptore smješteni su kod čovjeka na 12. kromosomu, a kod miša na 6. kromosomu, unutar tzv. NK-genskog kompleksa.

#### **1.2.2.1.1. Receptori iz imunoglobulinske superobitelji**

U imunoglobulinsku superobitelj spadaju humani KIR (ranije označavan kao "killer inhibitory receptor", a danas kao "killer immunoglobulin-like receptor") (62,60), humani LIR ("leukocyte immunoglobulin-like receptor" označavan i kao ILT

("immunoglobulin-like transcripts")) (63,64,65,66), nedavno otkriveni humani NCR ("natural cytotoxicity receptors") (67) te mišji gp49 (68). Receptori iz ove obitelji su obično monomerni, integralni membranski proteini tipa I.

KIR molekule, koje su najtipičniji te najbolje proučeni pripadnici ove skupine NK receptora, kodirane su genima smještenim na 19. kromosomu čovjeka (znači odvojeni su od NK-genskog kompleksa), a utvrđeno je postojanje dvanaestak različitih KIR gena. KIR molekule sadržavaju dvije (p58/p50) (KIR-2D) ili tri (p70/p140) (KIR-3D) imunoglobulinske domene, a mogu imati dugi ili kratki citoplazmatski dio. Ukoliko je citoplazmatski dio dug, sadržava ITIM (*engl.* immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif), te se takva KIR molekula ponaša kao inhibicijski NK-stanični receptor. Aktivacijskim KIR molekulama nedostaje citoplazmatski dio, to jest nemaju (za razliku od većine u imunologiji poznatih aktivacijskih receptora) ITAM u citoplazmi (*engl.* immunoreceptor tyrosine-based activatory motif), već aktivacijski signal prenose u stanicu pomoću tzv. adapterskih molekula. Svaki pojedini KIR receptor prepoznaje točno određene HLA molekule razreda I. Tako je KIR p58 specifičan za HLA-C, a KIR p70 za HLA-B (69).

Geni koji kodiraju LIR (ILT) molekule smješteni su također na 19. kromosomu čovjeka. LIR molekule sadrže između jedne i šest imunoglobulinskih domena, i ispoljavaju se ne samo na NK-stanicama nego i na brojnim drugim tipovima stanica (npr ILT2 na limfocitima B i T, bazofilima, monocitima i dendritičkim stanicama) (63). ILT2 i ILT4 receptori vežu se na široki spektar MHC molekula razreda I, a ILT2 također dolazi u interakciju s UL18 glikoproteinom humanog CMV-a, molekulom s određenim stupnjem homologije s HLA I molekulama (65).

Iako većina do nedavno poznatih NK-receptora za svoje ligande ima MHC molekule razreda I, uočeno je da se NK-klonovi međusobno razlikuju s obzirom na sposobnost liziranja različitih stanica bez MHC molekula razreda I ispoljenih na svojoj površini. NK-receptori odgovorni za indukciju NK-aktivacije na HLA-neovisan način nazvani su NCR, i u ovu obitelj se svrstavaju NKp46, NKp44 i NKp30 (67,70,71,72). Geni za NKp44 i NKp30 smješteni su na šestom kromosomu, a gen za NKp46 na 19 kromosomu. NKp46 i NKp30 ispoljavaju se i na neaktiviranim i na NK-stanicama aktiviranim s IL-2, dok se NKp44 eksprimira samo nakon IL-2

aktivacije NK-stanica. Ligand za NCR još uvijek je nepoznat, ali se zna da se ispoljava i na normalnim i na tumorskim stanicama, a također je konzerviran i u drugim vrstama (homolog ove molekule kloniran je i kod miša). Najnoviji radovi pokazuju da NKp46 prepoznaje hemaglutinine na površini virusom (influenza virusom i Sendai virusom) inficirane stanice te kao posljedica toga dolazi do aktivacije NK-stanične citotoksičnosti (73).

Za razliku od čovjeka na mišjim NK-stanicama nalazimo vrlo malo receptora koji pripadaju imunoglobulinskoj strukturalnoj superobitelji. To su prvenstveno gp49 molekule (68). Mišji gp49B receptor pokazuje strukturalnu sličnost s humanim KIR molekulama, i identificiran je kao receptor na mastocitima, stanicama mijeloidne loze i aktiviranim NK-stanicama. Za razliku od gp49A koji sadrži kratki citoplazmatski dio bez ITIM motiva, gp49B posjeduje na svom citoplazmatskom kraju ITIM. Ekspresija oba gp49 receptora na NK-stanicama može se *in vitro* izazvati stimulacijom s IL-2, a *in vivo* infekcijom s MCMV-om (74). Iz ovoga proizlazi da za razliku od receptora iz Ly49 obitelji, koji su konstitutivno ispoljeni, ekspresija gp49 receptora na NK-stanicama može biti regulirana, te stoga gp49B receptor predstavlja prvi poznati *in vivo*-aktivacijom-inducirani inhibicijski NK-stanični receptor. Osim toga gp49B ispoljava se i na makrofazima uterinih žlijezda srednjeg trimestra trudnoće, regulirajući njihovu funkciju tijekom trudnoće (vjerojatno djelujući kao endogeni negativni regulator njihove aktivacije) (75).

#### **1.2.2.1.2. Receptori iz superobitelji lektina C tipa**

Najvažniji članovi ove skupine receptora su mišje Ly49 molekule, mišji NKR-P1 te CD94/NKG2 kompleks ispoljen i kod čovjeka i kod miša.

Ly49 obitelj NK-staničnih receptora odgovorna je za prepoznavanje polimorfnih MHC molekula razreda I (76). Sastoji se od preko deset vrlo srodnih gena, smještenih unutar NK-genskog kompleksa na distalnom kraju mišjeg šestog kromosoma. Ly49 geni kodiraju transmembranske glikoproteine tipa II, koji se ispoljavaju kao disulfidno vezani homodimeri. Različiti Ly49 geni mogu se, ali i ne



moraju eksprimirati na pojedinoj NK-stanici, osiguravajući na taj način raznolikost repertoara Ly49 receptora (60,69). Ly49 receptori prepoznaju polimorfne determinante MHC molekule razreda I smještene u području  $\alpha 1/\alpha 2$  domene teškog lanca (77). Pojedini Ly49 receptori međusobno se razlikuju i u ekstracelularnoj i u citoplazmatskoj domeni implicirajući različitost i u njihovim ligandima, a i u signalnim putovima unutar NK-stanice. Poput KIR molekula, i unutar Ly49 obitelji postoje članovi s ITIM motivom u citoplazmi, a također i članovi kojima ITIM nedostaje, što znači da i Ly49 receptori po svojoj funkciji mogu biti i inhibicijski i aktivacijski. Tako su npr. Ly49A, Ly49C i Ly49G2 inhibicijski receptori, a Ly49D i Ly49H aktivacijski receptori (*Ly49-h* gen nedavno je identificiran kao *Cmv1* gen koji određuje rezistenciju miševa prema MCMV-u (78)). Pojedini Ly49 receptori specifični su za određene MHC-I molekule (npr. Ly49A za H2D<sup>d</sup> i D<sup>k</sup>, Ly49D za H2D<sup>d</sup> i L<sup>d</sup>), a također postoji i velika razlika u distribuciji pojedinih Ly49 receptora među sojevima miševa (npr. BALB/c miševi nemaju Ly49D, 129 miševi nemaju Ly49C receptor) (79). Ly49 receptori nisu prisutni na površini neonatalnih NK-stanica, postupno se pojavljuju od 3-5. dana po okotu, a nakon 18-21. dana dosežu razinu ekspresije odraslih životinja (80,81). Do sada još nisu identificirani humani homologi Ly49 receptora.

NKR-P1 (CD161) receptori (često označavani i kao NK1.1 antigen) kodirani su genima smještenim unutar NK-genskog kompleksa. Kod miša su do sada poznata tri srodna gena (*Nkrp1a*, *Nkrp1b* i *Nkrp1c*), dok je kod čovjeka identificiran samo jedan *Nkrp1* homolog. NKR-P1 antigeni su transmembranski glikoproteini tipa II, ispoljeni kao disulfidno vezani dimeri na površini većine NK-stanica te pojedinim subpopulacijama limfocita T (60,82). Iako NKR-P1 molekule prepoznaju određene ugljikohidratne ligande na ciljnim stanicama, ipak je zasad nepoznat proteinski ligand ovih NK-receptora. NKR-P1C posreduje aktivaciju NK-stanica, a suprotno njemu NKR-P1B inhibira aktivaciju NK-stanica, te za razliku od NKR-P1A i NKR-P1C, posjeduje ITIM u svojoj citoplazmatskoj domeni (82,83,84).

Iz superobitelji C-tipa lektina na humanim NK-stanicama nalazi se CD94 koji formira disulfidno vezani heterodimer s molekulom iz NKG2 obitelji (85). Obje molekule su integralni membranski glikoproteini tipa II. Nedavno su ovi receptori otkriveni i kod miša i pokazuju izrazitu homologiju sa čovjekom (86), a ispoljeni su na

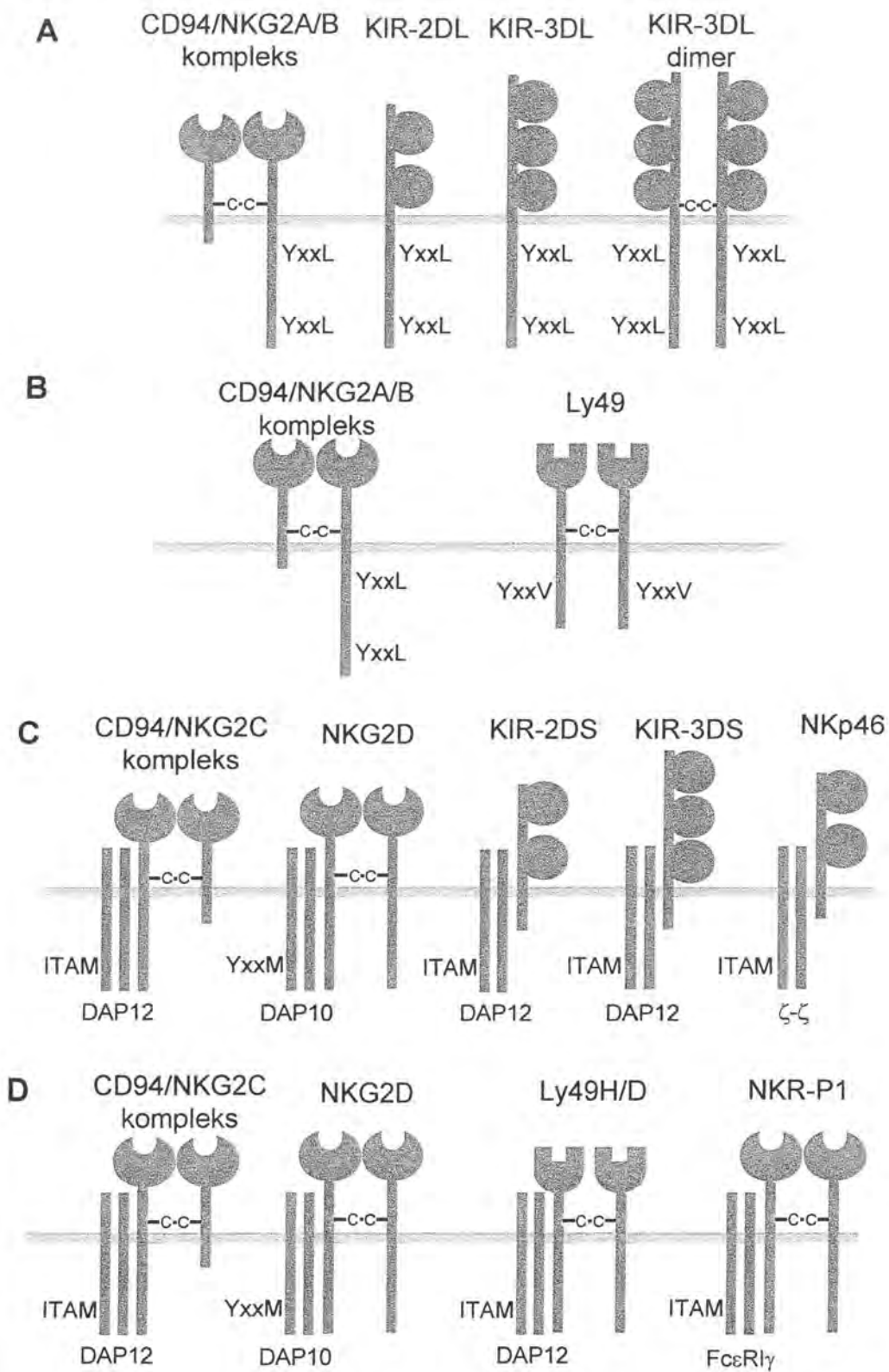
gotovo svim ispitivanim sojevima miševa (s izuzetkom DBA/2 soja). Geni koji kodiraju ove molekule smješteni su unutar NK-genskog kompleksa (87). Kao i kod većine do sad opisanih obitelji NK-receptora tako i pojedine NKG2 molekule funkcioniraju kao inhibicijski, a pojedine kao aktivacijski receptori. NKG2A/B sadrže ITIM motiv u citoplazmi koji ih određuje kao inhibicijske, dok uslijed nedostatka ovog motiva u citoplazmi NKG2C djeluje aktivacijski na NK-stanice. Ligand za CD94/NKG2A,B i C receptor su neklasične (nepolimorfne) MHC molekule razreda I : kod čovjeka HLA-E, a kod miša Qa-1<sup>b</sup>, koje vežu nonamerni peptid dobiven iz "leader" sekvence polimorfnih MHC molekula razreda I (88,89). *Nkg2d* gen, smješten unutar NK-genskog kompleksa blizu ostalih *Nkg2* gena, kodira receptor različit od ostalih članova ove obitelji (90). Na površini NK-stanice (te aktiviranih makrofaga i CD8<sup>+</sup> limfocita T) NKG2D ne ispoljava se kao heterodimer sa CD94, već kao homodimer, te djeluje aktivacijski na NK-stanice (također može pružiti potrebni kostimulacijski signal te pojačati citotoksični odgovor CMV-specifičnih  $\alpha\beta$ CD8<sup>+</sup> limfocita T (91)). Ligandi za humani NKG2D su MHC-srodne molekule MICA i MICB (92), te ULBP1, 2 i 3 (93), a za mišji NKG2D transmembranski protein H60 i glikozilfosfatidil-inozitol (GPI) vezane Rae-1 molekule (94). Na ULBP molekule veže se UL16 humanog CMV-a te su tako ove molekule i otkrivene (93). ULBP molekule ispoljavaju se na velikom broju različitih tkiva i organa (npr srce, mozak, pluća, timus), a pojačano se eksprimiraju na nekim tumorima (npr karcinom kolona i želuca) MICA/B molekule induciraju se stresom u intestinalnom epitelu, a snažno su izraženi i na velikom broju različitih epitelijalnih tumora. Najnovija istraživanja ustanovila su da citomegalovirusna infekcija inducira ispoljavanje MIC molekula na površini *in vitro* inficiranih fibroblasta i endotelijalnih stanica (91,95). MIC molekule imaju istu temeljnu strukturu kao klasične MHC molekule razreda I, to jest imaju  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$  domenu u ekstracelularnoj regiji, transmembransku domenu i kratak citoplazmatski dio. Ne udružuju se s  $\beta 2$ -mikroglobulinom niti ga trebaju za ispoljavanje na površini stanice (96). Ligandi za mišji NKG2D također su inducibilni. Rae-1 i H60 ne eksprimiraju se na većini normalnih stanica, ali im je ekspresija pojačana na brojnim tumorskim stanicama. H60 se ispoljava na stimuliranim BALB/c, ali ne C57BL/6 limfoblastima. Moguće je da virusna infekcija uzrokuje pojačanu ekspresiju ovih

molekula te putem NKG2D aktivaciju NK-stanica, kao što je ustanovljeno za MIC molekule tijekom *in vitro* CMV infekcije (91).

### 1.2.2.1.3. Razlika između inhibicijskih i aktivacijskih NK-receptora

Kao što je u navedenom prikazu NK-staničnih receptora i naglašeno, gotovo unutar svake strukturne obitelji NK-receptora postoje i aktivacijski i inhibicijski receptori (slika 1). Osnovna razlika između ove dvije funkcionalne skupine receptora jest u njihovom citoplazmatskom dijelu. Receptori koji uvjetuju inhibiciju NK-stanične aktivnosti posjeduju u svojoj citoplazmatskoj domeni ITIM motiv (konsensus sekvenca YxxL/V). Nakon vezanja liganda na inhibicijski receptor dolazi do fosforilacije ITIM-a te aktivacije tirozin kinaze (najčešće SHP-1) što u konačnici blokira aktivaciju NK-stanice. Aktivacijski receptori NK-stanica obično imaju kratak citoplazmatski dio i nedostaje im ITAM motiv (*engl.* immunoreceptor tyrosine-based activation motif) (konsensus sekvenca YxxL<sub>6-8x</sub>YxxL/I) inače uobičajen u citoplazmatskom dijelu drugih aktivacijskih receptora. Stoga je dugo bila nepoznanica na koji se način pozitivni, aktivacijski signal prenosi u stanicu. Danas je ustanovljeno postojanje nekoliko malenih tzv. transmembranskih adapterskih proteina koji u svom citoplazmatskom dijelu posjeduju ITAM i zaslužni su za prijenos signala (97). Sve ih karakterizira i malena ekstracelularna regija te aspartična kiselina u transmembranskom segmentu (važna za vezanje s receptorom). NK-stanice eksprimiraju nekoliko adaptor proteina:  $\zeta$  (zeta), Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ , DAP12 (98).

$\zeta$  i Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  udruženi su sa CD16 (niskoafinitetni Fc receptor za IgG odgovoran za ADCC (*engl.* antibody dependent cell cytotoxicity)), s NKp46 i NKp30, te kod miša s NKR-P1 (72,99,100). Adaptorski protein DAP12 (također nazivan i KARAP) komponenta je većeg broja NK-receptorskih kompleksa (KIR2DS2, CD94/NKG2C, Ly49D i H, NKp44 (101)). Nakon vezanja odgovarajućeg liganda na receptorski kompleks koji sadrži DAP12, ITAM motiv DAP molekule se fosforilira i veže na ZAP70 i Syk kinazu te uvjetuje daljnju aktivaciju NK-stanice, u smislu citotoksičnosti i produkcije citokina. Nedavno je otkrivena još jedna adapterska molekula, slična



Slika 1. Inhibicijski NK-receptori A) humani B) mišji; aktivacijski NK-receptori C) humani D) mišji

molekuli DAP12, i nazvana je DAP10 (102). DAP10 razlikuje se od prethodno navedenih adapterskih proteina nedostatkom ITAM motiva u citoplazmi umjesto kojeg ima sekvencu YINM, koja se veže na p85 podjedinicu P13K te tako aktivira NK-stanicu. Najvažniji do sada poznati NK-stanični receptor s kojim DAP10 čini receptorski kompleks je NKG2D (receptor za humane ULBP i MIC molekule i mišji Rae-1 i H60) (90,92,93,94).

### **1.3. Izbjegavanje imunološkog nadzora**

Brojni virusi, pa tako i citomegalovirusi, posjeduju čitav niz različitih mehanizama kojima nastoje izbjeći imunološki nadzor domaćina (103,104) (tablica 1). Produktima različitih gena citomegalovirusi interferiraju s preradom antigena i njihovom prezentacijom u kontekstu MHC molekula razreda I, MHC molekula razreda II, funkcijom komplementa, citokina i faktora rasta te njihovim receptorima, inhibicijom apoptoze, djelovanjem antitijela (105). Za imunološki nadzor posredovan limfocitima T i NK-stanicama svakako su najvažniji mehanizmi ometanja ekspresije MHC molekula razreda I na površini virusom inficirane stanice.

#### **1.3.1. Interferencija citomegalovirusa s preradom i prezentacijom antigena u kontekstu MHC molekula razreda I**

Kao što je u odjeljku o prezentaciji antigena već opisano, bilo koji antigen, pa tako i virusni, da bi se ispoljio na površini stanice u kontekstu MHC molekula razreda I, mora proći endogeni put prerade koji uključuje čitav niz različitih staničnih struktura i odjeljaka. Budući virusu nije u interesu da domaćin, to jest njegovi limfociti T prepoznaju i unište inficiranu stanicu, CMV, i humani i mišji, u svom genomu posjeduju nekoliko gena usmjerenih upravo na ometanje ovog puta prezentacije antigena (106,107). Produkti pojedinih gena s ovom funkcijom usmjereni su na različite stadije prerade antigena.

Tablica 1. CMV geni i mehanizmi izbjegavanja imunološkog nadzora\*

Virus	Gen/protein	Mehanizam djelovanja
<b>Inhibicija humoralne imunosti</b> MCMV HCMV	<i>m138</i> nepoznat	ekspresija virusnog Fc receptora, vezanje IgG ekspresija virusnog Fc receptora, vezanje IgG
<b>Virusni citokini i citokinski receptori</b> HCMV	<i>UL144</i>	homolog TNF-receptora
<b>Receptori za kemokine</b> HCMV MCMV	<i>US28</i> <i>M33</i>	vezanje za $\beta$ -kemokine vezanje za $\beta$ -kemokine
<b>Inhibicija apoptoze</b> HCMV	<i>IE1/IE2</i>	inhibicija apoptoze
<b>Interferencija s MHC-I prezentacijom</b> HCMV  MCMV	<i>US3</i> <i>US6</i>  <i>US2</i> <i>US11</i> <i>m152</i>  <i>m06</i>  <i>m04</i>	retencija MHC-I u ER djelovanje na razini TAP-a dislokacija teških lanaca MHC-I iz ER-a u citosol retencija MHC-I u ERGIC/ <i>cis</i> Golgiju skretanje MHC-I u endolizosome vezanje za MHC-I
<b>Interferencija s preradom antigena</b> HCMV	<i>UL83</i>	inhibicija prezentacije IE antigena od 72 kDa
<b>Interferencija s MHC-II</b> HCMV	nepoznat	smanjenje ekspresije MHC-II na površini makrofaga
<b>Interferencija s NK-stanicama</b> HCMV MCMV	<i>UL18</i> <i>m144</i>	MHC-I homolog MHC-I homolog

\* Nisu navedeni svi geni već karakteristični primjeri.

### 1.3.1.1. HCMV i ometanje antigenske prezentacije

#### 1.3.1.1.1. *UL83* gen

Tijekom IE razdoblja HCMV infekcije obilno se sintetizira virusni transkripcijski faktor od 72 kDa, međutim frekvencija CD8<sup>+</sup> CTL-a specifičnih za ovaj antigen je relativno niska (105). Postotak CMV inficiranih fibroblasta liziranih s IE-specifičnim citotoksičnim limfocitima T je nizak, ali je viši nakon infekcije fibroblasta s delecijском mutantom HCMV-a kojoj nedostaje *UL83* gen. Ovaj gen kodira pp65, protein matriksa koji ispoljava kinaznu aktivnost. Pomoću rekombinantnih virusa vakcinije je pokazano da je prepoznavanje proteina od 72 kDa smanjeno kada se istovremeno ispoljava i pp65. Pretpostavlja se da pp65 fosforilira protein od 72 kDa te tako ograničava njegov pristup u stanični sustav za preradu antigena.

#### 1.3.1.1.2. *US6* gen

Jedna od prvih stepenica na putu prezentacije antigena u kontekstu MHC molekula razreda I jest translokacija peptida proizvedenih u citosolu u lumen endoplazmatskog retikuluma (ER). Za ovaj prijenos neophodne su molekule TAP1 i TAP2. Ustanovljeno je da tijekom HCMV infekcije, unatoč značajnom povećanju ekspresije TAP1 i TAP2 molekule, dolazi do inhibicije translokacije citosolnih peptida u ER. Budući ovaj efekt nije bio uočen u stanicama inficiranim s delecijском mutantom bez *US1-US15* gena, uskoro je identificiran *US6* gen odgovoran za inhibiciju prijenosa peptida u ER putem TAP molekula (108,109,110). Produkt *US6* gena je glikoprotein molekulske mase 21 kDa čija kinetika ispoljavanja korelira s inhibicijom prijenosa peptida tijekom rane (E) i kasne (L) faze infekcije. Maksimum ekspresije *US6* doseže 72 sata poslije infekcije, to jest u vrijeme kada ostali geni koji interferiraju s putem prezentacije u kontekstu MHC molekula razreda I nisu aktivni (111). Glikoprotein od 21 kDa, produkt *US6* gena, udružuje se i čini kompleks s molekulama TAP1, TAP2, teškim lancem MHC molekule razreda I –

$\beta$ 2-mikroglobulinom, kalretikulinom, tapasinom, a veže se i na kalneksin (108). Blokada TAP-a od strane *US6* neovisna je o prisutnosti teškog lanca MHC-I molekule i tapasina, a također ne uključuje niti vezanje peptida na TAP molekulu (108). Unutar stanice produkt *US6* gena smješten je u ER-u, a molekula je funkcionalna i bez transmembranske i citoplazmatske domene, odnosno ER-luminalna domena *US6* glikoproteina inhibira translokaciju peptida putem TAP molekule (109,110). Osim što na ovaj način sprječava ekspresiju klasičnih MHC-I molekula na površini stanice, produkt *US6* gena svoj učinak ispoljava i na neklasične MHC molekule razreda I (HLA-G i HLA-C) što je pokazano na stanicama trofoblasta te je možda i jedan od uzroka spontanih pobačaja tijekom HCMV infekcije (112).

#### 1.3.1.1.3. *US2* i *US11* geni

Infekcija fibroblasta s HCMV-om rezultira nakon 24 sata drastičnim smanjenjem razine MHC-I kompleksa, ali i stabilnosti slobodnih, neudruženih teških lanaca MHC molekula razreda I (113). Daljnjim proučavanjem ustanovljene su dva, međusobno neovisna gena HCMV-a udružena s ovim fenomenom: *US2* i *US11* (114). Princip njihovog djelovanja gotovo je identičan. Teški lanci MHC molekula razreda I nakon što stignu u ER, djelovanjem glikoproteinskih produkata *US2* i *US11* gena translociraju se nazad u citosol gdje se s poluvremenom manjim od pola minute razgrade na proteasomima (115,116). Translokacija MHC-I teškog lanca odvija se preko strukture u membrani ER-a u kojoj se formira pora veličine 40-60 Å. Ova struktura sastoji se od 3 do 4 kopije Sec61 heterotrimeričkog kompleksa, važnog inače za ulazak proteina iz citosola u sekretorni put prezentacije antigena. Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da i deglikozilirani teški lanac MHC molekule razreda I i deglikozilirani produkt veličine 20 kDa od *US2* gena mogu biti reverzno translocirani putem Sec61 kompleksa iz ER-a natrag u citosol, gdje se razgrade na proteasomima. Produkti oba gena učinkovito razgrađuju klasične MHC molekule razreda I, međutim pokazano je da su HLA-C i HLA-G, ispoljeni na površini stanica humanog trofoblasta, otporni na njihovo djelovanje (117). Ovaj rezultat značajan je iz

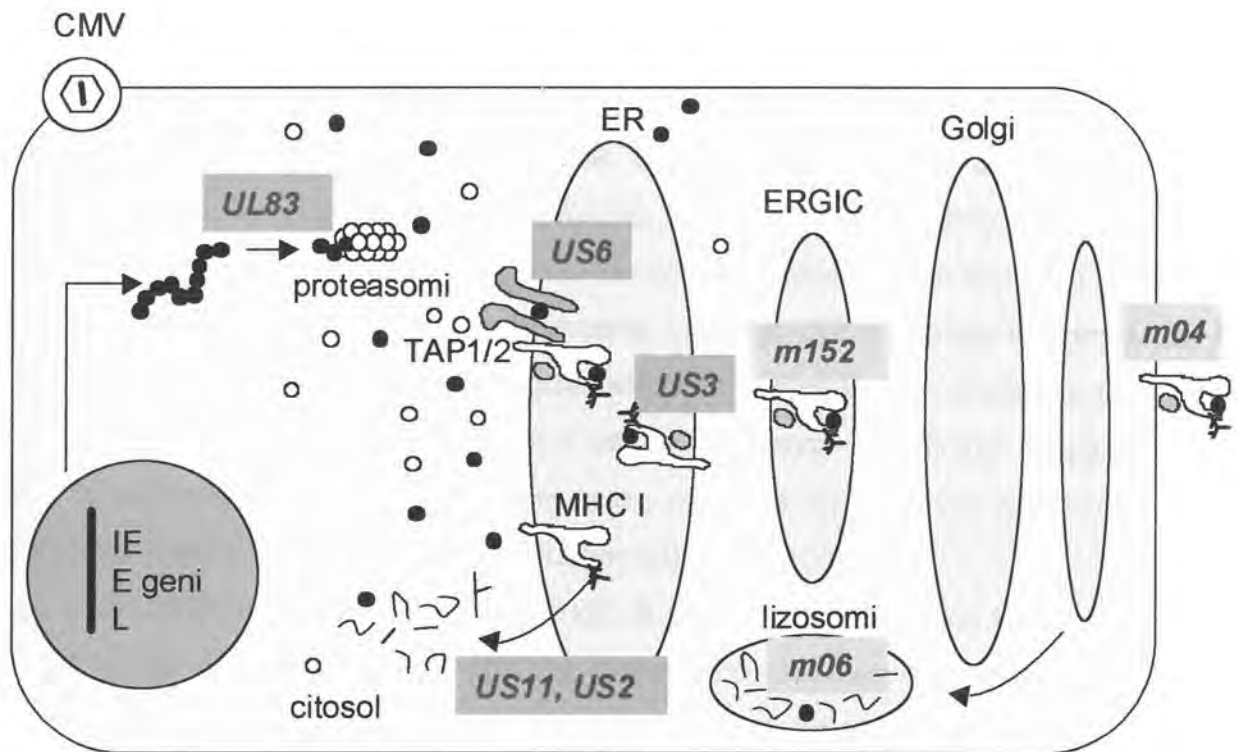


razloga što ometanjem ispoljavanja MHC-I molekula na površini, stanica postaje osjetljiva na djelovanje NK-stanica, te je stoga za sam virus povoljnije da propuštanjem neklasičnih MHC molekula učini stanicu rezistentnom i na nadzor posredovan NK-stanicama. Iako *US2* i *US11* djeluju veoma slično, ipak između njih postoji razlika u specifičnosti djelovanja na različite alelne forme teških lanaca mišjih MHC molekula razreda I (118).

#### 1.3.1.1.4. *US3* gen

Nakon ulaska u ER trimolekularni kompleks MHC molekula razreda I može biti zaustavljen na svom putu do stanične površine. Tijekom vrlo ranog razdoblja virusne infekcije (IE razdoblja) ispoljava se još jedan gen kojem je funkcija ometanje antigenske prezentacije. To je *US3* gen, a njegov glikoproteinski produkt od 32/33 kDa, lokaliziran je u ER-u (119,120). Produkt *US3* gena koimunoprecipitira se s trimolekularnim MHC-I kompleksom, ne uzrokuje brzu degradaciju MHC molekula razreda I (poput *US2* i *US11*) nego uzrokuje njihovo nakupljanje u ER-u spriječavajući njihovu daljnju maturaciju te put do stanične membrane. Za razliku od *US2* i *US11*, a poput *US6* i *US3* svoj učinak ispoljava i na HLA-G i HLA-C molekule ispoljene na stanicama humanog trofoblasta (112).

Transkripcija *US3* gena prethodi ekspresiji *US2*, *US11* i *US6*, ali prestaje u ranom razdoblju infekcije (108,111,119). Stoga se može spekulirati da HCMV inhibira prezentaciju antigena kao postupni višefazni proces, koji započinje retencijom MHC-I molekula posredovanom djelovanjem produkata *US3* (IE gena), za kojom slijedi degradacija ovih molekula djelovanjem produkata *US2* i *US11* gena (gena E razdoblja) (119).



Slika 2. Pojedini geni HCMV-a i MCMV-a uključeni u ometanje prezentacije antigena u kompleksu s MHC molekulama razreda I.

### 1.3.1.2. MCMV i ometanje prezentacije antigena

Poput HCMV-a i MCMV u svom genomu posjeduje nekoliko gena s funkcijom ometanja antigenske prezentacije u kontekstu MHC-I molekula (slika 2). Iako je konačni rezultat djelovanja ovih gena jednak rezultatu djelovanja gena HCMV-a ipak su mehanizmi kojim postižu ovaj učinak različiti.

### 1.3.1.2.1. *m152* gen

Za razliku od stanica inficiranih humanim CMV-om, tijekom infekcije stanica mišjim CMV-om nastanak i stabilnost MHC-I kompleksa nisu poremećeni. Međutim u stanicama inficiranim s MCMV-om inhibirano je normalno sazrijevanje i prijenos ovih kompleksa u medijalni Golgijev odjeljak stanice (121). Naime uočeno je da je prezentacija imunodominantnog MCMV IE antigena (nonapeptida dobivenog od pp89) citolitičkim limfocitima T selektivno prevenirana ekspresijom virusnog gena koji se ispoljava tijekom rane (E) faze virusne infekcije (122). Konstrukcijom MCMV delecijских mutanti te injiciranjem fragmenata DNA mišjeg CMV-a u stanice testirane na retenciju MHC molekula razreda I uspjelo se prvo identificirati regiju unutar MCMV genoma, na njegovom desnom kraju, veličine 5,9 kb (123) a uskoro i sam gen odgovoran za ovaj fenomen - *m152* gen (6).

*m152* gen smješten je unutar *HindIII* E regije MCMV genoma i pripada *m145* genskoj obitelji. *m152* ORF određuje protein od 378 aminokiselina, kodirajući transmembranski glikoprotein tipa I, od 37 (gp37) ili 40 (gp40) kDa ovisno od stupnja glikozilacije. Transkripcija *m152* gena tijekom replikacijskog ciklusa MCMV-a doseže maksimum 4 do 6 sati poslije infekcije, to jest tijekom ranog (E) razdoblja ciklusa. Gp 40 zaustavlja izlazak novosintetiziranih trimolekularnih MHC-I kompleksa iz ER-Golgi intermedijarnog staničnog odjeljka (ERGIC)/*cis*-Golgi te tako inhibira prezentaciju antigena na površini stanice citolitičkim CD8<sup>+</sup> limfocitima T (CTL) te prepoznavanje i uništavanje inficirane stanice od strane CTL-a. Iako je ustanovljeno nakupljanje MHC molekula razreda I u navedenom staničnom odjeljku, nije se uspjelo koprecipitirati ih s gp40 već jedino kolokalizirati konfokalnom mikroskopijom. Zaustavljeni MHC-I kompleksi su stabilni, u Endo-H osjetljivoj formi (što ukazuje da nisu dosegli medijalni-Golgi odjeljak u kojem stječu otpornost na Endo-H) te pokazuju produženo vrijeme poluživota (duže od 6 sati). Istovremeno gp40 ima znatno kraće vrijeme poluživota (oko 2,5 sata). Nakon 3 sata stječe Endo-H rezistenciju, te odlazi u endosomalni/lizosomski odjeljak stanice gdje se razgrađuje (6,124). Iz ovoga proizlazi da kontinuirana ekspresija gp40 nije neophodna za retenciju MHC molekula razreda I, već je potrebna isključivo za njeno započinjanje

(124). Također je uočeno da delecija citoplazmatskog kraja gp40 nije imala učinka na retenciju MHC molekula, već je pokazano da je luminalni dio molekule onaj koji katalizira ovu retenciju (124). Učinak *m152* gena na MHC molekule razreda I specifičan je isključivo za mišje MCMV molekule, to jest nema učinka ovog gena na prijenos humanih MHC-I molekula do površine stanice. *m152* gen nije jednako učinkovit prema svim mišjim MHC-I molekulama, jer najnoviji rezultati pokazuju da *m152* gen efikasno zaustavlja D<sup>b</sup> molekule u ERGIC/*cis*-Golgi odjeljku, ali tek djelomično blokira prijenos K<sup>b</sup> molekula (M. Wagner, osobno priopćenje). Osim toga *m152* gen nije učinkovit u makrofazima, te MHC molekule razreda I u ovim stanicama dolaze na površinu i tijekom MCMV infekcije (125). Za razliku od fibroblasta u kojima tijekom MCMV infekcije *m152* gen u potpunosti ispolji svoj imunosubverzivni učinak, tijekom infekcije makrofaga *m152* gen ne uspijeva spriječiti površinsku ekspresiju virusnih antigena (prvenstveno nonapeptida dobivenog iz IE peptida pp89). Iz ovoga proizlazi da su makrofazi rezistentni na virusni nadzor antigenske prezentacije u kontekstu MHC molekula razreda I, pružajući na taj način možda i objašnjenje paradoksa učinkovite indukcije CMV-specifičnih CTL-a *in vivo* unatoč postojanju virusnih imunosubverzivnih mehanizama.

Da bi se bolje proučio učinak *m152* gena *in vivo*, metodom homologne rekombinacije konstruirane su delecijske mutante MCMV-a bez ovoga gena te odgovarajući revertantni virusi (126,127). Pritom je prvo konstruirana delecijska mutanta kojoj je na mjesto deletiranog *m152* gena ubačen marker gen *LacZ*, porijeklom iz *E. coli* (označena kao  $\Delta$ MC95.21). U slijedećem koraku iz genoma ove delecijske mutante izbačen je i marker gena, te je tako dobivena delecijska mutanta i bez *m152* i bez *LacZ* gena u virusnom genomu. Ova delecijska mutanta označena je kao  $\Delta$ MC95.24. Vraćanjem *m152* gena u genom proizvedeni su revertantni virusi rMC95.26 (revertantni virus koji u genomu posjeduje marker gen *gpt*) te rMC96.27 (revertantni virus bez marker gena). Southern blot analiza rekombinantnih virusa te PCR metoda potvrdile su legitimnost rekombinacije. Slijedila je *in vitro* karakterizacija virusnih mutanti. Utvrđivanjem kinetike rasta virusa u NIH 3T3 fibroblastima te na stanicama MEF-a ustanovljeno je da *m152* gen nije neophodan za rast virusa u *in vitro* uvjetima. Napravljen je i test citotoksičnosti kojim je ispitivano prepoznavanje i

liza inficiranih stanica od strane CTL-a tijekom IE i E razdoblja ciklusa virusne replikacije. Kao što je već naglašeno *m152* gen identificiran je kao gen odgovoran za blok u prijenosu MHC molekula razreda I tijekom E faze. Stoga je, kako je i očekivano, delecija *m152* gena iz virusnog genoma rezultirala učinkovitom prezentacijom virusnih antigena u kontekstu MHC-I molekula i posljednično učinkovitom lizom inficiranih stanica od strane CTL-a specifičnih za pp89 antigen MCMV-a, i tijekom E faze, tijekom koje stanice inficirane divljim tipom ili revertantnim virusom (koji u svom genomu imaju *m152* gen) nisu bile prepoznate niti lizirane. Učinjena je i imunoprecipitacija iz lizata inficiranih stanica te je pokazano normalno sazrijevanje i prijenos MHC-I molekula u stanicama inficiranim s *m152*-delecijskom mutantom (MHC molekule su postizale Endo-H rezistentnu formu), nasuprot stanicama inficiranim divljim tipom i revertantnim virusom u kojima su MHC molekule razreda I ostajale u nezreloj, Endo-H osjetljivoj formi, uslijed zaostajanja u ERGIC/*cis*-Golgi odjeljku stanice.

Delecijska mutanta bez *m152* gena karakterizirana je i *in vivo*, što je bila tema mog magistarskog rada ("Značaj *m152* gena mišjeg citomegalovirusa u izbjegavanju imunološkog nadzora", Rijeka, 1998.) (126,128). *M152* gen nije važan za rast virusa u potpuno imunokompromitiranim životinjama (kao što nije esencijalan niti za virusnu replikaciju u kulturi stanica). U imunokompetentnim miševima *m152*-delecijska mutanta postiže značajno niži titar u odnosu na divlji tip i revertantni virus (revertantni virus pritom u potpunosti pokazuje fenotip divljeg tipa MCMV-a). Nakon deplecije limfocita T, titar delecijske mutante izrazito poraste i izjednači se s titrom revertantnog virusa. Atenuacija *m152*-delecijske mutante također ne postoji niti u CD8 knockout miševima, niti u  $\beta$ 2-mikroglobulin deficitnim miševima (kod kojih uslijed nedostatka  $\beta$ 2-mikroglobulina ne dolazi do ispoljavanja MHC molekula razreda I na površini stanica niti do razvoja CD8<sup>+</sup> limfocita T). U odnosu na revertantni virus,  $\Delta$ *m152* virus osjetljiviji je na nadzor posredovan CD8<sup>+</sup> limfocitima T. Pokus adoptivnog prijenosa stanica slezene pokazao je da je *m152*-delecijska mutanta osjetljivija na kontrolu i imunim i neimunim splenocitima u odnosu na svoju revertantu (126,128).

#### 1.3.1.2.2. *m06* gen

*m152* gen nije jedini imunosubverzivni gen mišjeg CMV-a. Tijekom ranog (E) razdoblja ciklusa umnažanja virusa, nešto kasnije od *m152* gena, ispoljava se *m06* gen, čiji glikoproteinski produkt od 48 kDa također interferira s putem antigenske prezentacije u kontekstu MHC molekula razreda I (7). *m06* gen smješten je unutar *HindIII*-A regije MCMV genoma i pripada *m02* genskoj obitelji. Sinteza gp48 počinje unutar prva 3 sata poslije infekcije, doseže maksimum 3-6 sati poslije infekcije i nastavlja se za cijelo vrijeme replikacijskog ciklusa virusa. Gp48 veže se na MHC-I molekule u ER-u, pri čemu je važan transmembranski i luminalni dio ovog transmembranskog glikoproteina tipa I. Tako nastao kompleks MHC molekule razreda I i gp48 prenosi se zatim iz ER-a u Golgi, međutim umjesto da stigne do površine inficirane stanice i na njoj se ispolji, usmjerava se u endocitozni put i ubrzo razgradi u Lamp-1<sup>+</sup> odjeljku stanice (*engl.* lysosomal-associated membrane protein). Na ovaj način stanice u kojima se eksprimira *m06* gen onemogućene su u prezentaciji virusnih antigena na svojoj površini te samim tim i zaštićene od lize posredovane CD8<sup>+</sup> limfocitima T. Iako se smatra da je učinak *m06* gena na MHC-I vezanu prezentaciju antigena snažniji od istoga *m152* gena, niti *m06* gen, poput *m152* gena nema učinka u makrofazima (125). Budući je opaženo da se gp48 može vezati na teški lanac MHC molekule H-2L<sup>d</sup> koji nije vezan s peptidom, postoje spekulacije da gp48 interferira i s recikliranjem praznih teških lanaca MHC molekula razreda I u endolizosomima (7).

#### 1.3.1.2.3. *m04* gen

Treći do sada poznati gen MCMV-a s učinkom na prezentaciju antigena u kontekstu MHC-I molekula jest *m04* gen (43). *m04* gen smješten je unutar *HindIII*A regije MCMV genoma i kodira glikoprotein tipa I od 34 kDa. Ekspresija *m04* gena započinje također tijekom ranog (E) razdoblja ciklusa replikacije virusa, ali kasnije od ekspresije *m152* gena. Gp34 sintetizira se u velikim količinama tijekom MCMV

infekcije i napušta ER jedino čvrsto vezan na MHC molekule razreda I koje moraju biti udružene s  $\beta$ 2-mikroglobulinom. Do sada se uspjelo koimunoprecipitirati gp34 s  $D^d$  i  $L^d$ , ali ne i  $K^d$  molekulama. MHC molekule razreda I u kompleksu s gp34 uspijevaju izbjeći blok u prijenosu posredovan djelovanjem imunosubverzivnih gena *m152* i *m06*, te se ispoljiti na površini virusom inficirane stanice. Iz ovoga prizlazi da se *m04* gen svojim učinkom suprotstavlja djelovanju dva prethodno navedena gena, možda sa svrhom izbjegavanja lize inficirane stanice posredovane NK-stanicama. Poznata je još jedna uloga *m04* gena (42). Kao što je već i navedeno u odjeljku o prezentaciji MCMV antigena, utvrđeno je da od gp34 nastaje antigenični nonapeptid koji se prezentira u kontekstu MHC molekule  $D^d$ . Ovaj nonapeptid drugi je antigenični peptid opisan za MCMV (uz nonapeptid dobiven od pp89), i prvi peptid E razdoblja za kojeg je pokazano da može izbjeći virusne mehanizme izbjegavanja imunološkog nadzora.

Najnoviji rezultati sugeriraju da *m04* gen ima i izravan učinak u izbjegavanju imunološkog nadzora posredovanog  $CD8^+$  limfocitima T (M. Wagner, osobno priopćenje). Pokazano je da je gp34 potreban za potpuno onemogućavanje prezentacije antigena u kontekstu  $K^b$  molekula. Budući *m152* gen prvenstveno blokira prienos  $D^b$  molekula, a da je slabog učinka na  $K^b$  molekule, MCMV-u je bio neophodan još jedan gen, *m04*, čiji produkt prvenstveno djeluje upravo na  $K^b$  molekule, da bi mogao spriječiti prezentaciju antigena u kontekstu MHC molekula razreda I.

### **1.3.2. CMV i izbjegavanje imunološkog nadzora posredovanog NK-stanicama**

Kao što je poznato i prethodno opisano, NK-stanice prepoznaju na površini stanica također MHC molekule razreda I, ali na način različit od limfocita T. Naime ukoliko ove molekule nisu promijenjene i prisutne su na stanici, preko inhibicijskih NK-receptora zaštićuju stanicu od NK-stanične lize. Stoga je logično za očekivati da će mehanizmi kojima virus ometa prezentaciju antigena u kontekstu MHC-I molekula,

koliko god bilo povoljno za virus u smislu izbjegavanja CD8<sup>+</sup> limfocita T, biti za njega nepovoljno što se tiče nadzora posredovanog NK-stanicama. Odnosno, neispoljavanjem MHC molekula razreda I na površini inficirane stanice izostat će inhibicijski signal te će takva stanica biti podložna NK-staničnoj lizi. Ukoliko se virus ne bi istovremeno zaštitio i od nadzora NK-stanica, i izbjegavanje limfocita T na prethodno opisane načine bilo bi besmisleno. Stoga sasvim sigurno postoje načini na koje CMV nastoji izbjeći NK-stanice, a do sada je poznato nekoliko takvih mehanizama.

Prije nekoliko godina otkriveno je postojanje virusnih homologa MHC molekula razreda I (129,130,131). Kod HCMV-a kodira ga gen *UL18*, a kod MCMV-a gen *m144*. Funkcija ovih MHC-I homologa bila bi ispoljavanje na površini inficirane stanice u vrijeme kada su aktivni ostali virusni immunosubverzivni geni koji ometaju prezentaciju normalnih MHC molekula razreda I, te bi ove virusne surogatne molekule trebale "prevariti" NK-stanice i inhibirati njihovu citotoksičnost, a istovremeno nisu dovoljno specifične da bi aktivirale limfocite T. Iako je postavljena teorija logična i temeljena na nekoliko znanstvenih radova (130,131) ipak postoje dvojbe u njenu ispravnost, pogotovo za gen humanog CMV-a *UL18*. Glikoproteinski produkt *UL18* gena veže se (poput teškog lanca MHC-I molekule) na  $\beta$ 2-mikroglobulin te veže peptide. U prvim radovima koji su ga opisivali, kao njegov NK-stanični receptor navodila se molekula CD94 (130), da bi se kasnije ustanovilo da je najvažniji receptor za *UL18* molekula LIR-1 (65). LIR-1 receptor pretežno se ispoljava na površini monocita i limfocita B, te je stoga moguće da *UL18* ima još neku drugu do sada nepoznatu funkciju, neovisnu s interferiranjem s NK-staničnom imunološkom kontrolom. U skladu s ovom pretpostavkom su i rezultati druge grupe znanstvenika, koji su pomoću delecije mutante virusa bez *UL18* te stanica transficiranih s *UL18* genom pokazali povezanost ispoljavanja *UL18* genskog produkta i pojačane osjetljivosti na NK-staničnu citotoksičnost (132).

*m144* gen mišjeg CMV-a po mnogo čemu je nalik na *UL18* (131). Kodira homolog teškog lanca MHC molekule razreda I, veže se s  $\beta$ 2-mikroglobulinom, ali za razliku od produkta *UL18*, zbog delecije unutar  $\alpha$ 2 domene ne može vezati peptid (133). Pokusi izvedeni *in vivo*, korištenjem delecije mutante virusa bez *m144*



gena, pokazali su da je atenuacija mutantnog virusa posljedica pojačane osjetljivosti na nadzor posredovan NK-stanicama, te je tako dokazana uloga *m144* gena u izbjegavanju NK-staničnog imunološkog odgovora (131). Pokazana je i protektivna uloga produkta *m144* gena ispoljenog na površini TAP-deficitnih tumorskih stanica (posljedično bez ispoljenih MHC molekula razreda I na svojoj površini), koji je tumor zaštitio od odbacivanja posredovanog NK-stanicama (134). Također ekspresija *m144* gena na površini stanica može *in vivo* kompromitirati nakupljanje i aktivaciju NK-stanica (134).

Jedan od načina na koji se virus može zaštititi od NK-stanica jest i selektivnost njegovih imunosubverzivnih gena, na način da blokira prijenos klasičnih, polimorfnih MHC molekula razreda I, ali istovremeno propusti neklasične MHC-I molekule (Qa-1<sup>b</sup> kod miša ili HLA-E kod čovjeka) do površine inficirane stanice. Izostanak ispoljavanja klasičnih MHC-I molekula onemogućio bi prepoznavanje inficirane stanice od strane limfocita T, a prisutnost neklasičnih MHC molekula putem CD94/NKG2A receptora uzrokovala bi inhibiciju djelovanja NK-stanica. Tako bi jedan gen teoretski mogao poslužiti virusu za izbjegavanje i CD8<sup>+</sup> limfocita T i NK-stanica. Iako je ova teorija veoma privlačna, do sada postoje dokazi o ovako selektivnom djelovanju samo za dva CMV imunosubverzivna gena – *US2* i *US11* i to samo na stanicama trofoblasta (117). Stanice trofoblasta ispoljavaju na svojoj površini veću količinu neklasičnih MHC-I molekula od ostalih tkiva, što je vjerojatno uvjetovano njihovom specifičnom lokalizacijom i funkcijom, odnosno potrebom za inhibicijom NK-stanične citotoksičnosti. Stoga bi posljedice izostanka ispoljavanja MHC-I molekula upravo na ovim stanicama, zbog aktivacije NK-stanica, mogle biti fatalne za plod. Poznata je također i selektivna aktivnost na MHC-I molekule tijekom infekcije s virusom HIV-1 (135).

Ustanovljen je još jedan potencijalni način na koji virus može izbjeći NK-stanice koristeći pritom neklasične MHC-I molekule. Kao što je poznato, neklasične MHC molekule razreda I, da bi se mogle ispoljiti na površini stanice, na sebe vežu nonapeptid točno određenog slijeda aminokiselina, dobiven iz "leader" sekvence klasičnih MHC-I molekula (88,89). U genomu humanog CMV-a pronađen je gen *UL40*, a u "leader" sekvenci njegovog glikoproteinskog produkta nalazi se

nonamerni peptid koji u potpunosti odgovara peptidu koji se veže na HLA-E molekulu (136). gpUL40, neovisno o TAP molekuli, može uvjetovati pojačanu ekspresiju HLA-E molekule, štiteći tako inficiranu stanicu od NK-stanične lize, uz istovremeno smanjeno ispoljavanje klasičnih MHC-I molekula na površini istih stanica.

Važnost inhibicijskih receptora na NK-stanicama poznata je već duže vrijeme. Međutim tek u posljednje vrijeme sve se više naglašava i uloga aktivacijskih receptora, te se smatra da za aktivaciju NK-stanica nije dostatan samo izostanak inhibicije nego je neophodna i aktivacija putem aktivacijskih receptora. Ako je ova hipoteza točna, onda izostanak ekspresije MHC-I molekula na površini stanica (konstitucijski ili djelovanjem virusnih imunosubverzivnih gena) sam po sebi ne bi bio dovoljan da aktivira NK-stanicu, već bi istovremeno bilo potrebno i ispoljavanje liganda za određeni aktivacijski NK-stanični receptor. MICA i MICB su ligandi za NK-aktivacijski receptor NKG2D, koji se inducibilno ekspimiraju na površini stanica, pa tako i CMV infekcija može inducirati njihovu ekspresiju i posljedičnu aktivaciju NK-stanica (91,92,95). Osim MIC molekula na NKG2D receptor vežu se i ULBP molekule (93). Na ULBP molekule veže se produkt *UL16* gena humanog CMV-a (*UL16* veže se i na MICB). Hipotetski, moguće je pretpostaviti da tijekom CMV infekcije, osim smanjene ekspresije MHC-I molekula, dolazi istovremeno i do inducirane ekspresije liganada za aktivacijske receptore NK-stanica (humanih MIC molekula, mišjih Rae-1 ili H60 (92,94)) što je za virus nepovoljno zbog posljedične aktivacije NK-stanica. Stoga virus eksprimira određeni gen (kod humanog CMV-a gen *UL16* (93)) čiji produkt sprječava vezanje inducibilnog liganda na aktivacijski NK-receptor te virus izbjegava lizu posredovanu NK-stanicama (137).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Citomegalovirusi, kao i drugi herpesvirusi, u svom genomu posjeduju gene kojima nastoje izbjeći imunološki nadzor domaćina (103,104,105). Budući su u imunološkom nadzoru citomegalovirusne infekcije najvažniji limfociti T, i to posebno njihova CD8<sup>+</sup> subpopulacija (koja prepoznaje antigene u kompleksu s MHC-I molekulama), logično je da su citomegalovirusi razvili upravo mehanizme kojima ometaju proces prerade antigena i njihove prezentacije na površini inficirane stanice u kompleksu s MHC molekulama razreda I (106,107). Geni mišjeg CMV-a s ovom funkcijom su *m04*, *m06* i *m152*.

Produkt *m06* gena (gp48) veže se u ER-u na MHC molekulu razreda I i skreće ju u endolizosome, gdje se MHC-I molekula ubrzo razgradi (7). Produkt *m152* gena (gp40) blokira prijenos trimolekularnog MHC-I kompleksa na njegovom putu prema staničnoj membrani u području ERGIC/*cis*-Golgi odjeljka (6). Produkt *m04* gena (gp34) veže se u ER-u na MHC-I molekulu, te takva MHC-I molekula izbjegava blok u prijenosu posredovan djelovanjem *m06* i *m152* gena i ispoljava se na površini inficirane stanice (43). Mada je ovaj učinak *m04* gena u suprotnosti s djelovanjem preostala dva navedena imunomodulacijska gena, moguće je da on inficiranu stanicu štiti od NK-stanica (42). Najnoviji rezultati pokazuju da gp34 inhibira antigensku prezentaciju u kontekstu K<sup>b</sup> molekula. Prema tome *m04*, *m06* i *m152* gen ometaju prezentaciju trimolekularnog MHC-I kompleksa na površini stanice što inficiranu stanicu štiti od CD8<sup>+</sup> limfocita T.

Metodom homologne rekombinacije proizvedeni su rekombinantni virusi s delecijom *m04*, *m06* ili *m152* gena (127). Koristeći ove rekombinantne viruse željeli smo ispitati ulogu navedenih gena, a posebno *m152* gena, u izbjegavanju imunološkog nadzora posredovanog limfocitima T i NK-stanicama *in vivo*. Do sada smo pokazali da je delecijska mutanta za *m152* gen *in vivo* atenuirana, što je posljedica pojačane osjetljivosti ovog virusa na nadzor posredovan CD8<sup>+</sup> limfocitima T (126,128). Utjecaj *m06* i *m04* gena na nadzor posredovan CD8<sup>+</sup> limfocitima T *in vivo*, te eventualni učinak bilo kojeg od ova tri imunomodulacijska gena na NK-stanični nadzor do sada nisu poznati.

S obzirom na ranu osjetljivost prema MCMV-u, konvencionalni sojevi miševa se mogu podijeliti u MCMV-otporne sojeve (npr. C57BL/6 miševi) te MCMV-osjetljive sojeve (npr. BALB/c miševi), a otpornost/osjetljivost na MCMV ovisna je o sposobnosti pojedinih miševa da generiraju protuvirusni odgovor NK-stanicama. Otpornost na MCMV pripisuje se produktu *Cmv1* (*Ly49-h*) gena, te rezistentni sojevi miševa posjeduju dominantni *Cmv1<sup>f</sup>* alel, a senzitivni sojevi recesivni *Cmv1<sup>s</sup>* alel. Mutacija *Cmv1<sup>f</sup>* gena u miševa otpornih na MCMV rezultira povećanjem osjetljivosti na virus (78). Nije međutim jasno što sputava životinje sa *Cmv1<sup>s</sup>* alelom da izvrše antivirni odgovor NK-stanicama budući da posjeduju druge NK-receptore s inhibicijskim ili aktivacijskim potencijalom.

U ovom radu postavili smo si pitanje da li je nemogućnost BALB/c soja da izrazi snažan NK-odgovor isključivo posljedica nedostatnog repertoara NK-receptora ili možda sam virus uspješno inhibira NK-stanice. U tom smislu posebno nas je zanimala uloga MCMV gena čiji produkti interferiraju s MHC-I prezentacijom (*m04*, *m06*, *m152* geni). Naime onemogućavanje prezentacije antigena u kompleksu s MHC molekulama razreda I na površini inficirane stanice štiti stanicu od imunološkog nadzora posredovanog CD8<sup>+</sup> limfocitima T, ali ju čini osjetljivom na nadzor posredovan NK-stanicama. Stoga se može pretpostaviti da je MCMV tijekom koevolucije sa svojim domaćinom uspio razviti mehanizme opiranja i NK-stanicama i CD8<sup>+</sup> limfocitima T. Ovo je tim više važno budući MCMV uspostavlja latenciju te je izmicanje nadzora NK-stanica i limfocita T važno ne samo tijekom primarne infekcije već i za reaktivaciju latentnog virusa.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Uređaji**

Automatski ispirać ELISA ploča, Awareness  
Centrifuga, Jouane  
FACS-uređaj, Becton-Dickinson  
Hladnjak -80<sup>0</sup>C, Sanyo  
Inkubatori, Jouane i Heraeus  
Invertni mikroskop, Olympus  
Komora za držanje miševa u sterilnim uvjetima  
Komore za rad u sterilnim uvjetima, Heraeus i Ehret  
Magnetska mješalica, Ikamag  
Optički čitač za ELISA ploče, Awareness  
Pipete, Gilson i Eppendorf  
Pipetor, Technomara  
Stolna centrifuga Eppendorf  
Termoblok, Eppendorf  
Ultracentrifuga, Beckman  
Vaga, Mettler  
Vodena kupelj, Koettermann  
Vorteks, Asid

#### **3.2. Plastično laboratorijsko posuđe**

Eppendorf epruvete od 0,5; 1,5 i 2 ml  
Epruvete od 5 i 10 ml, Golias  
Epruvete od 50 ml, Greiner  
Epruvete za FACS, Becton-Dickinson  
Epruvete za smrzavanje stanica od 2 ml, Costar

Petrijeve posude za staničnu kulturu promjera 90 i 145 mm, Greiner  
Plastične bočice za uzgoj hibridoma volumena 50 i 250 ml, Greiner  
Ploče od 24 rupice za staničnu kulturu, Costar  
Ploče od 48 rupica za staničnu kulturu, Costar  
Ploče od 96 rupica za staničnu kulturu, Greiner  
Ploče od 96 rupica za ELISU, Golias

### 3.3. Kemikalije

Amonij klorid,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Kemika  
Amonijev sulfat,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Kemika  
Barij klorid,  $\text{BaCl}$ , Kemika  
Blokirajući reagens za ELISU, Boehringer  
Dimetilsulfoksid (DMSO), Merck  
Etilendiaminotetraacetat- $\text{Na}_2$  (EDTA), Serva  
Fetalni teleći serum (FCS), Gibco  
Fosfonoacetična kiselina (PAA), Sigma  
Gentamicin sulfat, Serva  
Heparin, Belupo  
Hepes, Serva  
Inkompletni Freundov adjuvans (IFA), Sigma  
Kalcij klorid,  $\text{CaCl}_2$ , Kemika  
Kompletni Freundov adjuvans (CFA), Sigma  
L-Glutamin, Merck  
Limunska kiselina,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ , Kemika  
Merkaptoetanol, Merck  
Metil celuloza, Fluka  
Natrij azid,  $\text{NaN}_3$ , Difco  
Natrij dihidrogenfosfat-2-hidrat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , Kemika  
Natrij klorid,  $\text{NaCl}$ , Kemika

O-fenildiamin (OPD), Sigma  
Penicilin-streptomycin, Serva  
Poli I:C, Sigma  
Pristan, Sigma  
Propidij jodid, Serva  
Sukroza, Merck  
Sulfatna kiselina, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Kemika  
Tripansko modriilo, Serva  
Tripsin, Boehringer  
Tween-20 (polioksietilen-sorbitan monolaureat), Sigma  
Vodikov peroksid (30%), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Kemika

### **3.4. Mediji za uzgoj stanica**

#### **Kompletni DMEM medij**

DMEM medij, 10% fetalni teleći serum (FCS), 0,05 g/l gentamicin sulfat, 0,1 g/l streptomycin sulfat,  $1 \times 10^5$  U/l penicilin, 10 mM hepes (pH 7,2), 2 mM L-glutamin

#### **Kompletni MEM medij**

MEM medij, 3% fetalni teleći serum (FCS), 0,05 g/l gentamicin sulfat, 0,1 g/l streptomycin sulfat,  $1 \times 10^5$  U/l penicilin, 2 mM L-glutamin

#### **Kompletni RPMI medij**

RPMI 1640 medij, 10% fetalni teleći serum (FCS), 0,05 g/l gentamicin sulfat, 0,1 g/l streptomycin sulfat,  $1 \times 10^5$  U/l penicilin, 10 mM hepes (pH 7,2), 2 mM L-glutamin,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-merkaptetanol

### **Medij za zamrzavanje stanica**

70% RPMI 1640 medij, 20% fetalni teleći serum (FCS), 10% dimetilsulfoksid (DMSO)

### **Metil-celulozni medij**

MEM, 2,2% metil-celuloza, 10% FCS

### **Medij za FACS**

PBS, 10mM EDTA, 20 mM hepes (pH 7,2), 2% fetalni teleći serum (FCS), 0,1% natrij azid ( $\text{NaN}_3$ )

## **3.5. Pufferi**

### **Bikarbonatni pufer, pH 9,6**

0,5 mM natrij karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 45 mM natrij hidrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )

### **Citratni pufer, pH 5,0**

50 mM limunska kiselina ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ ), 50 mM natrij hidrogenfosfat-2-hidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )

### **Otopina za liziranje eritrocita**

140 mM amonij klorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), 27 mM kalij klorid ( $\text{KCl}$ ), 1,5 mM kalij dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 6,5 mM natrij hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 0,7 mM magnezij klorid ( $\text{MgCl}_2$ ), 0,7 mM kalcij klorid ( $\text{CaCl}_2$ )

### **Otopina OPD (supstrat za peroksidazu), pH 5,0**

citratni pufer, 0,3 mg/ml OPD, 0,88  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$



**PBS (fosfatima puferirana fiziološka otopina), pH 7,2**

140 mM natrij klorid (NaCl), 2,7 mM kalij klorid (KCl), 6,5 mM natrij hidrogen fosfat-2-hidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), 1,5 mM kalij dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0,7 mm kalcij klorid ( $\text{CaCl}_2$ ), 0,7 mM magnezij klorid-6-hidrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )

**VSF pufer, pH 7,8**

50 mM TRIS-klorovodična kiselina (TRIS-HCl), 12 mM kalij klorid (KCl), 5mM natrij-EDTA ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )

**3.6. Monoklonska protutijela i poliklonski serumi**

anti-AGM1, kunićji protuserum, Wako Chemicals

anti-mišji CD4-PE, Becton Dickinson

anti-mišji CD8-FITC, Becton Dickinson

anti-mišji DX 5-biotin, Pharmingen

anti-mišji NK 1.1-PE, Pharmingen

anti-mišji IgG, Boehringer

anti-mišji IgG-POD, Boehringer

anti-mišji IgM, Sigma

anti-mišji IgM-POD, Sigma

anti-štakorski IgG, Medac

anti-štakorski IgG-POD, Medac

anti-Qa1<sup>b</sup>-PE, (nabavljen ljubaznošću dr. Jamesa Formana, USA)

mišji IgG, Southern Biotechnology Associates

mišji IgG-FITC/PE, Becton Dickinson

NKG2D-PE tetramer, (nabavljen ljubaznošću dr. Dirka Buscha, Njemačka)

streptavidin-FITC, Pharmingen

streptavidin-PE, Pharmingen

štakorski IgG, Southern Biotechnology Associates

### 3.7. Virusi

U pokusima smo koristili divlji tip MCMV-a Smith soja (ATCC VR-194, Rockville, MD), deleciju mutanta za *m152* gen ( $\Delta$ MC95.24) te njoj odgovarajući revertantni virus (rMC96.27). Također smo koristili i delecije mutante za *m04* gen ( $\Delta$ MC95.33), za *m06* gen ( $\Delta$ MC96.61) te virusni soj s deletiranom cijelom obitelji imunosubverzivnih gena za MHC molekule razreda I ( $\Delta$ MC96.54).

#### 3.7.1. MCMV rekombinantni virusi

Budući je produkcija MCMV rekombinanti opisana u ranijim radovima (126, 127) ovdje će proces njihove proizvodnje biti samo sažeto naveden. Metodom homologne rekombinacije kreiran je rekombinantni virus s delecijom *m152* gena ( $\Delta$ MC95.24) te revertantni virus (rMC96.27). Pritom je korišten rekombinacijski plazmid p152KO. U ovom plazmidu je 1,2 kb dio *m152* gena bio zamijenjen marker genom *LacZ* porijeklom iz *E. coli*, koji je s obje strane bio omeđen *loxP* mjestima. Tako je prvo proizvedena delecijaska mutanta bez *m152* gena na čije je mjesto bio ubačen *LacZ* gen. Pasažom ove delecijske mutante kroz N2-7 stanice koje ispoljavaju rekombinazu *cre*, iz virusnog genoma je isječen marker gen *LacZ* te proizvedan rekombinantni virus bez *m152* gena i bez marker gena, nazvan  $\Delta$ MC95.24. Revertantni virus proizveden je vraćanjem *m152* gena u deleciju mutanta. Istovremeno je u virusni genom ubačen marker gen *gpt*, okružen s obje strane *loxP* mjestima. Pasažom ovako dobivenog revertantnog virusa kroz staničnu liniju N2-7 (rekombinaza *cre*<sup>+</sup>) iz virusnog genoma je odstranjen *gpt* gen te je tako nastao revertantni virus bez marker gena, nazvan rMC96.27.

Na sličan način, korištenjem odgovarajućih rekombinacijskih plazmida proizvedene su i ostale prethodno navedene delecijske mutante za *m04*, *m06* te (*m03-m06* i *m152*) gene (127).

U pojedinim pokusima koristili smo MCMV rekombinantne viruse (delecijske mutante za *m04*, *m06*, *m152* gen te divlji tip MCMV-a MW 97.01) dobivene

kloniranjem i mutagenezom MCMV genoma kao bakterijskog arteficialnog kromosoma (BAC) u *E. coli* te transfekcijom odgovarajućih MCMV BAC plazmida u mišje embrionalne fibroblaste (138,139).

### 3.7.2. Umnožavanje virusa

Nakon što su virusi bili proizvedeni bilo ih je potrebno umnožiti da bismo ih imali u dovoljnoj količini za izvođenje pokusa. Za to smo koristili mišje embrionalne fibroblaste porijeklom iz BALB/c miševa.

Stanice smo inficirali s virusom u dozi od 0,01 PFU/stanici, te inkubirali na 37°C kroz 4-5 dana. Zatim smo pokupili supernatant te ga centrifugirali na 200 x g tijekom 10 minuta da bismo se riješili inficiranih stanica koje su se odlijepile od podloge. Nadtalog smo ultracentrifugirali na 72 000 x g kroz 90 minuta, na 4°C kako bi iztaložili virus. Virusni talog resuspendirali smo u "posljednjoj kapi" (cca 300 µl) te ostavili na ledu 12 sati. Nakon toga smo ga nadslojili na sterilnu 15% sukrozu u VSB puferu, te utracentrifugirali 90 minuta na 4°C. Tako dobiveni virusni talog ostavili smo u kapi PBS-a tijekom noći, a onda dobro resuspendirali i profiltrirali kroz filter od 45 µm. Alikvote virusa (25 µl) smo do upotrebe držali na -80°C. Titar virusa odredili smo testom virusnih čistina.

### 3.7.3. Infekcija miševa virusom

Miševe smo injicirali s  $10^5 - 5 \times 10^5$  PFU virusa intraperitonealno, potkožno ("footpad") ili intravenski (ovisno o protokolu pojedinog pokusa) u ukupnom volumenu od 0.5 ml medija bez FCS-a (u slučaju potkožne infekcije u 50 µl).

### 3.8. Laboratorijske životinje

U pokusima su korišteni miševi genetski čistih sojeva uzgojeni u Središnjem vivariju Medicinskog fakulteta u Rijeci: BALB/c (H-2<sup>d</sup>), C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>), DBA/2 (H-2<sup>d</sup>), A/J (H-2<sup>a</sup>), BALB.B (H-2<sup>b</sup>) te F1 hibridi dobiveni križanjem čistih sojeva: (BALB/c x C57BL/6) i (BALB/c x CBA/J). Koristili smo i atimične, *nude* miševе (*nu/nu*) (BALB/c genska pozadina) kojima osim karakterističnog nedostatka dlake, izostaje normalan razvoj timusa te stoga nemaju limfocita T (140).

Pokuse smo izveli i na kongeničnim sojevima miševa (BALB.B6-*Cmv1*<sup>f</sup> i B6.BALB-*Cmv1*<sup>s</sup>) (141) te sojevima miševa s rekombinacijama unutar NK-kompleksa (intra-NKC rekombinantni sojevi): BALB.B6-CT1, -CT3, -CT6, -CT8, -CT12, -CT13 (142) koje nam je ustupio dr. Anthony Scalzo (University of Western Australia, Nedlands, Australija). BALB.B6-*Cmv1*<sup>f</sup> miševi genetski su jednaki miševima BALB/c soja osim u distalnom dijelu 6. kromosoma, na kojem je smješten NK-kompleks, a koji je prenesen s miševa C57BL/6 soja (141). Intra-NKC rekombinantni sojevi međusobno se razlikuju po kombinacijama BALB/c i C57BL/6 alela unutar NK-kompleksa.

Osim navedenih sojeva koristili smo i miševе dobivene transgeničnom tehnologijom:

1. Ljubaznošću dr. Rudolfa Jaenisch (Whitehead Institute of Biomedical Research, Cambridge, USA) omogućeno nam je izvođenje pokusa na miševima s mutiranim genom za  $\beta$ 2-mikroglobulin (na C57BL/6 genskoj osnovi), kod čijih homozigota uslijed navedene mutacije izostaje sinteza  $\beta$ 2-mikroglobulina te posljedično i nazočnost MHC molekula razreda I na površini stanica (16,17). Prijenosom mutacije kroz veći broj generacija na BALB/c miševе proizveli smo i  $\beta$ 2-mikroglobulin deficitne miševе na BALB/c genskoj pozadini.

2. H-2K<sup>b</sup> KO (knockout) miševi (C57BL/6 genska pozadina) dobiveni su mutacijom H-2K<sup>b</sup> gena, a H2D<sup>b</sup> KO miševi mutacijom H2D<sup>b</sup> gena. Međusobnim križanjem ova dva soja proizvedeni su H-2K<sup>b/-</sup>D<sup>b/-</sup> miševi, koji na površini svojih stanica ne ispoljavaju MHC molekule razreda I D<sup>b</sup> i K<sup>b</sup> (143). Ove sojeve ustupio nam je dr. Francois Lemonnier (Institut Pasteur, Paris, Francuska).

4.  $\text{IFN}\gamma\text{R}^{-/}$  miševi (129 genska pozadina) dobiveni su mutacijom gena za  $\text{IFN}\gamma$  receptor. Uslijed toga kod ovih miševa izostaje učinak  $\text{IFN}\gamma$  na stanice (144).

5. Mutacijom gena za TAP1 molekulu dobiveni su  $\text{TAP1}^{-/}$  miševi (C57BL/6 genska pozadina). Kod ovih miševa poremećen je proces prezentacije antigeničnih peptida u kontekstu MHC molekula razreda I, budući je za njihovo normalno procesiranje unutar stanice potreban TAP, te su kao posljedica toga odsutne MHC molekule razreda I s površine stanica (145). Također smo koristili i  $\text{TAP1}$  deficitne miševe na BALB/c genskoj osnovi, koji su dobiveni prijenosom mutacije  $\text{TAP1}$  s miševa C57BL/6 genske pozadine na BALB/c mišji soj kroz 6 generacija.

Osim miševa, za proizvodnju monoklonskih protutijela čiji su hibridomi štakorskog porijekla koristili smo i štakore i to hibride sojeva Lou i DA. Za proizvodnju protuseruma na AGM1 koristili smo kuniće.

### 3.8.1. Testiranje $\beta 2\text{m}^{-/}$ , $\text{H-2K}^{\text{b-/-}}\text{D}^{\text{b-/-}}$ i $\text{TAP1}^{-/}$ miševa

Kao što je već navedeno uslijed mutacija gena za  $\beta 2$ -mikroglobulin (16,17), za  $\text{K}^{\text{b}}$  i  $\text{D}^{\text{b}}$  molekule (143), ili za  $\text{TAP1}$  (145) kod ovih mišjih sojeva na površini stanica nisu ispoljene MHC molekule razreda I (kod  $\text{H2K}^{\text{b-/-}}\text{D}^{\text{b-/-}}$  miševa ova tvrdnja vrijedi samo za klasične MHC molekule budući je na površini njihovih stanica pokazana prisutnost neklasičnih MHC molekula razreda I:  $\text{Qa1}^{\text{b}}$ ,  $\text{TI}$  (143)). Iako smo životinje uzgajali u homozigotnim rasplodima odsutnost klasičnih MHC molekula razreda I ipak smo potvrdili protočnom citometrijom.

U Petrijevim posudama uzgajali smo embrionalne fibroblaste (MEF) iz navedenih sojeva miševa, te ih tripsinizirali i stanice sakupili u epruvete. Broj stanica u svakoj epruveti podesili smo na  $10^6$ , na njih dodali antitijela na MHC molekule razreda I (ovisno o genskoj pozadini soja): protutijela na  $\text{H-2K}^{\text{b}}$  (ascites proizveden od hibridoma B8-24-3) razrijeđen 1:500 u FACS mediju, protutijelo na  $\text{H-2K}^{\text{d}}$  (ascites proizveden od hibridoma MA2.15) ili protutijelo na  $\text{K}^{\text{b}}\text{D}^{\text{b}}$  (ascites proizveden od hibridoma 20-8-4s) te inkubirali 30 minuta na  $4^{\circ}\text{C}$ . Stanice smo zatim dvaput isprali u

FACS mediju te na njih dodali 3  $\mu$ l anti-mišjeg IgG-FITC. Nakon inkubacije od 30 minuta na 4°C, stanice smo ponovno dvaput isprali, propustili kroz najlonsku mrežicu te resuspendirali u 1 ml FACS medija uz dodatak propidijevog jodida. Uzorke smo očitali na FACS uređaju (Becton Dickinson), uzimajući pri svakom očitavanju po 10 000 stanica, te isključujući mrtve stanice (obojene propidij jodidom), ustanovili nedostatak ili nazočnost MHC molekula razreda I na površini embrionalnih fibroblasta.

Uslijed nedostatka MHC molekule razreda I na površini stanica izostaje i normalan razvoj CD8<sup>+</sup> limfocita T u timusu. Analizom CD8<sup>+</sup> stanica kod  $\beta$ 2m<sup>-/-</sup> miševa također smo pratili prisutnost navedene mutacije. Miševima smo uzeli iz repne vene po 100-200  $\mu$ l krvi u Eppendorf epruvete, uz dodatak 20  $\mu$ l 0,5 M EDTA. Krv smo zatim centrifugirali i na talog stanica dodali 3  $\mu$ l anti-mišjeg CD8-FITC protutijela. Nakon inkubacije od 30 minuta na 4°C stanice smo dvaput isprali u FACS mediju, te zatim lizirali prisutne eritrocite. Za to smo koristili otopinu za liziranje eritrocita (Becton Dickinson) koju smo prvo razrijedili 10 puta, te na talog stanica nanijeli 1 ml takve otopine. Nakon 5 minuta na sobnoj temperaturi stanice smo 5 minuta vrtili na 4000 okretaja/minuti u Eppendorf centrifugi, te ponovno dvaput isprali u FACS mediju. Konačno smo ih resuspendirali u 1 ml FACS medija uz propidij jodid, te po 10 000 limfocita analizirali pomoću FACS-uređaja na prisutnost CD8 biljega.

### 3.9. Stanice

Stanice smo uzgajali u plastičnim posudama za kulturu tkiva u inkubatoru na temperaturi od 37°C, uz 5% CO<sub>2</sub> i vlažnost od 90%. Redovito smo ih dohranjivali, a vrsta korištenog hranjivog medija ovisila je o tipu stanica (za mišje embrionalne fibroblaste 3% MEM, a za hibridome 10% RPMI ili 10% DMEM). Prema potrebi stanice su zamrzavane u mediju za smrzavanje i pohranjivane u tekućem dušiku. Prije ponovne upotrebe stanice bi naglo odmrzli, isprali u odgovarajućem hranjivom mediju i iznova kultivirali.

### 3.9.1. Mišji embrionalni fibroblasti

Mišje embrionalne fibroblaste (MEF) koristili smo za proizvodnju virusa, test virusnih čistina (za detekciju virusa) te kao stanice koje smo nakon infekcije intravenski injicirali u životinje. Za proizvodnju MEF-a koristili smo skotne ženke kojima smo 17-18. dana skotnosti sterilno izvadili fetuse. Ovisno o namjeni koristili smo ženke različitih mišjih sojeva kako će biti navedeno kod pojedinih pokusa (BALB/c, C57BL/6, (BALB/c x C57BL/6), BALB.B, BALB/c-*H-2<sup>Dm2</sup>*,  $\beta 2m^{-/-}$ ,  $H2K^{b-/-}D^{b-/-}$ ,  $TAP1^{-/-}$ ), ali smo rutinski za proizvodnju virusa i test virusnih čistina upotrebljavali isključivo MEF porijeklom iz BALB/c miševa. Nakon što smo u sterilnim uvjetima iz uterusa izvadili fetuse, odstranili smo im utrobe, mehanički ih usitnili, a zatim podvrgnuli enzimskoj digestiji djelovanjem tripsina na 37<sup>0</sup>C tijekom 90 minuta uz neprekidno miješanje na magnetskoj mješalici. Pritom smo svakih 30 minuta dodavali novih 10 ml tripsina. Tako dobiveni homogenat pustili smo kroz metalnu mrežicu da se riješimo preostalih nerazgrađenih većih dijelova, a dobivenu suspenziju stanica oprali u 25 ml 3% MEM-a. Stanice smo zatim resuspendirali u novom mediju te prebrojali pomoću tripanskog modrila i broj podesili na 25 x 10<sup>6</sup> stanica po jednoj Petrijevoj posudi (promjera 145 mm), odnosno 75 x 10<sup>6</sup> stanica po jednoj rou boci. Slijedećeg dana stanicama smo promijenili medij, te se tako ujedno riješili prisutnih eritrocita i ostalih neatheriranih stanica. MEF smo zatim ostavili da raste narednih 3-4 dana dok nije prekrpio cijelu površinu posude. Tada smo ga tripsinizirali i sakupili u epruvetu, te isprali u 30 ml 3% MEM-a. Nakon centrifugiranja na 200 x g stanice smo resuspendirali u desetak mililitara medija te ponovno prebrojali. U mediju za smrzavanje smrznuli smo po 5 x 10<sup>6</sup> stanica/ml na temperaturu -80<sup>0</sup>C, te ih tamo držali do upotrebe, kada bi ih naglo odmrznuli, isprali u 3% MEM-u te kultivirali tijekom 3-4 dana nakon čega bi ih koristili.

### 3.9.2. B12 i YAC-1 stanice

U citotoksičnom testu posredovanom NK-stanicama kao ciljne stanice koristili smo YAC-1 i B12 stanice. YAC-1 stanice su T-stanični limfom i rutinski se koriste za NK-citotoksični test, budući su izrazito osjetljive na NK-staničnu lizu, jer na svojoj površini ne ispoljavaju MHC molekule razreda I.

B12 stanice su mišji embrionalni fibroblasti porijeklom iz BALB/c soja transformirani sa SV40, te tako imortalizirani. Za razliku od običnog MEF-a ove su stanice u NK-citotoksičnom testu pokazivale puno veću osjetljivost.

YAC-1 i B12 stanice bile su pohranjene u tekućem dušiku, a nakon odmrzavanja kultivirane u odgovarajućem mediju (YAC-1 stanice u 10% RPMI, B12 stanice u 10% DMEM-u).

### 3.9.3. Priprema inficiranih stanica

U pojedinim pokusima bile su nam potrebne inficirane stanice, koje smo intravenski injicirali miševima (MEF) ili koristili u NK-citotoksičnom testu (B12).

Fibroblaste smo kultivirali u Petrijevim posudama, te ih inficirali s 1 ili 2 PFU/stanici. Nakon 30 minuta inkubacije na 37°C, uz 5% CO<sub>2</sub> i 90% vlažnosti, centrifugirali smo ih tijekom 30 minuta na 800 x g. Ovim se postupkom dobije bolja infekcija stanica. Nakon 12 sati (ili u pojedinim pokusima 2 sata) inficirane smo stanice odvojili od podloge tripsiniziranjem, sakupili u epruvetu te istaložili centrifugiranjem. Resuspendirali smo ih u 1 ml hladnog medija te izbrojali i ustanovili vijabilnost stanica pomoću tripanskog modrila. Zatim smo podesili broj stanica te ih resuspendirali u 0,5 ml medija (bez FCS-a) / mišu ukoliko smo ih planirali injicirati u životinje (broj injiciranih stanica je varirao ovisno o pokusu između 10<sup>4</sup> i 10<sup>5</sup>).

Inficirane stanice koristili smo i u NK-citotoksičnom testu, prije kojeg smo ih obilježavali s <sup>51</sup>Cr.



### 3.9.4. Hibridomi

Koristili smo hibridome koji produciraju monoklonska protutijela koja su nam bila neophodna za naša istraživanja: štakorsko IgG2b anti-mišje protutijelo na CD4<sup>+</sup> limfocite T (YTS 191.1.2.) (146); štakorsko IgG2b anti-mišje protutijelo na CD8<sup>+</sup> limfocite T (YTS 169.4.2.) (146); mišje IgG2a anti-mišje protutijelo na NK1.1<sup>+</sup> stanice (147); mišje anti-mišje protutijelo na H-2K<sup>b</sup> molekulu (B8-24-3); mišje anti-mišje protutijelo na H-2K<sup>d</sup> molekulu (MA2.15), te mišje anti-mišje protutijelo na K<sup>b</sup>D<sup>b</sup> molekule (20-8-4s). Navedene hibridome uzgajali smo u plastičnim posudama i dohranjivali odgovarajućim hranjivim medijima (prema ATCC-u), a dugoročno su bili pohranjeni u našoj banci hibridoma u tekućem dušiku na -180<sup>o</sup>C. Njihovu sposobnost lučenja testirali smo određivanjem koncentracije protutijela u supernatantu kultura metodom sandwich-ELISE (enzimatskog imunosorbentnog testa).

#### 3.9.4.1. Uzgoj hibridoma u eksperimentalnim životinjama

Iako se u supernatant kultura hibridoma luče odgovarajuća protutijela njihova je koncentracija preniska da bi se mogla koristiti za *in vivo* depleciju pojedinih staničnih populacija. Budući se znatno viša koncentracija protutijela dobije uzgojem hibridoma u trbušnoj šupljini odgovarajućih laboratorijskih životinja, monoklonska protutijela proizvodili smo u trbušnoj šupljini miševa ili štakora ovisno o porijeklu pojedinog hibridoma (hibridi (Lou x DA) štakora za YTS 169.4.2 i YTS 191.1.2; BALB/c miševi za B8-24-3 te 20-8-4s hibridom; CBA/J miševi za MA2.15 hibridom te hibridi BALB/c i CBA/J miševa za PK136 hibridom). Stoga smo prvo u trbušnu šupljinu životinja injicirali pristan (0,4 ml/mišu i 1 ml/štakoru) da bi se izazvala upalna reakcija te tako pospješio rast hibridomskih stanica u trbušnoj šupljini, a nakon tjedan dana injicirali smo odgovarajući broj hibridomskih stanica (1-5 x 10<sup>6</sup>). Zatim smo ponovno pričekali oko tjedan dana za vrijeme kojih se stvarao ascites. Ascites smo skupljali svaki drugi dan te smrzavali na -20<sup>o</sup>C, nakon što smo vrćenjem odvojili

u njemu prisutne stanice. Kad smo skupili dovoljnu količinu ascitesa iz njega smo precipitirali protutijela.

#### **3.9.4.2. Precipitacija protutijela iz ascitesa pomoću amonijevog sulfata**

Sakupljeni ascites smo prvo odmrznuli te propustili kroz staklenu vunu da se riješimo krupnih nečistoća i masnoće. Zatim smo u ascites uz stalno miješanje na magnetskoj mješalici dodavali kap po kap otopine amonijevog sulfata u odnosu 55% : 45%. Tako dobivenu mješavinu smo ostavili na 4<sup>0</sup>C naredna 2 sata te izvrtili na 1500 okretaja/minuti kroz 45 minuta na 4<sup>0</sup>C. Talog nastao centrifugiranjem resuspendirali smo u PBS-u, i to obično u volumenu dvostruko manjem od početnog volumena ascitesa, da bismo i tako još više povećali koncentraciju protutijela. Tako dobivenu otopinu smo stavili u dijalizacijsku membranu koja ne propušta čestice veće od 18 kDa, koju smo prethodno kuhali u destiliranoj vodi dvadesetak minuta da omekša. Dijaliza je vršena u PBS-u na 4<sup>0</sup>C tijekom 4-5 dana uz stalno miješanje na magnetskoj mješalici te mijenjanje PBS-a svaka 2 sata. Pomoću 0,1 M barijevog klorida ispitivali smo prisutnost amonijevog sulfata u PBS-u i kada ga više nismo mogli dokazati prekinuli smo dijalizu. Dijalizat smo profiltrirali kroz filter od 0,45 µm, alikvotirali po 1 ml te zamrznuli na -20<sup>0</sup>C. Prije upotrebe odredili smo koncentraciju, te provjerili specifičnost i sterilnost tako dobivene otopine protutijela.

#### **3.9.4.3. Određivanje koncentracije protutijela**

Koncentraciju protutijela u precipitiranom ascitesu određivali smo sandwich-ELISOM. Ploče za ELISU smo prethodno obložili s primarnim protutijelima, a to su bila anti-mišji IgG (ili anti-štakorski IgG, ovisno o porijeklu hibridoma), u koncentraciji od 10 µg/ml u volumenu od 50 µl po rupici. Nakon inkubacije tijekom noći na 4<sup>0</sup>C, ploče smo isprali s PBS-om te blokirali sa 150 µl blokirajućeg reagensa tijekom 2 sata na 4<sup>0</sup>C. Sadržaj ploča smo zatim izbacili van, a ploče dvaput isprali s PBS-om.

Na ploče smo zatim nanijeli odgovarajuće standarde (mišji ili štakorski IgG) priređene u više različitih poznatih koncentracija. Također smo nanijeli i ascites čiju smo koncentraciju željeli odrediti i to tako da bismo pripremili odgovarajuće razrijeđenje (obično 1:100 ili 1:500) te ga na ploči dalje serijski razrijeđivali (na isti način određivali smo i koncentraciju protutijela u supernatantu kultura hibridoma, ali smo kretali od razrijeđenja 1:2). Sva razrijeđenja i uzoraka i standarda pripremali smo u otopini PBS-a s 1% FCS-a i 0,05% TWEEN-a 20, a na ploče smo ih nanosili u duplikatu. Nakon inkubacije od 60 minuta na sobnoj temperaturi ploče smo isprali otopinom PBS-a s 0,01% TWEEN-a 20 pomoću ispiraća za ELISA ploče (Awarreness) te nanijeli 50  $\mu$ l/rupici sekundarnog protutijela. Sekundarno protutijelo razrijedili smo 1:1000 u gore navedenoj otopini (PBS s 1% FCS-a i 0,05% TWEEN-a 20). Ovisno o porijeklu ascitesa kao sekundarno protutijelo smo koristili anti-mišji ili anti-štakorski IgG obilježen peroksidazom. Tijekom 60 minuta ploče smo ponovno inkubirali na sobnoj temperaturi, te isprali ispiraćem za ELISA ploče. Na kraju smo nanijeli supstrat. Kao supstrat smo koristili OPD tablete, koje smo prema uputama proizvođača (Sigma) otopili u citratnom puferu (pH 5,5) uz dodatak vodikovog peroksida. Po rupici smo nanijeli 50  $\mu$ l tako pripremljenog supstrata. Nakon inkubacije od nekoliko minuta u tami na sobnoj temperaturi supstrat je počeo mijenjati boju kao posljedica njegove reakcije s peroksidazom iz sekundarnih protutijela, te smo tada reakciju zaustavili dodavanjem po 50  $\mu$ l/rupici 2 M sulfatne kiseline. Na optičkom čitaču za ELISA ploče (Awarreness) uz filter od 492 nm očitali smo apsorpciju svjetlosti. Iz očitanih vrijednosti te poznatih koncentracija standarda napravili smo krivulju iz čijeg smo ravnog dijela izračunali jednadžbu pravca. Uvrštavanjem u tako dobivenu jednadžbu vrijednosti očitane apsorpcije svjetlosti za ascites čiju smo koncentraciju određivali, te uzimajući u obzir poznato razrijeđenje ascitesa, odredili smo u njemu prisutnu koncentraciju protutijela.

#### 3.9.4.4. Provjera specifičnosti monoklonskih protutijela

Za provjeru specifičnosti proizvedenih monoklonskih protutijela koristili smo protočnu citometriju. Budući većina protutijela koje smo proizvodili služi za *in vivo* depleciju pojedinih staničnih populacija (subpopulacija limfocita T i NK-stanica), takva protutijela smo testirali tako da bi izvršili depleciju na način na koji to radimo i u pokusima, te slijedeći dan životinju žrtvovali i testirali učinkovitost deplecije u slezeni. Slezenu smo pažljivo iglama usitnili te propasirali kroz najlonsku mrežicu, a dobivenu suspenziju stanica isprali u 20 ml 10% RPMI. Nakon centrifugiranja na 200 x g na talog stanica smo dodali 4 ml otopine za razaranje eritrocita, talog resuspendirali, te pustili da otopina djeluje 5 minuta na 4°C, te 5 minuta vrtili na 200 x g. Stanice smo zatim isprali dvaput u 10 ml FACS medija, propustili kroz najlonsku mrežicu te prebrojali. Po uzorku smo podesili 10<sup>6</sup> stanica, te na njih dodali odgovarajuće protutijelo obilježeno fluorescentnom bojom (ovisno o učinjenoj depleciji npr. anti-CD8-FITC ili anti-NK1.1-PE). Stanice smo inkubirali 30 minuta na 4°C, te dvaput isprali u FACS mediju. Na kraju smo ih resuspendirali u 1 ml FACS medija s propidij jodidom (1 μl propidij jodida/1 ml FACS medija), te na protočnom citometru očitavali po 10 000 limfocita, isključujući pomoću propidij jodida mrtve stanice. Usporedbom s nedepletiranom životinjom mogli smo ustanoviti učinkovitost deplecije, odnosno potvrditi specifičnost proizvedenih protutijela.

Na gotovo identičan način provjeravali smo i efikasnost deplecije u pojedinim pokusima. Na dan žrtvovanja miševa jednoj depletiranoj i jednoj nedepletiranoj životinji uzeli smo pola slezene i stanice pripremili prema gore opisanom protokolu. Usporedbom staničnih populacija depletiranog i nedepletiranog miša ustanovili smo uspješnost provedene deplecije.

#### 3.9.4.5. Protokol selektivne imunodeplecije staničnih populacija *in vivo*

Monoklonska protutijela koja smo proizveli na prethodno opisani način u ascitesu laboratorijskih životinja te kunićji protuserum koristili smo za depleciju

pojedinih staničnih subpopulacija *in vivo*. Koja su monoklonska protutijela korištena za depleciju pojedinih stanica navedeno je ranije.

Monoklonska protutijela injicirali smo miševima intraperitonealno u koncentraciji od 1 mg po životinji otopljene u 0,5 ml sterilnog PBS-a. Miševima smo depletirali dan prije ili na sam dan infekcije (navedeno kod svakog pokusa) te depleciju ponavljali svakih 7 dana.

Depleciju NK stanica kunićjim protuserumom na AGM1 radili smo na slijedeće načine. Ukoliko smo koristili komercijalni pripravak (Wako Chemicals) tada smo slijedili upute proizvođača te uzimali 20  $\mu$ l anti-AGM1 po životinji u 0,5 ml 1% MEM-a. Miševima smo injicirali serum intraperitonealno dan prije infekcije te ovisno o dužini trajanja pokusa depleciju ponavljali svaki treći dan. U pokusima u kojima smo koristili anti-AGM1 protuserum koji smo sami proizveli, životinje smo depletirali dva puta: dan prije i na sam dan infekcije. Pritom smo davali 250  $\mu$ l seruma po životinji intraperitonealno u ukupnom volumenu od 0,5 ml PBS-a.

Učinkovitost deplecije provjeravali smo protočnom citometrijom, kako je prethodno opisano.

### **3.10. Proizvodnja kunićjeg protuseruma na AGM1 antigen**

Za proizvodnju kunićjeg protuseruma koristili smo kuniće teške 4-5 kg. Imunizirali smo ih s AGM1 antigenom na tri mjesta intradermalno. Antigen smo pripremili na slijedeći način. Jedan miligram AGM1 otopili smo u 1 ml fiziološke otopine (0,9% NaCl), u kojoj smo prethodno otopili 2 mg metiliranog BSA (148). Uzeli smo 300  $\mu$ l tako otopljenog antigena, dodali mu još 500  $\mu$ l fiziološke otopine, te pomiješali s 500  $\mu$ l kompletnog Freundovog adjuvansa. Ove dvije otopine miješali smo tako dugo dok nismo dobili stabilnu mliječnobijelu emulziju. Nakon tri tjedna životinje smo busterirali koristeći pri tom prethodno pripremljenu otopinu AGM1 antigena, pomiješanu u emulziju s inkompletnim Freundovim adjuvansom u omjeru 1:1, te ukupnom volumenu od 0,5 ml. Antigen smo ponovno injicirali na tri mjesta, no ovaj put dva intradermalno i jedno intramuskularno. Postupak smo ponovili za dva

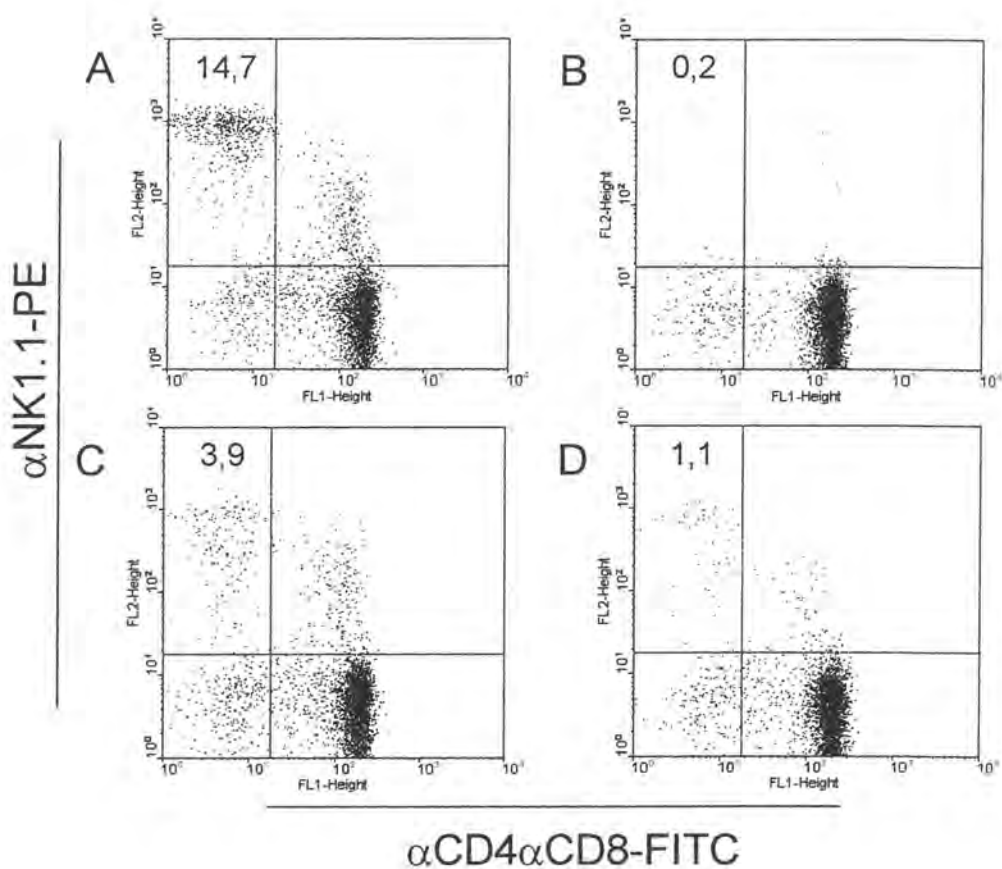
tjedna. Pet dana od zadnjeg injiciranja kuniće smo iskrvarili kardijalnom punkcijom u općoj anesteziji. Pritom su životinje bile uspavane intravenskim injiciranjem Nesdonala (pentobarbital), koji je bio otopljen u destiliranoj vodi u koncentraciji od 10 mg/kg tjelesne težine. Dobivenu krv (oko 150 ml po kuniću) smo skupili u epruvete, te ostavili 4 sata na sobnoj temperaturi da bi dopustili nastanak ugruška. Potom smo krv izvrtili na 1500 okretaja/minuti tijekom 10 minuta i odvojili serum. Serum smo dekomplementirali na 56°C kroz 30 minuta, te iz njega precipitirali protutijela pomoću amonijevog sulfata, na način kako je opisano za precipitaciju monoklonskih protutijela iz ascitesa. Dobiveni protuserum smo resuspendirali u PBS-u u volumenu dvostruko manjem od početne količine seruma. Alikvotirali smo ga po 1 ml te pohranili na -80°C. Prije upotrebe testirali smo specifičnost i sposobnost deplecije protuseruma protočnom citometrijom.

### **3.10.1. Testiranje kunićjeg protuseruma na AGM1 antigen**

Da bismo testirali učinkovitost anti-AGM1 kunićjeg protuseruma upotrijebili smo  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševe (C57BL/6 genska pozadina) (8). Pojedinom mišu depletirali smo NK-stanice intraperitonealnim ubrizgavanjem određene količine protuseruma (50; 100; 250 ili 500  $\mu$ l) u ukupnom volumenu od 500  $\mu$ l PBS-a. Jednog miša depletirali smo s 1 mg anti-NK1.1 protutijela porijeklom od PK136 hibridoma. Slijedećeg dana životinje smo žrtvovali, uzeli im krv u epruvete uz dodatak 50  $\mu$ l heparina, te izvadili slezene. Slezene smo usitnili, propasirali kroz najlonsku mrežicu te oprali u mediju. Nakon što smo lizirali eritrocite, izbrojali stanice i podesili broj na  $10^6$  stanica po uzorku, dodali smo anti-mišji CD4-FITC, anti-mišji CD8-FITC te anti-NK1.1-PE, svakog 4  $\mu$ l po uzorku. Za razliku od slezene u krv smo direktno dodali osim anti-CD4 i anti-CD8 protutijela anti-DX5-biotin (protutijelo na pan-NK marker), također 4  $\mu$ l po uzorku. Nakon inkubacije tijekom 30 minuta na 4°C, stanice smo dvaput isprali u FACS mediju, te splenocite resuspendirali u 1 ml FACS medija s propidij jodidom. Na krv smo još dodali streptavidin-PE (3  $\mu$ l po uzorku) te ponovno inkubirali na 4°C pola sata. Stanice smo zatim dvaput isprali te lizirali eritrocite.

Konačno smo i stanice krvi resuspendirali u 1 ml FACS medija uz propidij jodid. Na protočnom citometru smo očitali 10 000 isključivo živih limfocita. Analizirali smo učinkovitost delecije s različitim dozama primijenjenog protuseruma, uspoređujući broj preostalih NK-stanica s brojem NK-stanica kod nedepletirane životinje istog soja te kod miša depletiranog s PK136 protutijelom (slika 3).

Iz dobivenih rezultata zaključili smo da se djelotvorna delecija postiže injiciranjem 250  $\mu$ l proizvedenog kunićjeg anti-AGM1 protuseruma.



**Slika 3. Testiranje delecije NK-stanica pomoću protuseruma na AGM1.** Protočnim citometrom analizirali smo prisutnost NK-stanica u slezeni  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa: nedepletiranog (A), depletiranog s 1 mg mAt (monoklalnog protutijela) PK136 (B), depletiranih s 100  $\mu$ l (C) ili 250  $\mu$ l (D)  $\alpha$ AGM1 protuseruma. Prikazani su rezultati analize 10 000 stanica.

### 3.11. Određivanje titra virusa u tkivima

Titir virusa u pojedinim organima inficiranih životinja određivali smo na MEF-u porijeklom iz BALB/c miševa testom virusnih čistina (virus plaque assay) (15).

#### 3.11.1. Test virusnih čistina

Tri do četiri dana prije izvođenja testa odmrzli smo MEF te ga kultivirali u Petrijevim posudama (promjer 145 mm). Dan prije izvođenja testa MEF smo tripsinizacijom odlijepili s podloge te preselili u ploče za staničnu kulturu od 48 rupica u količini od  $5 \times 10^4$  stanica/rupici. Na dan izvođenja testa provjerili smo gustoću stanica na pločama, te odmrznuli organe u kojima smo željeli odrediti titar virusa. Organi miševa žrtvovanih u pokusima do izvođenja testa bili su pohranjeni na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cijeli postupak testa izvodio se na ledu i uz korištenje hladnog medija. Organe smo propasirali kroz najlonsku (slezena, jetra) ili metalnu mrežicu (pluća, žlijezde slinovnice) u 2 ml 3% MEM-a. Zatim smo dobivene homogenate organa razrijedili u istom mediju 200, 2000 i 20 000 puta, te razrijeđenja nanijeli u duplikatu na pripremljene ploče obložene MEF-om, s kojih smo neposredno prije nanošenja razrijeđenih homogenata organa posisali višak medija. Ploče smo inkubirali 30 minuta na  $37^{\circ}\text{C}$  uz 5%  $\text{CO}_2$  i 90% vlažnosti, a potom vrtili 30 minuta na  $800 \times g$ . Ponovno smo ih inkubirali 30 minuta na  $37^{\circ}\text{C}$  uz 5%  $\text{CO}_2$  i 90% vlažnosti, a onda na njih nanijeli metil-celulozni medij koji svojom viskoznošću onemogućava bilo kakvo širenje virusa osim horizontalnog. Nakon 3-4 dana tijekom kojih su ploče bile na  $37^{\circ}\text{C}$  uz 5%  $\text{CO}_2$  i 90% vlažnosti, pomoću invertnog mikroskopa prebrojali smo virusne čistine (plakove) u pojedinim rupicama. Svaka čistina odgovarala je jednoj infektivnoj jedinici virusa (PFU). Uzimajući u obzir razrijeđenje homogenata organa u kojem smo našli određeni broj virusnih plakova mogli smo izračunati ukupan broj virusa u pojedinom organu inficirane životinje. Razina detekcije virusa bila je 100 PFU po pojedinom organu.



### 3.12. NK-citotoksični test

Osjetljivost stanica inficiranih različitim virusima na NK-staničnu citotoksičnost ispitivali smo NK-citotoksičnim testom.

Kao efektorske stanice koristili smo splenocite iz *nude* i BALB/c miševa. Miševima smo 12-16 sati prije uzimanja slezene, intraperitonealno injicirali 200 µg poli I:C otopljenog u 200 µl PBS-a. Slezene smo usitnili u 10 ml RPMI bez FCS-a te stanice istaložili centrifugiranjem. Nakon liziranja eritrocita stanice smo dvaput isprali u mediju, te pustili kroz najlonsku mrežicu. Pomoću tripanskog modrila prebrojali smo stanice i odredili im vijabilnost, te im podesili broj na  $10^6$  stanica / 100 µl medija (10% RPMI). Ploče od 96 rupica za kulturu tkiva s okruglim dnom napunili smo sa 100 µl/rupici (osim rupica prvog reda) 10% RPMI s 50 U IL-2 / ml. U prvi red unijeli smo po 200 µl pripremljene suspenzije efektorskih stanica, te serijski prenosili po 100 µl u naredne redove, osim u zadnja dva reda. Tako pripremljenu ploču pohranili smo u inkubator do nanošenja ciljnih stanica.

Kao ciljne stanice koristili smo B12 fibroblaste, inficirane i neinficirane. Stanice smo skupili u Eppendorf epruvete te oprali u čistom mediju. Na talog stanica dodali smo 100 µCi radioaktivnog izotopa  $^{51}\text{Cr}$  u obliku natrijevog kromata (Amersham), te lagano promiješali. U termobloku na  $37^{\circ}\text{C}$  uz povremeno mješanje inkubirali smo stanice 60 minuta. Nakon inkubacije stanice smo 4 puta isprali s 1 ml 5% RPMI, resuspendirali u 1 ml 10% RPMI, prebrojali i odredili im vijabilnost pomoću tripanskog modrila. Konačno smo podesili broj ciljnih stanica na 2 000 stanica / 100 µl medija (10% RPMI).

Na pripremljenu ploču s efektorskim stanicama nanijeli smo ciljne stanice, 100 µl pripremljene suspenzije po rupici. Tako je omjer između efektorskih i ciljnih stanica bio od 500:1 do 15:1. Isti volumen ciljnih stanica smo prebacili u kivete kako bismo odredili maksimalnu radioaktivnost obilježenih stanica. Za kontrolu spontane lize koristili smo supernatant kultura obilježenih ciljnih stanica bez efektorskih stanica. Ploču smo izvrtili na 1000 okretaja/minuti tijekom 3 minute, te ostavili u inkubatoru na  $37^{\circ}\text{C}$  uz 5%  $\text{CO}_2$  i 90% vlažnosti tijekom 4 sata. Nakon ponovnog vrćenja od 3 minute na 1500 okretaja/minuti pokupili smo po 100 µl supernatanta iz

svake rupice te ga prenijeli u kivete. Kivete smo zatvorili tekućim parafinom, a postojeću radioaktivnost otpuštenu iz razorenih ciljnih stanica očitali pomoću  $\gamma$ -brojača. Iz dobivenih vrijednosti izračunali smo postotak specifične lize pomoću RAR programa, a prema formuli:

$$\% \text{ specifične lize} = \frac{\text{cpm (uzorak)} - \text{cpm (spontana liza)}}{\text{cpm (ukupni aktivitet)} - \text{cpm (spontana liza)}} \times 100$$

### 3.13. Statističke metode

Statistička značajnost razlika vrijednosti titra virusa između pojedinih grupa životinja određena je Mann-Whitney testom. Titrovi virusa ( $x$  i  $y$ ) su bili statistički značajni ukoliko je  $P$  ( $x$  nasuprot  $y$ ) bio manji od  $\alpha = 0,05$ , pri čem je  $P$  očekivana vjerojatnost pojave preklapanja vrijednosti, a  $\alpha$  izabrana vrijednost značajnosti.

## 4. REZULTATI

Najvažniju ulogu u nadzoru primarne citomegalovirusne infekcije imaju CD8<sup>+</sup> limfociti T. Da bi ove stanice mogle ispoljiti svoj protuvirusni potencijal neophodno je da virusni antigeni budu predočeni na površini inficirane stanice u kompleksu s MHC molekulama razreda I. Stoga ne čudi da citomegalovirusi u svom genomu posjeduju gene (*m04*, *m06*, *m152*) kojima se upliću u prezentaciju antigena u kontekstu MHC-I molekula. Rekombinantni virusi s delecijom *m04*, *m06* ili *m152* gena omogućili su nam da ispitamo ulogu ovih gena u virusnom izmicanju imunološkom nadzoru *in vivo*.

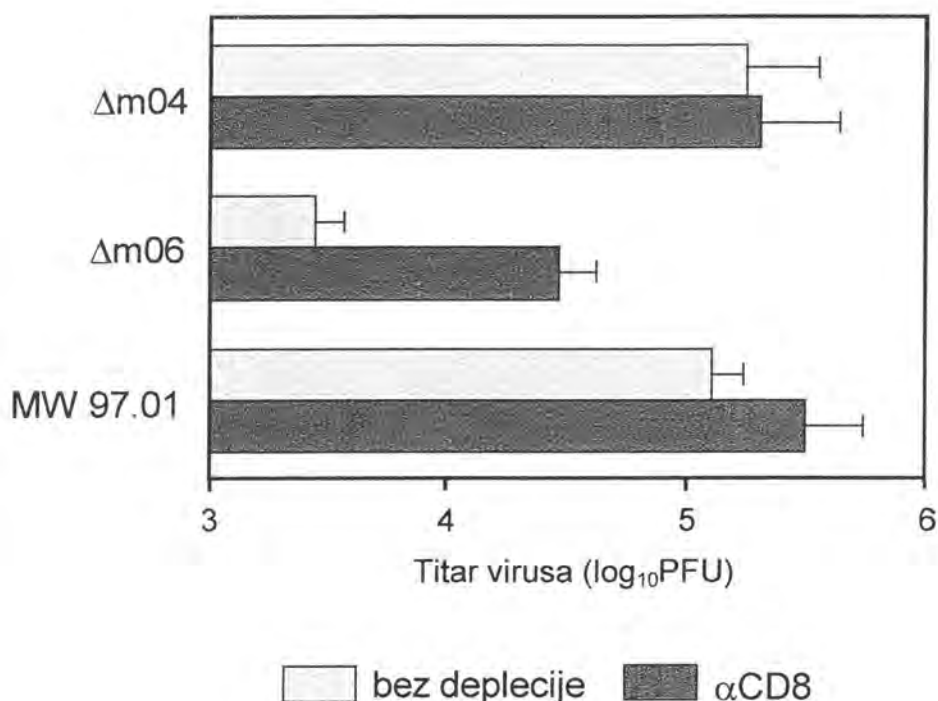
U mom magistarskom radu ("Značaj *m152* gena mišjeg citomegalovirusa u izbjegavanju imunološkog nadzora", Rijeka, 1998.) te članku (126) obradili smo ulogu *m152* gena *in vivo* u izbjegavanju nadzora posredovanog CD8<sup>+</sup> limfocitima T. Pokazali smo da je *m152*-delecijska mutanta *in vivo* atenuirana u odnosu na divlji tip MCMV-a i revertantni soj virusa, a da se razlika u dosegnutom titru između *m152*-delecijske mutante i revertantnog virusa gubi nakon deplecije limfocita T. Atenuacija *m152*-delecijske mutante nije postojala niti u CD8 knockout niti u miševima deficitnim za  $\beta$ 2-mikroglobulin, jasno dokazujući da je *m152* gen važan za izbjegavanje imunološkog nadzora posredovanog CD8<sup>+</sup> limfocitima T *in vivo*.

### 4.1. Produkt *m06* gena inhibira imunološki odgovor posredovan CD8<sup>+</sup> limfocitima T

Budući ne postoje podaci o značaju *m04* i *m06* gena u izbjegavanju CD8<sup>+</sup> limfocita T *in vivo*, u ovom smo radu prvo ispitali postoji li učinak ovih gena na imunološki nadzor posredovan CD8<sup>+</sup> limfocitima T *in vivo*.

C57BL/6 miševima depletirali smo NK-stanice te im intravenski injicirali 10<sup>5</sup> PFU naznačenih virusa. CD8<sup>+</sup> limfocite T depletirali smo svakih 7 dana (slika 4). Trinaestog dana nakon infekcije *m06*-delecijska mutanta dosezala je značajno niži titar u odnosu na divlji tip virusa, dok *m04*-delecijska mutanta nije bila atenuirana.

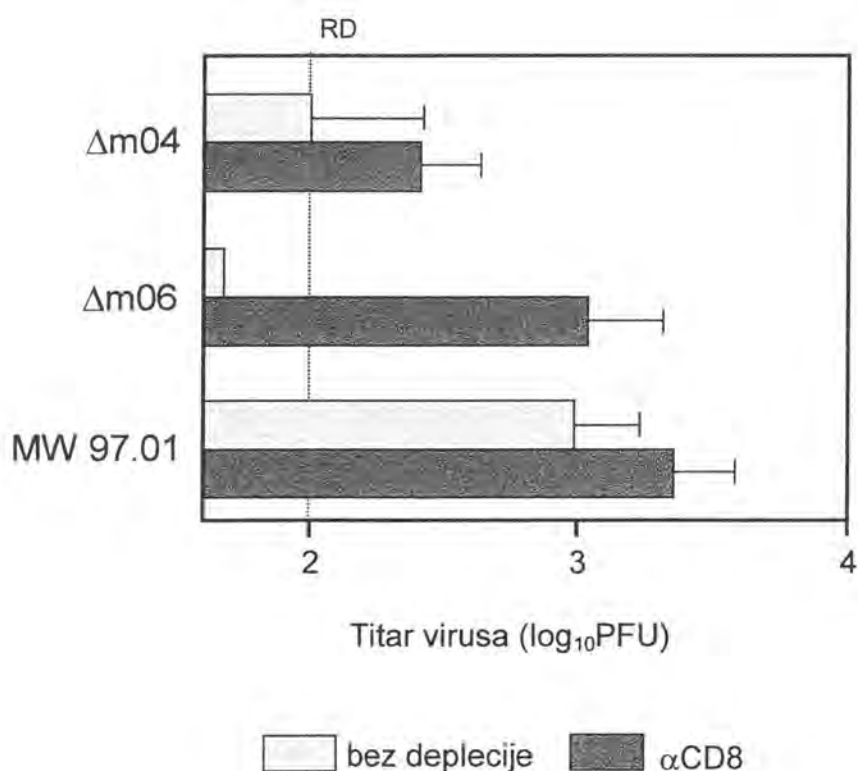
Nakon deplecije CD8<sup>+</sup> limfocita T došlo je do značajnog porasta titra *m06*-delecijske mutante, dok se titar *m04*-delecijske mutante i divljeg tipa virusa nije značajno mijenjao.



**Slika 4. Replikacija *m04*- i *m06*-delecijskih mutanti u C57BL/6 miševima.** C57BL/6 miševima su uklonjene NK-stanice nakon čega su intravenski injicirani s 10<sup>5</sup> PFU *m04*-delecijske mutante (Δ*m04*), *m06*-delecijske mutante (Δ*m06*) ili divljeg tipa virusa (MW 97.01). Svakih 7 dana životinjama su depletirani CD8<sup>+</sup> limfociti T. Virusni titar u plućima određen je 13. dana nakon injiciranja.

Pokus kojim smo ispitivali ulogu *m04* i *m06* gena u izbjegavanju CD8<sup>+</sup> limfocita T izveli smo i na BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>* miševima, kojima smo depletirali NK-stanice, intraperitonealno im injicirali 10<sup>5</sup> PFU virusa te pojedinim grupama miševa depletirali CD8<sup>+</sup> limfocite T svakih 7 dana (slika 5). Životinje smo žrtvovali nakon 14 dana. Sukladno rezultatima prethodnog pokusa na C57BL/6 miševima, *m06*-delecijska mutanta bila je atenuirana u odnosu na divlji tip virusa, ali joj je titar

značajno rastao nakon deplecije CD8<sup>+</sup> limfocita T. Porast titra *m04*-delecijske mutante te divljeg tipa virusa nakon deplecije CD8<sup>+</sup> limfocita T nije bio značajan.



**Slika 5. Replikacija *m04*- i *m06*-delecijskih mutanti u BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>* miševima.** BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>* miševima su depletirane NK-stanice i injicirani su intraperitonealno s 10<sup>5</sup> PFU *m04*-delecijske mutante ( $\Delta m04$ ), *m06*-delecijske mutante ( $\Delta m06$ ) ili divljeg tipa virusa (MW97.01). Svaki 7 dana životinjama su depletirani CD8<sup>+</sup> limfociti T. Virusni titar u plućima određen je 14. dana nakon injiciranja.

Rezultati ovih pokusa pokazuju da je produkt *m06* gena važan za izbjegavanje imunološkog nadzora posredovanog CD8<sup>+</sup> limfocitima T *in vivo*, što je bilo i očekivano poznavajući ulogu ovoga gena u onemogućavanju prijenosa MHC-I molekula do površine stanice. Očito je, poznavajući ulogu produkta *m152* gena *in vivo*, da MCMV ima više od jednog gena koji ga, djelujući kumulativno, štite od djelovanja CD8<sup>+</sup> stanica T. Za razliku od *m06* i *m152* gena, nismo uspjeli dokazati ulogu produkta *m04* gena u izbjegavanju CD8<sup>+</sup> limfocita T *in vivo*.

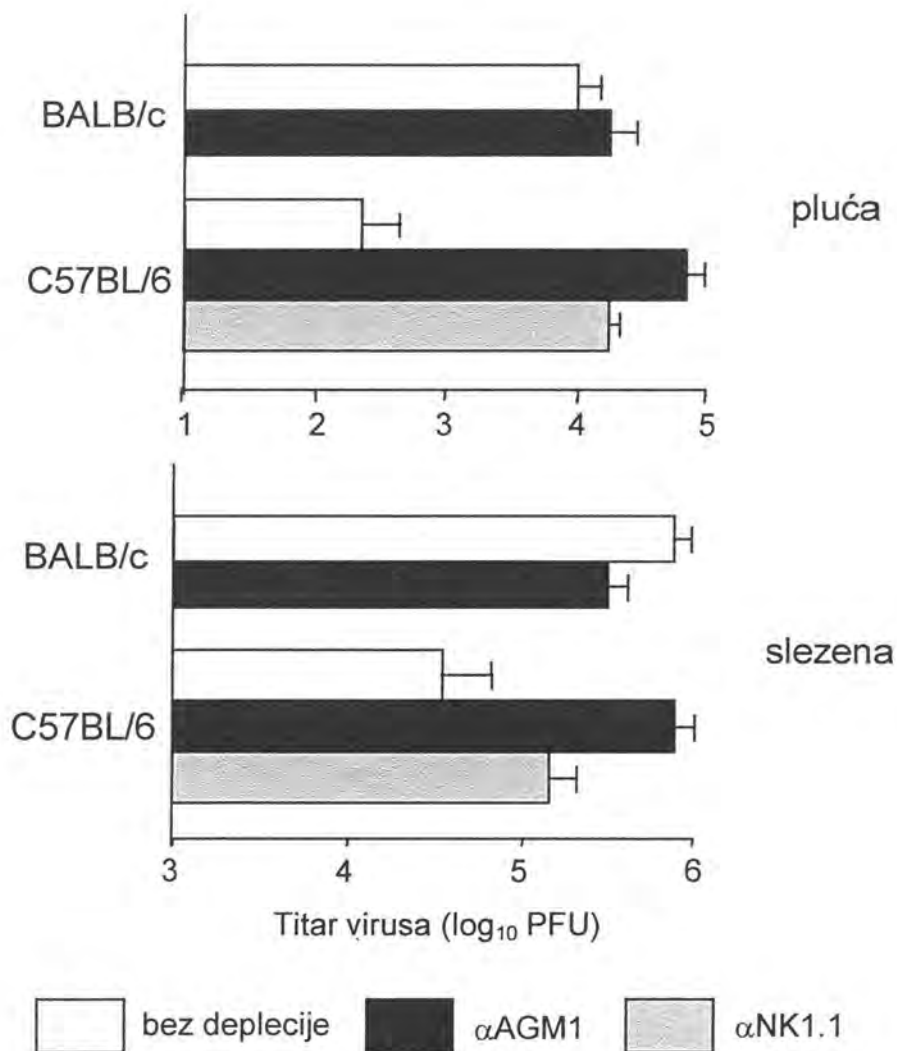
## 4.2. Osjetljivost MCMV-a na NK-stanice ovisna je o soju miševa

Od prije je poznato da postoje razlike između mišjih sojeva s obzirom na ranu osjetljivost na MCMV infekciju. Tako postoje sojevi koji su otporni (npr. C57BL/6 i CBA) te sojevi koji su osjetljivi na MCMV (BALB/c, 129). Ova osjetljivost odnosno rezistencija prvenstveno se pripisuje nadzoru virusa od strane NK-stanica, budući postoji razlika između mišjih sojeva u NK-kompleksu smještenom na 6. kromosomu. Unutar NK-kompleksa nalazi se i gen *Cmv1* (*Ly49-h*) koji se izravno povezuje s otpornošću miševa na MCMV. MCMV-otporni sojevi posjeduju dominantni *Cmv1<sup>f</sup>* alel, a MCMV-osjetljivi sojevi recesivni *Cmv1<sup>s</sup>* alel. Mutacija *Cmv1<sup>f</sup>* gena uvjetuje da MCMV-otporni sojevi postaju osjetljiviji na MCMV infekciju (78). Ne zna se zašto sojevi s recesivnim *Cmv1<sup>s</sup>* alelom ne mogu izvršiti učinkoviti NK-stanični protuvirusni odgovor unatoč postojanju velikog broja drugih aktivacijski i inhibicijskih NK-receptora. Moguće je da je nesposobnost MCMV-osjetljivih sojeva da izraze snažan NK-stanični protuvirusni odgovor posljedica i djelovanja samog virusa, a ne samo nedostatnog repertoara NK-stanica. Nelogično je da je virus tijekom koevolucije sa svojim domaćinom razvio samo mehanizme izbjegavanja CD8<sup>+</sup> limfocita T, budući ga promjene u ispoljavanju MHC-I molekula čine podložnijim djelovanju NK-stanica. Vjerojatnije je da virus posjeduje mehanizme koji ga štite i od CD8<sup>+</sup> limfocita T i od NK-stanica. Iz tog razloga željeli smo ispitati mogući učinak MHC-I imunomodulacijskih gena na imunološki nadzor posredovan NK-stanicama.

Da bismo potvrdili da postoji razlika između mišjih sojeva u osjetljivosti na MCMV infekciju, te da je ta razlika uvjetovana djelovanjem NK-stanica, u narednom pokusu miševе BALB/c i C57BL/6 soja injicirali smo intraperitonealno s 10<sup>5</sup> PFU divljeg tipa MCMV-a. Učinak NK-stanica provjeravali smo deplecijom pomoću specifičnih protutijela. Trećeg dana nakon infekcije, u vrijeme kada je najjača aktivnost NK-stanica, životinje smo žrtvovali i odredili titar virusa u pojedinim organima (slika 6).

Divlji tip MCMV-a postizao je u BALB/c miševa značajno višu razinu virusnog titra u odnosu na C57BL/6 životinje, kod kojih je postignuti titar bio relativno nizak (oko 50x niži nego kod BALB/c miševa). Nakon deplecije NK-stanica došlo je do značajnog porasta titra virusa u C57BL/6 životinja, te je on dosegao razinu sličnu

razini divljeg tipa virusa u BALB/c miševima. U isto vrijeme deplecija NK-stanica nije imala učinka na titar divljeg tipa virusa u BALB/c miševa, to jest u ovog soja miševa nakon NK-deplecije nije došlo do značajnog porasta titra virusa.



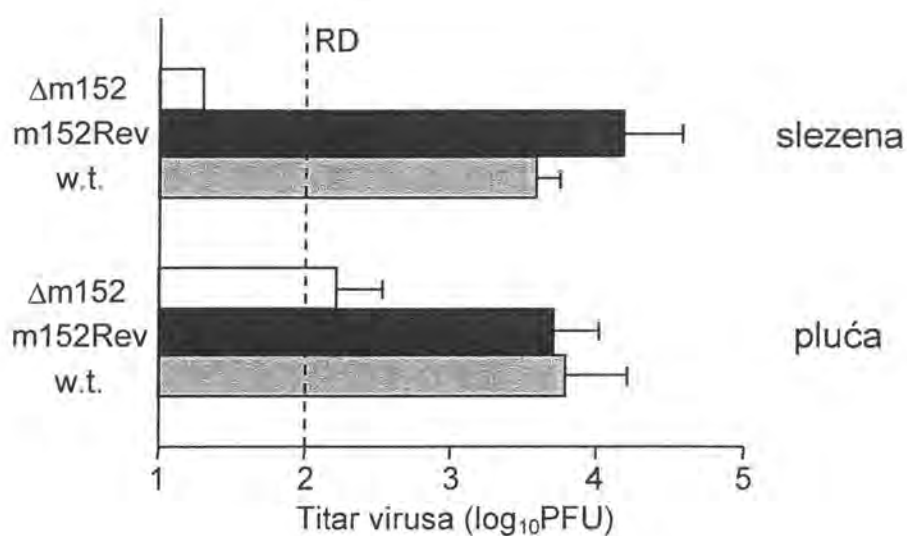
**Slika 6. Replikacija MCMV-a u BALB/c i C57BL/6 miševima.** Odrasli miševi BALB/c i C57BL/6 soja injicirani su intraperitonealno s  $2 \times 10^5$  PFU divljeg tipa MCMV-a. U svakoj skupini dio životinja je tretiran s protuserumom na AGM1 (ili protutijelom na NK1.1 kod C57BL/6 miševa) radi uklanjanja NK-stanica. Titar virusa određen je 3. dana nakon infekcije.

Prema tome NK-limfociti važni su za nadzor MCMV-a u C57BL/6 soju, dok istovremeno gotovo da nemaju učinka na nadzor virusa u BALB/c soja miševa. Ovim

pokusom potvrdili smo da je osjetljivost MCMV-a na nadzor posredovan NK-limfocitima ovisna o mišjem soju.

#### 4.3. Atenuacija *m152*-delecijske mutante u *nu/nu* BALB/c miševima

S obzirom da produkt *m152* gena, gp40, blokira prijenos MHC molekula razreda I na površinu stanice, bilo je za očekivati da će virus s delecijom *m152* gena biti podložniji nadzoru od strane CD8<sup>+</sup> limfocita T, u odnosu na revertantni soj virusa ili divlji tip MCMV-a. Naši pokusi potvrdili su ova očekivanja (126,128). Međutim neočekivani rezultat smo dobili kada smo *m152*-delecijsku mutantu testirali na atimičnim *nu/nu* BALB/c miševima. Naime ovim životinjama nedostaju limfociti T (140), te smo stoga pretpostavili da neće biti niti razlika u nadzoru između *m152*-delecijske mutante i revertantnog virusa, što bi se očitovalo podjednakim titrom virusa u tkivima. *Nude* miševima injicirali smo potkožno (footpad) 10<sup>5</sup> PFU virusa, a titar u organima odredili 10. dana po infekciji (slika 7).



**Slika 7. Replikacija *m152*-delecijske mutante u *nu/nu* BALB/c miševima.** *Nude* BALB/c miševi injicirani su potkožno s 10<sup>5</sup> PFU divljeg tipa virusa (w.t.), *m152*-delecijskom mutantom (Δ*m152*) ili revertantnim sojem (m152Rev). Titar virusa određen je 10. dana poslije infekcije. (RD) Razina detekcije virusa.



Suprotno očekivanju, *m152*-delecijska mutanta bila je i u ovih miševa izrazito atenuirana i dostizala značajno niži titar u usporedbi s revertantnim virusnim sojem. Budući atimični miševi nedostatak limfocita T kompenziraju snažnom aktivnošću NK-stanica, iz dobivenih rezultata proizlazilo je da su upravo NK-stanice razlog atenuacije *m152*-delecijske mutante prisutne u ovih miševa. Iako logičan s obzirom na dobiveni rezultat, ovaj zaključak je bio u potpunoj suprotnosti u odnosu na očekivano temeljeno na teoriji. Naime delecija *m152* gena iz virusnog genoma rezultirala je ukidanjem bloka u prijenosu MHC molekula razreda I do stanične površine te prezentacijom virusnih peptida u kontekstu molekula razreda I na površini inficirane stanice (ovaj učinak je ipak samo djelomičan, jer virus i dalje posjeduje *m06* gen). Kao posljedica prezentacije virusnih antigena inficirana stanica postaje podložnija nadzoru posredovanom CD8<sup>+</sup> limfocitima T, ali istovremeno prisutnost MHC-I molekula na površini stanice trebala bi stanicu inficiranu *m152*-delecijskom mutantom zaštititi od NK-stanica dajući im negativni signal vezanjem na njihove inhibicijske receptore. Budući da su naši rezultati u potpunosti potvrdili odnos funkcije *m152/gp40* i CD8<sup>+</sup> limfocita T to je zaista bilo za očekivati da će *m152*-delecijska mutanta biti rezistentnija na kontrolu posredovanu NK-stanicama.

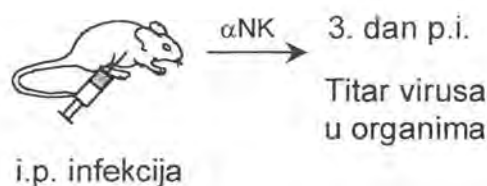
S obzirom na nesuglasje između teoretski očekivanog i rezultata eksperimenta, odlučili smo detaljnije ispitati utjecaj virusnih gena na NK-posredovani nadzor MCMV-a.

#### **4.4. *m152/gp40* inhibira antivirusni učinak NK-stanica *in vivo***

U narednim pokusima željeli smo ispitati ulogu imunomodulacijskih gena MCMV-a, posebno gena *m152*, u izbjegavanju nadzora posredovanog NK-stanicama.

Pokuse smo vršili prema dva osnovna protokola (slika 8). Prvi protokol sastojao se od klasične intraperitonealne infekcije miševa pročišćenim virusom proizvedenim u kulturi fibroblasta ( $2-5 \times 10^5$  PFU po životinji) uz ili bez deplecije NK-stanica (ovaj protokol korišten je i u pokusu prikazanom na slici 6).

### A. Injekcija pročišćenog virusa



### B. Injekcija inficiranih fibroblasta

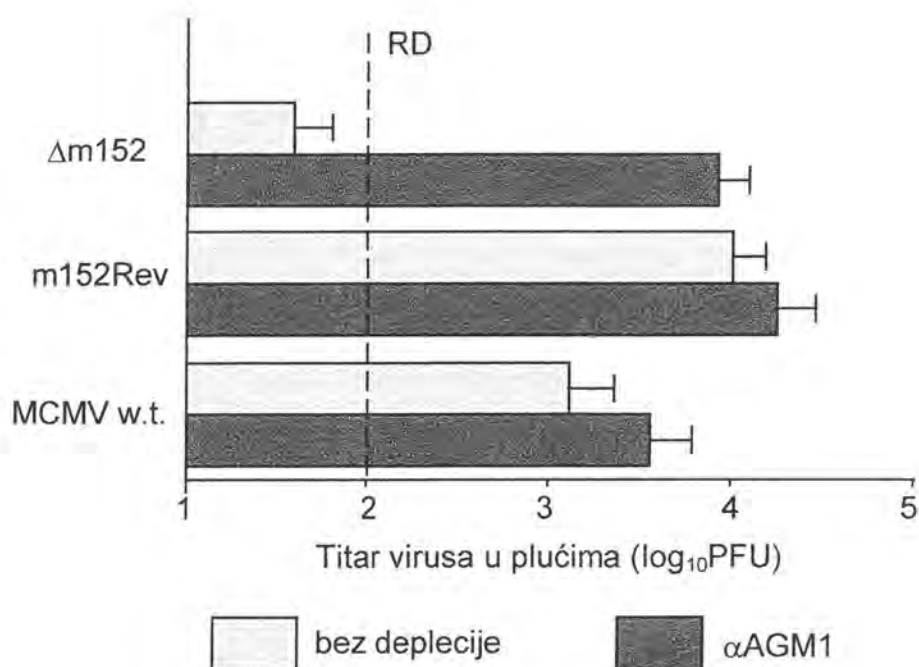


**Slika 8. Protokoli pokusa.** (MEF) mišji embrionalni fibroblasti; (i.v.) intravenski; (i.p.) intraperitonealno; (p.i.) poslije infekcije

U pokusima izvođenim prema drugom tzv. infuzijskom protokolu umjesto pročišćenog virusa koristili smo inficirane mišje embrionalne fibroblaste (MEF). MEF je 12 sati prije injiciranja inficiran s 2 PFU/stanici, te je zatim  $10^5$  inficiranih stanica intravenski injicirano u miševе. Pojedini grupama životinja bili su depletirani NK-limfociti. Prednost infuzijskog protokola je što omogućuje izučavanje uloge pojedinih liganada za NK-receptor te s tim u svezi mogući učinak virusnih gena na njihovu ekspresiju. NK-stanice depletirane su pomoću mAb PK136 (anti NK1.1), odnosno pomoću poliklonskog kunićjeg protuseruma na AGM1. Prema oba protokola životinje su žrtvovane 3. dana poslije infekcije. U pokusima izvođenim prema klasičnom protokolu intraperitonealne infekcije virusni titar određivan je u više različitih organa (pluća, slezena, jetra), dok je u pokusima rađenim prema infuzijskom protokolu titar virusa određivan isključivo u plućima inficiranih miševa. Naime inficirane stanice koje smo po ovom protokolu intravenski injicirali životinjama, zbog svoje veličine nisu

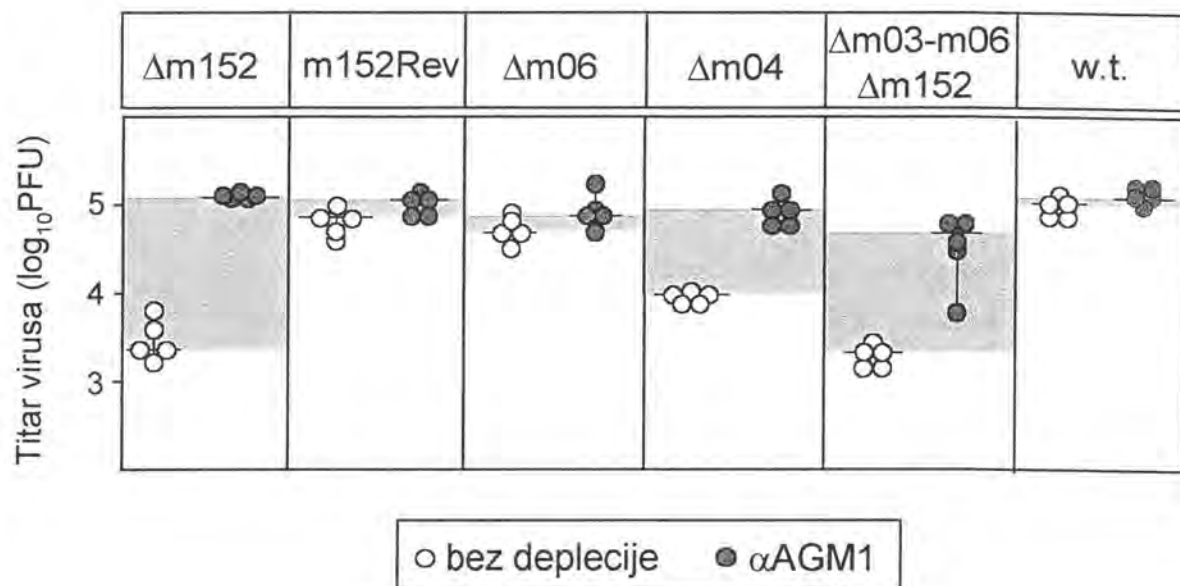
uspijevale proći kroz plućne kapilare, te je titar virusa u ostalim organima bio izrazito nizak, ili se virus uopće nije mogao otkriti.

U BALB/c miševima inficiranim sukladno klasičnom eksperimentalnom protokolu (infekcija pročišćenim virusom) *m152*-delecijska mutanta postizala je značajno niži titar u odnosu na divlji tip i revertantni virusni soj (slika 9). Nakon deplecije NK-limfocita došlo je do značajnog porasta titra u slučaju životinja inficiranih s *m152*-delecijskom mutantom, koji je tada dostizao približno istu razinu kao i revertantni soj odnosno divlji tip MCMV-a. Za razliku od *m152*-delecijske mutante, deplecija NK-stanica nije uzrokovala značajan porast titra revertantnog ili divljeg tipa virusa, potvrđujući tako već utvrđenu otpornost MCMV-a na NK-kontrolu u BALB/c miševa.



**Slika 9. Uloga NK-stanica u nadzoru *m152*-delecijske mutante u BALB/c miševima.** BALB/c miševi injicirani su intraperitonealno s  $2 \times 10^5$  PFU *m152*-delecijske mutante ( $\Delta m152$ ), revertante (*m152Rev*) ili divljeg tipa MCMV (*w.t.*). U svakoj skupini dio životinja je tretiran s protuserumom na AGM1 radi uklanjanja NK-stanica. Titar virusa u plućima određen je 3. dana poslije infekcije. (RD) Razina detekcije virusa.

Na BALB/c miševima napravili smo i pokus prema infuzijskom protokolu. U ovom pokusu testirali smo osjetljivost prema NK-stanicama ne samo *m152*-delecijske mutante nego i drugih virusa, kojima su uklonjeni pojedini geni za izmicanje imunološkom nadzoru. U pokus smo uključili i delecijske mutante za *m04* i *m06* gen, te virusni soj kojemu je deletirana cijela obitelj gena povezanih s negativnom regulacijom MHC molekula razreda I (geni *m03-m06*, te *m152* gen) (slika 10).

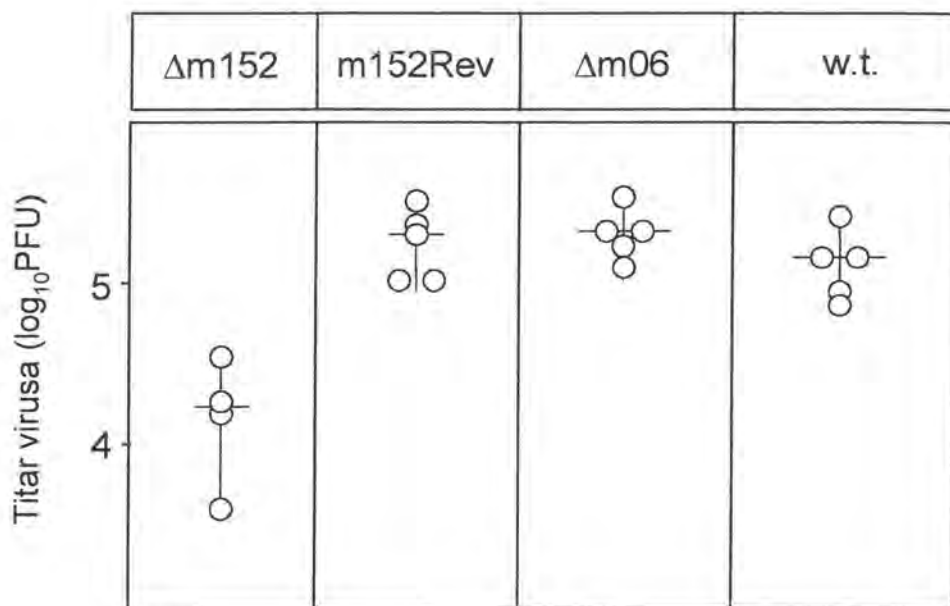


**Slika 10. Učinak delecije pojedinih gena na osjetljivost MCMV-a prema NK-stanicama u BALB/c miševima.** BALB/c miševi injicirani su intravenski s  $10^4$  stanica BALB/c fibroblasta (MEF) koji su 12 sati prije injiciranja bili inficirani s 2 PFU naznačenih virusa po stanici. U svakoj skupini dio životinja je tretiran s protuserumom na AGM1 radi uklanjanja NK-stanica. Virusni titar u plućima određen je 3. dana nakon infekcije. Prikazani su pojedinačni virusni titrovi i medijane vrijednosti (vodoravne crte).

Tri dana nakon infekcije, u BALB/c miševima, delecijske mutante za *m152* i *m04* gen, te virus kojemu su uklonjeni geni *m03* do *m06* i *m152*, bile su izrazito atenuirane i dostizale značajno niži virusni titar u odnosu na divlji tip i revertantni

virus. Deplecijom NK-stanica poništena je razlika u titru između virusa, odnosno došlo je do značajnog porasta titra navedenih atenuiranih delecijjskih mutanti te su se one svojim titrom izjednačile s titrom divljeg tipa MCMV-a i revertantnog virusnog soja. Za razliku od navedenih delecijjskih mutanti, delecijjska mutanta za *m06* gen nije bila atenuirana trećeg dana po infekciji, niti je deplecija NK-stanica imala bilo kakvog učinka na njen titar, unatoč snažnom učinku produkta *m06* gena na ekspresiju MHC molekula razreda I na površini virusom inficirane stanice (*m06/gp48* usmjerava zrele MHC molekule razreda I u lizosome gdje dolazi do njihove razgradnje (7)).

Pokus prema infuzijskom protokolu infekcije, ali bez deplecije NK-stanica, napravili smo i na *nu/nu* BALB/c miševima (slika 11).



**Slika 11. Replikacija delecijjskih mutanti u *nu/nu* BALB/c miševima.** BALB/c fibroblasti (MEF) inficirane su s 2 PFU naznačenih virusa po stanici i 12 sati poslije infekcije  $5 \times 10^4$  stanica intravenski je injicirano u *nude* BALB/c miševima. Titar virusa u plućima određen je 3. dana poslije infekcije. Prikazani su pojedinačni virusni titrovi i medijane vrijednosti (vodoravne crte).

Sukladno prethodno opisanim rezultatima, u plućima *nude* BALB/c miševa tri dana nakon infekcije delecijnska mutanta za *m152* gen postizala je značajno niži titar u odnosu na divlji tip i revertantni virusni soj, dok istovremeno *m06*-delecijnska mutanta nije bila atenuirana. U drugom pokusu na *nude* BALB/c miševima, u kojem smo koristili samo *m152*-delecijnsku mutantu i revertantni soj virusa, sukladno rezultatima na normalnim BALB/c miševima, delecija NK-stanica rezultirala je značajnim porastom titra delecijnske mutante za *m152* gen, dok nije imala učinka na titar revertantnog virusnog soja (tablica 2).

**Tablica 2. Replikacija *m152*-delecijnske mutante u *nu/nu* BALB/c miševima\***

	$\Delta m152$		m152Rev	
	$\emptyset$	$\alpha AGM1$	$\emptyset$	$\alpha AGM1$
Titar virusa u plućima	10 000	68 000	180 000	230 000
	20 000	70 000	210 000	250 000
	18 000	48 000	210 000	310 000
	29 000	75 000	400 000	260 000
Srednja vrijednost	$\bar{x}=19\ 250$	$\bar{x}=65\ 250$	$\bar{x}=250\ 000$	$\bar{x}=262\ 500$

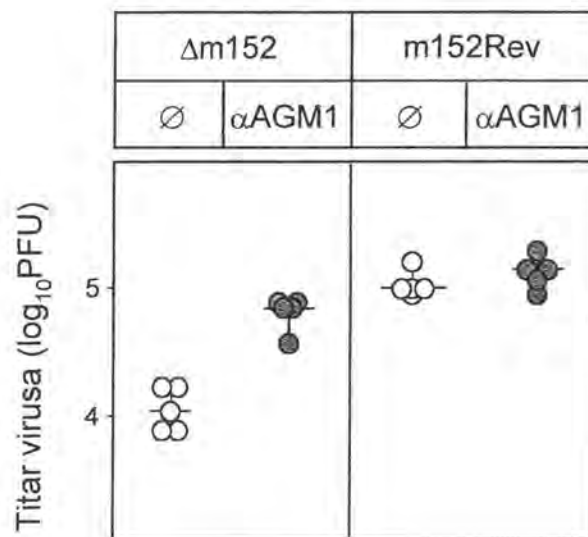
\*BALB/c fibroblasti (MEF) inficirani su s 2 PFU/stanici te 12 sati po infekciji intravenski injicirani ( $8 \times 10^4$  stanica) u *nude* BALB/c miševima kojima su bile depletirane NK-stanice (s  $\alpha AGM1$ ) ili su ostavljeni netretirani. Titar virusa određen je 3. dana poslije infekcije. Prikazani su pojedinačni virusni titrovi, te srednja vrijednost titrova virusa pojedine skupine miševa ( $\bar{x}$ ).

Iz rezultata ove skupine pokusa zaključili smo da u BALB/c mišjeg soja prisutnost *m152* gena u virusnom genomu čini virus otpornim na djelovanje NK-stanica. Budući je već dobro poznata uloga *m152/gp40* u izbjegavanju  $CD8^+$  limfocita T, očito je da *m152/gp40* omogućuje virusu da izmiče kontroli posredovanoj i  $CD8^+$  limfocitima T i NK-stanicama. *m04* gen također omogućuje virusu izbjegavanje NK-limfocita, dok *m06* gen nema učinka na izbjegavanje imunološkog nadzora posredovanog stanicama NK.

#### 4.5. Inhibicijski učinak *m152/gp40* na aktivnost NK-stanica nije ispoljen u C57BL/6 miševa

Već smo ranije pokazali da je osjetljivost MCMV-a na NK-stanice ovisna o mišjem soju (slika 6). Stoga smo učinak *m152* gena na NK-aktivnost testirali u nekoliko sojeva miševa kako bi ispitali eventualnu povezanost osjetljivosti virusa na NK-stanice i funkcije produkta *m152* gena. Pokuse smo izveli na C57BL/6, DBA/2, A/J te  $IFN\gamma R^{-/}$  (129 genska osnova) miševima.

U DBA/2 miševima postojala je razlika između *m152*-delecijske mutante i revertantnog virusa s obzirom na osjetljivost na nadzor posredovan NK-stanicama (slika 12). Kao i u BALB/c soja revertantni virus bio je otporan na NK-stanični nadzor te postizao značajno viši titar od delecijske mutante za *m152* gen. Razlika između titra *m152*-delecijske mutante i revertantnog virusa nestala je nakon deplecije NK-stanica. Prema tome *m152* gen ispoljava inhibicijski učinak na NK-stanice i u miševima DBA/2 soja.



**Slika 12. Replikacija *m152*-delecijske mutante u DBA/2 miševima.** BALB/c fibroblasti (MEF) inficirani su s 2 PFU/stanici i 2 sata poslije infekcije  $10^5$  stanica intravenski je injicirano u DBA/2 miševima. U svakoj skupini dio životinja je tretiran s protuserumom na AGM1 radi uklanjanja NK-stanica. Virusni titar u plućima određen je 2. dana po infekciji. Prikazani su pojedinačni virusni titrovi i medijane vrijednosti (vodoravne crte).

**Tablica 3. Replikacija *m152*-delecijske mutante u  $IFN\gamma R^{-}$  miševima\***

Titar virusa	$\Delta m152$	<i>m152Rev</i>
pluća	2 300	110 000
	5 000	40 000
	3 800	490 000
	9 800	450 000
	14 000	160 000
	5 100	148 000
slezena	100 000	540 000
	44 000	360 000
	35 000	3 900 000
	28 000	1 600 000
	54 000	1 240 000
	21 000	1 580 000
jetra	151 111	7 249 070
	176 056	338 409
	193 548	4 128 440
	202 429	98 928 277
	948 617	30 057 803
	220 264	3 393 425

\*  $IFN\gamma R^{-}$  miševi intravenski su injicirani s  $2 \times 10^5$  PFU naznačenih virusa. Titar virusa u organima određen je 3. dana poslije infekcije.

**Tablica 4. Replikacija *m152*-delecijske mutante u  $IFN\gamma R^{-}$  miševima nakon deplecije NK-stanica\***

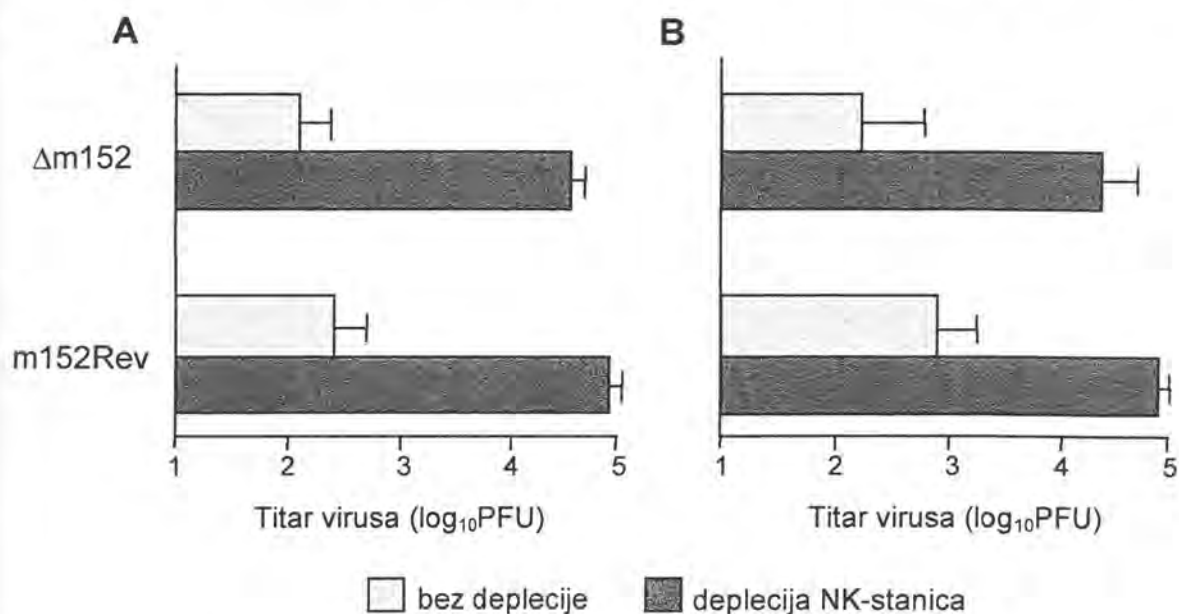
	$\Delta m152$		<i>m152Rev</i>	
	$\emptyset$	$\alpha AGM1$	$\emptyset$	$\alpha AGM1$
Titar virusa u plućima	60 000	260 000	370 000	310 000
	70 000	150 000	280 000	510 000
	20 000	240 000	220 000	800 000
	30 000	120 000	180 000	500 000
	30 000	70 000	490 000	400 000
Srednja vrijednost	$\bar{x}=42\ 000$	$\bar{x}=168\ 000$	$\bar{x}=308\ 000$	$\bar{x}=504\ 000$

\*BALB/c fibroblasti (MEF) inficirani su s 2 PFU/stanici naznačenih virusa te 12 sati po infekciji intravenski injicirani ( $8 \times 10^4$  stanica) u  $IFN\gamma R^{-}$  miševima kojima su bile depletirane NK-stanice (s  $\alpha AGM1$ ) ili su ostavljeni netretirani. Titar virusa određen je 3. dana poslije infekcije. Prikazani su pojedinačni virusni titrovi, te srednja vrijednost titrova virusa pojedine skupine miševa ( $\bar{x}$ ).



Izrazita atenuacija *m152*-delecijske mutante u odnosu na kontrolni virus postojala je i u  $\text{IFN}\gamma\text{R}^{-/}$  miševima (tablica 3). Trećeg dana po intravenskoj infekciji pročišćenim virusima (a isto tako i desetog dana nakon infekcije) postojala je značajna razlika u titru *m152*-delecijske mutante i revertante u svim analiziranim organima inficiranih miševa. U pokusu izvedenom po infuzijskom protokolu, titar *m152*-delecijske mutante značajno se povećavao nakon deplecije NK-stanica, te se približavao razini koju je neovisno o NK-depleciji dosegao revertantni virusni soj (tablica 4).

Za razliku od navedenih sojeva, u kojih je ispoljen učinak *m152* gena na funkciju NK-limfocita, u C57BL/6 miševa nije postojala razlika u osjetljivosti na imunološki nadzor posredovan NK-stanicama između *m152*-delecijske mutante i revertantnog soja virusa (slika 13). U ovih miševa oba su virusa bila pod učinkovitim NK-staničnim nadzorom. Drugim riječima ukoliko su NK-stanice bile prisutne titar oba virusa bio je nizak, da bi nakon deplecije NK-stanica došlo do značajnog porasta titra virusa, neovisno o prisutnosti ili odsutnosti *m152* gena iz virusnog genoma.



**Slika 13. C57BL/6 miševi rezistentni su na NK-inhibicijski učinak *m152/gp40*.** A) C57BL/6 miševi intraperitonealno su injicirani s  $5 \times 10^5$  PFU naznačenih virusa. B) BALB/c fibroblasti (MEF) inficirani su s 2 PFU/stanici i 12 sata poslije infekcije  $10^5$  stanica intravenski je injicirano u C57BL/6 miševe. U svakoj skupini dijelu životinja depletirane su NK-stanice pomoću protutijela na NK1.1. Virusni titar u plućima određen je 3. dana po infekciji.

Na miševima A/J soja provedli smo pokus prema protokolu klasične intraperitonealne infekcije pročišćenim virusima (tablica 5). Kao i u C57BL/6 soja, deplecija NK-stanica rezultirala je značajnim porastom titra i jednog i drugog virusa, sugerirajući da inhibicijski učinak *m152* gena na NK-stanice nije ispoljen niti u ovom soja miševa.

**Tablica 5. Replikacija *m152*-delecijske mutante u A/J miševima\***

	$\Delta m152$		m152Rev	
	$\emptyset$	$\alpha$ AGM1	$\emptyset$	$\alpha$ AGM1
Titar virusa u slezeni	40 000	260 000	9 000	68 000
	39 000	650 000	19 000	440 000
	49 000	140 000	85 000	85 000
	85 000	780 000	15 000	110 000
	85 000	770 000	66 000	530 000
Srednja vrijednost	$\bar{x}=59\ 600$	$\bar{x}=520\ 000$	$\bar{x}=38\ 800$	$\bar{x}=246\ 600$

\* A/J miševi intraperitonealno su injicirani s  $2 \times 10^5$  PFU naznačenih virusa. U svakoj skupini dio životinja je tretiran s protuserumom na AGM1 radi uklanjanja NK-stanica. Titar virusa određen je 3. dana poslije infekcije. Prikazani su pojedinačni virusni titrovi, te srednja vrijednost titrova virusa pojedine skupine miševa ( $\bar{x}$ ).

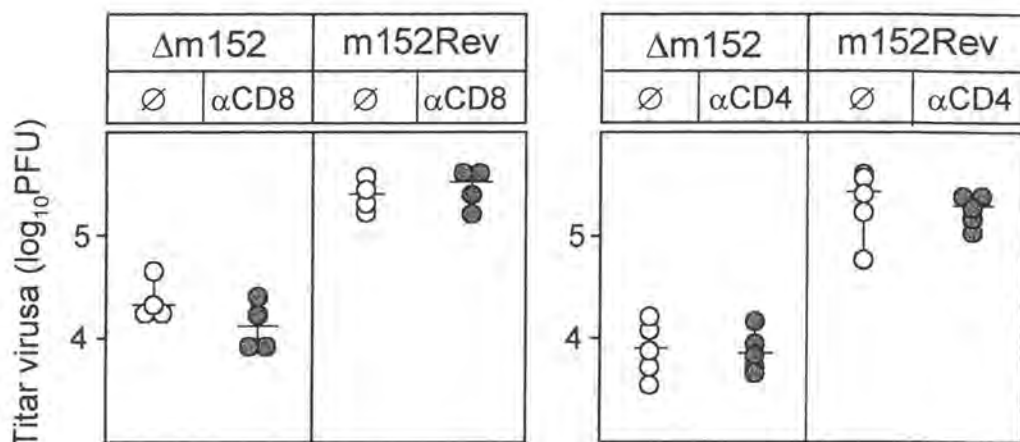
Iz dobivenih rezultata zaključili smo da je inhibicijski učinak *m152* gena i njegovog glikoproteinskog produkta gp40 na aktivnost NK-stanica ovisan o mišjem soju.

#### **4.6. Inhibicija NK-stanica posredovana produktom *m152* gena neovisna je o funkciji limfocita T**

Iako je dobro poznato da limfociti T nemaju ulogu u nadzoru MCMV-a prvih nekoliko dana nakon infekcije, ipak, budući smo u prethodno objavljenom radu (126) dokazali ovisnost atenuacije *m152*-delecijske mutante o imunološkom nadzoru posredovanom limfocitima T (posebno CD8<sup>+</sup> stanicama) bilo je potrebno isključiti

moгуćnost da su ove stanice neizravno odgovorne i za atenuaciju *m152*-delecijske mutante trećeg dana poslije infekcije. Stoga smo izveli pokus s deplecijom CD8<sup>+</sup> limfocita T.

Slijedeći infuzijski protokol, BALB/c miševi su injicirani intravenski sa singeničnim fibroblastima koji su prethodno inficirani s delecijskom mutantom za *m152* gen ili revertantim virusnim sojem, te su pojedinim grupama miševa depletirani CD8<sup>+</sup> limfociti T (slika 14). Treći dan poslije infekcije u plućima inficiranih miševa *m152*-delecijska mutanta ponovno je kao i u prethodnim pokusima postigla značajno niži titar u odnosu na revertantni virus, ali deplecija CD8<sup>+</sup> limfocita T nije imala učinka na titar bilo delecijske mutante bilo revertantnog virusa.



**Slika 14. Neovisnost atenuacije *m152*-delecijske mutante o limfocitima T trećeg dana nakon infekcije.** BALB/c fibroblasti (MEF) inficirani su s 2 PFU/stanici i 12 sati poslije infekcije 10<sup>5</sup> stanica intravenski injicirano u BALB/c miševe. U svakoj skupini dio životinja je tretiran s protutijelima na CD4 ili CD8. Virusni titar u plućima određen je 3. dana po infekciji. Prikazani su pojedinačni virusni titrovi i medijane vrijednosti (vodoravne crte).

Također smo slijedeći isti potokol ispitali moguću ulogu CD4<sup>+</sup> stanica trećeg dana po infekciji, ali poput CD8<sup>+</sup> limfocita T, niti ove stanice nisu bile važne za imunološki nadzor virusa u ranom razdoblju nakon infekcije (slika 14).

Rezultat ovog pokusa jasno je pokazao da niti CD8<sup>+</sup> niti CD4<sup>+</sup> limfociti T nisu odgovorni za povećanu osjetljivost *m152*-delecijske mutante prema NK-stanicama *in vivo*.

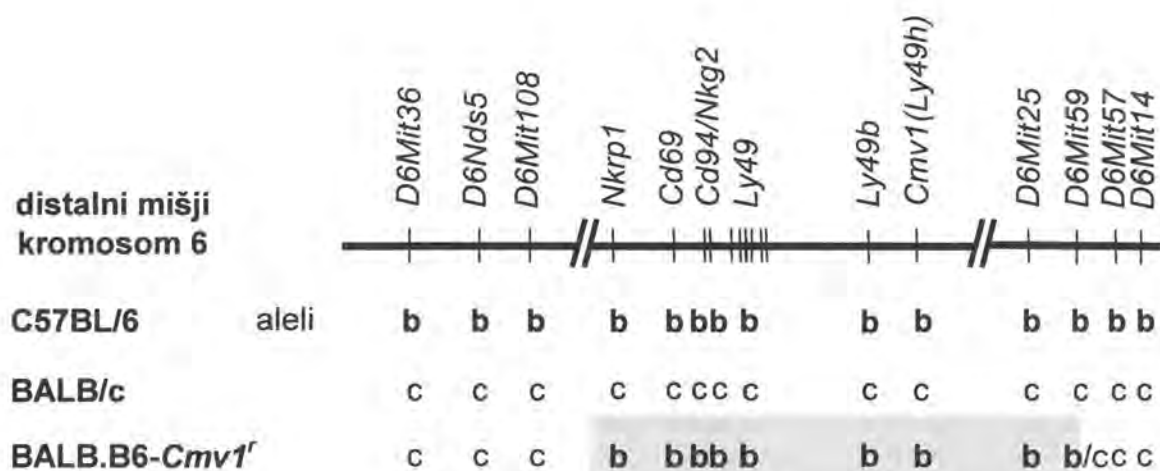
#### **4.7. Gen odgovoran za rezistenciju prema inhibicijskom učinku *m152/gp40* smješten je unutar NK-kompleksa**

Do sada prikazani rezultati pokazali su da su NK-stanice kod BALB/c miševa snažno inhibirane funkcijom *m152* gena. Iz tog razloga delecija NK-stanica nema učinka na titar divljeg tipa MCMV-a u ovom mišjem soju. Nakon delecije *m152* gena iz virusnog genoma NK-stanice učinkovito ograničavaju replikaciju tako nastale MCMV delecijske mutante, potvrđujući ulogu upravo *m152* gena u izbjegavanju nadzora posredovanog NK-stanicama. Za razliku od BALB/c soja miševa, kod C57BL/6 soja postoji rezistencija prema inhibicijskom učinku *m152* gena na NK-stanice, odnosno i virus koji posjeduje *m152* gen pod imunološkim je nadzorom NK-stanica. U narednim pokusima pokušali smo ustanoviti po čemu se to razlikuju ovi mišji sojevi, a što bi moglo imati utjecaja na različito ispoljavanje NK-inhibicijskog učinka *m152/gp40*.

Poznato je da se mišji sojevi međusobno razlikuju u repertoaru receptora ispoljenih na površini njihovih NK-stanica. Geni koji kodiraju većinu NK-staničnih receptora ili reguliraju funkciju NK-stanica kod miša su smješteni na distalnom kraku 6. kromosoma, u regiji koja se naziva NK-kompleks (NKC - od *engl.* NK gene complex) (149). Sojevi miševa, osim što se razlikuju u repertoaru NK-receptora, razlikuju se i s obzirom na alele pojedinih gena unutar NK-kompleksa.

Da bismo ustanovili da li je razlika u NK-kompleksu između BALB/c i C57BL/6 miševa odgovorna za različitu otpornost/osjetljivost na inhibicijski učinak *m152* gena na NK-stanice tijekom MCMV infekcije, upotrijebili smo BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>* kongeničan soj miševa (141). Ovaj soj miševa u potpunosti je na BALB/c genskoj osnovi, osim što je segment gena NK-kompleksa, od *Tnfr1* do *D6Mit25* prenesen s

C57BL/6 na BALB/c soj. Unutar ovog segmenta nalaze se geni za brojne NK-receptore poput *Nkrp1-a*, *Cd94*, *Ly49-a*, *Cd69*, *Ly49-h*, *Nkg2* (slika 15).



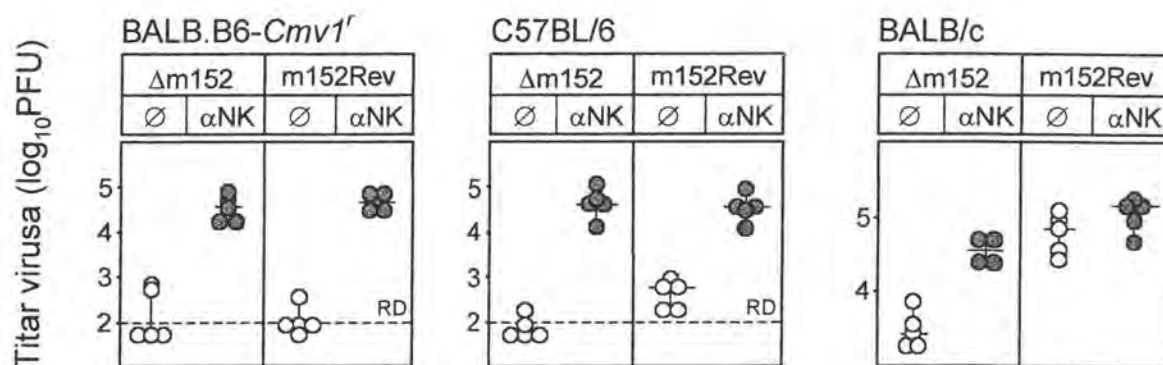
Slika 15. NK-kompleks BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>* miševa. b-C57BL/6 alel; c-BALB/c alel

Na BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>* miševima napravili smo veći broj pokusa, neke od njih slijedeći protokol klasične intravenske infekcije pročišćenim virusom, a neke eksperimente koristeći infuzijski protokol injiciranja inficiranih fibroblasta (tablica 6, slika 16). Neovisno o primijenjenom protokolu infekcije ovaj kongeničan soj miševa ponašao se kao roditeljski C57BL/6 soj. BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>* miševi bili su rezistentni na MCMV, te su nakon infekcije i revertantni virus i *m152*-delecijska mutanta postizali nizak titar, odnosno bili su podložni nadzoru posredovanom NK-stanicama. Nakon deplecije NK-stanica dolazilo je do značajnog i podjednakog porasta titra oba virusa, sugerirajući da su ovi miševi, poput C57BL/6 soja, rezistentni na inhibicijski učinak *m152* gena na NK-stanice.

Tablica 6. Replikacija *m152*-delecijske mutante u BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>* miševima\*

	$\Delta m152$		m152Rev	
	$\emptyset$	$\alpha AGM1$	$\emptyset$	$\alpha AGM1$
<b>1. pokus</b>				
Pluća	667	5 040	2 460	11 240
Slezena	3 917	520 000	27 640	824 000
Jetra	104 518	2 168 284	156 041	5 042 873
<b>2. pokus</b>				
Pluća	717	6 920	6 380	5 820
Slezena	100	4 540	240	3 560
Jetra	47 897	3 316 331	193 477	2 458 824
<b>3. pokus</b>				
Pluća	2 350	9 620	3 083	5 140
Slezena	100	22 200	400	28 000

\* BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>* miševi intravenski su injicirani s  $2 \times 10^5$  PFU naznačenih virusa. U svakoj skupini dio životinja je tretiran s protutijelom na NK1.1 radi uklanjanja NK-stanica. Titar virusa određen je 3. dana poslije infekcije. Prikazane su srednje vrijednosti titrova virusa pojedinih skupina miševa.



Slika 16. BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>* miševi rezistentni su na NK-inhibicijski učinak *m152/gp40*. BALB/c fibroblasti (MEF) inficirani su s 2 PFU/stanici i 2 sata poslije infekcije  $10^5$  stanica intravenski je injicirano u BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>*, BALB/c i C57BL/6 miševima. U svakoj skupini dijelu životinja depletirane su NK-stanice (pomoću protuseruma na AGM1 ili protutijelom na NK1.1). Virusni titar u plućima određen je 2. dana po infekciji. Prikazani su pojedinačni virusni titrovi i medijane vrijednosti (vodoravne crte). (RD) Razina detekcije.

Budući se BALB/c i BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>* miševi razlikuju isključivo u NK-kompleksu, a istovremeno jedino u čemu se BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>* miševi podudaraju s C57BL/6 miševima jest NK-kompleks, zaključili smo da je gen odgovoran za rezistenciju na inhibicijski učinak *m152* gena smješten unutar NK-kompleksa, na distalnom kraku 6. kromosoma.

#### **4.8. Mapiranje lokusa gena unutar NK-kompleksa odgovornog za osjetljivost/otpornost na inhibicijski učinak *m152/gp40***

Rezultati pokusa na BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>* miševima pokazali su da je gen odgovoran za otpornost na inhibicijski učinak *m152* gena smješten unutar NK-kompleksa (NKC). Stoga je logičan slijed naših istraživanja bio pokušati pobliže odrediti lokuse unutar NK-kompleksa koji određuju ovu rezistenciju. U tu svrhu koristili smo tzv. intra-NKC kongenične i rekombinantne sojeve miševa: BALB.B6-CT1, -CT3, -CT6, -CT8, -CT12, -CT13 i B6.BALB-*Cmv1<sup>s</sup>* (142). Ovi mišji sojevi međusobno se razlikuju po kombinacijama BALB/c i C57BL/6 alela unutar NK-kompleksa (tablica 7). Dobiveni su međusobnim križanjem miševa (BALB/c x BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>*) F1 generacije. Miševima tako nastale F2 generacije tipizirani su geni unutar NK-kompleksa. One životinje kod kojih je ustanovljeno da je došlo do rekombinacije unutar NK-kompleksa daljnjim križanjem s BALB/c miševima, te tako nastalih heterozigota međusobno, iskorištene su za dobivanje homozigotnih linija gore navedenih miševa s rekombinacijama unutar NK-kompleksa (intra-NKC rekombinantni sojevi miševa) (142).

Da bismo istovremeno mogli pratiti i titar virusa u slezene (a budući je gen koji određuje rezistenciju na MCMV te titar virusa u slezeni (*Cmv1 - Ly49-h*) smješten u NK-kompleksu) (78,150,151) u narednom pokusu intra-NKC rekombinantne i kongenične sojeve miševa intravenski smo injicirali pročišćenim virusima, depletirali NK-stanice pojedinim grupama životinja i odredili titar virusa u pojedinim organima 3. dana poslije infekcije (tablica 8).

Tablica 7. Genotip intra-NKC rekombinantnih i kongeničnih miševa.

mišji soj	D6Mit108	Tnfr1	D6Mit52	D6Mit194	Nkrp1-a	D6Mit135	Cd69	Cd94	Ly49-a	Cmv1	D6Mit13	D6Mit10	D6Mit25	D6Mit59	distalni kromosom 6
B6.BALB- <i>Cmv1</i> <sup>s</sup>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	
BALB.B6-CT13	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	
BALB.B6-CT12	<b>c</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	
BALB.B6-CT8	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	
BALB.B6-CT6	<b>c</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	
BALB.B6-CT3	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	b - C57BL/6 alel c - BALB/c alel
BALB.B6-CT1	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	

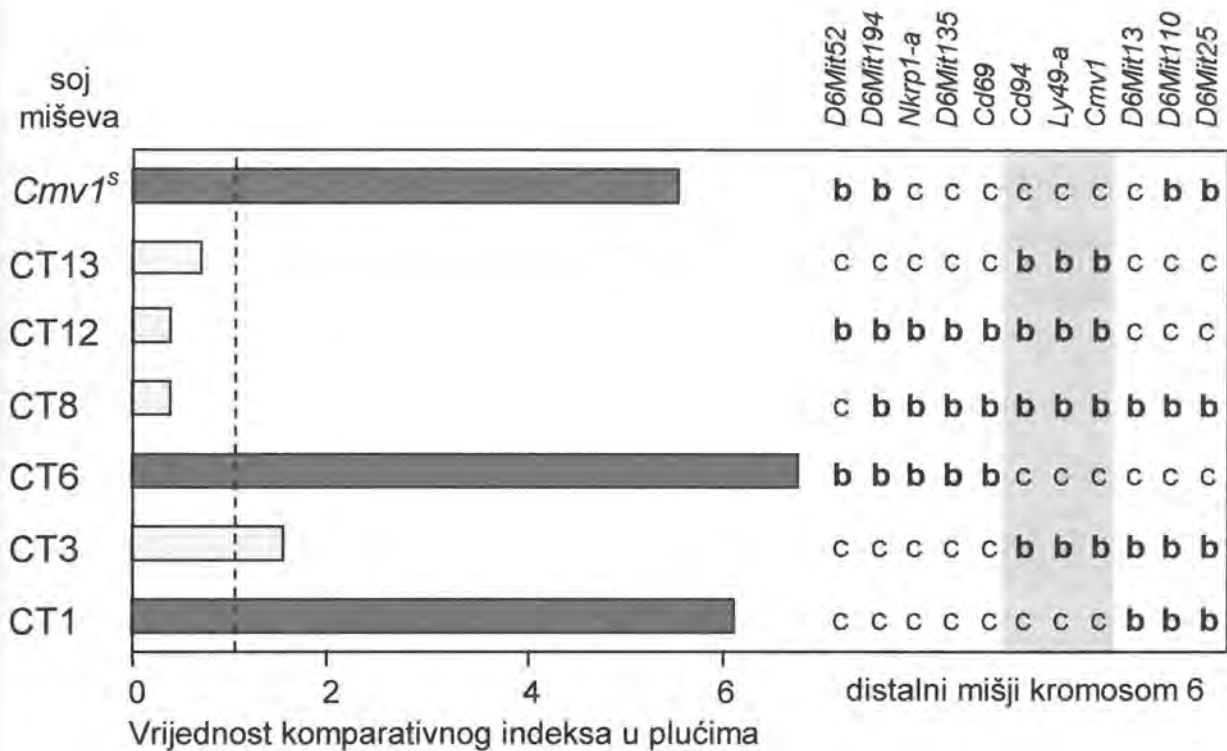
Iako s obzirom na rekombinacijska mjesta unutar NK-kompleksa nismo mogli svesti NK-inhibicijski učinak *m152* gena na samo jedan genski lokus (između pojedinih lokusa unutar NK-kompleksa nikada nije došlo do rekombinacije), već je na prvi pogled iz tablice 8, koja prikazuje razine titra virusa u plućima, jasno da sojevi miševa koji imaju *Cd94*, *Ly49-a* i *Cmv1* alele od C57BL/6 soja pokazuju rezistenciju na inhibicijski učinak *m152* gena (to su sojevi BALB.B6-CT3, -CT8, -CT12 i CT-13).



**Tablica 8. Replikacija virusa u intra-NKC rekombinantnim miševima\***

mišji soj	$\Delta m152$		m152Rev	
	$\emptyset$	$\alpha$ NK	$\emptyset$	$\alpha$ NK
<b>BALB.B6-CT1</b>	4 700	95 000	15 000	50 000
	5 100	110 000	16 000	56 000
	10 900	125 000	14 000	60 000
	3 200		29 000	
BALB.B6-CT3	1 500	30 000	1 100	6 000
	2 900	60 000	100	30 000
	1 000	53 000	5 000	30 000
	3 800		400	
<b>BALB.B6-CT6</b>	7 500	55 000	10 000	20 000
	1 600	90 000	11 000	18 000
	6 500	35 000	14 000	40 000
	2 200		17 000	
BALB.B6-CT8	10 000	77 000	1 500	76 000
	3 000	68 000	6 000	70 000
	7 000	80 000	1 100	46 000
	9 000		2 200	
BALB.B6-CT12	7 000	80 000	1 300	16 000
	25 000	170 000	1 800	60 000
	7 000	120 000	3 000	50 000
	18 000		1 800	
BALB.B6-CT13	2 000	31 000	400	32 000
	5 000	51 000	200	26 000
	1 800	90 000	600	17 000
	1 800		2 100	
<b>B6.BALB- Cmv1<sup>s</sup></b>	74 000	250 000	80 000	65 000
	60 000	160 000	80 000	60 000
	79 000	340 000	90 000	50 000
	40 000		83 000	
<b>BALB/c</b>	5 500	200 000	20 000	50 000
	7 000	220 000	35 000	55 000
	14 000	200 000	68 000	45 000
	9 000		16 300	22 000

\* Intra-NKC rekombinantni miševi intravenski su injicirani s  $5 \times 10^5$  PFU naznačenih virusa. U svakoj skupini dijelu životinja su depletirane NK-stanice (protuserumom na AGM1 ili protutijelom na NK1.1). Titar virusa određen je u plućima 3. dana poslije infekcije. Prikazani su pojedinačni virusni titrovi.



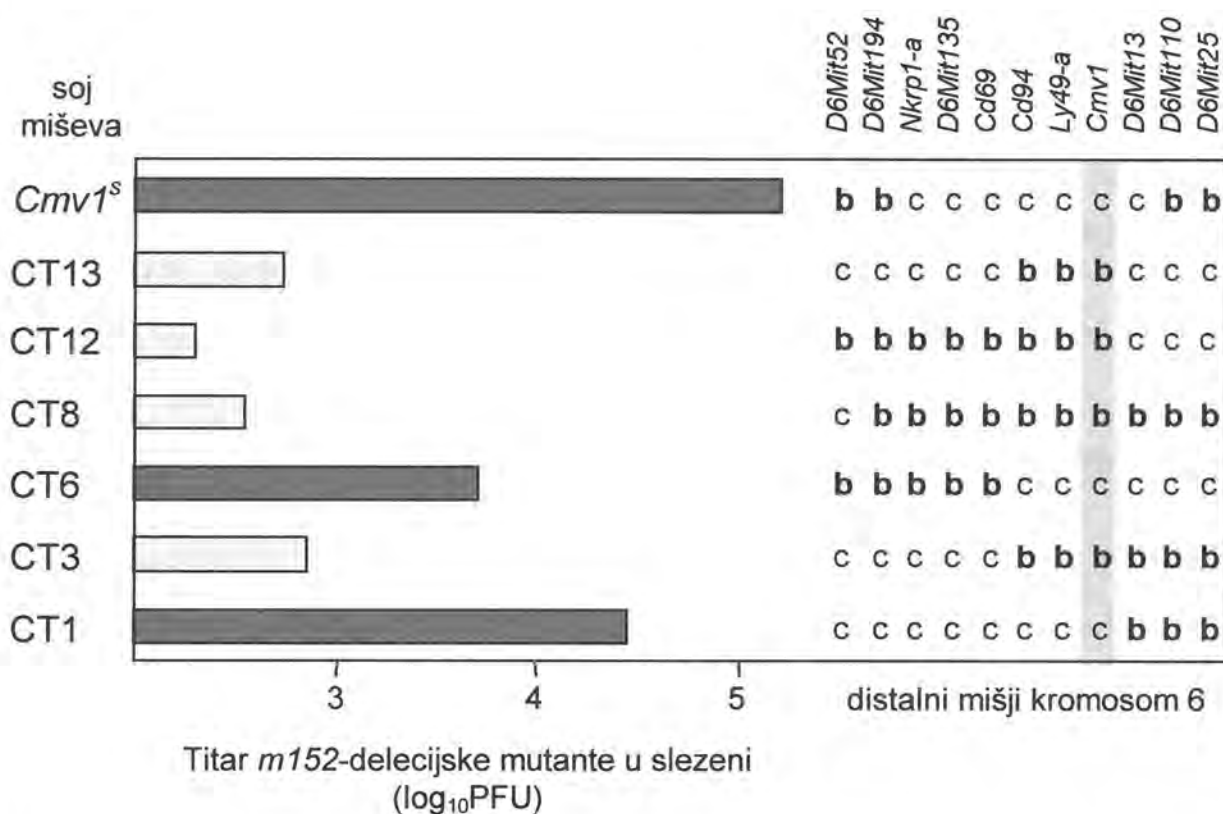
**Slika 17. Komparativni indeks porasta virusnih titrova u plućima.** Intra-NKC rekombinantni miševi intravenski su injicirani s  $5 \times 10^5$  PFU  $\Delta m152$  ili revertantnog virusa. U svakoj skupini dijelu životinja su bile depletirane NK-stanice ili su ostavljeni netretirani. Titar virusa određen je 3. dana poslije infekcije. Prikazane su vrijednosti komparativnog indeksa porasta virusnih titrova u plućima, izračunate prema formuli:

$$\frac{\text{srednja vrijednost titra } \Delta m152 \text{ nakon deplecije NK-stanica}}{\text{srednja vrijednost titra } \Delta m152 \text{ (bez deplecije)}} \div \frac{\text{srednja vrijednost titra m152Rev nakon deplecije NK-stanica}}{\text{srednja vrijednost titra m152Rev (bez deplecije)}}$$

b-C57BL/6 alel; c-BALB/c alel

Znatno jasnija slika dobije se kada se rezultati prikažu pomoću komparativnog indeksa (slika 17). Komparativni indeks predstavlja omjer porasta titra *m152*-delecijske mutante nakon deplecije NK-stanica i porasta titra revertantnog virusa nakon deplecije NK-stanica. Ukoliko titar oba virusa raste nakon deplecije NK-stanica podjednako, vrijednost komparativnog indeksa je oko 1 (npr kod C57BL/6 miševa). Nasuprot tome u slučaju BALB/c soja porast titra delecijske mutante nakon NK-deplecije daleko je veći od porasta titra revertantnog virusnog soja, te je i vrijednost komparativnog indeksa puno veća od 1. Na slici 17 jasno je vidljivo da oni

sojevi intra-NKC rekombinantnih i kongeničnih miševa (BALB.B6-CT3, -CT8, -CT12, -CT13) koji imaju *Cd94*, *Ly49-a* i *Cmv1* alele od C57BL/6 soja imaju vrijednost komparativnog indeksa oko 1, odnosno pokazuju rezistenciju na inhibicijski učinak *m152* gena. Istovremeno miševima (BALB.B6-CT1, -CT6, B6.BALB-*Cmv1*<sup>s</sup>) koji navedena tri alela imaju iz BALB/c soja vrijednost komparativnog indeksa daleko nadmašuje 1, odnosno poput BALB/c miševa i miševi ovih sojeva osjetljivi su na inhibicijski učinak *m152* gena na NK-stanice.



**Slika 18. NK-inhibicijski učinak *m152* gena nije povezan sa *Cmv1* genom.** Intra-NKC rekombinantni miševi injicirani su intravenski s  $5 \times 10^5$  PFU *m152*-delecijske mutante. Titar virusa u slezeni određen je 3. dana poslije infekcije. Prikazane su srednje vrijednosti virusnog titra pojedinih grupa miševa. b-C57BL/6 alel; c-BALB/c alel

Rezultati koje smo na intra-NKC rekombinantnim i kongeničnim miševima dobili u slezeni indirektno isključuju *Cmv1* gen kao gen odgovoran za razliku u

osjetljivosti na inhibicijski učinak *m152* gena. *Cmv1* gen (nedavno identificiran kao *Ly49-h*) određuje titar MCMV-a u slezeni (78,150,151). Ukoliko bi *Cmv1* gen bio odgovoran za otpornost/osjetljivost na NK-inhibicijski učinak *m152* gena, tada bi nakon infekcije miševa s *m152*-delecijskom mutantom, razlika u razini titra virusa u slezeni između sojeva koji se međusobno razlikuju u alelu za *Cmv1* trebala nestati (ovisno o tome da li posjeduju dominantni *Cmv1<sup>f</sup>* alel porijeklom iz C57BL/6 mišjeg soja ili recesivni alel *Cmv1<sup>s</sup>* porijeklom iz BALB/c miševa, sojevi se mogu podijeliti na rezistentne ili osjetljive na MCMV). Budući nakon infekcije s *m152*-delecijskom mutantom još uvijek postoji značajna razlika u razini virusnog titra između sojeva miševa koji su rezistentni i koji su osjetljivi na MCMV, zaključili smo da ovaj gen nema ulogu u inhibiciji NK-stanica posredovanoj *m152* genom (slika 18). Također ovaj zaključak podupire i rezultat dobiven na A/J soju miševa (tablica 3). Naime ovi miševi su *Cmv1<sup>s</sup>* (152), ali unatoč tome kod njih ne postoji inhibicijski učinak *m152* gena na NK-stanice.

#### **4.9. Učinak *m152* gena na ispoljavanje liganda za NK-receptore na ciljnim stanicama**

Infuzijski protokol intravenskog injiciranja inficiranih fibroblasta osim što nam je poslužio kao dodatni protokol za potvrdu rezultata dobivenih klasičnom intraperitonealnom ili intravenskom infekcijom pročišćenim virusima, omogućio nam je i istraživanje liganda (liganada) za NK-receptor ispoljenog na ciljnim stanicama koji regulira *m152* gen.

Kao što smo prethodno naveli, prvobitni infuzijski protokol kojeg smo koristili temeljio se na infekciji MEF-a s 2 PFU/stanici, te prijenosu  $10^5$  inficiranih stanica u miševu 12 sati poslije infekcije. Pojedinih grupama miševa depletirane su NK-stanice. Životinje su zatim ostavljene 3 dana i potom žrtvovane. U prvim pokusima kojima smo željeli izučavati ligande slijedili smo ovaj protokol, ali smo ga ubrzo modificirali. Naime znajući da replikacijski ciklus MCMV traje oko 24 sata, očito je bilo da 3,5 dana nakon infekcije stanica MEF-a virus prolazi slijedeći ciklus svoje

replikacije, izlazi iz stanica unesenih injiciranjem i ulazi u stanice domaćina, te fenotip koji registriramo nije više posljedica isključivo međuodnosa injiciranih stanica i primateljevih NK-stanica. Stoga i nismo nalazili razlike u ponašanju virusa ovisne o tipu injiciranih stanica 3. dana poslije infekcije.

Da bismo ograničili uplitanje naknadno inficiranih stanica domaćina u interakciju prenesenih ciljnih stanica i NK-stanica domaćina bilo je nužno skratiti period infekcije, to jest modificirati infuzijski protokol (slika 19). Prema tako modificiranom protokolu stanice smo injicirali u miševe 2 sata nakon infekcije (umjesto dotadašnjih 12 sati), a životinje žrtvovali 48 sati nakon infekcije stanica (umjesto 72 sata nakon infekcije životinja).



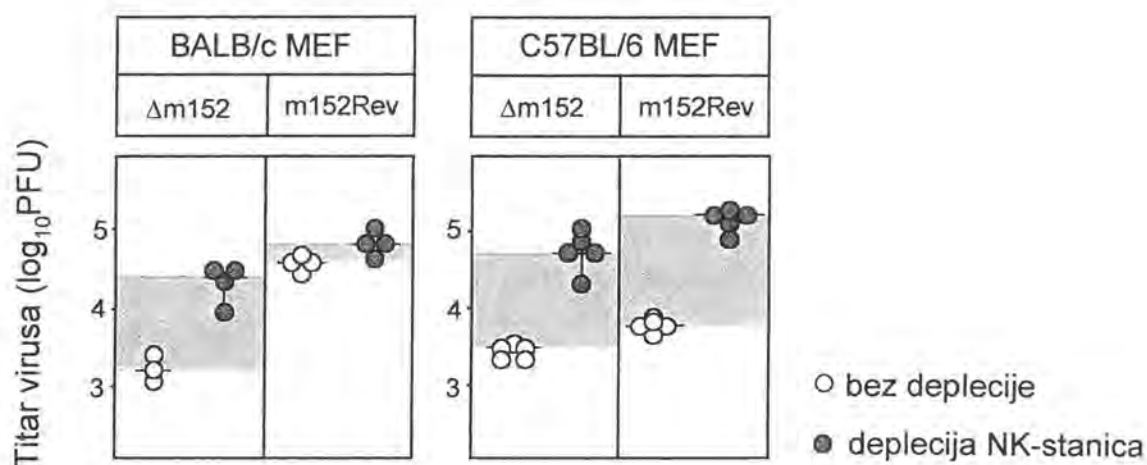
**Slika 19. Modificirani protokol injekcije inficiranih fibroblasta.** (MEF) mišji embrionalni fibroblasti; (p.i.) poslije infekcije; (i.v.) intravenski

#### 4.9.1. Inhibicijski učinak *m152* gena na NK-stanice ovisan je i o ligandu za NK-receptore na inficiranim stanicama

U prvom pokusu izvedenom po modificiranom infuzijskom protokolu u BALB/c miševe injicirali smo inficirane stanice MEF-a porijeklom iz BALB/c ili C57BL/6 mišjeg soja (slika 20). 48 sati po infekciji samo su BALB/c stanice inficirane s revertantnim virusom bile rezistentne na imunološki nadzor posredovan NK-stanicama. Stanice C57BL/6 MEF-a neovisno o tome da li su inficirane s *m152*-delecijskom mutantom ili revertantnim virusom, te stanice BALB/c MEF-a inficirane *m152*-delecijskom mutantom bile su vrlo dobro kontrolirane od strane NK-stanica, te smo našli nizak titar virusa, koji je značajno porastao nakon deplecije NK-stanica.

Istovremeno deplecija NK-stanica nije imala učinka na stanice BALB/c MEF-a inficirane revertantnim virusom, odnosno nije došlo do značajnog porasta titra virusa u plućima injiciranih životinja.

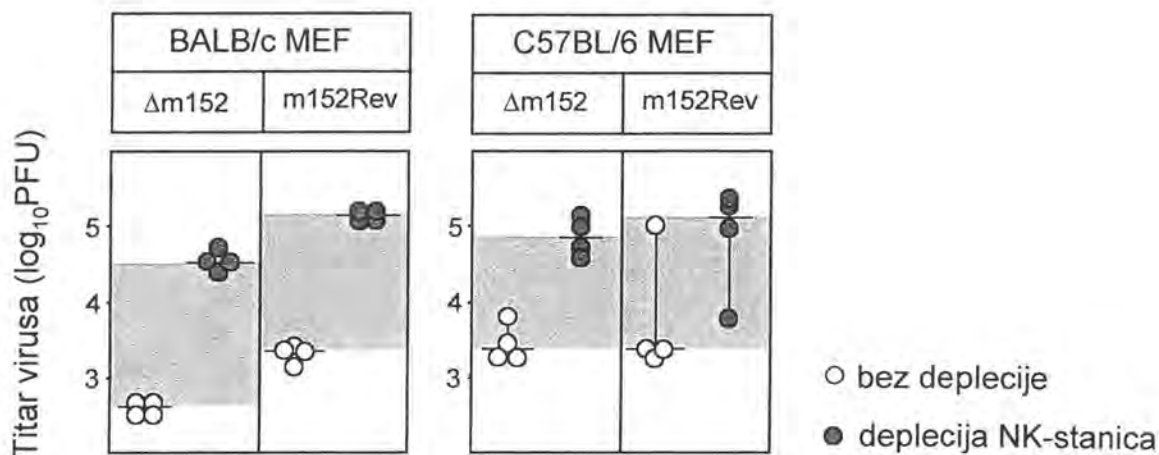
Rezultati ovog pokusa nedvojbeno ukazuju da je NK-inhibicija posredovana *m152* genom određena djelovanjem ovog gena ne samo na razini NK-receptora nego također i na razini liganda na inficiranoj stanici. Pritom izostanak NK-inhibicije u BALB/c miševa injiciranih sa stanicama porijeklom iz C57BL/6 soja može biti posljedica različitih MHC molekula razreda I ili razlike u ispoljavanju nekog drugog liganda za NK-receptore između ovih mišjih sojeva (što će biti analizirano kasnije u radu).



**Slika 20. NK-inhibicijski učinak *m152* gena ovisan je i o ligandu.** BALB/c i C57BL/6 fibroblasti (MEF) inficirani su s 2 PFU naznačenih virusa po stanici i 2 sata poslije infekcije  $10^5$  stanica intravenski injicirano u **BALB/c** miševe. U svakoj su skupini dijelu životinja depletirane NK-stanice. Virusni titar u plućima određen je 2. dana po infekciji. Prikazani su pojedinačni virusni titrovi i medijane vrijednosti (vodoravne crte).

Identičan pokus izveli smo i na C57BL/6 miševima. U ovom mišjem soju su sve injicirane stanice (i BALB/c i C57BL/6 porijekla, neovisno o virusu s kojim su bile inficirane) bile učinkovito kontrolirane putem NK-stanica domaćina te je titar virusa nađen u plućima inficiranih životinja značajno rastao nakon NK-delecije, a u prisutnosti NK-stanica bio izrazito nizak (slika 21). Drugim riječima inhibicijski učinak

*m152* gena na NK-stanice u ovoga mišjeg soja ne ispoljava se neovisno o injiciranim ciljnim stanicama.

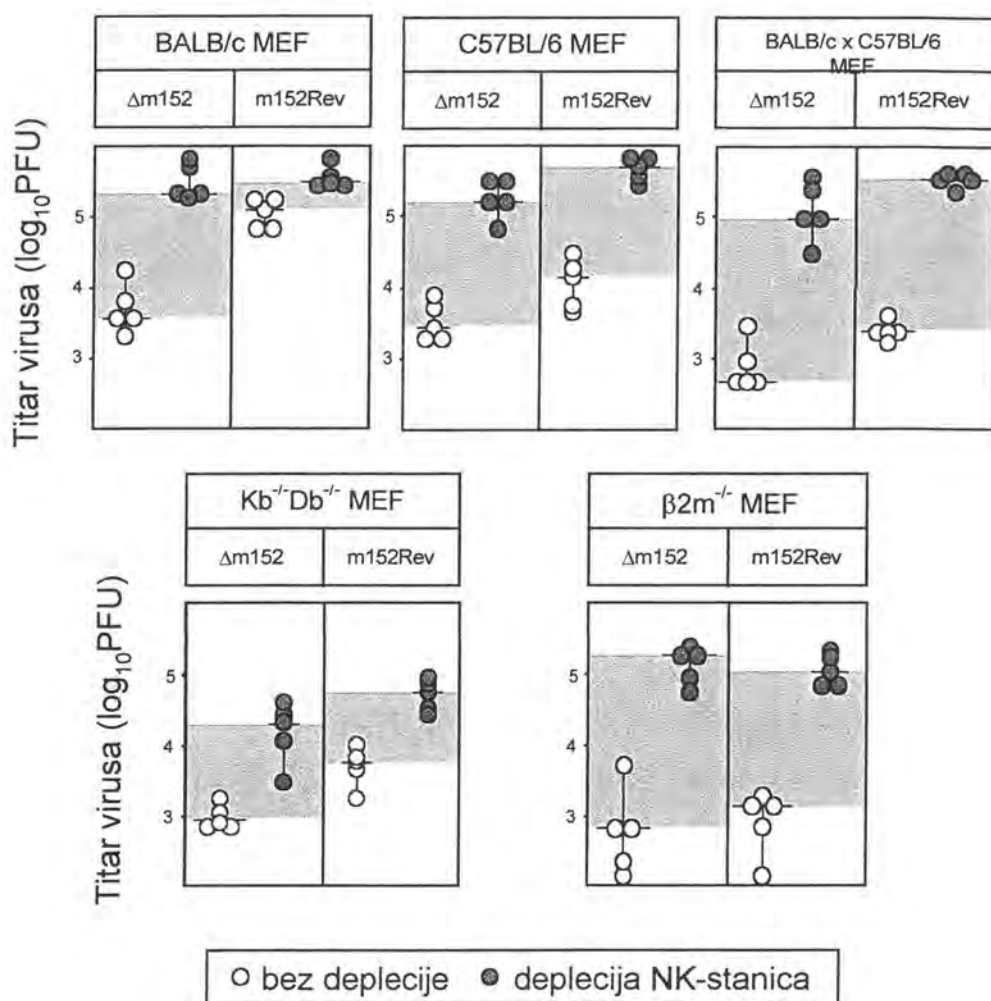


**Slika 21.** NK-inhibicijski učinak *m152* gena ne ispoljava se u C57BL/6 soju. BALB/c i C57BL/6 fibroblasti (MEF) inficirani su s 2 PFU naznačenih virusa po stanici i 2 sata poslije infekcije  $10^5$  stanica intravenski injicirano u C57BL/6 miševe. U svakoj su skupini dijelu životinja depletirane NK-stanice. Virusni titar u plućima određen je 2. dana po infekciji. Prikazani su pojedinačni virusni titrovi i medijane vrijednosti (vodoravne crte).

#### 4.9.2. Izostanak NK-inhibicije posredovane s *m152/gp40* nakon injiciranja inficiranih stanica deficitnih za TAP1 molekulu ili $\beta 2$ -mikroglobulin

Nakon što smo ustanovili da *m152* gen utječe i na NK-stanični ligand, pokušali smo pobliže odrediti o kojim molekulama na ciljnim stanicama bi se moglo raditi. Kao što je poznat velik broj receptora na NK-stanicama, tako postoje i brojni ligandi ovih receptora na ciljnim stanicama (60,69). MHC molekule razreda I ligandi su za veliku obitelj Ly49 receptora i ekspresija im se mijenja tijekom virusne infekcije (106,107,153). Također da bi se MHC molekule razreda I ispoljile na površini stanice teški lanac ove molekule mora biti povezan s  $\beta$ -mikroglobulinom te se na njih mora vezati peptid. Za pravilno procesiranje peptida unutar stanice neophodna je funkcija

TAP molekula, te posljedično u slučaju defekta ili nedostatka bilo TAP1 ili TAP2 molekule izostaje i normalno formiranje trimolekularnog MHC-I kompleksa, a samim time i ekspresija MHC molekula razreda I na površini stanice. I nedostatak  $\beta 2$ -mikroglobulina u stanici rezultira izostankom ispoljavanja MHC-I molekula na površini takve stanice. U narednim smo pokusima korištenjem različitih ciljnih stanica (među njima i stanica s deficitom TAP1 molekule i  $\beta 2$ -mikroglobulina) pokušali odrediti ligand na čije ispoljavanje utječe *m152/gp40*.



**Slika 22.** Inficirane  $\beta 2m^{-/-}$ ,  $K^b^{-/-}D^b^{-/-}$  i (BALB/c x C57BL/6) stanice učinkovito su kontrolirane NK-stanicama. BALB/c, C57BL/6,  $\beta 2m^{-/-}$ ,  $K^b^{-/-}D^b^{-/-}$  i (BALB/c x C57BL/6) fibroblasti (MEF) inficirani su s 2 PFU/stanica i 2 sata poslije infekcije  $10^5$  stanica intravenski injicirano u BALB/c miševe. U svakoj su skupini dijelu životinja depletirane NK-stanice. Virusni titar u plućima određen je 2. dana po infekciji. Prikazani su pojedinačni virusni titrovi i medijane vrijednosti (vodoravne crte).

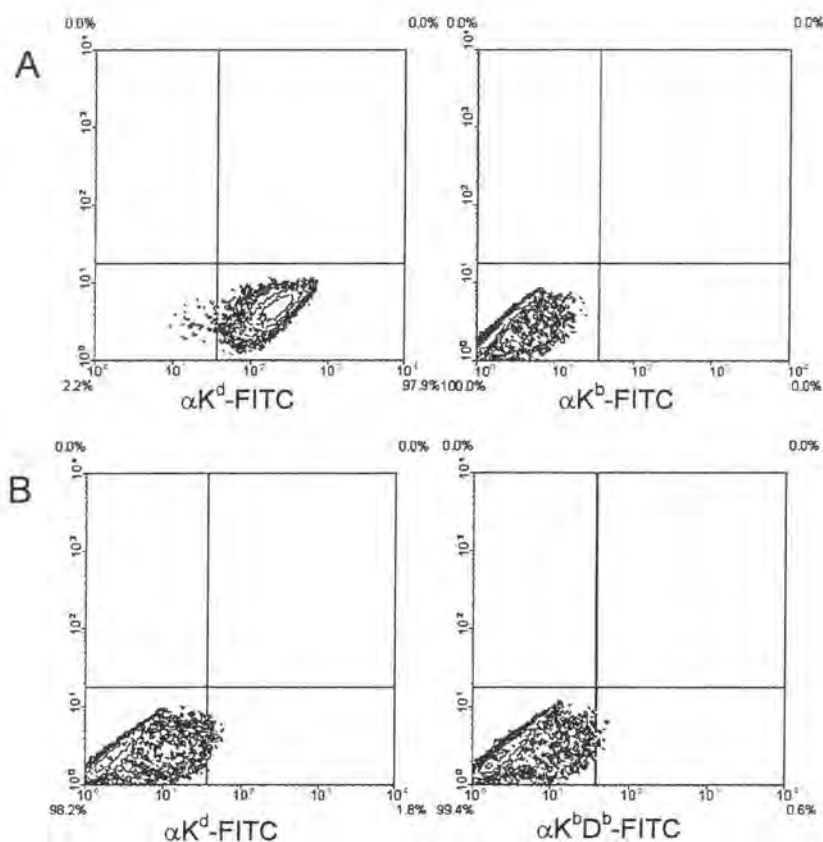


U životinje BALB/c soja injicirali smo inficirane fibroblaste porijeklom iz miševa kojima nedostaje  $\beta 2$ -mikroglobulin (te uslijed toga i MHC molekule razreda I) (16,17) ili  $K^bD^b$  molekule (MHC molekule razreda I) (143), a kao kontrola poslužile su nam životinje u koje smo injicirali inficirane stanice dobivene od BALB/c ili C57BL/6 miševa (slika 22). Također smo u pojedine grupe miševa injicirali stanice MEF-a dobivene iz F1 hibrida (BALB/c x C57BL/6) miševa. Iz slike 22 jasno se vidi da su inficirane  $\beta 2m^{-/-}$  kao i inficirane  $K^{b-/-}D^{b-/-}$  stanice bile efikasno nadzirane od strane NK-stanica. Rezistenciju na NK-inhibicijski učinak posredovan *m152* genom ispoljavale su samo stanice MEF-a porijeklom iz BALB/c miševa inficirane revertantnim virusom, dok su inficirane C57BL/6 stanice bile učinkovito kontrolirane od strane NK-stanica domaćina.

Interesantno je za uočiti da su stanice porijeklom iz F1 hibrida (BALB/c x C57BL/6) bile osjetljive na NK-stanični nadzor, odnosno ponašale su se poput stanica C57BL/6 roditeljskog soja, a ne poput stanica roditeljskog BALB/c soja. Iz ovoga proizlazi da je učinak *m152* gena na NK-stanični ligand na stanicama BALB/c porijekla nadvladan djelovanjem ili ekspresijom neke molekule porijeklom iz stanica C57BL/6 soja, otpornog na NK-inhibicijski učinak *m152* gena. Budući da F1 hibridi imaju receptor kodiran *Cmv1<sup>f</sup>* genom, moguće je da aktivacija tog receptora potisne inhibicijski učinak *m152* gena. Nadalje ne može se isključiti niti alogenički odgovor NK-stanica prema tuđim MHC-I molekulama.

Budući su  $K^{b-/-}D^{b-/-}$  životinje a i  $\beta 2m^{-/-}$ , od kojih su dobiveni odgovarajući fibroblasti korišteni u ovom pokusu bili na C57BL/6 genskoj osnovi, nije bilo moguće na temelju navedenih rezultata sa sigurnošću zaključiti da li je nedostatak inhibicijskog učinka *m152* gena nakon injiciranja ovih inficiranih stanica posljedica deficita molekula specifičnih za svake od navedenih stanica, ili je samo posljedica njihove genske podloge (kao što smo pokazali učinka na NK-stanice nije bilo niti nakon injiciranja inficiranih C57BL/6 fibroblasta u BALB/c miševima). Stoga je za donošenje bilo kakvih zaključaka bilo nužno pokuse provesti sa stanicama porijeklom iz miševa s BALB/c genskom pozadinom. Mutaciju gena za  $\beta 2$ -mikroglobulin uspjeli smo prenijeti s C57BL/6 miševa na BALB/c soj. MEF proizveden iz ovih miševa kao i MEF dobiven od *TAP1<sup>-/-</sup>* miševa (BALB/c genska

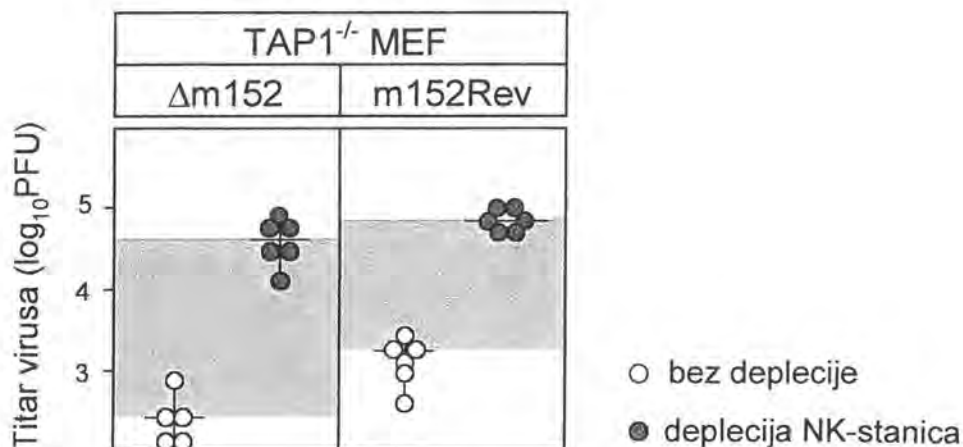
osnova) (ovim miševima uslijed nedostatka TAP1 molekule ne ispoljavaju se MHC molekule razreda I na površini stanica (slika 23)) (145) koristili smo u narednim pokusima.



**Slika 23. Analiza ispoljavanja MHC-I molekula na površini TAP1<sup>-/-</sup> BALB/c fibroblasta (MEF-a).** Protočnim citometrom smo testirali nazočnost MHC-I molekula (K<sup>d</sup>, K<sup>b</sup>, D<sup>b</sup>) na površini BALB/c (A) i TAP1<sup>-/-</sup> BALB/c (B) MEF-a. Prikazani su rezultati analize 10 000 stanica.

U BALB/c miševima injicirali smo inficirane TAP1<sup>-/-</sup> BALB/c fibroblaste te 48 sati po infekciji odredili titar virusa u plućima (slika 24). TAP1<sup>-/-</sup> BALB/c fibroblasti bili su, neovisno o virusu s kojim su inficirani, pod izrazitom kontrolom NK-stanica te je titar i *m152*-delecijske mutante i revertantnog virusa bio nizak u miševima bez NK-deplecije. Nakon deplecije NK-stanica došlo je do značajnog porasta titra oba virusa. Drugim

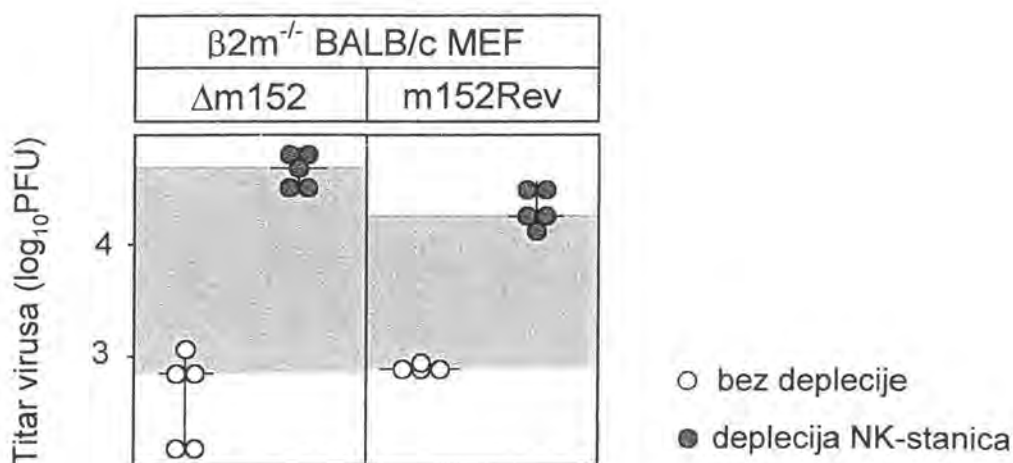
riječima, niti prisutnost *m152* gena u genomu revertantnog virusa nije učinila TAP1<sup>-/-</sup> BALB/c fibroblaste otpornima na nadzor posredovan NK-stanicama.



**Slika 24. Ligand reguliran *m152* genom ovisan je o TAP1 molekulima.** TAP1<sup>-/-</sup> BALB/c fibroblasti (MEF) inficirani su s 2 PFU/stanica i 2 sata poslije infekcije 10<sup>5</sup> stanica intravenski injicirano u BALB/c miševima. U svakoj skupini dijelu životinja depletirane su NK-stanice. Virusni titar u plućima određen je 2. dana po infekciji. Prikazani su pojedinačni virusni titrovi i medijane vrijednosti (vodoravne crte).

Identičan pokus proveli smo i sa β2m<sup>-/-</sup> BALB/c fibroblastima koje smo injicirali u BALB/c primatelje (slika 25). Rezultat pokusa bio je vrlo sličan rezultatu nakon infuzije TAP1<sup>-/-</sup> stanica. Za razliku od inficiranih BALB/c fibroblasta, kod kojih su ponovno stanice inficirane revertantnim virusom bile otporne na nadzor posredovan NK-stanicama, inficirani β2m<sup>-/-</sup> BALB/c fibroblasti bili su pod učinkovitim nadzorom NK-stanica neovisno o virusu s kojim su bili inficirani, odnosno neovisno o *m152* genu.

Iz rezultata ova dva pokusa moglo bi se zaključiti da je nazočnost TAP1 molekule i β2-mikroglobulina neophodna za ispoljavanje NK-staničnog liganda uključenog u NK-fenotip *m152* gena. Međutim alternativno objašnjenje je da su stanice koje ne ispoljavaju MHC-I molekule vrlo podložne NK-lizi zbog nedostatka liganada za inhibicijske NK-receptore (te samim time prevladavanja aktivacije NK-stanica).



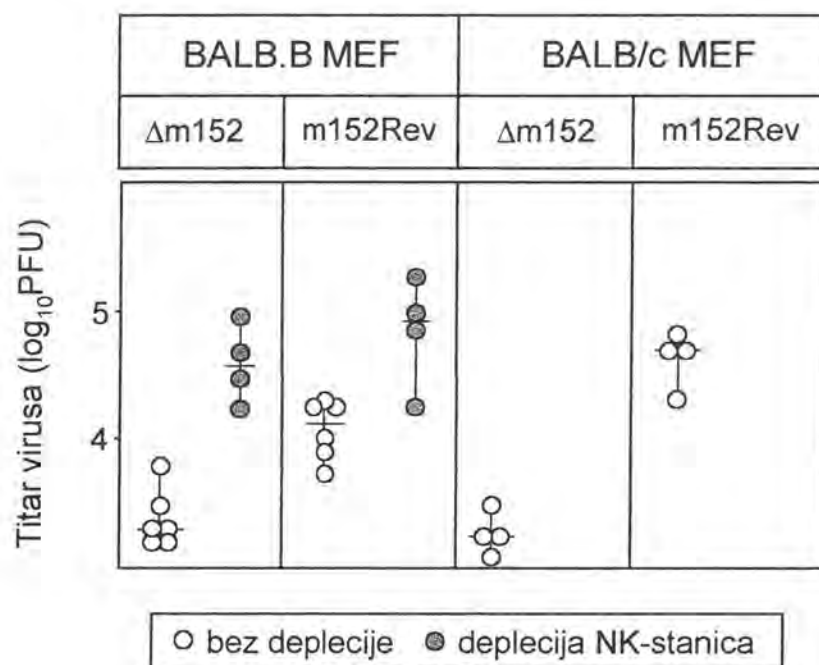
**Slika 25.** Ligand reguliran *m152* genom ovisan je o  $\beta 2$ -mikroglobulinu ( $\beta 2m$ ).  $\beta 2m^{-/-}$  BALB/c fibroblasti (MEF) inficirani su s 2 PFU/stanici i 2 sata poslije infekcije  $10^5$  stanica intravenski injicirano u BALB/c miševе. U svakoj skupini dio životinja je tretiran s protuserumom na AGM1 radi uklanjanja NK-stanica. Virusni titar u plućima određen je 2. dana po infekciji. Prikazani su pojedinačni virusni titrovi i medijane vrijednosti (vodoravne crte).

#### 4.9.3. NK-inhibicijski učinak *m152* gena nije određen $L^d$ molekulom

Budući su prethodno opisani rezultati ukazali na moguću ovisnost liganda na ciljnoj stanici reguliranog *m152* genom o  $\beta 2$ -mikroglobulinu i TAP1 molekuli, logično je bilo pretpostaviti da se možda radi o MHC molekuli razreda I. Osim toga poznato je da između mišjih sojeva postoje velike razlike kako u MHC-I molekulama (na površini mišjih stanica ispoljavaju se tri klasične MHC molekule razreda I: K, D i L, koje su izrazito polimorfne između mišjih sojeva) tako i u receptorima za njih na NK-stanicama (prvenstveno unutar Ly49 obitelji NK-receptora) (79). Također *m152* gen svoj immunosubverzivni učinak na  $CD8^+$  limfocite T ispoljava modulirajući ekspresiju MHC molekula razreda I na površini inficirane stanice (6,126).

U pokusu na BALB/c miševima kojima smo injicirali inficirane fibroblaste porijeklom iz BALB/c i C57BL/6 miševa (slika 20) ustanovili smo razliku s obzirom na osjetljivost inficiranih stanica na kontrolu posredovanu NK-stanicama. Da bismo ispitali da li je uočena razlika posljedica različitih MHC-I molekula kao ligandada za

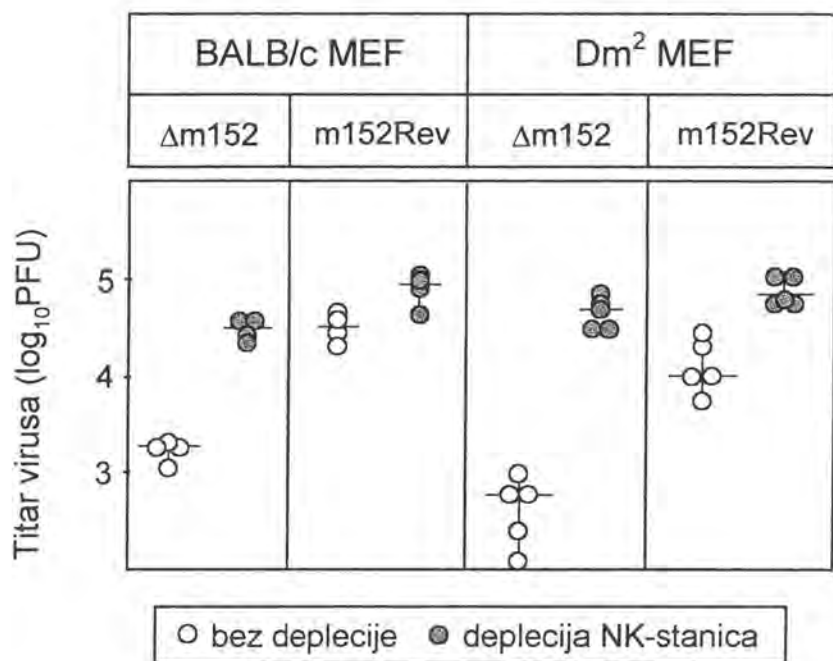
NK-stanice u slijedećem smo pokusu koristili fibroblaste dobivene iz BALB.B miševa. BALB.B miševi razlikuju se od BALB/c miševa samo u MHC molekulama razreda I, to jest ovi miševi nisu H-2<sup>d</sup> haplotipa (kao BALB/c miševi), već poput C57BL/6 soja H-2<sup>b</sup> haplotipa.



**Slika 26. Uloga MHC-I molekula u NK-inhibiciji posredovanoj *m152* genom.** BALB.B i BALB/c fibroblasti (MEF) inficirani su s 2 PFU/stanica i 2 sata poslije infekcije 10<sup>5</sup> stanica intravenski injicirano u BALB/c miševе. U svakoj skupini dio životinja je tretiran s protuserumom na AGM1 radi uklanjanja NK-stanica. Virusni titar u plućima određen je 2. dana po infekciji. Prikazani su pojedinačni virusni titrovi i medijane vrijednosti (vodoravne crte).

Sukladno modificiranom infuzijskom protokolu u BALB/c miševе injicirali smo intravenski 10<sup>5</sup> inficiranih BALB.B ili BALB/c fibroblasta koje smo 2 sata prije toga inficirali s *m152*-delecijskom mutantom ili revertantnim virusom (slika 26). Nakon 48 sati ustanovili smo razliku u nadzoru posredovanom NK-stanicama između BALB/c i BALB.B inficiranih fibroblasta. U skladu s prethodnim pokusima, nakon infuzije inficiranih BALB/c stanica bio je prisutan NK-inhibicijski učinak *m152* gena. Nakon

infuzije inficiranih BALB.B stanica titar *m152*-delecijske mutante i revertantnog virusa bio je nizak, iako je titar revertantnog virusa bio viši u odnosu na delecijsku mutantu (razlika u titru između ova dva virusa bila je u slučaju infuzije BALB/c fibroblasta daleko veća). Nakon deplecije NK-stanica došlo je do značajnog porasta titra oba virusa kod životinja kojima su injicirani inficirani BALB.B fibroblasti. Iako je nakon deplecije NK-stanica došlo do značajnog porasta titra i *m152*-delecijske mutante i revertantnog virusa ipak se može uočiti da ovaj rezultat nije jednak rezultatu dobivenom nakon injiciranja inficiranih C57BL/6 fibroblasta (slika 20), ali se također razlikuje od rezultata nakon infuzije inficiranog BALB/c MEF-a, odnosno izgleda kao da je "intermedijaran".



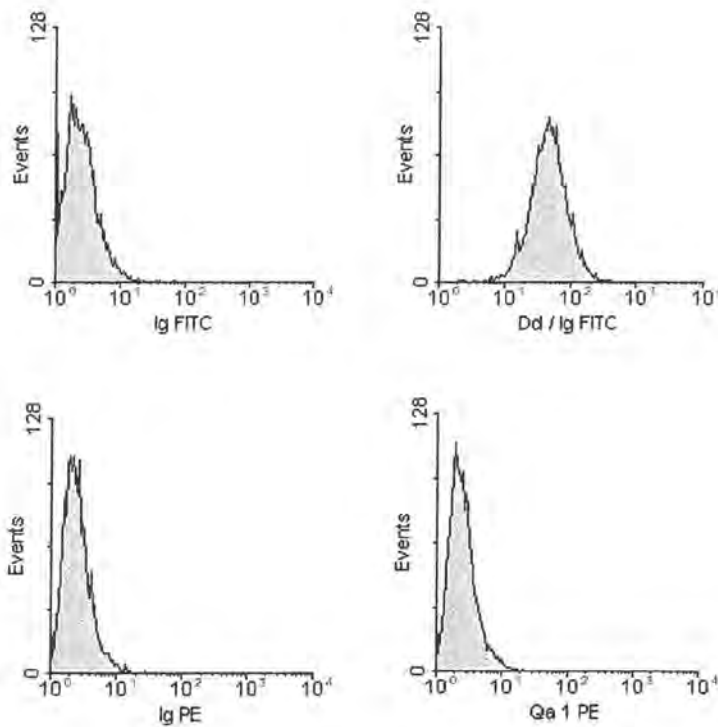
**Slika 27. NK-inhibicijski učinak *m152* gena nije određen L<sup>d</sup> molekulom.** BALB/c-*H-2<sup>dm2</sup>* i BALB/c fibroblasti (MEF) inficirani su s 2 PFU/stanici i 2 sata poslije infekcije 10<sup>5</sup> stanica intravenski injicirano u BALB/c miševe. U svakoj skupini dio životinja je tretiran s protuserumom na AGM1 radi uklanjanja NK-stanica. Virusni titar u plućima određen je 2. dana po infekciji. Prikazani su pojedinačni virusni titrovi i medijane vrijednosti (vodoravne crte).

U slijedećem pokusu testirali smo moguću ulogu jedne od klasičnih MHC molekula razreda I ( $L^d$  molekule) u inhibiciji NK-stanica djelovanjem *m152* gena. U tu svrhu koristili smo fibroblaste porijeklom iz BALB/c- $H-2^{dm2}$  miševa (BALB/c miševi kojima nedostaje L molekula). Ove stanice inficirali smo s *m152*-delecijskom mutantom ili revertantnim virusom i injicirali u BALB/c miševima, u skladu s modificiranim infuzijskim protokolom (slika 27). Kao kontrolu koristili smo inficirane "obične" BALB/c fibroblaste. Nakon infuzije BALB/c- $H-2^{dm2}$  inficiranih fibroblasta u BALB/c miševima bio je prisutan NK-inhibicijski učinak *m152* gena, iako ne onako jasno izražen kao nakon infuzije BALB/c fibroblasta. Naime na slici 27 je vidljivo da je nakon deplecije NK-stanica došlo do porasta titra ne samo *m152*-delecijske mutante nego i revertantnog virusa, međutim porast titra delecijske mutante bio je daleko veći od porasta titra njene revertante.

Osim klasičnih MHC-I molekula na površini stanica ispoljavaju se i neklasične MHC molekula razreda I, čiji je polimorfizam (pa samim tim i razlike među sojevima) puno manji u odnosu na klasične molekule. Kod miša najpoznatija neklasična MHC-I molekula je  $Qa-1^b$ . Za ispoljavanje na površini stanice ovoj molekuli također je potreban  $\beta 2$ -mikroglobulin te peptid. Međutim za razliku od klasičnih MHC molekula razreda I peptid koji se prezentira u kontekstu  $Qa-1^b$  molekule je nonapeptid dobiven od "leader" sekvence klasične MHC molekule razreda I i točno je određenog slijeda aminokiselina (154). Poznato je da *m152* gen blokira prijenos trimolekularnog kompleksa klasičnih MHC-I molekula na površinu inficirane stanice, uzrokujući tako njihovo nakupljanje u stanici. Nema podataka o tome jesu li i neklasične MHC-I molekule također regulirane virusnim genima. Ukoliko ne, moguće je pretpostaviti da uslijed suviška peptida koji se ispoljava na površini s  $Qa-1^b$ , a zbog zastoja klasičnih MHC-I molekula djelovanjem *m152* gena, istovremeno dolazi čak i do pojačane ekspresije ove neklasične MHC molekule razreda I, a što bi virusu koristilo zbog izbjegavanja i  $CD8^+$  limfocita T i NK-stanica.

Da bi ispitali utječe li virus, odnosno *m152* gen, na ispoljavanje neklasičnih MHC-I molekula na površini inficiranih stanica, inficirali smo BALB/c fibroblaste s 1 PFU *m152*-delecijske mutante ili revertantnog virusa po stanici. Šesnaest sati po infekciji pomoću monoklonskog protutijela na  $Qa-1^b$  direktno obilježenog s

fikoeritriinom gledali smo postoji li razlika u površinskoj ekspresije Qa-1<sup>b</sup> ovisna o virusu s kojim su fibroblasti inficirani. Međutim s primijenjenim protutijelom nismo uopće uspjeli pokazati niti minimalnu ekspresiju ove molekule, kako na neinficiranim tako niti na inficiranim fibroblastima (slika 28).



**Slika 28. Neispoljavanje Qa-1<sup>b</sup> molekule na površini BALB/c fibroblasta (MEF-a).** Protočnim citometrom smo analizirali ekspresiju D<sup>d</sup> i Qa-1<sup>b</sup> molekule na površini neinficiranog BALB/c MEF-a. Prikazani su rezultati analize 10 000 stanica.

#### **4.9.4. *m152* gen inhibira ispoljavanje liganda za NKG2D na inficiranim stanicama**

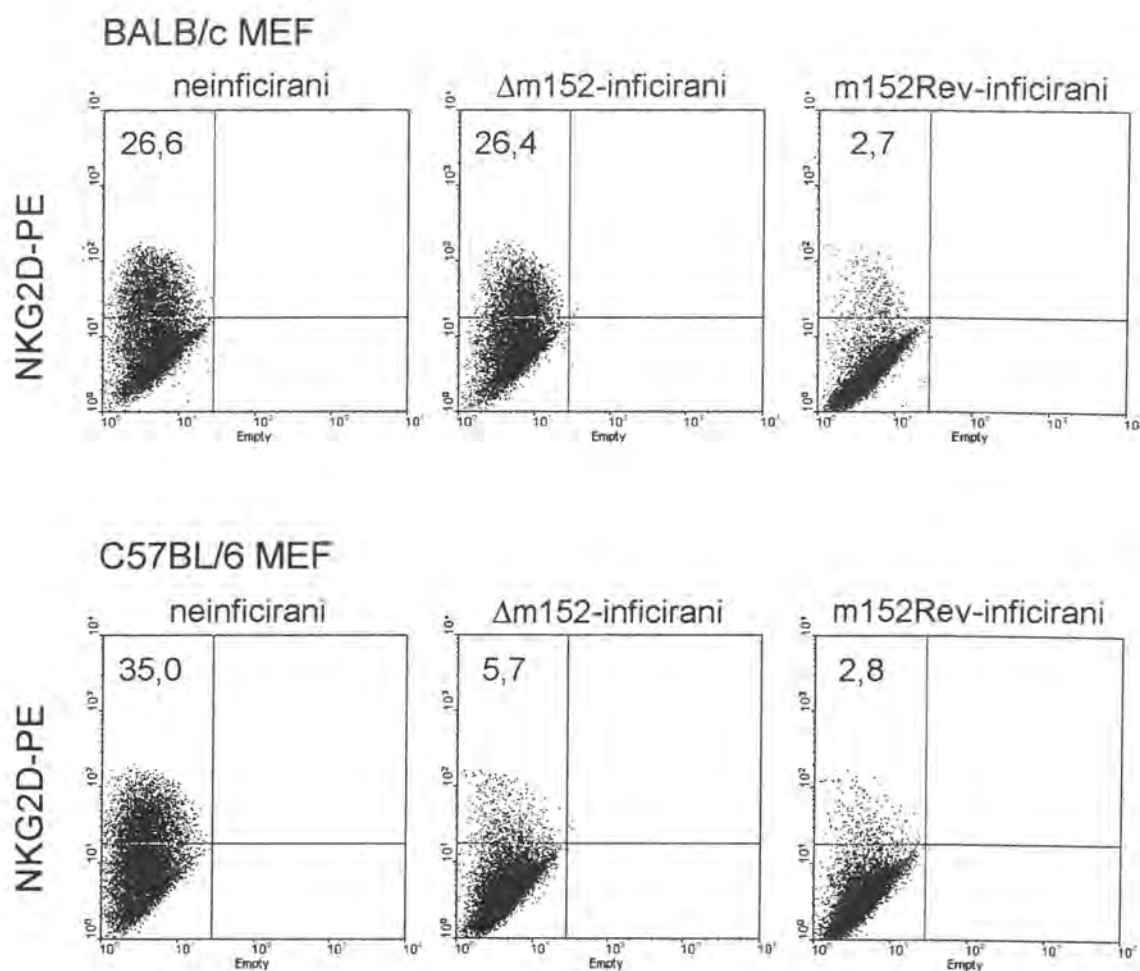
Iako do sada navedeni rezultati ukazuju da su najvjerojatnije MHC-I molekule ligandi moduliranjem čijeg ispoljavanja *m152/gp40* inhibira NK-stanice, ipak postoje i argumenti koji to dovode u pitanje. Naime u pokusima u kojima smo istraživali ligand na koji djeluje *m152/gp40* u miševima smo unosili inficirane stanice koje su bile



porijeklom iz miševa drugih sojeva te su na svojoj površini nosile MHC-I molekule različite od primateljevih (ili ih uopće nisu ispoljavale npr. MEF iz miševa deficitnih za TAP1 i  $\beta$ 2-mikroglobulin). Budući se NK-stanice tijekom svog razvoja privikavaju na MHC-I stanice domaćina, a sve ostale koje kasnije susretnu prepoznaju kao tuđe, moguće je da je izostanak NK-inhibicije nakon injiciranja alogeničnih stanica posljedica NK-lize ovih stanica uslijed aloreaktivnosti. Također i nakon injiciranja stanica bez MHC-I molekula ne možemo sa sigurnošću tvrditi da li je NK-inhibicija izostala uslijed ovisnosti liganda o TAP1 i/ili  $\beta$ 2-mikroglobulinu ili zbog brzog uništenja ovih stanica zbog izostanka NK-inhibicije putem MHC-I molekula. S obzirom na navedeno bilo je logično da smo nastavili s istraživanjima i drugih potencijalnih kandidata za ligand na čije ispoljavanje utječe *m152/gp40*.

Kao što smo pokazali u pokusu s intra-NKC rekombinantnim i kongeničnim miševima gen koji je odgovoran za otpornost/osjeljivost prema NK-inhibicijskom učinku *m152* gena smješten je unutar lokusa *Cd94*, *Ly49* i *Cmv1*. U ovom području smješten je i gen koji kodira NKG2D receptor. NKG2D je aktivacijski NK-receptor, prisutan i kod čovjeka i kod miša (91, 92, 93, 94). Ligandi za NKG2D su kod čovjeka MHC-I srodne molekule MICA, MICB i ULBP1, 2 i 3, a kod miša Rae1 i H60. Ispoljavanje ovih molekula može se inducirati stresom, a između mišjih sojeva uočena je razlika u ispoljavanju H60 molekule. Citomegalovirusna infekcija inducira ispoljavanje MIC molekula na površini inficiranih stanica (91, 95). Moguće je da MCMV infekcija utječe na ekspresiju liganda za NKG2D na površini stanice, modulirajući tako NK-stanični nadzor. Da bismo ispitali postoji li zaista ovaj učinak te ima li *m152* gen pritom kakvu ulogu izveli smo slijedeće pokuse.

Stanice BALB/c i C57BL/6 MEF-a inficirali smo s *m152*-delecijskom mutantom ili revertantnim virusom (1 PFU/stanici) te ih 12 sati poslije infekcije obilježili s NKG2D tetramerom (na taj smo način obilježili ligand za NKG2D receptor na inficiranim stanicama) (slika 29).

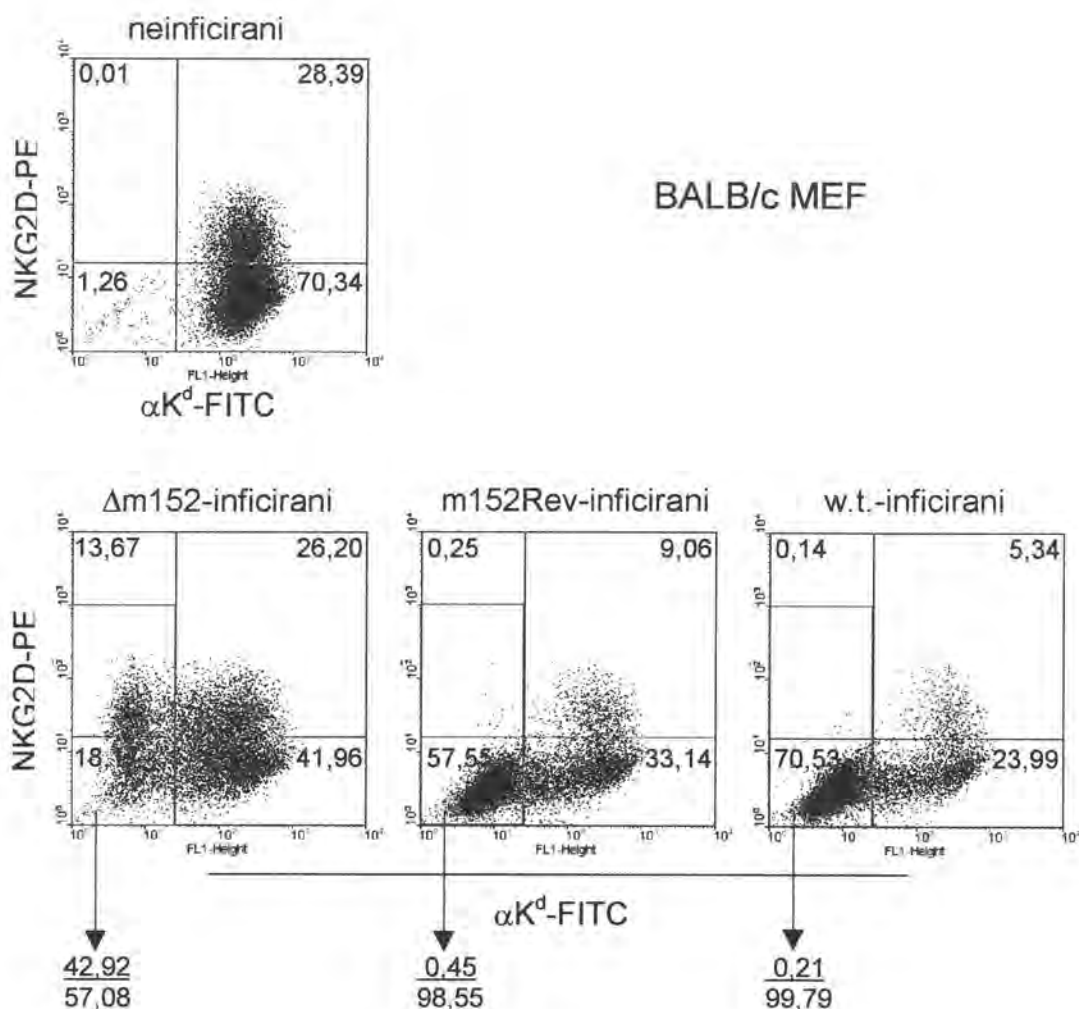


**Slika 29.** Ispoljavanje liganda za NKG2D receptor na inficiranim BALB/c i C57BL/6 fibroblastima (MEF-u). Protočnim citometrom smo pomoću NKG2D tetramera analizirali ekspresiju liganda za NKG2D receptor na površini BALB/c i C57BL/6 MEF-a: neinficiranog, inficiranog s *m152*-delecijskom mutantom i inficiranog s revertantnim virusom. Prikazani su rezultati analize 10 000 stanica.

Na BALB/c MEF-u uočili smo razliku u ispoljavanju NKG2D-liganda između neinficiranih stanica, stanica inficiranih *m152*-delecijskom mutantom i revertantnim virusom. Postotak stanica inficiranih s delecijskom mutantom koje su ispoljavale ligand za NKG2D bio je približno jednak postotku neinficiranih stanica koje ispoljavaju ovu molekulu. Nasuprot tome, postotak stanica inficiranih revertantnim virusom koje ispoljavaju NKG2D-ligand bio je značajno niži u usporedbi s

neinficiranim stanicama i stanicama inficiranim s *m152*-delecijskom mutantom. Rezultat dobiven nakon infekcije C57BL/6 MEF-a razlikovao se od rezultata na BALB/c MEF-u. Na C57BL/6 MEF-u nismo uočili razliku između stanica inficiranih delecijskom mutantom i onih inficiranih revertantnim virusom. Nakon infekcije s bilo kojim od ova dva virusa na C57BL/6 MEF-u došlo je do smanjenog ispoljavanja NKG2D-liganda na inficiranim stanicama u odnosu na neinficiranu kontrolu.

U narednom smo pokusu ponovno inficirali BALB/c MEF s virusima, ali smo istovremeno gledali ekspresiju i NKG2D-liganda i MHC-I molekule K<sup>d</sup> (slika 30). Tako smo mogli analizirati odnos između ispoljavanja ovih molekula na površini inficiranih stanica, te učinak *m152* gena na njihovo ispoljavanje. Kao što je vidljivo iz slike 30, na neinficiranom MEF-u na svim se stanicama ispoljavaju MHC-I molekule, a na 28,4% stanica i ligand za NKG2D. Nakon infekcije revertantnim virusom, uslijed bloka u prijenosu MHC-I molekula do površine stanice uzrokovano djelovanjem *m152* i *m06* gena, smanjuje se broj stanica koje eksprimiraju MHC-I molekule. Istovremeno, na 98% stanica kod kojih je došlo do smanjenja ekspresije MHC-I nema niti ekspresije liganda za NKG2D. U slučaju infekcije stanica s *m152*-delecijskom mutantom također se smanjuje postotak stanica na kojima se ispoljavaju MHC molekule razreda I (iako nešto slabije nego nakon infekcije s revertantnim virusom), što je posljedica djelovanja produkta *m06* gena. Međutim za razliku od revertantnog virusa, na 42% stanica inficiranih s delecijskom mutantom, a kod kojih je smanjena ekspresija MHC-I molekula, i dalje se ispoljava ligand za NKG2D. Razlika u ispoljavanju NKG2D-liganda između stanica inficiranih *m152*-delecijskom mutantom ili revertantnim virusom može se pripisati isključivo djelovanju *m152* gena. Sličan pokus smo proveli i na C57BL/6 MEF-u, a dobiveni rezultati su bili u skladu s rezultatima pokusa prikazanog na slici 29. Za razliku od rezultata na BALB/c MEF-u, nakon infekcije stanica, neovisno s kojim virusom su bile inficirane, došlo je do smanjenja ekspresije MHC-I molekula, ali također i NKG2D-liganda na istim stanicama (rezultati nisu prikazani).



**Slika 30. Ispoljavanje  $K^d$  molekule i liganda za NKG2D receptor na inficiranim BALB/c fibroblastima (MEF-u).** Protočnim citometrom smo analizirali ekspresiju  $K^d$  molekule i liganda za NKG2D receptor na površini BALB/c MEF-a: neinficiranog, inficiranog s *m152*-delecijskom mutantom, inficiranog s revertantnim virusom ili divljim tipom virusa. Prikazani su rezultati analize 10 000 stanica.

Rezultati pokusa s NKG2D tetramerom nedvojbeno upućuju na ulogu *m152* gena u regulaciji ekspresije NKG2D-liganda na inficiranim stanicama, sugerirajući istovremeno da je najvjerojatnije upravo NKG2D onaj receptor na NK-stanicama preko kojeg *m152* gen ostvaruje svoj NK-inhibicijski učinak. Osim toga, razlika između BALB/c i C57BL/6 miševa u postojanju NK-inhibicijskog učinka *m152* gena *in vivo* ovim je pokusima potvrđena i objašnjena. Očigledno postoji razlika u djelovanju

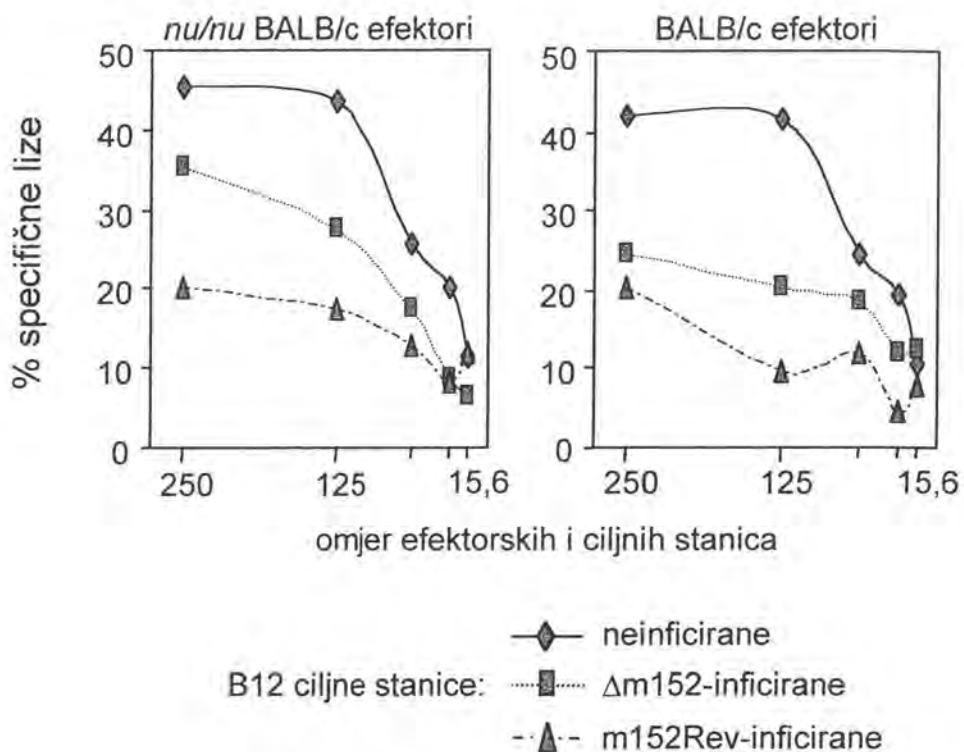
*m152* gena na ligand za NKG2D između ova dva mišja soja, to jest *m152* gen svoj učinak na NKG2D-ligand ne ispoljava u C57BL/6 miševima. Vjerojatno je to posljedica razlike između BALB/c i C57BL/6 miševa u ispoljavanju H60 molekule, jednog od liganada za NKG2D na mišjim stanicama (do sada poznati NKG2D-ligandi na mišjim stanicama su H60 i Rae1 molekule), odnosno iz dobivenih rezultata možemo pretpostaviti da je upravo H60 ligand preko kojeg *m152/gp40* ostvaruje NK-inhibiciju. Budući da u C57BL/6 miševa dolazi do smanjenja ekspresije liganda za NKG2D (Rae1 ili nekog do sada nepoznatog liganda) nakon infekcije neovisno o *m152* genu, očito je da u ovom mišjem soju neki drugi MCMV gen posreduje ovaj učinak. Međutim unatoč oslabljene ekspresije liganda za NKG2D nakon MCMV infekcije u C57BL/6 miševa nema NK-inhibicije, a što je vidljivo iz rezultata *in vivo* pokusa.

#### 4.10. NK-inhibicijski učinak *m152* gena *in vitro*

Do sada navedeni rezultati proizašli su iz *in vivo* istraživanja. Zanimalo nas je da li ćemo iste rezultate dobiti i *in vitro* u NK-citotoksičnom testu. Kao efektorske stanice koristili smo splenocite *nude* ili BALB/c miševa kojima smo prethodno injicirali poli I:C za indukciju NK-stanica. Stanice MEF-a nisu bile pogodne kao ciljne stanice zbog niskog postotka lize, a YAC stanice (inače uobičajene ciljne stanice u NK-citotoksičnom testu) nisu bile permisivne za produktivnu MCMV infekciju. Stoga smo u testu koristili B12 fibroblaste, budući su osjetljivi na NK-staničnu lizu, a permisivni za MCMV infekciju (slika 31).

Rezultati koje smo dobili pokazali su da MCMV infekcija B12 stanica *in vitro* smanjuje postotak NK-stanica posredovane lize. Pritom infekcija *m152*-revertantnim virusom snažno inhibira lizu, dok je inhibicija lize slabija nakon infekcije stanica s *m152*-delecijskom mutantom. Iz navedenog proizlazi suglasje *in vivo* i *in vitro* rezultata, budući da možemo pretpostaviti da veći postotak liziranih stanica u NK-citotoksičnom testu odgovara *in vivo* nižem titru virusa (zbog bolje NK-stanične kontrole), što je slučaj s *m152*-delecijskom mutantom. Nasuprot tome, nakon

infekcije stanica s revertantnim virusom imali smo niži postotak lize stanica *in vitro*, što odgovara višem titru ovog virusa u odnosu na *m152*-deleciju mutantu *in vivo*.



**Slika 31. NK-citotoksični test s inficiranim B12 stanicama kao targetima.** B12 stanice inficirane su s 1 PFU *m152*-delecije mutante ili revertantnog virusa po stanici te 12 sati nakon infekcije obilježene s  $^{51}\text{Cr}$  i pomiješane s efektorim stanicama u naznačenim omjerima. Kao efektori korišteni su splenociti iz *nu/nu* ili *BALB/c* miševa prethodno stimuliranih s poli I:C.

## 5. RASPRAVA

Postojanje gena kojima se virusi opiru imunološkom nadzoru domaćina poznato je već dugi niz godina (103,104). Citomegalovirusi također na razne načine pokušavaju izbjeći imunološku kontrolu (105). Budući u nadzoru MCMV-a u većini tkiva i organa glavnu ulogu imaju  $CD8^+$  limfociti T koji prepoznaju antigene (pa tako i virusne antigene) u kompleksu s MHC-I molekulama, nije neobično da ovaj virus u svom genomu posjeduje nekoliko gena koji se upliću u proces antigenske prerade i prezentacije u kompleksu s MHC molekulama razreda I (106,107). To su geni *m152*, *m04* i *m06*.

Gp40, produkt *m152* gena, blokira prijenos trimolekularnog kompleksa teškog lanca MHC molekule razreda I,  $\beta 2$ -mikroglobulina i peptida do stanične površine zadržavajući ih u ERGIC/*cis*-Golgi odjeljku stanice (6). Unatoč nastojanjima nije se uspjelo koprecipitirati gp40 s MHC-I molekulama, već je dokazana isključivo njihova kolokalizacija u navedenom staničnom odjeljku, indicirajući da je veza između ovih molekula vjerojatno vrlo labilna i kratkog trajanja (6). Neovisno o tome, gp40 ipak vrlo učinkovito zaustavlja MHC-I molekule na njihovom putu do površine stanice. Posljedica ovako nastalog bloka u prijenosu molekula razreda I jest ometanje prezentacije virusnih antigena na površini inficirane stanice i neprepoznavanje takve stanice od strane citotoksičnih  $CD8^+$  limfocita T. Stvarnu ulogu gp40 tijekom infekcije bilo je moguće ispitati isključivo *in vivo*, na mišjem modelu, koristeći pritom deleciju mutantu virusa kojoj je iz genoma izbačen *m152* gen (126,127,128). Ustanovljeno je da je *m152*-delecijska mutanta atenuirana u imunokompetentnih miševa, a da je atenuacija posljedica veće osjetljivosti ove virusne mutante imunološkom nadzoru posredovanom  $CD8^+$  limfocitima T (126,128). Ovaj rezultat bio je u potpunosti u skladu s očekivanjima budući nedostatak *m152* gena lišava virus mogućnosti izbjegavanja  $CD8^+$  stanica posredovanog djelovanjem gp40.

Osim gp40 i gp48, produkt *m06* gena, interferira s putem antigenske prezentacije u kontekstu MHC molekula razreda I, ali na drugi način od produkta *m152* gena (7). Za razliku od gp40, gp48 veže se na MHC molekule razreda I, te ih zatim "skreće" u endolizosome gdje se razgrađuju. *M152* i *m06* gen ispoljavaju se

tijekom ranog (E) razdoblja ciklusa umnažanja virusa, ali ekspresija *m06* gena započinje nešto kasnije od ekspresije *m152* gena. Iako je uloga *m152* gena na imunološki nadzor posredovan  $CD8^+$  limfocitima T pokazana *in vivo* (126,128), ipak *m06* gen ima snažniji utjecaj na površinsku ekspresiju MHC molekula razreda I *in vitro*, te stoga ne čudi da je delecijaska mutanta za *m06* gen također atenuirana *in vivo*, a da atenuacija nestaje nakon deplecije  $CD8^+$  limfocita T. Interesantno je primijetiti da je kod *m152*-delecijске mutante ostao u virusnom genomu *m06* gen, a kod *m06*-delecijске mutante *m152* gen. Unatoč poznatom učinku oba gena na površinsku ekspresiju MHC-I molekula, ipak je očigledno da niti *m06* niti *m152* gen sam za sebe ne mogu omogućiti virusu izbjegavanje  $CD8^+$  limfocita T, nego je potrebno djelovanje oba navedena gena.

Osim *m152* i *m06* gena MCMV posjeduje *m04* gen (43), čija je uloga do sada najnejasnija. Produkt *m04* gena veže se na MHC-I molekulu  $K^b$  i omogućava joj da "pobjegne" djelovanju gena *m152* i *m06* te stigne do površine inficirane stanice, pružajući možda na ovaj način inficiranoj stanici zaštitu od djelovanja NK-stanica. Osim toga, od produkta *m04* gena (gp34) nastaje antigenični nonapeptid koji se u kompleksu s MHC-I molekulom  $D^d$  ispoljava na površini inficirane stanice tijekom E razdoblja (42). Najnoviji *in vitro* rezultati pokazuju da *m04* gen ima i izravan učinak u izbjegavanju imunološkog nadzora posredovanog  $CD8^+$  limfocitima T sprečavanjem prezentacije antigena u kompleksu s  $K^b$  molekulom (iako su za potpuno onemogućavanje prezentacije antigena u kompleksu s  $K^b$  molekulom potrebni i *m04* i *m152* gen) (M. Wagner, osobno priopćenje). Pritom mehanizam djelovanja *m04* gena nije poznat, ali je različit od mehanizama djelovanja *m152* i *m06* gena, budući gp34 ne ometa prienos  $K^b$  molekula već najvjerojatnije djeluje na antigensku prezentaciju na samoj površini stanice do koje dođe vezan na  $K^b$  molekulu. Naši rezultati pokazuju da delecijaska mutanta za *m04* gen nije pojačano osjetljiva na nadzor posredovan  $CD8^+$  limfocitima T. Prema tome nismo uspjeli *in vivo* potvrditi važnost *m04* gena u izbjegavanju  $CD8^+$  limfocita T kao što su sugerirali prethodno navedeni *in vitro* rezultati M. Wagnera. Iz naših rezultata proizlazi da ovaj gen za razliku od gena *m152* i *m06* nije virusu esencijalan za izbjegavanje citotoksičnih limfocita T.



U ranom razdoblju nakon infekcije, dok još nije došlo do nastanka specifičnog protuvirusnog odgovora posredovanog CD8<sup>+</sup> limfocitima T, u nadzoru MCMV-a važnu ulogu igraju NK-stanice. Već je dugi niz godina poznato da se mišji sojevi međusobno razlikuju u osjetljivosti na MCMV, te se pojedini sojevi svrstavaju u osjetljive, a pojedini u otporne na MCMV (npr. BALB/c soj je osjetljiv, a C57BL/6 soj je otporan na MCMV). Ova osjetljivost/otpornost na MCMV je povezana s razlikama između sojeva u NK-genskom kompleksu smještenom na distalnom kraku mišjeg 6. kromosoma (149). Unutar NK-kompleksa smješteni su geni koji kodiraju NK-receptore poput *NKRP-1*, *Ly49*, *Cd94*, *Cd69*, *Nkg2*, te također i *Cmv1* gen. *Cmv1* gen se povezuje s otpornošću pojedinog mišjeg soja na MCMV, prvenstveno određujući razinu virusnog titra u slezeni (150,151). Iako je ovaj gen poznat već duže vrijeme tek je nedavno identificiran kao *Ly49-h*, član *Ly49* genske obitelji NK-receptora, a njegov ligand na ciljnoj stanici još je uvijek nepoznat (78). Osjetljivi mišji sojevi posjeduju recesivni *Cmv1<sup>s</sup>* alel, a otporni sojevi dominantni *Cmv1<sup>f</sup>* alel. Istovremeno u MCMV-otpornim sojevima važnu ulogu u nadzoru virusa imaju NK-stanice, odnosno nakon deplecije NK-stanica dolazi do značajnog porasta titra virusa (najnoviji rezultati pokazuju da je u C57BL/6 miševa kontrola MCMV infekcije posredovana subpopulacijom NK-stanica koje posjeduju Ly49H receptor (155)). U slučaju MCMV-osjetljivih sojeva deplecija NK-stanica nema učinka na virusni titar, iz čega proizlazi da NK-stanice u ovih mišjih sojeva nisu bitne za nadzor virusne infekcije. Rezultat u skladu s navedenim dobili smo i u ovom radu uspoređujući ulogu NK-stanica u ranom stadiju nakon infekcije divljim tipom MCMV-a u BALB/c i C57BL/6 miševa (slika 6).

Do sada je prevladavalo mišljenje da su navedene razlike između sojeva u osjetljivosti/otpornosti MCMV-a na nadzor posredovan NK-stanicama posljedica upravo genskih razlika unutar NK-kompleksa. Pokazano je da mutacija *Cmv1<sup>f</sup>* gena u miševa otpornih na MCMV rezultira povećanjem osjetljivosti na virus (78). Nejasno je međutim zašto MCMV-osjetljivi sojevi ne uspijevaju generirati učinkovit NK-protuvirusni odgovor kada posjeduju brojne druge aktivacijske i inhibicijske NK-receptore. Da li je moguće da je neučinkovitost NK-stanica u osjetljivih sojeva

posljedica ne samo nedostatnog repertoara NK-receptora već i djelovanja samog virusa? Posjeduje li virus u svom genomu gene čiji produkti inhibiraju NK-stanice, a čiji učinak nije jednak u svih mišjih sojeva?

Geni *m04*, *m06* i *m152* kodiraju produkte koji interferiraju s prezentacijom antigena u kompleksu s MHC molekulama razreda I. Koliko god ometanje prijenosa MHC-I molekula bilo za virus korisno, jer mu omogućava izbjegavanje citotoksičnih limfocita T, toliko je za virus istovremeno i potencijalno opasno. Naime NK-stanice "nadziru" na površini stanica prisutnost ili odsutnost MHC molekula razreda I, te u slučaju nedostatka ovih molekula te uz odgovarajući aktivacijski signal ubijaju stanicu. Bilo bi apsurdno da se virus zaštićujući se od jednih stanica izlaže djelovanju drugih imunološki aktivnih stanica, te cijeli sustav ometanja antigenske prezentacije ne bi imao smisla kada virus ne bi na neki način izbjegavao i NK-stanice. Jedini danas poznati gen MCMV-a s imunosubverzivnim učinkom usmjerenim upravo ka NK-stanicama je *m144* gen (131). Produkt ovoga gena zapravo je surogat teškog lanca MHC-I molekule koji se veže s  $\beta 2$ -mikroglobulinom i prezentira na površini inficirane stanice te njegova prisutnost zavarava NK-stanice i one ne liziraju inficiranu stanicu. Iako je aktivnost ovoga gena pokazana *in vivo* (131,134), ipak s obzirom na sumnju u stvarnu ulogu u izbjegavanju NK-stanica *UL18* gena HCMV-a (gena čiji produkt ima jednaku funkciju i vrlo sličnu strukturu kao i produkt *m144* gena (129,130)) dvojbeno je da li je uloga ovoga gena upravo ona koja je do sada opisana. Stoga još uvijek ne možemo sa sigurnošću objasniti kako MCMV izbjegava NK-stanice.

Iako je s obzirom na prethodno opisano djelovanje *m152* gena bilo za pretpostaviti da će *m152*-delecijska mutanta, a s obzirom na prisutnost MHC-I molekula na površini inficiranih stanica uslijed nedostatka *m152* gena, biti otporna na nadzor posredovan NK-stanicama to se nije dogodilo. Dapače potpuno neočekivano *m152*-delecijska mutanta bila je podložna NK-staničnom nadzoru, dok su divlji tip virusa kao i revertantni virus bili u BALB/c miševima potpuno neosjetljivi na učinak NK-stanica. Drugim riječima prisutnost *m152* gena učinila je MCMV otpornim na djelovanje NK-stanica. Koliko god ovaj rezultat bio neobičan toliko je bio i privlačan, budući do sada u literaturi ne postoje podaci o postojanju virusnog gena

koji omogućuje virusu izbjegavanje i CD8<sup>+</sup> limfocita T i NK-stanica. Međutim otvorila su se i nova pitanja. Moduliranjem ispoljavanja kojih molekula na površini inficiranih stanica MCMV pomoću *m152* gena izbjegava NK-stanice? Preko kojeg receptora *m152/gp40* inhibira NK-stanice?

Pokusom na C57BL/6 miševima ustanovili smo da je inhibicija NK-stanica posredovana djelovanjem *m152* gena vezana uz mišji soj, budući je u ovoga soja i divlji tip virusa bio podložan NK-staničnom nadzoru. Drugim riječima, u ovih miševa *m152* gen nije ispoljavao svoj potencijal usmjeren izbjegavanju NK-stanica uočen u miševa BALB/c i nekih drugih sojeva (DBA/2). Pomoću kongeničnih i rekombinantnih intra-NKC miševa ustanovili smo da se gen odgovoran za rezistenciju/osjetljivost pojedinog mišjeg soja na NK-inhibicijski učinak gena *m152* nalazi unutar NK-kompleksa i to unutar genskih lokusa *Ly49*, *Cd94* i *Cmv1*. Nažalost zbog nepostojanja rekombinacijskih mjesta te nemogućnosti daljnjeg razdvajanja između navedenih genskih lokusa nismo pomoću intra-NKC rekombinantnih i kongeničnih miševa mogli doći upravo do onoga jednoga lokusa preko kojega gp40 inhibira NK-stanice. Indirektno smo isključili ulogu *Cmv1* gena, budući je nakon infekcije *m152*-delecijskom mutantom i dalje bila evidentna razlika između mišjih sojeva s *Cmv1<sup>f</sup>* alelom i sojeva s *Cmv1<sup>s</sup>* alelom, a također inhibicija NK-stanica nije postojala niti u A/J miševa koji posjeduju *Cmv1<sup>s</sup>* alel. Unatoč isključivanju *Cmv1* gena, još je uvijek preostao veliki broj potencijalnih kandidata koji bi mogli kodirati receptor preko kojeg djeluje gp40. Naime u području koje obuhvaćaju *Ly49*, *Cd94* i *Cmv1* nalaze se još i *Nkg2* geni (pa i gen za aktivacijski NK-receptor NKG2D), te tako geni ovog područja kodiraju veliki broj različitih NK-receptora.

U pokusima koji su zatim slijedili ustanovili smo da je NK-inhibicija posredovana *m152/gp40* određena i na razini liganda na ciljnim stanicama te da je ispoljavanje liganda na kojeg djeluje *m152* različito na fibroblastima iz različitih sojeva. Rezultati su sugerirali da je ligand ovisan o TAP1 molekuli i β2-mikroglobulinu. Za ekspresiju klasičnih MHC molekula razreda I na površini stanice potrebno je da teški lanac molekule bude vezan s β2-mikroglobulinom i peptidom, a za normalnu preradu antigeničnog peptida koji se prezentira u kontekstu MHC-I molekule neophodna je TAP1 molekula kao sastavni dio TAP kompleksa. Stoga su

navedeni rezultati (a također budući se zna da se klasične MHC molekule razreda I veoma razlikuju među sojevima miševa) sugerirali da bi ligand preko kojeg *m152* gen inhibira NK-stanice mogle biti klasične MHC-I molekule (tim više što je modulacijski učinak *m152* gena na ove molekule dobro poznat iz *in vitro* te istraživanja vezanih uz izbjegavanje CD8<sup>+</sup> limfocita T), a u skladu s tim receptor na NK-stanicama pripadati Ly49 receptorskoj obitelji. Unutar Ly49 obitelji postoje i inhibicijski (npr. Ly49A, Ly49C) i aktivacijski (npr. Ly49D, Ly49H) receptori (60,69), a distribucija pojedinih Ly49 molekula razlikuje se među mišjim sojevima (79). Stoga smo s obzirom na uočenu razliku između BALB/c i C57BL/6 miševa prvo pretpostavili da su upravo Ly49 molekule odgovorne za uočeni fenomen inhibicije NK-stanica posredovane produktom *m152* gena. Važan argument za ovu pretpostavku je bio i rezultat dobiven s BALB/B MEF-om. Ovi fibroblasti po svemu su identični BALB/c fibroblastima (H-2<sup>d</sup> haplotip) osim po MHC molekulama razreda I koje kod BALB/B soja pripadaju H-2<sup>b</sup> haplotipu. Iz tog razloga izostanak inhibicije NK-stanica uočen nakon infuzije inficiranih BALB/B stanica u BALB/c miševu može biti pripisan isključivo MHC-I molekulama. Budući na površini BALB/c MEF-a postoje tri klasične MHC molekule razreda I : D<sup>d</sup>, K<sup>d</sup> i L<sup>d</sup>, a pokusom s BALB/c-H-2<sup>Dm2</sup> fibroblastima smo isključili L<sup>d</sup> molekule, mogli bismo zaključiti da je ligand reguliran *m152* genom, a važan za inhibiciju NK-stanica ili D<sup>d</sup> ili K<sup>d</sup> molekula. Međutim ipak je iz navedenih rezultata nemoguće zaključiti da su upravo MHC-I molekule ligandi preko kojih *m152/gp40* inhibira NK-stanice. Naime zna se da aloreaktivnost postoji i na razini NK-stanica, to jest da NK-stanice prepoznaju i ubijaju stanice koje na svojoj površini ispoljavaju MHC molekule razreda I različite od domaćinovitih odnosno onih na koje su se NK-stanice "priviknule" tijekom svog razvoja. Stoga je teško isključiti mogućnost da je izostanak NK-inhibicije u BALB/c miševa nakon infuzije BALB/B MEF-a posljedica NK-lize unesenih stanica uslijed aloreakcije, a neovisne o infekciji. Osim toga sam rezultat nakon infuzije ovih stanica nije u potpunosti jasan, odnosno možemo reći da je "intermedijaran", budući postoji značajan porast titra i *m152*-delecijske mutante i revertantnog virusa nakon NK-deplecije, ali je također prisutna značajna razlika između mutante i revertante u grupama miševa bez deplecije. Na sličan se način mogu objasniti i rezultati dobiveni nakon infuzije TAP1 ili  $\beta$ 2-

mikroglobulin deficitnih stanica. Moguće je da su ove stanice bile odmah prepoznate od NK-stanica miševa-primatelja uslijed nedostatka MHC-I molekula na njihovoj površini te lizirane zbog izostanka inhibicijskog signala kojeg MHC-I molekule isporučuju NK-stanicama, te je stoga izostala i NK-inhibicija. Iz tog razloga ne možemo sa sigurnošću tvrditi da je ligand čije ispoljavanje modulira *m152/gp40* ovisan o TAP1 i  $\beta 2$ -mikroglobulinu. Da bismo ispitali da li su zaista u NK-inhibiciju posredovanu *m152/gp40* umiješane Ly49 molekule izveli smo pokus na novookoćenim BALB/c miševima (rezultati nisu prikazani). Naime Ly49 molekule nisu prisutne na površini NK-stanica tijekom prva 3 dana života miša, za razliku od ostalih NK-receptora, prvenstveno CD94/NKG2A heterodimera koji predstavlja glavni inhibicijski receptor NK-stanica u tom periodu (Ly49 molekule dosegnu razinu ekspresiju odraslih miševa tek 18-21. dana života) (80,156,157). Budući smo NK-inhibiciju ustanovili i kod miševa inficiranih odmah nakon okota i žrtvovanih 72 sata nakon okota, dakle u vrijeme kada Ly49 receptori još nisu ispoljeni, indirektno smo mogli zaključiti da *m152* ne djeluje preko Ly49 molekula i njihovih liganada klasičnih MHC molekula razreda I. Osim toga NK-inhibiciju smo uočili i kod  $IFN\gamma R^{-/}$  miševa koji su 129 genske osnove, to jest b haplotipa (kao C57BL/6 miševi). Da su MHC-I molekule uključene u NK-inhibiciju posredovanu *m152/gp40* ne bi smjela postojati razlika između njih i miševa C57BL/6 soja.

Nismo mogli isključiti niti moguću ulogu CD94/NKG2 heterodimera, također kodiranog genima unutar naznačenih lokusa NK-regije (85). Ligand za CD94/NKG2 receptor jest neklasična MHC molekula razreda I, kod čovjeka HLA-E a kod miša Qa-1<sup>b</sup> (88,89). Iako nije poznato postojanje razlika u ovom receptoru između mišjih sojeva (mada postojanje ovih razlika ne možemo u potpunosti niti isključiti, jer je CD94/NKG2 tek nedavno otkriven kod miševa (86)) postavljena je interesantna hipoteza o mogućem istovremenom djelovanju MHC-I imunosubverzivnog gena na CD8<sup>+</sup> limfocite T i NK-stanice upravo preko ovog receptora i njegovog liganda neklasične MHC molekule razreda I (158). Tako na primjer *m152* gen blokira prienos MHC molekula razreda I u području ERGIC/*cis*-Golgija i uzrokuje njihovo nakupljanje u stanici, čak s produženim vremenom poluživota. Qa-1<sup>b</sup> molekula za svoje ispoljavanje na staničnoj površini mora nositi nonapeptid dobiven od signalnog

peptida klasične MHC-I molekule (89,154), kojeg tijekom MCMV infekcije (uslijed nakupljanja klasičnih MHC-I molekula u stanici zbog bloka u prijenosu) ima u suvišku. Moguće je da zbog takvog pojačanog "punjenja" tijekom infekcije na površinu stanice dolaze Qa-1<sup>b</sup> molekule u većem broju nego li na stanicu koja nije inficirana, te tako putem CD94/NKG2 receptora isporučuju NK-stanicama inhibicijski signal, unatoč nedostatku klasičnih MHC-I molekula na površini stanice inficirane MCMV-om (te samim time i nedostatku inhibicije putem Ly49 molekula). Tako bi bilo moguće da jedan te isti gen ometajući ispoljavanje klasičnih MHC-I molekula onemogućuje prepoznavanje inficirane stanice od strane CD8<sup>+</sup> limfocita T, a potencirajući ispoljavanje neklasičnih MHC-I molekula inhibira djelovanje NK-stanica. Naši rezultati nisu potvrdili primjenljivost ove teorije u slučaju djelovanja *m152* gena. Protutijelima na Qa-1<sup>b</sup> molekulu koja smo imali na raspolaganju nismo uspjeli pokazati niti prisutnost ove molekule na površini inficiranih fibroblasta, pa samim time niti razlike u ekspresiji između fibroblasta inficiranih *m152*-delecijskom mutantom ili revertantnim virusom. Moguće je da je ekspresija Qa-1<sup>b</sup> molekule na fibroblastima izuzetno slaba, te samim time isključuje ovaj ligand i njegov receptor kao kandidate uključene u NK-fenomen vezan za *m152* gen. Također pokus na DBA/2 miševima sugerira da ipak CD94/NKG2 nije traženi receptor. Naime na površini NK-stanica miševa ovog soja ne može se pokazati prisutnost CD94/NKG2 heterodimera, no unatoč tome u DBA/2 miševa prisutna je inhibicija NK-stanica posredovana *m152* genom.

Unutar lokusa NK-kompleksa koji su povezani s učinkom *m152* gena na NK-stanice, nalazi se i gen koji kodira NKG2D receptor (90). Za razliku od ostalih NKG2 molekula koje se udružuju s CD94 i tvore heterodimer, NKG2D tvori homodimer te povezan s DAP10 molekulom djeluje kao aktivacijski receptor za NK-stanice (102). Ligand su mu na humanim stanicama MICA i MICB molekule, udaljeni srodnici MHC-I molekula, koje se induciraju u stresu, a prisutne su i na nekim tumorskim stanicama (92). Osim MIC molekula ligand za NKG2D receptor je i ULBP na kojega se veže UL16 HCMV-a (93). Teoretski, moguće je da tijekom HCMV infekcije dolazi (uz poznato imunosubverzivno djelovanje *US2*, *US11*, *US3* i *US6* gena na MHC-I molekule) do pojačane ekspresije MICA/MICB/ULBP molekula koje bi preko NKG2D

trebale aktivirati NK-stanice, što virusu ne odgovara. Stoga se virus brani djelovanjem *UL16* gena, čiji produkt se veže na MICA/MICB/ULBP te tako onemogućava aktivaciju NK-stanica i štiti inficiranu stanicu od njihovog djelovanja. Nedavno su otkriveni ligandi za NKG2D i na mišjim stanicama. To su Rae-1 i H60 (94). I ove su molekule inducibilne te se ispoljavaju u stresu. Kodiraju se genima smještenim na mišjem 10. kromosomu (znači izvan kompleksa MHC gena). H60 se veže na NKG2D s 25x većim afinitetom od Rae-1, a različito se ispoljava u različitim mišjim sojevima, te ga uopće nema u C57BL/6 životinja, a ispoljen je npr. u miševa BALB/c, BALB/B i 129 soja (159,160). Da bi NK-stanice djelovale važan je ne samo izostanak inhibicijskog signala nego i postojanje aktivacijskog signala. Moguće je da tijekom MCMV infekcije dolazi do NK-inhibicije (unatoč izostanka NK-inhibicijskog signala do čega dolazi uslijed djelovanja gena koji onemogućavaju MHC-I prezentaciju), na način da virus moduliranjem ispoljavanja liganda za aktivacijski NK-receptor onemogućuje aktivacijski signal za NK-stanice. Možda upravo *m152* gen onemogućava ekspresiju NK-aktivacijskog liganda te samim tim i aktivaciju NK-stanica. Rezultati dobiveni protočnom citometrijom pomoću NKG2D tetramera potvrdili su ovu teoriju. Nakon infekcije BALB/c MEF-a divljim tipom MCMV-a došlo je do značajnog smanjenja ekspresije liganda za NKG2D, dok infekcija *m152*-delecijskom mutantom nije imala učinka na ispoljavanje ovog liganda te se postotak stanica koje su ga ispoljavale nije bitno razlikovao od istog kod neinficiranih stanica. Iz ovog je rezultata očito da je upravo *m152* gen zaslužan za smanjenje ekspresije NKG2D-liganda na inficiranim stanicama. Istovremeno je na stanicama C57BL/6 MEF-a nakon infekcije i revertantnim virusom i *m152*-delecijskom mutantom došlo do smanjenja ekspresije liganda za NKG2D u usporedbi s neinficiranim stanicama. Iz ovoga proizlazi da u C57BL/6 mišjeg soja *m152* gen nema učinka na ispoljavanje liganda za NKG2D, ali da istovremeno u ovog soja na ispoljavanje liganda djeluje neki drugi MCMV gen (budući nakon infekcije MCMV-om dolazi do smanjenog ispoljavanja liganda za NKG2D neovisno o *m152* genu). Znajući da se u C57BL/6 miševa ne ispoljava H60 očito je da *m152* gen svoj NK-inhibicijski učinak u BALB/c miševa ostvaruje modulirajući ekspresiju H60 molekule, dok je za djelovanje na ekspresiju Rae-1 molekula (prisutnih na stanicama i C57BL/6 miševa) ili nekog do

sada još nepoznatog liganda za NKG2D zadužen neki drugi gen MCMV-a. Također je očigledno da učinak MCMV-a na smanjeno ispoljavanje liganda za NKG2D nije presudan za onemogućavanje NK-staničnog nadzora u C57BL/6 soja. Naime u BALB/c miševa infekcija divljim tipom MCMV-a (uslijed djelovanja *m152* gena) rezultira smanjenom ekspresijom liganda za NKG2D (najvjerojatnije H60 molekule) i posljedično uslijed izostanka aktivacijskog signala inhibicijom NK-stanica. Istovremeno u C57BL/6 miševa infekcija divljim tipom MCMV-a (uslijed djelovanja nekog drugog gena, a ne gena *m152*) rezultira također smanjenom ekspresijom liganda za NKG2D (Rae-1 molekula ili nekog do sada nepoznatog liganda), ali u ovog soja smanjena ekspresija ne uzrokuje inhibiciju NK-stanica. Prema tome posljedice moduliranja ispoljavanja NKG2D-liganada djelovanjem virusnih gena razlikuju se između mišjih sojeva. Ovu razliku možemo pokušati objasniti na nekoliko načina. Već smo istakli da C57BL/6 miševi posjeduju *Cmv1<sup>f</sup>* alel. Moguće je da je učinak *Cmv1<sup>f</sup>* gena u ovog mišjeg soja dominantan i prevladavajući u odnosu na učinak drugih gena (pa tako i virusnih imunomodulacijskih gena) na aktivnost NK-stanica tijekom infekcije MCMV-om. Aktivacija NK-stanica putem Ly49H receptora vjerojatno je dovoljno snažna da može nadvladati nedostatak aktivacije putem NKG2D. Na ovaj način može se objasniti i nedostatak NK-inhibicije u BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>* miševa, unatoč postojanju H60 molekula na njihovim stanicama ili prenesenim inficiranim BALB/c fibroblastima. Druga je teoretska mogućnost (mada puno manje vjerojatna od prethodne) da ligand NKG2D molekule na čije ispoljavanje utječe MCMV u C57BL/6 soja ne djeluje na NK-stanice aktivacijski već inhibicijski te smanjenje njegove ekspresije uzrokuje nedostatak potrebnog inhibicijskog signala. Ova teorija je teško prihvatljiva s obzirom na danas poznate činjenice o NKG2D receptoru koji preko DAP10 molekule prenosi u NK-stanicu isključivo aktivacijske signale. Možda međutim postoji još neki neidentificirani receptor na NK-stanicama za Rae-1 molekule (prisutne u C57BL/6 miševa) preko kojeg NK-stanice primaju signale (aktivacijske ili inhibicijske), a koji je za ove molekule dominantniji od NKG2D receptora (već smo istaknuli da se H60 veže za NKG2D sa 25x većim afinitetom od Rae-1 molekula, pa možemo pretpostaviti da postoji još neki receptor na NK-stanicama većeg afiniteta upravo za Rae-1). Naredna istraživanja trebala bi biti



usmjerena upravo u pravcu otkrivanja razloga različite osjetljivosti mišjih sojeva tijekom MCMV infekcije na NK-inhibiciju, odnosno otkrivanja gena i receptora uključenih u ova zbivanja.

Za razliku od *m152* gena, *m06* gen nema inhibicijskog učinka na NK-stanice. Kao što je pokazano u rezultatima delecija *m06* gena iz virusnog genoma nije imala utjecaja na osjetljivost virusa na nadzor posredovan NK-stanicama, i *m06*-delecijska mutanta ponašala se u odnosu na NK-stanice trećeg dana po infekciji jednako kao i divlji tip virusa. Iako najnovije spoznaje o djelovanju MHC-I immunosubverzivnih gena, prvenstveno *m06* i *m152* gena, indiciraju da su za potpuno onemogućavanje antigenske prezentacije spregnute s MHC-I molekulama neophodna oba navedena gena (također po analogiji s HCMV-om, kod kojeg postoji veći broj gena koji ometaju antigensku prezentaciju u kompleksu s MHC molekulama razreda I različitim mehanizmima, ali odgovarajućim vremenskim slijedom tijekom infekcije, osiguravajući tako sigurno provođenje ovog immunosubverzivnog procesa (119)), moguće je da je osnovna uloga *m152* gena upravo izbjegavanje NK-stanica.

Za razliku od *m06* gena, a poput *m152* gena, delecija *m04* gena rezultirala je pojačanom osjetljivošću *m04*-delecijske mutante na imunološki nadzor posredovan NK-stanicama. Budući se *m04*-delecijska mutanta (za razliku od *m152*- i *m06*-delecijske mutante) nije razlikovala od divljeg tipa MCMV-a u osjetljivosti na nadzor posredovan CD8<sup>+</sup> limfocitima T, moguće je da je dominantna uloga *m04* gena izbjegavanje NK-stanica te čak da *m04* i *m152* gen na neki način sinergistički djeluju prema NK-stanicama. Da bismo navedene spekulacije mogli zaista i ispitati bilo bi neophodno da *in vivo* testiramo delecijske mutante MCMV-a kojima su deletirane različite kombinacije prethodno navedenih gena. Do sada smo pokuse napravili samo s delecijskom mutantom kojoj nedostaju geni *m03* do *m06* te gen *m152*. Ova delecijska mutanta bila je *in vivo* atenuirana u odnosu na divlji tip virusa, a atenuacija se gubila nakon deplecije limfocita T (rezultati nisu prikazani). Također je u BALB/c miševa ispoljavala pojačanu osjetljivost na imunološki nadzor posredovan NK-stanicama, indirektno potvrđujući da NK-inhibicija nije posljedica promjene u ispoljavanju MHC-I molekula na površini inficiranih stanica. Naime delecijska

mutanta je bila osjetljiva na NK-stanice unatoč prisutnosti MHC molekula razreda I na površini inficiranih stanica (uslijed nedostatka *m152* i *m06* gena).

Iz svega dosada navedenog očito je da je interakcija virusa i imunološkog sustava domaćina izuzetno složena. Iako postoje brojni geni kojima MCMV izbjegava imunološki nadzor domaćina, ipak se unatoč njihovoj ekspresiji, generira učinkovita protektivna imunost. S druge pak strane, ukoliko bi ovi geni omogućili virusu apsolutno izbjegavanje imunološkog sustava domaćina njihovo bi djelovanje bilo pogubno za domaćina, a posljedično i za virus. Budući je virusu važno da njegov domaćin preživi, ali i da se i sam virus u domaćinu umnoži, vjerojatno mu immunosubverzivni geni trebaju omogućiti "skrivanje" od domaćina u određenom periodu infekcije. Osim toga citomegalovirusi nakon akutne infekcije uspostavljaju stanje latencije. Moguće je da imunomodulacijski geni virusu nisu toliko važni tijekom akutne infekcije, već upravo u latenciji, odnosno u izbjegavanju imunološkog nadzora pri reaktivaciji. Stoga bi naredna istraživanja trebala biti usmjerena ka ispitivanju uloge imunomodulacijskih gena u latenciji i reaktivaciji.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Atenuacija *m152*-delecijske mutante te *m06*-delecijske mutante MCMV-a posljedica je pojačane osjetljivosti na nadzor posredovan  $CD8^+$  limfocitima T. Delecija *m04* gena nema utjecaja na osjetljivost virusa na  $CD8^+$  limfocite T.
2. Suprotno očekivanju delecija *m152* gena čini virus osjetljivijim i na nadzor posredovan NK-stanicama. Delecija *m04* gena također čini virus osjetljivijim na nadzor posredovan NK-stanicama, dok delecija *m06* gena ne utječe na osjetljivost virusa na NK-stanice.
3. Inhibicijski učinak na NK-stanice posredovan *m152/gp40* ovisan je o mišjem soju (u BALB/c i DBA/2 miševa NK-stanice su inhibirane djelovanjem *m152/gp40*, dok u C57BL/6 miševa nisu).
4. Gen koji određuje osjetljivost/rezistenciju prema NK-inhibicijskom učinku *m152* gena smješten je u NK-kompleksu unutar lokusa *Cd94*, *Ly49* i *Cmv1*.
5. NK-inhibicija posredovana *m152/gp40* određena je i na razini liganda na ciljnim stanicama.
6. Rezultati protočne citometrije s NKG2D-tetramerom sugeriraju da je ligand na ciljnim stanicama na čije ispoljavanje utječe *m152/gp40* molekula H60, a sukladno tome receptor na NK-stanicama, preko kojeg *gp40* modulira njihovo djelovanje, je NKG2D.

## 7. LITERATURA

1. Mocarski ES. Cytomegaloviruses and their replication. U: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, ur. *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996; str. 2447-2492
2. Britt WJ, Alford CA. Cytomegalovirus. U: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, ur. *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996; str. 2493-2524
3. Hudson JB. The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections. *Arch Virol* 1979;62:1-29
4. Weiland F, Keil GM, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Studies on the morphogenesis of murine cytomegalovirus. *Intervirology* 1986;26:192-201
5. Lučin P, Jonjić S. Cytomegalovirus replication cycle: an overview. *Period Biolog* 1995;97:13-22
6. Ziegler H, Thäle R, Lučin P i sur. A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/*cis*-Golgi compartments. *Immunity* 1997; 6:57-66
7. Reusch U, Muranyi W, Lučin P, Burgert HG, Hengel H, Koszinowski UH. A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J* 1999;18:1081-1091
8. Kitamura D, Roes J, Kuhn R, Rajewsky K. B cell-deficient mouse by targeting disruption of the membrane exon of the immunoglobulin  $\mu$  chain gene. *Nature (Lond.)* 1991;350:423-426

9. Jonjić S, Pavić I, Polić B, Crnković I, Lučin P, Koszinowski UH. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med* 1994;179:1713-1717
10. Emanuel D. The use of passive immune therapy with intravenous immunoglobulin for the prevention and treatment of cytomegalovirus infection following solid organ and marrow transplantation. *Excerpta Med Int Congr Ser* 1993;1032:295-303
11. Polić B, Hengel H, Krmpotić A i sur. Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J Exp Med* 1998;188:1047-1054
12. Rasmussen L. Immune response to human cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990;154:221-233
13. Starr SE, Allison AC. Role of T lymphocytes in recovery from murine cytomegalovirus infection. *Infect Immun* 1997;17:458-462
14. Reddehase MJ., Jonjić S, Weiland F, Mutter W, Koszinowski UH. Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adenitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *J Virol* 1988;62:1061-1065
15. Reddehase MJ, Weiland F, Münch K, Jonjić S, Lüske A, Koszinowski UH. Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J Virol* 1985;55:264-273

16. Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenish R.  $\beta$ 2-microglobulin deficient mice lack CD4<sup>-</sup>8<sup>+</sup> cytolytic T cells. *Nature (Lond.)* 1990;344:742-746
17. Zijlstra M, Li E, Sajjadi F, Subramani S, Jaenish R. Germ-line transmission of a disrupted  $\beta$ 2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature (Lond.)* 1989;342:435-438
18. Polić B, Jonjić S, Pavić I i sur. Lack of MHC class I complex expression has no effect on spread and control of cytomegalovirus infection *in vivo*. *J Gen Virol* 1996;77:217-225
19. Jonjić S, Pavić I, Lučin P, Rukavina D, Koszinowski UH. Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Virol* 1990;64:5457-5464
20. Jonjić S, Mutter W, Weiland F, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Exp Med* 1989;169:1199-1212
21. Lučin P, Pavić I, Polić B, Jonjić S, Koszinowski UH. Gamma interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. *J Virol* 1992;66:1977-1984
22. Pavić I, Polić B, Crnković I, Lučin P, Jonjić S, Koszinowski UH. Participation of endogenous tumour necrosis factor alpha in host resistance to cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* 1993;74:2215-2223
23. Monaco JJ. A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunol Today* 1992;13:173-179

24. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. Antigen recognition by T lymphocytes. U: Janeway CA, ur. Immunobiology, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, 1999; str. 115-192
25. Powis SJ, Townsend ARM, Deverson EV, Bastin J, Butcher GW, Howard JC. Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. Nature (London) 1991;354:528-531
26. Rock KL, Unanue ER. Antigen recognition. Curr Opin Immunol 1995;7:65-68
27. Solheim JC, Carreno BM, Hansen TH. Are transporter associated with antigen processing (TAP) and tapasin class I MHC chaperones? J Immunol 1997;158:541-543
28. Robertson M. Antigen presentation. Current Biology 2000;8(23): 829-831
29. Chapman HA. Endosomal proteolysis and MHC class II function. Curr Opin Immunol 1998;10:93-102
30. Reddehase MJ, Koszinowski UH. Significance of herpesvirus immediate-early gene expression in cellular immunity to cytomegalovirus infection. Nature 1984;312:369-371
31. Koszinowski UH, Keil GM, Schwarz H, Schickedanz J, Reddehase MJ. A nonstructural polypeptide encoded by immediate-early transcription unit of murine cytomegalovirus is recognized by cytotoxic T lymphocytes. J Exp Med 1987;166:289-294
32. Reddehase MJ, Mutter W, Münch K, Bühring HJ, Koszinowski UH. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. J Virol 1987;61:3102-3108

33. Del Val M, Volkmer H, Rothbard B i sur. Molecular basis for cytolytic T-lymphocyte recognition of the murine cytomegalovirus immediate-early protein pp89. *J Virol* 1988;62:3965-3972
34. Jonjić S, Del Val M, Keil GM, Reddehase MJ, Koszinowski UH. A nonstructural viral protein expressed by a recombinant vaccinia virus protects against lethal cytomegalovirus infection. *J Virol* 1988;62:1653-1658
35. Reddehase MJ, Rothbard JB, Koszinowski UH. A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. *Nature* 1989;337:651-653
36. Del Val M, Schlicht HJ, Ruppert T, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein. *Cell* 1991;66:1145-1153
37. Holtappels R, Podlech G, Geginat G, Steffens HP, Thomas D, Reddehase MJ. Control of murine cytomegalovirus in the lungs: relative but not absolute immunodominance of the immediate-early 1 nonapeptide during the antiviral cytolytic T-lymphocyte response in pulmonary infiltrates. *J Virol* 1998;72:7201-7212
38. Del Val M, Schlicht HJ, Volkmer H, Messerle M, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Protection against lethal cytomegalovirus infection by a recombinant vaccine containing a single nonameric T-cell epitope. *J Virol* 1991;65:3641-3646
39. Del Val M, Münch K, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Presentation of cytomegalovirus immediate-early antigens to cytolytic T lymphocytes is selectively blocked by viral genes expressed in the early phase. *Cell* 1989;58:305-315



40. Reddehase MJ, Keil GM, Koszinowski UH. The cytolytic T lymphocyte response to the murine cytomegalovirus. II. Detection of virus replication stage-specific antigens by separate populations of *in vivo* active cytolytic T lymphocyte precursors. *Eur J Immunol* 1984;14:56-61
41. Alterio de Goss A, Holtappels R, Steffens HP *in vivo*. Control of cytomegalovirus in bone marrow transplantation chimeras lacking the prevailing antigen-presenting molecule in recipient tissues rests primarily on recipient-derived CD8 T cells. *J Virol* 1998;72:7733-7744
42. Holtappels R, Thomas D, Podlech J, Geginat G, Steffens HP, Reddehase MJ. The putative natural killer decoy early gene *m04* (gp34) of murine cytomegalovirus encodes an antigenic peptide recognized by protective antiviral CD8 T cells. *J Virol* 2000;74:1871-1884
43. Kleijnen MF, Huppa JB, Lučin P *in vivo*. A mouse cytomegalovirus glycoprotein gp34 forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. *EMBO J* 1997;16:685-694
44. Morello CS, Cranmer LD, Spector DH. *In vivo* replication, latency, and immunogenicity of murine cytomegalovirus mutants with deletion in the M83 and M84 genes, the putative homologs of human cytomegalovirus pp65 (UL83). *J Virol* 1999;73:7678-7693
45. Biron CA. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol* 1997;9:24-34
46. Orange JS, Biron CA. Characterization of early IL-12, IFN $\alpha/\beta$ , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 1996;156:4746-4756

47. Salazar-Mather TP, Ishikawa R, Biron CA. NK cell trafficking and cytokine expression in splenic compartments after IFN induction and viral infection. *J Immunol* 1996;157:3054-3064
48. Orange JS, Wang B, Terhorst C, Biron CA. Requirement for natural killer (NK) cell-produced interferon  $\gamma$  in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J Exp Med* 1995;182:1045-1056
49. Orange JS, Biron CA. An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN  $\gamma$  production and antiviral defense. *J Immunol* 1996;156:1138-1142
50. Tay CH, Welsh RM. Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J Virol* 1997;71:267-275
51. Su HC, Ishikawa R, Biron CA. Transforming growth factor  $\beta$  expression and natural killer cell responses during virus infection of normal, nude and SCID mice. *J Immunol* 1993;151:4874-4890
52. Biron CA, Byron KS, Sullivan JS. Severe herpes virus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 1989;320:1731-1735
53. Shellam GR, Flexman JP, Farrell HE, Papadimitriou JM. The genetic background modulates the effect of the beige gene on susceptibility to cytomegalovirus infection in mice. *Scand J Immunol* 1985;22:147-155
54. Shellam GR, Allen JE, Papadimitriou JM, Bancroft GJ. Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:5104-5113

55. Bukowski JF, Wooda BA, Habu S, Okumura K, Welsh RM. Natural killer cells depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis *in vivo*. *J Immunol* 1983;131:1531-1538
56. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in mouse. *Nature* 1983;301:527-530
57. Welsh RM, Brubaker JO, Vargas-Cortes M, O'Donnell CL. Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function. *J Exp Med* 1991;173:1053-1063
58. Welsh RM, O'Donnell CL, Shultz LD. Antiviral activity of NK1.1<sup>+</sup> natural killer cells in C57BL/6 scid mice infected with murine cytomegalovirus. *Nat Immun* 1994;13:239-245
59. Bukowski JF, Warner JF, Dennert G, Welsh RM. Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells *in vivo*. *J Exp Med* 1985;161:40-52
60. Lanier LL. NK cell receptors. *Ann Rev Immunol* 1998;16(1):359-374
61. Ljunggren HG, Karre K. In search of the "missing self": MHC molecules and NK recognition. *Immunol Today* 1990;11:7-10
62. Parham P. NK cells, MHC class I antigens and missing self. *Immunol Rev* 1997;155:1-221
63. Colonna M, Navarro F, Bellon T i sur. A common inhibitory receptor for MHC class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 1997;186:1809-1818

64. Samaridis J, Colonna M. Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *Eur J Immunol* 1997;27:660-665
65. Cosman D, Fanger N, Borges L i sur. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 1997;7:273-282
66. Borges L, Hsu ML, Fanger N, Kubin M, Cosman D. A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. *J Immunol* 1997;159:5192-5196
67. Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 2000;21:228-234
68. Arm J.P, Gurish MF, Reynolds DS i sur. Molecular cloning of gp49, a cell-surface antigen that is preferentially expressed by mouse mast cell progenitors and is a new member of the immunoglobulin superfamily. *J Biol Chem* 1991;266:15966-15973
69. Lanier L. Natural killer cells: from no receptors to too many. *Immunity* 1997;6:371-378
70. Sivori S, Vitale M, Morelli L i sur. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* 1997;186:1129-1136
71. Vitale M. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells is involved in non-MHC restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 1998;187:2065-2072

72. Pende D. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 1999;190:1505-1516
73. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, Davis DM, Strominger JL, Yewdell JW, Porgador A. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 2001;409:1055-1060
74. Wang LL, Chu DT, Dokun AO, Yokoyama WM. Inducible expression of the gp49B inhibitory receptor on NK cells. *J Immunol* 2000;164:5215-5220
75. Matsumoto Y, Wang L, Yokoyama WM, Aso T. Uterine macrophages express the gp49B inhibitory receptor in midgestation. *J Immunol* 2001;166:781-786
76. Takei F, Brennan J, Mager DL. The Ly49 family: genes, proteins, and recognition of class I MHC. *Immunol Rev* 1997;155:67-79
77. Karlhofer FM, Ribuado RK, Yokoyama WM. MHC class I alloantigen specificity of Ly49<sup>+</sup> IL-2-activated natural killer cells. *Nature* 1992;358:66-7
78. Brown MG, Dokun AO, Heusel JW i sur. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 2001;292-934-937
79. Ortaldo JR, Mason AT, Winkler-Pickett R, Raziuddin A, Murphy WJ, Mason LH. Ly49 receptor expression and functional analysis in multiple mouse strains. *J Leukoc Biol* 1999;66:512-520

80. Sivakumar PV, Bennett M, Kumar V. Fetal and neonatal NK1.1<sup>+</sup>Ly-49<sup>-</sup> cells can distinguish between major histocompatibility complex class I(hi) and class I(lo) target cells: evidence for a Ly49-independent negative signaling receptor. *Eur J Immunol* 1997;27:3100-3104
81. Raulet D. Development and tolerance of natural killer cells. *Curr Opin Immunol* 1999;11:129-134
82. Ryan JC, Seaman WE. Divergent functions of lectin-like receptors on NK cells. *Immunol Rev* 1997;155:79-91
83. Girda R, Trucco M. Mouse NKR-P1: a family of genes selectively coexpressed in adherent lymphokine-activated killer cells. *J Immunol* 1991;147:1701
84. Carlyle JR, Martin A, Mehra A, Attisano L, Tsui FW, Zuniga-Pflucker JC. Mouse NKR-P1B, a novel NK1.1 antigen with inhibitory function. *J Immunol* 1999;162:5917-5923
85. Lazetic S, Chang C, Houchins JP, Lanier LL, Phillips JH. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 1996;157:4741-4745
86. Vance RE, Tanamachi DM, Hanke T, Raulet DH. Cloning of a mouse homolog of CD94 extends the family of C-type lectins on murine natural killer cells. *Eur J Immunol* 1997;27:3236-3241
87. Ho E, Heusel JW, Brown MG, Matsumoto K, Yokoyama WM. Murine NKG2D and CD94 are clustered within the natural killer complex and are expressed independently in natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6320-6325

88. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA i sur. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998;391:795-799
89. Vance RE, Kraft JR, Altman JD, Jensen PE, Raulet DH. Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J Exp Med* 1998;188:1841-1848
90. Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 1999;173:1017-1020
91. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8 $\alpha\beta$  T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001;2:255-260
92. Bauer S, Groh V, Wu J i sur. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999;285:727-729
93. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL i sur. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001;14:123-133
94. Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 2000;1:119-126
95. Ugolini S, Vivier E. Multifaceted roles of MHC class I and MHC class I-like molecules in T cell activation. *Nat Immunol* 2001;2:198-200

96. Groh V, Bahran S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12445-12450
97. Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature* 1989;338:383-384
98. Lanier LL. On guard-activating NL cell receptors. *Nat Immunol* 2000;2:23-27
99. Sivori S, Vitale M, Morelli L i sur. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* 1997;186:1129-1136
100. Arase N. Association with FcR $\gamma$  is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 1997;186:1957-1963
101. Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 1998;391:703-707
102. Wu J, Song Y, Bakker ABH i sur. An activating receptor complex on natural killer and T cells formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999;285:730-732
103. Alcami A, Koszinowski UH. Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today* 2000;21:447-455
104. Ploegh HL. Viral strategies of immune evasion. *Science* 1998;280:248-253
105. Hengel H, Brune W, Koszinowski UH. Immune evasion by cytomegalovirus-survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends in Microbiol* 1998;6:190-197



106. Hengel H, Koszinowski UH. Interference with antigen processing by viruses. *Curr Opin Immunol* 1997;9:470-476
107. Hengel H, Reusch U, Gutermann A i sur. Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse. *Immunol Rev* 1999;168:167-176
108. Hengel H, Koopmann JO, Flohr T i sur. A viral ER-resistant glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity* 1997;6:623-632
109. Hengel H, Flohr T, Hammerling GJ, Koszinowski UH, Momburg F. Human cytomegalovirus inhibits peptide translocation into the endoplasmatic reticulum for MHC class I assembly. *J Gen Virol* 1996;77:2287-2296
110. Ahn K, Gruhler A, Galocha B i sur. The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein *US6* inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* 1997;6:613-621
111. Jones TR, Muzithras VP. Fine mapping of transcripts expressed from the *US6* gene family of humane cytomegalovirus strain AD169. *J Virol* 1991;65:2024-2036
112. Jun Y, Kim E, Jin M. Human cytomegalovirus gene products US3 and US6 down-regulate trophoblast class I MHC molecules. *J Immunol* 2000;164:805-811
113. Beersma MFC, Bijlmakers MJE, Ploegh HL. Human cytomegalovirus down-regulates HLA class I expression by reducing the stability of class I H chains. *J Immunol* 1993;151:4455-4464

114. Jones TR, Hanson LK, Sun L, Slater JS, Stenberg RM, Campbell AE. Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol* 1995;69:4830-4841
115. Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogoy M, Geuze HJ, Ploegh HL. The human cytomegalovirus *US11* gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 1996;84:769-779
116. Wiertz E, Tortorella D, Bogoy M, et al. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 1996;384:432-438
117. Schust D, Tortorella D, Seebach J, Phan C, Ploegh HL. Trophoblast class I major histocompatibility complex (MHC) products are resistant to rapid degradation imposed by the human cytomegalovirus (HCMV) gene products *US2* and *US11*. *J Exp Med* 1998;188:497-503
118. Machold RP, Wiertz EJ, Jones TR, Ploegh HL. The HCMV gene products *US11* and *US2* differ in their ability to attack allelic forms of murine major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chains. *J Exp Med* 1997;185:363-366
119. Ahn K, Angulo A, Ghazal P, Peterson PA, Yang Y, Früh K. Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10990-10995
120. Jones TR, Wiertz EJ, Sun L, Fish KN, Nelson JA, Ploegh HL. Human cytomegalovirus *US3* impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11327-11333

121. Del Val M, Hengel H, Hacker H i sur. Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. *J Exp Med* 1992; 176:729-738
122. Del Val M, Münch K, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Presentation of CMV immediate-early antigen to cytolytic T lymphocytes is selectively prevented by viral genes expressed in the early phase. *Cell* 1989;58:305-315
123. Thäle R, Szepan U, Hengel H, Geginat G, Lučin P, Koszinowski UH. Identification of the mouse cytomegalovirus genomic region affecting major histocompatibility complex class I molecule transport. *J Virol* 1995;69:6098-6105
124. Ziegler H, Muranyi W, Burgert HG, Kremmer E, Koszinowski UH. The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes the retention of MHC class I molecules. *EMBO J* 2000;19:870-881
125. Hengel H, Reusch U, Geginat G i sur. Macrophages escape inhibition of major histocompatibility complex class I-dependent antigen presentation by cytomegalovirus. *J Virol* 2000;74:7861-7868
126. Krmpotić A, Messerle M, Crnković-Mertens I, Polić B, Jonjić S, Koszinowski UH. The immunoevasive function encoded by the mouse cytomegalovirus gene *m152* protects the virus against T cell control *in vivo*. *J Exp Med* 1999;190:1285-1295
127. Crnković I. Uloga citomegalovirusnih gena u izbjegavanju imunološkog nadzora pomoću rekombinantnih virusa. Doktorska dizertacija, Rijeka, 1997;
128. Krmpotić A. Značaj *m152* gena mišjeg citomegalovirusa u izbjegavanju imunološkog nadzora. Magistarski rad, Rijeka, 1998;

129. Beck S, Barrell BG. Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* 1988;331:269-271
130. Reyburn HT, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Davis DM, Pazmany L, Strominger JL. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* 1997;386:514-517
131. Farrell HE, Vally H, Lynch DM i sur. Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue *in vivo*. *Nature* 1997;386:510-514
132. Leong CC, Chapman TL, Bjorkman PJ. Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: the role of endogenous class I major histocompatibility complex and a viral class I homolog. 1998;187:1681-1687
133. Chapman TL, Bjorkman PJ. Characterization of a murine cytomegalovirus class I major histocompatibility complex (MHC) homolog: comparison to MHC molecules and to the human cytomegalovirus MHC homolog. *J Virol* 1998;72:460-466
134. Cretney E, Degli-Esposti MA, Densley EH, Farrell HE, Davis-Poynter NJ, Smyth MJ. m144, a murine cytomegalovirus (MCMV)-encoded major histocompatibility complex class I homologue, confers tumor resistance to natural killer cell-mediated rejection. *J Exp Med* 1999;190:435-443
135. Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM i sur. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* 1999;10:661-671

136. Tomasec P, Braud VM, Rickards C. *i sur.* Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 2000;287:1031-1033
137. Yokoyama WM. Now you see it, now you don't! *Nat Immunol* 2000;1:95-97
138. Messerle M, Crnković I, Hammerschmidt W, Ziegler H, Koszinowski UH. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial chromosome. *Proc Natl Sci USA* 1997;94:14759-14763
139. Wagner M, Jonjić S, Koszinowski UH, Messerle M. Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J Virol* 1999;73:7056-7060
140. Loor F, Amstutz H, Hagg LB, Mayors KS, Roelants GE. T lineage lymphocytes in nude mice born from homozygous *nu/nu* parents. *Eur J Immunol* 1976;6(9):663-65
141. Scalzo AA, Lyons PA, Fitzgerald NA, Forbes CA, Shellam GR. The BALB.B6-*Cmv1<sup>f</sup>* mouse: a strain congenic for *Cmv1* and the NK gene complex. *Immunogenetics* 1995;41:148-151
142. Scalzo AA, Brown MG, Chu DT, Heusel JW, Yokoyama WM, Forbes CA. Development of intra-natural killer complex (NKC) recombinant and congenic mouse strains for mapping and functional analysis of NK cell regulatory loci. *Immunogenetics* 1999;49:238-241
143. Perarnau B, Saron MF, Reina San Martin B *i sur.* Single H2K<sup>b</sup>, H2D<sup>b</sup> and double H2K<sup>b</sup>D<sup>b</sup> knockout mice: peripheral CD8<sup>+</sup> T cell repertoire and antilymphocytic choriomeningitis virus cytolytic responses. *Eur J Immunol* 1999;29:1243-1252

144. Huang S, Hendriks W, Althage A *et al*. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 1993;259:1742-1745
145. Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Ploegh HL, Tonegawa S. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4<sup>+</sup> T cells. *Cell* 1992;71:1205-1214
146. Cobbold SP, Jayasuriya A, Nash A, Prospero TD, Waldman H. Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets *in vivo*. *Nature (Lond.)* 1984;312:548-550
147. Koo GC, Dumont FJ, Tutt M, Hackett J, Kumar V. The NK1.1<sup>-</sup> mouse: a model of study differentiation of murine NK cells. *J Immunol* 1986;137:3742-3747
148. Kasai M, Iwamori M, Nagai Y., Okumura K, Tada T. A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur J Immunol* 1980;10:175-180
149. Brown MG, Scalzo AA, Matsumoto K, Yokoyama WM. The natural killer gene complex: a genetic basis for understanding natural killer cell function and innate immunity. *Immunol Rev* 1997;155:53-65
150. Scalzo AA, Fitzgerald NA, Simmons A, La Vista AB, Shellam GR. *Cmv1*, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J Exp Med* 1990;171:1469-1483
151. Scalzo AA, Fitzgerald NA, Wallace CR, Gibbons AE, Smart YC, Burton RC, Shellam GR. The effect of the *Cmv1* resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J Immunol* 1992;149:581

152. Depatie C, Chalifour A, Pare C, Lee SH, Vidal SM, Lemieux S. Assessment of *Cmv1* candidates by genetic mapping and *in vivo* antibody depletion of NK cell subsets. *Internal Immunol* 1999;11:1541-1551
153. Brutkiewicz RR, Welsh RM. Major histocompatibility complex class I antigens and the control of viral infections by natural killer cells. *J Virol* 1995;69:3967-3971
154. DeCloux A, Woods AS, Cotter RJ, Soloski MJ, Forman J. Dominance of a single peptide bound to the class I(B) molecule, Qa-1<sup>b</sup>. *J Immunol* 1997;158:2183-219
155. Daniels KA, Devora G, Lai WC, O'Donnell CL, Bennett M, Welsh RM. Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *J Exp Med* 2001;194:29-44
156. Sivakumar PV, Gunturi A, Salcedo M i sur. Cutting edge: expression of functional CD94/NKG2A inhibitory receptors on fetal NK1.1<sup>+</sup>Ly-49<sup>-</sup> cells: a possible mechanism of tolerance during NK cell development. *J Immunol* 1999;162:6976- 6980
157. Kubota A, Kubota S, Lohwasser S, Mager DL, Takei F. Diversity of NK cell receptor repertoire in adult and neonatal mice. *J Immunol* 1999;163:212-216
158. Long E. Signal sequences stop killer cells. *Nature* 1998;391:740-742
159. Malarkannan S, Shih PP, Eden PA i sur. The molecular and functional characterization of a dominant minor H antigen, H60. *J Immunol* 1998;161: 3501- 3509

160. O'Callaghan CA, Cerwenka A, Willcox BE, Lanier LL, Bjorkman PJ. Molecular competition for NKG2D: H60 and RAE1 compete unequally for NKG2D with dominance of H60. *Immunity* 2001;15:201-211



## POPIS SKRAĆENICA

AGM1	-	asialo GM1
$\beta 2m$	-	$\beta 2$ -mikroglobulin
$\beta 2m^{-/-}$	-	miševi homozigotni za mutaciju $\beta 2m$ gena
bp	-	base pairs (parovi baza)
CMV	-	citomegalovirus
<i>Cmv1<sup>f</sup></i>	-	<i>Cmv1</i> rezistentni
<i>Cmv1<sup>s</sup></i>	-	<i>Cmv1</i> senzitivni
CTL	-	citotoksični limfociti T
DNA	-	deoksiribonukleinska kiselina
$\Delta m152$	-	delecijska mutanta za <i>m152</i> gen
E	-	early (rano) razdoblje ciklusa umnažanja virusa
EBV	-	Epstein-bar virus
ELISA	-	enzyme linked immunosorbent assay (enzimatski imunosorbentni test)
Endo H	-	endoglikozidaza H
ER	-	endoplazmatski retikulum
ERGIC	-	ER-Golgi intermediate compartment (ER-Golgi intermedijarni odjeljak)
FACS	-	fluorescence activated cell sorter (protočni citometar)
FCS	-	fetal calf serum (fetalni teleći serum)
FITC	-	florescein izotiocijanat
gp	-	glikoprotein
gpt	-	guanozin fosforibozil transferaza
HCMV	-	humani citomegalovirus
HSV	-	herpes simpleks virus
IE	-	immediate-early (najranije razdoblje ciklusa umnažanja virusa)
IFN	-	interferon
$IFN\gamma R^{-/-}$	-	miševi bez receptora za $IFN\gamma$

Ig	-	imunoglobulin
IL-12	-	interleukin 12
i.p.	-	intraperitonealno
i.v.	-	intravenski
$K^{b-/-}D^{b-/-}$	-	miševi bez $K^bD^b$ molekula
kDa	-	kilodaltona
L	-	late (kasno razdoblje ciklusa umnažanja virusa)
MCMV	-	mišji citomegalovirus
MEF	-	mišji embrionalni fibroblasti
MHC	-	major histocompatibility complex (glavni sustav tkivne snošljivosti)
nm	-	nanometar
m152Rev	-	revertantni virus za <i>m152</i> gen
NK	-	natural killer
NKC	-	NK-kompleks
PE	-	phycoerithrin (fikoeritrin)
PFU	-	plaque forming unit (jedinica koja uzrokuje čistinu)
p.i.	-	poslije infekcije
$TAP1^{-/-}$	-	miševi s mutacijom gena za TAP1
VV	-	varičela virus
w.t.	-	divlji tip

## ŽIVOTOPIS

### Opći podaci:

- Ime i prezime: Astrid Krmpotić rođ. Sudar
- Datum i mjesto rođenja: 12. kolovoza 1964. Vinkovci
- Bračno stanje: udana, majka trojice sinova
- Adresa stalnog boravka: Rijeka, Čićarijska 29
- telefon: 051-269-586
- e-mail: [astridk@medri.hr](mailto:astridk@medri.hr)
- Zaposlenje: asistent na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci

### Školovanje:

- 1971-1977. pohađala Osnovnu školu Josipa Kozarca u Vinkovcima
- 1977-1979. nastavak osnovnog školovanja u OŠ Ivana Gundulića u Zagrebu
- 1979-1981. pohađala Obrazovni centar za kulturu i umjetnost u Zagrebu
- 1981-1983. pohađala Pedagoški obrazovni centar u Zagrebu
- 1983-1991. studirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu
- 11. 04. 1991. diplomirala i stekla naziv doktor medicine, s prosjekom ocjena 4,70
- 1992-1993. obavila liječnički pripravnički staž u Domu zdravlja Rijeka
- 1994. položila stručni ispit za doktora medicine
- 1995-1997. zaposlena kao znanstveni novak na Medicinskom fakultetu u Rijeci
- 1995. upisala poslijediplomski studij iz Kliničke imunologije na Medicinskom fakultetu u Rijeci
- 1. rujna 1997-1. rujna 1999. zaposlena kao stručni suradnik na Medicinskom fakultetu u Rijeci
- 29. lipnja 1998. godine obranila magistarski rad pod naslovom "Značaj *m152* gena mišjeg citomegalovirusa u izbjegavanju imunološkog nadzora" i stekla akademski stupanj magistra znanosti iz područja biomedicine i zdravstva
- 1. rujna 1999-... zaposlena kao asistent na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci

### Članstvo u znanstvenim udruženjima:

- 2000. Hrvatsko Imunološko Društvo

## Sudjelovanje na ljetnim školama:

1. International Summer School on "Pathogenesis of Infectious Disease", September, 20-25. 1996. Crikvenica, Croatia
2. John Humphrey Course "Effector Functions of Immune Cells", October, 11-14. 1998. Dubrovnik, Croatia

## PUBLIKACIJE

### Kvalifikacijski rad:

1. Značaj *m152* gena mišjeg citomegalovirusa u izbjegavanju imunološkog nadzora,  
**magistarski rad**, Rijeka, 1998.

### Znanstveni radovi:

1. L. Krapac, A. Krmpotić, L. Pavićević, Z. Domljan: Cervicobrachial Syndrome-Work and Disability. **Arh. hig. rada toksikol.** 43:255-262, 1992.
2. I. Crnković-Mertens, M. Messerle, I. Milotić, U. Szepan, N. Kučić, A. Krmpotić, S. Jonjić, U.H. Koszinowski: Virus Attenuation After Deletion Of The Cytomegalovirus Fc Receptor Gene Is Not Due To Antibody Control. **J. Virol.** 72:1377-1382, 1998.
3. B. Polić, H. Hengel, A. Krmpotić, J. Trgovcich, I. Pavić, P. Lučin, S. Jonjić and U.H. Koszinowski: Hierarchical and Redundant Lymphocyte Subset Control Precludes Cytomegalovirus Replication during Latent Infection. **J. Exp. Med.** 188:1047-1054, 1998.
4. M.F. Stančić, M. Potočnjak, V. Mićović, A. Krmpotić and S.E. MacKinnon: Evaluation of Functional Nerve Recovery Shows that Allogeneic Nerve Graft Treated with ICAM-1 and LFA-1 MAbs Can Be Good Alternative to Syngeneic Graft. **Acta Neurochir. (Wien)** 141:875-880, 1999.
5. A. Krmpotić, M. Messerle, I. Crnković-Mertens, B. Polić, S. Jonjić and U.H. Koszinowski: The Immuno-evasive Function Encoded by the Mouse Cytomegalovirus Gene *m152* Protects the Virus Against T Cell Control in Vivo. **J. Exp. Med.** 190:1285-1295, 1999.
6. J. Trgovcich, D. Štimac, B. Polić, A. Krmpotić, E. Pernjak-Pugel, J. Tomac, M. Hasan, B. Wraber and S. Jonjić: Immune Responses and Cytokine Induction in the Development of Severe Hepatitis during Acute Infections with Murine Cytomegalovirus. **Arch. Virol.** 145:1-18, 2000.