

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

MARINA BABIĆ ČAČ

**VIRUSNA REGULACIJA AKTIVNOSTI NK-LIMFOCITA:
ULOGA INHIBICIJSKIH LY49 RECEPTORA**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2011.

Mentori rada: Prof. dr. sc. Stipan Jonjić i Prof. dr. sc. Astrid Krmpotić

Doktorska disertacija obranjena je dana 17. studenog 2011. godine. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Akademik Daniel Rukavina
2. Prof. dr. sc. Alemka Markotić
3. Prof. dr. sc. Toni Valković
4. Prof. dr. sc. Stipan Jonjić
5. Prof. dr. sc. Astrid Krmpotić

Rad ima 131 list, 48 slika i 1 tablicu te 179 literaturnih navoda.

UDK klasifikacija: _____ .

Rad je izrađen na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci pod vodstvom prof. dr. sc. Stipana Jonjića i prof. dr. sc. Astrid Krmpotić, a u sklopu Doktorskog studija „Biomedicina“ pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Rad je izrađen u sklopu projekata MZOŠ-a Molekularni mehanizmi citomegalovirusnog izmicanja imunološkom nadzoru (062-0621261-1263 – voditelj **Jonjić Stipan**) te Uloga imunosubverzivnih citomegalovirusnih gena u latenciji (062-0621261-1268 – voditelj **Krmpotić Astrid**).

Dio rada izrađen je u Institutu za virologiju Medicinske škole u Hannoveru u Njemačkoj pod vodstvom Prof. dr. sc. Martin Messerle-a te u suradnji sa grupom Prof. dr. sc. Silvie M. Vidal (Sveučilište McGill, Montreal, Kanada) i Prof. dr. sc. Lewis L. Laniera (UCSF, San Francisco, USA).

Zahvale

Veliko hvala mentoru **Prof. dr.sc. Stipan Jonjiću** na ukazanom povjerenju, podršci, svakodnevnom sudjelovanju i zalaganju tijekom mog „znanstvenog odgoja“.

Hvala mentorici **Prof. dr.sc. Astrid Krmpotić** na pomoći pri beskrajnim infekcijama, znanstvenim diskusijama i uhodavanju u život u laboratoriju.

Hvala **Prof. dr.sc. Bojan Poliću** na znanstvenim diskusijama i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Veliko hvala svim **kolegama i prijateljima** sa Zavoda za histologiju i embriologiju te Centra za proteomiku jer su uz vas svi pokusi bili lakši i zabavniji.

Hvala **Prof. dr.sc. Martin Messerle, Dr. Eva Borst i Dr. Corinna Benkartek** (MHH, Hannover) što ste mi pružili nesebičnu pomoć kako na početku ovog projekta tako i kroz pet godina suradnje.

Hvala **Prof. dr.sc. Silvia Vidal i Michal Pyzik** (McGill Univerity, Canada) na suradnji te dugotrajnim i korisnim diskusijama tijekom izrade ovog rada.

Hvala **mojoj obitelji** jer ste cijelo vrijeme prisutni pružajući neizmjernu ljubav i podršku.

Hvala **Krešimiru** jer je imao razumijevanja u one dana kada citometar nije radio najbrže i jer je velika podrška mom znanstvenom razvoju.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Regulacija NK-staničnog odgovora tijekom rane infekcije mišjim citomegalovirusom (MCMV) rezultat je fine ravnoteže među signalima koji dolaze od aktivacijskih i inhibicijskih receptora ispoljenih na njihovoj staničnoj površini. Kako bi zaobišli antigensku prezentaciju i prepoznavanje od strane limfocita CD8⁺ T, MCMV kodira proteine kojima regulira ispoljavanje molekula MHC I na površini inficiranih stanica. Međutim, smanjeno ispoljavanje molekula MHC I na površini stanice trebalo bi dovesti do „missing self“¹-posredovanog prepoznavanja inficiranih stanica od strane stanica NK. Usprkos tom obilježju rane citomegalovirusne infekcije, većina laboratorijskih mišjih sojeva ne uspijeva kontrolirati akutnu infekciju. Naša je hipoteza da MCMV po infekciji stanica ispoljava molekule kojima veže inhibicijske receptore Ly49 i na taj način inhibira funkciju stanica NK.

Cilj ovog rada je karakterizirati mehanizme kojima mišji citomegalovirus izbjegava rani NK-stanični odgovor posredovan „missing self“-prepoznavanjem te utvrditi ulogu „missing self“-prepoznavanja u *in vivo* kontroli citomegalovirusne infekcije i utjecaj na razvoj specifičnog CD8 T-limfocitnog odgovora.

¹ „missing self“ označava prepoznavanje u slučaju nedostatka vlastitih molekula MHC I

Metode

Za potrebe ovog rada uhodala sam test reporterskih stanica koje ispoljavaju inhibicijski receptor Ly49A te testirala njihovu aktivaciju, praćenjem ispoljavanja GFP-a pomoću protočne citometrije, nakon ko-kultivacije sa virusom inficiranim stanicama kako bi odredila virusni gen/gene odgovoran za vezanje ovog receptora. Funkcionalnim testovima i protočnom citometrijom analizirala sam fenotip i funkciju stanica NK po infekciji miševa WT MCMV-om ili $\Delta m04$ MCMV-om. Standardnim testom virusnih čistina ispitala sam sposobnost raznih mišjih sojeva u kontroliranju WT MCMV-a ili $\Delta m04$ MCMV-a te ulogu stanica NK.

Rezultati

Pokazala sam kako ligacija inhibicijskog receptora Ly49A putem kompleksa m04/MHC I ispoljenog na površini inficiranih stanica rezultira: (i) protekcijom WT MCMV-inficiranih stanica od NK-posredovanog specifičnog ubijanja, (ii) smanjenom proliferacijom stanica NK *in vivo*, te (iii) slabom kontrolom virusnog titra *in vivo* 3 dana po infekciji u miševa haplotipa H-2^k i H-2^d. Virusni model „missing self“-prepoznavanja koristila sam u ispitivanju uloge jakosti NK-staničnog odgovora u formiranju CD8 T-limfocitnog odgovora te pokazala kako u BALB/c miševa snažan NK-stanični odgovor ne utječe na učinkovitost CD8 T odgovora i to najvjerojatnije zbog očuvanja broja i funkcije konvencionalnih dendritičkih stanica. Naposljetku, definirala sam tri nova aktivacijska receptora Ly49: Ly49P, Ly49L i Ly49D2, specifična za prepoznavanje MCMV-inficiranih stanica putem kompleksa m04/MHC I i dodatnog virusnog faktora.

Zaključak

Ovaj rad pokazuje novi citomegalovirusni mehanizam izbjegavanja NK-staničnog odgovora i to ispoljavanjem kompleksa koji ligira inhibicijski NK-stanični receptor te inhibira proliferacijski kapacitet stanica NK i kontrolu virusnog titra *in vivo*. Također, po prvi puta pokazuje fiziološku ulogu „missing self“-posredovanog prepoznavanja u kontekstu virusne infekcije. Istovremeno, ukazuje na postojanje aktivacijskih receptora Ly49, specifičnih za isti kompleks.

Ključne riječi

Citomegalovirus; imunološki nadzor; izbjegavanje imunološkog nadzora; m04/gp34; mišji citomegalovirus; prirođena imunost; receptori Ly49; stanice NK.

SUMMARY

Objectives

Regulation of NK cell response in acute mouse cytomegalovirus (MCMV) infection is dependent on the fine balance of signals coming from activating and inhibitory receptors expressed on their cell surface. In order to sidestep antigen presentation and recognition by CD8⁺T cells, MCMV encodes immunoevasion proteins that downmodulate the expression of MHC class I on the surface of infected cells. However, by lowering interactions and triggering through inhibitory Ly49 receptors, this process makes infected cells prone to „missing-self“-mediated killing by NK cells. In spite of that, most of the laboratory mouse strains are not capable of controlling the acute MCMV infection. My working hypothesis was that this mechanism has evolved to prevent NK cell activation and killing by restoring ‘self’ signature and allowing the engagement of inhibitory Ly49 receptors by their natural ligands.

The objective of this thesis was to characterize mechanisms which MCMV utilizes to avoid early „missing self“-dependent NK cell response and to determine the role of „missing self“-mediated recognition during *in vivo* control of MCMV infection and its influence on specific CD8 T cell response.

Methods

For the purpose of this dissertation I established an assay with reporter cells expressing inhibitory Ly49 receptors. Activation of reporter cells was followed by GFP expression using flow

cytometry, after co-cultivation with MCMV infected cells in order to determine the viral gene(s) responsible for the ligation of this receptor.

I used functional tests and immunophenotyping to analyse the phenotype and function of NK cells after infection of mice with WT or $\Delta m04$ MCMV. Standard plaque assay was used to determine the ability of various mouse strains to control infection with WT MCMV or $\Delta m04$ MCMV and the role of NK cells.

Results

The data show that the ligation of inhibitory Ly49A receptor by m04/MHC I complex results in: (i) protection of WT MCMV infected cells from NK cell-mediated killing, (ii) impaired proliferation of NK cells *in vivo* and (iii) weak control of the virus titer *in vivo* 3 days post infection in mice of H-2^k i H-2^d haplotype. I used the viral model of „missing self“-mediated recognition in determining the role of the strong NK cell response in shaping the adaptive immune response and demonstrated that in BALB/c mice the strong NK cell response does not influence the efficacy of the CD8 T cell response. This is most likely due to the preserved number and function of conventional dendritic cells. Finally, I identified three novel MCMV-specific activating Ly49 receptors: Ly49P, Ly49L i Ly49D2, which recognize infected cells via m04/MHC I complex and an additional viral factor.

Conclusion

This thesis presents a novel mechanism employed by mouse cytomegalovirus, aimed to avoid NK cell response by expressing a protein complex to ligate inhibitory Ly49 receptor, inhibit the proliferative capacity of NK cells and the ability to control virus titer *in vivo*. This study is the first evidence for the physiological role of the „missing self“-mediated recognition in the context of viral infection. At the same time it points to the 3 activating Ly49 receptors specifically recognizing the same m04/MHC I complex.

Key words

Cytomegalovirus; immunoevasion; immunosurveillance; innate immunity; Ly49 receptors; m04/gp34; mouse cytomegalovirus; NK cells.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Prirodnoubilačke stanice	1
1.1.1. Funkcija stanica NK.....	2
1.1.1.1. Nadzor nad tumorima.....	2
1.1.1.2. Nadzor nad virusima	3
1.1.2. Regulacija aktivnosti stanica NK	4
1.1.2.1. Hibridna rezistencija (eng. „Hybrid resistance“ – HR) i „missing self“ hipoteza.....	4
1.1.2.2. MHC I-ovisni inhibicijski NK-stanični receptori	5
1.1.2.3. MHC I-neovisni inhibicijski NK-stanični receptori.....	8
1.1.2.4. MHC I-ovisni aktivacijski NK-stanični receptori.....	11
1.1.2.5. Aktivacijski NK-stanični receptori ovisni o molekulama sličnima MHC I.....	12
1.1.2.6. Modeli edukacije stanica NK.....	16
1.1.3. Memorija posredovana stanicama NK	19
1.2. Citomegalovirus	20
1.2.1. Struktura i ispoljavanje gena citomegalovirusa	20
1.2.2. Imunološki nadzor infekcije CMV-om	21
1.2.2.1. Uloga stanica NK u nadzoru infekcije.....	22
1.2.2.1. Uloga limfocita T u nadzoru infekcije	25

1.2.3. Citomegalovirusni mehanizmi za izbjegavanje imunološkog nadzora posredovanog stanicama NK.....	27
1.2.3.1. Regulacija ispoljavanja molekula MHC razreda I.....	27
1.2.3.2. Ispoljavanje virusnih homologa molekula MHC razreda I.....	30
1.2.3.3. Regulacija ispoljavanja liganada za aktivacijski receptor NKG2D	31
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	34
3. MATERIJAL I METODE	36
3.1. Materijal.....	36
3.1.1. LB medij za uzgoj bakterija	36
3.1.2. Mediji za uzgoj stanica.....	36
3.1.3. Otopine i puferi	37
3.1.4. Monoklonska protutijela i poliklonski serumi	39
3.1.5. Stanične linije.....	41
3.2. Metode	42
3.2.1. Virusi.....	42
3.2.1.1. Ciljana mutageneza MCMV-BAC-a	44
3.2.1.2. Analiza virusnih mutanti restrikcijskim endonukleazama	45
3.2.2. Kultura staničnih linija	46
3.2.2.1. Priprema mišjih embrionalnih fibroblasta (MEF)	46

3.2.2.2.	<i>Uzgoj staničnih linija.....</i>	46
3.2.2.3.	<i>Krioprezervacija staničnih linija.....</i>	47
3.2.2.4.	<i>Određivanje broja stanica.....</i>	47
3.2.2.5.	<i>Testiranje staničnih linija na prisutnost Mycoplasme.....</i>	47
3.2.3.	Priprema monoklonskih protutijela.....	48
3.2.3.1.	<i>Održavanje hibridoma i priprema monoklonskih protutijela iz supernatanta kulture.....</i>	48
3.2.3.2.	<i>Proizvodnja ascitesa.....</i>	48
3.2.3.3.	<i>Obilježavanje protutijela fluorokromima.....</i>	49
3.2.4.	Obilježavanje staničnih proteina biotinom, imunoprecipitacija i Western blot.....	49
3.2.5.	Ly49 2B4-NFAT reporterska stanična linija.....	50
3.2.5.1.	<i>Izrada 2B4-NFAT reporterskih stanica koje nose aktivacijski Ly49.....</i>	50
3.2.5.2.	<i>Izrada 2B4-NFAT reporterskih stanica koje nose inhibicijski Ly49.....</i>	51
3.2.5.3.	<i>Test aktivacije reporterskih stanica.....</i>	52
3.2.6.	Analiza transkripcijske aktivnosti regije virusnog genoma.....	52
3.2.7.	Laboratorijske životinje.....	53
3.2.8.	Virusne infekcije i tretiranje miševa protutijelima.....	54
3.2.8.1.	<i>Propagacija MCMV-a u staničnoj kulturi.....</i>	54
3.2.8.2.	<i>Infekcije životinja i tretman antitijelima.....</i>	54
3.2.8.3.	<i>Određivanje virusnog titra u organima.....</i>	55
3.2.9.	Izolacija limfocita.....	55
3.2.9.1.	<i>Preparacija limfocita slezene.....</i>	55
3.2.9.2.	<i>Preparacija limfocita iz krvi.....</i>	56

3.2.10.	Fenotipska analiza limfocita i staničnih linija protočnom citometrijom.....	56
3.2.11.	Analiza proliferacije limfocita u inficiranim životinjama protočnom citometrijom.....	58
3.2.12.	Analiza produkcije IFN γ protočnom citometrijom	58
3.2.13.	Utvrđivanje razine IFN α u serumu inficiranih životinja.....	59
3.2.14.	Analiza citotoksičnosti posredovane stanicama NK	59
3.2.15.	Statistička obrada podataka	60
4.	REZULTATI.....	61
4.1.	Kompleks m04 i MHC I ispoljen je na površini virusom inficiranih stanica.....	61
4.2.	Kompleks m04/MHC I služi ligaciji inhibicijskog receptora Ly49A	62
4.2.1.	Učinak proteina m04 ovisan je o haplotipu molekula MHC I	62
4.2.2.	Aktivacija reporterskih stanica Ly49A je snažnija u prisustvu kompleksa MHC I/m04.....	63
4.3.	m04 antagonizira učinak m152 u negativnoj regulaciji ispoljavanja molekula MHC I.	65
4.4.	Vezanje inhibicijskog receptora Ly49A rezultira smanjenom proliferacijom stanica NK.....	68
4.5.	Prisustvo m04 štiti stanice od ubijanja posredovanog stanicama NK.....	69
4.6.	Virusna mutanta deficijentna za m04 ($\Delta m04$) pokazuje smanjeni virusni titar u odnosu na divlji tip virusa (WT) po infekciji miševa haplotipa H-2 ^d i H-2 ^k	71
4.7.	Funkcija proteina m04 nije izražena u miševa haplotipa H-2 ^b	73
4.8.	Novokoćeni miševi nemaju sposobnost kontroliranja infekcije sa mutantom $\Delta m04$	76
4.9.	Kontrola virusnog titra $\Delta m04$ posredovana je stanicama NK koje ispoljavaju inhibicijske receptore Ly49A, Ly49C, Ly49G2	77

4.10. Aktivacijski receptor NKG2D sudjeluje u „missing self“-posredovanom NK-staničnom nadzoru virusa.....	79
4.11. Stanice NK pokazuju sličan obrazac maturacije ali različit obrazac aktivacije te luče manje IFN γ u slučaju infekcije miševa sa virusom $\Delta m04$	81
4.12. NK-stanični odgovor posredovan prepoznavanjem nedostatka vlastitog ne utječe na kvalitetu odgovora limfocitima T	85
4.13. Kvalitetan CD8 T-limfocitni odgovor omogućen je očuvanjem broja konvencionalnih dendritičkih stanica.....	88
4.14. MCMV m04 je nužan za prepoznavanje inficiranih stanica preko receptora Ly49P.....	91
4.15. Prisustvo m04 na površini inficiranih stanica je kritično ali ne i dostatno za prepoznavanje preko aktivacijskih receptora Ly49	93
4.16. Prepoznavanje od strane aktivacijskih receptora zahtijeva prisustvo faktora iz $\Delta 7$ regije genoma MCMV-a.....	95
4.17. Aktivacijski receptori Ly49L i Ly49D2 također prepoznaju molekule MHC I u kontekstu MCMV-kodiranog m04	100
5. RASPRAVA.....	102
6. ZAKLJUČCI.....	109
7. LITERATURA.....	110

1. UVOD

1.1. Prirodnoubilačke stanice

Prirodnoubilačke stanice (eng. *Natural Killer Cells* – NK) su limfociti podrijetlom iz koštane srži, a prvotno su identificirane kao stanice koje imaju sposobnost razaranja tumorskih stanica bez prethodne senzibilizacije [1]. Njihova aktivnost u koštanoj srži je mala ali se očituje u tkivima poput slezene, pluća i jetre kamo dopijevaju cirkulacijom putem periferne krvi. Nedavno su karakterizirane i specifične subpopulacije ovih stanica u žlijezdama slinovnicama te sluznici probavnog sustava gdje stanice NK ispoljavaju jedinstveni repertoar receptora na svojoj površini [2]. Njihova uloga u ovim tkivima je još nedovoljno istražena. Dok se za prve smatra da bi mogle imati ulogu u uspostavi virusne perzistencije i latencije za druge se smatra da igraju ulogu u održavanju homeostaze epitelnog tkiva [3-6]. Stanice NK prisutne su i u uterusu gdje potpomažu implantaciju ploda te održanje fetoplacentarne jedinice [7, 8].

Stanice NK razvijaju se u koštanoj srži iz zajedničkih NK/T progenitora. Prijelaz iz zajedničkog progenitora u NK progenitor (NKP) karakteriziran je ispoljavanjem IL-2/15R β čime daljnji razvoj stanica NK postaje ovisan o IL-15 [9]. IL-15, trans-prezentiran preko IL15R α na dendritičkim stanicama (DC), pokazao se kao ključni citokin u razvoju stanica NK [10]. Postojanje zajedničkog progenitora za stanice NK i T najbolje se očituje u činjenici da ove populacije stanica koriste iste citolitičke mehanizme. Naime i stanice NK i citotoksični limfociti T prilikom lize stanica koriste se egzocitozom malih citolitičnih molekula granzima i perforina [11]. I dok perforin tvori pore u staničnoj membrani, granzimi su serinske proteaze koje uzrokuju cijepanje kaspaza čime se inducira apoptoza u ciljnim stanicama [12]. U miševa koji su genetički modificirani na način da im nedostaje perforin (*Prf*^{-/-}) otkrivena je uloga i ostalih citolitičnih

mehanizama [13]. Imune stanice iz ovih miševa ubijale su ciljne stanice putem interakcije između receptora Fas (Fas) i liganada za receptor Fas (FasL) te ostalih „death“ receptora. Za razliku od citotoksičnih limfocita, stanice NK ne ekspimiraju T stanični receptor (eng. *T cell receptor* – TCR) te njihova aktivacija ne zahtijeva prethodnu senzibilizaciju zbog čega spadaju u razred tzv. urođene imunosti.

Stanice NK se od ostalih staničnih subpopulacija razlikuju ekspresijom specifičnih biljega na svojoj površini. Humane stanice NK ispoljavaju CD56 i CD16 dok su negativne za biljeg CD3 [14]. Mišje stanice NK su također negativne za CD3, a pozitivne za NKp46 i CD49b (DX5) biljeg [15]. Stanice NK iz nekih mišjih sojeva (poput C57BL/6 ili MA/My) također su pozitivne za NKR-P1A (NK1.1).

1.1.1. Funkcija stanica NK

1.1.1.1. Nadzor nad tumorima

Stanice NK su prvi puta zapravo opisane kao stanice sa sposobnošću spontanog liziranja tumora. Neovisna istraživanja pokazala su citotoksični kapacitet stanica imunološkog sustava naspram singeničnih i alogeničnih tumora. Ova sposobnost nije bila narušena u miševa sa depletiranim limfocitima T i B kao ni u atimičnim miševima pa je ovaj atribut pripisan novoj populaciji stanica nazvanima prirodnoubilačke stanice (eng. *Natural Killer* – NK- *cells*) [16-19]. Dodatno je ta njihova sposobnost potvrđena na mišjim modelima u kojima miševi sa defektom funkcije stanica NK pokazuju smanjenu sposobnost kontrole rasta implantiranog singeničnog tumora. Naime primjećeno je kako splenociti iz miševa koji nose *beige* mutaciju (*bg/bg*) pokazuju smanjenu citotoksičnost u usporedbi sa heterozigotnim miševima (*bg/+*) *in vitro* dok *in vivo* pokazuju višu stopu smrtnosti u slučajevima supkutanog implantiranja tumorskih stanica

[20]. Stanice NK tumore uklanjaju citolitičkim mehanizmima te lučenjem citokina poput IFN γ čime se potiče uspostava antitumorskog stečenog imunološkog odgovora.

1.1.1.2. Nadzor nad virusima

Uloga stanica NK u kontroli virusne infekcije najbolje je istražena na primjeru herpesvirusnih infekcija. Naime, miševi kojima su depletirane stanice NK pokazivali su slabiju sposobnost kontroliranja virusnog titra u organima u slučajevima infekcije sa mišjim citomegalovirusom (MCMV), virusom vakcinije ili virusom mišjeg hepatitisa [21]. Također u jetri ovih miševa primjećene su histološke abnormalnosti u obliku patoloških lezija. Suprotno tome, uloga stanica NK nije pokazana tijekom akutne ili perzistentne infekcije miševa virusom koji uzrokuje limfocitni koriomeningitis (LCMV) [22]. Uloga stanica NK pokazana je i u slučajevima kontrole patoloških promjena u pankreasu tijekom infekcije miševa coxsackievirusom B4 pri čemu je deplecija stanica NK monoklonskim protutijelom rezultirala gubitkom kontrole nad akutnom infekcijom [23]. Isto je potvrđeno u slučajevima infekcije humanim herpes simplex virusom tipa 1 [24]. Uloga rezidualnih stanica NK u plućima pokazala se ključnom u posredovanju rezistencije miševa C57BL/6 na infekciju virusom influence A [25]. Također, na primjeru miševa C57BL/6 pokazana je uloga receptora CD94/NKG2E ispoljenog na stanicama NK u rezistenciji na virus ektromelije [26]. Konačno, uloga stanica NK u kontroli virusne infekcije potvrđena je u slučaju miševa koji nose SCID mutaciju zbog čega nemaju limfocite T i B [22, 27]. Ti miševi su bili otporni na infekciju MCMV-om zbog činjenice da su njihove stanice NK normalno proliferirale te lučile IFN γ u ovisnosti o IL-12 čija je proizvodnja od strane dendritičkih stanica bila inducirana u kontekstu infekcije.

Uloga stanica NK u borbi protiv virusnih infekcija potvrđena je i u slučaju humanih patogena. Naime tretiranje pacijenata sa čimbenicima koji pospješuju aktivnost stanica NK, poput interferona tipa I, IL-2 i IL-12 pokazala su ohrabrujuće rezultate u limitiranju infekcije herpesvirusima, virusom hepatitisa B i C te u slučaju infekcije virusom HIV-a [28].

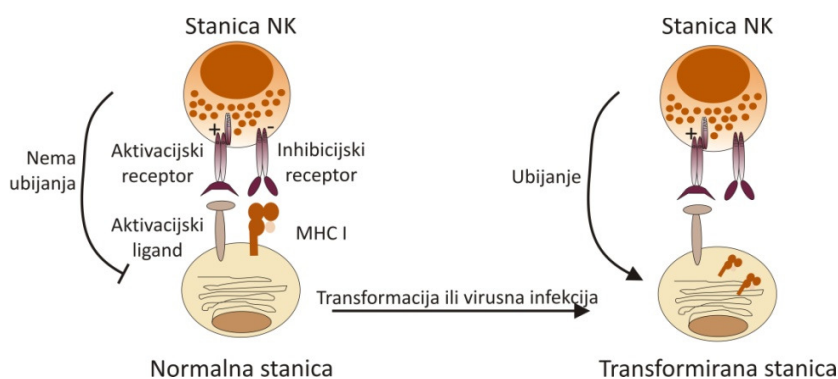
1.1.2. Regulacija aktivnosti stanica NK

1.1.2.1. Hibridna rezistencija (eng. „Hybrid resistance“ – HR) i „missing self“ hipoteza

Hibridna rezistencija se u literaturi pojavila kao pojam koji je opisivao pojavu da F1 hibridni potomci odbacuju stanice koštane srži oba roditelja što se kosilo sa dotadašnjim dogmama prema kojima F1 potomci ispoljavaju sve roditeljske histokompatibilne gene i zbog toga bi morali tolerirati transplantat [29]. Studije koje su uslijedile upućivale su na upletenost stanica urođenog imunološkog sustava u ovu pojavu. Naime, efektorske stanice upletene u ovu pojavu pokazivale su otpornost na zračenje, pokazivale su svoju funkciju u trećem tjednu razvoja te su djelovale brzo, unutar 36 sati, što je bilo prekratko za uspostavljanje stečenog imunološkog odgovora [30]. Tek nakon otkrića stanica NK, te nakon studija provedenih u uvjetima nefunkcionalnih ili depletiranih stanica NK, potvrđena je njihova uloga u pojavi hibridne rezistencije [31].

Jedno od obilježja stanica NK jest da prepoznaju i liziraju stanice koje ispoljavaju nisku razinu vlastitih molekula tkivne snošljivosti (eng. *Major Histocompatibility Complex* – MHC) molekula razreda I. Ova pojava prvi je puta predstavljena i dokazana 1986. kada je Klas Karre s kolegama pokazao da miševi C57BL/6 imaju sposobnost odbacivanja tumora s reduciranim ispoljavanjem molekula MHC I (H2-deficijentni tumori) dok su tumori sa normalnim

ispoljavanjem molekula MHC I bili tolerirani [32]. Uloga stanica NK u ovom eksperimentu potvrđena je u uvjetima nedostatka limfocita T, zatim nakon deplecije stanica NK te nakon rekonstitucije razine ispoljavanja molekula MHC I na tumorskim stanicama, čime je ponovno uspostavljena rezistencija na lizu posredovanu stanicama NK.



Slika 1. Aktivacija stanica NK posredovana prepoznavanjem nedostatka vlastitog („missing self“). Smanjeno ispoljavanje molekula MHC I na površini ciljnih stanica dovodi do aktivacije stanica NK zbog nedostatka inhibicijskog signala. Modificirano prema: Hans-Gustaf Ljunggren & Karl-Johan Malmberg: Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. Nature Reviews Immunology 7, 329-339 (May 2007)

Postavljena „missing self“ hipoteza pružila je objašnjenje prethodno opisanoj pojavi hibridne rezistencije pri čemu je postalo jasno da do odbacivanja roditeljskog presatka od strane F1 potomka dolazi zbog nepodudaranja u ispoljavanju vlastitih molekula MHC I. Danas je poznato kako u ovoj reakciji sudjeluju i aktivacijski NK-stanični receptori poput NKG2D i Ly49D [33].

1.1.2.2. MHC I-ovisni inhibicijski NK-stanični receptori

Aktivacija stanica NK posljedica je ravnoteže između signala koji dolazi od aktivacijskih i inhibicijskih receptora ispoljenih na površini tih stanica [34]. Najvažnija uloga inhibicijskih receptora je u edukaciji stanica NK tijekom njihova razvoja u koštanoj srži, osiguravanju

tolerancije na vlastite antigene te sprečavanju pojave autoimunih bolesti. Inhibicijski receptori kontroliraju prisutnost molekula MHC I na staničnoj površini, te posreduju „missing self“-aktivaciju stanica NK. Najdetajnije izučavane obitelji MHC I-ovisnih inhibicijskih receptora su obitelj Ly49 u miševa te receptori KIR (eng. *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors*) u ljudi [35].

Receptori Ly49 pripadaju poligenskoj obitelji polimorfnih receptora smještenih u kompleksu na kromosomu 6. Prema strukturi ovi transmembranski proteini tipa II spadaju u receptore slične C-tipu lektina. Njihova specifičnost određena je aminokiselinskim slijedom u ekstracelularnom dijelu dok intracelularni motiv određuje njihovu pripadnost aktivacijskoj ili inhibicijskoj skupini [36]. Inhibicijski receptori posjeduju intracelularni tirozinski inhibicijski motiv (eng. *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif* - ITIM). Vezanjem inhibicijskog receptora na odgovarajući ligand (MHC I) dolazi do fosforilacije motiva ITIM što pokreće signalnu kaskadu koja uključuje tirozinske fosfataze koje sadržavaju SH (poput SHP-1 i SHP-2) te rezultira defosforilacijom aktivacijskog signalnog motiva te utišavanjem signala. Ovo je tipičan scenarij inhibirane aktivnosti stanica NK tijekom homeostaze domaćina.

Ispoljavanje receptora Ly49 je stohastično. Stanice NK mogu istovremeno ispoljavati više inhibicijskih receptora Ly49 ali postoji pravilo prema kojem svaka funkcionalna stanica NK mora ispoljavati barem jedan inhibicijski receptor specifičan za vlastite molekule MHC I. Receptori Ly49 mogu biti ispoljeni na preklapajućim subpopulacijama te nekoliko receptora može biti specifično za istu molekulu MHC I. Većina mišjih sojeva ispoljava sve inhibicijske receptore Ly49: Ly49A, Ly49C, Ly49G2, Ly49I; međutim, njihov doprinos inhibicijskom signaliranju različit je s obzirom na edukaciju ovisnu o ispoljenosti molekula MHC I u ovim sojevima [37].

Ly49A je ispoljen na 5-20% stanica NK u većini laboratorijskih mišjih sojeva [37]. Njegov prirodni ligand su molekule MHC I, H-2D^d i H-2D^k, što je pokazano funkcionalnim testovima u kojima Ly49A⁺ stanice NK nisu ubijale ciljane stanice pozitivne za H-2D^d ili H-2D^k, ali i otkrivanjem kristalne strukture molekula [38, 39]. Ly49G2 je ispoljen na 20-40% stanica NK te kao ligand prepoznaje H-2D^k, H-2D^d i H-2L^d [40]. Ly49C je, što se ciljnih molekula tiče, najpromiskuitetniji receptor, s obzirom da prepoznaje H-2D^d i H-2K^d, H-2D^b i H-2K^b te H-2D^k [41]. Ispoljen je na oko 50% stanica NK. Ly49C dijeli visoku homologiju sa receptorom Ly49I ispoljenim u miševa 129/J. Ovaj receptor prepoznaje H-2K^b te molekule haplotipa H-2^s i H-2^d [42].

Osim na stanicama NK, inhibicijski receptori Ly49 ispoljeni su i na monocitima, stanicama NKT, stanicama $\gamma\delta$ T te efektorskim limfocitima T [43]. Uloga inhibicijskih receptora na citotoksičnim limfocitima T do sada nije jasno razjašnjena iako se smatra da imaju istu ulogu kao i u slučaju stanica NK.

Receptori KIR, ispoljeni u humanoj populaciji, funkcionalni su homolozi receptorima Ly49. Također sadrže aktivacijske i inhibicijske oblike ali se strukturno razlikuju po tome što su ispoljeni kao monomeri te pripadaju superobitelji imunoglobulina. Nomenklatura molekula KIR potječe od broja imunoglobulinskih domena u ekstracelularnoj regiji (npr. KIR2D ili KIR3D) dok oznake S ili L označavaju aktivacijski ili inhibicijski oblik (S=*short*, kratki; L=*long*, dugi). Naime, predloženi model evolucije ovih receptora pretpostavlja nastanak aktivacijskih receptora iz inhibicijskih i to pojavom STOP mutacija u citoplazmatskom dijelu molekule čime dolazi do trunkiranja citoplazmatske domene [44]. Ovi receptori također prepoznaju molekule MHC I, u ljudi nazvane humani leukocitni antigeni (eng. *Human Leukocyte Antigens* – HLA), HLA-A, -B, -C [45].

Obitelj receptora NKG2 također strukturno odgovara receptorima sličnima C-tipu lektina. Međutim, njihova posebnost odlikuje se u tome što je većina članova ove obitelji na površini stanice ispoljena kao heterodimer u kombinaciji sa molekulom CD94 (iznimka je NKG2D koji je homodimer) [46, 47]. Ovi receptori prepoznaju ne-klasične molekule MHC I, HLA-E u ljudi, tj. Qa-1 u miševa, čija uloga je prezentiranje peptida koji potječu od vlastitih molekula MHC I. Smatra se dakle da je uloga ovih receptora nadzor nad razinom ispoljenosti vlastitih molekula MHC I na površini stanica, pri čemu imunološki sustav kontrolira eventualne patološke promjene na stanicama, a koje mogu rezultirati promjenom u razini ispoljenosti molekula MHC I. Ovu obitelj sačinjavaju inhibicijski NKG2A/CD94 te aktivacijski NKG2C/CD94 i NKG2E/CD94.

1.1.2.3. MHC I-neovisni inhibicijski NK-stanični receptori

Receptor 2B4 (CD244) ispoljen je na svim stanicama NK, stanicama $\gamma\delta$ T i memorijskim stanicama CD8⁺ T te pripada obitelji receptora CD2. Dok oblik opisan u ljudi pripada skupini aktivacijskih receptora, za mišji receptor postoje dokazi o njegovoj aktivacijskoj i inhibicijskoj funkciji. Mišji receptor specifičan je zbog činjenice da ne prepoznaje molekule MHC I, već molekulu CD48 [48]. Vezanje receptora 2B4 putem monoklonskih protutijela rezultiralo je povećanom citoksičnošću i sekrecijom IFN γ od strane stanica NK čime je pokazana aktivacijska uloga ovog receptora [49]. Međutim, pokusi provedeni u miševima u kojima je deletiran ovaj receptor (C57BL/6 2B4^{-/-}) ili u miševa kojima nedostaje CD48 pokazuju da u takvim slučajevima stanice NK pokazuju povišene citotoksične i sekrecijske sposobnosti što ukazuje na inhibicijsku ulogu ovog receptora [50, 51]. Unutarstanična domena receptora ne posjeduje klasičan inhibicijski motiv (ITIM) već četiri tzv. motiva ITSM (eng. *Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif*). Regulacija aktivnosti stanica NK putem ovog receptora ovisi o stupnju ispoljenosti

ovog receptora, te u pravilu visoka ispoljenost rezultira inhibicijom, zatim dostupnosti njegova liganda kao i količini adaptorskih molekula koje se vežu na motiv ITSM [52]. Sva četiri motiva vežu protein asociran sa aktivirajućom signalnom molekulom limfocita (eng. *Signaling Lymphocyte Activating Molecule* – SLAM), SAP (eng. *SLAM-Associated Protein* - SAP) proteinom, pri čemu vezanje tog proteina na motive ITSM rezultira pojavom aktivacijskog signala. Inhibicijski signal, smatra se, prenose druge adaptorske molekule poput EAT-2A i EAT-2B. Dvostruka uloga receptora 2B4 pokazana je i u interakciji sa drugim NK-receptorima. Naime dok prisutnost 2B4 inhibira indukciju IFN γ uzrokovanu signaliranjem preko receptora NKp46, nužna je za indukciju IFN γ preko receptora NK1.1 [53]. Zanimljivo, iako je CD48 ispoljen i na samim stanicama NK [54], te je za očekivati kako bi stanice NK mogle biti podložne autolognom ubijanju, na humanom modelu pokazano je kako do toga ipak ne dolazi i to zbog toga što receptor 2B4 na stanicama NK ima sposobnost *cis*-vezanja molekula MHC I te to vezanje inhibira auto-ubijanje [55]. Signalne molekule uključene u ovaj mehanizam inhibicije nisu poznate, kao ni to da li isti princip djelovanja postoji i u miševa u kojima je pokazano kako CD48 ispoljen na NK stanicama služi kao ligand za stimulaciju susjednih stanica NK [56]. Uloga receptora 2B4 u virusnim infekcijama istraživana je na modelu perzistentne infekcije miševa LCMV-om. Pokazano je kako po infekciji miševi kojima nedostaje 2B4 razvijaju slabiji CD8 odgovor usmjeren na LCMV, lošiju kontrolu virusa te patološke promjene na tkivima. Slabiji CD8 T-limfocitni odgovor nije posljedica intrinzičnog efekta u 2B4 deficitnim CD8 T stanicama već je rezultat pojačanog, stanicama NK i perforinom posredovanog, ubijanja aktiviranih (CD44^{hi}) CD8 stanica [57].

TIGIT (prema eng. *T cell Ig and ITIM domain*) je receptor ispoljen na mišjim i humanim stanicama NK, aktiviranim i memorijskim stanicama CD8 T te na regulatornim stanicama T.

Pokazano je kako TIGIT veže PVR (prema eng. *Poliovirus Receptor*) i molekule slične PVR-u te direktno ili indirektno, putem dendritičkih stanica, inhibira aktivnost stanica CD8 T. Naime u radu Yu X i suradnika iz 2009. godine pokazano je kako vezanje receptora TIGIT na ligand PVR ispoljen na dendritičkim stanicama rezultira pojačanim lučenjem IL-10, citokina sa imunosupresivnim djelovanjem, te smanjenim lučenjem IL-12, što za posljedicu ima suprimiranje CD8 T-staničnog odgovora [58]. U radu Joller N i suradnika iz 2011. godine naknadno je pokazano kako TIGIT može direktno suprimirati T-stanični odgovor i to utišavanjem aktivacijskog signala posredovanog ligiranjem T staničnog receptora (eng. *T cell receptor* – TCR). Također je pokazano kako miševi sa nedostatkom TIGIT-a pokazuju veću sklonost razvoju autoimunih bolesti [59]. Rad Stanietsky N i suradnika ukazuje na ulogu receptora TIGIT i na inhibiciju stanica NK [60]. Naime na humanom modelu pokazali su da vezanje TIGIT-a na PVR i PVRL2 (Nectin 2) direktno putem motiva ITIM rezultira smanjenom citotoksičnom aktivnosti i inhibiranim ubijanjem tumorskih stanica. Međutim, osim na TIGIT, PVR se veže i na aktivacijske/ko-stimulacijske NK-stanične receptore DNAM-1 (CD226) i CD96 [61], doduše sa smanjenim afinitetom u odnosu na TIGIT. Na tumorskim modelima pokazano je kako interakcija PVR-a sa CD96 promovira adheziju stanica NK na ciljne stanice te stimulira njihovu citotoksičnost [62]. Također je pokazano kako interakcija PVR-a sa DNAM-1 rezultira lizom tumorskih stanica te lučenjem citokina koji suprimiraju stvaranje tumorskih metastaza [63, 64]. Do sada nije poznata uloga receptora TIGIT u citomegalovirusnoj infekciji kao ni to postoje li mehanizmi regulacije liganada za ovaj receptor od strane citomegalovirusa.

1.1.2.4. MHC I-ovisni aktivacijski NK-stanični receptori

Aktivnost stanica NK ovisi o postojanju aktivacijskog signala te redukciji ili nedostatku signala inhibicijskog receptora. Provođenje signala putem aktivacijskog receptora rezultira reorganizacijom citoskeleta, oslobađanjem citolitičnih molekula, pojačanom produkcijom citokina te proliferacijom stanica NK. Aktivacijskim receptorima nedostaje unutarstanični motiv ITIM. Naprotiv, ti receptori imaju u svojoj transmembranskoj regiji pozitivno nabijenu aminokiselinu pomoću koje elektrostatskim vezama vežu adaptorske molekule (poput DAP12 ili DAP10) koje u svom sastavu imaju aktivacijski motiv ITAM (prema eng. *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif* – ITAM) [34].

Uloga aktivacijskih receptora najbolje je opisana u modelima odbacivanja transplantata te u kontekstu virusnih infekcija. Za razliku od inhibicijskih receptora Ly49, većina aktivacijskih receptora Ly49 ne veže vlastite molekule MHC I. Broj gena za aktivacijske receptore Ly49 varira između mišjih sojeva. Do sada su u potpunosti opisana četiri haplotipa, BALB haplotip koji posjeduje samo jedan receptor (*Ly49l*), C57BL/6 haplotip sa dva receptora (*Ly49h* i *Ly49d*), 129/J sa tri aktivacijska receptora (*Ly49r*, *u* i *p*) te NOD sa čak sedam aktivacijskih receptora (*Ly49d*, *u*, *p₃*, *p₁*, *w*, *m*, *h*) [65].

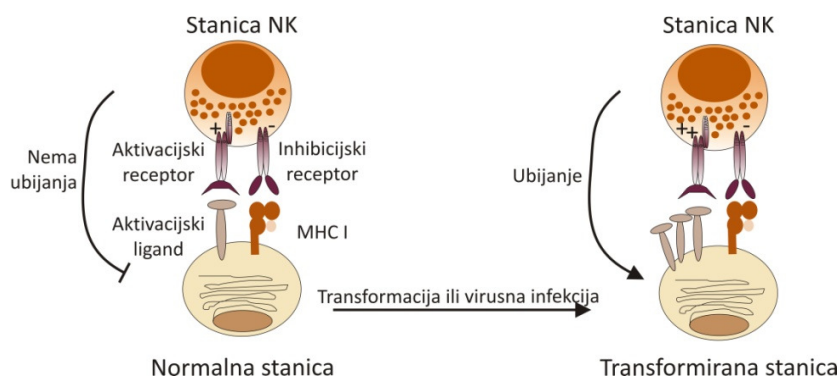
Ly49D najpoznatiji je po svojoj ulozi u odbacivanju transplantata koštane srži. Naime, pokazano je kako stanice NK koje ispoljavaju Ly49D posreduju odbacivanje koštane srži porijeklom iz miševa BALB/c od strane C57BL/6 ili F1(BALB/c x C57BL/6) miševa. U prilog tome idu i istraživanja koja su pokazala kako Ly49D⁺ stanice NK mogu ubiti H-2Dd⁺ ciljane stanice [66], te kako Ly49D⁺ stanice NK u C57BL/6 miševa posreduju odbacivanje transplantata porijeklom iz H-2D^{d+} kongeničnih miševa [67]. Osim H-2D^d, Ly49D prepoznaje i molekulu eksprimiranu na stanicama ovarija kineskog hrčka (eng. *Chinese Hamster Ovary* – CHO),

nazvanu Hm1-C4. Hm1-C4 je molekula slična molekulama MHC I te njeno vezanje na Ly49D uzrokuje liziranje stanica CHO [68].

Aktivacijski receptori Ly49H i Ly49P specifični su za prepoznavanje produkata MCMV-a i biti će diskutirani dalje u tekstu. Uloga ostalih aktivacijskih receptora Ly49 do sada nije poznata i biti će predmet dijela istraživanja ovog rada.

1.1.2.5. Aktivacijski NK-stanični receptori ovisni o molekulama sličnima MHC I

Receptor NKG2D (prema eng. *NK group 2, member D*) smatra se najvažnijim aktivacijskim NK-staničnim receptorom u nadzoru tumora i virusnih infekcija kao i prilikom odbacivanja transplantata koštane srži [69]. Ovaj homodimerični, C-tip lektinski receptor ispoljen je na većini humanih i mišjih stanica NK kao i na citotoksičnim stanicama CD8 T te stanicama $\gamma\delta$ gdje ima ko-stimulacijsku ulogu. Unatoč prisutnosti transkripta gena *Nkg2d* u makrofaga, njegova ispoljenost na površini tih stanica još je uvijek diskutabilna. Dok humani NKG2D veže dvije adaptorske molekule, DAP12 i DAP10, mišji receptor signalira isključivo putem adaptora DAP12 [70, 71]. Ligandi za receptor NKG2D nisu ispoljeni na površini stanica u uvjetima homeostaze u domaćina već su ispoljeni isključivo u uvjetima staničnog stresa, posredovanog oštećenjima molekule DNA, tumorskom transformacijom ili virusnom infekcijom, što je u literaturi opisano kao „induced self“ [72].



Slika 2. Aktivacija stanica NK posredovana pojačanim ispoljavanjem liganada za aktivacijske receptore („induced self“). Pojačano ispoljavanje liganada za aktivacijske receptore na površini ciljnih stanica dovodi do aktivacije stanica NK zbog nadvladavanja inhibicijskog signala. Modificirano prema: David H. Raulet & Russell E. Vance: Self-tolerance of natural killer cells. *Nature Reviews Immunology* 6, 520-531 (July 2006)

U ljudi, ligandi za receptor NKG2D su MICA i MICB (prema eng. *MHC class I related Chain A and B*), te proteini koji vežu UL-16 (eng. *UL-16 Binding Protein – ULBP*) 1-4. U miševa, ligandi za ovaj receptor identificirani su metodom protočne citometrije uz pomoć fluorescentno obilježenih tetramera NKG2D [73]. Identifikacijom molekula koje veže ovaj tetramer otkriveni su MULT-1 (prema eng. *Murine UL-16 binding proteinlike Transcript-1*), obitelj proteina RAE-1 (prema eng. *Retinoic Acid Early transcript*) i H60abc (prema eng. *minor Histocompatibility antigen 60*) [74-77]. Uloga receptora NKG2D osobito je značajna u kontroli tumora pri čemu je pokazano kako transfekcija ovih molekula u inače rezistentne tumore uzrokuje njihovu podložnost NK-posredovanoj lizi putem receptora NKG2D. Grupa David Raulet-a objavila je 2009. godine rad u kojem su pokazali da mišji soj deficijentan za receptor NKG2D ne pokazuje abnormalnosti u razvoju stanica NK, ali pokazuje njegovu kritičnu ulogu u nadzoru nad epitelnim i limfatičkim tumorima [78]. Međutim, u radu Zafirove B i suradnika u nezavisnom istraživanju pokazano je kako NKG2D igra ulogu u razvoju stanica NK, tj. kako miševi deficijentni za ovaj receptor pokazuju ubrzan razvoj stanica NK, njihovu podložnost

apoptozi te posljedično tome razlike u veličini populacija [79]. U istom radu, autori su pokazali kako ovi miševi neočekivano pokazuju NK-posredovanu rezistenciju na infekciju mišjim citomegalovirusom. Konflikti rezultati ovih dviju grupa do sada nisu razjašnjeni ali objašnjenja je moguće je tražiti u tehničkim izvedbama mišjih mutanti.

Regulacija ispoljavanja liganada za NKG2D vrlo je složena. Naime, transkripti za RAE-1 rijetko se nalaze u normalnim stanicama, dok su vrlo izraženi u virusom inficiranim stanicama, tumorskim stanicama te tijekom embriogeneze. Za razliku od RAE-1, transkripti za MULT-1 i H60 nađeni su i u normalnim stanicama, no međutim, njihovo površinsko ispoljavanje nedostaje, što upućuje na njihovu strogu transkripcijsku i posttranskripcijsku kontrolu (revijski obrađeno u [80]). Indukcija transkripcije liganada za NKG2D posredovana je retinoidnom kiselinom, vezanjem liganada na *Toll like* receptore, toplinskim šokom te putem transkripcijskog faktora AP-1. Neposredno, pojačano ispoljavanje liganada posredovano je i oštećenjem DNA, i to ionizirajućim ili UV-zračenjem te interkalirajućim agensima, te se odvija preko proteinskih kinaza ATM i ATR. U nedavnom radu Nice TJ i suradnici pokazali su kako je u normalnim stanicama MULT-1 ubikvitiran i degradiran u lizosomima te je na taj način spriječeno njegovo površinsko ispoljavanje [81, 82]. Ispoljavanje liganada za receptor NKG2D regulirano je i od strane tumora te mnogih virusa. U slučajevima uznapredovalih tumora u serumu bolesnika su detektirani solubilni oblici liganda MICA. Vezanje solubilnih liganada rezultira internalizacijom i smanjenom ispoljenosti receptora NKG2D što smanjuje imunološki nadzor tumora [83, 84]. Solubilne forme liganda MICA pronađene su i u HIV-inficiranih pacijenata što korelira sa smanjenom ispoljenošću receptora NKG2D te inhibiranom NKG2D-posredovanom aktivnošću stanica NK [85]. Pokazano je kako formiranje solubilnih oblika receptora posreduju enzimi metaloproteinaze ADAM 10 i ADAM 17 koji uzrokuju cijepanje molekule MICA u

izvanstaničnoj domeni [86]. Osim solubilnih liganada, internalizaciju receptora može uzrokovati dugotrajna izloženost površinski vezanom ligandu što rezultira smanjenom aktivnošću stanica NK *in vitro* [87]. Međutim, *in vivo* model transgeničnih miševa koji konstantno izražavaju Rae-1 ϵ pod β -aktinskim promotorom pokazuje da NK stanice iz tih miševa imaju sposobnost razviti normalan odgovor putem neprepoznavanja vlastitog te stimulacijom preko aktivacijskog receptora Ly49H [88]. Regulacija liganada za receptor NKG2D od strane herpesvirusa biti će diskutirana dalje u tekstu.

Grupa A. Morette provela je pionirska istraživanja na području kloniranja i karakterizacije tri dodatna citotoksična receptora ispoljena na stanicama NK: NKp30, NKp44 i NKp46 [89]. Sva tri receptora posreduju direktnu lizu tumorskih stanica. Međutim, prirodni ligandi za ove receptore, bilo endogeni ili tumorski, do sada još nisu karakterizirani. S vremenom je opisano kako NKp46 prepoznaje i posreduje ubijanje stanica inficiranih virusom influence [90]. Naime, NKp46 prepoznaje ostatke sialične kiseline na molekulama hemaglutinina ispoljenih na površini inficiranih stanica. Također, pokazano je kako receptor NKp46 prepoznaje ligand ispoljen na stanicama Langerhansovih otočića u gušterači te kako su miševi deficijentni za ovaj receptor manje skloni razvoju dijabetesa tipa I u modelu u kojem se ovaj tip dijabetesa izaziva injiciranjem streptozotocina [91]. Humani NKp30 prepoznaje ligand B7-H2 koji je ispoljen na tumorskim ali ne i na zdravim stanicama [92]. Humani NKp44, pak, prepoznaje glikoproteine ovojnice virusa West Nile i virusa denge te posreduje aktivaciju stanica NK [93]. Uloga ovih receptora u kontroliranju citomegalovirusne infekcije do sada nije poznata, no činjenica da humani citomegalovirus kodira protein koji uzrokuje disocijaciju aktivacijske adaptorske molekule CD3 ζ od receptora NKp30 te inhibiciju citotoksičnog odgovora svakako upućuje na njihovu važnost [94].

1.1.2.6. Modeli edukacije stanica NK

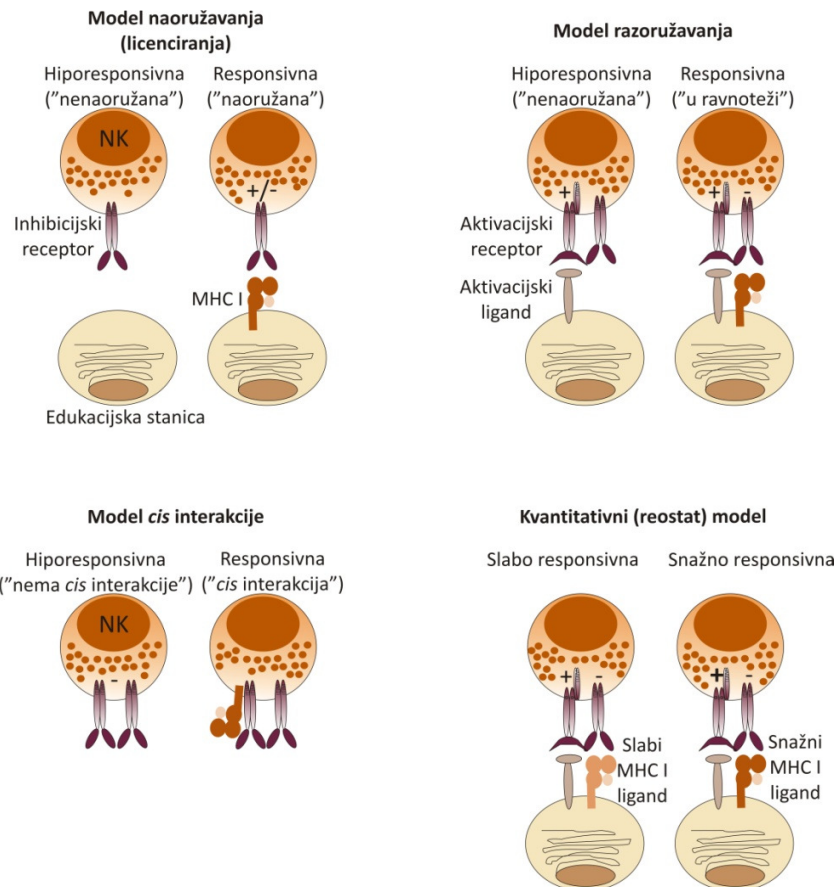
Iako stanice NK ispoljavaju brojne aktivacijske receptore, specifične za vlastite molekule, nema dokaza da stanice NK mogu uzrokovati pojavu autoimunosti, čak ni u nedostatku limfocita T i B te u miševa sklonih razvoju autoimunog dijabetesa (NOD). To implicira činjenicu da je edukacija i tolerancija stanica NK efikasnija od mehanizama negativne i pozitivne selekcije limfocita T. Dominantnu ulogu u mehanizmima edukacije stanica NK imaju inhibicijski receptori na stanicama NK koji specifično prepoznaju vlastite molekule MHC I.

Stanice NK iz miševa deficijentnih za MHC I, $\beta 2m$ ili TAP nisu sposobne ubiti tumore koji ne ispoljavaju molekule MHC I u *in vitro* uvjetima kao ni odbaciti transplantat koštane srži miševa deficijentnih za MHC I *in vivo* [95]. Stanice NK iz normalnih miševa, a koje ne ispoljavaju inhibicijske receptore, su hipo-responsivne u *in vitro* uvjetima stimulacije preko aktivacijskih receptora [96]. Zaključno ovi rezultati upućuju na važnost inhibicijskih receptora u stjecanju efektorskih funkcija tijekom razvoja stanica NK.

Postoje četiri modela koja predlažu mehanizam edukacije stanica NK. U ovom radu opisani su kronološki prema slijedu pojavljivanja u literaturi. Prva hipoteza, objavljena 2005. godine u radu grupe W. Yokoyame, tvrdi da su stanice NK inicijalno hipo-responsivne te da za stjecanje funkcionalne kompetencije trebaju interakciju između inhibicijskog receptora i vlastitih molekula MHC I [97]. Također, pokazano je kako je sam prijenos signala preko inhibicijskog motiva ITIM nužan s obzirom da su stanice NK kojima je ITIM mutiran bile hipo-responsivne iako su se razvile u prisutnosti vlastitih molekula MHC I. Problem ovog modela bio je u vjerovanju da inhibicijski receptor ne prenosi aktivni signal već zapravo služi dokidanju aktivacijskog signala te je u tom pogledu bilo teško razumjeti edukacijsku ulogu inhibicijskog receptora. Međutim, nedavni radovi pokazali su kako okidanje inhibicijskog signala dovodi do

aktivne fosforilacije nizvodne signalne, adaptorske molekule Crk, što daje dodatnu težinu ovom modelu [98]. Alternativni model opisan je u radu grupe Davida H. Rauleta. Prema njemu sve su stanice NK inicijalno responsivne te im ligacija inhibicijskog signala tijekom razvoja služi u postizanju tolerancije na vlastito [99]. U vrijeme objavljivanja ovaj je model bio lakše shvatljiv jer se temelji na klasičnom shvaćanju funkcije aktivacijskog i inhibicijskog signaliranja. Treći model razvio se nakon otkrića grupe W. Helda da molekule MHC I ispoljene na samim stanicama NK imaju sposobnost *cis*-vezanja inhibicijskih receptora Ly49 [100]. Koristeći se činjenicom da *cis* i *trans* vezanje MHC I H-2D^d na Ly49A ne koristi ista vezna mjesta, autori su razvili model u kojem su koristili mutantu Ly49A receptora koja je vezala MHC I isključivo *trans*-interakcijom. Na taj su način pokazali da mutantni receptor može inhibirati efektorsku funkciju stanica NK ali ne može educirati stanice NK čime su ukazali na važnost *cis*-interakcije u edukaciji NK stanica. Također, pokazali su kako *cis*-vezanje inhibicijskog receptora Ly49A sprečava njihovo re-lociranje u imunološku sinapsu, sprečava inhibicijsko signaliranje neovisno o ligandu te zapravo čini hipo-responsivnu stanicu NK responsivnom. Kao posljedica toga stanice NK na kojima je receptor Ly49A vezan molekulom MHC I u *cis* varijanti imaju smanjen inhibitorni učinak na aktivacijski signal te su takve stanice NK reaktivnije [101]. Nedostatak ovog modela jest što opisuje isključivo interakciju između molekula Ly49A i H-2D^d te je zapravo nepoznato može li se primijeniti na sveukupnu populaciju molekula KIR i Ly49. Suprotno prva dva opisana modela, četvrti model opisuje edukaciju stanica NK kao kvantitativni proces [102]. Koristeći mišve modificirane na način da ispoljavaju jedan alel za individualne molekule MHC I (K^b, D^b, D^d, L^d) ili kombinacije dva ili više alela, autori su pokazali da reaktivnost stanica NK ovisi kako o broju alela koje susreće tijekom edukacije tako i o jačini

interakcije između molekula MHC I i receptora Ly49. Ovaj model u mehanističkom je skladu sa svim do sada opisanim modelima edukacije.



Slika 3. Modeli edukacije stanica NK. Model naoružavanja pretpostavlja da svaka stanica NK da bi stekla funkcionalnost mora preko svog inhibicijskog receptora stupiti u interakciju sa edukacijskim ligandom MHC I. Model razoružavanja pretpostavlja da svaka stanica NK mora vezati odgovarajući ligand MHC I kako bi izbjegla anergiju. Model cis interakcije pretpostavlja kako cis-interakcija sprečava nakupljanje inhibicijskih receptora u imunološkoj sinapsi te omogućuje provođenje aktivacijskog signala i aktivaciju stanica NK. Kvantitativni model pretpostavlja da jačina reaktivnosti ovisi o jačini veze ostvarene sa edukacijskim ligandom tijekom razvoja. Modificirano prema: Petter Höglund & Petter Brodin: Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. Nature Reviews Immunology 10, 724-734 (October 2010).

Cijeli proces edukacije stanica NK doveden je u pitanje dvama nedavno objavljenim radovima, koji neovisno pokazuju kako reaktivnost stanica NK nije konačna ovisno o njihovoj

edukaciji već se može promijeniti ukoliko se okolišni uvjeti promijene. Naime, pokazano je kako adoptivni prijenos stanica iz miševa deficijentnih za molekule MHC I (pri čemu su te stanice hipo-responsivne) u normalne miševe čini te stanice ponovno reaktivnima i spremnima za proizvodnju citokina i degranulaciju [103]. U prilog tome idu i rezultati koji pokazuju da ukoliko se normalno responsivne stanice NK iz *wild type* miševa prenesu u miševe deficijentne za molekule MHC I, one postaju hipo-responsivne, unatoč ne promijenjenom ispoljavanju markera zrelosti na staničnoj površini [104].

1.1.3. Memorija posredovana stanicama NK

Iako su povijesno opisane kao dio urođenog imunološkog sustava, ponajviše zbog činjenice da im nedostaju geni za rearanžiranje receptora, nedavni radovi diskutiraju činjenice koje ukazuju na to da i stanice NK imaju obilježja stečene imunosti. Naime osim već navedenih obilježja kojima je istaknuto kako limfociti NK i T dijele zajedničkog progenitora, tijekom razvoja zahtijevaju prisutnost citokina te reagiraju sličnim citolitičkim mehanizmima, činjenica jest da stanice NK kao i limfociti T i B prolaze tijekom razvoja proces selekcije (edukacije) te kao zrele stanice izražavaju neke površinske markere poput citotoksičnih limfocita T (npr. CD122, CD69, Klr1, CD43...). Stoga je bilo za očekivati kako će stanice NK u određenim uvjetima pokazivati i svojstvo memorije.

Koristeći miševe kojima nedostaju stanice T i B, Paust S i kolege pokazali su kako stanice NK igraju ulogu u izazivanju kontaktne hipersenzitivnosti na kemijske haptene [105]. Odgovor na 2-, 4-dinitrofluor-benzen (2-, 4-DNFB) trajao je u ovih miševa duže od četiri tjedna te je bio izazvan samo u slučaju podraživanja miševa haptenom kojem su izvorno bili izloženi. Ista grupa pokazala je sposobnost stanica NK u pamćenju vakcinacije miševa antigenima virusa

influence, vezikularnog stomatitis virusa te virusa humane imunodeficijencije. Zanimljivo je da je NK-posredovana memorija pripisana samo stanicama NK izoliranim iz jetre te da je ovisna o CXCR6, kemokinskom receptoru ispoljenom na membrani ovih stanica. Također, pokazano je kako se memorijski fenotip stanica NK može izazvati i nakon pre-aktivacije citokinima IL-12 i IL-18 nakon čega aktivacija ovih stanica rezultira većim udjelom IFN γ ⁺ NK stanica [106].

Infekcija MCMV-om pokazala se kao uspješan model u istraživanju sposobnosti stanica NK u memoriranju informacije. Na modelu infekcije miševa C57BL/6 MCMV-om Sun J i kolege su pokazali kako prilikom primarnog odgovora na patogen Ly49H⁺ stanice NK ekspandiraju, prolaze fazu kontrakcije, te se zadržavaju kao dugo-živuće stanice koje imaju sposobnost lučenja IFN γ nakon stimulacije antitijelima [107]. Također ove stanice su prilikom adoptivnog prijenosa u miševu kojem nedostaje DAP12 po infekciji reagirale snažnom proliferacijom te su pokazivale protektivni kapacitet prilikom prijenosa u singenične novookoćene miševu koji su potom inficirani.

1.2. Citomegalovirus

1.2.1. Struktura i ispoljavanje gena citomegalovirusa

Citomegalovirus (CMV) pripada obitelji β -herpesvirusa. Iako infekcija citomegalovirusom uglavnom prolazi asimptomatski kod imunokompetentnih domaćina, u slučaju infekcije imunokompromitiranih jedinki, kao i novorođenčadi ili pacijenata nakon transplantacije organa, infekcija može izazvati teška oštećenja pa čak i smrt. Važnost citomegalovirusne infekcije potvrđuje činjenica da je Američki medicinski institut (*USA Institute of Medicine*) proglasio cjepivo za CMV jednim od najvećih prioriteta u 21. stoljeću. Ruta ulaska virusa u domaćina nije u potpunosti razjašnjena. S obzirom da se infektivni virus može detektirati

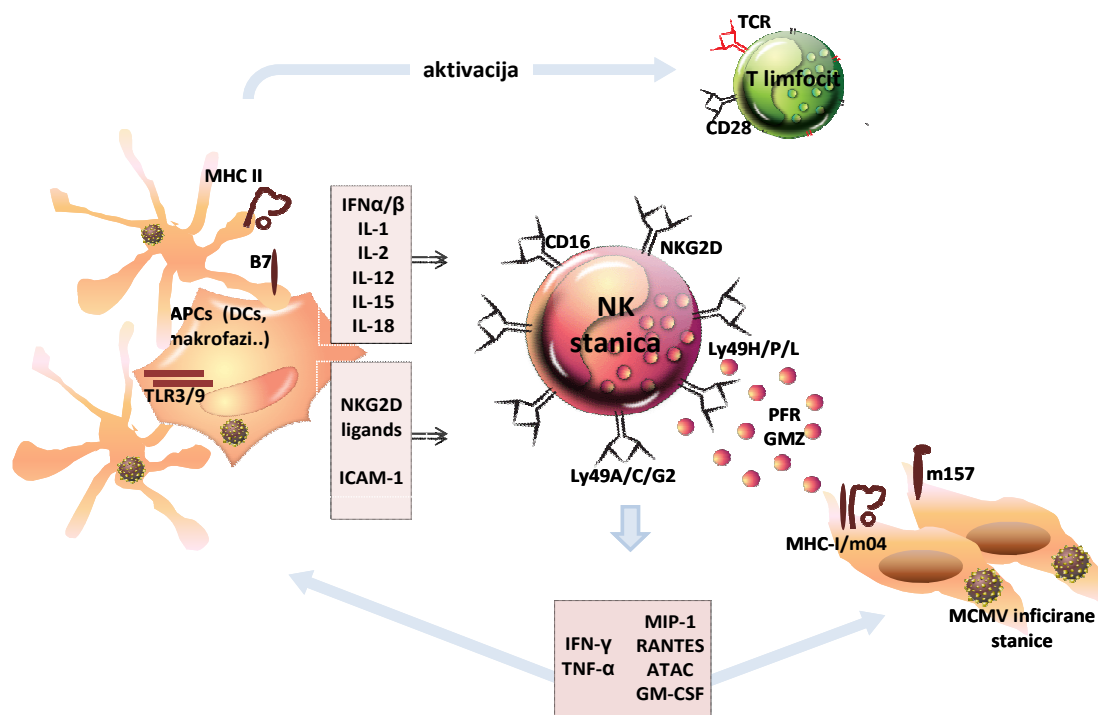
u slini, smatra se da je dominantni horizontalni način širenja upravo putem sline. Također virus se može prenijeti i seksualnim putem, kao i najvjerojatnije kroz epitel gastrointestinalnog trakta. Vertikalni put širenja razlikuje se kod mišjeg i humanog citomegalovirusa, te dok u slučaju humanog virus prolazi placentalnu barijeru, u slučaju mišjeg to se ne događa. Ipak, virusne čestice nađene su u slučaju oba tipa infekcije u kolostrumu te se smatra da taj put infekcije doprinosi vertikalnom širenju virusa. Nakon infekcije virus se širi u hematološke organe te može inficirati različite tipove stanica, poput epitelnih/endotelnih stanica, makrofaga, fibroblasta i stanica strome koštane srži. Put kao i brzina širenja virusa ovisi o ruti infekcije, administriranoj dozi kao i virusnom soju [108]. S obzirom na specifičnost citomegalovirusa za vrstu, te nemogućnost i neetičnost provođenja istraživanja na humanoj populaciji, kao model patogeneze humanog citomegalovirusa najčešće se koristi infekcija miševa mišjim citomegalovirusom [109].

Genom mišjeg citomegalovirusa (MCMV) čini dvostruka molekula DNA veličine 230 kilo baznih parova, a koju čini niz od gotovo 170 gusto upakiranih otvorenih okvira čitanja (eng. *open reading frame* – ORF) koji smatra se rezultiraju sa više od 200 potencijalno antigenih produkata. Geni MCMV-a ispoljavaju se u tri faze, kao izrazito rani (eng. *immediate early* – IE), rani (eng. *early* – E) te kasni (eng. *late* - L) [110]. Izrazito rani geni imaju funkciju transaktivatora ranih gena koji onda pak kodiraju za proteine važne za replikativni ciklus virusa, kao i proteine koji služe izbjegavanju imunološkog odgovora. Kasni geni pak kodiraju za strukturne proteine ovojnice i kapside virusa te su bitni za izlazak virusa iz stanice.

1.2.2. Imunološki nadzor infekcije CMV-om

Infekcija miševa mišjim citomegalovirusom (MCMV) najčešće je korišten model za izučavanje patogeneze i imunobiologije citomegalovirusnih (CMV) infekcija. Unatoč tome što u

dugoročnoj kontroli infekcije MCMV-a ključnu ulogu imaju limfociti T, prirodna imunost važna je za imunološki nadzor unutar prvih nekoliko dana po infekciji. Tijekom ranog razdoblja MCMV-infekcije važnu ulogu u nadzoru replikacije i širenja virusa imaju stanice NK čiji je antivirusni učinak najizraženiji tijekom prvih 3-6 dana po MCMV-infekciji i to izlučenim citolitičnim molekulama (granzimi i perforin) te interferonom- γ (IFN γ) [108].

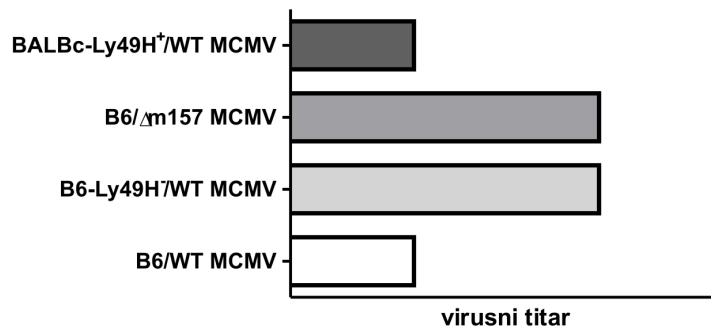


Slika 4. Imunološki nadzor CMV-infekcije. Rani nadzor akutne infekcije vrše stanice NK čija aktivacija je rezultat direktne interakcije sa inficiranim stanicama ili je posredovana citokinima koje luče antigen prezentirajuće stanice. Interakcija između stanica NK i dendritičkih stanica uvjetuje razvoj kasnije dominantnog odgovora posredovanog limfocitima CD8 T.

1.2.2.1. Uloga stanica NK u nadzoru infekcije

Ovisno o njihovoj osjetljivosti tijekom ranog perioda po infekciji citomegalovirusom, konvencionalni mišji sojevi mogu se podijeliti u MCMV-osjetljive i MCMV-rezistentne. Rezistencija korelira sa sposobnošću tih miševa da razviju dobar NK-stanični odgovor. Pionirski

primjer mišjeg soja rezistentnog na infekciju MCMV-om je mišji soj C57BL/6 (B6) u kojem je pokazano da je rezistencija posredovana genskim lokusom *Cmv1* smještenim unutar kompleksa NKC (prema eng. *Natural Killer Complex*) na kromosomu 6 [111]. Ovi miševi u ovisnosti o stanicama NK uspješno kontroliraju ranu virusnu replikaciju u organima. Nedugo nakon identifikacije lokusa *Cmv1* pokazano je kako je gen *Ly49h*, a koji kodira za NK-stanični aktivacijski receptor Ly49H, odgovoran za rezistenciju [112]. Koristeći se *in vitro* modelom temeljenom na reporterskim stanicama, Arase H i suradnici pokazali su kako receptor Ly49H prepoznaje produkt gena MCMV-a, protein m157 [113-115]. m157 je protein, rano ispoljen na inficiranim stanicama, a čija struktura odgovara molekuli sličnoj molekulama MHC I. Interakcija između m157 i Ly49H rezultira citolitičnom aktivnošću stanica NK, tj. lučenjem citolitičnih molekula perforina i granzima, što dovodi do eliminacije inficiranih stanica. Važnost ove interakcije potvrđena je od strane nekoliko istraživačkih grupa. Naime delecija gena *Ly49h* iz miševa C57BL/6 ili infekcija istih miševa mutantom MCMV-a kojoj nedostaje gen *m157* ($\Delta m157$) učinila je ove miševe osjetljivima na infekciju [116, 117]. Suprotno tome, umetanje gena za Ly49H u genom miševa BALB/c, inače osjetljivih na MCMV infekciju, učinila je ove miševe rezistentnima [118].



Slika 5. Shematski prikaz kontrole virusnog titra *in vivo* posredovane interakcijom Ly49H i m157. Miševi soja B6 (prirodno ispoljavaju Ly49H) kao i miševi BALB/c kojima je ubačen gen za Ly49H (BALBc-Ly49H⁺) uspijevaju kontrolirati infekciju WT MCMV-om 4 dana po infekciji. Za razliku od njih miševi B6 koji su deficitarni za Ly49H (B6-Ly49H⁻) ne uspijevaju kontrolirati virusni titar baš kao ni B6 miševi inficirani mutantom deficitarnom za m157 ($\Delta m157$).

S obzirom da je pokazano kako m157 istovremeno služi kao ligand za inhibicijski receptor Ly49I, ispoljen u miševa 129/J, smatra se kako je njegova inicijalna uloga zapravo bila inhibiranje NK-staničnog odgovora te kako je nastanak aktivacijskog receptora za isti ligand zapravo evolucijski odgovor domaćina na virusnu infekciju. Važnost selekcijskog tlaka u formiranju interakcija između virusnih proteina i staničnih receptora pokazana je i činjenicom da mnogi izolati divljeg tipa MCMV-a kodiraju mutiranu varijantu proteina m157, koji se uvelike razlikuje po svojim karakteristikama vezanja za aktivacijski receptor Ly49H te inhibicijske receptore Ly49I i Ly49C [119]. Pritom je pokazano kako virusi koji kodiraju mutirani protein m157 izbjegavaju imunološki odgovor posredovan stanicama NK te mogu neometano replicirati u miševima C57BL/6.

Dodatni primjer miševa koji su rezistentni na infekciju MCMV-om, unatoč činjenici da ne ispoljavaju gore spomenuti Ly49H, je mišji soj MA/My. U tih miševa rezistencija na MCMV posredovana je genskim lokusom nazvanim *Cmv3*, a za koji je pokazano kako kodira NK-stanični aktivacijski receptor Ly49P [120]. Receptor Ly49P posreduje rezistenciju

prepoznavanjem kompleksa ispoljenog na površini inficiranih stanica, a koji se sastoji od molekule MHC I, H-2D^k, te virusnog produkta. Treći primjer miševa rezistentnih na MCMV su PWK/Pas miševi kod kojih je rezistencija posredovana lokusom *Cmv4* [121]. Mehanizam rezistencije u ovih miševa do danas nije razjašnjen.

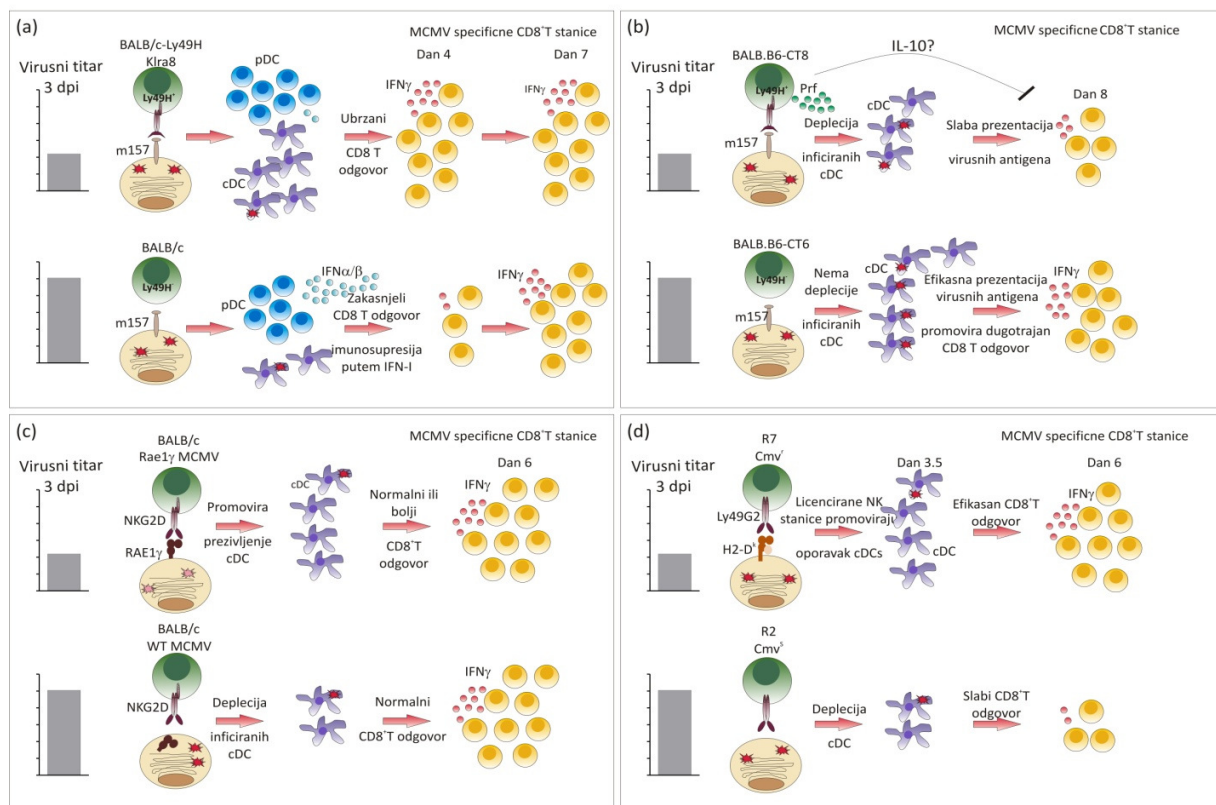
Ovih nekoliko navedenih sojeva, u pravilu čine iznimku, s obzirom da većina konvencionalnih mišjih sojeva ipak ne uspijeva razviti dobar rani imunološki nadzor nad širenjem infekcije MCMV-om. Smatra se da je to zbog činjenice što je ovaj virus tijekom dugogodišnje ko-evolucije sa domaćinom razvio brojne mehanizme kojima izbjegava imunološki odgovor o čemu će biti više govora dalje u tekstu.

1.2.2.1. Uloga limfocita T u nadzoru infekcije

Unatoč činjenici da neki mišji sojevi posjeduju dobar NK-stanični odgovor tijekom rane infekcije MCMV-om, zapravo je razvoj odgovora posredovanog limfocitima T onaj koji je odgovoran za rezoluciju produktivne infekcije te ulazak virusa u latenciju. Uloga limfocita T tijekom citomegalovirusne infekcije pokazana je u modelima adoptivnog prijenosa ovih stanica izoliranih iz akutno ili latentno inficiranih životinja u ozračene životinje koje su potom inficirane MCMV-om. Prijenos limfocita T, pokazalo se, smanjuje replikaciju virusa u organima te mortalitet životinja. Ova funkcija pripisana je klonovima CD8⁺ T limfocita specifičnima za antigene MCMV-a [108, 122-124].

Oblikovanje CD8⁺ T-limfocitnog odgovora, dominantnog tijekom kasnije faze odgovora na infekciju MCMV-om, uvelike ovisi o jačini inicijalnog NK-staničnog odgovora. Ovo pitanje istraživano je na nekoliko različitih modela, te iako svi sugeriraju kako taj odnos posreduju dendritičke stanice, do sad nijedan od njih nije dao kompletan uvid u mehanizam interakcije

među stanicama. Interakcija između stanica NK i dendritičkih stanica može rezultirati pojačanom proliferacijom i citotoksičnim kapacitetom stanica NK, prezerviranjem broja konvencionalnih dendritičkih stanica nakon virusne infekcije te stimulacijom dendritičkih stanica u njihovoj funkciji antigenske prezentacije i lučenja citokina. Prvi model, pokazan od strane Robbinsa SH i suradnika, temelji se na interakciji m157 i Ly49H, gdje pokazuje kako snažan NK-stanični odgovor posredovan ovom interakcijom ubrzava odgovor posredovan CD8⁺ limfocitima T. Tu pojavu objašnjava limitiranim lučenjem tip I interferona (IFN α/β) od strane plazmacitoidnih dendritičkih stanica (pDC), a koji djeluju imunosupresivno na imunološke stanice [125]. Ovi rezultati dodatno su istraženi pomoću miševa sa selektivnom deplecijom pDC koji su pokazali kako deplecija ove stanične subpopulacije ne utječe na kasniji MCMV-specifični limfocitni odgovor [126]. U radu Andrews D i suradnika, na modelu koji se također temelji na interakciji m157 i Ly49H, pokazani su donekle kontradiktorni rezultati koji govore kako snažan početni odgovor na infekciju limitira kasniji antivirusni CD8-posredovani odgovor [127]. Autori ovu pojavu objašnjavaju eliminacijom inficiranih dendritičkih stanica te posljedično slabijom antigenskom prezentacijom. Stadnisky M i suradnici istu su pojavu istražili na modelu miševa kod kojih snažan rani odgovor posredovan licenciranim Ly49G2⁺ stanicama NK utječe na brži oporavak frekvencije inficiranih konvencionalnih dendritičkih stanica te posljedično tome ne kompromitira CD8 T-posredovani odgovor [128]. Ovaj rezultat potvrđen je i u radu naše grupe koji se temelji na drugačijem modelu. Naime, korištenjem genetički modificirane varijante MCMV-a, koji ispoljava Rae1- γ , ligand za aktivacijski receptor NKG2D, te je snažno atenuiran u BALB/c miševa, pokazano je kako snažan inicijalni odgovor ne utječe na kvalitetu kasnije dominantnog CD8 T-limfocitnog odgovora [129].



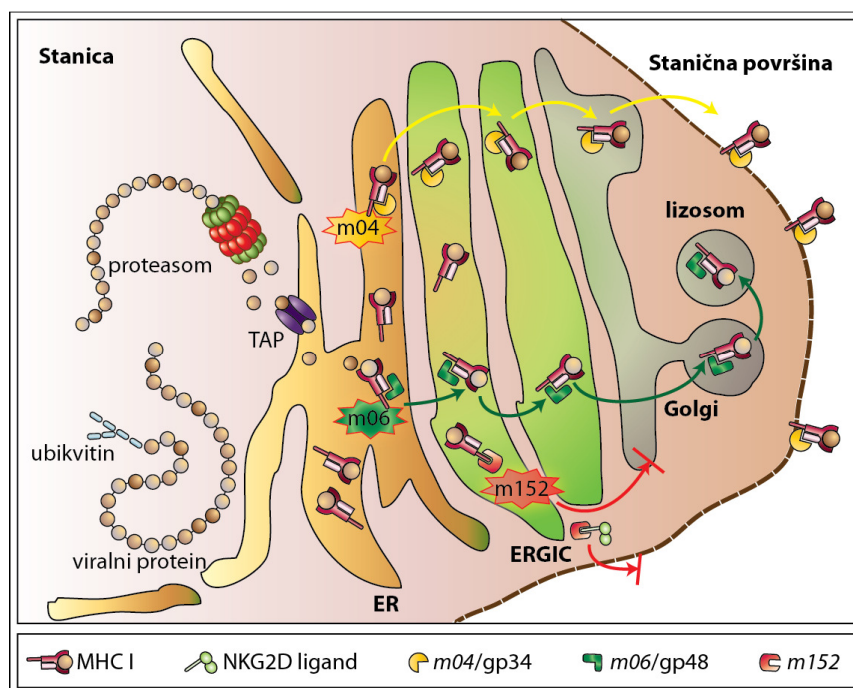
Slika 6. Shematski prikaz modela korištenih u izučavanju utjecaja snažnog NK-staničnog odgovora na razvoj specifičnog CD8 T-limfocitnog odgovora. (a) U modelu Robbinsa i sur. slabi NK-stanični odgovor rezultira zakašnjelim i slabijim MCMV-specifičnim CD8 T-limfocitnim odgovorom, najvjerojatnije zbog imunosupresivnog djelovanja IFN α izlučenog od strane pDC. (b) Slabi NK-stanični odgovor rezultira efikasnijim i dugotrajnijim MCMV-specifičnim CD8 T-limfocitnim odgovorom, vjerojatnog zbog izostanka deplecije cDC i očuvane antigenske prezentacije. (c) Snažni NK-stanični odgovor u slučaju infekcije sa RAE1 γ -MCMV ne utječe na kvalitetu MCMV-specifičnog CD8 T-limfocitnog odgovora, najvjerojatnije zbog preživljenja cDC i efikasne antigenske prezentacije. (d) Licencirane stanice NK promoviraju oporavak cDC nakon MCMV-infekcije i omogućuju efikasan MCMV-specifični CD8 T-limfocitni odgovor.

1.2.3. Citomegalovirusni mehanizmi za izbjegavanje imunološkog nadzora posredovanog stanicama NK

1.2.3.1. Regulacija ispoljavanja molekula MHC razreda I

Mnogi virusi kodiraju proteine koji kompromitiraju ispoljavanje molekula MHC I; na taj način smanjuju prezentaciju antigena putem molekula MHC I te izbjegavaju imunološki odgovor

putem CD8⁺ limfocita T. Smanjeno ispoljavanje molekula MHC I na površini ciljnih stanica dovodi pak do smanjenog signala putem inhibicijskih receptora stanica NK što bi prema teoriji trebalo rezultirati aktivacijom stanica NK putem „missing self“ mehanizma, ali se to zapravo ne događa. Iz literature je poznato da MCMV ispoljava tri proteina koji reguliraju ispoljavanje molekula MHC I na površini inficirane stanice. Glikoprotein m152/gp40 zaustavlja transport molekula MHC I na razini ERGIC/*cis*-Golgi staničnog odjeljka [130], dok gp48 kodiran *m06* genom usmjerava molekule MHC I prema lizosomima gdje su one podvrgnute razgradnji [131]. Smatra se da *m06* posreduje svoju funkciju dileucinskim citoplazmatskim motivom koji je odgovoran za sortiranje u lizosome. Treći regulator je glikoprotein gp34, kodiran genom *m04*, a za koji je poznato da ne sprečava ispoljavanje molekula MHC I, već naprotiv, da u endoplazmatskom retikulumu stupa u interakciju s njima te biva zajedno s njima ispoljen na staničnoj površini [132]. Priroda interakcije između molekula MHC I i *m04* nije u potpunosti razjašnjena te je pokazano kako *m04*, koji je transmembranski protein tipa I, svojom transmembranskom regijom stupa u vezu sa molekulama MHC I [133]. Također pokazano je kako *m04* u endoplazmatskom retikulumu preferencijalno veže pravilno svijene molekule MHC I na koje je vezan peptid. Fiziološka uloga *m04* nije potpuno jasna. Poznato je da njegova funkcija u regulaciji ispoljavanja molekula MHC I antagonizira funkciju utišavanja posredovanu proteinom m152. Međutim, istovremeno, pokazano je kako *m04* ima ulogu u izbjegavanju CD8 T-limfocitnog odgovora s obzirom da kompleks *m04*/MHC I kompromitira prepoznavanje od strane citotoksičnih limfocita T. Smatra se kako je tome uzrok promjena konformacije molekula MHC I posredovana vezanjem *m04* [134-136]. Predložena uloga *m04*/MHC I kompleksa je inhibiranje NK-staničnog odgovora. Do sada ova hipoteza nije potvrđena te je predmet istraživanja ovog rada.



Slika 7. Shematski prikaz regulacije ispoljavanja molekula MHC I tijekom infekcije MCMV-om. MCMV proteini m152 i m06 različitim mehanizmima negativno reguliraju ispoljavanje molekula MHC I na staničnoj površini. m152 uzrokuje zadržavanje ovih molekula u endoplazmatskoj mrežici dok m06 posreduje njihovo sortiranje i degradaciju u lizosomima. m04, pak, veže MHC I u endoplazmatskoj mrežici te pomaže njihovo ispoljavanje na staničnoj površini.

Funkcionalni homolozi dvaju negativnih regulatora ispoljavanja MHC I molekula karakterizirani su i u slučaju humanog citomegalovirusa. US6 protein inhibira funkciju TAP-a (prema eng. *Transporter associated with Antigen Processing* –TAP) na način da vezanjem uzrokuje konformacijske promjene u molekuli TAP-a čime se inhibira vezanje ATP-a i hidroliza istog te posljedično kompromitira transport peptida u lumen endoplazmatske mrežice [137, 138]. US3 inhibira funkciju tapasina čime se sprečava pravilno punjenje i svijanje molekula MHC I [139, 140]. Usprkos tome dio MHC I molekula ipak stiže na staničnu površinu što upućuje na činjenicu da pravilno svijanje molekula MHC I nije isključivo ovisno o tapasinu [141]. US2 i US11 se vežu direktno na teški lanac molekula MHC I te usmjeravaju ove molekule u

degradaciju asociranu sa endoplazmatskom mrežicom (eng. *ER associated degradation* – ERAD) [142, 143]. Iako rezultiraju istim, pritom se koriste različitim mehanizmima [144].

1.2.3.2. Ispoljavanje virusnih homologa molekula MHC razreda I

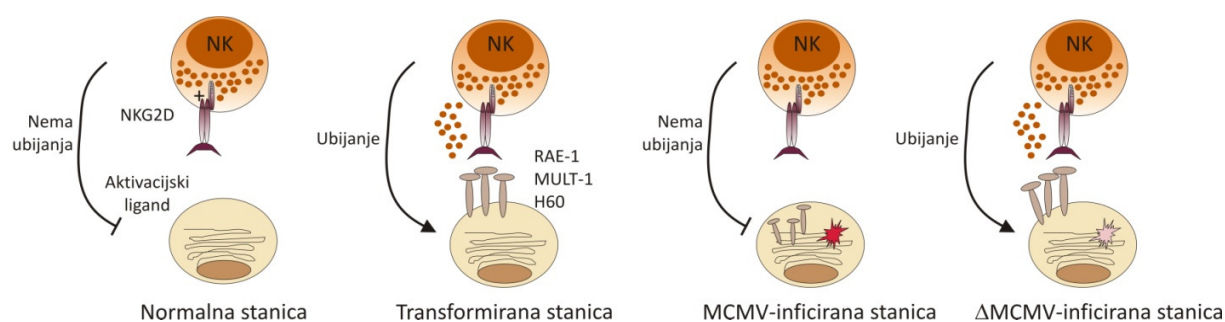
Mišji citomegalovirus ispoljava niz proteina koji su strukturno slični molekulama MHC I. To su npr. m144, m145, m152, m153, m157 [145]. Za neke od njih nije poznata njihova fiziološka uloga ali se smatra da na neki način, najvjerojatnije vezanjem receptora na stanicama NK, doprinose virusnim mehanizmima izbjegavanja imunološkog odgovora. Najviše je istraživana uloga UL18, kodiranog u genomu HCMV-a, za koji je pokazano kako veže inhibitorni receptor LIR-1 ispoljen na maloj subpopulaciji NK stanica [146]. S vremenom je pokazano kako UL18 može izazvati i aktivaciju NK stanica, do sada nepoznatim, ali LIR-1-neovisnim, mehanizmom [147].

Iako ne klasičnim putem, štakorski citomegalovirus (eng. *rat cytomegalovirus* - rCMV) također posjeduje mehanizam izbjegavanja prepoznavanja inficiranih stanica posredovanog „missing self“-om. Naime, smatra se da osovina Nkrp1-Ocil/Clr-b predstavlja alternativni mehanizam raspoznavanja vlastitih od stranih stanica. Pokazano je kako tijekom infekcije stanica sa rCMV-om dolazi do utišanog ispoljavanja endogenih Ocil/Clr-b molekula. Iako bi to trebalo dovesti do prepoznavanja i lize inficiranih stanica to se ne događa. Naime, virus ispoljava molekulu, nazvanu RCTL (prema eng. *RCMV C-type lectin-like*), koja je homolog staničnih Ocil/Clr-b, te koja se veže na receptor Nkrp1 te inhibira funkciju stanica NK [148]. Do sada nisu definirani mehanizmi ni molekule odgovorne za smanjeno ispoljavanje endogenih liganada Ocil/Clr-b.

1.2.3.3. Regulacija ispoljavanja liganada za aktivacijski receptor NKG2D

Čak i tijekom normalne razine ispoljenosti molekula MHC I, vezanje liganada na aktivacijski receptor NKG2D može dovesti do aktivacije stanica NK. Ligandi za ovaj aktivacijski receptor nisu ispoljeni u uvjetima homeostaze, već isključivo na tumorskim stanicama ili virusom inficiranim stanicama. Stoga ne čudi činjenica da je citomegalovirus posvetio mnoge od svojih gena upravo reduciranju ispoljenosti liganada za ovaj receptor te se smatra da je upravo to razlog činjenici da većina konvencionalnih laboratorijskih mišjih sojeva ne uspijeva razviti efikasan rani imunološki nadzor nad infekcijom. Naša i druge grupe pokazale su ulogu 4 proteina MCMV-a (m138, m152, m155, m145) u izbjegavanju imunološkog nadzora putem aktivacijskog receptora NKG2D. Naime, svi do danas poznati ligandi za receptor NKG2D u miša: RAE-1 obitelj, H60 i MULT-1, podložni su negativnoj regulaciji od strane MCMV-a. Mehanizmi djelovanja virusnih proteina na ligande za NKG2D nisu u potpunosti razjašnjeni. Protein m152 negativno regulira ispoljavanje molekula obitelji RAE-1, i to smatra se mehanizmom sličnim regulaciji ispoljavanja molekula MHC I [73, 149]. Međutim, molekule RAE-1 obitelji pokazuju različitu osjetljivost na regulaciju od strane m152. I dok su RAE-1 α , β , i γ u potpunosti osjetljive na regulaciju, molekule RAE-1 δ i ϵ pokazuju rezistenciju na djelovanje m152 [150]. Smatra se da je osjetljivost na djelovanje m152 determinirana citoplazmatskim PLWY motivom prisutnim u RAE-1 α , β , i γ izoformama, odsutnim u RAE-1 δ , te mutiranim u RAE-1 ϵ . Iako je pokazano da afinitet vezanja m152 na RAE-1 β ovisi o PLWY motivu, činjenica da delecija istog motiva iz RAE-1 γ ili insercija u RAE-1 δ ne mijenja afinitet vezanja m152 za ove molekule sugerira na postojanje drugih odrednica u interakciji između ovih proteina [151]. m152 također regulira ispoljavanje RAE-1 ϵ , međutim isključivo na sortirajućem putu prema staničnoj površini. Uklanjanje frakcije ovog proteina sa stanične površine vrši drugi virusni protein, m138 [152]. m138, osim RAE-1 ϵ ,

negativno regulira ispoljavanje i drugih molekula, poput MULT-1, H60 te B7.1 [153, 154]. Razina ispoljenosti MULT-1 i H60 regulirana je i od strane dvaju dodatnih MCMV proteina: m145 i m155 i to reguliranjem njihovog vezikularnog sortiranja na putu prema staničnoj površini. Studije pokazuju kako m155 regulira H60 po njegovom izlasku iz ERGIC/*cis*-Golgi odjeljka i to najvjerojatnije usmjeravajući ga na razgradnju u lizosomima [155-157]. Uloga ovih imunoevazivnih gena MCMV-a potvrđena je i *in vivo*, s obzirom da je infekcija miševa mutantama kojima nedostaju individualno ovi geni rezultirala efikasnom kontrolom njihove replikacije u organima, u ovisnosti o prisustvu stanica NK.



Slika 8. Uloga receptora NKG2D u kontroli citomegalovirusne infekcije. Normalna stanica ne ispoljava ligande za NKG2D, za razliku od transformirane stanice koja ispoljava RAE1, MULT1 i H60. U slučaju infekcije stanica MCMV kodira nekoliko proteina koji uzrokuju negativnu regulaciju ispoljavanja liganada za aktivacijski receptor NKG2D i na taj način sprečava aktivaciju stanica NK i ubijanje virusom inficiranih stanica. Korištenjem virusnih mutanti deficijentnih za pojedine gene karakterizirani su mehanizmi regulacije ispoljavanja NKG2D liganada.

Slična je situacija i sa humanim citomegalovirusom, koji uz proteine kodira i koristi i molekule miRNA (eng. *micro RNA*) kako bi izazvao degradaciju i spriječio ispoljavanje liganada za humani receptor NKG2D. Naime, pokazano je kako se miR-UL112 veže na 3' netranslatirajuću regiju transkripta za protein MICB (engl. *MHC class I chain-related gene B*) čime posreduje degradaciju transkripta i inhibiciju ispoljavanja ovog liganda [158]. Zanimljivo je

da isto vezno mjesto koristi i stanična miRNA, vjerojatno kako bi regulirala razinu ispoljavanja ovog proteina u normalnim staničnim uvjetima [159]. Protein MICB podložan je razgradnji posredovanoj miRNA i u slučaju infekcije drugim humanim herpesvirusima, poput virusa Epstein Barr te virusa uzročnika Kapošijevog sarkoma [160]. MICB, kao i ULBP-1 i -2 podložni su i djelovanju HCMV-kodiranog proteina UL16 [161-164]. Ni MICA nije pošteđena proteinima posredovanog imunosubverzivnog djelovanja HCMV-a. Naime, UL142 negativno regulira razinu ispoljavanja ovog liganda [165]. Zanimljivo je kako se MICA u humanoj populaciji javlja i u trunkiranoj formi [166], koja u odnosu na cijelu formu nije podložna djelovanju proteina UL142 [167].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Dosadašnjim istraživanjima uloge stanica NK u nadzoru citomegalovirusne infekcije u konvencionalnim laboratorijskim mišjim sojevima nedovoljno je razjašnjeno zbog čega većina ovih mišjih sojeva ne uspijeva uspostaviti rani nadzor nad citomegalovirusno infekcijom. Naime, rana citomegalovirusna infekcija rezultira smanjenjem broja molekula MHC razreda I ispoljenih na staničnoj površini. Smatra se kako se virus koristi ovim mehanizmom kako bi smanjio razinu antigenske prezentacije i izbjegao imunološki odgovor posredovan citotoksičnim CD8 T limfocitima. Međutim, takva bi situacija trebala rezultirati brzim odgovorom od strane stanica NK koje smanjenje razine ispoljenosti molekula MHC razreda I detektiraju kao nedostatak vlastitog („missing self“) što se u većini slučajeva ipak ne događa. Dosadašnje radovi pokazali su da jedan od virusnih proteina, m04/gp34, veže molekule MHC razreda I te ih dovodi na staničnu površinu gdje se pretpostavljalo da služe inhibiciji stanica NK.

Naša je hipoteza da m04 u kompleksu sa MHC I molekulama služi kao ligand za NK-stanični inhibicijski receptor Ly49 te na taj način negativno regulira imunološki odgovor posredovan prepoznavanjem nedostatka vlastitog od strane stanica NK.

Cilj ovog istraživanja je ispitati mehanizam virusnog izmicanja NK-staničnoj kontroli putem „missing self“-a te objasniti način kojim m04 negativno regulira aktivnost stanica NK, a zbog kojeg većina laboratorijskih miševa ne uspijeva kontrolirati MCMV. Također ćemo karakterizirati mutantu deficijentnu za gen *m04* ($\Delta m04$) u mišjih sojeva osjetljivih i rezistentnih na MCMV. Potom ćemo ispitati ulogu m04 proteina u kontekstu dva negativna citomegalovirusna regulatora ispoljavanja molekula MHC I (m06 i m152). Potom, ispitati ćemo ulogu m04/gp34 u prepoznavanju inficiranih stanica od strane aktivacijskih receptora Ly49 i

identificirati dodatne virusne komponente koje sudjeluju u ovom prepoznavanju te utjecaj te interakcije na kontrolu virusne infekcije *in vivo*. Naposljetku, ispitati ćemo utjecaj inicijalnog NK-staničnog odgovora na oblikovanje kasnije dominantnog odgovora posredovanog CD8 T limfocitima.

Eksperimentalni dio ovog istraživanja obuhvaća tehnologiju izrade rekombinantnih virusnih mutanti, izradu reporterskih stanica koje ispoljavaju inhibicijski receptor Ly49 te uspostavu testa za praćenje interakcije reporterskih stanica i stanica inficiranih MCMV-om, ispitivanje uloge stanica NK i njihovih subpopulacija u kontroli virusnog titra te fenotipsku i funkcionalnu analizu stanica NK, dendritičkih stanica i stanica CD8 T izoliranih iz inficiranih miševa.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. LB medij za uzgoj bakterija

10 g tripton, 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl, 1 mL 1M NaOH, 15 g agara (za 1 L medija). Sastojci se otope u destiliranoj vodi do ukupnog volumena 800 mL, provjeri se i podesi pH na 7,0 (dodatkom 5 μ l 10M NaOH ili 125 μ l 4M NaOH), te se radi otapanja agara ostavi u Kochovu loncu na 100°C. Medij se autoklavira 15' na 121°C ili 20' na 120°C. U medij ohlađen na 50°C u vodenoj kupelji tijekom 1,5 h se doda antibiotik (npr. ampicilin 50 μ g/mL). Razlije se u Petrijeve posudice i čuva na +4°C.

3.1.2. Mediji za uzgoj stanica

Dulbeccov modificirani minimalni esencijalni medij (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Serum-DMEM*)

Medij DMEM, 3-10% fetalni teleći serum (FCS), 10mM HEPES (pH 7.2), 2 mM L-glutamin, 10⁵ U/L Penicilin, 0.1 g/L Streptomycin

Kompletni RPMI medij

RPMI 1640 medij, , 10 % fetalni teleći serum (FCS), 10mM HEPES (pH 7.2), 2 mM L-glutamin, 10⁵ U/L Penicilin, 0.1 g/L Streptomycin, 5x10⁻⁵ M 2-merkaptoetanol

Medij za smrzavanje stanica

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

Medij za protočnu citometriju (FACS medij)

PBS, 1% goveđeg serumskog albumina (BSA), 0.1% NaN₃

Metil-celulozni medij

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

3.1.3. Otopine i puferi

Fosfatima puferirana fiziološka otopina (10x PBS pufer), pH 7.2

140 mM natrij klorid (NaCl), 2.7 mM kalij klorid (KCl), 6.5 mM natrij hidrogenfosfat-2-hidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), 1.5 mM kalij dihidrogenposfat (KH_2PO_4), 0.7 mM kalcij klorid (CaCl_2), 0.7 mM magnezij klorid-6-hidrat ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)

10x pufer za lizu eritrocita (10x Lysing solution)

140 mM amonij klorid (NH_4Cl), 2.7 mM kalij klorid (KCl), 1.5 mM kalij dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), 6.5 mM natrij hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), 0.7 mM magnezij klorid (MgCl_2), 0.7 mM kalcij klorid (CaCl_2)

15% sukroza u VSB puferu

VBS pufer pH 7,8, 50 mM Tris klorovodična kiselina (TRIS-HCl), 12 mM kalij klorid (KCl), 5 mM natrij EDTA (Na_2EDTA)

Otopina za resuspendiranje (Otopina 1)

50 mM glukoza, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0

Alkalna otopina (Otopina 2)

0,2 M NaOH, 1% SDS

Neutralizacijska otopina (Otopina 3)

3M NaOAc, podesiti pH na 4,8 dodatkom octene kiseline

10x TE pufer (Tris/EDTA)

100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)

50x TAE pufer (Tris-acetatni pufer)

57,1 mL glacialne octene kiseline, 242 g Tris baze, 100 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0), dopuniti do 1L redestiliranom vodom

10x TBE pufer (Tris-boratni pufer)

108 g Tris baze, 55 g borne kiseline, 40 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0), dopuniti do 1 L destiliranom vodom

Pufer za biotinizaciju

10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$, 5 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , pH podešen na 8.8

Otopina za zaustavljanje biotinizacije

50 mM NH_4Cl u PBS-u

Otopina za liziranje stanica

50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 2 mM PMSF

Otopina B

2.19 g NaCl, 1.25 mL 2M Tris pH 7.6, 1 mL 0.5M EDTA pH 8.0, 0.5 mL NP40, dopuniti do 250 mL sa sa destiliranom vodom

Otopina C

7.3 g NaCl, 1.25 mL 2M Tris pH 7.6, 1 mL 0.5M EDTA pH 8.0, dopuniti do 250 mL sa sa destiliranom vodom

Otopina D

1.25 mL 2M Tris pH 7.6, dopuniti do 250 mL sa sa destiliranom vodom

2X pufer za nanošenje uzoraka na gel

1.2 mL 0.5M Tris pH 6.8, 1.9 mL glicerol, 2.0 mL 10% SDS, 0.5 mL 2-merkaptoetanol, 1 mL 1% bromofenolnog modrila, dopuniti do 16 mL sa destiliranom vodom

10X Laemli pufer za SDS-PAGE elektroforezu

0.25 M Tris, 1.92 M Glycine, 1 % SDS, pH 8.3

1X pufer za transfer proteina

20 mM Tris, 150 mM Glycine, 10-20% methanol, 0.005% SDS

1X pufer TBS-T za ispiranje membrana

20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20

3.1.4. Monoklonska protutijela i poliklonski serumi

Štakorski FITC-, PE-, APC- anti-mišji CD335 (NKp46) (klon 29A1.4), IgG2a, eBioscience

Štakorski biotinom obilježeni anti mišji CD49b (klon DX5), IgM, eBioscience

Štakorski FITC-, PE Cy7- anti mišji CD11b (klon M1/70), IgG2b, eBioscience

Armenijski zamorac PE-, PE Cy7- anti mišji CD27 (LG.7F9), IgG, eBioscience

Armenijski zamorac FITC-, PE Cy7- anti mišji CD69 (H1.2F3), IgG, eBioscience

Zlatni sirijski zamorac biotinom obilježeni anti mišji KLRG1 (2F1), IgG, eBioscience

Štakorski FITC-, PerCP Cy5.5- anti mišji Ly49G2 (klon 4D11), IgG2a, eBioscience

Zlatni sirijski zamorac FITC-, PE- anti mišji Ly49C/I/F/H (klon 14B11), IgG, eBioscience

Štakorski PerCP Cy5.5- anti mišji CD19 (klon 1D3), IgG2a, eBioscience

Štakorski PerCP Cy5.5- anti mišji CD3 (klon 17A2), IgG2b, eBioscience

Štakorski APC- anti mišji CD8 α , IgG2a, eBioscience

Štakorski PerCP Cy5.5- anti mišji CD197 (CCR7) (klon 4B12), IgG2a, eBioscience

Štakorski PE- anti mišji CD127 (IL-7R) (klon A7R34), IgG2a, eBioscience

Štakorski FITC- anti mišji CD43 (klon eBioR2/60), IgM, eBioscience

Štakorski APC eFluor 780- anti mišji CD44 (klon IM7), IgG2b, eBioscience

Štakorski PE Cy7- anti mišji CD62L (MEL-14), IgG2a, eBioscience

Armenijski zamorac APC-, PE- anti mišji CD11c (klon N418), IgG, eBioscience

Štakorski APC- anti mišji MHC-II (klon M5/114.15.2), IgG2b, eBioscience

Štakorski PerCP Cy5.5- anti mišji CD45R (B220) (klon RA3-6B2), IgG_a, eBioscience

Štakorski PE- anti mišji CD317 (PDCA-1) (klon 129c), IgG2b, eBioscience

Štakorski FITC-, PE- anti mišji IFN γ (klon XMG.1) IgG1, eBioscience

FITC-, PE-, PE Cy7-, APC eFluor 780- streptavidin, eBioscience

Štakorski anti mišji IgG1-FITC ili -PE (BD Pharmingen)

Kunićji α -asialo GM1, WAKO Chemicals

Mišji anti mišji NKR-P1A (NK1.1/PK136), supernatant hibridoma

Mišji anti mišji Ly49P/A (klon JR9.318), dobiven ljubaznošću Dr. W. Held-a

Mišji anti mišji Ly49C/I (klon 5E6) dobiven ljubaznošću Dr. W. Held-a

Štakorski anti mišji Ly49G2 (klon 4D11) dobiven ljubaznošću Dr. W. Held-a

Štakorski anti mišji Ly49A/L (klon YE1/48), dobiven ljubaznošću Dr. L. L. Lanier-a

Armenijski zamorac neobilježeni anti mišji NKG2D (blokirajući klon C7), dobiven ljubaznošću Dr. W. Yokoyama-e

Mišje anti H-2L^d (klon 28-14-8S), IgG2a, supernatant hibridoma

Mišje anti H-2D^d (klon 34-5-8S), IgG2a, supernatant hibridoma

Mišje anti H-2K^d (klon SF-1.1.1.), IgG2a, supernatant hibridoma

Mišje anti H-2D^k (klon 15-5-5s), IgG2a, supernatant hibridoma

Kozje α -štakorsko IgG-PE (BD Pharmingen)

Kozje α -mišje IgG-PE (BD Pharmingen)

Tetramer NKG2D-PE (dobiven ljubaznošću D. H. Buscha)

3.1.5. Stanične linije

Mišji embrionalni fibroblasti (MEF)

U eksperimentima smo koristili mišje embrionalne fibroblaste (MEF) koje smo izolirali iz različitih sojeva miševa prema standardnom protokolu. Korišten je MEF izoliran iz mišjih sojeva BALB/c, BALB.K, CBA/J i C57BL/6. Svi navedeni sojevi MEF-a korišteni su u testu ko-kultivacije sa reporterskim stanicama. Analizirano je ispoljavanje molekula MHC razreda I na MEF-u izoliranom iz miševa BALB.K. BALB/c MEF korišten je u pokusima određivanja virusnog titra u organima inficiranih životinja.

SV40-transformirane endotelne stanice (SVEC4-10), ATCC CRL-2181

SVEC4-10 je stanična linija dobivena transformacijom endotelnih stanica dobivenih iz miševa C3H/J putem SV40 virusa. Izražava molekule haplotipa H-2^k. Kultiviraju se kao adherentne stanice u 10% DMEM-u.

SV40-transformirani BALB/c MEF (B12)

B12 je stanična linija dobivena transformacijom mišjih embrionalnih fibroblasta porijeklom iz miševa BALB/c putem SV40 virusa. Izražava molekule haplotipa H-2^d. Kultiviraju se kao adherentne stanice u 10% DMEM-u.

SV40-transformirani BALB.K MEF (MEF.K)

MEF.K je stanična linija dobivena imortalizacijom mišjih embrionalnih fibroblasta porijeklom iz miševa BALB.K putem velikog antigena T polio virusa. Izražava molekule haplotipa H-2^k. Kultiviraju se kao adherentne stanice u 10% DMEM-u.

MEF.K-m04/V5

MEF.K-m04/V5 je stanična linija dobivena tranzijentnom transfekcijom MEF.K stanične linije sa pMx-puro plazmidom koji nosi m04 gen fuzioniran sa V5 biljegom. Kultiviraju se kao adherentne stanice u 10% DMEM-u, a selekcioniraju povremenim provjeravanjem razine izražaja m04 proteina i V5 biljega protočnom citometrijom. Dobiven je u sklopu suradnje sa Dr. Silviom M. Vidal.

RAW 264.7

RAW 264.7 je adherentna stanična linija dobivena transformacijom normalnih BALB/c peritonealnih makrofaga sa SV40. Kultiviraju se u 10% RPMI mediju, a dižu se sa plastične podloge inkubacijom u 50mM EDTA/PBS otopini tijekom 5-10' na 37°C, 5% CO₂, nakon čega se laganim ispiranjem u potpunosti odlijepe sa podloge.

Ly49 NFAT-GFP 2B4-T stanični hibridom

Ly49 NFAT-GFP 2B4-T stanični hibridom je semi-adherentna stanična linija koja se uzgaja u flaskovima u 10% RPMI mediju te zahtijeva razrijeđivanje u omjeru 1:10-1:20 svaki drugi dan. Dobiven je u sklopu suradnje sa Dr. Silviom M. Vidal.

3.2. Metode

3.2.1. Virusi

U pokusima je kao divlji tip MCMV-a korišten virus MW97.01 koji je po biološkim karakteristikama ekvivalentan soju Smith MCMV-a (ATCC VR-1399). MW97.01 dobiven je kloniranjem genoma Smith MCMV-a u bakterijski umjetni kromosom (eng. *bacterial artificial*

chromosome – BAC) i njegovom propagacijom u staničnoj kulturi. Za taj virus u radu se koristi naziv divlji tip (eng. *wild type* – WT). Osim divljeg tipa u radu su korištene i delecije mutante navedene u tablici. Sve mutante dobivene su ET mutagenezom.

Tablica 1. Virusne mutante mišjeg citomegalovirusa.

Naziv mutante	Geni koji nedostaju (položaj u genomu)	Literaturni navod/ Početnice korištene pri mutagenezi
$\Delta m04$	m04 (3270 - 4067)	[168]
$\Delta m06$	m06 (5300 - 6334)	[168]
$\Delta m152$	m152 (C; 210 244 - 211 377)	[168]
$\Delta m04$ $\Delta m06$	m04 (3270 - 4067), m06 (5300 - 6334)	[168]
$\Delta m04$ $\Delta m152$	m04 (3270 - 4067), m152 (C; 210 244 - 211 377)	[168]
$\Delta m06$ $\Delta m152$	m06 (5300 - 6334), m152 (C; 210 244 - 211 377)	[168]
$\Delta m04$ $\Delta m06$ $\Delta m152$	m04 (3270 - 4067), m06 (5300 - 6334), m152 (C; 210 244 - 211 377)	[168]
$\Delta 6$	m144-m159	[169]
$\Delta m157$	m157 (C; 215 898 – 216 884)	[117]
$\Delta m04$ Δ $m157$	m04 (3270 - 4067), m157 (C; 215 898 – 216 884)	Dobiven ljubaznošću Prof. dr. U.H. Koszinowskog
$\Delta 7$	m159-m170	[169]
WT-gfp	divlji tip virusa koji ispoljava GFP	Dobiven ljubaznošću Prof. dr. M. Messerle-a
* $\Delta 7S.1$ -gfp	m159-m162; mutanta ispoljava GFP	F: 5' AACTGGAAAATATAGTTAGCACCGTTAGAGAGGGCGACAGA TTTCGATCACTACAAGGACGACGACGACAAGTAA 3' R: 5' CGGGCGAAGACACAGACGTATAGCGCTGTACGTCCTACCG AATCGCGGTGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA 3'
* $\Delta 7S.2$ -gfp	m163-m166; mutanta ispoljava GFP	F: 5' GAAAGCCCCATGTCTATCGGAAACACACTACGGTTCAAGAG AGGGCCCTACTACAAGGACGACGACGACAAGTAA 3' R: 5' GCGGGCGTCCAGAGACAGAGGACTCCGGCGGGGACACTAA CGATCCGGGGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA 3'
* $\Delta 7S.3$ -gfp	m167-m170; mutanta ispoljava GFP	F: 5' CGAACGTCGATCCAAACACCCTCTTCCGCACGCGCAGCTGCT GGCCCTCACTACAAGGACGACGACGACAAGTAA 3' R: 5' ATGTGCTCGGTAAACGAGTTGGCCCTTCGTCGGGCTGTCCGGC ACGACTACGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA 3'
* $\Delta m167$	m167(C; 225 782 - 227 089)	F: 5' CGAACGTCGATCCAAACACCCTCTTCCGCACGCGCAGCTGCT GGCCCTCACTACAAGGACGACGACGACAAGTAA 3'

		R: 5' ATGCTCACGTGGCAGAGTGTGGAAACTTTGACAGCGGATGT TGCGACCCGACAGGAACACTTAACGGCTGA 3'
* $\Delta m168$	m168 (227 920 - 228 462)	F: 5' ATGCGAGGACGGACACACGAGGGAAGGATGTATGTGCGTGA AAGAACACGTAGGACGACGACGACAAGTAA 3' R: 5' CGACTGCCCGTCTCCTTCGGAGTAGAACTCTATCCTCGGAG CGATCCTCGCAGGAACACTTAACGGCTGA 3'
* $\Delta m169$	m169 (C; 228 313 – 228 708)	F: 5' GAACACTTTCGGTGACATGAACGATGAAGTGGCGGGAGAAA GTAGCAAGCTCAGGACGACGACGACAAGTAA 3' R: 5' ATGAGCAACGCGGTCCCCTTCGTCCTACGCGGGTATCGGC CACAACTCAGGAACACTTAACGGCTGA 3'
* $\Delta m170$	m170 (C; 229 342 – 230 046)	F: 5' CCTGGTACCTGCGCGGGTCAACCCGTAACGCCTGTAGCAT GCCGGCGGGAGGACGACGACGACAAGTAA 3' R: 5' ATGCTCACGTGGCAGAGTGTGGAAACTTTGACAGCGGATGT TGCGACCCGAAGGAACACTTAACGGCTGA 3'
* $\Delta m168$ $\Delta m169$	m168, m169	F: 5' ATGCGAGGACGGACACACGAGGGAAGGATGTATGTGCGTGA AAGAACACGTAGGACGACGACGACAAGTAA 3' R: 5' ATGAGCAACGCGGTCCCCTTCGTCCTACGCGGGTATCGGC CACAACTCAGGAACACTTAACGGCTGA 3'
* $\Delta m169$ $\Delta m170$	m169, m170	F: 5' GAACACTTTCGGTGACATGAACGATGAAGTGGCGGGAGAAA GTAGCAAGCTCAGGACGACGACGACAAGTAA 3' R: 5' ATGCTCACGTGGCAGAGTGTGGAAACTTTGACAGCGGATGT TGCGACCCGAAGGAACACTTAACGGCTGA 3'

F – „forward“ početnica; R – „reverse“ početnica; C – gen se prepisuje sa komplementarnog lanca (eng. *complementary*) Napomena: Početnice su navedene u slučajevima mutanti koje su prvi puta napravljene u svrhu izrade ove disertacije. *Virusi izrađeni u grupi Prof.dr.sc. Martin Messerle-a.

3.2.1.1. Ciljana mutageneza MCMV-BAC-a

Metoda ET rekombinacije zasniva se na djelovanju rekombinantnih enzima bakteriofaga λ : red α , red β , red γ koji posreduju homolognu rekombinaciju na molekuli deoksiribonukleinske kiseline (eng. *deoxyribonucleic acid* - DNA). Ciljana delecija slijeda nukleotida iz genoma MCMV-BAC-a temelji se na unosu gena koji kodira rezistenciju na antibiotik (najčešće kanamicin). Taj gen umnaža se sa plazmida pGP704-Kan pomoću početnica koje uz sekvencu homolognu genu kanamicinske rezistencije na svojim krajevima sadrže i slijed nukleotida homologan rubnim područjima sekvence koju želimo ukloniti. Sekvence početnica korištene za izradu virusnih mutanti nalaze se u Tablici 1. Potom se linearni fragment dobiven lančanom reakcijom polimeraze pomoću High Fidelity Phusion Taq polimeraze (Finnzymes) metodom

elektroporacije unese u kompetentne bakterije DH10B koje već sadrže MCMV-BAC i plazmid pKD46 s kojeg je inducirano ispoljavanje rekombinacijskih enzima. Selekcija mutanti koje nose gen za rezistenciju vrši se inkubacijom na hranjivim podlogama koje sadrže kloramfenikol (17 µg/mL) i kanamicin (25 µg/mL). Uspješnost selekcije provjerava se izolacijom plazmidne DNA i analizom restrikcijskim endonukleazama. Posljednji korak mutagenaze jest uklanjanje kanamicinske kazete iz genoma mutiranog MCMV-BACa. To se vrši elektroporacijom bakterija koje nose ispravni klon MCMV mutante sa plazmidom pCP20 s kojeg se ispoljava FLP rekombinaza. FLP rekombinaza prepoznaje FRT mjesta (eng. *FLP recombinase target site*), koja se nalaze na rubnim dijelovima gena koji kodira rezistenciju na kanamicin. FLP rekombinaza posreduje homolognu rekombinaciju nukleotidnog slijeda između ta dva mjesta pri čemu se gen za rezistenciju na kanamicin isijeca iz genoma dok MCMV-BAC zaostaje sa delecijom na željenom slijedu nukleotida i jednim FRT mjestom. Selekcija mutanti koje su zadržale deleciju željenog slijeda nukleotida te su uspješno izbacile gen za rezistenciju na kanamicin vrši se selekcijom na hranjivim podlogama sa kloramfenikolom (17 µg/mL) te izolacijom plazmidne DNK i restrikcijskom analizom.

Rekombinantni virusi rekonstituirani su transfekcijom rekombinantne DNA u stanice BALB/c MEF-a, te su nakon dodatne tri pasaže (kako bi se uklonila BAC sekvenca) pročišćeni na sukroznom gradijentu.

3.2.1.2. Analiza virusnih mutanti restrikcijskim endonukleazama

Reakcijsku smjesu pripremila sam miješanjem destilirane vode, odgovarajućeg pufera, BSA po potrebi te odgovarajuće restrikcijske endonukleaze u finalnim koncentracijama prema preporuci proizvođača (New England Biolabs) u konačnom volumenu 50 µL/uzorku. Potom sam

dodala MCMV-BAC DNA i cijepala sam 3-4 h na odgovarajućoj temperaturi (najčešće 37°C) te reakcijsku smjesu analizirala gel elektroforezom (0.5x TBE gel elektroforeza pri uvjetima: 70V, 14h).

3.2.2. Kultura staničnih linija

3.2.2.1. Priprema mišjih embrionalnih fibroblasta (MEF)

Za proizvodnju MEF-a korištene su mišice kojima su 17.-18. dana skotnosti sterilno izvađeni fetusi. Nakon odstranjenja trbušnih organa i mehaničkog usitnjavanja tkivo je podvrgnuto enzimatskoj digestiji tripsinom tijekom 90 minuta uz miješanje. Dobiveni homogenat propušten je kroz metalnu mrežicu, stanice su isprane 3% DMEM-om te im je određen broj. Potom su u gustoći od 2×10^7 stanica razdijeljene u Petrijeve posude te inkubirane na 37°C uz 5% CO₂. Nakon 24 sata zamijenjen im je hranjivi medij. Nakon 3-4 dana, kada su stvorile konfluentni sloj na dnu posude, stanice se odljepljuju tripsinom, ispiru svježim medijem, prebroje te alikvotiraju u mediju za smrzavanje pri gustoći od 5×10^6 stanica/alikvotu. Pohanjuju se na -80°C do korištenja.

3.2.2.2. Uzgoj staničnih linija

Rast svih staničnih linija sam svakodnevno provjeravala mikroskopom. Kulture MEFa sam razdjeljivala kad bi postale konfluentne. Kulture ostalih staničnih linija sam razdjeljivala kada bi postigle 70%-tnu konfluentnost.

3.2.2.3. Krioprezervacija staničnih linija

Stanice sam smrzavala u svježe pripremljenom mediju, koji sam sterilizirala filtracijom i ohladila na +4°C. Tripsinizirane stanice sam resuspendirala u mediju za smrzavanje tako da je konačnog sastava 70% medija, 20% FCS i 10% DMSO. Suspenziju stanica sam alikvotirala u epruvete za smrzavanje na ledu te ih postupno smrzavala na -80°C. Nakon 24-48 h krioepruvete sa smrznutim stanicama za dugotrajniju pohranu sam prebacila u tank s tekućim dušikom.

Smrznute stanice sam odmrzavala brzim grijanjem u vodenoj kupelji na 37°C i prebacivanjem u 10 mL medija kako bi se minimaliziralo štetno djelovanje DMSOa. Suspenziju stanica sam centrifugirala na 350g/5', supernatant izbacila a stanice resuspendirala u njima odgovarajućem mediju te rasporedila u odgovarajućoj gustoći na ploče ili flask.

3.2.2.4. Određivanje broja stanica

Broj stanica sam određivala brojanjem na Neubauerovoj komorici. 25 µL suspenzije stanica sam pomiješala sa 200 µL tripana te nanijela na komoricu ispod pokrovnog stakla. Prebrojila sam samo žive stanice u vanjskim kvadrantima koje se za razliku od mrtvih ne boje tripanom modrilom. Ukupan broj stanica dobila sam množenjem srednje vrijednosti broja stanica po kvadrantu sa korektivnim faktorom 90 te sa volumenom uzorka i sa 1000 (br.st. x 90 x V x 1000).

3.2.2.5. Testiranje staničnih linija na prisutnost *Mycoplasme*

Prisutnost *Mycoplasme* u staničnim linijama sam testirala PCRom. Iz stanične linije koju želimo testirati izolirala sam DNA. Radi se tzv. ugnježeni ('nested') PCR, čime se povećava osjetljivost i specifičnost detekcije. Prvi krug PCRa od 30 ciklusa napravila sam sa početnicama

MCGpF1 i MCGpR1. 5 μ L produkta sam koristila za drugi krug PCR od 30 ciklusa sa početnicama MCGpF2 i MCGpR2. Koristila sam uvjete 94°C/30", 58°C/30", 72°C/30". Ciljna molekula je gen koji kodira rRNA mycoplasme koji je konzerviran u velikom broju različitih specijesa mycoplasme i ureaplasme, stoga umnoženi fragment koji predstavlja pozitivan rezultat može biti veličine 300 - 400 pb.

3.2.3. Priprema monoklonskih protutijela

3.2.3.1. Održavanje hibridoma i priprema monoklonskih protutijela iz supernatanta kulture

U istraživanjima opisanima u ovom radu korištena su monoklonska protutijela producirana od strane mišjih hibridoma PK136, 5E6 te JR9.318 koji izlučuju antitijela specifična redom za: NK1.1, Ly49C/I te Ly49A^{BALB}; zatim od strane štakorskih hibridoma YE1/48 te 4D11 koji izlučuju antitijela specifična redom za: Ly49A/L te Ly49G2. Svi hibridomi uzgajani su u plastičnim bočicama u 10% DMEM-u. Svi hibridomi osim PK136 postupno su prilagođeni na rast u mediju s malom količinom proteina (1% FCS) te su u konačnici protutijela proizvedena skupljanjem nadtaloga kulture stanica i njihovim pročišćavanjem metodom afinitetne kromatografije na Protein-G kolonama.

3.2.3.2. Proizvodnja ascitesa

Kako bi se dobila veća količina protutijela, PK136 hibridom uzgajan je u trbušnoj šupljini odgovarajućih laboratorijskih životinja, F1(BALB/c x CBA/J). Prvo je u trbušnu šupljinu miševa ubrizgan Pristan (0.5 mL/miš) kako bi se izazvala upalna reakcija koja će pospješiti rast hibridomskih stanica. Tjedan dana potom miševima je ubrizgano 1×10^6 hibridomskih stanica

uzgojenih u kulturi. Ascites je sakupljan peritonealnom punkcijom svaki drugi dan te nakon odvajanja stanica pohranjen na -20°C.

3.2.3.3. Obilježavanje protutijela fluorokromima

Pročišćena monoklonska protutijela dobivena iz hibridoma YE1/48, JR9.318, 5E6 i 4D11 otopljena su u PBS-u u koncentraciji 1 mg/mL. Potom su obilježena sa fluorescein-izotiocijanatom (eng. fluorescein-isothiocyanate – FITC) ili alofikocijaninom (eng. allophycocyanin – APC) pomoću Monoclonal Antibody Labeling Kit (Invitrogen) prema preporuci proizvođača.

3.2.4. Obilježavanje staničnih proteina biotinom, imunoprecipitacija i Western blot

1×10^6 stanica B12 naseljeno je u Petrijevu posudu (10 cm) osam sati prije infekcije. Stanice su inficirane sa 1.5 PFU/st (prema eng. *plaque forming units*) u 3 mL 3% DMEM-u. Nakon pola sata inkubacije na 37°C, 5% CO₂, na stanice je dodano 7 mL 3% DMEM-a te su centrifugirane na 800g pola sata. Nakon toga vraćene su u inkubator slijedećih 12 sati. Jednak broj stanica ostavljen je neinficiran u svrhu kontrole. Nakon 12 sati infekcije stanice su sakupljene tretiranjem sa 2mM otopinom EDTA, oprane 2x sa PBS-om te inkubirane u biotinizirajućem puferu uz dodatak 0.15 mg/ml biotina (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, Pierce, Thermo Fisher Scientific) 15 minuta na ledu. Biotinizacija je zaustavljena dodatkom hladne STOP otopine (50 mM NH₄Cl) te inkubacijom 5 minuta na ledu. Potom su stanice 2x oprane u PBS-u te razorene inkubacijom sa 1%-tnom NP-40-lizirajućom otopinom 20 minuta na ledu. Potom su stanice centrifugirane 20 minuta na 13 200 rpm, te +4°C. Supernatant je prebačen u novu tubicu te je određena koncentracija proteina. Uzorci su inkubirani sa zečjim anti-m04

serumom ili monoklonskim anti H-2D^d protutijelom 2 sata na +4°C uz miješanje te dodatnih 2 sata sa sefarnim kuglicama na koje je vezan stafilokokni protein G (Protein G Sepharose 4 Fast Flow, Amersham, GE Healthcare). Nakon inkubacije sefarnih kuglice su oprane: 3x u otopini B, 2x u otopini C te 2x u otopini D, resuspendirane u puferu za nanošenje na gel te inkubirane 5 minuta na 95°C kako bi se vezani proteini otpustili u pufer. Na 12-15%-tni poliakrilamidni gel nanoseni su proteini u puferu za nanošenje te razdvojeni metodom vertikalne SDS-poliakrilamidne gel elektroforeze pri 35mA u trajanju od 8 sati. Po završetku elektroforeze proteini su prenešeni na najlonsku membranu (polyvinylidene fluoride – PVDF–membrane, Roche), blokirani u 5%-tnom obranom mlijeku, te inkubirani sa peroksidazom obilježenim streptavidinom (AV-POD). Proteini su na membrani vizualizirani nakon dodatka kemiluminiscentnog supstrata za peroksidazu (BM Chemiluminescence Western Blotting Kit, Roche) te izlaganja autoradiografskom filmu (Kodak).

3.2.5. Ly49 2B4-NFAT reporterska stanična linija

3.2.5.1. Izrada 2B4-NFAT reporterskih stanica koje nose aktivacijski Ly49

2B4T stanični hibridom je transfeciran plazmidom koji nosi GFP reporterski gen pod promotorom jezgrinog faktora aktiviranih T stanica (eng. *Nuclear factor of activated T-cells* – NFAT) (NFAT-GFP). cDNA mišjeg FLAG-DAP12 i Ly49H uklonirana je u pMX-neo i pMxs retrovirusne vektore. cDNA Ly49P podrijetlom iz MA/My, Ly49L podrijetlom iz BALB/c i Ly49D2 podrijetlom iz miševa PWK/Pas uklonirana je u pMx puro vektor pomoću BamHI i EcoRI restrikcijskih mjesta. Retrovirusi su upakirani u PLAT-E stanicama i transducirani u NFAT-GFP reporterske stanice.

3.2.5.2. *Izrada 2B4-NFAT reporterskih stanica koje nose inhibicijski Ly49*

Kimerični receptori su generirani fuzioniranjem Natural killer domene (eng. *Natural Killer Domain*-NKD) receptora sa aktivacijskim stalkom a koji sačinjava transmembranska domena i citoplazmatski ostatak (eng. *cytoplasmic/transmembrane/stalk* – CTS).

cDNA Ly49A, Ly49C i Ly49G iz C57BL/6 miševa te Ly49A i Ly49G iz BALB/c miševa, uklonirane su u pMx-puromicin vektor pomoću specifičnih početnica. Signalirajući konstrukt CD3 ζ -Ly49ATM-NKR-P1A dobiven je ljubaznošću Dr. W. H. Yokoyama-e (Washington University School of Medicine, St. Louis, MO). Metodom lančane reakcije polimerazom umnožene su izvanstanična i dio transmembranske domene svakog od inhibicijskih Ly49 receptora. Istovremeno sa signalirajućeg konstrukta umnožena je transmembranska domena Ly49A i CD3 ζ molekula. Na krajevima umnoženih konstrukata nalazilo se mjesto za restriksijsku endonukleazu Esp3I čime je omogućena ligacija ovih dvaju fragmenata. Ligacijsko mjesto smješteno je u transmembranskoj regiji konačnog konstrukta te je isti imao slijedeći poredak: CD3 ζ -Ly49ATM-Esp3I::Esp3I-Ly49ATM/stalak/NK domena. Ukupni konstrukt je pomoću sekvenci za restriksijske endonukleaze BamHI i NotI ukloniran u pMx-puro vektor te transduciran u NFAT-GFP reporterske stanice.

Ovakav konstrukt ima mogućnost generiranja aktivacijskog signala preko signalne molekule CD3 ζ a vezanjem nizvodnih komponenti Fyn, ZAP70, PLC γ , PIP2, IP₃, Ca²⁺ i kalcineurina rezultira vezanjem jezgrinog faktora aktiviranih T stanica (eng. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT)) na promotsku sekvencu i prepisivanjem gena za GFP (eng. green fluorescent protein) koji se nalazi pod ovim promotorom.

3.2.5.3. Test aktivacije reporterskih stanica

Ujutro na dan infekcije ciljane stanice (CBA/J, BALB/c i C57BL/6 MEF) sam prebrojila te raspodijelila u ploče sa 24 jažice u gustoći od 2×10^5 stanica/jažici. Za infekciju sam koristila dozu virusa od 1.5 infektivne jedinice virusa po stanici (engl. *plaque forming unit*, PFU). Sa stanica se ukloni medij, doda se pripremljena virusna doza u 250 μ L medija i inkubira 30' na 37°C uz 5% CO₂ uz povremeno nagnjanje ploča kako bi virus ostao raspoređen po cijeloj površini. Nakon inkubacije sam dodala 500 μ L medija i centrifugirala Petrijeve ploče 30' na 800g na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja stanice sam inkubirala 12 h na 37°C uz 5% CO₂.

Po infekciji sam ciljnim stanicama posisala medij i dodala 7×10^4 reporterskih stanica/jažici u volumenu od 500 μ L 10% RPMI. Stanice sam ko-kultivirala na 37°C uz 5% CO₂ narednih 24 sata.

Uzorcima koji su rađeni u duplikatu sam nakon ko-kultivacije pokupila supernatant uz ispiranje jažica kako bih sakupila reporterske stanice. Duplikate uzoraka sam spojila u jedan uzorak, stanice 2 puta isprala u FACS mediju te analizirala protočnom citometrijom na prisutnost izražaja GFP proteina. Mrtve stanice isključila sam dodavanjem propidij-jodida, u razrijeđenju 1:100, 5 minuta prije analize uzorka.

3.2.6. Analiza transkripcijske aktivnosti regije virusnog genoma

BALB/c MEF u gustoći od 400 000 st/jažici sam inficirala sa 0.3 PFU/stanici WT MCMV uz centrifugiranje. Kontrolni uzorak je ostavljen neinficiran. Nakon 12 sati infekcije izolirala sam citoplazmatsku RNA pomoću kita RNeasy (QIAGEN) prema uputama proizvođača. Nakon tretiranja uzoraka RNA sa enzimom DNaza I sintetizirala sam jednolančanu cDNA uz

pomoć oligo-dT početnica. Potom sam cDNA koristila kao kalup za PCR koristeći se pri umnožavanju specifičnim početnicama za bioinformatički predviđene gene m168, m169 i m170.

Početnice korištene za umnožavanje specifičnih fragmenata:

M168-SP1 – 5' TTTTGTCTGACAGGTGACAACCTC 3'

M168-SP2 – 5' GTGAATCCTCCTTCCCCTCCGTCC 3'

M168-SP3 – 5' GACGAGGATCGCTCCGAGGATAGC 3'

M169-SP1 – 5' GCCCGTAGGGTTTCGCGGGGATCGT 3'

M169-SP2 – 5' GACAGCAACAGAAAAGACGGCAAC 3'

M169-SP3 – 5' CTCACCCGCTGGGTGTCGCATTCT 3'

M170-SP1 – 5' TTGCGTCACCGGCGTCGCGTTACG 3'

M170-SP2 – 5' ATCTCGAAACCCGGGCGGTGCTC 3'

M170-SP3 – 5' ACGGTGTTTTTCCGCGCCCGGGG 3'

Umnoženi produkti PCR-a razdvojeni su na agaroznom gelu, analizirani te su specifični fragmenti izolirani iz gela, pročišćeni pomoću kita QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN) prema preporuci proizvođača te poslani na sekvencioniranje.

Početnice korištene za određivanje sekvence umnoženog specifičnog fragmenta:

5' RACE m169 – 5' GGCAGTGTTCACTGGAACGGAGGG 3'

3' RACE m169 – 5' CGTCACATCGAACGGTCAGTTCG 3'

3.2.7. Laboratorijske životinje

Životinje koje sam koristila u pokusima uzgojene su u vivariju Centra za uzgoj i inženjering laboratorijskih miševa (LAMRI) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Životinje su uzgajane u specifičnim uvjetima bez prisustva patogena (eng. *specific pathogen free*

- SPF). Koristila sam mišje sojeve BALB/c, CBA/J, C3H/J, BALB.K, BALB.B, C57BL/6, Ma/My.

3.2.8. Virusne infekcije i tretiranje miševa protutijelima

3.2.8.1. Propagacija MCMVa u staničnoj kulturi

BALB/c MEF se koristi za umnažanje i proizvodnju virusa. MEF sam inficirala sa 0,01 PFU po stanici odgovarajućeg virusa te inkubirala 4-5 dana pri 37°C i 5% CO₂. Supernatant i stanice postrugane sa podloge sam centrifugirala na 200g 10' kako bi se riješila stanica. Supernatant sam zatim centrifugirala na 52 000g/90' na 4°C pri čemu se talože virusne čestice. Virusni talog sam resuspendirala u 300 µL sterilnog 3% DMEM te ostavila na ledu preko noći. Zatim sam nadslojila suspenziju na sterilnu 15% sukrozu u VSB puferu te centrifugirala na 100 000g/90' na 4°C. Nakon centrifugiranja supernatant sam odstranila, a na talog dodala 300 µL PBSa te ostavila na ledu preko noći. Potom sam talog virusnih čestica resuspendirala, razbila ultrazvukom, te alikvotirala po 25 µL i pohranila na -80°C. Titar virusa odredila sam standardnim testom virusnih čistina (eng. *standard plaque assay*).

3.2.8.2. Infekcije životinja i tretman antitijelima

Kako bih ispitala ulogu stanica NK, 24 h prije infekcije sam određenim grupama depletirala stanice NK intraperitonealnim injiciranjem 20 µL/mišu α-asialo GM1 zečjeg seruma ili 300 µg/mišu α-NK1.1 (PK136) protutijela. Ulogu pojedinih NK staničnih receptora ispitala sam intraperitonealnim injiciranjem 300 µg/mišu α-NKG2D blokirajućeg protutijela (C7) ili 150 µg/mišu depletirajućih protutijela α-Ly49A (YE1.48), α-Ly49C/I (5E6), α-Ly49G2 (4D11) 24 h prije infekcije. Sva protutijela aplicirana su u konačnom volumenu 500 µL PBS-a.

Miševi su inficirani intravenoznim injiciranjem 2×10^5 PFU/mišu (3×10^5 za C57BL/6 miševe) virusnog pripravka u konačnom volumenu 500 μ L DMEM-a.

3.2.8.3. Određivanje virusnog titra u organima

Količinu virusa u homogenatima organa inficiranih životinja odredila sam metodom standardnog testa virusnih čistina na BALB/c MEFu. Četiri dana prije titracije virusa prethodno pripremljeni i smrznuti MEF je odmrznut i kultiviran u Petrijevim posudama. Dan prije izvođenja testa napravljene su ploče od 48 jažica nasađivanjem cca. 5×10^4 stanica/jažici. Organe kojima sam određivala virusni titar sam odmrznula i ispasirala kroz metalnu mrežicu u 2 mL 3% DMEMa. U istom mediju sam homogenat razrijedila 200, 2 000, 20 000 i 200 000 puta. Pločama od 48 rupica koje su obložene MEFom sam uklonila višak medija te nanijela po 100 μ L odgovarajućeg razrjeđenja u duplikatu. Ploče sam inkubirala 30' na 37°C, 5% CO₂, centrifugirala 30' na 800xg, te ponovno inkubirala 30' na 37°C uz 5% CO₂. Potom sam u svaku rupicu dodala ~0,5 mL metil-celuloznog medija. Nakon 3 dana inkubacije na 37°C uz 5% CO₂ pomoću invertnog mikroskopa sam prebrojala virusne čistine u svakoj rupici. Svaka čistina odgovara jednoj infektivnoj jedinici virusa (eng. *plaque forming unit* - PFU). Broj virusnih čestica u organima inficiranih životinja izračunala sam prema broju čistina u odgovarajućim razrjeđenjima homogenata organa. Donja razina detekcije je 100 PFU/organu.

3.2.9. Izolacija limfocita

3.2.9.1. Preparacija limfocita slezene

Izoliranu slezenu škaricama sam usitnila u malenoj Petrijevoj zdjelici. Ukoliko su splenociti izolirani u svrhu analize populacija dendritičkih stanica tada je kao prvi korak

usitnjena slezena inkubirana u prisustvu kolagenaze D (2 mg/mL) 30 minuta na 37°C uz miješanje. Usitnjeni organ sam ispasirala uz ispiranje sa 10 mL 3% RPMI, centrifugirala na 300g/5' te odsisala supernatant. Radi uklanjanja eritrocita stanični talog sam resuspendirala u 4 mL *pufera za lizu eritrocita*, inkubirala 5' na ledu, neutralizirala sa 10 mL 3% RPMI, ponovo centrifugirala 300x g / 5' i resuspendirala u 10 mL 5% RPMI, te prosijala kroz stanično sito, prebrojala i podesila koncentraciju. Ukoliko sam stanice koristila za funkcionalne testove resuspendirala sam ih u 10% RPMI, a ako sam ih koristila za fenotipsku analizu protočnom citometrijom resuspendirala sam ih u *FACS mediju*. Slezene korištene za analizu subpopulacija dendritičkih stanica procesuirane su nakon inkubacije sa kolagenazom u otopini PBS-a s dodatkom 5mM EDTA i 3% FCS-a.

3.2.9.2. Preparacija limfocita iz krvi

Za preparaciju limfocita iz krvi koristila sam punu krv iz repne vene miševa. Oko 200-300 µL krvi sakupljala sam u epruvete sa 20 µL 50 mM EDTA (anti-koagulant). Krv razrijeđenu PBS-om u omjeru 1:3 nadslojila sam na identičan volumen Lymphoprep-a i centrifugirala na 800g 10 min uz isključenje kočnice. Limfocitni prsten sam uz pomoć Pasteurove pipete izvukla u novu epruvetu, isprala dva puta sa po 1 mL FACS medija te inkubirala 5 minuta na ledu u otopini za lizu eritrocita. Lizu sam neutralizirala ispiranjem u FACS mediju te limfocite koristila za fenotipsku analizu.

3.2.10. Fenotipska analiza limfocita i staničnih linija protočnom citometrijom

Za bojanje splenocita sam koristila 5×10^6 stanica. Stanice sam prije površinskog bojanja isprala u FACS mediju. Da se izbjegne nespecifično vezanje protutijela, stanice sam prvo

tretirala 25' na ledu sa 2.4G2, specifičnim antitijelom za Fc γ RII/III (CD16/32). Na blokirane stanice sam dodavala direktno obilježena ili primarna protutijela te ih inkubirala 25' na ledu. Stanice se 2x isperu FACS medijem od viška nevezanih protutijela prije dodatka sekundarnih, fluorescentno obilježenih protutijela ili drugih reagensija ako su potrebne. Obojane stanice se 2x isperu i resuspendiraju u 300 μ L FACS medija, te se svaki uzorak prosije kroz stanično sito. Mrtve stanice sam isključila iz analize tako da sam ih obojila dodatkom 100 μ L propidij-jodida razrijeđenog 1:100 uzorku 5' prije analize.

Analizirala sam suspenzije stanica slezene kako bi se karakterizirale limfocitne populacije T limfocita, NK i dendritičkih stanica. Pri tom sam koristila sljedeća biotin ili flurokromom obilježena protutijela specifična za mišje stanične površinske markere. Za NK stanice: CD3, CD19, NKp46, DX5, CD11b, CD27, CD69, KLRG1, Ly49A (JR9.318), Ly49C/I (5E6), Ly49G2 (4D11), Ly49A/L (YE1/48⁺). JR9.318, 5E6 i 4D11 hibridomi dobiveni su ljubaznošću Dr. W. Helda, a YE1/48 dobiven je ljubaznošću Dr. L.L. Laniera.

Za CD8 T limfocite: CD19, CD3, CD8 α , CCR7, CD127, CD43, CD44, CD62L.

Za konvencionalne dendritičke stanice: CD3, CD19, CD11c, MHC-II, CD8 α .

Za plazmacitoidne dendritičke stanice: B220, CD11b, CD11c, PDCA-1.

U bojanjima su korištena i biotin-specifična sekundarna protutijela streptavidin-FITC, streptavidin-PE, streptavidin-PE-Cy7 i streptavidin-APC eFluor 780 (sve eBioscience).

Za bojanje staničnih linija (300 000 stanica/uzorku) sam koristila sljedeće reagensije: α -H-2K^d (klon SF-1.1.1), α -H-2D^d (klon 34-5-8S), α -H-2L^d (klon SF 28-14-8S), α -H-2D^k (klon 15-5-5s) i tetramer NKG2D-PE dobiven ljubaznošću D. H. Buscha. Vizualizacija neobilježenih primarnih protutijela omogućena je dodatkom kozjeg α -štakorskog IgG-PE i kozjeg α -mišjeg IgG-PE (oba BD Pharmingen).

Stanice sam analizirala protočnim citometrom FACScan (Becton Dickinson, BD) ili FACSCalibur (BD) upotrebom CellQuest istraživačkog programa (BD) te na FACSaria sorteru (BD) uporabom FlowJo 7.2.5 programa za analizu (Tree Star, Ashland, OR).

3.2.11. Analiza proliferacije limfocita u inficiranim životinjama protočnom citometrijom

Grupama miševa koje sam inficirala intravenski sa MW97.01 ili $\Delta m04$ MCMV sam 2 h prije žrtvovanja intraperitonealno aplicirala 2 mg/mišu BrdU (BD Biosciences). 36h poslije infekcije 5×10^6 svježe izoliranih splenocita sam nakon bojanja površinskih biljega NK stanica ili NK staničnih subpopulacija fiksirala, permeabilizirala i označila intracelularno koristeći FITC ili APC BrdU Flow kit (BD Biosciences).

3.2.12. Analiza produkcije IFN γ protočnom citometrijom

Da bih odredila sposobnost produkcije IFN γ od strane NK stanica u inficiranim životinjama, grupe miševa sam intravenski inficirala sa MW97.01 ili $\Delta m04$ MCMV-om. 36 ili 72h poslije infekcije 5×10^6 svježe izoliranih splenocita sam inkubirala u 0.5 mL R10 uz dodatak rIL-2 (1000 U/mL) na pločama sa 24 jažice tijekom 5 h na 37°C uz dodatak Brefeldin A (eBioscience) tijekom zadnjih 4 sata.

Nakon površinskog bojanja staničnih biljega specifičnih za populaciju splenocite sam fiksirala i permeabilizirala uporabom Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD) prema uputama proizvođača, nakon čega sam stanice obojala i intracelularno sa α IFN γ -FITC ili -PE.

U slučaju analize lučenja IFN γ od strane CD8 T limfocita, splenociti su nakon izolacije u gustoći od 1×10^6 po jažici stimulirani pojedinim MCMV-specifičnim peptidom (pp89 – H-2L^d vezani YPHFMPTNL i m164 – H-2D^d vezani AGPPRYSRI, JPT Peptide Technology) u trajanju od 2 sata. Potom su stanice inkubirane dodatna 4 sata uz prisustvo Brefeldin A (eBioscience) te analizirane gore opisanim postupkom.

3.2.13. Utvrđivanje razine IFN α u serumu inficiranih životinja

Miševi su bili inficirani sa WT ili $\Delta m04$ MCMV-om te je nakon 36 odnosno 72 sata sakupljen serum nakon centrifugiranja pune krvi. Serum je analiziran uz pomoć VeriKine Mouse Interferon Alpha (Mu-IFN- α) ELISA Kit-a (PBL Interferon Source, NJ, USA) prema preporuci proizvođača čime je određena razina IFN α .

3.2.14. Analiza citotoksičnosti posredovane NK stanicama

NK staničnu citotoksičnost odredila sam prema SVEC4-10 i B12 staničnoj liniji inficiranoj MCMVom.

Priprema efektor

Svježe izoliranim splenocitima iz miševa C3H/J i BALB/c sam bojanjem NK-staničnih površinskih biljega odredila postotak stanica NK te odredila njihov broj kako bi odgovarao željenim omjerima efektor i targeta.

Priprema ciljnih stanica

Ujutro na dan infekcije ciljne stanice sam prebrojila te raspodijelila po 1.2×10^6 stanica na Petrijevu posudu promjera 10 cm (Greiner). Za infekciju sam koristila dozu virusa od 1.5 (SVEC4-10) ili 3 (B12) infektivne jedinice virusa po stanici (engl. *plaque forming unit*, PFU). Sa

stanica se ukloni medij, doda se pripremljena virusna doza u 3 mL medija i inkubira 30' na 37°C uz 5% CO₂ uz povremeno nagnjanje ploča kako bi virus ostao raspoređen po cijeloj površini. Nakon inkubacije sam dodala 7 mL medija i centrifugirala Petrijeve ploče 30' na 800g na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja stanice sam inkubirala 10 h na 37°C uz 5% CO₂.

Ciljne stanice sam zatim obilježila sa 5 μM CFSE (Molecular Probes) i pripremila ih u gustoći od 10⁴ stanica po uzorku u volumenu od 100 μL R10 medija. Potom sam uzorcima dodala različita razrijeđenja efektora, tako da je konačni volumen 400 μL R10 uz dodatak rIL-2 1000 U/mL. Uzorci se centrifugiraju na 150g, 5' na sobnoj temperaturi kako bi stanice došle u neposredni kontakti te inkubiraju u otvorenim ependorf epruvetama na 37°C uz 5% CO₂ tijekom 4h.

Analiza testa

Nakon inkubacije, 15' prije analize uzoraka doda se 7-AAD (7-aminoactinomycin D, eBioscience) koji oboji mrtve stanice. Za svako razrijeđenje sam analizirala triplikate uzoraka. Postotak ubijanja sam izračunala prema formuli: (mrtve ciljne stanice u uzorku (%)) – spontano umrle ciljne stanice (%) / (100 % – spontano umrle ciljne stanice (%)).

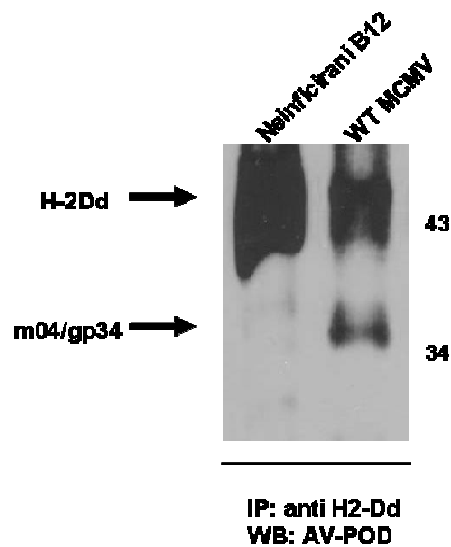
3.2.15. Statistička obrada podataka

Brojčane vrijednosti dobivene u pokusima pohranila sam u bazu podataka koristeći program Microsoft Excel[®]. Statističku obradu podataka napravila sam programom GraphPad Prism5. Odabir odgovarajućeg testa ovisio je o raspodijeli i broju ispitanika (Studentov *t-test* ili Mann-Whitney test). Razina od P<0,05 smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. Kompleks m04 i MHC I ispoljen je na površini virusom inficiranih stanica

Poznato je kako rana infekcija stanica mišjim citomegalovirusom rezultira brzim smanjenjem ispoljavanja molekula MHC I na staničnoj površini, i to u svrhu izbjegavanja antigenske prezentacije i odgovora posredovanog citotoksičnim limfocitima T. Kako bih provjerila da se i u takvim uvjetima na površini inficiranih stanica mogu naći kompleksi proteina m04 i molekula MHC I koristila sam se metodama površinske biotinizacije proteina, imunoprecipitacije i Western blota. Rezultati pokazuju kako se molekule MHC I (H-2D^d) vezane na protein m04 ispoljavaju na staničnoj površini tijekom infekcije stanica B12 sa divljim tipom (WT, prema eng. *wild type*) MCMV-a. Također, vidljivo je kako je količina molekula MHC I ispoljenih na staničnoj površini tijekom infekcije manja u usporedbi sa neinficiranim uzorkom.

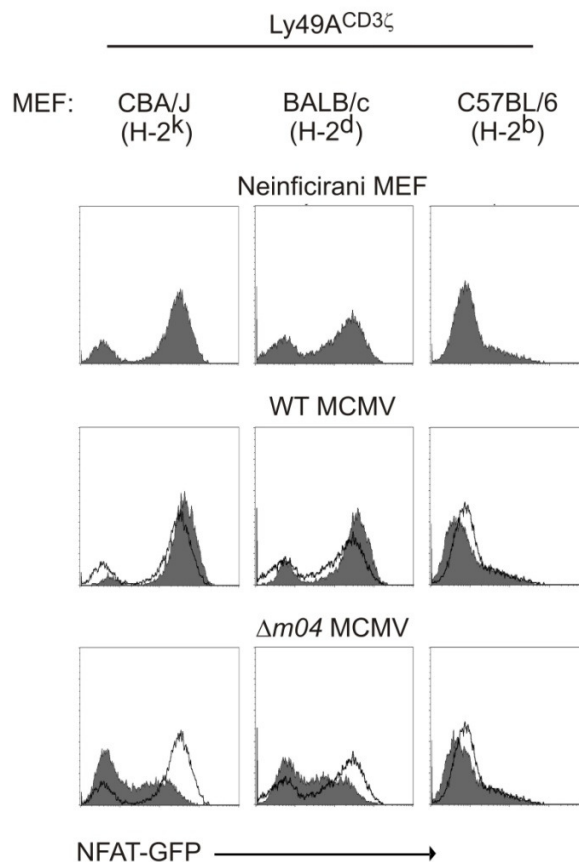


Slika 9. Kompleks m04/MHC I ispoljen je na staničnoj površini WT MCMV-inficiranih stanica. Neinficirane i 12 sati WT-inficirane stanice su površinski obilježene biotinom te potom lizirane. Imunoprecipitacija je vršena protutijelom anti-H-2D^d tijekom jednog sata nakon čega su imunokompleksi vezani na protein G kolonu. Nakon razdvajanja uzoraka SDS-PAGE elektroforezom proteini su prebačeni na membranu, inkubirani sa AV-POD te vizualizirani.

4.2. Kompleks m04/MHC I služi ligaciji inhibicijskog receptora Ly49A

4.2.1. Učinak proteina m04 ovisan je o haplotipu molekula MHC I

Hipoteza našeg istraživanja predlaže kako bi kompleks molekule MHC I i proteina m04 mogao služiti vezanju inhibicijskog receptora Ly49 na stanicama NK. Kako bi to provjerila koristila sam reporterski test u kojem sam reporterske stanice koje ispoljavaju inhibicijski receptor Ly49A podrijetlom iz miševa BALB/c ko-kultivirala sa ciljnim stanicama koje su bile inficirane sa WT MCMV ili mutantom deficitnom za m04 ($\Delta m04$ MCMV). Kao ciljne stanice korišten je MEF porijeklom iz miševa CBA/J, BALB/c i C57BL/6. Aktivacija reporterskih stanica korelirala je sa njihovim ispoljavanjem GFP-a što sam pratila protočnom citometrijom. Reporterske stanice ko-kultivirane sa neinficiranim CBA/J i BALB/c MEF-om reagirale su aktivacijom, kao posljedicom vezanja receptora sa endogenim molekulama MHC I. Reporterske stanice ko-kultivirane sa CBA/J i BALB/c MEF-om prethodno inficiranim sa WT MCMV-om reagirale su aktivacijom, usprkos smanjenom ispoljavanju molekula MHC I, kao posljedicom vezanja receptora sa kompleksom MHC I/m04. Reporterske stanice ko-kultivirane sa CBA/J ili BALB/c MEF-om inficiranim sa mutantom $\Delta m04$ nisu bile aktivirane. Reporterske stanice ko-kultivirane sa MEF-om podrijetlom iz C57BL/6 miševa nisu bile aktivirane ni u kakvim uvjetima što je uvjetovano činjenicom da receptor Ly49A ne prepoznaje molekule MHC I haplotipa H-2^b.

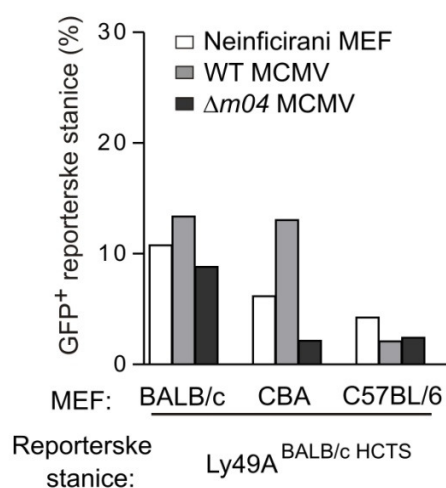


Slika 10. Inhibicijski receptor Ly49A prepoznaje kompleks proteina m04 i molekula MHC I i to prepoznavanje ovisno je o MHC I-haplotipu. Neinficirane ili inficirane ciljane stanice (CBA/J, BALB/c ili C57BL/6 MEF) ko-kultivirane su sa reporterskim stanicama koje ispoljavaju Ly49A. Protočnom citometrijom praćeno je ispoljavanje proteina GFP 24 sata po ko-kultivaciji. Sivi histogram prikazuje razinu ispoljavanja GFP po aktivaciji reporterskih stanica. U slučaju infekcije otvoreni histogram prikazuje aktivaciju reporterskih stanica po ko-kultivaciji sa neinficiranim stanicama (kontrolni uzorak).

4.2.2. Aktivacija reporterskih stanica Ly49A je snažnija u prisustvu kompleksa MHC I/m04

U slučaju ko-kultivacije reporterskih stanica sa ciljnim stanicama inficiranim sa WT MCMV-om primjetila sam veći postotak stanica koje ispoljavaju GFP nego u slučaju ko-kultivacije sa neinficiranim stanicama, što je upućivalo na to da Ly49A receptor snažnije veže kompleks MHC I/m04 nego native molekule MHC I. Kako bih to provjerila koristila sam

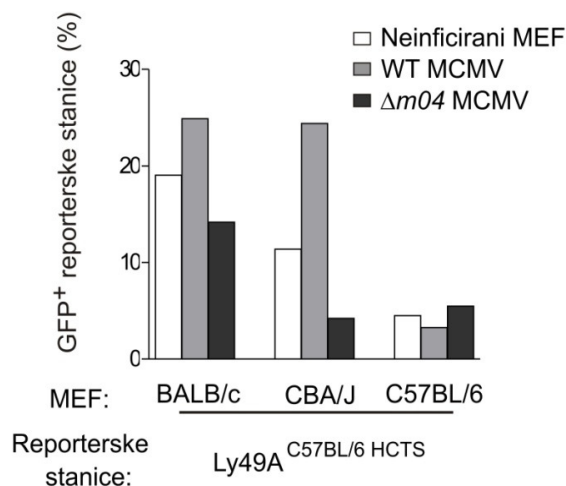
inačicu reporterskih stanica u kojima je signalni konstrukt modificiran na način da po ligaciji receptora provodi slabiji signal (Ly49A^{BALB/c HCTS}). Ko-kultivacija takvih reporterskih stanica sa neinficiranim MEF-om CBA/J ili BALB/c podrijetla rezultirala je slabom aktivacijom reporterskih stanica, tj. niskim postotkom GFP⁺ reporterskih stanica. Međutim, ko-kultivacija reportera sa WT MCMV-inficiranim ciljnim stanicama rezultirala je značajno snažnijom aktivacijom čime je potvrđeno da receptor Ly49A snažnije veže kompleks MHC I/m04 od nativnih molekula MHC I. Ko-kultivacija reporterskih stanica sa $\Delta m04$ MCMV-inficiranim ciljnim stanicama rezultirala je nedostatkom aktivacije.



Slika 11. Aktivacija Ly49A-reporterskih stanica jača je u slučaju ko-kultivacije sa WT-inficiranim nego neinficiranim ciljnim stanicama. Neinficirane ili inficirane ciljne stanice (CBA/J, BALB/c ili C57BL/6 MEF) ko-kultivirane su sa reporterskim stanicama koje ispoljavaju Ly49A ali su modificirane na način da provode slabiji signal po aktivaciji. Protočnom citometrijom praćeno je ispoljavanje proteina GFP 24 sata po ko-kultivaciji te uspoređen postotak stanica pozitivnih na ispoljavanje tog proteina.

Jednak učinak m04 proteina dobila sam i u slučaju reporterskih stanica koje su ispoljavale receptor Ly49A podrijetlom iz C57BL/6 miševa. Pritom je, sveukupno gledajući, aktivacija reporterskih stanica u ovom slučaju bila jača nego u slučaju receptora podrijetlom iz BALB/c

miševa. Ovi rezultati također potvrđuju kako nedostatak aktivacije reporterskih stanica u slučaju ko-kultivacije sa C57BL/6 MEF-om nije posljedica nefunkcionalnosti receptora u tih miševa već nedostatak odgovarajućeg liganda.



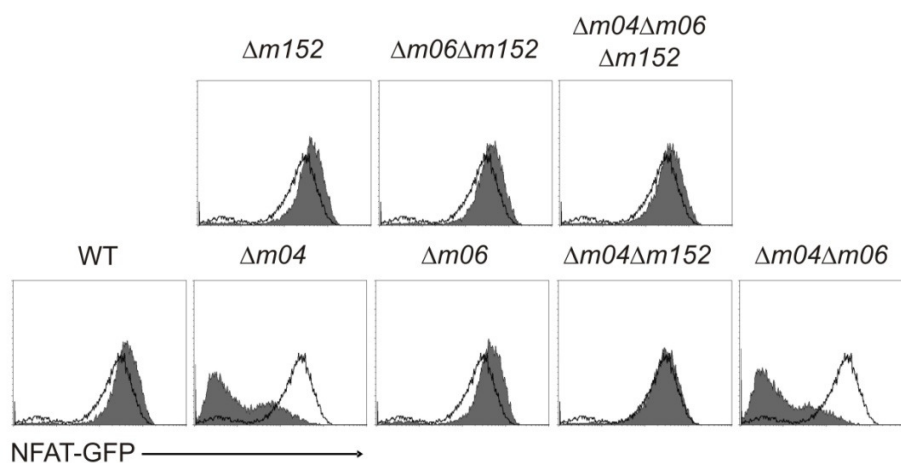
Slika 12. Reporterske stanice koje ispoljavaju receptor Ly49A porijeklom iz miševa C57BL/6 pokazuju isti obrazac aktivacije kao i stanice koje ispoljavaju receptor Ly49A porijeklom iz miševa BALB/c. Neinficirane ili inficirane ciljane stanice (CBA/J, BALB/c ili C57BL/6 MEF) ko-kultivirane su sa reporterskim stanicama koje ispoljavaju Ly49A porijeklom iz miševa C57BL/6. Protočnom citometrijom praćeno je ispoljavanje proteina GFP 24 sata po ko-kultivaciji te uspoređen postotak stanica pozitivnih na ispoljavanje tog proteina.

4.3. m04 antagonizira učinak m152 u negativnoj regulaciji ispoljavanja molekula MHC

I

Kako bi ispitala ulogu proteina m04 u kontekstu dva druga virusna regulatora ispoljavanja molekula MHC I, u reporterskom testu ko-kultivirala sam reporterske stanice Ly49A sa stanicama CBA MEF-a inficiranim sa slijedećim virusnim mutantama: WT, $\Delta m04$, $\Delta m06$, $\Delta m152$, $\Delta m04\Delta m06$, $\Delta m04\Delta m152$, $\Delta m06\Delta m152$, $\Delta m04\Delta m06\Delta m152$ te neinficiranim stanicama. Neinficirane te WT, $\Delta m06$, $\Delta m152$, $\Delta m06\Delta m152$ i $\Delta m04\Delta m06\Delta m152$ inficirane stanice očekivano su aktivirale reportersku liniju ukazujući da na površini postoji dostatna količina

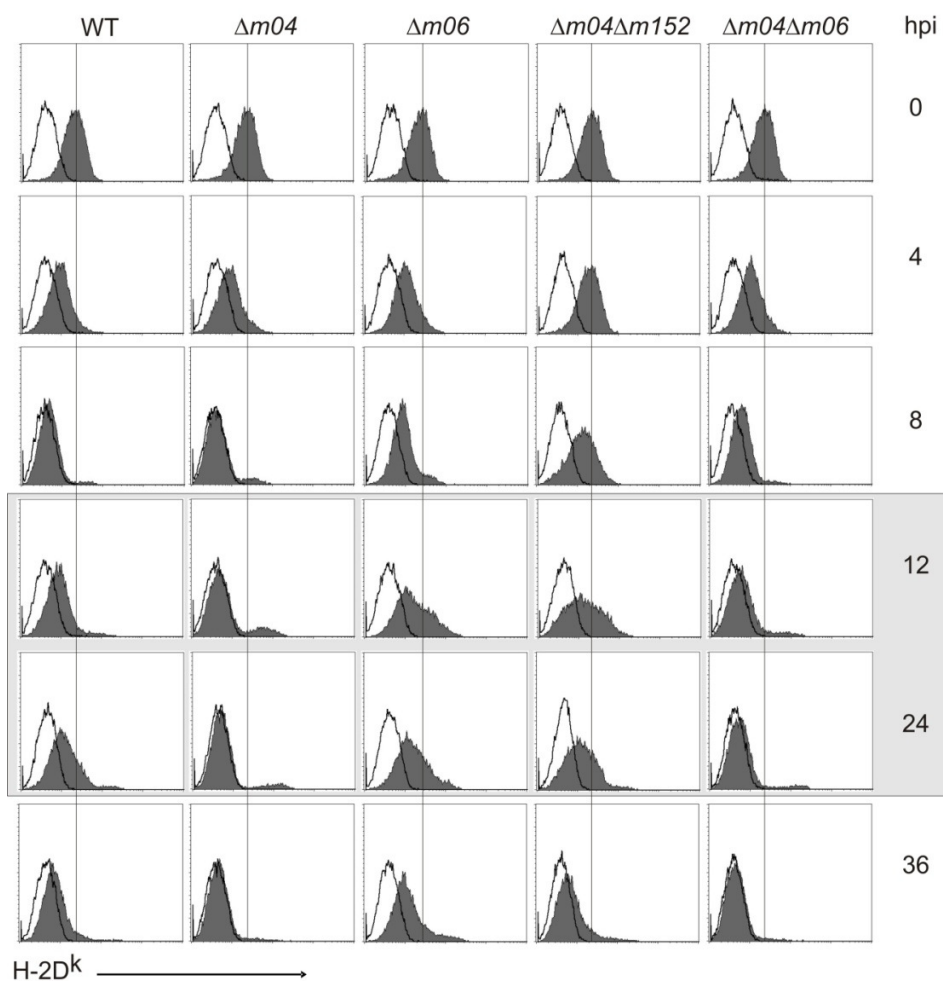
molekula MHC I potrebna za ligaciju receptora Ly49A. Jednako očekivano, u slučaju $\Delta m04$ i $\Delta m04\Delta m06$ infekcije, reporterske stanice nisu se aktivirale. Iznenadujuće je, međutim, da su stanice u slučaju infekcije $\Delta m04\Delta m152$ aktivirale reportersku staničnu liniju, usprkos prisustvu m06, negativnog regulatora ispoljavanja MHC I.



Slika 13. m04 antagonizira učinak m152 u negativnoj regulaciji ispoljavanja molekula MHC I. Neinficirane ili inficirane ciljne stanice (CBA/J MEF) ko-kultivirane su sa reporterskim stanicama koje ispoljavaju Ly49A. Protočnom citometrijom praćeno je ispoljavanje proteina GFP 24 sata po ko-kultivaciji. Sivi histogram prikazuje razinu ispoljavanja GFP po aktivaciji reporterskih stanica u slučaju infekcije. Otvoreni histogram prikazuje aktivaciju reporterskih stanica po ko-kultivaciji sa neinficiranim stanicama (kontrolni uzorak).

Da bi objasnila gore opisani fenomen, pratila sam kinetiku regulacije ispoljavanja molekula MHC I u uvjetima infekcije korištenima u reporterskom testu. U navedenim vremenima po infekciji sakupljala sam stanice te protočnom citometrijom ispitala površinsko ispoljavanje molekula MHC I, H-2D^k. U slučaju infekcije sa WT ili $\Delta m04$ razina ispoljavanja se smanjila već 4 sata po infekciji te ostala smanjena sve do 36-og sata infekcije. U slučaju $\Delta m04$ negativno reguliranje ispoljavanja je očekivano jače izraženo no pri infekciji sa WT-om. Tijekom infekcije sa $\Delta m06$ vidljivo je da prisustvo m04 antagonizira negativnu regulaciju putem m152,

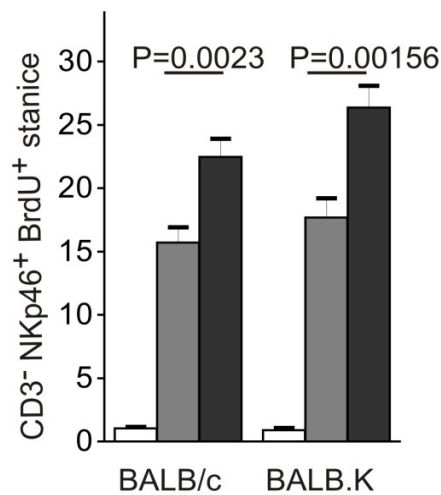
što potvrđuje prijašnje nalaze iz literature [134]. Usporedbom infekcije sa $\Delta m04\Delta m06$ i $\Delta m04\Delta m152$ vidljivo je kako $m152$ puno brže i efikasnije regulira ispoljavanje H-2D^k od $m06$. Iako nakon 36 sati infekcija objema mutantama rezultira usporedivim gubitkom površinskog ispoljavanja H-2D^k, brzina regulacije ispoljavanja ovih molekula tijekom infekcije (posredovana sa $m152$, tj. sa $m06$) ima za posljedicu različit učinak na aktivaciju reporterskih stanica.



Slika 14. Kinetika regulacije ispoljenosti molekula MHC I na površini stanica inficiranih različitim virusnim mutantama. CBA/J MEF inficiran je prikazanim virusnim mutantama te u naznačeno vrijeme po infekciji analiziran protočnom citometrijom na razinu ispoljenosti molekule H-2D^k na staničnoj površini. Sivi histogram pokazuje razinu ispoljenosti H-2D^k na inficiranim stanicama dok otvoreni histogram prikazuje iste stanice obilježene odgovarajućim izotipskim protutijelom. Okvir prikazuje vremenski period inkubacije ciljnih stanica sa reporterskim stanicama tijekom reporterskog testa.

4.4. Vežanje inhibicijskog receptora Ly49A rezultira smanjenom proliferacijom stanica NK

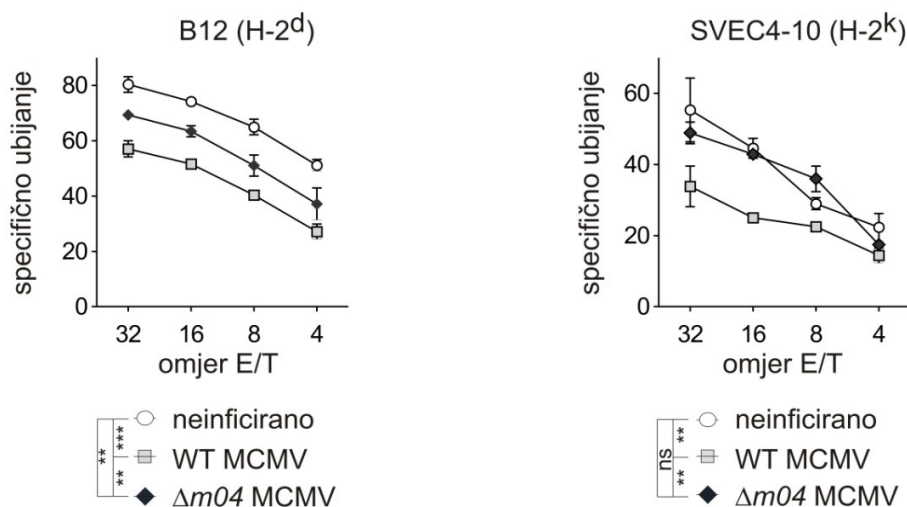
Kako bi ispitala utjecaj interakcije m04/MHC I i inhibicijskog receptora Ly49A na ponašanje stanica NK pratila sam njihovu proliferaciju prilikom virusne infekcije *in vivo*. Korištena metoda obuhvaćala je intraperitonealno apliciranje nukleotidnog analoga 5-brom-2'-deoksiuridina (5-bromo-2'deoxyuridine - BrdU) inficiranim miševima 2 sata prije izolacije i analize splenocita protočnom citometrijom. U usporedbi sa neinficiranim kontrolnim miševima analiza je pokazala kako stanice NK proliferiraju u odgovoru na infekciju. Međutim, vidljivo je kako prisustvo m04 tijekom infekcije WT MCMV-om dijelom inhibira proliferaciju stanica NK u usporedbi sa miševima inficiranim sa $\Delta m04$. Učinak je vidljiv u miševa haplotipa H-2^d (BALB/c) ali je izraženiji u miševa haplotipa H-2^k (BALB.K).



Slika 15. Vežanje inhibicijskog receptora Ly49A rezultira smanjenom proliferacijom stanica NK. BALB/c i BALB.K miševi inficirani su intravenozno sa WT- ili $\Delta m04$ -MCMV ili ostavljeni neinficirani. 1.5 dan po infekciji životinje su tretirane sa 2 mg BrdU intraperitonealno te su im nakon 3 sata izolirani splenociti te analizirani protočnom citometrijom. Prikazan je postotak stanica NK koje su ugradile BrdU.

4.5. Prisustvo m04 štiti stanice od ubijanja posredovanog stanicama NK

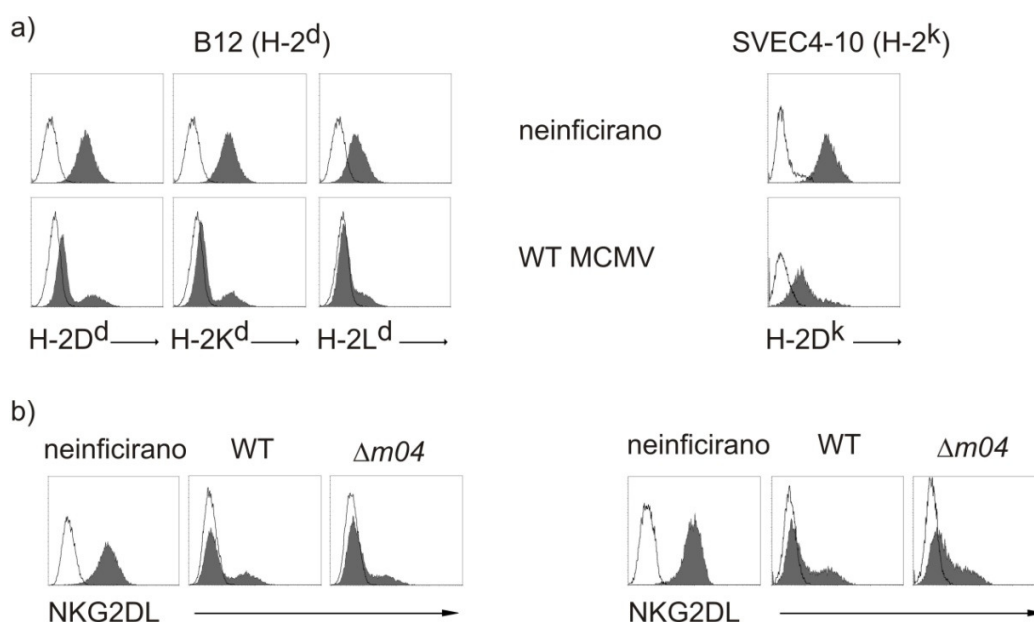
Kako bi dodatno ispitala utjecaj m04 na inhibiciju stanica NK provjerila sam ulogu m04 u zaštiti inficiranih stanica od ubijanja posredovanog stanicama NK. CFSE-om obilježene stanice SVEC4-10 ili B12, prethodno inficirane sa WT ili $\Delta m04$ MCMV-om, ili neinficirane, ko-kultivirane su sa splenocitima iz naivnih singeničnih (C3H/J ili BALB/c) miševa te je protočnom citometrijom određen udio mrtvih ciljnih stanica. Po analizi je vidljivo kako je u oba slučaja (haplotip H-2^k ili H-2^d) prisutnost m04 tijekom infekcije WT MCMV-om uvjetovala slabije ubijanje posredovano stanicama NK u usporedbi sa neinficiranim stanicama ili stanicama inficiranim sa $\Delta m04$.



Slika 16. Prisustvo m04 tijekom infekcije sa WT MCMV-om štiti od specifičnog liziranja stanica.

Stanice B12 i SVEC4-10 inficirane su sa WT- ili $\Delta m04$ -MCMV ili ostavljene neinficirane. Nakon 12 sati infekcije obilježene su CFSE-om te ko-inkubirane sa splenocitima naivnih singeničnih miševa (BALB/c i CBA/J). Nakon 4 sata ko-inkubacije CFSE⁺ stanice analizirane su protočnom citometrijom tako da je određen postotak mrtvih stanica (kao mrtve stanice određene su CFSE⁺ stanice koje su bile pozitivne i na 7-AAD).

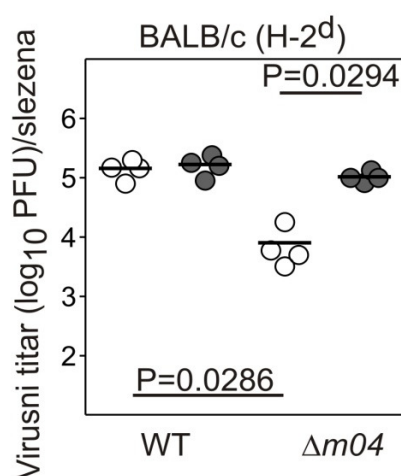
S obzirom da su i SVEC4-10 i B12 transformirane stanične linije koje ispoljavaju ligande za NKG2D te je dio njihova ubijanja posredovan i aktivacijskim receptorom NKG2D, provjerom površinskog ispoljavanja liganada za ovaj receptor isključila sam moguć utjecaj proteina m04 na njihovu regulaciju. Iz analize protočnom citometrijom vidljivo je kako infekcija sa $\Delta m04$ ima jednak negativni utjecaj na ispoljavanje liganada za NKG2D kao i infekcija WT MCMV-om što upućuje na to da m04 nema utjecaja na regulaciju ispoljavanja ovih liganada. Istovremeno, potvrdili smo učinkovito djelovanje WT MCMV-a na regulaciju ispoljavanja molekula MHC I.



Slika 17. m04 ne utječe na ispoljavanje liganada za receptor NKG2D. Stanice B12 i SVEC4-10 inficirane su naznačenim virusima ili neinficirane te 12 sati po infekciji analizirane protočnom citometrijom na ispoljavanje (sivi histogram) a) molekula MHC I i b) liganada za NKG2D. Otvoreni histogram prikazuje isti uzorak obojan odgovarajućim irelevantnim izotipskim protutijelom.

4.6. Virusna mutanta deficijenta za m04 ($\Delta m04$) pokazuje smanjeni virusni titar u odnosu na divlji tip virusa (WT) po infekciji miševa haplotipa H-2^d i H-2^k

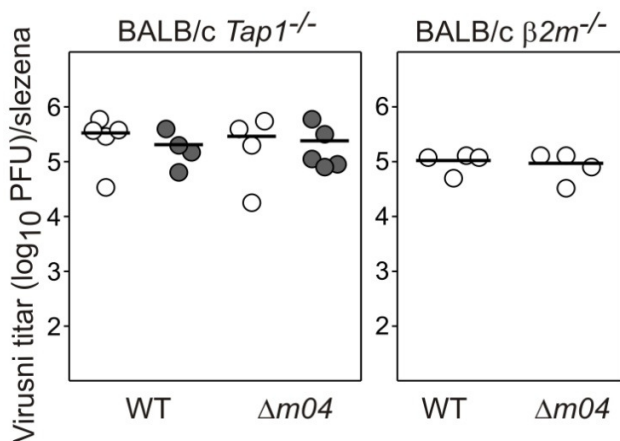
Miševi haplotipa BALB (neovisno o haplotipu MHC I) razvijaju slabi rani imunološki odgovor na infekciju WT MCMV-om te nemaju sposobnost kontroliranja virusnog titra 3 dana po infekciji. Čak i nešto „rezistentniji“ miševi CBA/J i C3H/J (H-2^k) nemaju mogućnost kontroliranja titra poput C57BL/6 miševa u kojih je ta rezistencija posredovana aktivacijskim receptorom Ly49H. Kako bi ispitala ulogu m04 u sprečavanju razvijanja dobrog NK-staničnog odgovora intravenozno sam inficirala miševe BALB/c (H-2^d) sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. Analizom rezultata testa virusnih čistina pokazala sam kako infekcija miševa sa $\Delta m04$ MCMV-om rezultira uspješnom kontrolom virusnog titra u slezeni 4 dana po infekciji.



Slika 18. Miševi BALB/c učinkovito kontroliraju infekciju m04-deficijentnom virusnom mutantom i ta kontrola se gubi po uklanjanju stanica NK. Grupe od 4 BALB/c miša intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. Dijelu životinja su 8 sati prije infekcije uklonjene stanice NK intraperitonealnim injiciranjem anti asialo GM1 (sivi kružići), dok dio životinja nije tretiran (bijeli kružići). 4. dan po infekciji životinje su žrtvovane te slezena analizirana standardnim testom virusnih čistina radi određivanja virusnog titra.

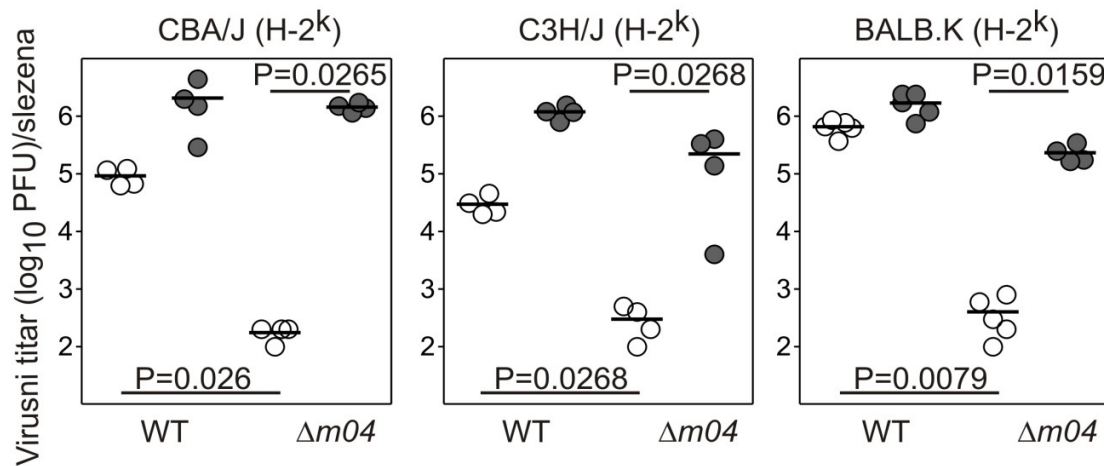
Kako bi provjerila ulogu stanica NK u kontroli virusnog titra mutante $\Delta m04$, dijelu životinja su uklonjene stanice NK, intraperitonealnim apliciranjem depletirajućeg seruma anti asialo GM1, 8-12 sati prije infekcije. Pokazano je kako uklanjanjem stanica NK razina virusnog titra mutante $\Delta m04$ dostiže onu u slučaju infekcije WT MCMV-om što ukazuje na ulogu tih stanica u kontroli virusnog titra mutante. Istovremeno uklanjanje stanica NK u slučaju infekcije WT MCMV-om nema nikakvog utjecaja na virusni titar.

Kritičnu ulogu molekula MHC I pokazala sam infekcijom miševa BALB/c $Tap1^{-/-}$, pri čemu ti miševi zbog deficijencije u genu za transport peptida prilikom antigenske prezentacije ispoljavaju izrazito smanjenu količinu molekula MHC I. Ti miševi po infekciji sa WT ili $\Delta m04$ MCMV-om nisu uspijevali kontrolirati virusnu infekciju. Uklanjanje stanica NK u slučaju obje infekcije nije imalo utjecaja na kontrolu virusnog titra. Iste rezultate potvrdila sam infekcijom miševa BALB/c $\beta 2m^{-/-}$, koji zbog deficijencije u genu za $\beta 2$ -mikroglobulin ne ispoljavaju molekule MHC I.



Slika 19. Kontrola $\Delta m04$ MCMV-a ovisna je o prisustvu molekula MHC I. Grupe od 4-5 BALB/c miševa deficijentnih za Tap1 (BALB/c $Tap1^{-/-}$) ili $\beta 2m$ (BALB/c $\beta 2m^{-/-}$) intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. Dijelu životinja su 8 sati prije infekcije uklonjene stanice NK intraperitonealnim injiciranjem anti asialo GM1 (sivi kružići), dok dio životinja nije tretiran (bijeli kružići). 4. dan po infekciji životinje su žrtvovane te slezena analizirana standardnim testom virusnih čistina radi određivanja virusnog titra.

U prijašnjim pokusima pokazala sam da učinak proteina m04 ovisi o haplotipu molekula MHC I. Kako bi ispitala ulogu MHC I-haplotipa *in vivo*, inficirala sam miševe haplotipa H-2^k (CBA/J, C3H/J, BALB.K) prema uvjetima korištenim u gornjim eksperimentima. Rezultati ukazuju da m04 ima učinak i u miševa haplotipa H-2^k, a vidljivo je i kako je atenuacija m04-deficijentne mutante jača u odnosu na onu u miševa BALB/c. Kao i gore, uklanjanjem stanica NK, pokazala sam kritičnu ulogu ove limfocitne populacije u kontroli virusa $\Delta m04$.

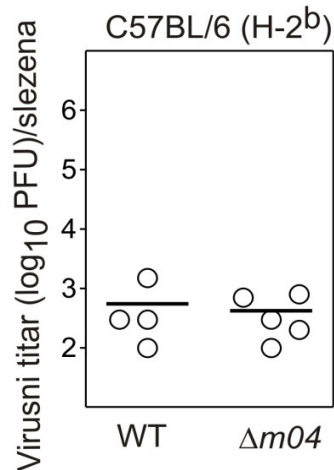


Slika 20. Miševi haplotipa MHC I H-2^k kontroliraju infekciju m04-deficijentnom virusnom mutantom učinkovitije od BALB/c (H-2^d) miševa. Grupe od 4-5 C3H/J, CBA/J i BALB.K miševa intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. Dijelu životinja su 8 sati prije infekcije uklonjene stanice NK intraperitonealnim injiciranjem anti asialo GM1 (sivi kružići), dok dio životinja nije tretiran (bijeli kružići). 4. dan po infekciji životinje su žrtvovane te slezena analizirana standardnim testom virusnih čistina radi određivanja virusnog titra.

4.7. Funkcija proteina m04 nije izražena u miševa haplotipa H-2^b

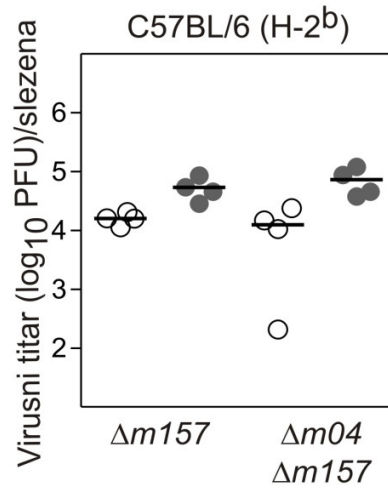
Unatoč činjenici da m04 tvori komplekse i sa molekulama MHC I haplotipa H-2^b [135], naši rezultati ukazuju na to da ta interakcija nema ulogu u inhibiranju stanica NK preko receptora Ly49A. Kako bi to provjerila *in vivo*, prema gore navedenom protokolu ispitala sam kontrolu

m04-deficijentne mutante u miševa C57BL/6 (H-2^b). Pokazala sam kako ti miševi podjednako dobro kontroliraju i WT i $\Delta m04$ viruse, i to zahvaljujući interakciji Ly49H/m157.



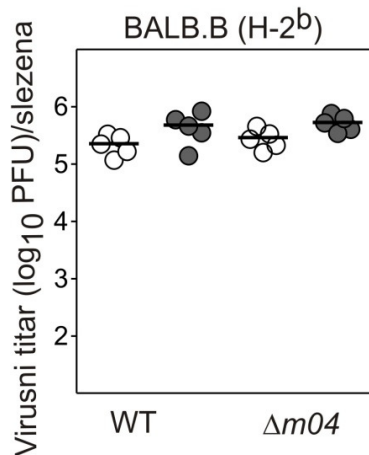
Slika 21. Fenotip $\Delta m04$ MCMV-a nije izražen u miševa haplotipa H-2^b. Grupe od 4 C57BL/6 miša intravenozno su inficirane sa 3×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. 4. dan po infekciji životinje su žrtvovane te slezena analizirana standardnim testom virusnih čistina radi određivanja virusnog titra.

Kako bi isključila ulogu Ly49H, iste miševe inficirala sam sa mutantom $\Delta m157$, pri čemu C57BL/6 miševi nisu uspijevali kontrolirati virusni titar. Međutim, infekcija istih miševa sa dvostrukom mutantom $\Delta m04\Delta m157$ pokazala je kako životinje nemaju mogućnost kontrole ni tog virusa potvrđujući početno opažanje gdje m04 nema funkciju u miševa haplotipa H-2^b.



Slika 22. Fenotip $\Delta m04$ MCMV-a nije izražen u miševa haplotipa H-2^b. Grupe od 4 C57BL/6 miša intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU $\Delta m157$ ili $\Delta m04 \Delta m157$ MCMV-a. Dijelu životinja su 8 sati prije infekcije uklonjene stanice NK intraperitonealnim injiciranjem anti NK1.1 (sivi kružići), dok dio životinja nije tretiran (bijeli kružići). 4. dan po infekciji životinje su žrtvovane te slezena analizirana standardnim testom virusnih čistina radi određivanja virusnog titra.

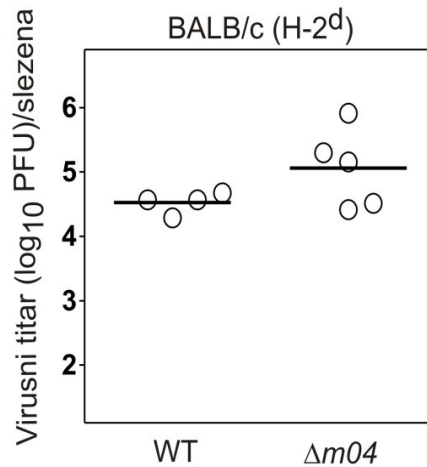
Kako bi dodatno potvrdila nepostojanje učinka m04 u miševa haplotipa H-2^b, inficirala sam miševe BALB.B, koji imaju jednak genomski kompleks NKC kao i BALB/c miševi, ali se razlikuju u tome što imaju MHC-haplotip H-2^b. Ti miševi također nemaju sposobnost kontroliranja infekcije WT MCMV-om. Kako i u gornjim slučajevima, ni ovi miševi nisu bili sposobni kontrolirati infekciju sa $\Delta m04$ MCMV-om, čime sveukupno ovi rezultati ukazuju na to da m04 u miševa haplotipa H-2^b ne posreduje inhibiciju stanica NK.



Slika 23. Fenotip $\Delta m04$ MCMV-a nije izražen u miševa haplotipa H-2^b. Grupe od 5 BALB.B miševa intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. Dijelu životinja su 8 sati prije infekcije uklonjene stanice NK intraperitonealnim injiciranjem anti asialo GM1 (sivi kružići), dok dio životinja nije tretiran (bijeli kružići). 4. dan po infekciji životinje su žrtvovane te slezena analizirana standardnim testom virusnih čistina radi određivanja virusnog titra.

4.8. Novookočeni miševi nemaju sposobnost kontroliranja infekcije sa mutantom $\Delta m04$

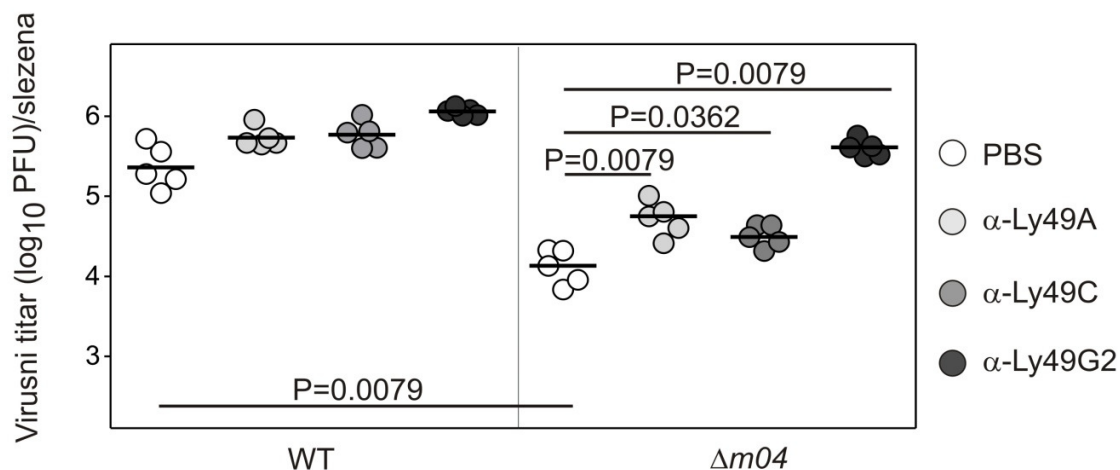
Iz literature je poznato kako se geni za molekule Ly49 počinju u stanicama NK ispoljavati u trećem tjednu postnatalnog razvoja. Stoga sam ulogu m04 u inhibiciji stanica NK putem interakcije sa receptorima Ly49 ispitala infekcijom miševa neposredno nakon njihova rođenja (prvi dan po infekciji) očekujući kako novookočeni miševi neće imati sposobnost kontroliranja virusnog titra neovisno o prisustvu m04. Analiza je uistinu i pokazala kako, četiri dana po infekciji, novookočeni miševi BALB/c nemaju sposobnost kontroliranja infekcije niti WT ni $\Delta m04$ MCMV-om, što ukazuje na važnost receptora Ly49 u prepoznavanju m04/MHC I kompleksa te posredovanju NK-stanične kontrole infekcije.



Slika 24. Fenotip $\Delta m04$ MCMV-a nije izražen u novookoćenih miševa BALB/c. Grupe od 4-5 BALB/c miševa intraperitonealno su inficirane sa 100 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. 4. dan po infekciji životinje su žrtvovane te slezena analizirana standardnim testom virusnih čistina radi određivanja virusnog titra.

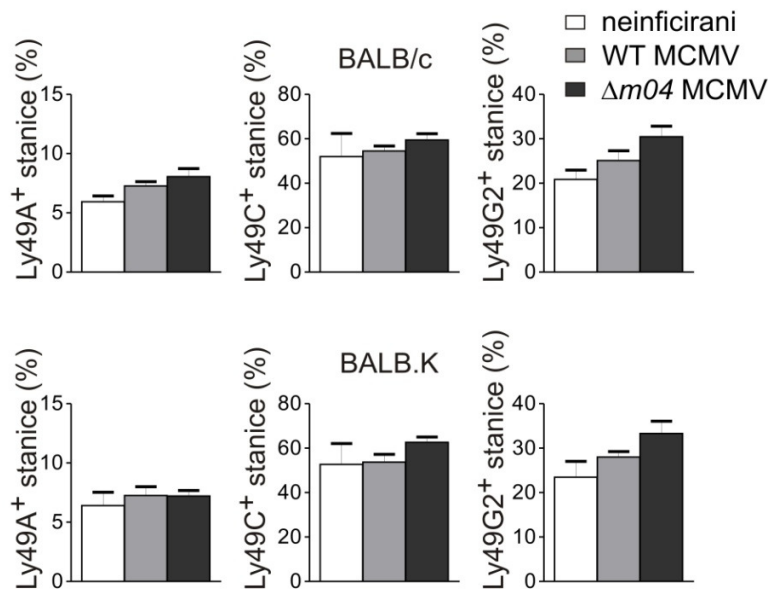
4.9. Kontrola virusnog titra $\Delta m04$ posredovana je stanicama NK koje ispoljavaju inhibicijske receptore Ly49A, Ly49C i Ly49G2

Stanice NK iz miševa haplotipa BALB, kao i one iz miševa CBA/J i C3H/J ispoljavaju 3 inhibicijska receptora: Ly49A, Ly49C i Ly49G2. Kako bi ispitala ulogu subpopulacija NK stanica koje ispoljavaju ove receptore, prije infekcije miševima sam aplicirala protutijela koja specifično uklanjaju pojedine subpopulacije. Dobiveni rezultati ukazuju na to da sve 3 subpopulacije imaju ulogu u kontroliranju titra mutante $\Delta m04$. Ipak, najveći utjecaj na porast virusnog titra imalo je uklanjanje populacije koja ispoljava Ly49G2 pri čemu je titar bio gotovo jednak onom koji postiže infekcija WT MCMV-om. Učinak uklanjanja Ly49A⁺ subpopulacije kao i Ly49C⁺ subpopulacije bio je znatno slabije izražen.



Slika 25. Kontrola $\Delta m04$ MCMV-a posredovana je subpopulacijama stanica NK koje izražavaju inhibicijske receptore Ly49. Grupe od 5 BALB/c miševa intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. Dijelu životinja su 8 sati prije infekcije uklonjene pojedine subpopulacije stanica NK intraperitonealnim injiciranjem odgovarajućih protutijela (puni kružići prema legendi), dok je dio životinja primio PBS (bijeli kružići). 4. dan po infekciji životinje su žrtvovane te slezena analizirana standardnim testom virusnih čistina radi određivanja virusnog titra.

Dobiveni fenomen moguće je objasniti ukoliko tijekom infekcije dolazi do porasta pojedine subpopulacije čijim se uklanjanjem onda uzrokuje nedostatak kontrole virusnog titra. Kako bi ispitala tu mogućnost provjerila sam proporcije pojedinih subpopulacija tijekom infekcije miševa BALB/c sa WT i $\Delta m04$ MCMV-om kao i u neinficiranih životinja. Usporedbom dobivenih rezultata vidljivo je kako se proporcija pojedinih subpopulacija ne mijenja značajno u životinja inficiranih WT ili $\Delta m04$ MCMV-om, kao ni u usporedbi sa neinficiranim životinjama. Isti rezultat pokazan je i u miševa BALB.K čime je zapravo potvrđena dominantna uloga NK-staničnih populacija koje ispoljavaju inhibicijske receptore Ly49G2 u „missing self“-posredovanoj kontroli virusne infekcije *in vivo*, a koja se ne može objasniti isključivo ekspanzijom same populacije.

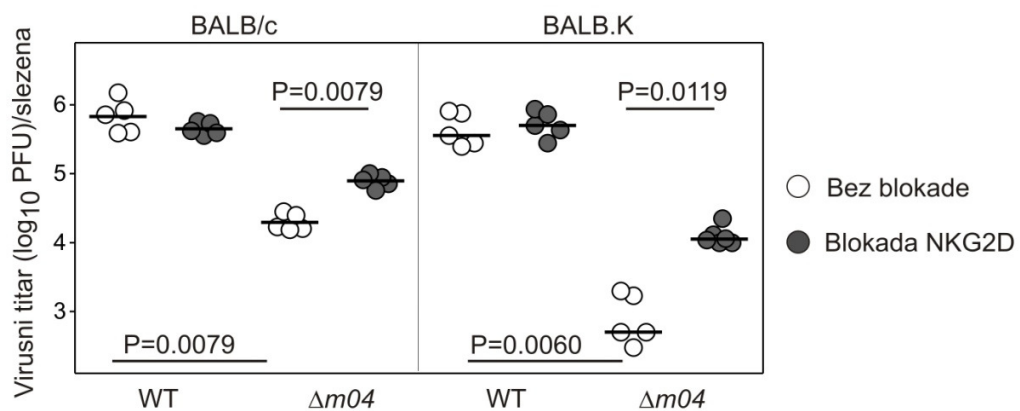


Slika 26. Infekcija miševa WT ili $\Delta m04$ MCMV-om ne rezultira značajnim perturbacijama u prisustvu pojedinih subpopulacija stanica NK. Grupe od 3 BALB/c i BALB.K miša intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. 3. dan po infekciji životinje su žrtvovane te slezena analizirana protočnom citometrijom te određen postotak stanica NK pozitivnih na ispoljavanje pojedinih receptora Ly49.

4.10. Aktivacijski receptor NKG2D sudjeluje u „missing self“-posredovanom NK-staničnom nadzoru virusa

Prepoznavanje nedostatka ispoljenosti molekula MHC I na staničnoj površini inficiranih stanica uzrokuje nedostatak inhibicijskog signala u stanicama NK. Međutim, sam nedostatak inhibicijskog signala ne uzrokuje aktivaciju stanica NK ukoliko istovremeno ne postoji aktivacijski signal posredovan vezanjem nekog od aktivacijskih receptora. Do sada je, uglavnom na modelima odbacivanja transplantata koštane srži, pokazana uloga aktivacijskih receptora NKG2D i Ly49D u posredovanju „missing self“-aktivacije stanica NK, međutim nisu definirani aktivacijski receptori koji posreduju taj fenomen tijekom virusne infekcije. Stoga sam odlučila ispitati ulogu aktivacijskih receptora NKG2D i NKp46 u kontroli infekcije $\Delta m04$ MCMV-om.

Miševi BALB/c su 8 sati prije infekcije tretirani blokirajućim antitijelom anti-NKG2D. Analiza virusnog titra pokazala je kako blokada receptora NKG2D djelomično kompromitira sposobnost miševa u kontroliranju infekcije mutantom $\Delta m04$ što ukazuje na ulogu ovog receptora u posredovanju aktivnosti stanica NK tijekom „missing self“-ovisnog prepoznavanja. Fenomen se kao i u dosadašnjim pokusima pokazao jače izražen u miševa haplotipa H-2^k, u ovom slučaju miševa BALB.K. S obzirom da je blokada receptora NKG2D izazvala samo djelomičnu osjetljivost miševa na infekciju, ispitala sam ulogu dodatnog snažnog aktivacijskog receptora - NKp46. Međutim infekcija miševa BALB/c deficijentnih za gen koji kodira za ovaj receptor, BALB/c *Ncr1*^{-/-}, nije ukazala na ulogu ovog receptora tijekom „missing self“-posredovanog prepoznavanja (nije pokazano).

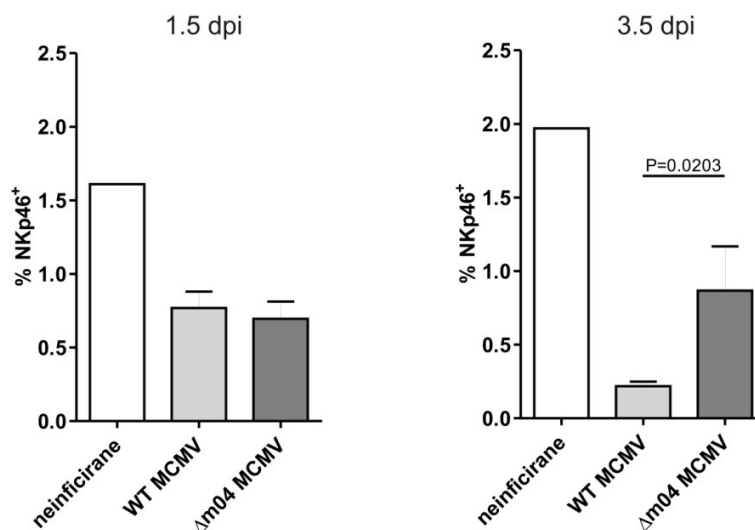


Slika 27. Aktivacijski receptor NKG2D posreduje kontrolu virusa putem „missing self“-a. Grupe od 5 BALB/c i BALB.K miševa intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. Dijelu životinja je 8 sati prije infekcije blokirao receptor NKG2D intraperitonealnim injiciranjem blokirajućih anti NKG2D protutijela (sivi kružići), dok dio životinja nije tretiran (bijeli kružići). 4. dan po infekciji životinje su žrtvovane te slezena analizirana standardnim testom virusnih čistina radi određivanja virusnog titra.

4.11. Stanice NK pokazuju sličan obrazac maturacije ali različit obrazac aktivacije te luče manje IFN γ u slučaju infekcije miševa sa virusom $\Delta m04$

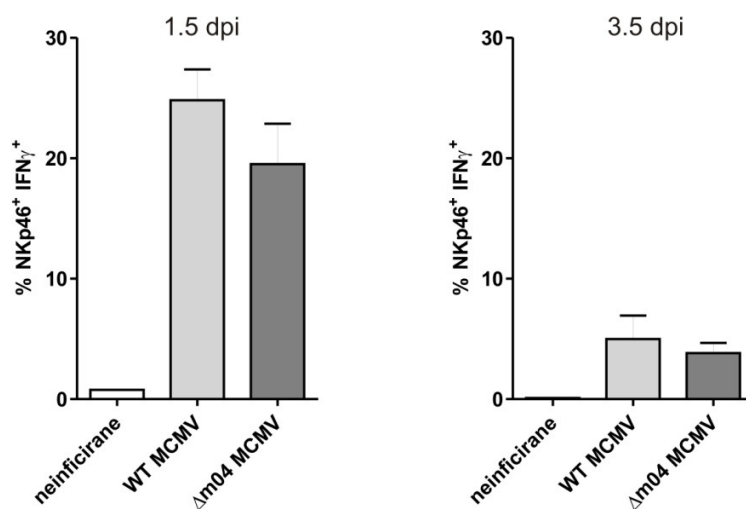
Tijekom akutne infekcije miševa sa WT MCMV-om stanice NK reagiraju brзом aktivacijom te lučenjem citolitičnih molekula perforina i granzima, kao i citokina poput IFN γ . Njihova aktivacija očituje se i ispoljavanjem aktivacijskog biljega CD69. Također, praćenjem ispoljavanja aktivacijskog biljega CD27 te molekule integrina CD11b zaključilo se kako prilikom akutne infekcije većinu NK-stanične populacije čine zrele i aktivirane te iscrpljene subpopulacije. Kako bi pokazali razlike u ponašanju stanica NK tijekom infekcije miševa sa virusima WT i $\Delta m04$ pratili smo broj stanica NK kao i obrazac ispoljavanja aktivacijskih i maturacijskih molekula tijekom ranog odgovora na infekciju, tj. 36 i 72 sata po infekciji.

Površinskim bojanjem specifičnih NK-staničnih biljega pokazali smo kako se po infekciji miševa BALB/c u slezeni smanjuje udio stanica NK. Taj je udio, međutim, očuvan tijekom infekcije miševa sa m04-deficijentnom mutantom. Prikazani odnos korelira sa očuvanjem kontrole virusnog titra u ovih miševa *in vivo*.



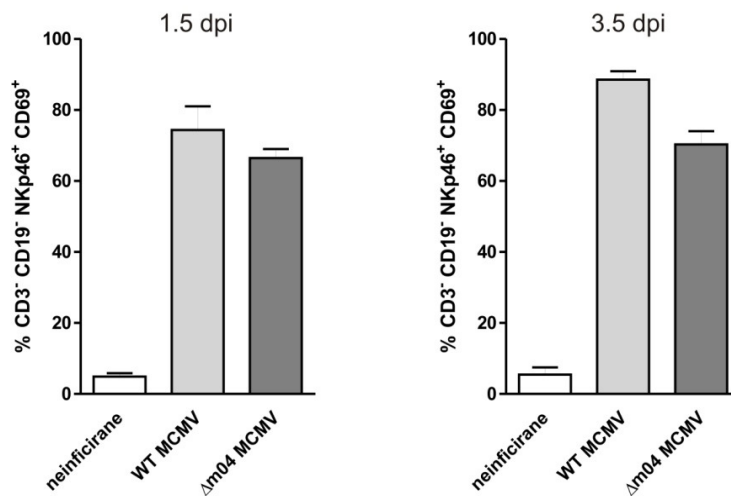
Slika 28. Udio stanica NK u slezeni smanjuje se nakon infekcije sa WT MCMV-om no očuvan je nakon infekcije sa $\Delta m04$ MCMV-om. Grupe od 3 BALB/c miša intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. 1.5 te 3.5 dana po infekciji životinje su žrtvovane te slezena analizirana protočnom citometrijom te određen postotak stanica NK.

Istovremeno, intracelularnim bojanjem molekula $IFN\gamma$ pokazala sam kako je 36 sati po infekciji udio stanica NK pozitivnih za ispoljavanje ovog citokina značajno veći u miševa inficiranih WT MCMV-om nego u miševa inficiranih sa $\Delta m04$. 72 sata po infekciji udio stanica NK pozitivnih za ispoljavanje $IFN\gamma$ značajno opada neovisno o prisutnosti m04. Ova pojava ukazuje na uzročno-posljedičnu vezu sa razinom virusnog titra u slezeni. Također, upućuje na činjenicu da se stanice NK koriste mehanizmima različitim od lučenja $IFN\gamma$ prilikom kontrole virusa $\Delta m04$, najvjerojatnije citolitičkim mehanizmima.



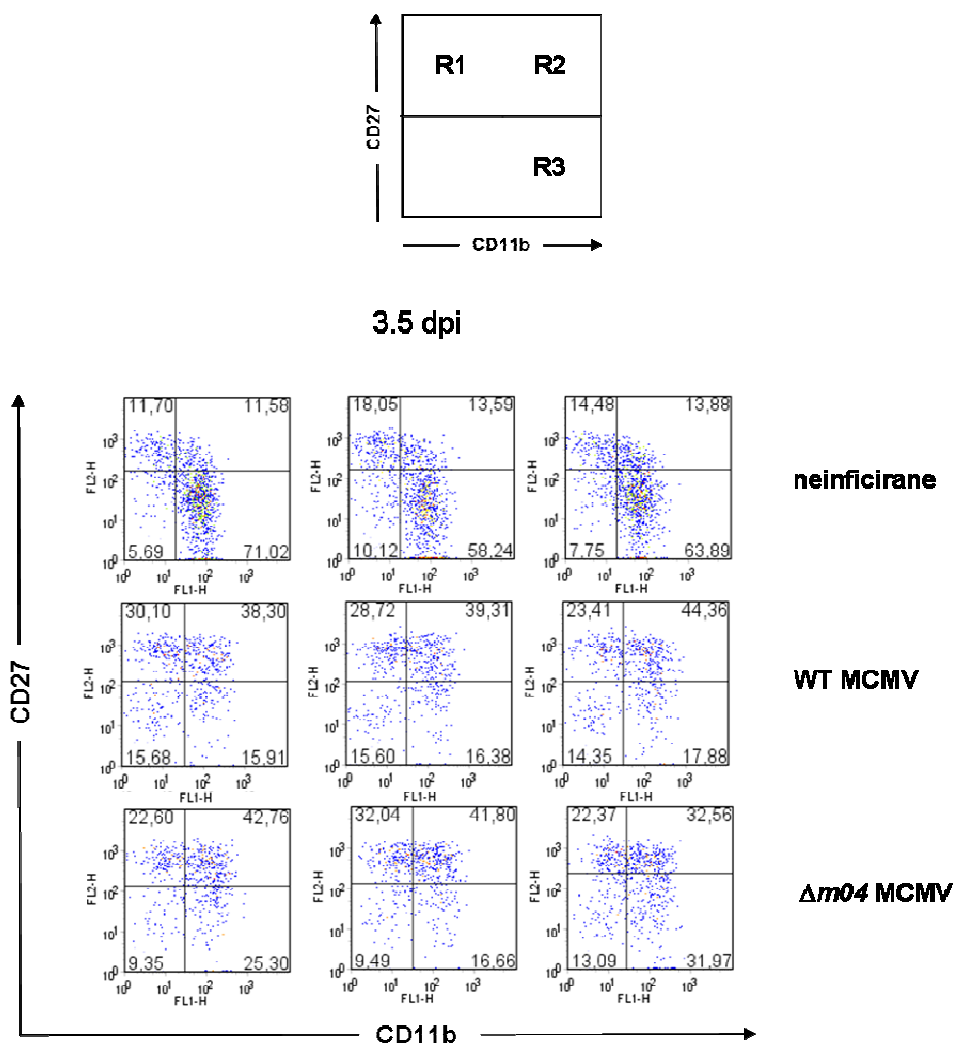
Slika 29. Udio stanica NK pozitivnih na ispoljavanje IFN γ manji je u slučaju infekcije sa $\Delta m04$ MCMV-om nego u slučaju infekcije WT-om. Grupe od 3 BALB/c miša intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. 1.5 te 3.5 dana po infekciji životinje su žrtvovane te slezena analizirana protočnom citometrijom te određen postotak stanica NK pozitivnih na ispoljavanje IFN γ .

Ovaj rezultat korelira sa rezultatima dobivenim površinskim bojanjem aktivacijskog biljega CD69 pri čemu je vidljivo da je pri infekciji WT MCMV-om veći udio stanica NK pozitivan na ispoljavanje CD69 od onog u miševa inficiranih sa $\Delta m04$.



Slika 30. Udio stanica NK pozitivnih na ispoljavanje CD69 manji je u slučaju infekcije sa $\Delta m04$ MCMV-om nego u slučaju infekcije WT-om. Grupe od 3 BALB/c miša intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. 1.5 te 3.5 dana po infekciji životinje su žrtvovane te slezena analizirana protočnom citometrijom te određen postotak stanica NK pozitivnih na ispoljavanje CD69.

Obrazac sazrijevanja stanica NK tijekom infekcije miševa WT i $\Delta m04$ MCMV-om pokazao je kako veći udio stanica NK čine zrele i aktivirane stanice, tj. one stanice sa visokom razinom ispoljavanja molekula CD27 (CD27^{hi}, tj. R1 i R2). Pritom se smanjuje razina iscrpljenih stanica, tj. onih sa visokom razinom ispoljavanja CD11b i niskom razinom ispoljavanja CD27 (CD11b^{hi}CD27^{lo}, tj. R3). Usporedbom infekcije sa WT i $\Delta m04$ MCMV-om nisu primjećene značajne razlike u ispoljenosti ovih biljega zrelosti perifernih stanica NK.

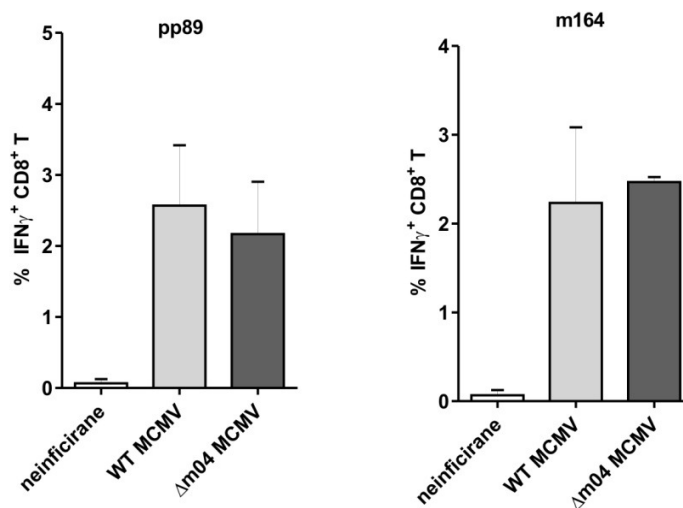


Slika 31. Obrazac sazrijevanja perifernih stanica NK u MCMV-inficiranih BALB/c miševa. Grupe od 3 BALB/c miša intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. 3.5 dana po infekciji životinje su žrtvovane te slezena analizirana protočnom citometrijom te određen postotak stanica NK pozitivnih na ispoljavanje CD11b i CD27.

4.12. NK-stanični odgovor posredovan prepoznavanjem nedostatka vlastitog ne utječe na kvalitetu odgovora limfocitima T

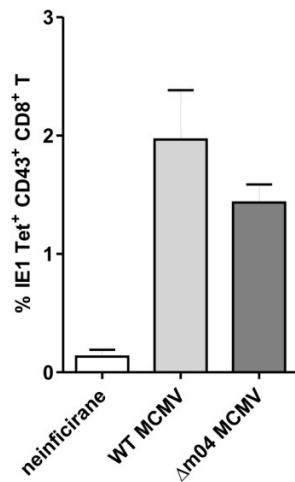
Kao što je opisano u uvodu, dosadašnji radovi ukazali su na određene kontradiktornosti u interpretaciji utjecaja inicijalnog NK-staničnog odgovora na kasnije dominantni CD8 T-limfocitni odgovor, čime su ukazali na potrebu za dodatnim revidiranjem uloge jačine NK-

staničnog odgovora, kao i samog signalnog puta uključenog u aktivaciju stanica NK. Stoga sam odlučila model infekcije miševa mutantom $\Delta m04$ koristiti kao model za ispitivanje kvalitete CD8 T-limfocitnog odgovora koji dominira nakon početnog NK-staničnog odgovora posredovanog „missing self“-prepoznavanjem. Miševima BALB/c inficiranim sa WT ili $\Delta m04$ određen je fenotipski i funkcionalni kapacitet limfocita CD8 T sedmi dan po infekciji. Dio životinja ostavljen je neinficiran i korišten kao kontrolna skupina. Pokazala sam da je udio limfocita CD8 T specifičnih za MCMV a koji ispoljavaju IFN γ podjednak u slučaju obje infekcije.



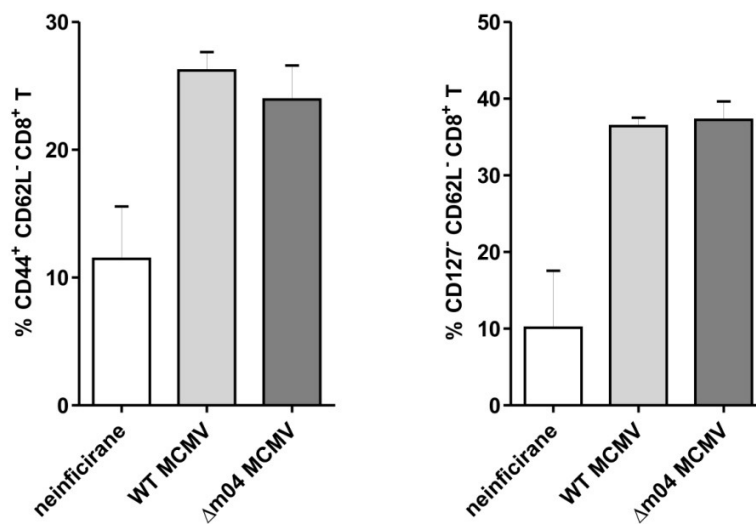
Slika 32. MCMV-specifični CD8 T-limfocitni odgovor u BALB/c miševa. Grupe od 3 BALB/c miša intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. 7 dana po infekciji životinje su žrtvovane te su splenociti nakon stimulacije MCMV-specifičnim peptidima analizirani protočnom citometrijom te određen postotak limfocita CD8 T pozitivnih na ispoljavanje IFN γ .

Isti rezultat potvrđen je i upotrebom fluorescentno obilježenih MHC I tetramera koji specifično prepoznaju MCMV-specifične subpopulacije CD8 T limfocita. Određivanjem udjela CD43⁺ Tetramer⁺ stanica utvrđena je razina aktivacije ove stanične subpopulacije.



Slika 33. MCMV-specifični CD8 T-limfocitni odgovor u BALB/c miševa. Grupe od 3 BALB/c miša intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. 7 dana po infekciji životinje su žrtvovane te slezena analizirana protočnom citometrijom te određen postotak aktiviranih MCMV-specifičnih limfocita CD8 T.

Analizom ispoljenosti specifičnih biljega vidljivo je kako se udio efektorskih limfocita CD8 T ($CD44^+CD127^+CD62L^-$) značajno povećava prilikom infekcije MCMV-om, ali se ne razlikuje u u ovisnosti o prisustvu m04.



Slika 34. Fenotip CD8 T-limfocitnog odgovora u BALB/c miševa. Grupe od 3 BALB/c miša intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. 7 dana po infekciji životinje su žrtvovane te slezena analizirana protočnom citometrijom te određen fenotip limfocita CD8 T.

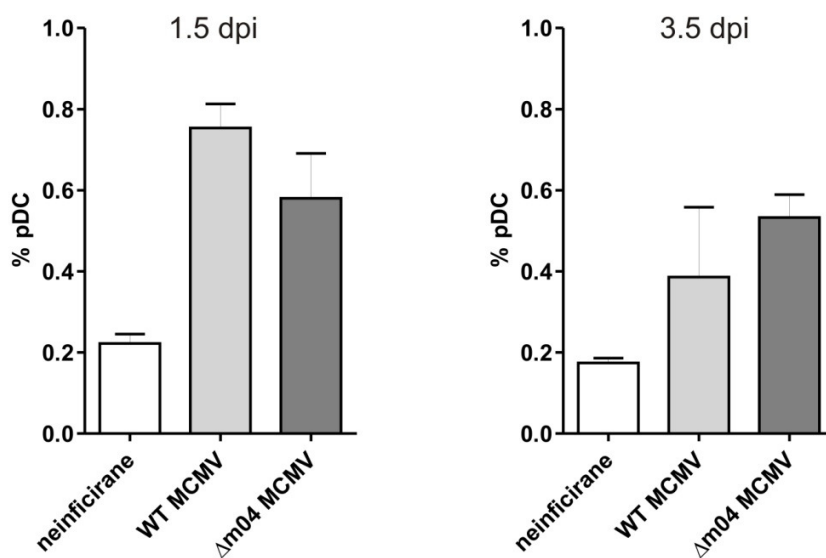
Ovi rezultati ukazuju da efikasan „missing self“-posredovani NK-stanični odgovor ne kompromitira kasniju imunološku reakciju posredovanu limfocitima CD8 T.

4.13. Kvalitetan CD8 T-limfocitni odgovor omogućen je očuvanjem broja konvencionalnih dendritičkih stanica

Interakciju između stanica NK i limfocita T uvelike posreduju dendritičke stanice, ali njihova uloga tijekom citomegalovirusne infekcije nije dovoljno razjašnjena. Smatra se da tijekom prvih 24 sata infekcije konvencionalne dendritičke stanice sa funkcijom antigenske prezentacije bivaju inficirane te je poznato da se njihov udio u slezeni smanjuje. Istovremeno se mijenja obrazac lučenja IL-12 od strane tih stanica, a taj citokin za posljedicu ima aktivaciju limfocita T, te potiče lučenje IFN γ od strane stanica NK i limfocita T. Za razliku od njih plazmacitoidne dendritičke stanice nisu inficirane te one tijekom infekcije luče tip I interferone, koji imaju antiviralni ali i imunosupresivni učinak.

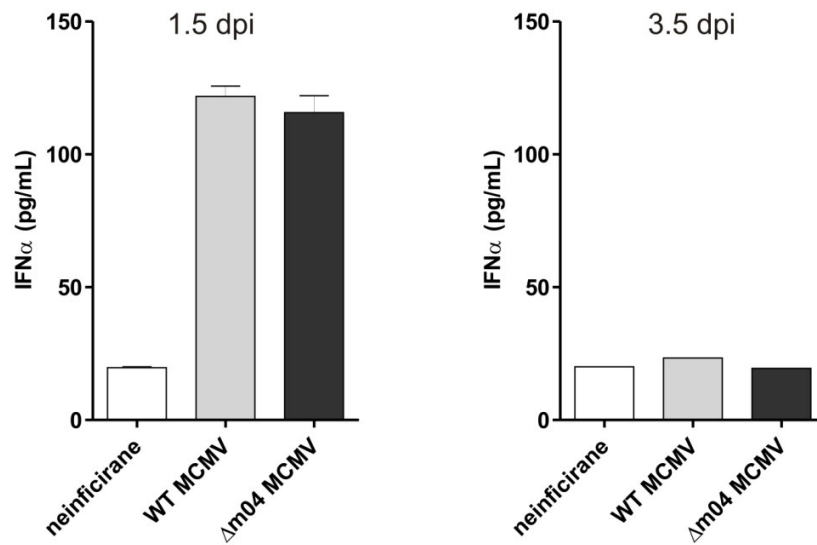
Kako bi objasnila gore opisani rezultat, gdje sam pokazala kako snažan inicijalni NK-stanični odgovor ne utječe na kvalitetu kasnijeg CD8 T-limfocitnog odgovora, odlučila sam ispitati dolazi li do fenotipskih i funkcionalnih promjena u odjeljku dendritičkih stanica. Slezene miševa inficiranih sa WT ili $\Delta m04$ analizirane su 36 i 72 sata po infekciji protočnom citometrijom pri čemu su određeni udjeli konvencionalnih i plazmacitoidnih dendritičkih stanica. Istovremeno, kako bi odredila da li je narušena funkcionalnost plazmacitoidnih dendritičkih stanica, odredila sam razinu IFN α u serumu inficiranih životinja. Iz analize je vidljivo kako se 36 sati po infekciji udio pDC-ova povisuje u odnosu na neinficiranu kontrolnu grupu miševa. Istovremeno, taj udio podjednak je kod miševa inficiranih sa WT i $\Delta m04$ MCMV-om. 72 sata po

infekciji udio pDC-ova se smanjuje u inficiranih životinja, no još uvijek je viši u odnosu na neinficirane životinje.



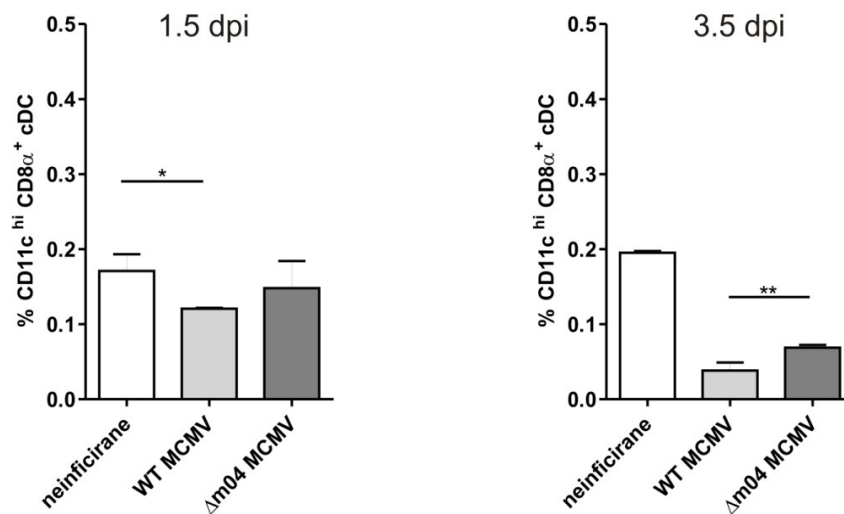
Slika 35. Udio plazmacitoidnih dendritičkih stanica (pDC) ne ovisi o jačini inicijalnog NK-staničnog odgovora. Grupe od 3 BALB/c miša intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. 1.5 i 3.5 dana po infekciji životinje su žrtvovane, slezena analizirana protočnom citometrijom te određen udio pDC.

Razina $IFN\alpha$ u serumu podjednaka je u životinja inficiranih WT i $\Delta m04$ MCMV-om no značajno viša od razine u serumu neinficiranih životinja i smanjuje se 72 sata po infekciji.



Slika 36. Razina IFN α inficiranih životinja u serumu ne ovisi o jačini inicijalnog NK-staničnog odgovora. Grupe od 3 BALB/c miša intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. 1.5 i 3.5 dana po infekciji životinjama je izoliran serum te ELISA-om utvrđena razina citokina.

Kao što je poznato iz literature, 72 sata po infekciji, udio cDC-ova u slezeni WT-inficiranih miševa je smanjen u odnosu na neinficirane miševe [170]. Međutim, po infekciji miševa sa $\Delta m04$ MCMV-om udio cDC-ova u slezeni je očuvan i viši u odnosu na miševe inficirane WT MCMV-om, što upućuje na očuvanje antigenske prezentacije te dijelom objašnjava efikasan CD8 T-limfocitni odgovor.



Slika 37. Udio konvencionalnih dendritičkih stanica (cDC) ovisan je o jačini inicijalnog NK-staničnog odgovora. Grupe od 3 BALB/c miša intravenozno su inficirane sa 2×10^5 PFU WT ili $\Delta m04$ MCMV-a. 1.5 i 3.5 dana po infekciji životinje su žrtvovane, slezena analizirana protočnom citometrijom te određen udio cDC. (* $P < 0.01$, ** $P < 0.005$)

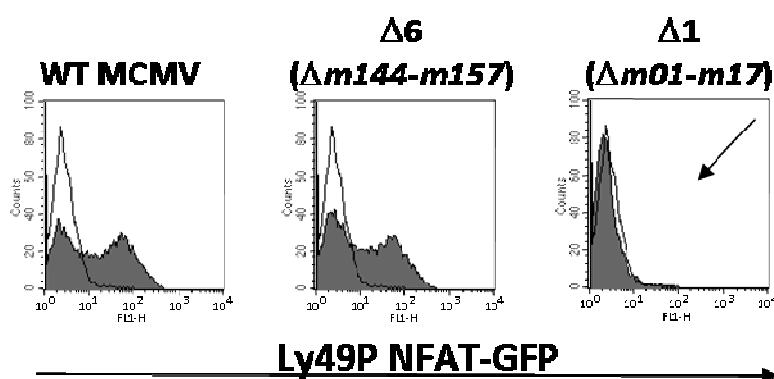
Ovi rezultati, kao i rezultati poznati iz literature, ukazuju na činjenicu da utjecaj stanica NK na dinamiku i kvalitetu CD8 T-limfocitnog odgovora ovisi o kontekstu infekcije i aktivacije stanica NK, sugerirajući na kompleksnost i nepostojanje unificiranog moda interakcije komponenti imunološkog odgovora.

4.14. MCMV m04 je nužan za prepoznavanje inficiranih stanica preko aktivacijskog receptora Ly49P

Iz literature je poznato da postoje dva aktivacijska receptora Ly49, Ly49H i Ly49P, koja specifično prepoznaju stanice inficirane MCMV-om. I dok je za Ly49H poznato da prepoznaje direktno glikoprotein m157, za Ly49P poznato je kako prepoznaje MHC molekulu H-2D^k u kontekstu virusne infekcije. Stoga smo postavili pitanja: (i) koji virusni faktor(i) je/su potrebni za

prepoznavanje inficiranih stanica od strane Ly49P i (ii) postoje li dodatni aktivacijski receptori Ly49 koji specifično prepoznaju MCMV-inficirane stanice.

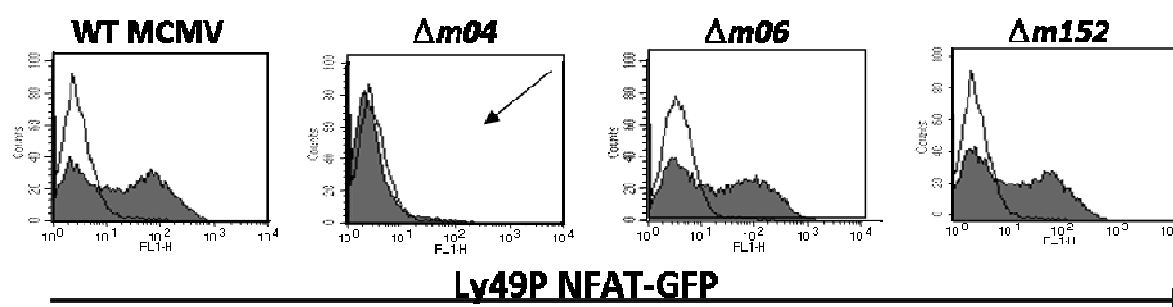
Kako bi identificirala virusni gen nužan za prepoznavanje od strane Ly49P, ko-kultivirala sam GFP-reportersku liniju koja ispoljava Ly49P sa ciljnim stanicama haplotipa H-2^k (CBA MEF) koje su bile inficirane različitim virusnim mutantima kojima su nedostajali određeni dijelovi genoma. Analiza rezultata pokazala je kako stanice inficirane mutantom kojoj nedostaju geni od m01 do m22 nisu sposobne aktivirati reportersku liniju što ukazuje na činjenicu da se odgovoran gen nalazi u toj regiji. Kao kontrola korištene su neinficirane stanice koje nisu aktivirale, te WT MCMV-inficirane stanice koje su aktivirale reportersku liniju, čime sam potvrdila kritičnost virusne infekcije u H-2D^k-posredovanom prepoznavanju inficiranih stanica od strane Ly49P.



Slika 38. Ly49P-reporterske stanice ne aktiviraju se po ko-kultivaciji sa ciljnim stanicama inficiranim MCMV-mutantom kojoj nedostaju geni iz regije m1-m17. Ly49P-reporterske stanice bile su ko-kultivirane sa CBA MEF-om inficiranim sa navedenim mutantima. Nakon 24 sata koinkubacije reporterske su stanice sakupljene i analizirane na ispoljavanje GFP-a (sivi histogram). Bijeli histogrami prikazuju razinu ispoljavanja GFP-a u reporterskim stanicama ko-kultiviranim sa neinficiranim ciljnim stanicama.

Kako se u regiji *m01-m22* nalaze dva gena koja kodiraju regulatore ispoljavanja molekula MHC I: *m04* i *m06*, odlučila sam testirati mutante kojima nedostaju navedeni individualni

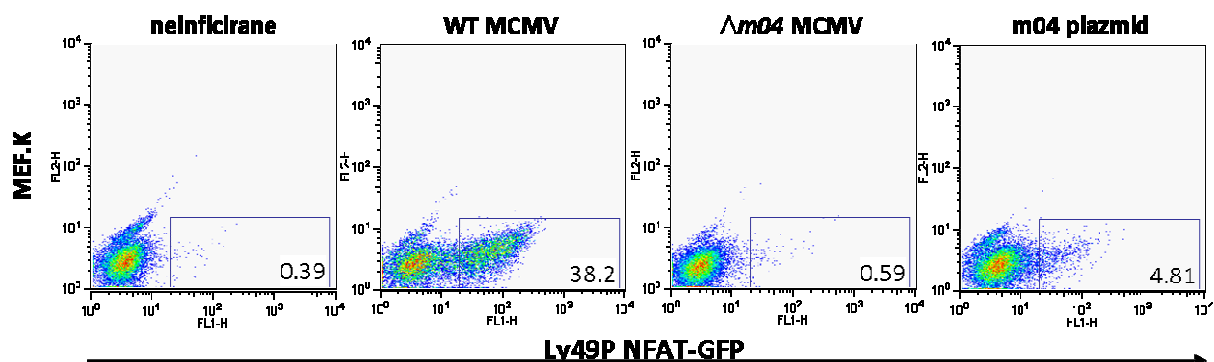
regulatori MHC I. Rezultati su pokazali kako stanice inficirane mutantom kojoj nedostaje gen *m04* ($\Delta m04$) nisu mogle aktivirati reportersku liniju, pokazujući kritičnu ulogu *m04* u prepoznavanju inficiranih stanica od strane Ly49P. Reporterske stanice inkubirane sa stanicama inficiranim sa $\Delta m06$ ili $\Delta m152$ bile su aktivirane kao u slučaju WT MCMV infekcije.



Slika 39. Aktivacija Ly49P-reporterskih stanica ovisna je o prisustvu *m04*. Ly49P-reporterske stanice bile su ko-kultivirane sa CBA MEF-om inficiranim sa navedenim mutantima. Nakon 24 sata koinkubacije reporterske su stanice sakupljene i analizirane na ispoljavanje GFP-a (sivi histogram). Bijeli histogrami prikazuju razinu ispoljavanja GFP-a u reporterskim stanicama ko-kultiviranim sa neinficiranim ciljnim stanicama.

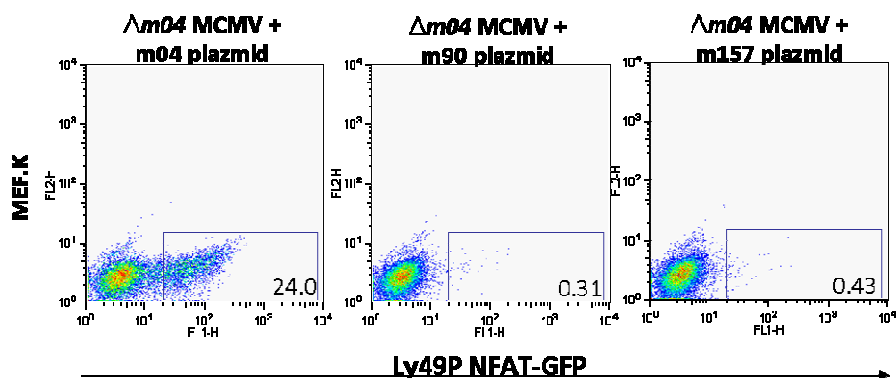
4.15. Prisustvo *m04* na površini inficiranih stanica je kritično ali ne i dostatno za prepoznavanje preko aktivacijskih receptora Ly49

Kako bih provjerila da li je kompleks *m04*/MHC I dostatan za prepoznavanje od strane Ly49P, ko-kultivirala sam staničnu liniju MEF.K sa Ly49P-ispoljavajućim reporterskim stanicama. Za razliku od WT MCMV-inficiranih ciljnih stanica neinficirana stanična linija MEF.K kao ni ona inficirana $\Delta m04$ MCMV-om ili transfecirana *m04*-ispoljavajućim plazmidom nisu uspjele aktivirati reportersku liniju što ukazuje da je *m04* nužan ali ne i dostatan za prepoznavanje preko Ly49P.



Slika 40. MCMV m04 važan je ali ne i dostatan za aktivaciju Ly49P-reporterskih stanica. Ly49P-reporterske stanice bile su ko-kultivirane sa stanicama MEF.K inficiranim sa navedenim mutantama. Nakon 24 sata koinkubacije reporterske su stanice sakupljene i analizirane na ispoljavanje GFP-a. Brojke na točkastom dijagramu pokazuju postotak reporterskih stanica koje ispoljavaju GFP. Rezultat prikazan na slici napravljen je na Sveučilištu McGill, Montreal, Canada, u grupi Dr. Silvie M. Vidal.

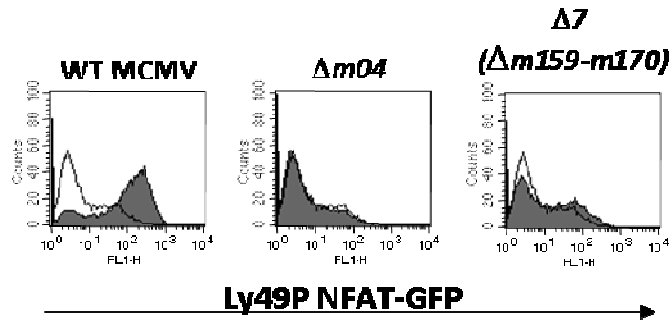
Da bih utvrdila da li je dodatni faktor potreban za prepoznavanje kodiran u virusnom genomu, MEF.K liniju transfecirala sam pojedinačno plazmidima koji ispoljavaju gene MCMV-a: m04, m90 i m157 te ih potom inficirala sa mutantom $\Delta m04$ te ko-kultivirala sa reporterskim stanicama. U slučaju stanica koje su sa plazmida ispoljavale m04, reporterske stanice su se aktivirale, iako ne do razine izazvane ko-kultivacijom sa WT MCMV-inficiranim stanicama. U slučaju irelevantnih proteina m90 i m157 aktivacija reporterskih stanica je očekivano izostala. Dobiveni rezultati upućuju kako postoji dodatni virusni faktor(i) potreban za prepoznavanje inficiranih stanica od strane receptora Ly49P.



Slika 41. Transfekcija sa m04 komplementira infekciju sa $\Delta m04$ MCMV-om prilikom aktivacije reporterskih stanica. Stanice MEF.K stabilno su transfecirane sa navedenim plazmidima te potom inficirane sa $\Delta m04$ MCMV-om i ko-kultivirane sa Ly49P-reporterskim stanicama. Nakon 24 sata inkubacije reporterske su stanice sakupljene i analizirane na ispoljavanje GFP-a. Brojke na točkastom dijagramu pokazuju postotak reporterskih stanica koje ispoljavaju GFP. Rezultat prikazan na slici napravljen je na Sveučilištu McGill, Montreal, Canada, u grupi Dr. Silvie M. Vidal.

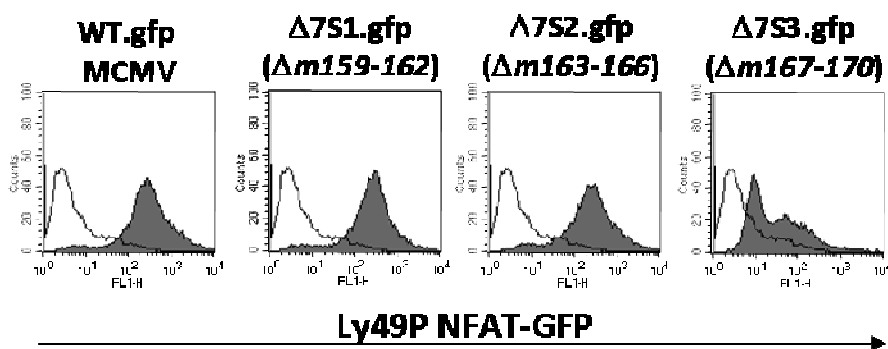
4.16. Prepoznavanje od strane aktivacijskog receptora zahtijeva prisustvo faktora iz $\Delta 7$ regije genoma MCMV-a

Da bi identificirala dodatni faktor(e) nužan za prepoznavanje preko Ly49P, ponovno sam ko-kultivirala reporterske stanice sa ciljnim stanicama inficiranim sa različitim delecijским mutantama. Analiza je pokazala kako reporterske stanice nisu bile aktivirane u uvjetima inkubacije sa ciljnim stanicama inficiranim sa mutantom kojoj nedostaju geni od *m159* do *m170* ($\Delta 7$).



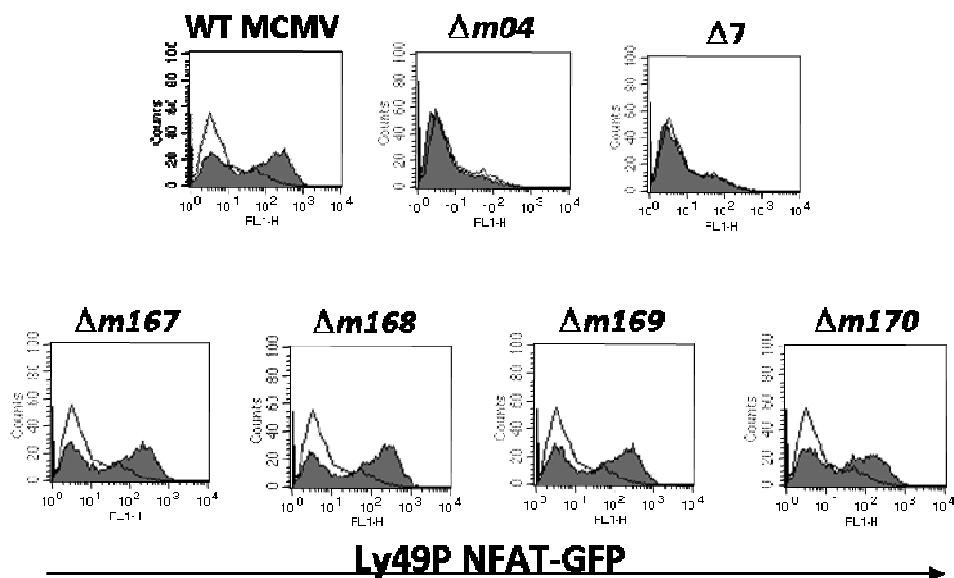
Slika 42. Virusni element iz regije $\Delta 7$ ($m159-m170$) potreban je za aktivaciju Ly49P-reporterskih stanica. Ly49P-reporterske stanice bile su ko-kultivirane sa CBA MEF-om inficiranim sa navedenim mutantama. Nakon 24 sata koinkubacije reporterske su stanice sakupljene i analizirane na ispoljavanje GFP-a (sivi histogram). Bijeli histogrami prikazuju razinu ispoljavanja GFP-a u reporterskim stanicama ko-kultiviranim sa neinficiranim ciljnim stanicama.

Kako bi suzila regiju genoma odgovornu za aktivaciju stanica NK, ko-inkubirala sam reportere sa ciljnim stanicama inficiranim sa manjim delecijским mutantama: $\Delta 7S.1$ ($\Delta m159-m162$), $\Delta 7S2.3$ ($\Delta m163-m166$), $\Delta 7S.3$ ($\Delta m167-m170$). Dok su stanice inficirane mutantama $\Delta 7S.1$ i $\Delta 7S.2$ aktivirale reportersku liniju, u slučaju stanica inficiranih sa $\Delta 7S.3$ aktivacija je izostala, čime se odgovorna regija suzila na samo četiri gena: $m167$, $m168$, $m169$ i $m170$.



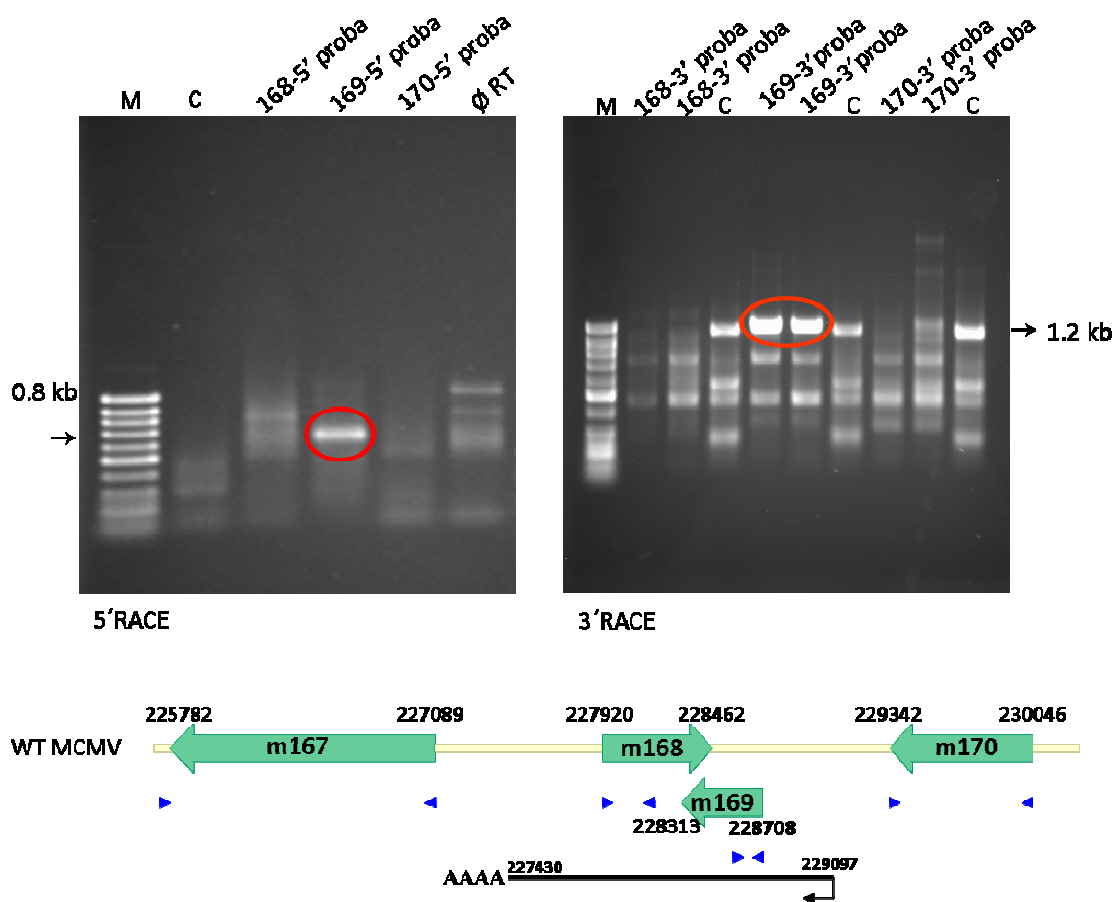
Slika 43. Virusni element iz regije $\Delta 7S.3$ ($m167-m170$) potreban je za aktivaciju Ly49P-reporterskih stanica. Ly49P-reporterske stanice bile su ko-kultivirane sa CBA MEF-om inficiranim sa navedenim mutantama. Nakon 24 sata koinkubacije reporterske su stanice sakupljene i analizirane na ispoljavanje GFP-a (sivi histogram). Bijeli histogrami prikazuju razinu ispoljavanja GFP-a u reporterskim stanicama ko-kultiviranim sa neinficiranim ciljnim stanicama.

U svrhu identifikacije gena odgovornog za interakciju sa Ly49P, provela sam reporterski test sa ciljnim stanicama inficiranim sa mutantima kojima nedostaju individualno gore navedeni geni ($\Delta m167$, $\Delta m168$, $\Delta m169$, $\Delta m170$). Međutim, iznenađujuće, u uvjetima infekcije sa individualnim mutantima reporterske stanice bile su normalno aktivirane (u usporedbi sa WT MCMV-inficiranim stanicama) ukazujući na činjenicu da ni jedan od predviđenih gena individualno nije odgovoran za gore opisani fenomen.



Slika 44. Nijedan od gena iz $\Delta 7.S3$ regije individualno nije kritičan za aktivaciju Ly49P-reporterskih stanica. Ly49P-reporterske stanice bile su ko-kultivirane sa CBA MEF-om inficiranim sa navedenim mutantima. Nakon 24 sata koinkubacije reporterske su stanice sakupljene i analizirane na ispoljavanje GFP-a (sivi histogram). Bijeli histogrami prikazuju razinu ispoljavanja GFP-a u reporterskim stanicama ko-kultiviranim sa neinficiranim ciljnim stanicama.

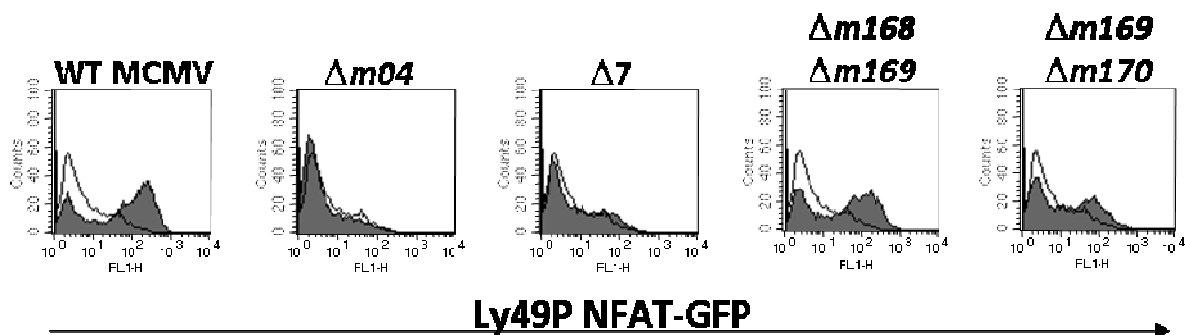
Pri analizi ovih rezultata treba voditi računa da su mutante konstruirane i generirane prema otvorenim okvirima čitanja predviđenima bioinformatičkom analizom. Stoga sam, da bi bolje analizirala to područje genoma, provela analizu transkripcijske aktivnosti te regije.



Slika 45. U regiji genoma koja obuhvaća gene *m167-m170* dominira jedan transkript. Stanice BALB/c MEF inficirane su sa WT MCMV-om te je iz njih nakon 12 sati izolirana ukupna RNA. Uz pomoć oligo-dT i gen-specifičnih početnica umnožen je transkript te mu određena sekvenca. (M=DNA marker, C i ØRT=kontrolni uzorak, 5' i 3' probe=gen-specifične probe) Donji dio slike shematski prikazuje položaj transkripta u odnosu na bioinformatički predviđene otvorene okvire čitanja. (brojevi prikazuju predviđene granice gena/transkripta, strelice prikazuju položaj početnica korištenih pri uklanjanju gena iz genoma)

Rezultati umnožavanja krajeva molekula cDNA (eng. *Rapid Amplification of cDNA Ends* – RACE) ukazali su na činjenicu da u toj regiji postoji samo jedan transkripcijski produkt, koji sekvencom odgovara produktu gena *m169* ali se svojim 5' i 3' netranslatirajućim regijama preklapa sa predviđenim područjima gena *m168* i *m170*, što djelomično objašnjava rezultate dobivene nakon analize individualnih mutanti tijekom reporterskog testa.

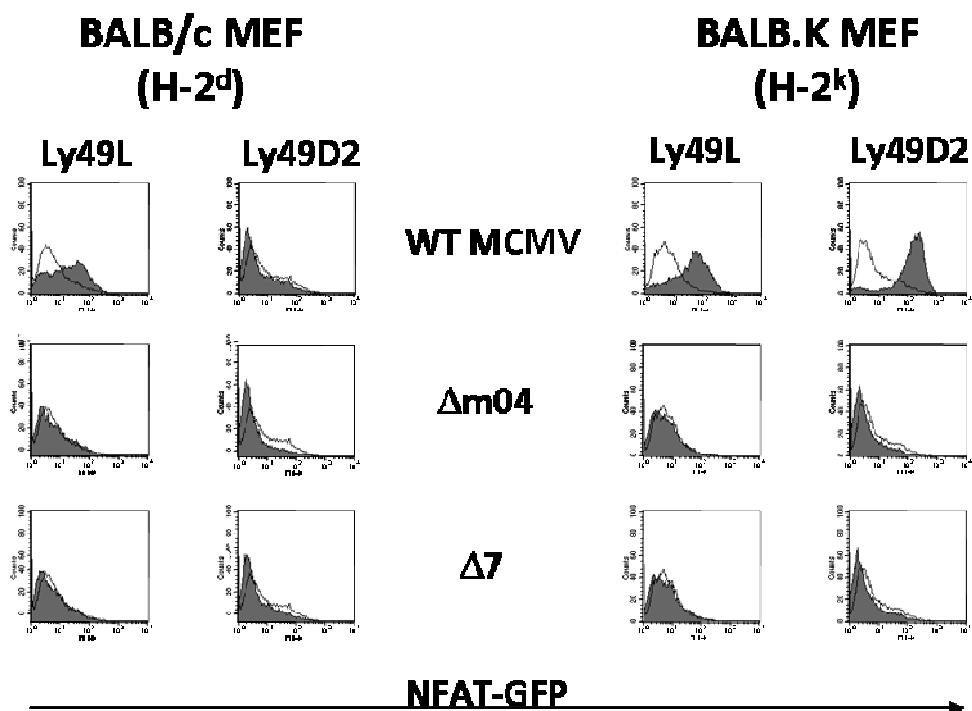
Ulogu transkripta djelomično sam potvrdila nakon ko-kultivacije reporterskih stanica sa ciljnim stanicama inficiranim sa mutantama kojima nedostaju po dva susjedna gena u kombinaciji: $\Delta m168m169$ te $\Delta m169m170$, pri čemu je vidljivo kako aktivacija reportera gotovo u potpunosti izostaje u slučaju $\Delta m169m170$ te samo djelomično u slučaju $\Delta m168m169$ što ukazuje na moguću važniju ulogu 5' kraja ovog transkripta.



Slika 46. Aktivacija reporterskih stanica ovisna je o prisutnosti transkripta iz regije $\Delta 7.S3$. Ly49P-reporterske stanice bile su ko-kultivirane sa CBA MEF-om inficiranim sa navedenim mutantama. Nakon 24 sata koinkubacije reporterske su stanice sakupljene i analizirane na ispoljavanje GFP-a (sivi histogram). Bijeli histogrami prikazuju razinu ispoljavanja GFP-a u reporterskim stanicama ko-kultiviranim sa neinficiranim ciljnim stanicama.

4.17. Aktivacijski receptori Ly49L i Ly49D2 također prepoznaju molekule MHC I u kontekstu MCMV-kodiranog m04

Postojanje dva aktivacijska receptora Ly49 specifična za prepoznavanje MCMV-inficiranih stanica potaklo nas je na ispitivanje postoje li i dodatni receptori koji su također specifični za MCMV. Stoga sam provela test koristeći reporterske stanice koje su ispoljavale individualne aktivacijske receptore Ly49 te identificirala dva dodatna receptora specifična za prepoznavanje WT MCMV-inficiranih stanica haplotipa H-2^k: Ly49L, ispoljen u miševa haplotipa BALB, te Ly49D2, ispoljen u miševa PWK/Pas. Istovremeno, ti receptori nisu prepoznavali neinficirane stanice. Želeći provjeriti da li je prepoznavanje inficiranih stanica ograničeno na pojedini haplotip molekula MHC I, reporterske smo stanice ko-inkubirali sa WT MCMV-inficiranim stanicama haplotipa H-2^d. I dok je aktivacija Ly49L-reporterskih stanica bila održana, Ly49D2-reporterske stanice nisu se aktivirale, ukazujući na to da je prepoznavanje od strane ovog receptora ograničeno na ciljne stanice haplotipa H-2^k. Kako bi karakterizirali virusni faktor uključen u ovo prepoznavanje, reporterske smo stanice ko-inkubirali sa ciljnim stanicama inficiranim sa različitim MCMV-delecijskim mutantama te, iznenađujuće, pronašli da su Ly49L i Ly49D2 također specifični za prepoznavanje kompleksa MHC I/m04. Istovremeno, oba su ova receptora za prepoznavanje zahtijevala i prisustvo faktora iz $\Delta 7$ regije.



Slika 47. Dva dodatna aktivacijska receptora Ly49 specifično prepoznaju kompleks m04/MHC I. Ly49L- i Ly49D2-reporterske stanice bile su ko-kultivirane sa CBA i BALB/c MEF-om inficiranim sa navedenim virusima. Nakon 24 sata koinkubacije reporterske su stanice sakupljene i analizirane na ispoljavanje GFP-a (sivi histogram). Bijeli histogrami prikazuju razinu ispoljavanja GFP-a u reporterskim stanicama ko-kultiviranim sa neinficiranim ciljnim stanicama.

Zaključno, ovi rezultati ukazuju na postojanje barem tri aktivacijska receptora Ly49: Ly49P, Ly49L i Ly49D2 koji specifično prepoznaju MCMV-inficirane stanice preko kompleksa m04/MHC I. Također, to prepoznavanje ovisno je ne samo o prisutnosti već i o haplotipu molekula MHC I te o dodatnom faktoru/faktorima kodiranim u virusnom genomu.

5. RASPRAVA

Mnogi virusi su tijekom ko-evolucije sa domaćinom razvili mehanizme kojima reguliraju ispoljavanje molekula MHC I kako bi izbjegli antigensku prezentaciju i prepoznavanje od strane limfocita CD8 T. Sukladno tome, takve MHC I-deficitne inficirane stanice trebale bi biti podložne ubijanju od strane stanica NK i to na temelju „missing self“-posredovanog prepoznavanja. Mišji citomegalovirus kodira tri proteina koja reguliraju ispoljavanje molekula MHC I. m152 i m06 imaju jasnu ulogu u negativnoj regulaciji ispoljavanja molekula MHC I, pri čemu m152 zaustavlja transport ovih molekula u endoplazmatskoj mrežici dok ih m06 usmjerava u lizosome. Uloga m04, pak, do sada nije bila tako jasna. Rani radovi pokazali su kako m04 veže molekule MHC I te potpomaže njihov odlazak na površinu, tj. antagonizira učinak m152 [132, 134, 168]. Međutim, u literaturi se može pronaći i podatak o ulozi m04 u izbjegavanju MCMV-specifičnog CD8 odgovora te je zapravo nejasno da li vezanje m04 na MHC I interferira sa vezanjem peptida namjenjenog prezentaciji ili prepoznavanjem od strane T-staničnog receptora [135]. Naša hipoteza je bila da m04 originalno služi virusu da bi na površini stanice osigurao dovoljno molekula MHC I koje su dostatne za ligaciju inhibicijskih receptora Ly49 i inhibiciju NK-staničnog odgovora.

U ovom radu pokazala sam novi mehanizam kojim se mišji citomegalovirus služi u izbjegavanju NK-staničnog odgovora usprkos snažnoj negativnoj regulaciji ispoljavanja molekula MHC I. Naime, koristeći test reporterskih stanica pokazala sam kako prisutnost m04 tijekom WT MCMV infekcije stanica antagonizira učinak m152 i omogućava dolazak dovoljne količine liganada za inhibicijski receptor Ly49A (Slika 10. i 14.). Zanimljivo, uspoređujući stupanj aktivacije reporterskih stanica pri ko-kultivaciji sa neinficiranim i WT MCMV-

inficiranim ciljnim stanicama primjetila sam kako prisustvo m04, tj. kompleksa m04/MHC I (infekcija sa WT MCMV) rezultira većim postotkom aktiviranih reporterskih stanica nego u slučaju ligacije receptora sa njegovim nativnim ligandom – H-2D^d ili H-2D^k (Slika 11.). To upućuje na mogućnost da m04 zaista mijenja konformaciju molekula MHC I te na taj način osigurava veći afinitet receptora Ly49A za kompleks.

Deplecijom ukupnih stanica NK kao i deplecijom populacija stanica NK koje nose pojedine inhibicijske receptore Ly49 (Slika 18. i 25.) pokazala sam ulogu „missing self“-prepoznavanja u kontroli virusne infekcije. Deplecija pojedinih subpopulacija ukazala je na dominantnu ulogu Ly49G2⁺ stanica NK u kontroli $\Delta m04$ MCMV-infekcije. Uloga Ly49G2⁺ stanica NK pokazana je i ranije u literaturi u kontroli WT MCMV-infekcije u miševa C57L.M-H2^k gdje te stanice ekspandiraju po infekciji te posreduju rezistenciju [171], ali je njihova proliferacija primjećena i u slučaju infekcije virusom uzročnikom limfocitnog koriomeningitisa (LCMV), mišjim hepatitis virusom ili virusom vakcinije [172, 173]. Zanimljivo, Ly49G2⁺ stanice NK su i prva populacija stanica koje se javlja nakon transplantacije hematopoetskih matičnih stanica [174]. Sama dominacija te subpopulacije nije razjašnjena u literaturi, te možemo samo nagađati zbog čega te stanice pokazuju snažnu reaktivnost. Naime, gotovo sve Ly49G2⁺ stanice NK ispoljavaju visoku razinu receptora za IL-12 (IL-12R β 2) [175] zbog čega bi mogle pokazivati bolji odgovor na IL-12 izlučen tijekom infekcije. Pa ipak naši rezultati ne ukazuju na značajne razlike u serumskoj razini IL-12 tijekom WT i $\Delta m04$ infekcije, kao ni razliku u postotku IFN γ ⁺ stanica koje ispoljavaju Ly49G2 (nije pokazano). U H-2^k miševa, gdje je fenotip m04 najizraženiji i gdje se Ly49G2 veže samo na molekulu H-2D^k [40], nedostatak m04 (infekcija sa $\Delta m04$ MCMV) rezultira niskom razinom ispoljenosti molekula MHC I, reduciranim inhibicijskim signalom i snažnom kontrolom virusnog titra. U H-2^d miševa, gdje Ly49G2 veže

H-2D^d i H-2L^d [40], unatoč smanjenom ispoljavanju molekula MHC I možemo pretpostaviti da dva liganda posreduju inhibicijske signale te je i fenotip m04 slabije izražen u ovih miševa (u usporedbi sa miševima H-2^k). U miševa haplotipa H-2^b, gdje fenotip m04 nije izražen, receptor Ly49G2 nema liganda. Ly49G2⁺ stanice u našem modelu pokazuju najbolju sposobnost detekcije nedostatka vlastitog što može biti posljedica činjenice da taj receptor provodi slabiji inhibicijski signal u odnosu na Ly49A, Ly49C i Ly49I [176]. Iako u literaturi taj fenomen nije razjašnjen on može biti posljedica slabijeg premještanja ovog receptora u imunološke sinapse ili je moguće da Ly49G2⁺ stanice preferencijalno ispoljavaju aktivacijski receptor koji posreduje njihovu aktivnost. U prilog tome idu i podaci iz literature koji ukazuju na preferencijalno ispoljavanje aktivacijskih receptora Ly49D i Ly49H [177] te naši rezultati koji ukazuju na važnu ulogu aktivacijskog receptora NKG2D u „missing self“-posredovanoj aktivaciji stanica NK (Slika 27.).

Ly49A⁺ stanice NK čine samo oko 5-10 % ukupne populacije stanica NK u H-2^k i H-2^d miševa. Upravo zbog toga te stanice, iako sposobne detektirati „missing self“, slabije doprinose kontroli $\Delta m04$ *in vivo*. U miševa haplotipa H-2^k i H-2^d Ly49A prepoznaje i veže H-2D^k i H-2D^d [38]. Rezultati našeg reporterskog testa pokazuju kako je aktivacija reporterskih stanica koje nose Ly49A jača u slučaju ko-kultivacije sa stanicama podrijetlom iz miševa H-2^k nego u slučaju ko-kultivacije sa stanicama iz miševa H-2^d. To doprinosi objašnjenju opaženih rezultata koji pokazuju najizraženiji fenotip m04 u miševa haplotipa H-2^k, slabije izražen u miševa haplotipa H-2^d, te nedostatak fenotipa u miševa haplotipa H-2^b. Iako kvantitativne razlike u fenotipu m04, u nedostatku literaturnih podataka o jačini vezanja receptora Ly49A na različite ligande, nije lako objasniti, rad Jonsson H i suradnika, koji govori o jačem stupnju licenciranja Ly49A⁺ stanica NK u miševa haplotipa H-2^k nego u miševa haplotipa H-2^d, govori u prilog opaženim rezultatima.

Ly49C⁺ stanice NK, iako predstavljaju gotovo 50 % ukupne populacije stanica NK, ne pridonose uvelike „missing self“-posredovanoj kontroli $\Delta m04$ *in vivo*. Činjenica da Ly49C prepoznaje H-2K^b i H-2D^b u miševa haplotipa H-2^b, H-2D^d i H-2K^d u miševa haplotipa H-2^d te samo H-2D^k u miševa haplotipa H-2^k [41], govori u prilog o ulozi m04 kao regulatora stupnja inhibicije stanica NK. Nedostatak uloge Ly49C u „missing self“-posredovanoj kontroli $\Delta m04$ -infekcije može se diskutirati i kroz činjenicu da u prirodi u divljim izolatima MCMV-a postoje varijante gena m157 koje mogu vezati Ly49C i posredovati inhibiciju [119]. Stoga nije isključeno da u slučaju infekcije sa $\Delta m04$ MCMV-om sam m157 ili neke druge molekule slične molekulama MHC I posreduju inhibiciju stanica NK preko Ly49C. Naši preliminarni rezultati, prema kojima aktivacija reporterskih stanica koje ispoljavaju Ly49C izostaje u slučaju infekcije ciljnih stanica sa $\Delta m157$ MCMV-om, govore u prilog toj teoriji.

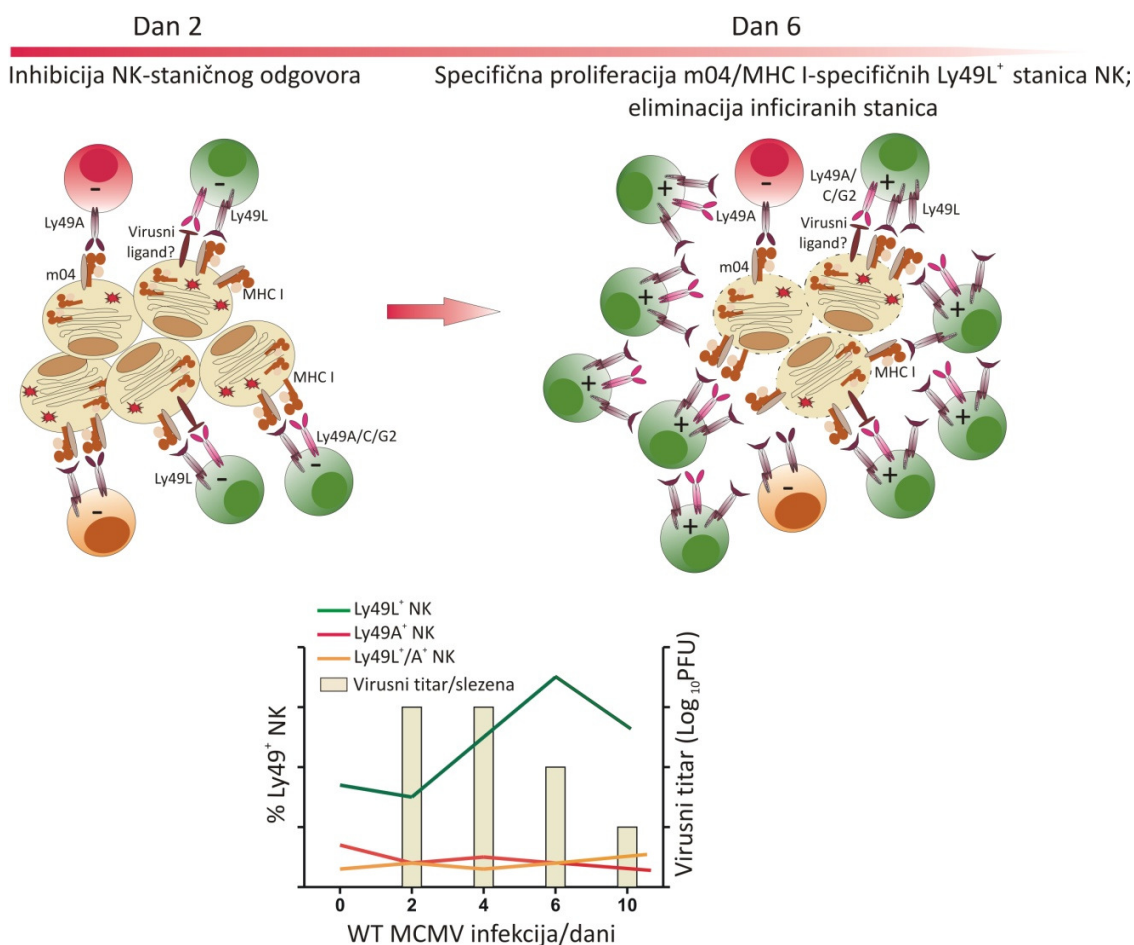
Za razliku od miševa u kojima m04/MHC I posreduje inhibiciju stanica NK i nesposobnost kontroliranja virusnog titra, u prirodi postoje mišji sojevi koji su prirodno rezistentni na infekciju MCMV-om. U najpoznatijem primjeru MCMV-rezistentnog soja, u C57BL/6 miševa, rezistencija je posredovana NK-staničnim aktivacijskim receptorom Ly49H koji prepoznaje m157, ispoljen na površini MCMV-inficiranih stanica [113, 114]. Drugi primjer su miševi MA/My, u kojima rezistenciju posreduje aktivacijski receptor Ly49P, koji prepoznaje molekulu H-2D^k u kontekstu virusne infekcije [178]. U ovom radu, korištenjem reporterskih stanica koje ispoljavaju Ly49P i raznih virusnih mutanti, pokazano je kako Ly49P specifično prepoznaje kompleks m04/MHC I. Ipak, kompleks m04/MHC I kritičan je ali ne i dostatan za prepoznavanje od strane Ly49P, već je za prepoznavanje potreban i virusni faktor iz regije genoma koja obuhvaća gene *m167-m170* (Slika 40. i 42.). Dodatni pokusi su potrebni kako bi razjasnili mehanističku ulogu dodatnog virusnog faktora. Naime, možemo samo nagađati radi li

se o proteinu koji zajedno sa m04/MHC I čini trimerni kompleks, interakciji kompleksa m04/MHC I i mRNA ili peptidu koji biva prezentiran putem kompleksa m04/MHC I.

Naši rezultati pokazuju kako Ly49P nije jedini receptor specifičan za ovaj kompleks, već da postoje još barem dva receptora: Ly49L, ispoljen u miševa haplotipa BALB, te Ly49D2, ispoljen u miševa PWK/Pas koji specifično prepoznaju isti kompleks. Postavlja se pitanje uloge ovih receptora u aktivaciji stanica NK tijekom MCMV-infekcije. Naime, u ovom radu pokazano je kako miševi haplotipa BALB (BALB/c, BALB.K, CBA/J i C3H/J) unatoč Ly49L⁺ stanicama NK nemaju sposobnost kontroliranja virusnog titra tijekom prva četiri dana po infekciji za razliku od miševa MA/My. Stoga je legitimno pitanje da li stanice NK koje ispoljavaju Ly49L vrše svoju funkciju nakon četvrtog dana? U radu Pyzika M i suradnika pokazano je kako, uistinu, Ly49L⁺ stanice NK tijekom infekcije WT MCMV-om proliferiraju u razdoblju od 4. do 10. dana infekcije, te postižu vrhunac 6-og dana [179]. Također, 6-ti dan po infekciji te stanice predstavljaju 50 % IFN γ -pozitivne populacije ukupnih stanica NK. Ovaj fenotip ponovno je najizraženiji u miševa haplotipa H-2^k, manje izražen u miševa haplotipa H-2^d te odsutan u miševa haplotipa H-2^b ili u slučaju infekcije virusom deficitarnim za m04 ($\Delta m04$ MCMV) čime je potvrđena ovisnost proliferacije stanica o prisustvu m04. Kinetika proliferacije ovih stanica korelira sa virusnim titrom u slezeni miševa BALB.K koji se u periodu od 6-og do 10-og dana infekcije značajno smanjuje u ovisnosti o stanicama NK.

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom radu kao i činjenica iz literature možemo predložiti model uloge inhibicijskih i aktivacijskih receptora specifičnih za m04/MHC I tijekom infekcije miševa haplotipa H-2^k i H-2^d MCMV-om. Naime, zbog ligacije inhibicijskog receptora Ly49A kompleksom MHC I/m04 u ranoj fazi infekcije, stanice NK ne kontroliraju virusnu infekciju, unatoč činjenici da ispoljavaju aktivacijski receptor Ly49L, specifičan za isti

kompleks. Također, ne možemo isključiti mogućnost da stanica inficirana MCMV-om ne ispoljava dodatne ligande za inhibicijske receptore čime omogućuje dominaciju inhibicije. Tijekom infekcije (od 6-og do 10-og dana), stanice koje ispoljavaju Ly49L proliferiraju, moguće povećavaju i broj ispoljenih receptora na površini, te aktivacija prevladava rezultirajući ubijanjem inficiranih stanica i smanjenjem virusnog titra (Slika 48.).



Slika 48. Model uloge aktivacijskih i inhibicijskih receptora Ly49 tijekom MCMV-infekcije *in vivo*. U ranoj fazi infekcije stanice NK ne kontroliraju virusnu infekciju zbog ligacije inhibicijskog receptora Ly49A kompleksom MHC I/m04, unatoč činjenici da ispoljavaju aktivacijski receptor Ly49L, specifičan za isti kompleks (gore lijevo). Kasnije tijekom infekcije (od 6-og do 10-og dana), stanice koje ispoljavaju Ly49L proliferiraju, moguće povećavaju gustoću ispoljenih receptora na površini, te aktivacija prevladava rezultirajući ubijanjem inficiranih stanica i smanjenjem virusnog titra (gore desno). Donja slike prikazuje shematski prikaz opisanog modela i korelaciju sa virusnim titrom u slezeni inficiranih životinja.

Pitanje koje se nameće jest zbog čega Ly49L⁺ stanice NK svoju funkciju posreduju tek kasnije u tijeku infekcije, za razliku od Ly49H i Ly49P čiji se učinak očituje već treći dan po infekciji. Također, postavlja se pitanje koji događaj promovira aktivaciju NK-staničnog odgovora te ima li i kakvu ulogu u tome virusni faktor iz regije genoma koji obuhvaća gene *m167-m170*.

Interakcija virusa sa svojim domaćinom tijekom stotinama milijuna godina ko-evolucije rezultirala je brojnim kombinacijama aktivacijskih i inhibicijskih NK-staničnih receptora i molekula MHC I u svrhu prepoznavanja i kontrole infekcije. Naša je teorija da je inhibicija stanica NK kao jedan od brojnih imunosubverzivnih mehanizama MCMV-a nastala ranije, te da je postojanje aktivacijskih receptora specifičnih za iste strukture posljedična reakcije obrane domaćina. Teoriju potkrepljuju rezultati genetičkih analiza koji pokazuju da su aktivacijski receptori Ly49 usitinu tijekom evolucije nastali iz inhibicijskih i to pojavom točkastih mutacija te duplikacije gena [44]. Činjenica da postoji barem pet aktivacijskih receptora specifičnih za prepoznavanje MCMV-a govori o važnosti ovog patogena. Iako ne postoji dovoljno podataka koji govore o specifičnom prepoznavanju humanog citomegalovirusa za očekivati je postojanje kombinacija NK-receptora i MHC-haplotipa sa protektivnim efektom. Takva bi saznanja, pak, mogla značajno doprinijeti napretku terapijskih pristupa u liječenju infekcija.

6. ZAKLJUČCI

- Kompleks m04/MHC I na površini WT MCMV-inficiranih stanica ligira inhibicijski receptor Ly49A
- Ligacija Ly49A kompleksom m04/MHC I tijekom WT MCMV-infekcije rezultira inhibicijom proliferacije stanica NK, sprečavanjem NK-posredovanog ubijanja te slabom kontrolom virusnog titra *in vivo* tijekom rane infekcije
- Mutanta deficijentna za gen m04 atenuirana je *in vivo* i ta atenuacija je ovisna o prisutnosti molekula MHC I i stanica NK
- *In vivo* kontrola mutante $\Delta m04$ MCMV uglavnom je posredovana subpopulacijama Ly49G2⁺ i Ly49A⁺ stanica NK
- Aktivacija stanica NK tijekom „missing self“-posredovane *in vivo* kontrole mutante $\Delta m04$ MCMV djelomično je ovisna o aktivacijskom receptoru NKG2D
- „Missing self“-posredovani snažni NK-stanični odgovor ne utječe na kvalitetu kasnije razvijenog CD8 T-limfocitnog odgovora tijekom infekcije miševa sa $\Delta m04$ MCMV-om i to najvjerojatnije zbog očuvanja broja i funkcije konvencionalnih dendritičkih stanica
- Kompleks m04/MHC I na površini inficiranih stanica prepoznaju i aktivacijski receptori Ly49: Ly49P, Ly49L i Ly49D2
- m04-ovisno prepoznavanje MCMV-inficiranih stanica od strane aktivacijskih receptora Ly49 ovisno je o prisustvu i haplotipu molekula MHC I te o prisustvu virusnog faktora iz regije genoma *m167-m170*

7. LITERATURA

1. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989; 47: 187-376.
2. Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol* 2011; 12(1): 21-7.
3. Cella M, Fuchs A, Vermi W i sur. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 2009; 457(7230): 722-5.
4. Sanos SL, Bui VL, Mortha A i sur. ROR γ and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat Immunol* 2009; 10(1): 83-91.
5. Satoh-Takayama N, Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S i sur. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 2008; 29(6): 958-70.
6. Tessmer MS, Reilly EC, Brossay L. Salivary gland NK cells are phenotypically and functionally unique. *PLoS Pathog* 2011; 7(1): e1001254.
7. Bilinski MJ, Thorne JG, Oh MJ i sur. Uterine NK cells in murine pregnancy. *Reprod Biomed Online* 2008; 16(2): 218-26.
8. Eastabrook G, Hu Y, von Dadelszen P. The role of decidual natural killer cells in normal placentation and in the pathogenesis of preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Can* 2008; 30(6): 467-76.
9. Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 2003; 3(5): 413-25.
10. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 2007; 26(4): 503-17.
11. Trapani JA, Davis J, Sutton VR, Smyth MJ. Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Curr Opin Immunol* 2000; 12(3): 323-9.
12. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(5): 361-70.

13. Screpanti V, Wallin RP, Grandien A, Ljunggren HG. Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Mol Immunol* 2005; 42(4): 495-9.
14. Poli A, Michel T, Theresine M, Andres E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 2009; 126(4): 458-65.
15. Vosshenrich CA, Samson-Villeger SI, Di Santo JP. Distinguishing features of developing natural killer cells. *Curr Opin Immunol* 2005; 17(2): 151-8.
16. Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer* 1975; 16(2): 230-9.
17. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* 1975; 16(2): 216-29.
18. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 1975; 5(2): 117-21.
19. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 1975; 5(2): 112-7.
20. Karre K, Klein GO, Kiessling R, Klein G, Roder JC. In vitro NK-activity and in vivo resistance to leukemia: studies of beige, beige//nude and wild-type hosts on C57BL background. *Int J Cancer* 1980; 26(6): 789-97.
21. 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(1): 40-52.
22. Welsh RM. Regulation of virus infections by natural killer cells. A review. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1986; 5(4): 169-99.
23. Vella C, Festenstein H. Coxsackievirus B4 infection of the mouse pancreas: the role of natural killer cells in the control of virus replication and resistance to infection. *J Gen Virol* 1992; 73 (Pt 6): 1379-86.
24. Habu S, Akamatsu K, Tamaoki N, Okumura K. In vivo significance of NK cell on resistance against virus (HSV-1) infections in mice. *J Immunol* 1984; 133(5): 2743-7.

25. Kast WM, Bluestone JA, Heemskerk MH i sur. Treatment with monoclonal anti-CD3 antibody protects against lethal Sendai virus infection by induction of natural killer cells. *J Immunol* 1990; 145(7): 2254-9.
26. Fang M, Orr MT, Spee P, Egebjerg T, Lanier LL, Sigal LJ. CD94 is essential for NK cell-mediated resistance to a lethal viral disease. *Immunity* 2011; 34(4): 579-89.
27. Orange JS, Wang B, Terhorst C, Biron CA. Requirement for natural killer 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(4): 1045-56.
28. See DM, Khemka P, Sahl L, Bui T, Tilles JG. The role of natural killer cells in viral infections. *Scand J Immunol* 1997; 46(3): 217-24.
29. Bennett M. Biology and genetics of hybrid resistance. *Adv Immunol* 1987; 41: 333-445.
30. Bennett M. Prevention of marrow allograft rejection with radioactive strontium: evidence for marrow-dependent effector cells. *J Immunol* 1973; 110(2): 510-6.
31. Kiessling R, Hochman PS, Haller O, Shearer GM, Wigzell H, Cudkowicz G. Evidence for a similar or common mechanism for natural killer cell activity and resistance to hemopoietic grafts. *Eur J Immunol* 1977; 7(9): 655-63.
32. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986; 319(6055): 675-8.
33. Beilke JN, Benjamin J, Lanier LL. The requirement for NKG2D in NK cell-mediated rejection of parental bone marrow grafts is determined by MHC class I expressed by the graft recipient. *Blood* 2010; 116(24): 5208-16.
34. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008; 9(5): 495-502.
35. Parham P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunol Lett* 2004; 92(1-2): 11-3.
36. Dimasi N, Moretta L, Biassoni R. Structure of the Ly49 family of natural killer (NK) cell receptors and their interaction with MHC class I molecules. *Immunol Res* 2004; 30(1): 95-104.

37. Ortaldo JR, Mason AT, Winkler-Pickett R, Raziuddin A, Murphy WJ, Mason LH. Ly-49 receptor expression and functional analysis in multiple mouse strains. *J Leukoc Biol* 1999; 66(3): 512-20.
38. Karlhofer FM, Ribaldo RK, Yokoyama WM. The interaction of Ly-49 with H-2Dd globally inactivates natural killer cell cytolytic activity. *Trans Assoc Am Physicians* 1992; 105: 72-85.
39. Tormo J, Natarajan K, Margulies DH, Mariuzza RA. Crystal structure of a lectin-like natural killer cell receptor bound to its MHC class I ligand. *Nature* 1999; 402(6762): 623-31.
40. Silver ET, Lavender KJ, Gong DE, Hazes B, Kane KP. Allelic variation in the ectodomain of the inhibitory Ly-49G2 receptor alters its specificity for allogeneic and xenogeneic ligands. *J Immunol* 2002; 169(9): 4752-60.
41. Brennan J, Mahon G, Mager DL, Jefferies WA, Takei F. Recognition of class I major histocompatibility complex molecules by Ly-49: specificities and domain interactions. *J Exp Med* 1996; 183(4): 1553-9.
42. Dimasi N, Sawicki MW, Reineck LA i sur. Crystal structure of the Ly49I natural killer cell receptor reveals variability in dimerization mode within the Ly49 family. *J Mol Biol* 2002; 320(3): 573-85.
43. Coles MC, McMahon CW, Takizawa H, Raulet DH. Memory CD8 T lymphocytes express inhibitory MHC-specific Ly49 receptors. *Eur J Immunol* 2000; 30(1): 236-44.
44. Abi-Rached L, Parham P. Natural selection drives recurrent formation of activating killer cell immunoglobulin-like receptor and Ly49 from inhibitory homologues. *J Exp Med* 2005; 201(8): 1319-32.
45. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 359-93.
46. Vales-Gomez M, Reyburn H, Strominger J. Interaction between the human NK receptors and their ligands. *Crit Rev Immunol* 2000; 20(3): 223-44.
47. Yokoyama WM, Plougastel BF. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(4): 304-16.
48. Brown MH, Boles K, van der Merwe PA, Kumar V, Mathew PA, Barclay AN. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med* 1998; 188(11): 2083-90.

49. Garni-Wagner BA, Purohit A, Mathew PA, Bennett M, Kumar V. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* 1993; 151(1): 60-70.
50. Mooney JM, Klem J, Wulfiging C i sur. The murine NK receptor 2B4 (CD244) exhibits inhibitory function independent of signaling lymphocytic activation molecule-associated protein expression. *J Immunol* 2004; 173(6): 3953-61.
51. Lee KM, McNerney ME, Stepp SE i sur. 2B4 acts as a non-major histocompatibility complex binding inhibitory receptor on mouse natural killer cells. *J Exp Med* 2004; 199(9): 1245-54.
52. Chlewicki LK, Velikovskiy CA, Balakrishnan V, Mariuzza RA, Kumar V. Molecular basis of the dual functions of 2B4 (CD244). *J Immunol* 2008; 180(12): 8159-67.
53. Fortenbery NR, Paraiso KH, Taniguchi M, Brooks C, Ibrahim L, Kerr WG. SHIP influences signals from CD48 and MHC class I ligands that regulate NK cell homeostasis, effector function, and repertoire formation. *J Immunol* 2011; 184(9): 5065-74.
54. Nakajima H, Colonna M. 2B4: an NK cell activating receptor with unique specificity and signal transduction mechanism. *Hum Immunol* 2000; 61(1): 39-43.
55. Betser-Cohen G, Mizrahi S, Elboim M, Alsheich-Bartok O, Mandelboim O. The association of MHC class I proteins with the 2B4 receptor inhibits self-killing of human NK cells. *J Immunol* 2010; 184(6): 2761-8.
56. Kim EO, Kim N, Kim TJ i sur. Unidirectional signaling triggered through 2B4 (CD244), not CD48, in murine NK cells. *J Leukoc Biol* 2010; 88(4): 707-14.
57. Waggoner SN, Taniguchi RT, Mathew PA, Kumar V, Welsh RM. Absence of mouse 2B4 promotes NK cell-mediated killing of activated CD8+ T cells, leading to prolonged viral persistence and altered pathogenesis. *J Clin Invest* 2010; 120(6): 1925-38.
58. Yu X, Harden K, Gonzalez LC i sur. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 2009; 10(1): 48-57.
59. Joller N, Hafler JP, Brynedal B i sur. Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions. *J Immunol* 2011; 186(3): 1338-42.

60. Stanietsky N, Simic H, Arapovic J i sur. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(42): 17858-63.
61. Bottino C, Castriconi R, Pende D i sur. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med* 2003; 198(4): 557-67.
62. Fuchs A, Cella M, Giurisato E, Shaw AS, Colonna M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol* 2004; 172(7): 3994-8.
63. Pende D, Bottino C, Castriconi R i sur. PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis. *Mol Immunol* 2005; 42(4): 463-9.
64. Chan CJ, Andrews DM, McLaughlin NM i sur. DNAM-1/CD155 interactions promote cytokine and NK cell-mediated suppression of poorly immunogenic melanoma metastases. *J Immunol* 2010; 184(2): 902-11.
65. Carlyle JR, Mesci A, Fine JH i sur. Evolution of the Ly49 and Nkrp1 recognition systems. *Semin Immunol* 2008; 20(6): 321-30.
66. George TC, Mason LH, Ortaldo JR, Kumar V, Bennett M. Positive recognition of MHC class I molecules by the Ly49D receptor of murine NK cells. *J Immunol* 1999; 162(4): 2035-43.
67. Raziuddin A, Longo DL, Mason L, Ortaldo JR, Bennett M, Murphy WJ. Differential effects of the rejection of bone marrow allografts by the depletion of activating versus inhibiting Ly-49 natural killer cell subsets. *J Immunol* 1998; 160(1): 87-94.
68. Merck E, Voyle RB, MacDonald HR. Ly49D engagement on T lymphocytes induces TCR-independent activation and CD8 effector functions that control tumor growth. *J Immunol* 2009; 182(1): 183-92.
69. 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(5428): 727-9.
70. Wu J, Song Y, Bakker AB i sur. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999; 285(5428): 730-2.
71. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(10): 781-90.

72. Gasser S, Raulet DH. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol Rev* 2006; 214: 130-42.
73. Krmpotic A, Busch DH, Bubic I i sur. MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo. *Nat Immunol* 2002; 3(6): 529-35.
74. Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T i sur. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 2000; 12(6): 721-7.
75. Malarkannan S, Shih PP, Eden PA i sur. The molecular and functional characterization of a dominant minor H antigen, H60. *J Immunol* 1998; 161(7): 3501-9.
76. Diefenbach A, Hsia JK, Hsiung MY, Raulet DH. A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity. *Eur J Immunol* 2003; 33(2): 381-91.
77. Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Fremont DH, Yokoyama WM. Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol* 2002; 169(8): 4079-83.
78. Guerra N, Tan YX, Joncker NT i sur. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 2008; 28(4): 571-80.
79. Zafirova B, Mandaric S, Antulov R i sur. Altered NK cell development and enhanced NK cell-mediated resistance to mouse cytomegalovirus in NKG2D-deficient mice. *Immunity* 2009; 31(2): 270-82.
80. Cerwenka A. New twist on the regulation of NKG2D ligand expression. *J Exp Med* 2009; 206(2): 265-8.
81. Nice TJ, Coscoy L, Raulet DH. Posttranslational regulation of the NKG2D ligand Mult1 in response to cell stress. *J Exp Med* 2009; 206(2): 287-98.
82. Nice TJ, Deng W, Coscoy L, Raulet DH. Stress-regulated targeting of the NKG2D ligand Mult1 by a membrane-associated RING-CH family E3 ligase. *J Immunol* 2010; 185(9): 5369-76.
83. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002; 419(6908): 734-8.
84. Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 2002; 169(8): 4098-102.

85. Nolting A, Dugast AS, Rihn S i sur. MHC class I chain-related protein A shedding in chronic HIV-1 infection is associated with profound NK cell dysfunction. *Virology* 2010; 406(1): 12-20.
86. Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F i sur. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res* 2008; 68(15): 6368-76.
87. Wiemann K, Mittrucker HW, Feger U i sur. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol* 2005; 175(2): 720-9.
88. Champsaur M, Beilke JN, Ogasawara K, Koszinowski UH, Jonjic S, Lanier LL. Intact NKG2D-independent function of NK cells chronically stimulated with the NKG2D ligand Rae-1. *J Immunol* 2010; 185(1): 157-65.
89. Moretta A, Bottino C, Vitale M i sur. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 197-223.
90. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M i sur. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 2001; 409(6823): 1055-60.
91. Gur C, Porgador A, Elboim M i sur. The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2010; 11(2): 121-8.
92. Brandt CS, Baratin M, Yi EC i sur. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med* 2009; 206(7): 1495-503.
93. Hershkovitz O, Rosental B, Rosenberg LA i sur. NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells. *J Immunol* 2009; 183(4): 2610-21.
94. Arnon TI, Achdout H, Levi O i sur. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* 2005; 6(5): 515-23.
95. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11(7): 237-44.
96. Raulet DH. Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Semin Immunol* 2006; 18(3): 145-50.
97. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM i sur. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 2005; 436(7051): 709-13.

98. Peterson ME, Long EO. Inhibitory receptor signaling via tyrosine phosphorylation of the adaptor Crk. *Immunity* 2008; 29(4): 578-88.
99. Fernandez NC, Treiner E, Vance RE, Jamieson AM, Lemieux S, Raulet DH. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* 2005; 105(11): 4416-23.
100. Chalifour A, Scarpellino L, Back J i sur. A Role for cis Interaction between the Inhibitory Ly49A receptor and MHC class I for natural killer cell education. *Immunity* 2009; 30(3): 337-47.
101. Back J, Malchiodi EL, Cho S i sur. Distinct conformations of Ly49 natural killer cell receptors mediate MHC class I recognition in trans and cis. *Immunity* 2009; 31(4): 598-608.
102. Brodin P, Lakshmikanth T, Johansson S, Karre K, Hoglund P. The strength of inhibitory input during education quantitatively tunes the functional responsiveness of individual natural killer cells. *Blood* 2009; 113(11): 2434-41.
103. Elliott JM, Wahle JA, Yokoyama WM. MHC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I-sufficient environment. *J Exp Med* 2010; 207(10): 2073-9.
104. Joncker NT, Shifrin N, Delebecque F, Raulet DH. Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *J Exp Med* 2010; 207(10): 2065-72.
105. Paust S, Gill HS, Wang BZ i sur. Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nat Immunol* 2010; 11(12): 1127-35.
106. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(6): 1915-9.
107. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 2009; 457(7229): 557-61.
108. Krmptotic A, Bubic I, Polic B, Lucin P, Jonjic S. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect* 2003; 5(13): 1263-77.
109. Hudson JB. The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections. *Arch Virol* 1979; 62(1): 1-29.

110. Mocarski ES. Cytomegaloviruses and their replication. u: Fields virology, ur: B.N. Fields. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. str. 2447-2492.
111. Scalzo AA, Yokoyama WM. Cmv1 and natural killer cell responses to murine cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 321: 101-22.
112. Scalzo AA, Lyons PA, Fitzgerald NA, Forbes CA, Yokoyama WM, Shellam GR. Genetic mapping of Cmv1 in the region of mouse chromosome 6 encoding the NK gene complex-associated loci Ly49 and musNKR-P1. *Genomics* 1995; 27(3): 435-41.
113. Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 2002; 296(5571): 1323-6.
114. Smith HR, Heusel JW, Mehta IK i sur. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(13): 8826-31.
115. van Dommelen SL, Sumaria N, Schreiber RD, Scalzo AA, Smyth MJ, Degli-Esposti MA. Perforin and granzymes have distinct roles in defensive immunity and immunopathology. *Immunity* 2006; 25(5): 835-48.
116. Fodil-Cornu N, Lee SH, Belanger S i sur. Ly49h-deficient C57BL/6 mice: a new mouse cytomegalovirus-susceptible model remains resistant to unrelated pathogens controlled by the NK gene complex. *J Immunol* 2008; 181(9): 6394-405.
117. Bubic I, Wagner M, Krmpotic A i sur. Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus. *J Virol* 2004; 78(14): 7536-44.
118. Lee SH, Zafer A, de Repentigny Y i sur. Transgenic expression of the activating natural killer receptor Ly49H confers resistance to cytomegalovirus in genetically susceptible mice. *J Exp Med* 2003; 197(4): 515-26.
119. Corbett AJ, Coudert JD, Forbes CA, Scalzo AA. Functional consequences of natural sequence variation of murine cytomegalovirus m157 for Ly49 receptor specificity and NK cell activation. *J Immunol* 2011; 186(3): 1713-22.
120. Desrosiers MP, Kielczewska A, Loredó-Osti JC i sur. Epistasis between mouse Klra and major histocompatibility complex class I loci is associated with a new mechanism of natural killer cell-mediated innate resistance to cytomegalovirus infection. *Nat Genet* 2005; 37(6): 593-9.

121. Adam SG, Caraux A, Fodil-Cornu N i sur. Cmv4, a new locus linked to the NK cell gene complex, controls innate resistance to cytomegalovirus in wild-derived mice. *J Immunol* 2006; 176(9): 5478-85.
122. Jonjic S, Mutter W, Weiland F, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4+ T lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 169(4): 1199-212.
123. Reddehase MJ, Jonjic S, Weiland F, Mutter W, Koszinowski UH. Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adrenalitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *J Virol* 1988; 62(3): 1061-5.
124. Reddehase MJ, Weiland F, Munch K, Jonjic S, Luske 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(2): 264-73.
125. Robbins SH, Bessou G, Cornillon A i sur. Natural killer cells promote early CD8 T cell responses against cytomegalovirus. *PLoS Pathog* 2007; 3(8): e123.
126. Swiecki M, Gilfillan S, Vermi W, Wang Y, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual. *Immunity* 2010; 33(6): 955-66.
127. Andrews DM, Estcourt MJ, Andoniou CE i sur. Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection. *J Exp Med* 2010; 207(6): 1333-43.
128. Stadnisky MD, Xie X, Coats ER, Bullock TN, Brown MG. Self MHC class I-licensed NK cells enhance adaptive CD8 T-cell viral immunity. *Blood* 2011; 117(19): 5133-41.
129. Slavuljica I, Busche A, Babic M i sur. Recombinant mouse cytomegalovirus expressing a ligand for the NKG2D receptor is attenuated and has improved vaccine properties. *J Clin Invest* 2010; 120(12): 4532-45.
130. Ziegler H, Thale R, Lucin P i sur. A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity* 1997; 6(1): 57-66.
131. Reusch U, Muranyi W, Lucin P, Burgert HG, Hengel H, Koszinowski UH. A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J* 1999; 18(4): 1081-91.

132. Kleijnen MF, Huppa JB, Lucin P i sur. 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(4): 685-94.
133. Lu X, Kavanagh DG, Hill AB. Cellular and molecular requirements for association of the murine cytomegalovirus protein m4/gp34 with major histocompatibility complex class I molecules. *J Virol* 2006; 80(12): 6048-55.
134. Holtappels R, Gillert-Marien D, Thomas D i sur. Cytomegalovirus encodes a positive regulator of antigen presentation. *J Virol* 2006; 80(15): 7613-24.
135. Kavanagh DG, Gold MC, Wagner M, Koszinowski UH, Hill AB. The multiple immune-evasion genes of murine cytomegalovirus are not redundant: m4 and m152 inhibit antigen presentation in a complementary and cooperative fashion. *J Exp Med* 2001; 194(7): 967-78.
136. Pinto AK, Munks MW, Koszinowski UH, Hill AB. Coordinated function of murine cytomegalovirus genes completely inhibits CTL lysis. *J Immunol* 2006; 177(5): 3225-34.
137. 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(5): 613-21.
138. Hewitt EW, Gupta SS, Lehner PJ. The human cytomegalovirus gene product US6 inhibits ATP binding by TAP. *EMBO J* 2001; 20(3): 387-96.
139. Lee S, Yoon J, Park B i sur. Structural and functional dissection of human cytomegalovirus US3 in binding major histocompatibility complex class I molecules. *J Virol* 2000; 74(23): 11262-9.
140. Park B, Kim Y, Shin J i sur. Human cytomegalovirus inhibits tapasin-dependent peptide loading and optimization of the MHC class I peptide cargo for immune evasion. *Immunity* 2004; 20(1): 71-85.
141. Peh CA, Burrows SR, Barnden M i sur. HLA-B27-restricted antigen presentation in the absence of tapasin reveals polymorphism in mechanisms of HLA class I peptide loading. *Immunity* 1998; 8(5): 531-42.
142. Lilley BN, Ploegh HL. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 2004; 429(6994): 834-40.
143. Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 2004; 429(6994): 841-7.

144. Carvalho P, Goder V, Rapoport TA. Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* 2006; 126(2): 361-73.
145. Mans J, Zhi L, Revilla MJ i sur. Structure and function of murine cytomegalovirus MHC-I-like molecules: how the virus turned the host defense to its advantage. *Immunol Res* 2009; 43(1-3): 264-79.
146. Prod'homme V, Griffin C, Aicheler RJ i sur. The human cytomegalovirus MHC class I homolog UL18 inhibits LIR-1+ but activates LIR-1- NK cells. *J Immunol* 2007; 178(7): 4473-81.
147. Wagner CS, Riise GC, Bergstrom T, Karre K, Carbone E, Berg L. Increased expression of leukocyte Ig-like receptor-1 and activating role of UL18 in the response to cytomegalovirus infection. *J Immunol* 2007; 178(6): 3536-43.
148. Carlyle JR, Jamieson AM, Gasser S, Clingan CS, Arase H, Raulet DH. Missing self-recognition of Ocil/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(10): 3527-32.
149. Lodoen M, Ogasawara K, Hamerman JA i sur. NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J Exp Med* 2003; 197(10): 1245-53.
150. Arapovic J, Lenac T, Antulov R i sur. Differential susceptibility of RAE-1 isoforms to mouse cytomegalovirus. *J Virol* 2009; 83(16): 8198-207.
151. Zhi L, Mans J, Paskow MJ i sur. Direct interaction of the mouse cytomegalovirus m152/gp40 immunoevasin with RAE-1 isoforms. *Biochemistry* 2010; 49(11): 2443-53.
152. Arapovic J, Lenac Rovis T, Reddy AB, Krmpotic A, Jonjic S. Promiscuity of MCMV immunoevasin of NKG2D: m138/fcr-1 down-modulates RAE-1epsilon in addition to MULT-1 and H60. *Mol Immunol* 2009; 47(1): 114-22.
153. Lenac T, Budt M, Arapovic J i sur. The herpesviral Fc receptor fcr-1 down-regulates the NKG2D ligands MULT-1 and H60. *J Exp Med* 2006; 203(8): 1843-50.
154. Mintern JD, Klemm EJ, Wagner M i sur. Viral interference with B7-1 costimulation: a new role for murine cytomegalovirus fc receptor-1. *J Immunol* 2006; 177(12): 8422-31.
155. Krmpotic A, Hasan M, Loewendorf A i sur. NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145. *J Exp Med* 2005; 201(2): 211-20.

156. Lodoen MB, Abenes G, Umamoto S, Houchins JP, Liu F, Lanier LL. The cytomegalovirus m155 gene product subverts natural killer cell antiviral protection by disruption of H60-NKG2D interactions. *J Exp Med* 2004; 200(8): 1075-81.
157. Hasan M, Krmpotic A, Ruzsics Z i sur. Selective down-regulation of the NKG2D ligand H60 by mouse cytomegalovirus m155 glycoprotein. *J Virol* 2005; 79(5): 2920-30.
158. Stern-Ginossar N, Elefant N, Zimmermann A i sur. Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* 2007; 317(5836): 376-81.
159. Nachmani D, Lankry D, Wolf DG, Mandelboim O. The human cytomegalovirus microRNA miR-UL112 acts synergistically with a cellular microRNA to escape immune elimination. *Nat Immunol* 2010; 11(9): 806-13.
160. Nachmani D, Stern-Ginossar N, Sarid R, Mandelboim O. Diverse herpesvirus microRNAs target the stress-induced immune ligand MICB to escape recognition by natural killer cells. *Cell Host Microbe* 2009; 5(4): 376-85.
161. 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(2): 123-33.
162. Kubin M, Cassiano L, Chalupny J i sur. ULBP1, 2, 3: novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells. *Eur J Immunol* 2001; 31(5): 1428-37.
163. Welte SA, Sinzger C, Lutz SZ i sur. Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur J Immunol* 2003; 33(1): 194-203.
164. Dunn C, Chalupny NJ, Sutherland CL i sur. Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med* 2003; 197(11): 1427-39.
165. Zou Y, Bresnahan W, Taylor RT, Stastny P. Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A. *J Immunol* 2005; 174(5): 3098-104.
166. Zhang Y, Lazaro AM, Lavingia B, Stastny P. Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum Immunol* 2001; 62(6): 620-31.

167. Chalupny NJ, Rein-Weston A, Dosch S, Cosman D. Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346(1): 175-81.
168. Wagner M, Gutermann A, Podlech J, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Major histocompatibility complex class I allele-specific cooperative and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus. *J Exp Med* 2002; 196(6): 805-16.
169. Brune W, Wagner M, Messerle M. Manipulating Cytomegalovirus Genomes by BAC Mutagenesis: Strategies and Applications. u: Cytomegaloviruses: Molecular biology and Immunology, ur: M.J. Reddehase. Norfolk: Caister Academic Press; 2006. str. 63-89.
170. Andrews DM, Andoniou CE, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P, Degli-Esposti MA. Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nat Immunol* 2001; 2(11): 1077-84.
171. Xie X, Stadnisky MD, Brown MG. MHC class I Dk locus and Ly49G2+ NK cells confer H-2k resistance to murine cytomegalovirus. *J Immunol* 2009; 182(11): 7163-71.
172. Tay CH, Yu LY, Kumar V, Mason L, Ortaldo JR, Welsh RM. The role of LY49 NK cell subsets in the regulation of murine cytomegalovirus infections. *J Immunol* 1999; 162(2): 718-26.
173. 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(1): 29-44.
174. Barao I, Alvarez M, Ames E i sur. Mouse Ly49G2+ NK cells dominate early responses during both immune reconstitution and activation independently of MHC. *Blood* 2011; 117(26): 7032-41.
175. Chakir H, Camilucci AA, Fillion LG, Webb JR. Differentiation of murine NK cells into distinct subsets based on variable expression of the IL-12R beta 2 subunit. *J Immunol* 2000; 165(9): 4985-93.
176. Hanke T, Takizawa H, McMahan CW i sur. Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors. *Immunity* 1999; 11(1): 67-77.

177. Smith HR, Chuang HH, Wang LL, Salcedo M, Heusel JW, Yokoyama WM. Nonstochastic coexpression of activation receptors on murine natural killer cells. *J Exp Med* 2000; 191(8): 1341-54.
178. Kielczewska A, Pyzik M, Sun T i sur. Ly49P recognition of cytomegalovirus-infected cells expressing H2-Dk and CMV-encoded m04 correlates with the NK cell antiviral response. *J Exp Med* 2009; 206(3): 515-23.
179. Pyzik M, Charbonneau B, Gendron-Pontbriand EM i sur. Distinct MHC class I-dependent NK cell-activating receptors control cytomegalovirus infection in different mouse strains. *J Exp Med* 2011; 208(5): 1105-17.

ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

IME I PREZIME: Marina Babić Čač

DATUM ROĐENJA: 15.03.1983

ADRESA: Primorska 8a, 51 000 Rijeka

ELEKTRONIČKA POŠTA: Marina.Babic@medri.hr

TELEFON: 098 182 7765

ŠKOLOVANJE

2006-danas: Doktorski studij Biomedicina pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci;

Naziv doktorskog rada: Virusna regulacija aktivnosti NK-limfocita: uloga inhibicijskih Ly49 receptora

2001-2006: Prirodoslovno-Matematički Fakultet, Zagreb; Biološki Odsjek-smjer:

Molekularna biologija; diplomski rad pod nazivom: *Polimorfizam gena za 5-HT_{2A} receptor i autizam: ispitivanje povezanosti u stanovništva Hrvatske pod vodstvom Doc. Dr. sc. Dubravke Hranilović; izrađen u Institutu Rudjer Bošković-Zavod za Molekularnu biologiju-Laboratorij za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju)*

1997-2001: Opća gimnazija Vladimir Nazor, Zadar

RADNO ISKUSTVO

2007-danas: Asistent na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci na projektu "Molekularni mehanizmi citomegalovirusnog izmicanja imunološkom nadzoru" nositelja Prof. Dr.sc. Stipana Jonjića

2006-danas: Suradnik u Centru za proteomiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

USAVRŠAVANJE

2007.: Max von Pettenkofer Institut, Muenchen, Njemačka; Projekt u suradnji s Prof. J. Haasom na kloniranju i ekspresiji proteina Varicella Zoster Virusa

2006.: Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Njemačka; Projekt u suradnji sa Prof. dr. sc. Martin Messerle-om na izradi mutantnih varijanti mišjeg citomegalovirusa BAC-tehnologijom

2005.: Max Planck Institut za Eksperimentalnu medicinu, Goettingen, Njemačka; Projekt ispitivanje uloge mutacija u proteolipidnom proteinu (PLP) u razvoju Pelizaeus-Merzbacherove bolesti

PUBLIKACIJE

1. Hranilovic D, Novak R, **Babic M**, Novokmet M, Bujas-Petkovic Z, Jernej B: Hyperserotonemia in autism: the potential role of 5HT-related gene variants. Coll Antropol. 2008 Jan; 32 Suppl 1:75-80.
2. Jonjic S, **Babic M**, Polic B, Krmpotic A: Immune evasion of natural killer cells by viruses. Curr Opin Immunol, 2008 Feb; 20(1):30-8.

3. Kielczewska A, Pyzik M, Sun T, Krmpotic A, Lodoen MB, Munks MW, **Babic M**, Hill AB, Koszinowski UH, Jonjic S, Lanier LL, Vidal SM. Ly49P recognition of cytomegalovirus-infected cells expressing H2-Dk and CMV-encoded m04 correlates with the NK cell antiviral response. *J Exp Med*. 2009 Mar 2.
4. Hranilovic D, Blazevic S, **Babic M**, Smurinic M, Bujas-Petkovic Z, Jernej B. 5-HT2A receptor gene polymorphisms in Croatian subjects with autistic disorder. *Psychiatry Res*. 2010 Aug 15; 178(3):556-8.
5. **Marina Babić**, Michal Pyzik, Biljana Zafirova, Maja Mitrović, Višnja Butorac, Lewis L. Lanier, Astrid Krmpotić, Silvia M. Vidal and Stipan Jonjić. Cytomegalovirus immunoevasin reveals the physiological role of 'missing-self' recognition in natural killer cell dependent virus control *in vivo*. *J Exp Med*. 2010 Nov 22; 207(12):2663-73.
6. Irena Slavuljica, Busche Andreas, **Marina Babić**, Maja Mitrović, Iva Gašparović, Đurđica Cekinović, Elitza Markova Car, Ester Pernjak Pugel, Ana Ciković, Vanda Juranić Lisnić, William Britt, Ulrich Koszinowski, Martin Messerle, Astrid Krmpotić, Stipan Jonjić. A ligand for the NKG2D receptor expressed by mouse CMV attenuates the virus, changes virus distribution and improves vaccine properties. *J Clin Invest*. 2010 Dec 1;120(12): 4532-45.
7. Pyzik M, Charbonneau B, Gendron-Pontbriand EM, **Babić M**, Krmpotić A, Jonjić S, Vidal SM. Distinct MHC class I-dependent NK cell-activating receptors control cytomegalovirus infection in different mouse strains. *J Exp Med*. 2011 May 9; 208(5): 1105-17.
8. **Marina Babić**, Astrid Krmpotić and Stipan Jonjić. All is fair in virus-host interactions: NK cells and cytomegalovirus. *Trends in Molecular Medicine*. 2011 Nov;17(11):677-85. Epub 2011 Aug 17.

SUDJELOVANJA NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

1. Sudjelovanje na "NK cell defence and therapy" Summer School, Božava, Dugi Otok, Hrvatska 28.-31.08.2007.
2. Third European Congress of Virology, Nuremberg, Germany, 01-05. 09. 2007.; poster prezentacija: Arapovic J, Lenac T, **Babic M**, Antulov R, Krmpotic A, Polic B, Jonjic S: „Resistance of Rae-1d to downregulation by MCMV“
3. Godišnji sastanak Hrvatskog imunološkog društva, Crveni otok, 19-21.10.2007; poster prezentacija: Mans J, Natarajan K, **Babić M**, Messerle M, Šimić H, Krmpotić A, Jonjić S, Margulies DH: „Cellular, structural and physiological characterization of MCMV m153“

4. NK symposium „Harnessing the power of NK cells“, Bad Herrenalb, 21-23. 05. 2008; poster prezentacija: **Babic M**, Krmpotic A, Jonjic S: „MCMV m04 functions as an NK cell response inhibitor“
5. Advanced Laboratory Training Course on Viral Subversion of Immune Response, June 7-18, 2008, Rijeka, Hrvatska
6. Godišnji sastanak Hrvatskog imunološkog društva., Šibenik, 09- 12.10.2008; oralna i poster prezentacija: **Marina Babic**, Agnieszka Kielczewska, Michal Pyzik, Astrid Krmpotic, Silvia Vidal, Stipan Jonjic: „MCMV m04 functions as an NK cell response activator and inhibitor“;
7. Godišnji sastanak Hrvatskog imunološkog društva., Šibenik, 09- 12.10.2008; poster prezentacija: Dikla Lankry, Hrvoje Simic, **Marina Babic**, Karmela Miklic, Stipan Jonjic and Ofer Mandelboim: „Regulation of NK Cytotoxicity by two novel inhibitory and activating receptors“
8. Sudjelovanje na Proteomics Forum 2009, Berlin, 29.03-02.04.2009; poster prezentacija: **M. Babic**, R. Pothineni, T. Lenac , A. Baiker, F. Markovic, K. Miklic, M. Endesfelder, D. Rose, H. Simic, S. Bailer, J. Haas, S. Jonjic: Proteome-wide Production of Antibodies against Varicella Zoster Virus
9. Sudjelovanje na 2nd ECI, Berlin, 13-16. 09. 2009; poster prezentacija: **M. Babic**, M. Pyzik, A. Kielczewska, A. Krmpotic, S.M. Vidal, S. Jonjic: The MCMV m04 protein plays a key role in NK cell inhibition via „missing self“ mechanism
10. Godišnji sastanak Hrvatskog imunološkog društva., Starigrad, 01-04.10.2009; oralna i poster prezentacija: **M. Babic**, M. Pyzik, A. Kielczewska, A. Krmpotic, S.M. Vidal, S. Jonjic: The MCMV m04 protein plays a key role in NK cell inhibition via „missing self“ mechanism
11. Godišnji sastanak Hrvatskog imunološkog društva., Starigrad, 01-04.10.2009; poster prezentacija: **M. Babic**, R. Pothineni, T. Lenac , A. Baiker, F. Markovic, K. Miklic, M. Endesfelder, D. Rose, H. Simic, S. Bailer, J. Haas, S. Jonjic: Proteome-wide Production of Antibodies against Varicella Zoster Virus
12. Sudjelovanje na 12th Meeting of the Society for Natural Immunity, Cavtat, 11-15.09.2010; oralna prezentacija: **Marina Babić**, Biljana Zafirova, Maja Mitrović, Michal Pyzik, Astrid Krmpotić, Silvia M. Vidal, Stipan Jonjić: The MCMV m04 protein prevents NK cell activation via „missing self“ mechanism
13. Godišnji sastanak Hrvatskog imunološkog društva., Mali Lošinj, 26-30.09.2010; oralna i poster prezentacija: **Marina Babić**, Biljana Zafirova, Maja Mitrović, Michal Pyzik, Astrid Krmpotić, Silvia M. Vidal, Stipan Jonjić: Cytomegalovirus immunoevasin reveals the physiological role of “missing self” recognition in NK cell dependent virus control in vivo
14. Sudjelovanje na Annual Meeting of the Austrian Society for allergology and immunology, Beč, Austrija, 03-05.12.2010; oralna prezentacija: **Marina Babić**, Biljana Zafirova, Maja Mitrović, Michal Pyzik, Astrid Krmpotić, Silvia M. Vidal,

- Stipan Jonjić: Mouse cytomegalovirus compromises 'missing self' mediated activation of natural killer cells
15. Sudjelovanje na 2011 NK Cell Symposium, Mainz, Germany, 18-20.04.2011; oralna prezentacija: **Marina Babić**, Biljana Zafirova, Maja Mitrović, Michal Pyzik, Astrid Krmpotić, Silvia M. Vidal, Stipan Jonjić: NK cell recognition of the 'missing-self' is relevant in the recognition and control of a viral pathogen in vivo
 16. Sudjelovanje na 16th FEBS School on Immunology, Grad Hvar, Hvar, Hrvatska 02.-11.09.2011. Poster prezentacija: **Marina Babić**, Biljana Zafirova, Maja Mitrović, Michal Pyzik, Astrid Krmpotić, Silvia M. Vidal, Stipan Jonjić: NK cell recognition of the 'missing-self' is relevant in the recognition and control of a viral pathogen in vivo
 17. Godišnji sastanak Hrvatskog imunološkog društva., Rabac, 07.-09.10.2011; oralna i poster prezentacija: **Marina Babić**, Biljana Zafirova, Maja Mitrović, Michal Pyzik, Astrid Krmpotić, Silvia M. Vidal, Stipan Jonjić: Mouse cytomegalovirus restores host 'self' to prevent 'missing self'
 18. Sudjelovanje na 6th Mini Herpesvirus Workshop, Berlin, Njemačka, 21.10.2011; oralna prezentacija: **Marina Babić**, Biljana Zafirova, Maja Mitrović, Michal Pyzik, Astrid Krmpotić, Silvia M. Vidal, Stipan Jonjić: Mouse cytomegalovirus restores host 'self' to prevent 'missing self'

STIPENDIJE I NAGRADE

- Stipendist Grada Zadra, 1999-2001
- Stipendist Sveučilišta u Zagrebu, 2004/2005
- Stipendist MZOŠ-a, 2001-2006
- DAAD stipendist (17.09.2006 -19.11.2006 – usavršavanje na MHH, Hannover, Njemačka)
- EFIS Travel Scholarship grant za sudjelovanje na 2nd ECI, Berlin, 13-16. 09. 2009
- EFIS Travel Scholarship grant za sudjelovanje na 2011 NK Cell Symposium, Mainz, Germany, 18-20.04.2011
- Nagrada za najbolju poster prezentaciju na godišnjem sastanku Hrvatskog imunološkog društva 2009. godine
- Dobitnik Godišnje nagrade Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci za najboljeg mladog znanstvenika na području bazičnih znanosti, 2010.
- Dobitnik Godišnje nagrade Zaklade Sveučilišta u Rijeci za najboljeg mladog znanstvenika na području biomedicinskih i biotehničkih znanosti,

2010.

- Dobitnik Godišnje nagrade Hrvatskog imunološkog društva za najbolji rad člana društva u 2010. godini

OSTALE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

- Član Hrvatskog imunološkog društva od 2007. godine
- Sudjelovanje u formiranju laboratorija za ciljanu mutagenezu i ekspresiju proteina u Centru za Proteomiku Sveučilišta u Rijeci
- Sudjelovanje u organizaciji NK defense and therapy Summer School, održane na Bozavi, Dugi otok, 28.-31. 08. 2007.
- Sudjelovanje u organizaciji Advanced Laboratory Training Course on Viral Subversion of Immune Response, June 7-18, 2008, Rijeka, Croatia
- Sudjelovanje u organizaciji 12th Meeting of the Society for Natural Immunity & NK 2010, Cavtat, 11.-15.09.2010.

- Vodenje izrade diplomskog rada studentice Adriane Damjanović na projektu "Recombination-mediated genetic engineering of murine cytomegalovirus genome for construction of $\Delta m160$, $\Delta m161$ and $\Delta m162$ viral strains"

OSTALO

- Aktivno poznavanje engleskog jezika u govoru i pismu
- Pasivno poznavanje njemačkog jezika u govoru i pismu