

# Mehanizmi imunološkog nadzora latentne herpesvirusne infekcije

---

**Polić, Bojan**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**1996**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:031900>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-06**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

BOJAN POLIĆ

MEHANIZMI IMUNOLOŠKOG NADZORA LATENTNE  
HERPESVIRUSNE INFEKCIJE

Doktorska disertacija

SVEUČILIŠNA KNJIŽNICA  
RIJ E K A



930024969

Rijeka, travanj 1996.

## I. AUTOR

Ime i prezime	BOJAN POLIĆ
Datum i mjesto rođenja	1. kolovoza 1964, Rijeka
Naziv fakulteta, odnosno organizacije za postdiplomski studij i datum završene nastave II i III stupnja	Medicinski fakultet u Rijeci. 1989. Medicinski fakultet u Rijeci 1992.
Sadašnje zaposlenje	asistent Medicinski fakultet u Rijeci

## II. PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA

Naslov rada	MEHANIZMI IMUNOLOŠKOG NADZORA LATENTNE HERPESVIRUSNE INFEKCIJE
Broj stranica, slika, tabela, bibliografskih podataka	130 str., 30 sl., 230 ref.,
Ustanova i mjesto gdje je disertacija izrađena	Medicinski fakultet u Rijeci
Znanstvena disciplina	Medicina
Mentori	Doc.dr.sc. Pero Lučin
Fakultet na kojem je disertacija obranjena	Medicinski fakultet u Rijeci

## III. OCJENA I OBRANA

Datum prijave teme	21. svibnja 1993.
Datum predaje rada	22. prosinca 1995.
Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen	12. ožujka 1996.
Sastav povjerenstva koje disertaciju ocijenilo	prof.dr.sc. Stipan Jonjić, prof. dr. Daniel Rukavina, prof.dr.sc. Boris Labar i doc.dr.sc. Pero Lučin
Datum obrane disertacije	18. travnja 1996
Sastav povjerenstva pred kojim je disertacija obranjena	I s t i
Datum promocije	

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

Voditelj: Doc. dr. Pero Lučin

Rad sadrži 143 stranice, 30 slika i 2 tablice.



Zahvaljujem se svom voditelju doc. dr. Peri Lučinu na potpori i brojnim korisnim savjetima koji su mi bili od velike pomoći prilikom izrade ovoga rada.

Osobitu zahvalnost dugujem prof. dr. Stipanu Jonjiću, mom učitelju i nositelju znanstvenog projekta, čija je svjetlost uvijek obasjavala put kojim sam kročio.

Ovom prilikom želim, također, iskazati veliku zahvalnost dr. sc. Ivici Paviću, mr. sc. Ireni Crnković, dr. med. Ireni Zorici, dr. med. Astrid Krmpotić i laborantici Jeleni Đirlić, s kojima sam proveo nebrojene sate zajedničkoga rada i bez čije bi pomoći ovaj rad bilo doista nemoguće ostvariti.

Izraze zahvalnosti upućujem mr. sc. Leji Gudelj na pomoći i sugestijama pri isčitavanju rukopisa.

Zahvaljujem se ujedno svim ostalim kolegama i članovima Zavoda za fiziologiju i imunologiju, na čelu s prof. dr. Danijelom Rukavinom, na razumijevanju i podršci.

U Rijeci, travnja 1996.

Bojan Polić



## SAŽETAK

Citomegalovirusi (CMV), poput ostalih herpesvirusa, uspostavljaju doživotnu latenciju nakon primarne infekcije koja obično prolazi asimptomatski. Reaktivacija latentnog virusnog genoma, u uvjetima narušenog imunološkog nadzora, dovodi do razvoja rekurentne infekcije i pojave CMV bolesti. Razvoj bolesti usprkos prisutnim protuvirusnim protutijelima pokazuje da su mehanizmi stanične imunosti presudni u nadzoru rekurentnog virusa. No, do sada nije utvrđena točna uloga pojedinih staničnih mehanizama. Naime, neutralizacijski učinak nazočnih protuvirusnih protutijela znatno ometa detekciju rekurentnog virusa u tkivima i time smanjuje osjetljivost postojećih modela za izučavanje nadzora rekurentne infekcije. Uporabom miševa s mutacijom gena za teški lanac imunoglobulina M ( $\mu$ MT/ $\mu$ MT), u kojih postoji nedostatak limfocita B i protutijela, po prvi puta smo bili u mogućnosti istražiti ulogu imunoloških mehanizama u uspostavi i nadzoru latencije. Potvrdili smo da su stanični mehanizmi nadzora neophodni za uspostavu i održavanje latencije. Protuvirusna protutijela ne mogu spriječiti pojavu rekurentne infekcije, ali mogu značajno ograničiti širenje rekurentnog virusa. Rizik od pojave rekurentne infekcije ovisi isključivo o stupnju narušenosti imunološkog nadzora posredovanog podvrstama limfocita T i stanicama NK. Pojedinačno uklanjanje ovih stanica ne uzrokuje pojavu rekurentne infekcije, usprkos njihovim različitim ulogama u nadzoru rekurentnog virusa.  $CD8^+$  limfociti T mogu samostalno nadzirati rekurentni virus u svim organima, za razliku od  $CD4^+$  limfocita T koji sami nisu dovoljni za učinkovit nadzor rekurentne infekcije. Stanice NK imaju ograničenu ulogu u nadzoru rekurentnog virusa u svim ispitanim organima, osim u slezeni gdje mogu samostalno kontrolirati virus. Rezultati neutralizacije citokina su pokazali da  $IFN\gamma$  ima ključnu ulogu u nadzoru rekurentnog virusa.

S obzirom da  $CD8^+$  limfociti T spregnuti s MHC molekulama razreda I predstavljaju glavni efektorski mehanizam nadzora MCMV infekcije, ispitali smo kako nedostatak ovoga mehanizma utječe na uspostavu latencije i nadzor rekurentne infekcije. U tu svrhu smo koristili miševe s mutiranim genom za  $\beta 2$ -mikroglobulin ( $\beta 2m^{-/-}$ ) i posljedičnim nedostatkom  $CD8^+$  limfocita T. Utvrdili smo da ovi miševi učinkovito kontroliraju virus dobiven iz kulture tkiva i uspostavljaju latenciju u jednakom vremenskom slijedu kao i odgovarajući heterozigoti. Međutim, nadomjesni mehanizmi imunološkog nadzora, prirodno razvijeni u ovih miševa, imaju ograničenu sposobnost nadzora infekcije s virulentnijim izolatom virusa. Nemogućnost izazivanja pojave rekurentne infekcije u latentno inficiranih  $\beta 2m^{-/-}$  miševa, unatoč neselektivnoj imunodepleciji, ukazuje na osobit način nadzora rekurentne infekcije u ovih miševa. Osim toga, pokazali smo da  $\beta 2m$  i MHC molekule razreda I nisu od presudne važnosti za infekciju s CMV kao mogući virusni receptori.

## SUMMARY

Cytomegaloviruses (CMV), like other members of the herpesvirus family, establish lifelong latency after usually asymptomatic primary infection. Reactivation of the latent viral genome in immunodeficient host causes recurrent infection and CMV disease. Development of CMV disease in the presence of antiviral antibodies suggests that cellular immune mechanisms play a crucial role in immunosurveillance of the recurrent virus. The precise role of cellular immune mechanisms has not yet been determined because of the low sensibility of experimental models, due to the capacity of antiviral antibodies to neutralize the recurrent virus in tissues. In this study we used mice with mutated immunoglobulin  $\mu$  chain gene, that are consequently devoid of B-cells and antibodies, as a susceptible model for characterization of the antibody-independent immune mechanisms involved in the surveillance of recurrent infection. We confirmed that cellular immune functions are essential for the establishment and maintenance of latency. Antiviral antibodies could not prevent recurrent infection, but they significantly limited dissemination of the recurrent virus. Risk of the recurrent infection and disease depended on the conditions of immune control provided by T cell subsets and NK cells. Recurrent infection in latently infected mice did not occur if a single subset was abolished, despite of non-equal capacity in immunosurveillance of the recurrent virus they possess. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes on their own were sufficient in controlling the recurrent virus in all tested organs, while CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were not. NK cells on their own had limited capacity in the control of recurrent virus. The only exception was the spleen, where NK cells completely prevented the infection. The results of cytokine neutralization *in vivo* indicate that IFN $\gamma$  plays a substantial role in the maintenance of latency.

Since MHC class I-restricted control of MCMV infection provided by CD8<sup>+</sup> T lymphocytes is main protective principle in the immunocompetent host, we examined how the lack of this immune effector mechanism influences the establishment of latency and control of the recurrent infection. To address this questions, we used mice with mutated  $\beta 2$  microglobulin gene ( $\beta 2m^{-/-}$ ) and consequently devoid of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. These mice efficiently controlled primary infection with the tissue culture grown virus and established latency with the kinetics similar to that of their heterozygous littermates. However, compensatory immune mechanisms, constitutively established in these mice, were limited in the control of more virulent isolate of the virus. Induction of the recurrent infection in latently infected  $\beta 2m^{-/-}$  mice was unsuccessful, despite of strong immunodepletion, indicating an unique control mechanism in these mice. In addition, we showed that  $\beta 2m$  and MHC class I molecules expressed on the cell surface are not essential for infection as putative viral receptors.

## POPIS KRATICA

ADCC	-	antibody dependent cell cytotoxicity (citotoksičnost ovisna o protutijelima)
$\beta 2m$	-	$\beta 2$ mikroglobulin
$\beta 2m^{+/-}$	-	miševi heterozigotni za mutaciju $\beta 2m$ gena
$\beta 2m^{-/-}$	-	miševi homozigotni za mutaciju $\beta 2m$ gena
CMV	-	citomegalovirus
E	-	early (rano razdoblje ciklusa umnažanja virusa)
EBV	-	Epstein-Barr virus
ELISA	-	enzyme linked immunosorbent assay (enzimatski imunosorbentni test)
ER	-	endoplazmatski retikulum
FACS	-	fluorescence activated cell sorter (protočni citometar)
FCS	-	fetal calf serum (fetalni teleći serum)
FITC	-	fluorescein izotiocijanat
gB	-	glikoprotein B
gH	-	glikoprotein H
GVHD	-	graft versus host disease (bolest uzrokovana reakcijom transplantata protiv primaoca)
HCMV	-	humani CMV
HSV	-	herpes simpleks virus
IE	-	immediate-early (najranije razdoblje ciklusa umnažanja virusa)
IFN	-	interferon
L	-	late (kasno razdoblje ciklusa umnažanja virusa)
LAT	-	latency associated transcript (prijepis virusne DNA u latenciji)
MCMV	-	mišji CMV
MEF	-	mišji embrionalni fibroblasti
MHC	-	major histocompatibility complex (glavni kompleks tkivne podudarnosti)
$\mu MT/+$	-	miševi heterozigotni za mutaciju imunoglobulinskog $\mu$ gena
$\mu MT/\mu MT$	-	miševi homozigotni za mutaciju imunoglobulinskog $\mu$ gena
MOI	-	multiplicity of infection (pojačanje infekcije)
NF- $\kappa B$	-	nuclear factor $\kappa B$ (nuklearni čimbenik kapa B)
PCR	-	polymerase chain reaction (lančana reakcija DNA-polimeraze)
PE	-	phycoerithrin (fikoeritrin)
PFU	-	plaque forming unit (jedinica virusa koja uzrokuje čistinu citopatogenim učinkom)
SGV	-	salivary gland virus (izolat MCMV iz žlijezda slinovnica)
TNF	-	tumour necrosis factor (čimbenik tumorske nekroze)



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	1
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	5
<b>2.1. Herpesvirusi</b> .....	5
2.1.1. Citomegalovirusi (CMV).....	6
2.1.1.1. Struktura CMV .....	7
2.1.1.2. Regulacija izražavanja CMV gena.....	8
<b>2.2. Imunološki nadzor infekcije s CMV</b> .....	11
2.2.1. Uloga stanične imunosti u nadzoru infekcije s CMV.....	12
2.2.1.1. Uloga limfocita T u nadzoru infekcije s CMV .....	12
2.2.1.2. Uloga stanica NK u nadzoru infekcije s CMV .....	14
2.2.2. Uloga citokina u nadzoru infekcije s CMV.....	16
2.2.3. Uloga protutijela u nadzoru infekcije s CMV.....	17
<b>2.3. Perzistentna virusna infekcija</b> .....	18
2.3.1. Mehanizmi perzistencije u infekciji s CMV .....	19
2.3.1.1. Ometanje imunološkog prepoznavanja.....	19
2.3.1.2. Imunosupresivno djelovanje CMV.....	21
2.3.2. Mehanizmi perzistencije u infekciji s drugim herpesvirusima .....	22
<b>2.4. Latentna infekcija</b> .....	23
2.4.1. Latentna CMV infekcija.....	24
2.4.2. Latentna infekcija u drugim skupinama herpesvirusa .....	26
2.4.2.1. Latentna infekcija u $\alpha$ herpesvirusa.....	26
2.4.2.2. Latentna infekcija u $\gamma$ herpesvirusa .....	27

<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	30
<b>3.1. Laboratorijske životinje</b> .....	30
<b>3.2. Virusi</b> .....	30
<b>3.3. Stanične linije</b> .....	31
<b>3.4. Materijal</b> .....	31
3.4.1. Kemikalije .....	31
3.4.2. Mediji.....	33
3.4.3. Puferi .....	33
3.4.4. Plastično laboratorijsko posude .....	34
3.4.5. Reagencije za protočnu citometriju.....	35
<b>3.5. Metode</b> .....	35
3.5.1. Testiranje miševa s genetskom mutacijom.....	35
3.5.1.1. Testiranje $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa .....	35
3.5.1.2. Testiranje $\beta$ 2m <sup>-/-</sup> miševa.....	36
3.5.2. Priprema monoklonskih protutijela.....	37
3.5.2.1. Uzgoj hibridomskih linija .....	37
3.5.2.2. Dobivanje protutijela u ascitesu.....	37
3.5.2.3. Pročišćavanje protutijela.....	38
3.5.3. Proizvodnja imunog seruma kunića na mišje citokine.....	39
3.5.4. Testiranje protutijela .....	40
3.5.4.1. Određivanje koncentracije protutijela .....	40
3.5.4.2. Test neutralizacije IFN $\gamma$ .....	41
3.5.4.3. Test neutralizacije TNF $\alpha$ .....	43
3.5.5. Deplecija limfocita i neutralizacija citokina <i>in vivo</i> .....	44
3.5.5.1. Deplecija subpopulacija limfocita T i stanica NK.....	44
3.5.5.2. Testiranje deplecije limfocitnih populacija protočnim citometrom.....	45
3.5.5.3. Testiranje funkcijske odsutnosti stanica NK .....	47
3.5.5.4. Neutralizacija citokina <i>in vivo</i> .....	48



3.5.5.5. Protokol neselektivne imunodeplecije.....	49
3.5.6. Detekcija virusa u tkivima.....	49
3.5.6.1. Priprema mišjih fibroblasta za titraciju virusa.....	49
3.5.6.2. Titracija virusa.....	50
3.5.6.3. Određivanje virusa u cjelokupnom homogenatu organa.....	51
3.5.6.4. Testiranje razine detekcije virusa u homogenatima organa <i>in vitro</i> .....	51
3.5.6.5. Testiranje latencije prijenosom homogenata organa latentno inficiranih $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa u neinficirane C57BL/6 miševe..	52
3.5.7. Kvantitativno i kvalitativno određivanje protuvirusnih protutijela u serumu.....	53
3.5.7.1. Kvantitativno određivanje protuvirusnih protutijela ELISA metodom.....	53
3.5.7.2. Test neutralizacije virusa <i>in vitro</i> .....	54
3.5.8. Histokemijska analiza stanica inficiranih s $\Delta$ MMS94.5 mutantnom MCMV.....	55
3.5.9. Detekcija virusne DNA u tkivima.....	56
3.5.9.1. Izolacija stanične DNA.....	56
3.5.9.2. Umnožavanje virusne DNA metodom lančane reakcije polimeraze (PCR).....	57
3.5.10. Statističke metode.....	58
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1. Miševi s nedostatkom protutijela (<math>\mu</math>MT/<math>\mu</math>MT) predstavljaju novi         model za izučavanje mehanizama nadzora rekurentne CMV infekcije? ...</b>	<b>59</b>
4.1.1. Mehanizmi nadzora primarne infekcije s CMV u $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa.....	60
4.1.1.1. Protutijela nisu neophodna u nadzoru primarne infekcije i ustpostavi latencije.....	61

4.1.1.2. Uloga mehanizama stanične imunosti u nadzoru primarne infekcije pri nedostatku protutijela .....	63
4.1.1.3.. Mehanizam nadzora kronične perzistentne infekcije u žlijezdama slinovnicama .....	65
<b>4.2. Latencija u <math>\mu</math>MT/<math>\mu</math>MT miševa .....</b>	<b>66</b>
4.2.1. Podjednaka nazočnost latentnog virusnog genoma u tkivima $\mu$ MT/ $\mu$ MT i $\mu$ MT/+ miševa.....	66
4.2.2. Latencija je stanje potpunog izostanka produktivne infekcije .....	68
<b>4.3. Mehanizmi imunološkog nadzora rekurentne CMV infekcije.....</b>	<b>70</b>
4.3.1. Uloga protutijela u nadzoru rekurentne infekcije .....	70
4.3.2. Uloga stanične imunosti u nadzoru rekurentne infekcije.....	73
4.3.2.1. Učestalost pojave rekurentne infekcije nakon deplecije limfocita T i stanica NK.....	73
4.3.2.2. Selektivna uloga limfocita T i stanica NK u nadzoru rekurentnog virusa.....	75
4.3.2.3. Epitelne stanice acinusa žlijezda slinovnica nisu izvor rekurentnog virusa.....	79
4.3.3. Uloga citokina u nadzoru rekurentne infekcije .....	82
<b>4.4. Nadzor infekcije u miševa s mutacijom gena za <math>\beta</math>2-mikroglobulin.....</b>	<b>84</b>
4.4.1. Uspostava latencije u uvjetima nedostatka MHC molekula razreda I i CD8 <sup>+</sup> limfocita T.....	85
4.4.2. Površinska nazočnost MHC molekula razreda I nije neophodna za infekciju fibroblasta <i>in vitro</i> .....	87
4.4.3. Mehanizmi nadzora primarne infekcije u $\beta$ 2m <sup>-/-</sup> miševa.....	88
4.4.3.1. Smanjena otpornost $\beta$ 2m <sup>-/-</sup> miševa na infekciju virulentnim virusom.....	91
4.4.4. Mehanizmi nadzora latentne infekcije u $\beta$ 2m <sup>-/-</sup> miševa .....	92
4.4.4.1. Izostanak reaktivacije virusa u $\beta$ 2m <sup>-/-</sup> miševa nakon imunodeplecije.....	92

4.4.4.2. Reaktivacija virusa kokultivacijom eksplanta slezene $\beta 2m^{-/-}$ miševa <i>in vitro</i> .....	93
<b>5. RASPRAVA</b> .....	95
<b>6. ZAKLJUČNI PREGLED</b> .....	107
<b>7. LITERATURA</b> .....	109

## 1. UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME

Skupinu herpesvirusa obilježava osobitost da nakon primarne infekcije imunokompetentnog domaćina, koja obično prolazi klinički neopaženo, ostaju latentno prisutni u organizmu kroz cijeli život (193). Imunološki sustav, naime, ne može u potpunosti ukloniti virusni genom iz stanica, premda učinkovito nadzire pojavu produktivne infekcije. Rekurentna infekcija, koja nastaje kao posljedica reaktivacije latentnog virusnog genoma, u uvjetima stečenih nedostatnosti imunološkog sustava uzrokuje bolest, često s teškom kliničkom slikom.

Citomegalovirusi (CMV) dijele zajedničke osobitosti herpesvirusa i pripadaju njihovoj  $\beta$  podskupini (193). Riječ je o DNA virusima specifičnim za vrstu, koji pokazuju tropizam za različite vrste stanica. Umnažanje virusa tijekom primarne infekcije odvija se u različitim tkivima i organima što uvjetuje rasprostranjenost latentnog virusnog genoma (163). S obzirom na raznolikost stanica koje mogu biti inficirane, do sada nije utvrđeno da li u svima dolazi do uspostave latencije i koje od njih mogu biti izvor rekurentnog virusa. Unatoč vjerojatno spontanoj i ograničenoj aktivnosti virusnog genoma tijekom latencije, do pojave rekurentne infekcije ipak ne dolazi u imunokompetentnog domaćina (95, 128). Uočeno je, naime, da je rizik od rekurentne infekcije neposredno povezan s primjenom različitih terapijskih protokola kojima se postiže dugotrajna imunosupresija. Rekurentna infekcija u imunoneдостatnih osoba je čest uzrok CMV bolesti što s obzirom na rasprostranjenost CMV među humanom populacijom (40 -100%) (69) predstavlja značajan medicinski problem. U Sindromu stečene imunodeficijencije izazvane virusom humane imunodeficijencije (AIDS), rekurentna CMV infekcija je uzrok komplikacija, a često i letalnog ishoda bolesti (106). Osim toga, s razvojem transplantacije organa i njezinom sve

široj primjeni u medicini raste i problem komplikacija koje nastaju kao posljedica rekurentne infekcije. Naime, nazočnost latentnog virusnog genoma u transplantatu ili u tkivima primaoca u uvjetima dugotrajne imunosupresivne terapije uzrokuje pojavu rekurentne infekcije i simptome CMV bolesti. Ovaj problem je naročito izražen prilikom transplantacije koštane srži (56, 126, 150), ali i drugih organa, uključujući jetru, bubrege, srce i pluća (84).

S obzirom na medicinski značaj CMV infekcije, čine se sve veći napori u istraživanju mehanizama imunološkog nadzora, kao i bioloških osobitosti virusa. Klinička opažanja i pokusi na mišjem modelu CMV infekcije su pokazali da je imunost posredovana stanicama glavni nosilac imunološkog nadzora (105, 159). Atimični miševi (nu/nu), koji nemaju limfocita T, su izrazito osjetljivi na infekciju s CMV za razliku od heterozigota (192). Prilikom istraživanja uloge pojedinih podvrsta limfocita T utvrđeno je da su CD8<sup>+</sup> limfociti T glavne stanice odgovorne za nadzor infekcije. Njihovim pasivnim prijenosom su se mogli polučiti profilaktički i terapijski učinci (92, 164, 166, 167, 171). Međutim, u odsutnosti CD8<sup>+</sup> limfocita T, nadzor nad infekcijom učinkovito preuzima nadomjesni mehanizam nadzora ovisan o CD4<sup>+</sup> limfocitima T, što pokazuje izuzetnu sposobnost prilagodbe imunološkog sustava u nadzoru infekcije (92). Prilikom prijenosa imunih CD4<sup>+</sup> limfocita T u imunonehodatne primatelje utvrđeno je da ove stanice nemaju neposredan zaštitni učinak, već pružaju neophodnu pomoć drugim efektorskim mehanizmima (92, 164). Stanice NK predstavljaju glavne kandidate za sudjelovanje u nadomjesnom mehanizmu nadzora s obzirom na obrazac citokinske podrške o kojem ovise njihove funkcije (IL-2, IL-12, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ). Uloga stanica NK u nadzoru CMV infekcije uočena je u homozigotnih beige miševa (bg/bg) s prirodnim nedostatkom NK-aktivnosti koji su znatno osjetljiviji na infekciju od heterozigota (182). S obzirom da su ove stanice nosioci prirodene imunosti, pretpostavlja se da one imaju važnu ulogu u ranom razdoblju virusne infekcije. Protuvirusno djelovanje stanica NK se



najvjerojatnije ostvaruje neposredno citolitičkim djelovanjem (21, 113, 119) i posredno, djelovanjem putem citokina ( $IFN\gamma$  i  $TNF\alpha$ ) ili protuvirusnih protutijela (ADCC) (39, 113, 124, 179).

Premda je razmjerno dobro dokumentirana uloga pojedinih mehanizama imunosti u nadzoru primarne infekcije, to se ne može ustvrditi i za nadzor latencije. S obzirom da se tijekom latencije vjerojatno odvija spontana i ogranična aktivnost latentnog virusnog genoma čiji su molekularni mehanizmi nadzora gotovo nepoznati, bolje je govoriti o imunološkom nadzoru rekurentne infekcije kao posljedici produktivne reaktivacije latentnog virusnog genoma. Utvrđeno je, naime, da se rekurentna infekcija pojavljuje u uvjetima neselektivne imunodeplecije latentno inficiranih miševa (28, 95). Ova činjenica ukazuje na glavnu ulogu staničnih mehanizama u nadzoru rekurentne infekcije, s obzirom da se ona javlja uz nazočnost protuvirusnih protutijela (163). U kliničkoj praksi je također zamijećeno da se u imunoneudostatnih osoba, unatoč prisutnosti specifičnih protutijela u serumu, javlja rekurentna infekcija i razvija CMV bolest (159). Premda je ova činjenica poznata već duže vrijeme, do sada nije razlučena uloga pojedinih staničnih mehanizama imunološkog nadzora rekurentne infekcije. Vjerojatan razlog za ovu činjenicu jest nazočnost relativno visokog titra neutralizacijskih protutijela u serumu latentno inficiranih miševa (163). Premda protuvirusna protutijela ne mogu spriječiti nastanak rekurentne infekcije u odsutnosti staničnih mehanizama nadzora, ona vjerojatno neutralizacijom virusa značajno smanjuju osjetljivost sustava za njegovu detekciju u pojedinim organima. Osim toga, reaktivacija latentnog virusnog genoma je u početku pojedinačan i ograničen događaj u tkivima s malom nazočnošću rekurentnog virusa, što za izučavanje uloge pojedinih mehanizama imunološkog nadzora zahtjeva osjetljiv model za detekciju rekurentnog virusa.

U našim istraživanjima smo koristili mišji model infekcije s CMV zbog razmjerno visoke razine usporedivosti s humanom infekcijom i eksperimentalnog pristupa kojeg bi bilo vrlo teško ili nemoguće ostvariti u

ljudi. Tom prilikom odabrali smo miševе s mutiranim genom za teški lanac imunoglobulina M ( $\mu$ MT/ $\mu$ MT) (101). U ovih miševa dolazi do zastoja u razvoju limfocita B i do izostanka proizvodnje imunoglobulina. Nedostatak protuvirusnih protutijela je omogućio značajno povećanje osjetljivosti ovoga modela i sustava za testiranje nazočnosti virusa (za  $10^2$  do  $10^3$  puta) u odnosu na dosadašnje modele, što nam je po prvi puta omogućilo izolirano izučavanje pojedinih staničnih mehanizama i citokina u imunološkom nadzoru rekurentne infekcije.

Osim toga, pokušali smo utvrditi kako razvoj primarne infekcije u uvjetima nedostatka  $CD8^+$  limfocita T, i time razvijenog nadomjesnog imunološkog mehanizma ovisnog o  $CD4^+$  limfocitima T, utječe na uspostavu i nadzor latencije. Pokuse smo izvodili na miševima kojima je rekombinantnom tehnologijom mutiran gen za  $\beta 2$  mikroglobulin ( $\beta 2m^{-/-}$ ), što onemogućuje nazočnost MHC molekula razreda I na površini stanica i uzrokuje nedostatak  $CD8^+$  limfocita T zbog onemogućenog timusnog odabira (229, 230). Ovom prilikom smo, također, ispitali ulogu  $\beta 2m$  i MHC molekula razreda I u CMV infekciji s obzirom na postojanje predložka o ulozi ovih molekula kao virusnih receptora.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1 Herpesvirusi

Herpesvirusi čine veliku skupinu DNA virusa i dijele temeljna zajednička obilježja. Veliki genom, od 120 do 240 tisuća parova baza linearne dvolančane DNA, je upakiran u ikozahedričnu kapsidu sastavljenu od 162 podjedinice, kapsomere (150 heksamera i 12 pentamera). Oko kapside se nalazi masa amorfne materijala, tegument, o čemu ovisi konačna veličina viriona (120 do 300 nm). Tegument s vanjske strane obavlja lipoproteinska ovojnica koja sadrži izdanke sačinjene od virusnih glikoproteina i nastaje prilikom prolaska nukleokapside kroz stanične membrane (175, 185, 216).

Temeljem bioloških osobitosti, posebice trajanja ciklusa umnažanja virusa i tropizma, herpesvirusi se dijele u  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  podskupinu. Podskupinu  $\alpha$ -herpesvirusa, čiji su glavni predstavnici virus herpesa simpleksa i varičela-zoster virus, odlikuje razmjerno kratak ciklus umnažanja i tropizam za stanice ektodermalnog podrijetla. Nasuprot tome,  $\beta$ -herpesviruse, čiji su tipični predstavnici citomegalovirusi i humani herpesvirus 6, obilježava dug replikacijski ciklus i tropizam za različite stanice (epitelne, fibroblaste, monocite, živčane stanice, itd.). Treća podskupina,  $\gamma$ -herpesvirusi, pokazuju tropizam za stanice limfoidne loze, a glavni predstavnici su Epstein-Bar virus i herpesvirus saimiri.

Ciklus umnažanja herpesvirusa je hijerarhijski reguliran u najmanje tri razdoblja. Tijekom najranijeg IE (engl. immediate early) ili  $\alpha$  razdoblja ciklusa umnažanja, izražavaju se geni čiji proteini imaju regulacijsku funkciju i potrebni su za otpočinjanje ranog E (engl. early) ili  $\beta$  razdoblja virusnog ciklusa. U  $\beta$  razdoblju izražava se čitav niz virusnih gena čiji proizvodi imaju različite uloge: priprema stanice za umnažanje virusne DNA i



ometanje imunološkog nadzora inficirane stanice. Kasno L (engl. late) ili  $\gamma$  razdoblje virusnog ciklusa započinje umnažanjem virusne DNA, nakon čega slijedi izražavanje strukturnih virusnih glikoproteina i oblikovanje viriona (175).

### **2.1.1. Citomegalovirusi**

Citomegalovirusi (CMV) su pripadnici podskupine  $\beta$  herpesvirusa (175). Strogo su specifični za pojedinu vrstu, imaju dug replikacijski ciklus, pokazuju tropizam za stanice različitog podrijetla i uzrokuju citomegaliju (196).

Primarna infekcija s humanim CMV (HCMV) događa se najčešće u dječjoj populaciji (2). U imunokompetentnih osoba prolazi subkliničkim tijekom i nakon replikacije virusa u različitim tkivima i organima prelazi u latentni oblik. Međutim, infekcija imunoneдостatnih osoba uzrokuje različite kliničke slike CMV bolesti (hepatitis, pneumonija, korioretinitis, itd.), a često i smrt. U SAD je oko 40 - 80% humane populacije inficirano prije puberteta, a u manje razvijenim zemljama taj broj se kreće od 90 - 100 % (50). Horizontalno širenje infekcije (širenje među jedinkama) odvija se bliskim kontaktom (109). Infektivni virus nalazimo u krvi i raznim tjelesnim izlučevinama poput sline, mlijeka, suza, mokraće, cervikalnog i vaginalnog ekskreta, stolice i sperme. (2, 93, 170). CMV se može širiti i vertikalnim prijenosom (transplacentalno) (30, 75). Oko 1% novorođenčadi je inficirano na ovaj način, a 0,1% ima simptome CMV bolesti (30, 144). Petehijalna krvarenja, hepatosplenomegalija, žutica i korioretinitis su najčešće kliničke značajke opće CMV bolesti u novorođenčadi (74, 144). Trajne posljedice kongenitalne infekcije mogu biti: mikrocefalija, oštećenje sluha i vida, te druge, za CMV rijetke malformacije, poput mikrognatije, srčanih greški, itd. (74, 75).

### 2.1.1.1. Struktura CMV

Od različitih CMV specifičnih za pojedine vrste (štakor, miš, zamorče, majmun, čovjek itd.) do sada su najbolje istraženi humani (HCMV) i mišji (MCMV). Genom ovih virusa, veličine 230-240 tisuća parova baza, sadrži oko 200 genskih lokusa i smješten je u virion karakterističan za ostale herpesviruse (31, 50). Dvostruka linearna virusna DNA na svojim krajevima sadrži ponavljajuće odsječke nukleotida i po svojoj složenosti pripada skupini E herpesvirusnih DNA (175). Ponavljajući odsječci predstavljaju mjesta sljepljivanja virusne DNA, pa se u inficiranim stanicama nalaze kružni (episomi) ili/i višejedinični (konkatemerni) oblici (108, 122). U HCMV se, za razliku od životinjskih CMV, ponavljajući odsječci nalaze i unutar molekule DNA, pa govorimo o izomernoj DNA. (175) U inficiranoj se stanici obično nalaze četiri izomera ove molekule (175).

Citomegalovirus, kao i ostali herpesvirusi, ulazi u stanicu postupkom koji se odvija stupnjevito: započinje priljublivanjem za staničnu membranu, na što se nastavlja sjedinjenje vanjske membrane virusa i stanične membrane, i završava prodiranjem nukleokapside u citoplazmu. U tim postupcima sudjeluje nekoliko glikoproteina što se nalaze u virusnoj ovojnici i na staničnoj membrani. Unatoč mnogim nastojanjima, još uvijek nisu utvrđene stanične receptorske strukture koje omogućavaju priljublivanje i sjedinjenje virusa sa staničnom membranom.

Jedan od glikoproteina, za kojega se smatra da sudjeluje u postupku priljublivanja virusa za stanicu, je  $\beta 2$  mikroglobulin ( $\beta 2m$ ). Ovaj glikoprotein, premda podrijetlom pripada domaćinu, pronađen je vezan za tegument viriona (190, 221). S obzirom na uočenu sposobnost HCMV viriona da veže slobodni  $\beta 2$  mikroglobulin ( $\beta 2m$ ), proizašla je pretpostavka da bi ovako vezan  $\beta 2m$  mogao poslužiti kao "most" za vezanje s teškim lancima MHC molekula razreda I na površini ciljne stanice (70, 71). Premda postoje podaci koji ukazuju na sudjelovanje  $\beta 2m$  u postupku

infekcije s CMV (71), biološki značaj ovog mehanizma još nije potpuno razjašnjen. Naime, postoje i oprečni rezultati koji poriču ovu ulogu  $\beta$ 2m (8). Osim toga, mogućnost infekcije staničnih linija koje ne ekspimiraju MHC molekule razreda I opovrgava isključivi značaj ovoga načina vezanja virusa sa stanicom (222).

Za glikoproteine vanjske virusne ovojnice postoje određeni dokazi da sudjeluju u procesu ulaska virusa u stanicu. Jedan od njih je glikoprotein H (gH) (157, 160, 161). Neutralizacijom ovog glikoproteina može se spriječiti infektivnost virusa *in vitro*, međutim, ovaj učinak nije opažen i *in vivo* (158, 161). Izgleda da gH ima određenu ulogu u sjedinjavanju virusa sa staničnom membranom, ali ne i u priljublivanju na staničnoj površini (97). Uz pomoć antiidiotipskih protutijela na monoklonska protutijela specifična za gH utvrđen je na staničnoj površini glikoprotein od 92,5 kD koji bi mogao predstavljati receptor za gH (97).

Glikoprotein B (gB) je također ekspimiran na virusnoj ovojnicu i vjerojatno predstavlja glavni protein u postupku sjedinjenja virusne sa staničnom membranom (137). Osim toga, on je odgovoran za prijenos virusa iz jedne stanice u drugu međustaničnim kontaktom i za oblikovanje sincicija inficiranih stanica (137). Uočeno je vezanje ovog glikoproteina s nekoliko glikoproteina na membrani stanice veličine od 30 do 34 kD (1, 203)

#### **2.1.1.2. Regulacija izražavanja CMV gena**

Infekcijom podložnih stanica započinje ciklus umnažanja CMV. Nakon specifičnog vezanja virusa za stanicu dolazi do sjedinjenja vanjske virusne ovojnice i stanične membrane prilikom čega se oslobađa nukleokapsida koja ulazi u stanicu. Prilikom prolaska nukleokapside kroz stanične strukture do jezgre dolazi do njezine postupne razgradne pri čemu se oslobađa virusna DNA. Ona se zatim prenosi u jezgru stanice gdje započinje izražavanje

virusnih gena. Regulacija izražavanja virusnih gena je hijerarhijski organizirana u tri razdoblja ciklusa umnažanja, kao i u ostalih herpesvirusa (115, 130, 175).

Najranijem,  $\alpha$  razdoblju ciklusa umnažanja virusa pripadaju najmanje tri gena (IE1, IE2 i IE3) čiji proteini imaju regulacijsko djelovanje na izražavanje gena  $\beta$  razdoblja, iako djeluju i autoregulacijski. U mišjeg CMV IE1 i IE3 geni dijele zajednički promotor i prva tri egzona, a dominantni proizvod izražavanja ovih gena je fosfoprotein od 89 kD (pp89) (104). Izgleda da ovaj regulacijski protein ne ostvaruje svoju transaktivacijsku ulogu neposrednim vezanjem za *cis* regulacijske elemente DNA, već je pokazano njegovo visokoafinitetno vezanje za histone (H2B) koje vjerojatno dovodi do aktivacije gena (135). O proizvodima izražavanja IE1/IE3 gena je ovisna aktivacija prve podskupine  $\beta$  gena (20). Transaktivacijsku ulogu u HCMV imaju geni IE1 i IE2 (45, 191), s tim da proizvod izražavanja gena IE2 djeluje negativno na pojačivač  $\alpha$  gena (149). IE2 gen u MCMV ne pokazuje sličnosti s IE genima u HCMV i nema transaktivacijsku ulogu (98, 100). Ovo najranije razdoblje izražavanja virusnih gena traje oko 2 sata pri infekciji s MCMV (99) i oko 4 sata pri infekciji s HCMV (195, 215).

Izražavanje transaktivacijskih gena  $\alpha$  razdoblja je pod snažnim nadzorom promotora i pojačivača koji se nalaze ispred ove skupine gena. U regulaciji aktivnosti pojačivača sudjeluju virusni, ali i stanični čimbenici što vjerojatno uzrokuje razlike u trajanju ciklusa replikacije u različitim tipovima stanica (62, 63, 78). Za aktivaciju  $\alpha$  gena je dovoljan transaktivacijski virusni protein upakiran u virionu, pa se ona može odvijati i uz nazočnost inhibitora sinteze proteina (197). Osim toga izražavanje  $\alpha$  gena je pozitivno ili negativno autoregulirano proizvodima ovih gena (149, 197). Unutar pojačivača  $\alpha$  gena nalazi se čitav niz ponavljajućih *cis*-regulacijskih elemenata preko kojih djeluju regulacijski *trans* čimbenici. U



HCMV je pojačivač podjeljen u dvije regije. U prvoj regiji nalazimo odsječke od 13 parova baza (pb) koje predstavljaju vezno mjesto za porodicu regulacijskih čimbenika NF1/CBP (engl. nuclear factor 1/CAAT binding protein).(196). Drugoj regiji pripada niz ponavljajućih odsječaka od 16, 18, 19 i 21 pb (128, 196). Na odsječcima od 18 pb nalazi se vezno mjesto CRE (engl. cAMP responsive element) za cAMP, a na odsječcima od 19 pb vezna mjesta za čimbenik NF- $\kappa$ B (engl. nuclear factor- kapa B) i AP-1 (128, 177). Prilikom infekcije humanih fibroblasta (HF) s HCMV bivaju inducirani transaktivacijski čimbenici što se vežu na vezno mjesto za AP-1 (18 pb) i cAMP (19 pb) (186, 197). Također, na vezno mjesto za NF- $\kappa$ B se veže i proizvod izražavanja IE1 gena HCMV (32, 177). Odsječci od 18 i 19 pb pokazuju homologiju sa odsječcima iste veličine u MCMV (16, 32, 63, 177, 197).

Izražavanje  $\beta$  gena se odvija kaskadno. U mišjeg su CMV do sada određene barem dvije podskupine gena, od kojih je prva regulirana regulacijskim proteinima  $\alpha$  razdoblja, a druga proteinima prve  $\beta$  podskupine (20). Virusni proteini koji se javljaju tijekom ovog razdoblja pripremaju stanicu za umnažanje virusne DNA i oblikovanje viriona. Tijekom ovog razdoblja pojavljuju se i proteini koji imaju imunosubverzivno djelovanje. Naime, zamijećeno je ometanje prezentacije virusnih antigena putem MHC molekula razreda I u inficiranim stanicama (7, 26, 42, 43, 223), a u mišjeg CMV su utvrđeni i određeni geni odgovorni za ovaj učinak (205). Osim toga, tijekom  $\beta$  razdoblja se izražava i virusni gen čiji proteini od 86/88 i 105 kD pokazuju sposobnost vezanja za Fc fragment imunoglobulina G (204). Ovo razdoblje završava s početkom umnažanja virusne DNA, oko 16 sati p.i. u MCMV (99) i oko 48 sati u HCMV (195, 215).

Tijekom kasnog  $\gamma$  razdoblja umnaža se virusna DNA, stvaraju se strukturni glikoproteini i oblikuju se virioni (99, 116, 195, 215). Umnažanje virusne DNA započinje na episomalnoj DNA koja služi poput kalupa za

sintezu novih molekula DNA (129). Ova kružna molekula DNA nastaje sljepljivanjem krajeva linearne virusne DNA tijekom prolaska nukleokapside kroz stanične strukture do jezgre (122, 129). Umnažanje u CMV započinje u području skupine konzerviranih gena virusnog genoma (103). Izgleda da se sinteza DNA odvija u oba pravca i pritom se oblikuje dugačka linearna molekula DNA (konkatemera), sastavljena od niza jednakih međusobno spojenih jedinica (9, 129). Cijepanjem konkatemere na mjestima sljepljivanja njezinih jedinica oslobađaju se linearne molekule DNA koje predstavljaju otisak episomalne DNA i kao takve ulaze u sastav nukleokapsida (115, 130). Nakon prelaska nukleokapsida kroz jezgrinu membranu one u citoplazmi dobivaju omotač od amorfog materijala (tegument), a prolaskom kroz vezikularni sustav Golgi- odjeljka i vanjsku ovojnicu (115, 216).

## **2.2. Imunološki nadzor infekcije s CMV**

Infekcija imunokompetentnog domaćina s CMV potiče imunološki odgovor posredovan stanicama i protutijelima. Imunološki sustav učinkovito nadzire produktivnu infekciju u tkivima i organima, ali ne može u potpunosti ukloniti virusni genom, što rezultira uspostavom doživotne latentne infekcije. Unatoč određenoj ulozi specifičnih protutijela, glavnu ulogu u nadzoru citomegalovirusne infekcije i uspostavi latencije imaju stanični imunološki mehanizmi (192). Važnost staničnih mehanizama najbolje potvrđuju opažanja na bolesnicima sa izraženom nedostatnošću stanične imunosti (ozračivanje, imunosupresivna terapija, AIDS, itd.) u kojih, unatoč normalnoj razini specifičnih protutijela, dolazi do razvoja citomegalovirusne bolesti (38, 67).

## **2.2.1. Uloga stanične imunosti u nadzoru infekcije s CMV**

### **2.2.1.1. Uloga limfocita T u nadzoru infekcije s CMV**

Povećana osjetljivost atimičnih miševa (nu/nu) na infekciju s MCMV, u odnosu na heterozigote (nu/+), ukazala je na ovisnost nadzora infekcije o limfocitima T (192). Zapažanja da tijekom infekcije dolazi do značajne proliferacije Thy-1<sup>+</sup> stanica i da se njihovim prijenosom u letalno inficirane miševe može spriječiti smrtnost potvrdila su presudnu ulogu limfocita T u nadzoru infekcije CMV (83, 192). Daljnjim istraživanjima uloge pojedinih podvrsta limfocita T utvrđeno je da citotoksični CD8<sup>+</sup> limfociti T predstavljaju glavni obrambeni mehanizam za vrijeme infekcije imunokompetentnog domaćina. Dokazi o zaštitnoj ulozi CD8<sup>+</sup> limfocita T su utemeljeni na rezultatima profilaktičkog i terapijskog prijenosa imunih limfocita T u imunosuprimiranog primatelja, kada se je s razmjerno malim brojem stanica moglo značajno ograničiti umnažanje virusa u različitim tkivima i otkloniti u potpunosti infekcija s MCMV (92, 164, 166). Nasuprot zaštitnom učinku CD8<sup>+</sup> limfocita T, ovakav učinak nije opažen prilikom prijenosa CD4<sup>+</sup> limfocita T ili CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> stanica (164). Tijekom ovih istraživanja uočeno je da je zaštitni učinak CD8<sup>+</sup> limfocita T nezavisan od pomoći CD4<sup>+</sup> limfocita T. Naime, prijenosom imunih limfocita T u ozračenog i CD4-depletiranog primaoca postignut je nadzor infekcije s MCMV identičan onome u skupini nedepletiranih miševa (164).

Analizom prethodnika citotoksičnih limfocita T iz regionalnih limfnih čvorova i slezene miševa inficiranih s MCMV utvrđeno je da gotovo polovica ovih stanica prepoznaje peptid, nastao preradom nestrukturnog virusnog fosfoproteina od 89 kD (pp89), koji je vezan za L<sup>d</sup> molekule (166). Cijepanjem postraničnih aminokiselina utvrđeno je da je peptid koji ima antigenična svojstva veličine od 5 do 9 aminokiselina (168). Prijenosom CD8<sup>+</sup> limfocita T iz miševa imuniziranih rekombinantnim virusom vakcinije što sadrži gen za pp89 spriječeno je uginanje letalno inficiranih miševa s

MCMV, što pokazuje zaštitnu ulogu stanica usmjerenih na ovaj virusni antigen (90). Usmjerenost citotoksičnog djelovanja na inficirane stanice u kojima je ciklus umnažanja virusa tek počeo ukazuje na sposobnost imunološkog sustava da ograniči infekciju u samom začetku.

Iako je zaštitna uloga  $CD8^+$  limfocita T u nadzoru CMV infekcije prevladavajuća, ona nije i nezamjenjiva. Imunološki sustav posjeduje izrazitu sposobnost prilagodbe, te može u potpunosti nadomjestiti ispad glavnog efektorskog mehanizma. Prilagodba imunološkog odgovora naročito dolazi do izražaja u miševa kojima su uklonjeni  $CD8^+$  limfociti T u kojih se kinetika uklanjanja virusa iz tkiva i organa ne razlikuje od imunokompetentnih životinja (92). Rezultati imunog prijenosa stanica pokazuju da se radi o mehanizmu ovisnom o  $CD4^+$  limfocitima T, a ne o neposrednom citotoksičnom učinku ovih stanica (164). Djelatnost ovoga mehanizma najvjerojatnije proizlazi iz neposrednog, antivirusnog, ili posrednog, imunoregulacijskog, djelovanja citokina.

Sličnim mehanizmom nadzire se infekcija u žlijezdama slinovnicama imunokompetentnih domaćina. Ovaj organ predstavlja mjesto perzistentne virusne infekcije i izvor horizontalnog širenja virusa. Iz još nepoznatih razloga infekcija epitelnih stanica acinusa žlijezda slinovnica pokazuje potpunu otpornost prema nadzoru posredovanom  $CD8^+$  limfocitima T i isključivo je pod nadzorom mehanizma ovisnog o  $CD4^+$  limfocitima T. Naime, prilikom deplecije  $CD4^+$  limfocita T dolazi do uspostave kronične perzistentne infekcije unatoč nazočnosti infiltrata  $CD8^+$  limfocita T u tkivu (91). S obzirom da rezultati prijenosa imunih stanica govore protiv neposrednog sudjelovanja  $CD4^+$  limfocita T u nadzoru ove infekcije istraživani su mogući načini posrednog djelovanja ovih stanica. Ispitana je uloga citokina,  $IFN\gamma$  i  $TNF\alpha$  koji pokazuju neposredno protuvirusno djelovanje *in vitro* (116). Neutralizacijom  $IFN\gamma$  i  $TNF\alpha$  *in vivo* postignut je učinak sličan depleciji  $CD4^+$  limfocita T što ukazuje na činjenicu da je



mehanizam nadzora ovog osobitog mjesta infekcije uglavnom posredovan spomenutim citokinima (117, 146).

#### **2.2.1.2. Uloga stanica NK u nadzoru infekcije s CMV**

Pokusi na atimičnim miševima (nu/nu) su pokazali da unatoč nedostatku limfocita T ipak postoji stanoviti stupanj imunološkog nadzora CMV infekcije. Deplecijom stanica NK sa serumom na asialo-GM1 antigen dodatno je povećana osjetljivost ovih miševa na infekciju s CMV (23, 24). Slični rezultati su dobiveni i u pokusima na beige miševima (bg/bg) u kojih postoji nedostatak NK-aktivnosti (182). Postoje, također, i klinička opažanja neočekivano teških simptoma infekcije s HCMV u pacjenata s prirodnim selektivnim nedostatkom stanica NK (13). Prijenosom stanica NK u inficirane, tek okoćene, C57BL/6 miševe potvrđen je zaštitni učinak stanica NK u nadzoru CMV infekcije (22).

Ubijanje ciljnih stanica je temeljni princip djelovanja stanica NK, što vjerovatno vrijedi i u nadzoru virusne infekcije. Ovo citotoksično djelovanje može biti posljedica neposrednog prepoznavanja određenih receptora na stanici ili je posredovano protutijelima (ADCC) (80, 139, 143). Osim toga, stanice NK su i izvor citokina s protuvirusnim djelovanjem ( $IFN\gamma$  i  $TNF\alpha$ ) (39, 141, 179). Aktivnost stanica NK je najizrazitija u vrlo ranom razdoblju infekcije (3. do 5. dana) nakon kojeg se ona smanjuje, a povećava se aktivnost citotoksičnih limfocita T (7. do 9. dana) (14, 201). Proliferacija i citotoksična aktivnost stanica NK je potaknuta s IL-12 i  $IFN\alpha$  što ih luče aktivirani makrofagi,  $IFN\beta$  što ga luče fibroblasti, te IL-2 i  $IFN\gamma$  što ih luče limfociti T i stanice NK (12, 64, 217). U početku infekcije porast aktivnosti stanica NK praćen je s porastom razine  $IFN\alpha/\beta$  (12, 217). S druge strane aktivirani limfociti T mogu prigušiti aktivnost stanica NK lučenjem Transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$  (engl. transforming growth factor- $\beta$ , TGF $\beta$ ) tijekom kasnijeg razdoblja virusne infekcije što objašnjava

opadanje aktivnosti stanica NK s razvojem CTL odgovora (201). U prilog tome govore i rezultati pokusa na miševima s teškom kombiniranom imunodeficijencijom (engl. SCID) koji pokazuju da aktivnost stanica NK ostaje značajno povećana i u kasnijem razdoblju infekcije i da može do određene razine nadzirati CMV infekciju unatoč nedostatku funkcije limfocita T i B (218). Ipak, taj mehanizam ne može samostalno u potpunosti suzbiti infekciju, što govori o nedostatnoj ulozi samih stanica NK u konačnom uklanjanju virusa (218).

Način na koji stanice NK prepoznaju stanicu inficiranu s virusom još nije u potpunosti razjašnjen. Uočeno je da receptori na stanicama NK (Ly-49, NKR-P1 skupine u miša i p58 u ljudi) prepoznaju određene alotipove MHC molekula razreda I na ciljnim stanicama (19, 96, 132). Ove molekule, zajedno s još nekima na NK stanicama (NK 1.1, CD69), pripadaju skupini membranskih proteina lektinskog tipa i određeni su genima na 6. kromosomu u miša (41, 66, 96, 206, 226). U ovoj skupini gena nalazi se i genski lokus *Cmv-1* koji je vezan uz lokus *NK 1.1.*, a odgovoran je za nadzor MCMV infekcije posredovan stanicama NK u slezeni C57BL/6 miševa (178). Za razliku od CD8<sup>+</sup> limfocita T, prepoznavanje određenog alotipa MHC molekule razreda I inhibira citotoksičnu aktivnost stanica NK (33, 41, 113). Ukoliko se monoklonskim protutijelima blokiraju receptori stanica NK (npr. Ly-49) ili odgovarajuće MHC molekule razreda I oslobada se citolitički potencijal stanica NK i moguće je razaranje ciljne stanice (96). Prepoznavanje je vezano uz određene determinante u varijabilnim domenama ( $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ ) MHC molekula razreda I (199, 200), a neki od receptora (NKR-P1 skupina) pokazuju specifičnost za ugljikohidratne ostatke nastale glikozilacijom membranskih proteina tijekom prolaska kroz egzocitozni put stanice (11). Razmatrana je, također, i uloga peptida u procesu prepoznavanja, no dobiveni su dvojbeni rezultati (29).

### 2.2.2. Uloga citokina u nadzoru infekcije s CMV

Sazrijevanje i diferencijacija staničnih efektorskih mehanizama je pod snažnim uplivom citokina. Limfociti T, stanice NK i makrofagi predstavljaju glavni izvor citokina koji podržavaju ovaj proces. Citokini koji potiču najučinkovitiji imunološki odgovor u suzbijanju virusne infekcije pripadaju tzv. Th1 obrascu lučenja (engl. T helper 1), a to su uglavnom  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  i IL-2, za razliku od Th2 obrasca koji potiče pretežno humoralni imunološki odgovor i koga čine IL-4, IL-5, IL6, IL-10 (133, 134, 180). Lučenje pojedinog obrasca citokina je određeno uzročnikom, mjestom ulaska u organizam i načinom prezentacije njegovih antigena (134, 180). Pojedini citokini potaknutog obrasca lučenja mogu inhibirati lučenje citokina suprotnog obrasca na staničnoj razini. Naprimjer, poznato je da IL-12, kojega luče pretežno makrofagi, potiče Th1 obrazac lučenja u limfocita T i stanica NK, a da IL-10 i IL-4 blokiraju njegovo lučenje i djelovanje na ciljne stanice (180)

$IFN\gamma$  je jedan od glavnih citokina što se izlučuje tijekom virusnih infekcija. Tijekom infekcije s CMV primjećeno je njegovo neposredno djelovanje na ciklus umnažanja virusa, kao i imunoregulacijsko djelovanje. Direktni protuvirusni učinak očituje se smanjenjem broja virusnih plakova u kulturi fibroblasta što je posljedica zaustavljanja prepisivanja gena kasnog razdoblja ciklusa umnažanja virusa (116). Premda slično protuvirusno djelovanje nije karakteristično za  $TNF\alpha$ , ovaj citokin zajedno sa  $IFN\gamma$  višekratno pojačava spomenuti učinak (116). Imunoregulacijske funkcije  $IFN\gamma$  su posljedica njegovog djelovanja na sazrijevanje staničnih efektorskih mehanizama u nadzoru virusne infekcije ( $CD8^+$  limfocita T i stanica NK), te poboljšavanja imunološkog prepoznavanja djelovanjem na postupak prerade virusnih antigena i pojačanjem ekspresije MHC molekula razreda I i II (147). Neutralizacija  $IFN\gamma$  *in vivo* uzrokuje porast titra virusa u žlijezdama slinovnicama imunokompetentnog domaćina (117). Ovaj učinak je

zamijećen i u drugim organima miševa kojima su dodatno depletirani CD8<sup>+</sup> limfociti T (117). Slični rezultati su dobiveni i prilikom neutralizacije TNF $\alpha$  (146). Ovi rezultati pokazuju da su navedeni citokini sastavni dio efekorskog mehanizma za nadzor CMV infekcije.

Tijekom infekcije s CMV posebno je važno djelovanje IFN $\gamma$  u poboljšanju prezentacije virusnih antigena u inficiranim stnicama. CMV posjeduje mehanizme kojima ometa prezentaciju svojih antigena putem MHC molekula razreda I. U infekciji s MCMV je uočena obustava prijenosa MHC molekula razreda I u endoplazmatskom retikulumu (ER) i smanjenje nazočnosti MHC molekula razreda I na površini stanice (42). IFN $\gamma$  može poništiti učinak ovog imunosubverzivnog mehanizama i omogućiti prezentaciju virusnih antigena putem MHC molekula razreda I (76).

### **2.2.3. Uloga protutijela u nadzoru infekcije s CMV**

Tijekom primarne infekcije s CMV stvaraju se specifična protutijela koja su usmjerena na strukturne, ali i regulacijske proteine virusa (68, 159). Neutralizacijsko djelovanje pripisuje se protutijelima specifičnim za glikoproteine virusne ovojnice (gB, gH) (158, 161). Protivirusna protutijela sudjeluju i u reakciji citotoksičnosti posredovanoj protutijelima (ADCC) (80, 139, 143). Međutim, rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju na ograničenu ulogu protutijela u nadzoru CMV infekcije. Kliničko iskustvo je pokazalo da se upotrebom imunog seruma u novorođenčeta s CMV bolešću mogu ublažiti simptomi bolesti, ali se ne može učinkovito suzbiti replikacija virusa u tkivima i organima (15, 54). Injiciranjem imunog seruma prije infekcije se ne može potpuno spriječiti širenje virusa do različitih tkiva i organa, kao ni uspostava latencije (55, 163, 181). U prilog maloj učinkovitosti protutijela u nadzoru akutne infekcije s CMV govori i podatak da miševi kojima su depletirani CD4<sup>+</sup> limfociti T, a čija je pomoć neophodna u stvaranju protivirusnih protutijela, vrlo dobro kontroliraju virusnu infekciju u



svim tkivima izuzev žlijezda slinovnica (91). Pojava CMV bolesti u imunosuprimiranih pacijenata, unatoč nazočnosti relativno normalne razine protuvirusnih protutijela, ukazuje na važnost staničnih mehanizama u nadzoru rekurentne CMV infekcije (159).

### **2.3. Perzistentna virusna infekcija**

Perzistentna virusna infekcija može nastati nakon akutne infekcije s različitim virusima (140). Riječ je o kroničnoj infekciji koja se zadržava u pojedinim vrstama stanica domaćina, unatoč prisutnom imunološkom nadzoru (140). Za razliku od latentne infekcije, koja je također oblik virusne perzistencije, pod perzistentnom infekcijom u užem smislu podrazumjevamo kroničnu produktivnu infekciju. Razvitak perzistentne virusne infekcije ovisi o virusnim mehanizmima ometanja imunološkog nadzora i o tipu inficirane stanice. Izbjegavanje imunološkog nadzora domaćina, te stalno umnažanje i širenje virusa među populacijom jest uvjet njegovog opstanka. Stoga su virusi, tijekom evolucije, razvili čitav niz različitih imunosubverzivnih mehanizama koji im omogućavaju neometano umnažanje u stanicama domaćina.

S obzirom na način djelovanja, imunosubverzivni mehanizmi se mogu podijeliti u dvije skupine: na one koji ometaju imunološko prepoznavanje i razaranje inficirane stanice, i one koji ometaju proliferaciju i diferencijaciju imunokompetentnih stanica (140, 184). Ometanje imunološkog prepoznavanja je posljedica djelovanja virusa, odnosno proizvoda ispoljavanja virusnih gena na postupak prerade i prezentacije virusnih antigena (stvaranje peptida na proteasomima, transport peptida u ER, oblikovanje trimolekulskih kompleksa s MHC molekulama razreda I i njihov transport do stanične membrane), pojavu molekula koje sudjeluju u procesu prepoznavanja (MHC molekule, adhezijske molekule) ili maskiranje istih na površini stanice (140, 184). S druge strane, ometanje uloge imunokompetentnih stanica se postiže

neposredno, njihovom infekcijom, ili posredno, djelovanjem virusnih proteina koji imaju funkciju citokina ili njihovih receptora čime se postiže imunomodulacijski učinak (184).

Perzistentna infekcija je uobičajena posljedica akutne infekcije herpesvirusima. Oni, s obzirom na veličinu genoma i broj pronađenih gena čiji produkti imaju imunosubverzivni učinak, predstavljaju zahvalan model za izučavanje molekulskih mehanizama virusne perzistencije. Mnogi od prethodno navedenih načina izbjegavanja učinkovitim imunološkom nadzoru su podloga perzistentnim herpesvirusnim infekcijama.

### **2.3.1. Mehanizmi perzistencije u infekciji s CMV**

#### **2.3.1.1. Ometanje imunološkog prepoznavanja**

S obzirom na glavnu ulogu CD8<sup>+</sup> limfocita T u nadzoru infekcije s CMV i njihovu spregnutost MHC molekulama razreda I, ometanje imunološkog prepoznavanja virusnih antigena ovim putem predstavljalo je atraktivan koncept za traženje molekulskih osnova za CMV perzistenciju.

Ranije je utvrđeno da peptid nastao preradom virusnog regulacijskog fosfoproteina pp89, u najranijem  $\alpha$  razdoblju ciklusa umnažanja MCMV, predstavlja antigen za CD8<sup>+</sup> limfocite T *in vivo* (165). Neosjetljivost inficiranih fibroblasta tijekom  $\beta$  razdoblja ciklusa umnažanja virusa u citotoksičnom testu s klonom CD8<sup>+</sup> limfocita T, specifičnim za spomenuti peptid, ukazao je na postojanje virusnog mehanizma ometanja prezentacije antigena (43). Zastoj u prezentaciji  $\alpha$  antigena primjećen je također i u infekciji s HCMV (65). Pritom nije uočen učinak virusnih produkata na postupak stvaranja i prijenosa peptida u ER, kao ni na sintezu teškog i lakog lanca MHC molekula razreda I (42). Mišji citomegalovirus neselektivno obustavlja prijenos oblikovanih trimolekulskih kompleksa u ER/cis Golgi odjeljku (42). Nedavno je pronađena i regija u virusnom genomu (*HIND III E*) u kojoj se nalaze geni odgovorni za ovaj učinak

(205). Posljedica obustave prijenosa trimolekulskih kompleksa je onemogućena prezentacija virusnih, ali i staničnih peptida tijekom E razdoblja virusnog ciklusa.

Osim zastoja u prezentaciji antigena, u tom razdoblju dolazi do brzog i gotovo potpunog nestajanja MHC molekula razreda I sa stanične površine (103). Naime, svega pet sati od početka infekcije dolazi do punog razvoja ovog učinka. S obzirom na stabilnost MHC molekula razreda I, koje u uvjetima potpuno zaustavljenog staničnog prijenosa proteina (brefeldinom A) ostaju stabilno prisutne na membrani stanice kroz više od 16 sati, njihovo brzo nestajanje s površine stanice nije se moglo objasniti virusnim ometanjem prijenosa ovih molekula do stanične membrane. Osim toga, potpunom obustavom staničnog prijenosa proteina može se spriječiti ovaj učinak virusa, što znači da je potreban prijenos i virusnih proteina na površinu stanice da bi se polučio učinak. Stoga postoje dokazi o postojanju još barem jednog mehanizma posredovanog direktnim učinkom virusnog(ih) proteina na stabilnost površinskih molekula razreda I MHC.

U infekciji s HCMV postoje dokazi o djelovanju virusnog mehanizma na oblikovanje i stabilnost MHC molekula razreda I, što dovodi do njihovog zadržavanja u pre-Golgi odjeljku i smanjenja nazočnosti na staničnoj površini (7). Istraživanja genoma HCMV su utvrdila postojanje gena UL-18 koji pokazuje sličnost s teškim lancem MHC molekula razreda I (6). Izražavanje ovog gena u stanicama inficiranim rekombinantnom vakcinijom dovela je do odjeljivanja  $\beta$ 2-m i onemogućila oblikovanje stabilnih trimolekulskih kompleksa (18). Međutim, u stanicama inficiranim s HCMV nije dokazano izražavanje ovoga gena, a pokusi s HCMV mutantom kojoj nedostaje UL-18 govore protiv uloge ovoga gena u smanjenju nazočnosti MHC molekula razreda I na površini stanice (17).

Osim navedenih načina ometanja imunološkog prepoznavanja spregnutog s MHC molekulama razreda I, pronalaskom CMV proteina koji

se ponaša kao receptor za Fc fragment imunoglobulina G istaknut je još jedan imunosubverzivni mehanizam. Ovaj protein se pojavljuje u stanicama inficiranim i s humanim i s mišjim CMV (58, 204). Njegova nazočnost na površini inficirane stanice, kao i na ovojnica virusa, pretpostavlja mogućnost maskiranja stanice vezanjem IgG i onemogućavanjem lize posredovane protutijelima (sustav komplementa i ADCC) (190). Nemogućnost neutralizacije virusa izoliranog iz žlijezda slinovnica protuvirusnim protutijelima, već samo korištenjem protutijela usmjerenih na mišje imunoglobuline ukazuje na moguću ulogu ovog mehanizma (88) Gen za spomenuti Fc receptor eksprimira se tijekom  $\beta$  razdoblja virusnog ciklusa, a njegov proizvod u slučaju infekcije s MCMV je glikoprotein veličine 105 kD (204). Osim maskirajućeg djelovanja, postoje naznake da bi ekspresija ovog proteina mogla utjecati na infektivnost virusa. Na temelju opažanja da je virion CMV sposoban vezati  $\beta$ 2m, stvorena je pretpostavka o  $\beta$ 2m kao virusnom receptoru (70, 71). Nedavna istraživanja na stanicama inficiranim s HCMV ukazuju na mogućnost da analog Fc receptora predstavlja ujedno i vezni protein za  $\beta$ 2m (190).

### **2.3.1.2. Imunosupresivno djelovanje CMV**

Imunosupresivno djelovanje CMV također predstavlja podlogu za razvoj perzistentne infekcije. Ono može biti posljedica djelovanja virusa na sazrijevanje imunokompetentnih stanica u primarnim limfatičkim organima ili inhibicije zrelih oblika.

U koštanoj srži je dokazana infekcija progenitorskih stanica posebno mijelomonocitne loze (136, 169). Postoje dokazi i o infekciji potpornih stromalnih stanica u timusu (210) i koštanoj srži (153) što dovodi do prolazne involucije ovih organa (156). S obzirom na ulogu stromalnih stanica u procesu negativne i pozitivne selekcije, posljedice infekcije ovih stanica mogu biti mnogobrojni nedostaci u repertoaru limfocita T i B.



Poremećaj u sazrijevanju limfocita T može se uočiti prelaskom nezrelih oblika kortikalnih timocita ( $CD4^+CD8^+$ ) na periferiju (156). Razlika u humoralnom odgovoru između adultno i neonatalno inficiranih miševa upućuje na promjene u repertoaru limfocita B. Naime, serum neonatalno inficiranih miševa precipitira manje virusnih proteina (163).

Ometanje funkcije zrelih imunokompetentnih stanica je vjerojatno posljedica infekcije monocita/makrofaga. Produktivna infekcija ovih stanica, koje imaju važnu ulogu u prezentaciji antigena i pokretanju imunološkog odgovora, može biti razlogom primjećene smanjene sposobnosti odgovora limfocitima T i B, te stanicama NK (87). Naime, nema dokaza za infekciju ovih stanica tijekom CMV infekcije, kao ni za imunomodulacijsko djelovanje virusa putem mogućih analoga citokina ili njihovih receptora.

### **2.3.2. Mehanizmi perzistencije u infekciji s drugim herpesvirusima**

Tijekom infekcije s virusom herpesa simpleksa tipa I i II, predstavnika  $\alpha$  skupine herpesvirusa, ispoljava se niz gena odgovornih za imunosubverzivni učinak. Izražavanje gena najranijeg razdoblja virusnog ciklusa, ICP47, je odgovorno za obustavu prezentacije virusnih antigena (227). Učinak virusnog proteina očituje se u destabilizaciji kompleksa MHC molekula razreda I i njihovog zadržavanja u ER/cis Golgi odjeljku. S obzirom da je učinak identičan za humane i za mišje alele molekula razreda I i da nije dokazano vezanje ovog virusnog proteina za teške lance, pretpostavilo se je njegovo djelovanje na razini razgradnje antigena i prijenosa peptida u ER (82). Nedavno je potvrđena ova pretpostavka, te je pokazano da se ICP47 veže za protein koji prenosi peptide (TAP) iz citosola u ER (60, 227).

Osim ometanja procesa prezentacije virusnih antigena pronađeno je i nekoliko virusnih proteina koji sudjeluju u maskiranju inficiranih stanica i viriona od djelovanja protutijela i sustava komplementa. Virusni glikoprotein C-1 predstavlja receptor za C3b komponentu komplementa kojim se sprečava neutralizacija virusa i liza inficiranih stanica s pomoću sustava komplementa (59). Proteini gE i gI zajedno tvore heterodimer koji ima ulogu receptora za Fc fragment IgG protutijela čime se također sprečava citotoksičnost posredovan protutijelima i opsonizacija inficiranih stanica (57).

Primjer stvaranja virusnog proteina s ulogom receptora za C4b komponentu komplementa nalazimo u infekciji herpesvirus saimiri, čime je zaustavljen samo klasični put aktivacije sustava komplementa (184).

U infekcije EBV virusom, predstavnikom  $\gamma$  skupine herpesvirusa, uočeno je izražavanje gena čiji protein BCRF-1 pokazuje sličnost s IL-10 i uzrokuje inhibiciju produkcije Th1 citokina ( $\text{IFN}\gamma$  i  $\text{TNF}\alpha$ ) (131). Također, pronađen je i virusni inhibitor djelovanja  $\text{IFN}\gamma$  na translaciju proteina (184). Blokiranjem fosforilacije elongacijskog čimbenika eIF-2 dolazi do obustavljanja translacije proteina.

#### **2.4. Latentna infekcija**

Latentna infekcija ili latencija virusa je jedna od osobitosti koja obilježava skupinu herpesvirusa. Uspostavljanje latencije u imunokompetentnog domaćina odvija se nakon uklanjanja primarne infekcije, pri čemu virusni genom ostaje trajno latentno prisutan u pojedinim stanicama. Latencija se definira kao potpuni izostanak produktivne infekcije u tkivima uz mogućnost reaktivacije latentno prisutnog virusnog genoma u dugotrajnoj kulturi tkiva *in vitro* (193). Mehanizmi uspostavljanja i održavanja virusnog genoma u latentnom stanju nije u potpunosti razjašnjen. Iz kliničkog iskustva (AIDS, imunosupresivna terapija) i brojnih istraživanja proizlazi da u uvjetima nedostatnosti imunološkog sustava dolazi do pojave

rekurentne infekcije, što ukazuje na važnost imunološkog nadzora u sprečavanju produktivne reaktivacije latentnog virusnog genoma (95, 106). S druge strane, osobit način regulacije ekspresije herpesvirusnih gena, kao i ograničenost latentnog virusnog genoma na pojedine vrste stanica u tkivima upućuje na suptilan mehanizam regulacije ciklusa umnažanja virusa u pojedinim tipovima stanica. Pronalazak transkripcijske aktivnosti virusnog genoma, specifične virusne RNA i proteina u nekih virusa mijenja sliku o potpunom "mirovanju" virusnog genoma tijekom razdoblja latencije (193).

#### **2.4.1. Latentna CMV infekcija**

Citomegalovirus pokazuje tropizam za pojedine stanice ektodermnog (žljezdani epitel slinovnica, živčavne stanice), mezodermnog (fibroblasti, makrofagi, endotelne stanice) i endodermnog podrijetla (hepatociti, žljezdani epitel gušterače). Unatoč brojnih i podrijetlom različitih stanica koje mogu biti inficirane ovim virusom, za sada je pokazano da se virus u uvjetima *in vitro* najbolje umnaža u fibroblastima. S obzirom na mogućnost infekcije potpornih, ali i parenhimnih stanica, virusni genom je rasprostranjen tijekom primarne infekcije u gotovo svim organima i tkivima. Posljedica primarne infekcije ovim virusom je uspostava višežarišne latentne infekcije u organizmu (163). Izgleda da količina prisutnog latentnog virusnog genoma u pojedinim tkivima ovisi o intenzitetu umnažanja, odnosno nadzoru primarne infekcije (163). Latentni virusni genom je prisutan u brojnim tkivima i organima (pluća, slinovnice, slezena, bubreg, nadbubrežne žlijezde, i dr.) gdje se virus može i reaktivirati, no međutim, malo se zna o stanicama koje su sjedišta latentnog virusa. Učinjeni su znatni naponi da se identificiraju inficirane stanice u pojedinim organima u kojima se može reaktivirati virus. Do sada postoji nekoliko podataka koji ukazuju da bi endotelne stanice u crvenoj pulpi slezene mogle biti jedno od sjedišta latentnog virusa, kojega je moguće reaktivirati u kulturi tkiva (94, 125, 130,

152). Upravo zbog nedostatka dovoljnih podataka o stanicama koje su sjedišta latentne infekcije, kao i nepostojanja zadovoljavajućeg modela za izučavanje latentne citomegalovirusne infekcije, molekularni mehanizmi uspostave latencije su gotovo nepoznati. Ipak, na temelju istraživanja funkcije pojedinih virusnih gena, kao i regulacije njihovog izražavanja tijekom ciklusa umnažanja virusa, pretpostavlja se da bi izražavanje najranijih  $\alpha$  gena mogla imati ključnu ulogu u uspostavi latentne infekcije. Proučavanjem regulacije ekspresije gena IE-1 u  $\alpha$  razdoblju ciklusa replikacije HCMV utvrđeno je da prelazak ciklusa u produktivnu fazu (ekspresija  $\beta$  i  $\gamma$  virusnih gena) ovisi o stvaranju kompleksa između staničnog čimbenika NF- $\kappa$ B i proizvoda IE-1 gena, te njegovom djelovanju u aktivaciji virusnih gena (130). Prilikom infekcije fibroblasta uvijek se oblikuje spomenuti kompleks i dolazi do produktivne infekcije, dok se obično pri infekciji neaktiviranih limfocita T ciklus prekida u  $\alpha$  razdoblju umnažanja zbog nemogućnosti oblikovanja kompleksa sa transaktivirajućim osobitostima. Stoga bi ravnoteža između virusne aktivacije i latencije mogla biti ovisna o mogućnosti aktivacije nuklearnog staničnog čimbenika NF- $\kappa$ B proizvodima izražavanja najranijih gena virusnog ciklusa (177). Uloga najranijih virusnih gena u uspostavi i održavanju perzistentne infekcije i latencije je proučavana i upotrebom mutanti mišjega CMV. Infekcijom miševa s mutiranim virusom RM-408, u kojem je učinjena delecija početnog odsječka gena IE-2, pokazala je normalno umnažanje virusa *in vivo*, osim ograničenog i produženog umnažanja u žlijezdama slinovnicama. Prilikom pokušaja reaktivacije ove mutante utvrđena je značajno manja učestalost reaktivacije u kulturi eksplanta slezene u odnosu na infekciju s divljim tipom virusa (121, 130).

## **2.4.2. Latentna infekcija u drugim skupinama herpesvirusa**

### **2.4.2.1. Latentna infekcija u $\alpha$ herpesvirusa**

Predstavnici  $\alpha$  herpesvirusa pokazuju tropizam za tkiva ektodermnog podrijetla (koža, živčane stanice, sluznice). Stoga su ova tkiva, poglavito živčane stanice, sjedišta latentne infekcije. Najviše podataka o mjestu i načinu uspostavljanja latencije ove podskupine herpesvirusa postoji o virusu herpesa simpleksa 1 (HSV1). Nakon primarne infekcije i nekoliko ciklusa umnažanja ovog virusa u koži, sluznicama ili rožnici infekcija se prenosi na završetke osjetnih živčanih stanica koji inerviraju inficirano područje. Brzim retrogradnim aksonskim prijenosom nukleokapside dopijevaju u tijela živčanih stanica (senzorički gangliji) (35, 118), gdje dolazi ili do umnažanja virusa i lize stanice ili do uspostavljanja latentne infekcije. Približno je procijenjeno da u senzoričkim ganglijima postoji oko 0,01 do 1,0 kopija virusnog genoma po stanici (25, 52, 172), odnosno od 1 do 20 kopija virusnog genoma po neuronu (193). U latentno inficiranim stanicama je pronađena virusna DNA u obliku ekstrakromosomske DNA s kovalentno povezanim krajevima, što upućuje na monomerni kružni oblik (episom) sličan plazmidu ili na konkatemerni linearni ili kružni oblik (52, 129, 172, 173). Izgleda da je virusni genom u latentnom stanju udružen sa nukleosomima slično kromatinu u eukariotskim stanicama (46). Tijekom latentnog perioda infekcije virusni genom nije u potpunosti "miran", već se odvija specifična i po opsegu ograničena transkripcija, čiji se produkti nazivaju LAT (engl. latency-associated transcripts) (194). Na temelju Northern blot analize utvrđena je dominantna prisutnost RNA veličine 2,2 kb (50-90%), zatim RNA veličine 1.5 kb (10-15%) za koju se pretpostavlja da je proizvod alternativnog spajanja prvog transkripta i treće najmanje RNA veličine od oko 1 kb (166, 182). LAT su proizvodi transkripcije u suprotnom smjeru (3' - 5') gena za polipeptid ICP0 (engl. Infected-cell polypeptide 0)  $\alpha$  razdoblja replikacijskog ciklusa virusa (209). Transkripcija



obuhvaća oko jednu trećinu ovoga gena, a procjena broja kopija LAT proizvoda se kreće oko  $2-5 \times 10^4$  molekula po latentno inficiranoj živčanoj stanici (208). Premda su LAT proizvodi specifični za latentnu infekciju, dvojben je njihov biološki značaj u uspostavljanju i održavanju latentne infekcije. Infekcija s mutantom HSV virusa, koja ne eksprimira LAT proizvode, pokazala je da se u ove mutante može uspostaviti i održati latentno stanje, a također i reaktivirati virus (89). Međutim, izgleda da LAT proizvodi sudjeluju u pojačanju reaktivacije latentnog virusa, što je pokazano na kunićjem modelu (193). O ulozi gena IE razdoblja u uspostavljanju latencije govore i pokusi sa mutantom HSV sa nedostatkom gena za ICP0 i ICP4 koji uspostavlja perzistentnu infekciju, dok se mutanta sa nedostatkom samo ICP0 ne može reaktivirati iz latentnog stanja (176).

#### **2.4.2.2. Latentna infekcija u $\gamma$ herpesvirusa**

U ove skupine virusa, koji pokazuju tropizam pretežno za limfocite, najbolje je upoznat mehanizam uspostave i održavanja latentne infekcije u Epstein-Barr virusa (EBV). Ovaj virus pokazuje izraziti tropizam za limfocite B, i u akutnom razdoblju infekcije uzrokuje simptome infektivne mononukleoze. Infekcija započinje u epitelnim stanicama orofarinksa nakon čega se prenosi na limfocite B. Infekcija s EBV može rezultirati lizom stanice, latencijom ili neoplastičnom transformacijom stanice. Dugoživući cirkulirajući limfociti B su nosioci latentnog virusnog genoma (193). Utvrđeno je da postoje mnogostruke ekstrakromosomske kopije EBV genoma u svakoj latentno inficiranoj stanici, čiji su krajevi kovalentno spojeni, te svaka kopija za sebe tvori kružni plazmidski oblik DNA (episom) (112, 138). Broj episoma u svakoj latentno inficiranoj stanici je konstantan, što upućuje na strogo regulirano umnažanje virusnog genoma povezano sa staničnim ciklusom (224, 225). U neoplastički transformiranim stanicama nalazimo i virusnu DNA integriranu u stanični genom (123).

Tijekom latencije virusni genom je prilično aktivan na što ukazuje transkripcijska aktivnost i niz proteina pronađenih u latentno inficiranim stanicama. Skupina nuklearnih virusnih antigena (EBV nuclear antigen, EBNA) ima određenu ulogu u nadzoru nad latentnim stanjem virusnog genoma. U uspostavljanju i održavanju episomalnog oblika virusne DNA važnu ulogu ima protein EBNA-1 (162, 224). Ovaj nuklearni protein je produkt ekspresije gena u području U3 i U4 virusnog genoma, a njegova veličina je promjenjiva (68-88 kD) i posljedica je alternativnog spajanja glasničke RNA (40). U procesu imortalizacije stanice sudjeluje protein EBNA-2 (82 - 87 kD) koji je produkt U-2 područja virusnog genoma (40). Stanice inficirane prirodnom delecijском mutantom EBV, kojoj nedostaje gen za EBNA-2, bivaju lizirane (127). Funkcija ostalih nuklearnih antigena (EBNA-3, EBNA-4, EBNA-5 i EBNA-6) nije u potpunosti poznata (193). Osim nuklearnih antigena koji sudjeluju mahom u regulaciji aktivnosti virusnog genoma, u latentno inficiranih stanicama pojavljuje se i membranski virusni protein (engl. Latent Membrane Protein, LMP) veličine oko 60 kD određen virusnim genom LT3 (40, 77). Transfekcija gena za LMP u neke stabilne mišje i štakorske stanične linije narušava njihov rast, pa se pretpostavlja uloga ovoga proteina u staničnoj transformaciji (213). Reaktivacija EBV iz latentnog stanja se može postići na različite načine (anti IgG protutijelima, kalcijским ionoforama, tumorskim promotorima), čime se barem u nekim slučajevima potakne aktivnost protein kinaze C (PKC), a time i ekspresija određenih čimbenika potrebnih za otpočinjanje litičkog ciklusa (193). Jedan od takvih čimbenika je i virusni transaktivacijski polipeptid (43 kD) nazvan ZEBRA (engl. BamHI fragment Z Epstein-Barr replication activator) (37, 202). Nedavno je pokazano da važnu ulogu u uspostavi i održavanju latentnog stanja imaju i virusom inducirani nitrični oksidi u inficiranim limfocitima B (120). Njihova uloga u održavanju latencije objašnjava se dijelom i preko kočenja aktivnosti

ZEBRA transaktivatora njegovom oksidacijom (5). Osim navedenog, utvrđeno je da inducirani nitrični oksidi sprečavaju apoptozu inficiranih stanica, a time doprinose dugovječnosti latentno inficiranih stanica (120).

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Laboratorijske životinje

Miševi što smo ih koristili u pokusima bili su genetski čistog soja. Uzgojeni su u vlastitoj koloniji Vivarija Medicinskog fakulteta u Rijeci, izolirani od vanjske okoline i u umjetno stvorenim uvjetima. Od visoko srodenih sojeva koristili smo miševe soja Balb/c ( $H2^d$ ) i C57BL/6 ( $H2^b$ ). Osim na spomenutim sojevima, pokuse smo izvodili i na sojevima miševa dobivenim transgeničnom tehnologijom. Miševi s mutiranim genom za  $\mu$  lanac imunoglobulina M dobiveni su ljubaznošću dr. Klause Rajewskog, Sveučilište u Kölnu, SR Njemačka. Posljedica ove mutacije u homozigota ( $\mu MT/\mu MT$ ) je zastoj u razvoju limfocita B i potpuni nedostatak imunoglobulina (101). Miševe s mutiranim genom za  $\beta 2$ -mikroglobulin smo dobili zahvaljujući dr. Rudolfu Jaenischu, Whitehead Institute of Biomedical Research, Cambridge, USA. U homozigota ( $\beta 2m^{-/-}$ ) izostaje sinteza  $\beta 2m$  što onemogućuje nazočnost MHC molekula razreda I na površini stanice i uslijed toga diferencijaciju  $CD8^+$  limfocita T (229, 230).

#### 3.2. Virus

Smith soj mišjeg citomegalovirusa (MCMV) je podrijetlom iz American Type Culture Collection (VR-194, Rockville, MD). Virus smo proizvodili na kulturi mišjih embrijskih fibroblasta (MEF) i pročišćavali ga sedimentacijom kroz sloj 15% sukroze ultracentrifugiranjem (25 000 x g, 90 min.) (165). Virus smo, do upotrebe, čuvali na  $-70^{\circ}$  C.

Rekombinantni virus  $\Delta MS94.5$  MCMV je delecijaska mutanta Smith soja MCMV u koje nedostaje dio genoma iz HIND III E područja. Dobiven je homolognom rekombinacijom pri čemu je na mjesto od približno 16 tisuća

parova baza početnog dijela HIND III E odsječka MCMV genoma ubačena "kazeta" što sadrži gen za  $\beta$ -galaktozidazu (lacZ "kazeta") (205).

Za testiranje letalne doze virusa pripremili smo virulentniji izolat MCMV iz žlijezda slinovnica (142). Subletalno ozračene (6,5 Gy) miševe Balb/c soja smo inficirali s MCMV i nakon 2 tjedna smo im izvadili žlijezde slinovnice. Izvadene organe smo homogenirali u MEM mediju, a homogenat raspodijelili i pohranili na  $-70^{\circ}\text{C}$ . Titar virusa smo odredili titracijom na podlozi od mišjih fibroblasta.

### 3.3 Stanične linije

Za proizvodnju monoklonskih protutijela koristili smo hibridomske stanične linije: YTS 191.1.2. (štakor  $\alpha$  miš CD4, IgG1) (34), YTS 169.4.2. (štakor  $\alpha$  miš CD8, IgG1) (34), PK 136 (miš  $\alpha$  miš NK 1.1., IgG2a) (102), R4.6A2 (štakor  $\alpha$  miš IFN $\gamma$ , IgG1) (187) i V1q (štakor  $\alpha$  miš TNF $\alpha$ , IgG2a) (51). Osim navedenih hibridomskih linija koristili smo i stanične linije: YAC-1 (limfom T stanica, H2<sup>a</sup>) i L929 (liniju imortaliziranih mišjih fibroblasta, H2<sup>k</sup>).

### 3.4. Materijal

#### 3.4.1. Kemikalije

Aktinomicin D, Sigma

Amonij sulfat,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Kemika

Blokirajući reagens za ELISA, Boehringer Mannheim

Dimetilsulfoksid (DMSO), Merck

Etilendiamintetraacetat- $\text{Na}_2$ -sol (EDTA), Merck

Fetalni teleći serum (FCS), Gibco

Gentamicin sulfat, Serva

L-Glutamin, Merck

Hepes, Serva

Kalcij-klorid,  $\text{CaCl}_2$ , Kemika



Kalij fericijanid,  $\text{KFe}(\text{CN})_4$ , Sigma  
Kalij ferocijanid,  $\text{KFe}(\text{CN})_3$ , Sigma  
Limunska kiselina,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$  Kemika  
Magnezij klorid,  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , Merck  
Merkaptoetanol, Merck  
Mišji interferon-gama, Bender Wien, lot M3-RD48  
MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid, Sigma  
Natrij azid,  $\text{NaN}_3$ , Difco  
Natrij-dihidrogenfosfat-2-hidrat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , Kemika  
Natrij-dodecil-sulfat (SDS), Serva  
di-Natrij-hidrogenfosfat-12-hidrat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ , Kemika  
Natrij-hidrogenkarbonat,  $\text{NaHCO}_3$ , Kemika  
Natrij hidroksid,  $\text{Na OH}$ , Kemika  
Natrij klorid,  $\text{Na Cl}$ , Kemika  
Nondient P-40 (NP-40), Sigma  
O-fenildiamin (OPD), Sigma  
Penicilin, Grunenthal, Stolberg  
Propidij jodid, Serva  
Streptomicinsulfat, Merck  
Sukroza, Merck  
Tripansko modriilo, Serva  
Tris-hidroksimetil-aminometan, Boehringer Mannheim  
Tween-20 (polioksietilen-sorbitan monolaureat), Sigma  
Vodikov peroksid (30%),  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Kemika

### 3.4.2. Mediji

1. Kompletan RPMI 1640 medij

2 mM L-Glutamin,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-Merkaptoctanol, 10 mM Hepes (pH 7.2),  $1 \times 10^5$  U/l Penicilin, 0,1 g/l Streptomicin sulfat, 0,05 g/l Gentamicin sulfat, 10-15 % Fetalni teleći serum (FCS), RPMI 1640 medij

2. Kompletan DMEM medij

2 mM L-Glutamin, 10 mM Hepes (pH 7,2),  $1 \times 10^5$  U/l Penicilin, 0,1 g/l Streptomicin sulfat, 0,05 g/l Gentamicin sulfat, 10% Fetalni teleći serum (FCS), DMEM medij

3. Kompletan MEM medij

2 mM L-Glutamin,  $1 \times 10^5$  U/l Penicilin, 0,1 g/l Streptomicin sulfat, 0,05 g/l Gentamicin sulfat, 3% Fetalni teleći serum (FCS), MEM medij

4. Medij za smrzavanje stanica

70% RPMI 1640 medij, 20% Fetalni teleći serum (FCS), 10% Dimetilsulfoksid (DMSO)

5. Medij za FACS

10 mM EDTA, 20 mM Hepes (pH 7,2), 2% Fetalni teleći serum, 0,1% Natrij azid ( $\text{NaN}_3$ ), PBS

### 3.4.3. Pufferi

1. PBS (fosfatima puferirana fiziološka otopina), pH 7,2

140 mM Natrij klorid ( $\text{NaCl}$ ), 2,7 mM Kalij klorid ( $\text{KCl}$ ), 6,5 mM Natrij hidrogenfosfat-2-hidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), 1,5 mM Kalij dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0,7 mM Kalcij klorid ( $\text{CaCl}_2$ ), 0,7 mM Magnezij klorid-6-hidrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ).

2. Bikarbonatni pufer, pH 9,6

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

3. Citratni pufer, pH 5.0

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

4. TAE pufer, pH 8,3

400 mM Tris acetat, 20 mM EDTA

5. Pufer za digestiju tkiva, pH 8,0

100 mM Natrij klorid ( $\text{NaCl}$ ), 10 mM Tris-Cl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, 0,1 mg/ml Proteinaza K

6. Otopina supstrata za peroksidazu, pH 5,0

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

#### **3.4.4. Plastično laboratorijsko posude**

Petrijeve posude za uzgoj tkiva (f 90 i 145 mm), Greiner

Ploče za uzgoj tkiva sa 24 rupice, Greiner

Ploče za uzgoj tkiva sa 48 rupica, Costar

Ploče za uzgoj tkiva s 96 rupica s ravnim dnom, Nunclon

Ploče za uzgoj tkiva s 96 rupica s okruglim dnom, Greiner

Bočice za uzgoj tkiva od 50 i 250 ml (Greiner)

Kontejneri od 1,8 ml (Eppendorf)

Epruvete za protočni citometar, Falcon Becton Dickinson

### 3.4.5. Reagensije za protočnu citometriju

anti-mišji CD4-PE (Becton Dickinson)  
anti-mišji CD8-FITC (Becton Dickinson)  
anti-mišji NK-Biotin (Pharmingen)  
anti-mišji CD2-PE (Pharmingen)  
anti-mišji TCR $\alpha\beta$ -FITC (Pharmingen)  
anti-mišji B220-PE (Becton Dickinson)  
anti-mišji CD5-FITC (Becton Dickinson)  
anti-mišji Ld Biotin (Pharmingen)  
anti-mišji Kd Biotin (Pharmingen)  
anti-mišji Dd Biotin (Pharmingen)  
Streptavidin-FITC (Becton Dickinson)  
Streptavidin-Tricolor (Caltag)

## 3.5. Metode

### 3.5.1. Testiranje miševa s genetskom mutacijom

#### 3.5.1.1. Testiranje $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa

Posljedica mutacije gena za  $\mu$  lanac IgM u  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa je zastoj u razvoju limfocita B i potpuni nedostatak serumskih imunoglobulina (101). Mutacija za spomenuto svojstvo se nasljeđuje po Mendeljevim pravilima kao autosomno recesivno svojstvo, te stoga heterozigoti imaju normalnu razinu serumskih imunoglobulina. Za rasplod ovih miševa koristili smo homozigotne ( $\mu$ MT/ $\mu$ MT) mužjake i heterozigotne ( $\mu$ MT/+) ženke, a očekivani udio homozigota u prvoj filijalnoj generaciji bio je 50%. Utvrđivanje homozigoteta obavljali smo testiranjem nazočnosti imunoglobulina u serumu. Prethodno označenim miševima (na ušima) smo uzeli 100  $\mu$ l krvi iz repne vene s pomoću mikropipete i odvojili serum. Serume smo testirali na nazočnost imunoglobulina razreda IgM pomoću "sandwich" enzimatskog imunosorbentnog testa ("sandwich" ELISA). Ploče za ELISA smo preko noći inkubirali s

kožjim  $\alpha$  mišjim IgM protutijelima otopljenim u bikarbonatnom puferu (pH 9,6) u koncentraciji od 3  $\mu\text{g/ml}$  na 4°C. Nakon blokiranja ploča s blokirajućim reagensom od najmanje 2 h (4 °C), na ploče smo ukapali serume u početnom razrijeđenju od 1:50 i titrirali ih uz dvostruko razrijeđivanje. Za sekundarna protutijela koristili smo kuničja  $\alpha$  mišja IgM protutijela obilježena s peroksidazom. U tako pripremljene rupice dodali smo supstrat OPD. Reakciju smo zaustavili dodavanjem istog volumena 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a apsorbanciju svjetla očitavali na optičkom čitaču za mikrotitar ploče (Titertek) uz filter od 492 nm. Vrijednosti apsorbancije svjetla u slučaju homozigotnog seruma bile su na razini negativne kontrole.

### 3.5.1.2. Testiranje $\beta 2\text{m}^{-/-}$ miševa

Mutacija gena za  $\beta 2$  mikroglobulin onemogućuje površnu ekspresiju MHC molekula razreda I i posljedično dovodi do zastoja u pozitivnoj selekciji CD8<sup>+</sup> limocita T u timusu (229, 230). Stoga se u u homozigotnih ( $\beta 2\text{m}^{-/-}$ ) miševa gotovo ne nalaze CD8<sup>+</sup> limfociti T u slezeni, limfnim čvorovima ili krvi. S obzirom da se ova mutacija prenosi autosomno recesivno, heterozigoti ( $\beta 2\text{m}^{+/-}$ ) imaju normalnu razinu CD8<sup>+</sup> limfocita T. Za rasplod smo koristili homozigotne mužjake i heterozigotne ženke. Homozigotet smo utvrđivali posredno, analizom CD8<sup>+</sup> limfocita T u perifernoj krvi s pomoću protočnog citometra. Miševima smo iz repne vene uzeli 100  $\mu\text{l}$  krvi s pomoću mikropipete i stavili smo je u prethodno pripremljene Eppendorf kontejnere s 5  $\mu\text{l}$  0,5 M EDTA (pH 8,0). Izravno u punu krv smo dodali 0,5  $\mu\text{l}$  kožjih  $\alpha$  mišjih CD8 protutijela obilježenih s FITC, te smo ih inkubirali 45 min. na sobnoj temperaturi. Zatim smo u iste kontejnere dodali 1 ml hladne (4°C) otopine za razaranje eritrocita (Becton Dickinson) i nakon inkubacije od 5 minuta stanice smo istaložili centrifugiranjem na 4000 o/min kroz 4 minute. Nadtalog smo odstranili, a na talog dodali medij za FACS kojim smo dva puta isprali stanice. Nakon toga smo stanice resuspendirali ponovno u mediju



za FACS (1 ml), te smo ih preko najlonske mrežice propustili u epruvete za protočni citometar. Na protočnom citometru (FACScan, Becton Dickinson) smo analizirali 10 000 limfocita i na temelju broja stanica koje fluoresciraju zelenom svjetlošću (FITC) odredili nazočnost CD8<sup>+</sup> limfocita T u perifernoj krvi. Homozigotima smo smatrali sve miševe koji su imali manje od 1% pozitivnih stanica.

### **3.5.2. Priprema monoklonskih protutijela**

Tijekom izrade ovoga rada koristili smo monoklonska protutijela za depleciju pojedinih subpopulacija limfocita i citokina *in vivo*. Protutijela smo proizveli, pročistili i testirali u vlastitom laboratoriju.

#### **3.5.2.1. Uzgoj hibridomskih linija**

Za dobivanje monoklonskih protutijela koristili smo hibridomske linije pohranjene u vlastitoj banci hibridoma što se čuva u tekućem dušiku na -196 °C. Prilikom proizvodnje monoklonskih protutijela hibridomske linije smo odmrznuli na 37 °C i zatim uzgojili u odgovarajućem kompletnom mediju (RPMI 1640 ili DMEM) uz dodatak 10 - 15% FCS u bočicama za kulturu tkiva. Stanice smo inkubirali na 37 °C uz 5% CO<sub>2</sub>. Nakon što su dostigle visoku razinu umnažanja i određenu gustoću stanice smo sakupili i injicirali u pripremljenu životinju radi dobivanja ascitesa sa visokom koncentracijom protutijela. Prisutnost monoklonskih protutijela u nadtalogu smo provjerili ELISA metodom (opisano dolje).

#### **3.5.2.2. Dobivanje protutijela u ascitesu**

Rast hibridoma u peritonealnoj šupljini eksperimentalne životinje uzrokuje stvaranje ascitesa s visokom koncentracijom protutijela (oko 10<sup>3</sup> puta većom od one u nadtalogu uzgojenih hibridoma *in vitro*). Eksperimentalnim životinjama koje su predviđene za proizvodnju ascitesa injicirali smo u

peritonealnu šupljinu 0,5 ml (miš) ili 1 ml (štakor) ugljikovodika pristana kako bismo izazvali nespecifičnu upalnu reakciju koja je pogodan okoliš za razvoj ascitičnog tumora. U tako pripremljene životinje smo nakon 5 do 7 dana injicirali stanice odgovarajućeg hibridoma ( $5 \times 10^6$  stanica) intraperitonealno. Pritom smo nastojali da tumor podrijetlom bude singeničan s pripremljenim životinjama kako bismo izbjegli odbacivanje tumora. Ukoliko stanice hibridoma nisu bile singenične, životinje smo dan prije injiciranja stanica imunosuprimirali ciklofosamidom (Endoxan<sup>R</sup>) u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno i hidrokortizon sukciantom u dozi od 125 mg/kg intramuskularno. Stvaranje ascitesa počelo je 5 do 10 dana poslije injiciranja stanica, te smo tada životinjama vadili ascites s pomoću odgovarajućih igala u eterskoj narkozi. U izvađenom ascitesu smo istaložili stanice (200 x g, 10 min.), a nadtalog smo sakupili i pohranili na -20 °C.

### **3.5.2.3. Pročišćavanje protutijela**

Monoklonska protutijela iz prikupljenog ascitesa smo pročistili precipitacijom imunoglobulina u prezasićenoj otopini amonijevog sulfata. Prikupljeni ascites smo propustili kroz sloj (oko 2 cm) staklene vune kako bismo odstranili masne čestice i preostalu nečistoću u ascitesu. Tako pripremljenom ascitesu smo postupno dodali 45% (vol/vol) prezasićene otopine amonijevog sulfata uz stalno miješanje na magnetnoj mješalici. Dobivenu otopinu smo ostavili kroz 2 sata na 4 °C da bi se dovršio proces precipitacije imunoglobulina. Nakon inkubacije, precipitate smo istaložili centrifugiranjem otopine kroz 30 min uz brzinu od 2000 x g. Nadtalog smo odstranili, a talog otopili u najmanjem mogućem volumenu PBS. Dobivenu otopinu smo profiltrirali kroz filter (veličina pora od 0,45  $\mu\text{m}$ ) i zatim smo njome ispunili dijalizacijsku membranu koja nije propusna za molekule veće od 18 kD (Merck). Dijalizacijska membrana od celuloznih vlakana je prije toga pripremljena iskuhavanjem u destiliranoj vodi kroz 30 minuta. Otopljeni

precipitat smo dijalizirali u 1000 puta većem ukupnom volumenu PBS od volumena dijalizata, na 4 °C uz stalno miješanje na magnetnoj mješalici. Dijalizu smo završili onda kada u PBS nismo mogli dokazati nazočnost amonijevog sulfata s pomoću 0,1 M barijevog klorida. Dijalizat smo još jednom profiltrirali, a zatim raspodijelili u Eppendorf kontejnere i pohranili na -20 °C.

### **3.5.3. Proizvodnja imunog seruma kunića na mišje citokine**

Kunićima težine 4 do 5 kg smo injicirali s 10 µg rekombinantnog mišjeg IFN $\gamma$  (rIFN $\gamma$ , Bender, Wien) ili 10 µg rekombinantnog mišjeg TNF $\alpha$  (rTNF $\alpha$ , Bender, Wien) u homogenatu kompletnog Freundovog adjuvansa (CFA). Rekombinantne citokine smo otopili u 0,5 ml sterilnog PBS-a. Otopini citokina smo dodali volumen (0,5 ml) CFA, nakon čega smo pristupili miješanju dvije otopine dok nije dobivena gusta mliječnobijela emulzija. Emulziju smo injicirali kuniću intrakutano na više mjesta. Poslije 2 tjedna iste količine rekombinantnih citokina smo injicirali kunićima, ali sada emulgirane u nekompletnom Freundovim adjuvansu (IFA) u istom omjeru. Kunići su, zatim, ponovno podraženi nakon 2 tjedna s istom količinom citokina otopljenom u 1 ml PBS što smo je injicirali intraperitonealno. Tjedan dana poslije zadnjeg injiciranja kunićima smo izvadili krv kardijalnom punkcijom u općoj anesteziji. Za anesteziju kunića koristili smo Ketavet<sup>R</sup> u dozi od 20 mg/kg u kombinaciji s Rompunom<sup>R</sup> u dozi od 5 mg/kg. Anestetike smo injicirali intramuskularno. Izvadenu krv (150 - 200 ml/kuniću) smo prikupili u epruvete od 50 ml, te smo je tijekom 2 sata inkubirali na sobnoj temperaturi kako bi došlo do zgrušavanja i retrakcije ugruška. Potom smo centrifugiranjem odvojili serum (200 g, 10 minuta), koji smo zatim profiltrirali (0,45 µm) i dekomplementirali na 56 °C tijekom 30 minuta. Serum smo zatim raspodijelili i pohranili na -20 °C. Specifičnost seruma i njegovu neutralizacijsku sposobnost smo testirali u niže opisanim neutralizacijskim testovima.

### **3.5.4. Testiranje protutijela**

Nakon pročišćavanja monoklonskih protutijela iz ascitesa pristupili smo njihovom testiranju. Najprije smo provjerili da li je dobiveni dijalizat sterilan nasadivanjem na hranjive mikrobiološke podloge (krvni agar). U sterilnom dijalizatu smo odredili koncentraciju protutijela i njihovu specifičnost.

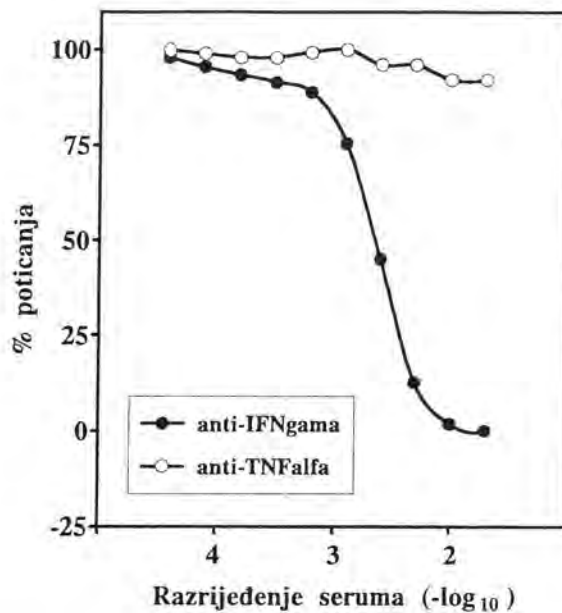
#### **3.5.4.1. Određivanje koncentracije protutijela**

Koncentraciju protutijela dobivenih precipitacijom iz ascitesa smo određivali sandwich-ELISA metodom. Ploče od 96 rupica za ELISA smo preko noći inkubirali s protutijelima protiv imunoglobulina odgovarajuće specifičnosti (miš, štakor) u koncentraciji od 3  $\mu\text{g/ml}$  u bikarbonatnom puferu (pH 9,6). Poslje toga smo ploče 2 puta isprali s PBS, te smo ih blokirali tijekom najmanje 2 sata sa 150  $\mu\text{l}$ /rupici reagensa za blokiranje. Potom smo ploče ponovno isprali 2 puta s PBS i u rupice ukapali protutijela dobivena postupkom precipitacije iz ascitesa. Protutijela smo razrijedili u PBS što je sadržavao 1% FCS i 0,05% Tween-20 i titirali u više uzastopnih razrijeđenja kako bismo mogli odrediti njihovu koncentraciju na temelju usporedbe sa standardnim krivuljama. Na istu ploču smo ukapali razrijeđenja standardnih otopina imunoglobulina. Nakon inkubacije od 45 minuta na sobnoj temperaturi ploče smo isprali u PBS obogaćenom s 0,05% Tween-20 s pomoću ručnog ispiraća za mikrotitar ploče (Titertek). Slijedeći korak bio je ukapavanje peroksidazom obilježenih sekundarnih protutijela specifičnih za imunoglobuline odgovarajuće vrste i izotipa. Inkubacija sa sekundarnim protutijelima trajala je također 45 minuta, nakon čega smo ploču ponovno isprali na već opisan način. U isprane ploče smo ukapali otopinu supstrata (OPD). Reakciju smo zaustavili dodatkom istog volumena 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  u trenutku kada je maksimalna vrijednost apsorpcije svjetla u pozitivnoj kontroli približno dostigla gornju granicu detekcije. Apsorpcije svjetla smo očitali na optičkom čitaču za mikrotitar ploče (Titertek) uz filter od 492 nm.

Vrijednosti apsorpcije svjetla za testirane uzorke usporedili smo sa standardnom krivuljom iz koje smo očitali odgovarajuće vrijednost koncentracije. Konačnu vrijednost koncentracije protutijela dobili smo korekcijom dobivene koncentracije s razrijeđenjem očitanoog test uzorka.

### 3.5.4.2. Test neutralizacije IFN $\gamma$

Specifičnost i neutralizacijski kapacitet kuničjeg seruma protiv rIFN $\gamma$



**Slika 1. Neutralizacijska sposobnost poliklonskog kuničjeg anti-IFN $\gamma$  seruma.**

Sposobnost kuničjeg anti-IFN $\gamma$  seruma (•) da neutralizira 2 ng/ml rIFN $\gamma$  odredili smo mjerenjem nazočnosti MHC molekula razreda I na mišjim fibroblastima s pomoću protočnog citometra. Za kontrolu smo koristili serum kunića imuniziranog s rTNF $\alpha$  (○). Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost 3 uzorka izraženu kao postotak od maksimalno potaknute nazočnosti MHC molekula razreda I s 2 ng/ml rIFN $\gamma$  nakon 24 h inkubacije.

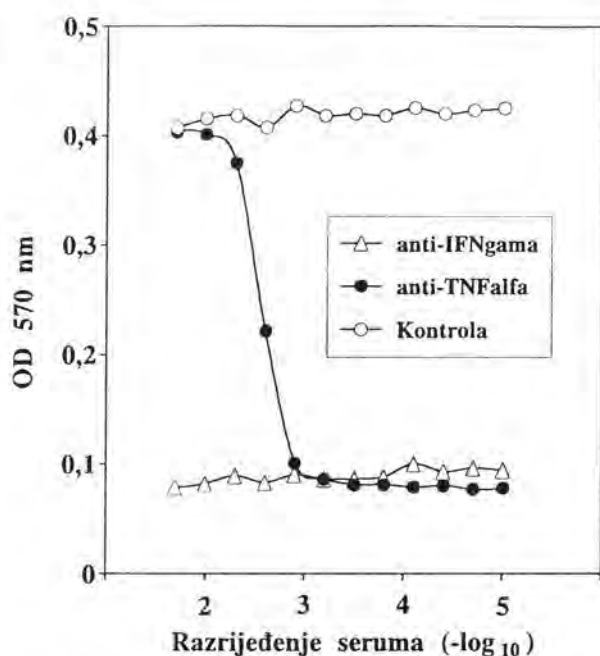
smo testirali *in vitro*. Imuni serum kunića smo titrirali (u MEM mediju s 3% FCS) tako da je početno razrijeđenje bilo 1:25, a svako slijedeće razrijeđenje je bilo dvostruko veće od prethodnog. U tako pripremljene epruvete s različitim razrijeđenjima seruma smo dodali isti volumen medija u kojem je bio otopljen rIFN $\gamma$  u koncentraciji od 4 ng/ml. Nakon miješanja dviju otopina konačno razrijeđenje seruma je bilo dvostruko veće (početno 1:50), a konačna koncentracija rIFN $\gamma$  u svakoj epruveti 2 ng/ml. Za kontrolu smo na isti način



razrijedili neimuni seruma kunića. Serume pomiješane s rIFN $\gamma$  smo inkubirali tijekom 90 minuta na 4 °C. Nazočnost rIFN $\gamma$  koji nije neutraliziran smo odredili testiranjem indukcije MHC molekula razreda I na mišjim fibroblastima (MEF). Naime, rIFN $\gamma$  već u koncentraciji od 0,02 ng/ml (1 U/ml) nakon 24 sata inducira maksimalnu nazočnost MHC molekula razreda I na stanicama. Ploče (24 rupice) s  $2 \times 10^5$  fibroblasta/rupici smo pripremili 4 sata prije ukapavanja kako bi se stanice priljepile za podlogu. U svaku rupicu smo dodali po 1 ml otopine iz svake prethodno inkubirane epruvete. Za negativnu kontrolu su nam poslužili fibroblasti uzgojeni u normalnom mediju, a za pozitivnu kontrolu smo koristili fibroblaste inkubirane u nazočnosti različitih koncentracija rIFN $\gamma$ . Nakon inkubacije od 24 sata u CO $_2$  inkubatoru pri 37°C, stanice smo prikupili direktno u epruvete za protočni citometar kratkotrajnom tripsinizacijom u tripsinskom mediju. Nakon neutralizacije tripsina, dodavanjem deseterostruke količine medija s 3% FCS, stanice smo istaložili centrifugiranjem (200 g, 3 minute), a zatim ih jednom isprali u mediju za FACS. Na talog smo dodali mješavnu komercijalnih protutijela obilježenih biotinom na sva tri alelska oblika (L $^d$ , K $^d$  i D $^d$ ) MHC molekula razreda I. Za kontrolu smo koristili nespecifična mišja protutijela istog izotipa također obilježena biotinom. Nakon inkubacije od 30 minuta stanice smo isprali dva puta s po 1 ml medija za FACS, a zatim smo na talog dodali Streptavidin-FITC u količini od 2  $\mu$ l/uzorku. Stanice smo potom inkubirali tijekom slijedećih 30 minuta. Nakon ispiranja, one su pripremljene za analizu na protočnom citometru resuspendiranjem u 1 ml medija za FACS uz dodatak 1  $\mu$ g/ml propij jodida. Rezultati testiranja su prikazani na slici 1. kao postotak maksimalno inducirane ekspresije MHC molekula razreda I na mišjim fibroblastima potaknute rIFN $\gamma$  (2 ng/ml) tijekom 24 h. S obzirom da testirani serum kunića u razrijeđenju 1/400 smanjuje induksijsku sposobnost IFN $\gamma$  na polovinu maksimalne vrijednosti, iz toga proizlazi da 1 ml seruma može neutralizirati oko 800 ng rIFN $\gamma$ .

### 3.5.4.3. Test neutralizacije TNF $\alpha$

Neutralizacijsku sposobnost seruma kunića imuniziranog s rTNF $\alpha$  smo provjeravali u testu neutralizacije rTNF $\alpha$  in vitro. Test se zasniva na činjenici da TNF $\alpha$  u koncentraciji od 0,02 ng/ml (1U/ml) ubija 50% stanica linije imortaliziranih mišjih fibroblasta L929 u razdoblju inkubacije od 16 sati (212). Imuni serum kunića smo razrijeđivali na ploči od 96 rupica, s tim da je početno razrijeđenje bilo 1:25, a slijedeća razrijeđenja dvostruko veća. U tako



**Slika 2. Neutralizacijska sposobnost poliklonskog kunićjeg anti-TNF $\alpha$  seruma.**

Sposobnost kunićjeg anti-TNF $\alpha$  seruma (●) da neutralizira 5 ng/ml rTNF $\alpha$  smo odredili u testu ubijanja L929 stanica (212). Za negativnu kontrolu smo koristili serum kunića imuniziranog s rIFN $\gamma$  (○). Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost od 3 uzorka, i uspoređeni su s učinkom samog rTNF $\alpha$  na L929 stanice (Δ).

pripremljena razrijeđenja (100  $\mu$ l/rupici) dodali smo jednak volumen otopljenog rTNF $\alpha$  u konačnoj koncentraciji od 5 ng/ml uz dodatak aktinomicina D (4 mg/ml) kako bi zaustavili rast L929 stanica. Za kontrolu smo na jednak način razrijedili serum kunića imuniziranog s rIFN $\gamma$ . Ploču smo zatim inkubirali tijekom 60 minuta na 4 °C. Nakon inkubacijskog razdoblja uzorke smo testirali na nazočnost rTNF $\alpha$  koji nije neutraliziran serumom. Ploče od 96 rupica (ravno dno) smo pripremili prethodni dan ukapavanjem 10<sup>4</sup> stanica po

rupici. Na tako pripremljene stanice smo ukapali 100  $\mu$ l/rupici otopine iz prethodno inkubiranih uzoraka za testiranje. Osjetljivost stanica na rTNF $\alpha$  smo testirali dodavanjem različitih koncentracija rTNF $\alpha$ . Očitavanje testa smo izvršili kolorimetrijski nakon 16 sati inkubacije u CO<sub>2</sub> inkubatoru na 37 °C. Tijekom posljednja 4 h stanice smo inkubirali u pirsustvu tetrazolijeve soli (MTT) (1,65 mg/ml) (183). Žive stanice su tijekom tog perioda u mitohondrijima preradile MTT u plavi formazan. Nakon toga ploče smo isprali 1x u redestiliranoj vodi, kako bismo se riješili medija i neadherentnih stanica, a zatim smo ih osušili i otopili formazan s 150  $\mu$ l otopine apsolutnog etanola i DMSO u omjeru 1:1. Nakon toga smo očitavali apsorpcije svjetla na optičkom čitaču za mikrotitar ploče (Titertek) uz filter od 530 nm. Rezltati testiranja su prikazani na slici 2., gdje se može vidjeti da imuni serum kunića u razrijeđenju 1/400 neutralizira 5 ng/ml rTNF $\alpha$  u tolikoj mjeri da preostali slobodni rTNF $\alpha$  uzrokuje smrt 50% L929 stanica. Iz toga proizlazi da 1 ml seruma neutralizira oko 2  $\mu$ g rTNF $\alpha$ .

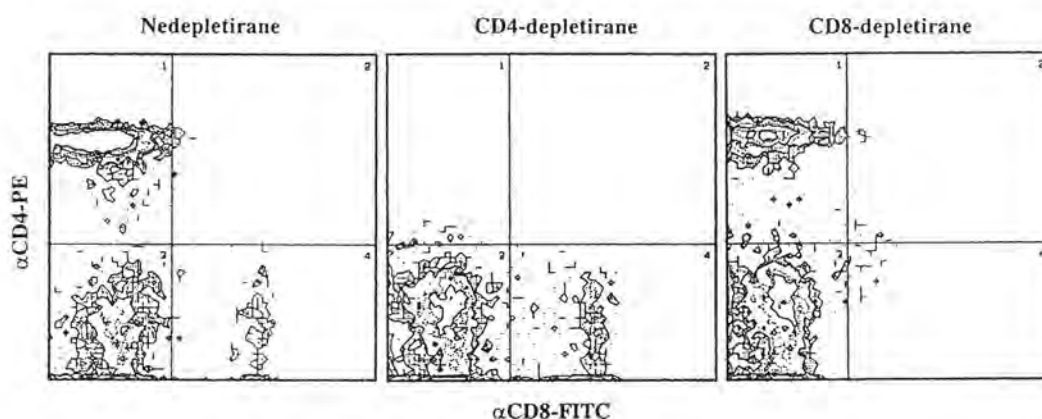
### **3.5.5. Deplecija limfocita i neutralizacija citokina *in vivo***

#### **3.5.5.1. Deplecija subpopulacija limfocita T i stanica NK**

Limfocite T smo selektivno depletirali injiciranjem monoklonskih protutijela YTS 191.1.2. specifičnih za molekulu CD4 (selektivna deplecija CD4<sup>+</sup> limfocita) ili monoklonskih protutijela YTS 169.4.2. specifičnih za molekulu CD8 (selektivna deplecija CD8<sup>+</sup> limfocita) (34). Stanice NK smo depletirali injiciranjem monoklonskih protutijela PK 136 specifičnih za molekulu NK1.1., što se nalazi na većini stanica NK (102). Protutijela smo injicirali miševima intraperitonealno u dozi od 1 mg/mišu na dan početka pokusa, te svaki 5. dan tijekom trajanja pokusa. Kontrolnoj skupini životinja smo u isto vrijeme injicirali irelevantna protutijela u istom volumenu.

### 3.5.5.2. Testiranje deplecije limfocitnih populacija protočnim citometrom

Učinkovitost deplecije pojedinih populacija limfocita *in vivo* testirali smo metodom dvostruke imunofluorescencije, a rezultate smo analizirali s pomoću protočnog citometra (FACScan, Becton Dickinson). Na dan žrtvovanja, pojedinim životinjama iz depletiranih skupina uzeli smo 1/2 slezene i poplitealne limfne čvorove kako bismo mogli utvrditi učinkovitost deplecije. Ovojnice spomenutih organa smo pažljivo potrgali iglama, a zatim smo stanice

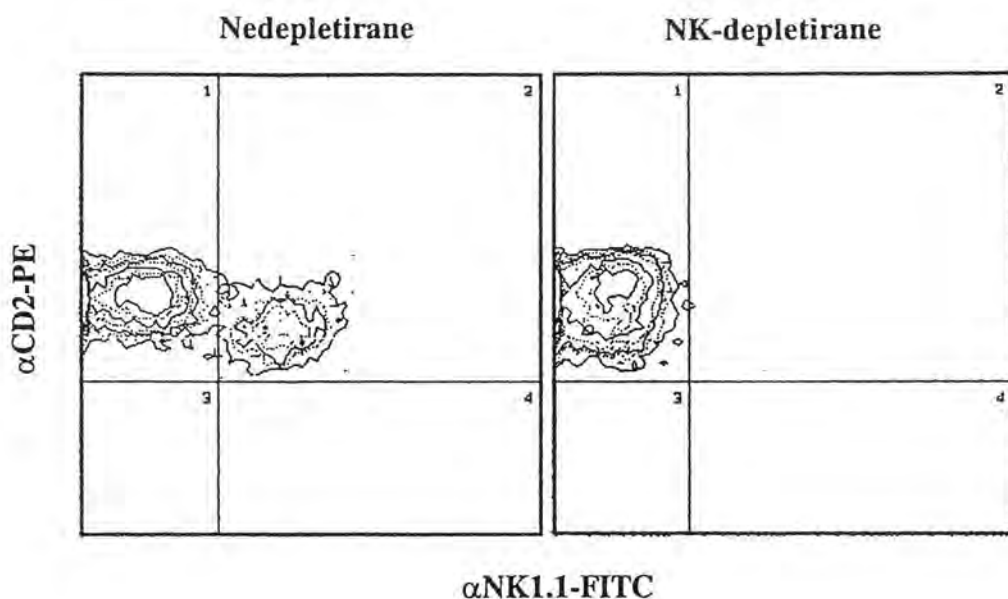


**Slika 3. Testiranje deplecije CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita T u  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa.**

Protočnim citometrom smo analizirali nazočnost CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita T u slezeni nedepletiranih, CD4-depletiranih i CD8-depletiranih  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa. Prikazani su rezultati analize 10000 limfocita.

propustili kroz najlonsku mrežicu ispiranjem organa s 10 ml kompletnog RPMI 1640 medija obogaćenog s 10 % FCS. Stanice smo istaložili centrifugiranjem u trajanju od 5 minuta na 200 x g, na talog stanica dodali 2 ml hladne (4 °C) otopine za razaranje eritrocita, te ih zatim isprali 2 puta u 10 ml kompletnog medija. Nakon zadnjeg ispiranja stanice smo resuspendirali u mediju za FACS, odredili koncentraciju živih stanica s pomoću tripanskog modrila, i po 10<sup>6</sup> stanica raspodijelili u Eppendorf kontejnere. U tako pripremljene uzorke dodali smo obilježena monoklonska protutijela specifična za navedene diferencijacijske biljege. Depleciju podvrsta limfocita T smo

provjeravali fikoeritriinom obilježenim protutijelima  $\alpha$ CD4 i fluoresceinom obilježenim protutijelima  $\alpha$ CD8. Depleciju stanica NK smo testirali fikoeritriinom obilježenim protutijelima  $\alpha$ CD2 protutijela i biotinom obilježenim protutijelima  $\alpha$ NK1.1.. Nakon inkubacije od 30 minuta pri temperaturi od 0°C (na ledu), stanice smo 2 puta isprali centrifugiranjem (Eppendorf minifuga, 200 g) s po 1 ml medija za FACS. Uzorku u kojem smo testirali nazočnost NK stanica smo zatim dodali streptavidinom vezan fluorescein (streptavidin-FITC, BD). Poslije inkubacijskog razdoblja od 30 minuta stanice smo ponovno



**Slika 4. Testiranje deplecije stanica NK u  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa.** Protočnim citometrom smo analizirali nazočnost stanica NK u slezeni nedepletiranih i NK-depletiranih  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa. Prikazani su rezultati analize 5000 CD2<sup>+</sup> limfocita.

2 puta isprali u mediju za FACS. Na kraju smo ih resuspendirali u 1 ml medija i analizirali na protočnom citometru. Na slici 3. su prikazani rezultati testiranja životinja kojima su depletirane subpopulacije limfocita T, a na slici 4. rezultati testiranja deplecije stanica NK. Pri testiranju limfocita T prozor smo stavili na sve limfocite i analizirali 10 000 stanica. Pri analizi deplecije stanica NK prozor smo stavili na CD2<sup>+</sup> stanice i analizirali ukupno 5000 stanica.



### 3.5.5.3. Testiranje funkcijske odsutnosti stanica NK

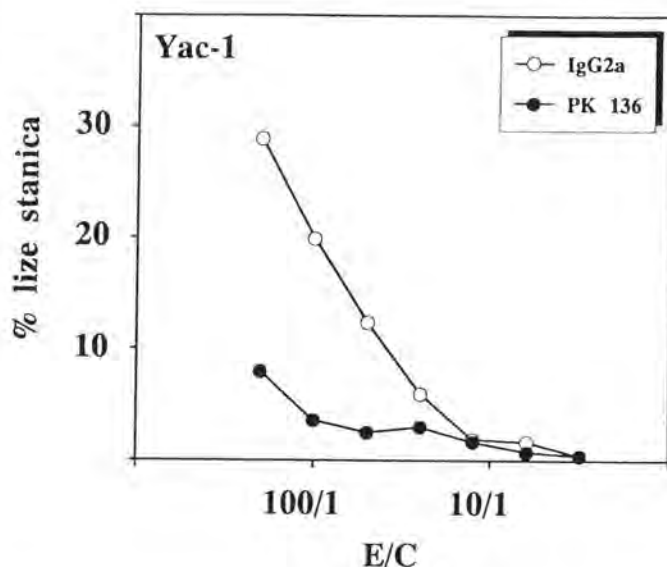
Učinkovitost protutijela u depleciji stanica NK smo testirali i određivanjem citotoksične aktivnosti stanica NK u akutno inficirane (5 dana p.i.) i depletirane životinje. Citotoksičnu aktivnost stanica NK smo utvrdili u citotoksičnom testu u kojem smo koristili NK-osjetljivu staničnu liniju YAC-1. Efektorske stanice smo izolirali iz slezene ili poplitealnih limfnih čvorova NK-depletiranih miševa. Nakon što smo razorili eritrocite, preostale stanice smo 2 puta isprali i zatim resuspendirali u 5 ml medija. U suspenziji smo odredili njihovu koncentraciju i vijabilnost brojenjem stanica u tripanskom modrilu. Stanice smo zatim ukapali u volumenu od 100  $\mu$ l na ploču za kulturu tkiva od 96 rupica s okruglim dnom i to tako da je u početnom razrijeđenju bilo  $4 \times 10^5$  stanica/rupici, a svako daljnje razrjeđenje je bilo dvostruko veće od prethodnoga. Istovremeno, oko  $10^7$  ciljnih stanica (YAC-1) u ukupnom volumenu od 1ml RPMI 1640 medija inkubirali smo s 100  $\mu$ Ci radioaktivnog izotopa  $^{51}\text{Cr}$  u obliku natrijevog kromata (Amersham) u  $\text{CO}_2$  inkubatoru pri  $37^\circ\text{C}$  tijekom 1 sata uz povremeno miješanje. Nakon inkubacije, stanice smo 3 puta isprali, a zatim smo podesili njihovu koncentracija na  $2 \times 10^4$  stanica/ml. U ploču s efektorskim stanicam smo dodali ciljne stanice u volumenu od 100  $\mu$ l/rupici ( $2 \times 10^3$  stanica), tako da se je omjer između efektorskih i ciljnih stanica kretao od 200:1 do 1,65:1. Isti volumen ciljnih stanica stanica smo prebacili u kivete za  $\gamma$ -brojač kako bismo odredili maksimalnu vrijednost radioaktivnosti obilježenih stanica. Stanice ukapane na ploče smo zatim istaložili kratkotrajnim centrifugiranjem (5 min, 200 x g) kako bi ostvarile što bolji dodir, te smo ih inkubirali na  $37^\circ\text{C}$  tijekom slijedeća 4 sata. Poslije inkubacijskog razdoblja ploče smo ponovno centrifugirali, i zatim smo u pripremljene kivete za  $\gamma$ -brojač prebacivali po 100  $\mu$ l nadtaloga iz svake rupice. Kivete smo zatvorili parafinom kojeg smo prethodno zagrijali do tališta. Radioaktivnost  $^{51}\text{Cr}$  otpuštenog iz razorenih ciljnih stanica smo odredili s pomoću  $\gamma$ -brojača. Iz dobivenih vrijednosti smo



izračunali postotak razorenih ciljnih stanica (201). Rezultati su prikazani na slici 5., gdje se vidi da se injiciranjem  $\alpha$ NK1.1. protutijela *in vivo* gotovo u potpunosti dokida NK aktivnost, što ukazuje na učinkovitu depleciju stanica NK.

#### 3.5.5.4. Neutralizacija citokina *in vivo*

Citokine smo neutralizirali monoklonskim protutijelima ili imunim



**Slika 5.** Testiranje citotoksične aktivnosti stanica NK u  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa. U citotoksi čnomtestu temeljenom na otpuštanju radioaktivnog izotopa  $^{51}\text{Cr}$  iz obilježenih ciljnih YAC-1 stanica testirali smo citotoksičnu aktivnost stanica NK podrijetlom iz slezena nedepletiranih (o) i NK-depletiranih (•)  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa. Prikazani su postoci ubijenih ciljnih stanica koji predstavljaju srednju vrijednost od 3 uzorka. (E/C) Omjer između efektorskih i ciljnih stanica.

serumom kunića. Protutijela smo injicirali intraperitonealno, a zatim injiciranje nastavili svaki drugi dan tijekom trajanja pokusa. Neutralizaciju  $\text{IFN}\gamma$  smo provodili monoklonskim protutijelima R4.6A2 (200  $\mu\text{g}$  po životinji u pojedinačnoj dozi) ili kunićjim antiserumom (250  $\mu\text{l}$  u pojedinačnoj dozi).  $\text{TNF}\alpha$  smo neutralizirali monoklonskim protutijelima V1q (200  $\mu\text{g}$  u pojedinačnoj dozi) ili serumom imunog kunića (100  $\mu\text{l}$  u pojedinačnoj dozi).

### **3.5.5.5. Protokol neselektivne imunodeplecije**

U nastojanju da utvrdimo reaktivacijski kapacitet MCMV u latentno inficiranim miševima primjenili smo protokol neselektivne imunodeplecije. Latentno inficirane miševе smo ozračili  $\gamma$ -zrakama ( $^{60}\text{Co}$ ) u dozi od 6,5 Gy. Ozračene životinje smo injicirali intraperitonealno mješavinom protutijela za depleciju  $\text{CD4}^+$  limfocita T (YTS 191.1.2.) i  $\text{CD8}^+$  limfocita T (YTS 169.4.2.), te stanice NK (PK 136). Sva smo protutijela injicirali u dozi od 1 mg/mišu, a depleciju smo ponovili nakon 7 dana od početka protokola. U reaktivacijski protokol smo uključili i kortikosteroid (hidrokortizon sukcinat, 125 mg/kg) kojeg smo injicirali intramuskularno na dan početka primjene protokola, a zatim smo injiciranje nastavili svaki drugi dan.

### **3.5.6. Detekcija virusa u tkivima**

Konačni učinak deplecije pojedinih limfocitnih populacija i citokina *in vivo* u svrhu proučavanja mehanizama imunološkog nadzora MCMV infekcije smo testirali detekcijom i određivanjem broja infektivnih jedinica virusa (titar) u pojedinim organima žrtvovanih životinja. Titar virusa smo odredili brojenjem čistina na sloju mišjih fibroblasta koje su posljedica citopatogenog djelovanja virusa. Jedna čistina odgovara jednoj infektivnoj jedinici (plaque forming unit, PFU).

#### **3.5.6.1. Priprema mišjih fibroblasta za titraciju virusa**

Mišje embrionalne fibroblaste (MEF) smo dobili iz 17 do 19 dana starih fetusa skotnih Balb/c ženki. Fetuse smo izvadili sterilno iz uterusu i usitnili sterilnim škarama, te komadiće tkiva izložili djelovanju tripsina (10 ml tripsinskog medija) tijekom 90 minuta na 37 °C uz stalno miješanje na magnetnoj mješalici. Svakih 30 minuta smo dodavali 10 ml tripsinskog medija (ukupno 30 ml). Po završetku tripsinizacije stanice smo propustili kroz sterilnu metalnu mrežicu kako bismo odstranili zaostale komadiće tkiva, potom ih 2

puta isprali u MEM mediju s 3% FCS. Nakon što smo odredili vijabilnost i koncentraciju, stanice smo raspodjelili (po  $4 \times 10^7$  stanica) u plastične Petrijeve posude za kulturu tkiva ( $\phi$  145 mm) u istom mediju i inkubirali tijekom slijedećih 3 do 5 dana (1. pasaža). Slijedeći dan smo promijenili medij kako bismo se riješili mrtvih i nepriljubljenih stanica. Po isteku inkubacije, kada su fibroblasti potpuno prekrili dno Petrijeve posude, stanice smo kratkotrajno tripsinizirali kako bismo ih mogli sakupiti. Tripsinizaciju smo zaustavili dodatkom deseterostruko većeg volumena MEM medija s 3% FCS. Nakon ispiranja (2 puta) stanice smo izbrojili u tripanskom modrilu, resuspendirali u mediju za smrzavanje i smrznuli. Čuvali smo ih u tekućem dušiku na temperaturi od  $-196$  °C. Za titraciju virusa smo koristili fibroblaste nakon slijedeće pasaže (3. pasaža). Dan prije titracije virusa smo na ploče od 48 rupica nasadili fibroblaste ( $5 \times 10^4$  stanica/rupici) kako bi stvorili polukonfluentan sloj.

### **3.5.6.2. Titracija virusa**

U organima životinja u kojima smo očekivali razmjerno visok broj infektivnih jedinica virusa ( $>100$  PFU) odredili smo virus titracijom u različitim razrijeđenjima njihovih homogenatima. Naime, organi pohranjene na  $-20$  °C smo odmrznuli, a zatim smo ih propustili kroz metalne mrežice u 2 ml hladnog MEM medija s 3% FCS. Dobivene homogenate smo resuspendirali u Eppendorf kontejnerima s po 1 ml hladnog medija u početnom razrijeđenju od 10 puta i zatim dalje razrijeđivali tako da je svako slijedeće razrijeđenje bilo deseterostruko veće od prethodnog. Nakon titracije razrijeđeni homogenat smo prebacili na pripremljenu ploču s mišjim fibroblastima. Neposredno prije ukapavanja razrijeđenog homogenata odstranili smo višak medija u pločama tako da je u svakoj rupici ostalo oko 150  $\mu$ l medija. Nakon toga smo u svaku rupicu prebacili po 100  $\mu$ l prethodno razrijeđenog homogenata (10, 100 i 1000 puta) tako da je rupica s najmanjim

razrijeđenjem sadržavala 1/100 ukupnog homogenata. Nakon inkubacije u CO<sub>2</sub> inkubatoru pri 37 °C u trajanju od 30 minuta, ploče smo centrifugirali (800 g, 30 minuta) čime smo povećali osjetljivost testa za oko 10 - 20 puta (176). Nakon centrifugiranja ploče smo ponovno inkubirali na 37 °C tijekom sljedeća 2 sata, dodali 0,5 ml viskoznog metilceluloznog medija kako bismo onemogućili vertikalno širenje virusa. Čistine na sloju fibroblasta uzrokovane citopatogenim učinkom virusa očitavali smo pod invertnim mikroskopom nakon 3 do 4 dana inkubacije u CO<sub>2</sub> inkubatoru pri 37 °C. Donja granica detekcije ovakvog načina određivanja infektivnog virusa bila je 100 PFU po organu.

### **3.5.6.3. Određivanje virusa u cjelokupnom homogenatu organa**

U slučajevima očekivano niskog titra virusa u organima (< 100 PFU) spustili smo granicu detekcije na 1 PFU po organu. Organe pohranjene na -20 °C smo odmrznuli, homogenizirali u 10 ml hladnog MEM medija uz dodatak 5% FCS, te prebacili po 200 µl/rupici homogenata na cijelu, fibroblastima obloženu ploču od 24 rupice. Nakon ukapavanja homogenata ploče smo inkubirali tijekom 30 minuta u CO<sub>2</sub> inkubatoru, a zatim centrifugirali (800 g, 30 minuta). Po centrifugiranju smo ih ponovno inkubirali tijekom 2 sata, a zatim je dodan 1 ml/rupici MEM medija s 5% FCS. Čistine na podlozi fibroblasta uzrokovane virusom smo očitavali invertnim mikroskopom 4. i 7. dana inkubacije.

### **3.5.6.4. Testiranje razine detekcije virusa u homogenatima organa *in vitro***

S obzirom da koncentracija homogenata organa može utjecati na osjetljivost testa za određivanje virusa, testirali smo kolika je donja granica osjetljivosti u našim uvjetima. Žlijezde slinovnice, pluća i slezenu neinficiranih µMT/µMT miševa smo odvojeno homogenizirali u 9,5 ml MEM medija s 3% FCS. U tako pripremljene homogenate smo dodali različite doze SGV (100,

10, 1, 0,1 PFU) u volumenu od 0,5 ml, tako da smo dobili ukupno 10 ml suspenzije homogenata. U pozitivnoj kontroli smo navedene doze virusa u istom volumenu dodali u 9,5 ml medija. Dobivene suspenzije smo zatim prebacili na cijelu, fibroblastima obloženu ploču od 24 rupice. Nakon centrifugiranja i inkubacije ploče su očitane 4. i 7. dana. Utvrdili smo da u navedenim razrijeđenjima homogenata organa ne dolazi do značajnijeg smanjenja osjetljivosti testa. Stoga je donja granica detekcije u našim uvjetima na razini od 1 PFU.

### **3.5.6.5. Testiranje latencije prijenosom homogenata organa latentno inficiranih $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa u neinficirane C57BL/6 miševe**

Organe latentno inficiranih  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa (žlijezde slinovnice, pluća i slezena) smo smrznuli, a zatim homogenizirali u 2 ml MEM medija. Prilikom žrtvovanja miševima smo uzeli 0,5 ml krvi kardijalnom punkcijom i dodali joj 1,5 ml medija. Polovinu homogenata (1ml), odnosno suspenzije stanica krvi, smo injicirali intraperitonealno u intaktne C57BL/6 miševe, a preostalu polovinu smo razrijedili do ukupnog volumena od 5 ml i odredili nazočnost virusa u homogenatu. Za pozitivnu kontrolu smo koristili homogenate organa intaktnih životinja priredene na prethodno opisan način uz dodatak 10, 1, 0,1 i 0,01 PFU SGV. Homogenat neinficiranih miševa smo koristili kao negativnu kontrolu. Miševima smo odredili titar protuvirusnih protutijela u serumu 2 odnosno 4 tjedna poslije injiciranja homogenata s pomoću ELISA (shema 1). Osim toga, 4 tjedna od injiciranja homogenata životinje smo imunodepletirali injiciranjem ciklofosfamida (150 mg/kg), mješavne citolitičkih protutijela na CD4, CD8 i NK1.1 biljeg, te otopine hidrokortizon sukcinata (125 mg/kg) (shema 1). Deplecija stanica protutijelima je ponovljena nakon 7 dana, a hidrokortizon je injiciran svaki drugi dan intramuskularno. Životinje smo žrtvovali nakon 2 tjedna od početka protokola imunodeplecije, a titar virusa smo im odredili u žlijezdama slinovnicama.



### **3.5.7. Kvantitativno i kvalitativno određivanje protuvirusnih protutijela u serumu**

#### **3.5.7.1. Kvantitativno određivanje protuvirusnih protutijela ELISA metodom**

U serumima inficiranih miševa smo odredili titar ili koncentraciju protuvirusnih protutijela u različito vrijeme nakon infekcije. Miševima smo krv izvadili iz repne vene, izdvojili serum i pohranili ga na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do upotrebe.

Titar protuvirusnih protutijela smo odredili ELISA metodom, a kao antigen smo koristili homogenat inficiranih fibroblasta. Singenične fibroblaste smo inficirali ( $0,1\text{ PFU/stanica}$ ), sakupili 3 do 5 dana nakon infekcije i 2 puta ih isprali u PBS. Poslije ispiranja, stanice smo resuspendirali u bikarbonatnom puferu ( $\text{pH } 9,6$ ) i razorili ultrazvukom. Dobiveni homogenat smo razrijedili u bikarbonatnom puferu tako da je  $10\text{ ml}$  otopine sadržavalo ekvivalent od  $2 \times 10^6$  stanica. Tako razrijedeni homogenat smo ukapali na ploče od 96 rupica s ravnim dnom u volumenu od  $75\text{ }\mu\text{l}$  po rupici. Ploče smo inkubirali preko noći na temperaturi od  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , čime smo za ploču priljepili virusne antigene. Istim postupkom smo pripremili i neinficirane fibroblaste koji su služili za kontrolu. Slijedeći smo dan homogenat izbacili iz ploča, koje smo zatim isprali s PBS (2 puta) i blokirali s  $150\text{ }\mu\text{l}$  reagensa za blokiranje tijekom 2 sata na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . U tako pripremljene ploče ukapali smo različita razrijeđenja seruma u volumenu od  $75\text{ }\mu\text{l/rupici}$ . Početno razrijeđenje je bilo 1:8, a svako slijedeće dvostruko veće od prethodnoga. Serume smo razrijedili s PBS koji je sadržavao 1% FCS i 0,05 % Tween-20. Nakon inkubacije od 45 minuta ploče smo isprali 6 puta s PBS-Tween-20, a zatim ukapali peroksidazom obilježena sekundarna protumišja protutijela specifična za izotip (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b i IgG3). Poslije inkubacije od 45 minuta ploče smo ponovno isprali i zatim dodali  $75\text{ }\mu\text{l/rupici}$  supstarata OPD. Reakciju smo zaustavili s istim volumenom  $2\text{M H}_2\text{SO}_4$  kada je u pozitivnoj kontroli približno dosegnuta gornja granica detekcije apsorbirane svjetlosti.



Apsorpcije svjetlosti su očitane uz filter od 492 nm na čitaču za mikrotiter ploče (Titertek).

Prilikom određivanja titra protuvirusnih protutijela apsorpcije svjetla dobivene na pločama s neinficiranim fibroblastima smo oduzeli od onih dobivenih na inficiranoj podlozi za iste serume. Zatim smo tako dobivene vrijednosti apsorpcija seruma imunih životinja usporedili s vrijednostima apsorpcija svjetla neimunih seruma. Ono razrijeđenje seruma u kojem se je apsorbicija svjetla razlikovala za 3 standardne devijacije u odnosu na isti titar normalnog seruma odredili smo kao titar protuvirusnih protutijela u serumu.

U slučaju određivanja koncentracije protuvirusnih protutijela apsorpcije svjetla imunih seruma smo usporedili s standardnom krivuljom apsorpcija svjetla za razrijeđenja otopine mišjih imunoglobulina poznate koncentracije. Koncentraciju smo odredili za sve izotipove protutijela. Na strmom dijelu krivulje smo očitali standardnu koncentraciju koja je pomnožena razrijednje ispitivanog uzorka.

#### **3.5.7.2. Test neutralizacije virusa *in vitro***

Neutralizacijsku sposobnost seruma imunih životinja odredili smo testom neutralizacije virusa *in vitro*. Serume smo inkubirali tijekom 30 minuta na 56 °C, filtrirali kroz filtere s porama od 0,45 µm i razrijedili na pločama od 96 rupica (100 µl/rupici). Početno razrijeđenje seruma bilo je 1:4, a svako slijedeće dvostruko veće od prethodnoga. Za kontrolu nam je poslužio jednako razrijeđen neimuni mišji serum. Tako pripremljenim razrijeđenjima seruma dodali smo 100 PFU/rupici virusa u volumenu od 100 µl. Nakon inkubacije na 4 °C kroz 45 minuta u rupice smo dodali po 50 µl komplementa (seruma kunića) u prethodno utvrđenom optimalnom razrijeđenju, te ih dalje inkubirali u CO<sub>2</sub> inkubatoru tijekom slijedećih 30 minuta. Potom smo volumen od 100 µl iz svakog razrijeđenja seruma prebacili na ploču od 48 rupica na koju smo

dan prije nasadili fibroblaste. Broj infektivnih jedinica virusa smo utvrdili s pomoću prethodno opisanog testa.

### **3.5.8. Histokemijska analiza stanica inficiranih s $\Delta$ MS94.5 mutantnom MCMV**

U nastojanju da utvrdimo mjesta reaktivacije latentnog virusa, tek okoćene miševe smo inficirali (100 PFU i. p.) s mutantom  $\Delta$ MS94.5 MCMV virusa kojem je u području odsječka E (HIND III) ubačen gen za  $\beta$ -galaktozidazu (205). Nakon što su miševi dostigli stanje latentne infekcije (5 mj. p. i.) neselektivno smo ih imunodepletirali prema prethodno opisanom protokolu. Životinje smo žrtvovali u različito vrijeme poslije primjene protokola imunodeplecije, te smo im uzeli organe za histološku analizu (slezena, jetra, pluća, slinovnice, koža, bubrezi i pankreas). Organe smo fiksirali u 3% paraformaldehidu (3 % paraformaldehida, 2 mM  $MgCl_2$  u PBS) na 4 °C, a zatim zasitili u otopini 30% sukroze (30 % sukroze, 2 mM  $MgCl_2$  u PBS). Zasićenje je bilo potpuno kada su organi potonuli na dno epruvete. Nakon zasićenja tkiva smo naglo smrznuli u tekućem dušiku i serijski ih narezali na kriotomu na rezove debljine od 8  $\mu$ m. Rezove smo priljepili na predmetna stakalca prethodno obložena želatinom i kromalaunom. Narezana tkiva smo ponovno fiksirali u hladnom 3% paraformaldehidu tijekom 5 minuta i nekoliko puta isprali u otopini za ispiranje (2 mM  $MgCl_2$  u PBS). Nakon toga tkiva smo permeabilizirali u otopini za permeabilizaciju (2 mM  $MgCl_2$ , 0,02% Na-deoksikolat, 0,1 NP-40 u PBS) tijekom 10 minuta na 4 °C. Potom smo stakalca uronili u otopinu kalijeveg feri- i ferocijanida (35 mM kalijeveg ferocijanida i 35 mM kalijeveg ferocijanida u otopini za permeabilizaciju) u koju smo dodali supstrat za  $\beta$ -galaktozidazu X-gal (0,1%) i inkubirali na sobnoj temperaturi preko noći. Reakciju smo zaustavili ispiranjem u tekućoj vodi, a tkiva smo kontraobojili Meyer-ovim

hematoksilinom. Na obojenim tkivima inficirane stanice su se izdvojile svojim modro-zelenim obojenjem.

### **3.5.9. Detekcija virusne DNA u tkivima**

#### **3.5.9.1. Izolacija stanične DNA**

Iz organa (slinovnica, pluća i slezene) latentno inficiranih životinja smo izolirali staničnu DNA kako bismo mogli utvrditi prisutnost virusnog genoma. Organe smo izvadili novim instrumentima koji nisu bili u doticaju s MCMV, a cijeli postupak smo izvodili u prostoriji u kojoj se nikada nije radilo s virusom. Nakon vadenja, organe smo naglo smrznuli u tekućem dušiku i pohranili na  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  do postupka izolacije DNA. Prije izolacije DNA, organe smo usitnili sa sterilnim skalpelom i komadiće resuspendirali u 1 ml otopine za digestiju u koju je neposredno prije toga dodan enzim proteinaza K (0,1 mg/ml). Tako pripremljen uzorak smo inkubirali tijekom 12 - 18 h u zatvorenom Eppendorf kontejneru na  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  pri čemu su se u otopinu oslobodile stanične komponente odvojene od DNA. Pripremljenom uzorku smo dodali jednaki volumen otopine fenola, kloroforma i izoamilalkohola u volumskom omjeru 25:24:1. Nakon toga smo otopinu centrifugirali na mikrocentrifugi tijekom 10 minuta na  $10\ 000\text{ x g}$ . Pažljivo smo odstranili vodenu fazu koja sadrži DNA i prebacili je u novi kontejner. DNA smo precipitirali u 70% otopini etanola uz dodatak 1,25 M amonijevog acetata. Uzorak smo zatim centrifugirali na  $10000\text{ x g}$  tijekom 5 minuta. Nadtalog smo aspirirali, a talog ponovno isprali s otopinom 70% etanola. Nakon centrifugiranja i aspiracije nadtaloga precipitiranu DNA smo osušili u cetrifugi s vakuumom. Dobivenu DNA smo zatim otopili u TAE puferu i pohranili na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5.9.2. Umnazanje virusne DNA metodom lančane reakcije polimeraze (PCR)

Izolat stanične DNA iz latentno inficiranih miševa smo podvrgnuli postupku specifičnog umnažanja sekvence virusnog genoma (engl. polymerase chain reaction, PCR) kako bismo dokazali njegovu prisutnost i utvrdili broj kopija. Specifično umnažanje odsječka virusne DNA, veličine od 363 nukleotida, koji čini dio 4. egzona *ie-1* gena MCMV (4), smo proveli upotrebom termostabilne Taq polimeraze i specifičnih kratkih komplementarnih sekvenci DNA (eng. primer) koje su bile ujedno početna mjesta sinteze komplementarne DNA. Tijekom reakcije smo koristili oligonukleotid IE1.1983 (5'-ATTGTTTCATTGCCTGGGGAGTTT-3') kao nishodni prajmer, a IE1.2345 (5'-ATCTGGTGCTCCTCAGATCAGCTAA-3') kao povratni prajmer. Oligonukleotid IE1.2135 (5'-AGCGTATCCACACATGTGGTAGT-3') smo koristili za potvrdu identiteta umnoženog produkta. Uzorci za PCR su sadržavali 5 µg stanične DNA u puferu za PCR kojem su dodani prajmeri i 2,5 U Taq polimeraze. Cijeli postupak se je odvijao u automatskom termocikličkom bloku u 35 ciklusa. Ciklus se je sastojao od denaturacije DNA pri temperaturi od 94 °C tijekom 90 sekundi, vezanja prajmera za virusnu DNA na temperaturi od 55 °C tijekom 2,5 minute i konačno sintezom komplementarne DNA pri temperaturi od 72 °C tijekom 2 minute što je programirano produžavano do 6 minuta u zadnjem ciklusu. Produkte umnažanja smo analizirani elektroforezom na agaroznom (1,4%) minigelu, southern blotom, hibridizacijom s probom obilježenom radioaktivnim izotopom <sup>32</sup>P i autoradiografijom. Negativnu kontrolu su predstavljali uzorci DNA izolirani iz organa neinficiranih životinja, a za pozitivnu kontrolu nam je poslužio plazmid pIE111 koji obuhvaća *ie1* i *ie3* gen MCMV (4). Različit broj kopija spomenutog plazmida (1 do 1000) smo pomiješali s 5 µg DNA izolirane iz organa neinficirane životinje, te smo ih usporedili s testiranim

uzorcima kako bismo polukvantitativno mogli odrediti broj kopija virusnog genoma u organima latentno inficiranih životinja.

#### **3.5.10. Statističke metode**

Statistička značajnost razlika vrijednosti titra virusa između grupa životinja određena je Man-Whitney testom. Titrovi virusa ( $x$  i  $y$ ) su bili statistički značajni ukoliko je  $P$  ( $x$  nasuprot  $y$ ) bilo manje od  $\alpha = 0,05$  (jednostrani test), gdje je  $P$  očekivana vjerojatnost pojave preklapanja vrijednosti, a  $\alpha$  izabrana vrijednost značajnosti. Osim navedenog testa, koristili smo i Studentov  $t$ -test prilikom izračunavanja titra specifičnih protutijela po načelu malih nezavisnih uzoraka. Razlika između uzoraka je bila značajna onda kada je očekivana vjerojatnost pojave preklapanja vrijednosti ( $P$ ) bila manja od 0,05.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Miševi s nedostatkom protutijela ( $\mu$ MT/ $\mu$ MT) predstavljaju novi model za izučavanje mehanizama nadzora rekurentne CMV infekcije?

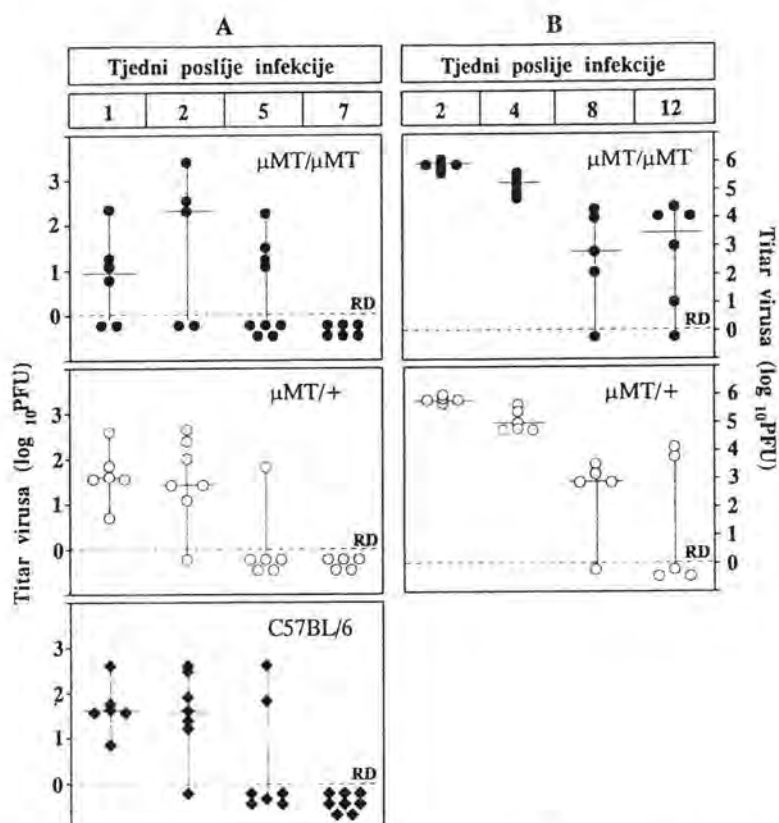
Rekurentna CMV infekcija je posljedica reaktivacije latentnog virusnog genoma u uvjetima narušenog imunološkog nadzora. Javlja se u seropozitivnih imunone dostatnih domaćina, usprkos nazočnosti protuvirusnih protutijela, što pokazuje da glavnu ulogu u kontroli rekurentne infekcije imaju stanični mehanizmi imunološkog (95, 163). Premda je ova činjenica poznata već dulje vrijeme, do sada ne postoje podaci o pojedinačnoj ulozi staničnih mehanizama u nadzoru rekurentne infekcije. Razlog tome je nazočnost razmjerno visokog titra neutralizacijskih protutijela u serumima domaćina, kako u čovjeka tako i u životinjskim modelima, što vjerojatno smanjuje osjetljivost sustava za detekciju produktivne infekcije u tkivima. Znajući za slojevitost i nadomjesnu sposobnost imunoloških mehanizama tijekom akutne infekcije, nemoguće je sprovesti istraživanja pojedinih mehanizama u uvjetima selektivne imunone dostatnosti ukoliko ne postoji dovoljna osjetljivost sustava za detekciju virusa. To naročito dolazi do izražaja u početnim razdobljima rekurentne infekcije s obzirom na malu nazočnost rekurentnog virusa u tkivima. Stoga je za očekivati da su protutijela značajan ograničavajući čimbenik u detekciji virusa.

Zbog navedenih razloga smo nastojali ispitati da li miševi s mutiranim genom za  $\mu$  lanac imunoglobulina M ( $\mu$ MT/ $\mu$ MT) (101) mogu predstavljati dovoljno osjetljiv model za precizno izučavanje pojedinih mehanizama imunološkog sustava u nadzoru rekurentne CMV infekcije. Naime, zbog navedene mutacije ovi miševi imaju zastoj u razvoju limfocita B i kao posljedicu nedostatak protutijela.



#### 4.1.1. Mehanizmi nadzora primarne infekcije s CMV u $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa

U nastojanjima da uspostavimo model za izučavanje uloge pojedinih mehanizama imunološkog nadzora rekurentne infekcije, najprije smo ispitali da li  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševi pokazuju razlike u nadzoru primarne infekcije s CMV u

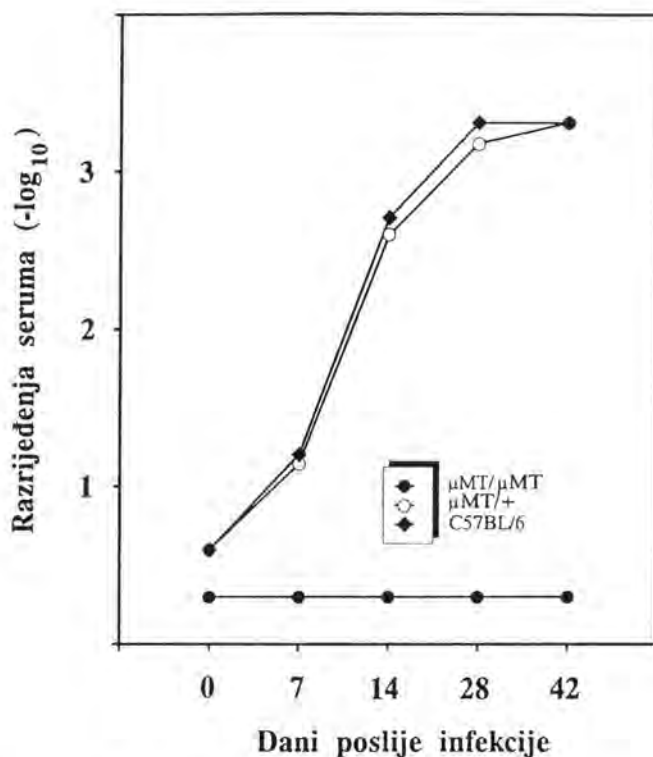


**Slika 6. Podjednaka nazočnost i brzina uklanjanja virusa iz žlijezda slinovnica  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa i seropozitivnih kontrola. A.** Skupine homozigotnih ( $\mu$ MT/ $\mu$ MT) i heterozigotnih ( $\mu$ MT/+) miševa za mutaciju gena  $\mu$  lanca imunoglobulina M, te C57BL/6 miševa smo inficirali s  $10^5$  PFU MCMV. Titrove virusa smo odredili u žlijezdama slinovnicama i prikazali je pojedinačno u svakoj skupini. **B.** Miševe smo inficirali s  $10^4$  PFU izolata virusa iz žlijezda slinovnica (SGV). Prikazali smo pojedinačno nazočnost virusa u žlijezdama slinovnicama za skupine  $\mu$ MT/ $\mu$ MT i  $\mu$ MT/+ miševa. (RD) Razina detekcije.

odnosu na miševe koji imaju normalno razvijene limfocite B i sposobnost stvaranja protutijela (heterozigoti za spomenutu mutaciju i C57BL/6). Naime, izostanak suradnje između limfocita B i T (citokinska podrška, prezentacija antigena) i nedostatak protuvirusnih protutijela u  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa mogli bi imati upliva na nadzor primarne infekcije i uspostavu latencije.

#### 4.1.1.1. Protutijela nisu neophodna u nadzoru primarne infekcije i uspostavi latencije

Dosadašnja eksperimentalna istraživanja su pokazala da mehanizmi stanične imunosti, posebice  $CD8^+$  limfociti T, imaju glavnu ulogu u nadzoru primarne CMV infekcije (90, 92, 164, 166). Premda je tijekom seroterapije bolesnika i u pokusima na životinjskom modelu pokazano da protuvirusna



**Slika 7. Nedostatak specifičnih protuvirusnih protutijela u serumu  $\mu MT/\mu MT$  miševa.** Serume  $\mu MT/\mu MT$ ,  $\mu MT/+$  i C57BL/6 miševa smo prikupili u različitim vremenskim razdobljima nakon infekcije, te smo ih analizirali s pomoću ELISA na prisutnost specifičnih protuvirusnih protutijela. Rezultati prikazuju srednju vrijednost pet pojedinačnih uzoraka.

protutijela imaju određenu zaštitnu ulogu u širenju infekcije, još uvijek njihov značaj nije precizno određen. Uporabom miševa s nedostatkom imunoglobulina ( $\mu MT/\mu MT$ ), ispitali smo značaj protuvirusnih protutijela u nadzoru primarne infekcije s CMV i uspostavi latencije. Tijek primarne infekcije s virusom što je uzgojen u kulturi mišjih embrionalnih fibroblasta ili s virulentnijim izolatom iz žlijezda slinovnica smo uspoređivali između  $\mu MT/\mu MT$  miševa i miševa s

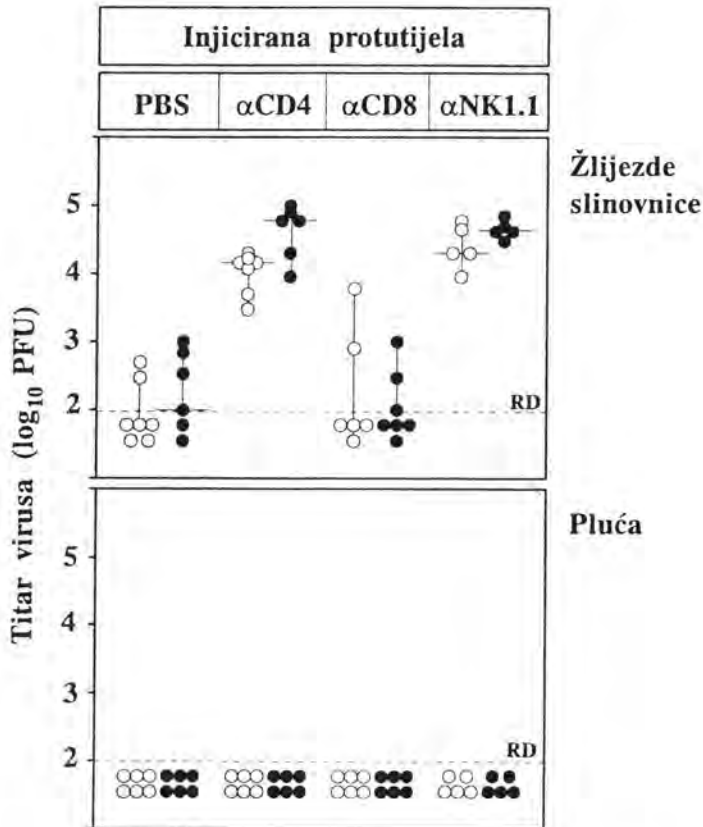
moogućnošću stvaranja protutijela ( $\mu$ MT/+ i C57BL/6). Budući da tijekom primarne infekcije ne dolazi do bolesti pratili smo sposobnost imunološkog sustava da ukloni virus iz inficiranih tkiva. Životinje smo žrtvovali 1, 2, 5 i 7 tjedana poslije infekcije s virusom uzgojenim u kulturi tkiva, odnosno 2, 4, 8 i 12 tjedana poslije infekcije s virulentnijim izolatom virusa iz žlijezda slinovnica (SGV). Količinu virusa u žlijezdama slinovnicama, plućima i slezeni smo odredili metodom brojenja čistina (plakova) stvorenih na podlozi fibroblasta. S obzirom na poznatu činjenicu da virus najdulje perzistira u žlijezdama slinovnicama (91), na slici 6. su prikazani pojedinačni titrovi virusa u ovim organima za  $\mu$ MT/ $\mu$ MT i kontrolne skupine miševa. Između skupina ispitivanih sojeva miševa inficiranih s virusom uzgojenim u kulturi tkiva (slika 6A) nismo uočili značajnije razlike u količini virusa i brzini uklanjanja virusa iz tkiva. Isto vrijedi i za skupine miševa inficiranih sa SGV (slika 6B). Ovi rezultati pokazuju da prisutnost protutijela nema značajnu ulogu u nadzoru primarne infekcije. Razlike u količini virusa nisu uočene niti u plućima i slezeni ispitivanih životinja (rezultati nisu prikazani). U skupini  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa, kao i u kontrolnim skupinama, inficiranoj s virusom uzgojenim u kulturi tkiva nismo mogli utvrditi nazočnost virusa u tkivima poslije 7. tjedna od infekcije (slika 6A), za razliku od miševa inficiranih s SGV (slika 6B) koji nisu u potpunosti uklonili virus niti nakon 12. tjedna poslije infekcije.

Paralelno s praćenjem količine virusa u pojedinim organima, miševima smo prikupljali serum, te ELISA metodom odredili titar protuvirusnih protutijela. Slika 7. prikazuje razinu protuvirusnih protutijela u skupini  $\mu$ MT/ $\mu$ MT,  $\mu$ MT/+ i C57BL/6 miševa u različitim razdobljima nakon infekcije. Skupine miševa koje mogu stvarati protutijela ( $\mu$ MT/+ i C57BL/6) pokazuju istu i razmjerno visoku razinu specifičnih protuvirusnih protutijela već 2 do 3 tjedna poslije infekcije. Sukladno očekivanjima, zastoj u razvoju B limfocita u  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa rezultirao je potpunim izostankom stvaranja protutijela (101). S obzirom da  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševi učinkovito i u jednakom vremenskom

slijedu uklanjaju virus iz tkiva kao i kontrolne skupine životinja, to potvrđuje presudnu ulogu staničnih mehanizama u nadzoru primarne infekcije.

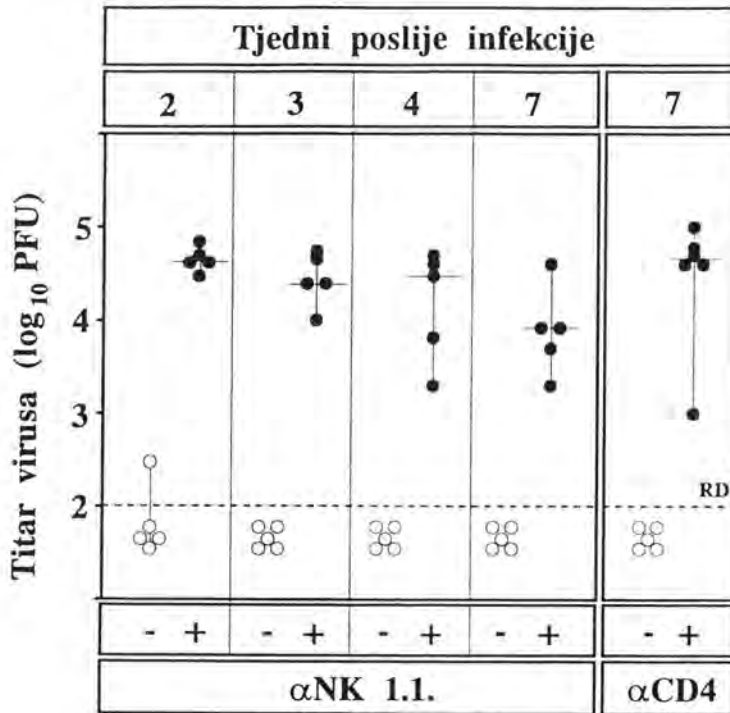
#### 4.1.1.2. Uloga mehanizama stanične imunosti u nadzoru primarne infekcije pri nedostatku protutijela

Zbog nedostataka limfocita B i protutijela u  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa, koji inače mogu sudjelovati u reakcijama posredovanim limfocitima T i stanicama NK, bilo je potrebno ispitati da li u tih miševa postoje razlike u mehanizmima staničnog nadzora primarne infekcije u odnosu na odgovarajuće heterozigotne miševе ( $\mu$ MT/+) s normalnim humoralnim odgovorom. Skupini homozigota i heterozigota smo depletirali podvrste limfocita T ( $CD4^+$  i



Slika 8. Učinak deplecije  $CD4^+$  i  $CD8^+$  limfocita T i stanica NK na nadzor primarne infekcije u  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa.  $\mu$ MT/ $\mu$ MT (●) i  $\mu$ MT/+ (○) miševе smo depletirali s mPt specifičnim za CD4, CD8 i NK1.1 biljeg limfocita i inficirali s  $10^5$  PFU virusa. Prikazani su pojedinačni titrovi virusa u žlijezdama slinovnicama i plućima, te medijane vrijednosti (-). (RD) Razina detekcije.

CD8<sup>+</sup>) i stanice NK neposredno prije infekcije. Dva tjedna poslije infekcije smo odredili količinu virusa u žlijezdama slinovnicama, plućima i slezeni. Na slici 8. su prikazani pojedinačni titrovi virusa u žlijezdama slinovnicama i plućima. Odsutnost značajnih razlika u količini virusa između odgovarajućih skupina  $\mu\text{MT}/\mu\text{MT}$  i  $\mu\text{MT}/+$  miševa u testiranim organima potvrđuje našu pretpostavku da stanični mehanizmi mogu učinkovito nadzirati primarnu



Slika 9. Perzistentna infekcija žlijezda slinovnica je pod nadzorom CD4<sup>+</sup> limfocita T i stanica NK. Homozigotnim ( $\mu\text{MT}/\mu\text{MT}$ ) miševima smo depletirali CD4<sup>+</sup> limfocite T ili stanice NK, te ih inficirali s  $10^5$  PFU virusa ( $\bullet$ ). Kontrolne skupine miševa smo injicirali nespecifičnim mišjim imunoglobulinima IgG2a izotipa ( $\circ$ ). Prikazali smo pojedinačno titrove virusa u žlijezdama slinovnicama miševa žrtvovanih u različitim vremenskim razdobljima poslije infekcije (simboli), te medijane vrijednosti (-). (RD) Razina detekcije.

infekciju i bez protutijela.

U skladu s već objavljenim rezultatima, nadzor virusa u žlijezdama slinovnicama je neovisan o CD8<sup>+</sup> limfocitima T (101). Međutim, ovi rezultati pokazuju da nadzor u ovom organu, osim o CD4<sup>+</sup> limfocitima T, ovisi i o stanicama NK. Gotovo jednaka količina virusa u žlijezdama slinovnicama miševa kojima smo depletirali CD4<sup>+</sup> limfocite T ili stanice NK ukazuje na



povezanost funkcije ova dva mehanizma u nadzoru virusne infekcije u tim organima. U plućima se, kao i u slezeni (nije prikazana), može uočiti fiziološka plastičnost imunološkog sustava, jer u slučaju deplecije bilo koje od podvrsta limfocita nadzor učinkovito preuzimaju preostale stanice. Budući da nema razlika u nadzoru infekcije i ulozi pojedinih staničnih mehanizma između ispitivanih skupina miševa, može se zaključiti da suradnja između limfocita B s limfocitima T ili stanicama NK nije neophodna za stvaranje učinkovitog protuvirusnog odgovora posredovanog staničnim mehanizmima imunološkog nadzora. Osim toga, nedostatak protutijela u  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa ukazuje na činjenicu da ona ne igraju značajniju ulogu u nadomjesnom mehanizam nadzora infekcije koji se razvija prilikom deplecije CD8<sup>+</sup> limfocita T, što je bila jedna od ranije pretpostavljenih mogućnosti koja je dobila nedvojbenu potvrdu (101).

#### **4.1.1.3. Mehanizam nadzora kronične perzistentne infekcije u žlijezdama slinovnicama**

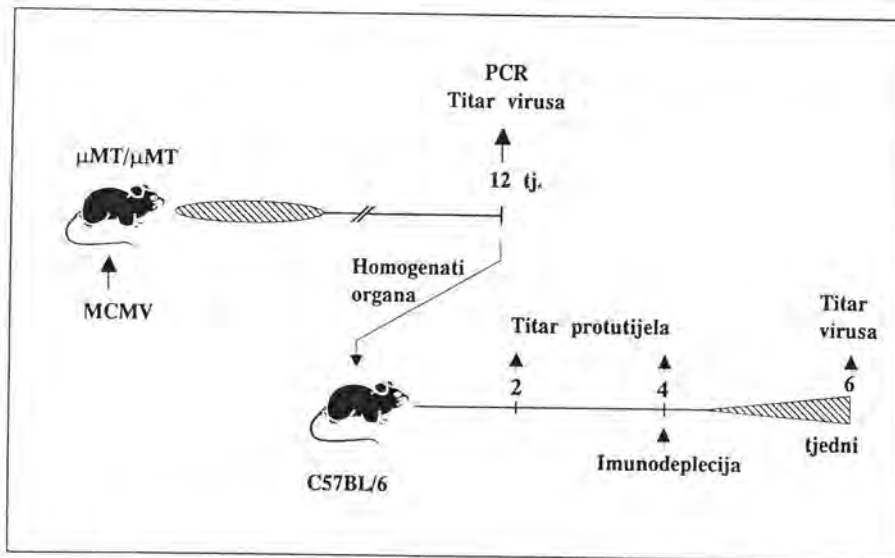
Poznato je da dugotrajna deplecija CD4<sup>+</sup> limfocita T uzrokuje kroničnu perzistentnu infekciju u žlijezdama slinovnicama (101). S obzirom da rezultati deplecije podvrsta limfocita ukazuju na značajnu ulogu stanica NK u nadzoru infekcije u spomenutim organima, željeli smo utvrditi da li i u slučaju dugotrajne deplecije NK stanica možemo polučiti isti učinak. Skupini  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa smo uklonili stanice NK neposredno prije infekcije, a zatim svakoga petoga dana do završetka pokusa, te smo im odredili količinu virusa u žlijezdama slinovnicama. Negativna kontrola su bili miševi kojima smo injicirali nespecifična mišja protutijela (IgG2a), a pozitivna kontrola miševi kojima smo uklonili CD4<sup>+</sup> limfocite T. Rezultati prikazani na slici 9. pokazuju da i deplecija stanica NK uzrokuje kroničnu perzistentnu infekciju u žlijezdama slinovnicama, slično kao i deplecija CD4<sup>+</sup> limfocita T. Ovi rezultati pokazuju da nedostatak jedne od navedenih populacije stanica dugoročno ne

može biti nadomješten drugom u nadzoru infekcije u žlijezdama slinovnicama, što ukazuje na njihovu međuovisnost.

## 4.2. Latencija u $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa

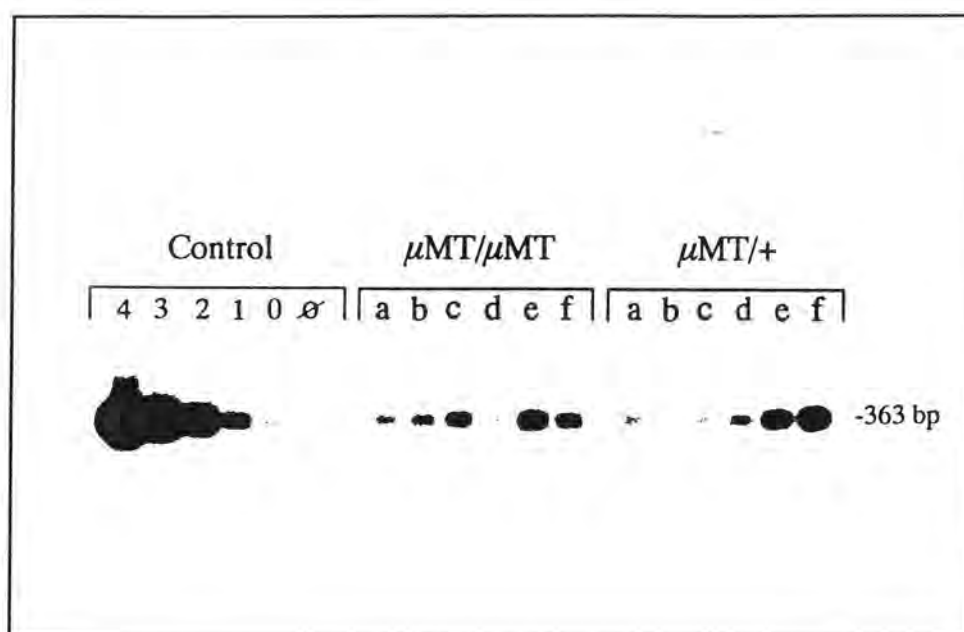
### 4.2.1. Podjednaka nazočnost latentnog virusnog genoma u tkivima $\mu$ MT/ $\mu$ MT i $\mu$ MT/+ miševa

CMV, poput drugih herpesvirusa, nakon primarne infekcije prelazi u stanje latencije. Tijek primarne infekcije pokazuje da se mehanizmi nadzora virusa u  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa ne razlikuju u odnosu na odgovarajuće heterozigote ( $\mu$ MT/+). S obzirom da uvjeti primarne infekcije određuju nazočnost virusnog genoma u tkivima (163), željeli smo utvrditi da li postoje razlike u njegovoj nazočnosti u tkivima spomenutih skupina miševa po izostanku produktivne infekcije. U tkivima latentno inficiranih miševa testirali



**Slika 10. Plan pokusa za utvrđivanje nazočnosti infektivnog virusa u tkivima latentno inficiranih  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa.**  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševima smo 12 tjedana poslije infekcije s  $10^5$  PFU virusa testirali organe na prisutnost MCMV. Količinu virusnog genoma u tkivima smo odredili s pomoću PCR metode. Nazočnost infektivnog virusa smo testirali brojenjem čistina stvorenih citopatogenim učinkom virusa *in vitro* i prijenosom homogenata organa u neinficirane singenične C57BL/6 miševima. Serume primatelja homogenata smo prikupili 2, odnosno 4 tj. nakon prijenosa i u njima analizirali prisustvo specifičnih protuvirusnih protutijela. Životinje smo zatim neselektivno imunodepletirali, i nakon slijedeća 2 tj. odredili nazočnost virusa u žlijezdama slinovnicama.

smo prisutnost virusnog genoma metodom umnažanja DNA uz pomoć termostabine DNA polimeraze (engl. Polimerase Chain Reaction, PCR) i upotrebu specifičnih prajmera za virusni IE1 gen. Nakon što više nismo mogli utvrditi produktivnu virusnu infekciju u žlijezdama slinovnicama, plućima i slezeni (slika 10.), izolirali smo ukupnu DNA iz tih organa. Količinu od 3  $\mu$ g DNA, izolirane 12 tjedana poslije infekcije, smo testirali na prisutanost virusnog genoma. Za kontrolu smo koristili različiti broj kopija plazmida IE

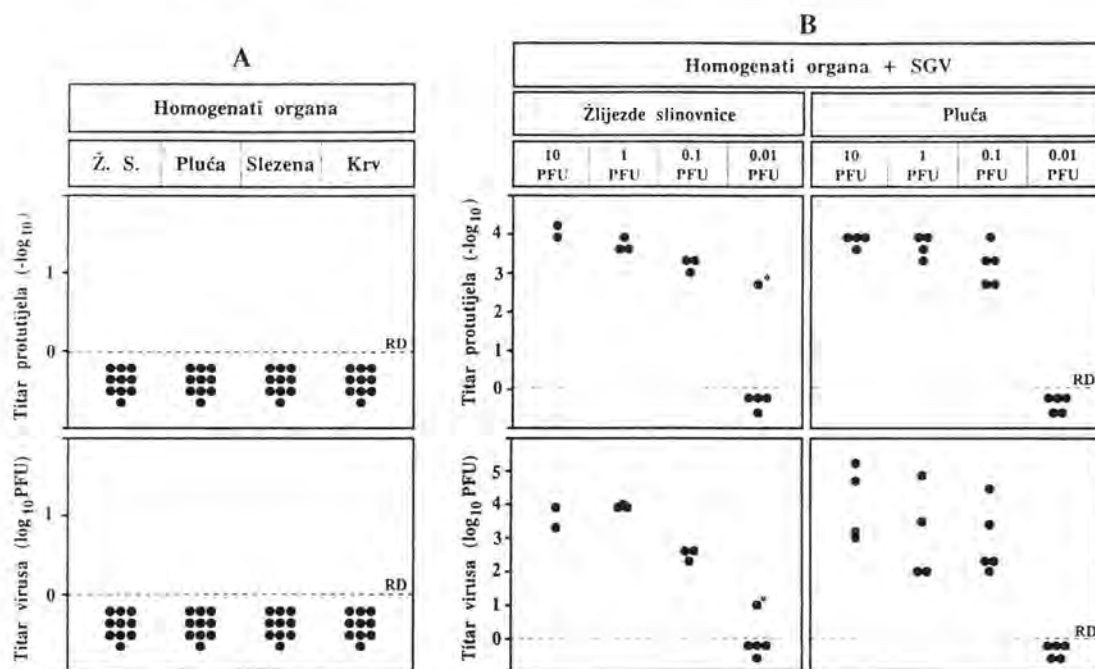


**Slika 11. Podjednaka nazočnost virusnog genoma u plućima  $\mu$ MT/ $\mu$ MT i  $\mu$ MT/+ miševa.** U 5  $\mu$ g DNA izolirane iz pluća latentno inficiranih  $\mu$ MT/ $\mu$ MT i  $\mu$ MT/+ miševa odredili smo nazočnost virusnog genoma koristeći PCR metodu. Rezultati su prikazani pojedinačno (a-f) u svakoj skupini. Različiti broj kopija plazmida IE 111 pomješanih s 5  $\mu$ g stanične DNA, izolirane iz neinficiranih miševa, nam je služio kao pozitivna kontrola. (Ø) Sve reagensije osim plazmidske DNA.

111 umnoženog na isti način kao i ispitivana DNA. I u homozigota i heterozigota virusna DNA je prisutna u tkivu pluća unatoč nemogućnosti utvrđivanja nazočnosti produktivne infekcije (slika 11.). Premda metoda ima ograničene mogućnosti u određivanju količine virusnog genoma (polukvantitativna metoda), usporedbom dobivene količine virusnog genoma u staničnoj DNA pluća među ispitivanim skupinama nije uočena značajnija razlika.

#### 4.2.2. Latencija je stanje potpunog izostanka produktivne infekcije

Definicija latentcije, kao stanja potpunog nedostatka produktivne infekcije u tkivima, temeljena je na osjetljivosti postojećih sustava za detekciju virusa. Različita i nedovoljno utvrđena osjetljivost ovih sustava, te pronalazak određene transkripcijske aktivnosti virusnog genoma tijekom latentcije, pobudila je dvojbu da li je latencija stanje produktivne infekcije niskog intenziteta



**Slika 12. Latencija je stanje potpunog izostanka produktivne infekcije.**

**A.** Homogenate latentno inficiranih  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa (12 tj. p.i.) smo injicirali u neinficirane C57BL/6 miševe. Nakon 4 tj. analizirali smo serum primatelja na prisustvo protuvirusnih protutijela s pomoću ELISA, a nakon dvotjedne imunodeplecije pojedinačno smo odredili titar virusa u žlijezdama slinovnicama (•). **B.** U homogenate organa (slinovnice i pluća) neinficiranih  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa smo dodali različite doze SGV i injicirali ih u neinficirane C57BL/6 miševe. Prikazani su rezultati analize seruma na protuvirusna protutijela i titra virusa u žlijezdama slinovnicama nakon dvotjedne imunodeplecije (•). (RD) Razina detekcije.

(mikroperzistencije) ili njezinog potpunog nedostatka. Unatoč tome što titracijom cjelokupnog homogenata organa nismo mogli dokazati produktivnu infekciju u latentno inficiranih životinja, osjetljivost metode za detekciju infektivnog virusa nije u potpunosti isključila produktivnu infekciju niskog intenziteta (mikroperzistenciju). Iz tog razloga smo napravili pokus u kojem smo pokušali dostignuti što veću razinu osjetljivosti detekcije infektivnog virusa

(slika 10.). Organe i krv iz latentno inficiranih  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa smo homogenizirali, a zatim homogenat injicirali intraperitonealno u singenične neinficirane primaoce koji mogu stvoriti protutijela (C57BL/6). S obzirom da se radi o homogenatima organa podrijetlom iz miševa koji ne stvaraju protutijela, izostala je mogućnost neutralizacije virusa u homogenatima. Miševi kojima smo prenijeli homogenat su bili razdvojeni u zasebne kaveze kako bismo spriječili horizontalno širenje virusa. Kontrolnim skupinama životinja smo injicirali homogenate organa neinficiranih  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa s kojima smo pomiješali različit broj PFU (od 0,01 do 10) virulentnog SGV. Nakon 4 tjedna od injiciranja homogenata u serumu životinja smo odredili titar protuvirusnih protutijela. Rezultati pokazuju da niti u jednog primaoce u kojeg je prenet homogenat iz latentno inficiranih  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa nije uočena pojava serokonverzije (slika 12A). Nasuprot tome, u kontrolnim skupinama miševa kojima je prenet homogenat pomiješan s odgovarajućom dozom SGV uočen je razmjerno visoki titar specifičnih protutijela (slika 12B). Pojava serokonverzije u svih miševa inficiranih s 0,1 PFU SGV ukazuje na visoku osjetljivost metode u utvrđivanju infektivnog virusa. Naime, prilikom prijenosa homogenata s odgovarajućom dozom SGV u primaoce, testirali smo nazočnost injiciranog virusa u prenesenom homogenatu titracijom *in vitro*. Testiranje smo izvodili sa i bez centrifugalnog pojačanja infekcije, te smo utvrdili da pojačanje infekcije iznosi od 10 do 20 puta (1PFU  $\sim$  m.o.i. 10 do 20). S obzirom na uočeni rezultat da u jednoj od pet životinja injiciranih s dozom virusa od 0,01 PFU dolazi do serokonverzije, doza virusa koja u neinficiranoj životinji uzrokuje serokonverziju bi približno odgovarala jednoj infektivnoj jedinici utvrđenoj centrifugalnim pojačanjem *in vitro* (m.o.i. 1 do 2).

Kako bismo pokazali da je serokonverzija stvarno posljedica virusne replikacije u tkivima i utvrdili s kojom dozom virusa je uopće moguće polučiti produktivnu infekciju *in vivo*, pokušali smo dokazati virus u primatelja. S obzirom da smo očekivali da će imunokompetentni primatelji ubrzo po



injiciranju homogenata s malom dozom virusa suzbiti infekciju i uspostaviti perzistentnu infekciju (ili latenciju), morali smo potaknuti umnažanje i širenje virusa *in vivo* do razine kada ga je lako utvrditi u tkivima. Stoga smo 4 tjedna po injiciranju homogenata primatelje imunodepletirali s ciklofosamidom, mješavinom protutijela protiv limfocita T i stanica NK, te hidrokortizonom tijekom slijedeća 2 tjedna (slika 10.). Životinje smo zatim žrtvovali, a u homogenatu žlijezda slinovnica odredili titar virusa. Rezultati su prikazani na slici 12A, i pokazuju da, unatoč imunodepleciji, nismo uspjeli utvrditi produktivnu infekciju u primatelja kojima je prenijet homogenat latentno inficiranih  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa, za razliku od kontrolnih skupina miševa (slika 12B). Treba uočiti da je virus utvrđen u svim životinjama u kojih je došlo do serokonverzije.

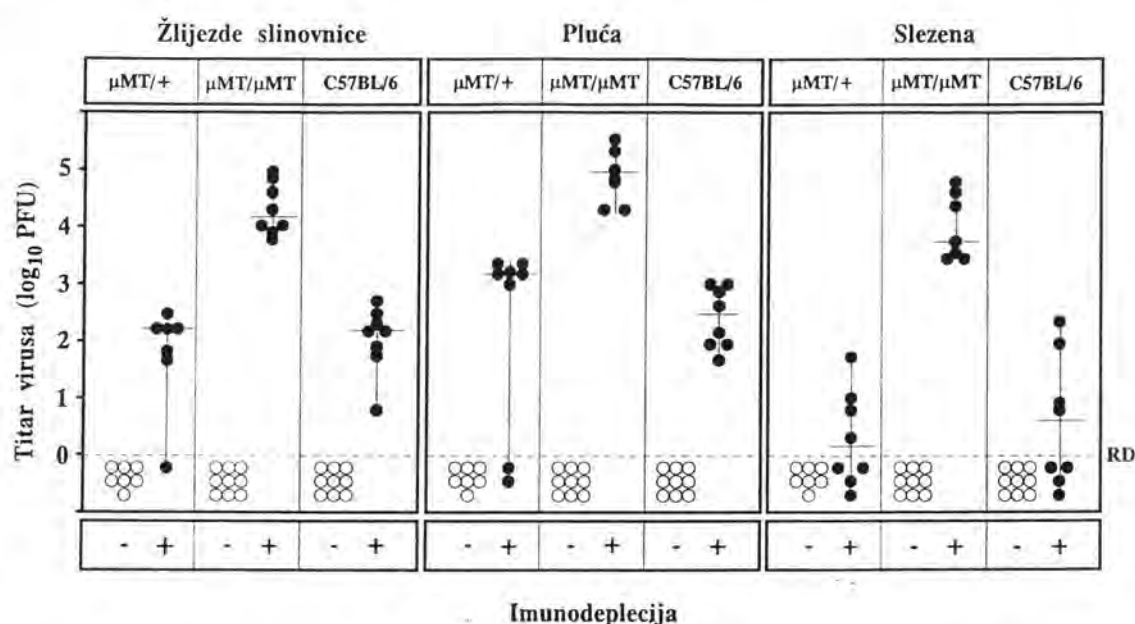
Mogućnost utvrđivanja nazočnosti ovako niske doze virusa *in vivo* (0,1 PFU) i izostanak serokonverzije u primaoca kojima su prenešeni homogenati organa i krvi latentno inficiranih miševa govorio bi protiv nazočnosti infektivnog virusa u tkivima, i ukazuje na postojanje tzv. molekulske latencije.

### **4.3. Mehanizmi imunološkog nadzora rekurentne CMV infekcije**

#### **4.3.1. Uloga protutijela u nadzoru rekurentne infekcije**

S obzirom da naši rezultati pokazuju da protutijela nisu presudna za nadzor primarne infekcije i uspostavu latencije, željeli smo ispitati njihovu ulogu u nadzoru rekurentne infekcije. Poznato je da se rekurentna CMV infekcija javlja uvijek u uvjetima imunosupresije latentno inficiranog domaćina usprkos nazočnosti razmjerno visokog titra neutralizacijskih protutijela u serumu (95, 128). Međutim, profilaktičkim prijenosom imunog seruma moguće je znatno smanjiti, premda ne i potpuno spriječiti, nazočnost virusa u tkivima i uspostavu latencije. Stoga smo uporabom latentno inficiranih  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa i seropozitivnih  $\mu$ MT/+ i C57BL/6 miševa željeli ispitati točnu ulogu protutijela u nadzoru rekurentne infekcije. Nakon uspostave latencije

spomenute skupine smo neselektivno imunodepletirali tijekom 2 tjedna i nakon toga odredili količinu virusa u žlijezdama slinovnicama, plućima i slezeni. Žrtvovanjem kontrolnih skupina miševa na dan početka imunodeplecije provjerili smo odsutnost produktivne infekcije u tkivima i organima. Imunodeplecija u  $\mu\text{MT}/\mu\text{MT}$  miševa uzrokuje rekurentnu infekciju i visok titar virusa (slika 13.). Ukupno uzevši, i u kontrolnim skupinama miševa dolazi do reaktivacije virusa u gotovo svih životinja, što znači da se rekurentna infekcija

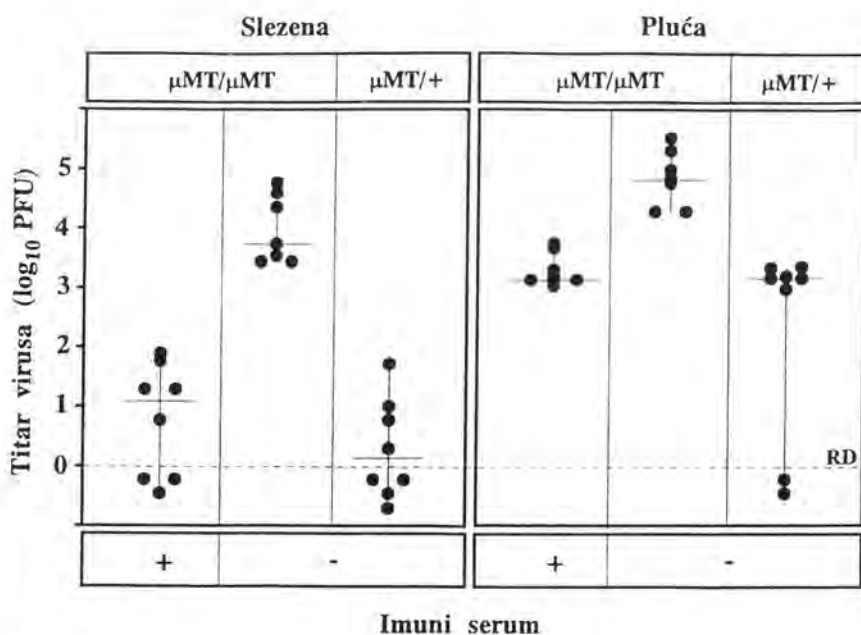


**Slika 13. Neselektivna imunodeplecija uzrokuje pojavu velike količine rekurentnog virusa u  $\mu\text{MT}/\mu\text{MT}$  miševa.** Latentno inficirane miševе (12 tj. p.i.) smo podvrgnuli protokolu neselektivne imunodeplecije, a nazočnost rekurentnog virusa u tkivima smo odredili dva tjedna kasnije (•). Skupinu kontrolnih miševa smo testirali na prisustvo virusa na dan početka imunodeplecije (o). Prikazani su titrovi virusa pojedinačno (simboli), te medijane vrijednosti (-). (RD) Razina detekcije.

javlja unatoč nazočnosti protuvirusnih protutijela. Međutim, količina rekurentnog virusa je u miševima bez protutijela ( $\mu\text{MT}/\mu\text{MT}$ ) viša za 100 do 1000 puta u pojedinim organima u odnosu na skupine heterozigota i C57BL/6 miševa, što ukazuje na određenu zaštitnu ulogu protutijela u rekurentnoj infekciji.

Poznato je da tijekom latencije postoji stalna nazočnost razmjerno visoke razine neutralizirajućih protuvirusnih protutijela u serumu (163). S

obzirom na uočene razlike u količini rekurentnog virusa između miševa sa i bez protutijela, željeli smo potvrditi da su navedene razlike posljedica nedostatka specifičnih protutijela u  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa. Skupini latentno inficiranih  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa smo injicirali serum latentno inficiranih  $\mu$ MT/+ miševa na početku primjene protokola neselektivne imunodeplecije. Serum (po 0,5 ml) smo injicirali svakih 8 h do ukupne količine od 2,5 ml, čime smo dostigli razinu titra specifičnih protutijela u seropozitivnih miševa. Pojavu rekurentnog virusa u tako tretiranih životinja smo uspoređivali s razinom rekurentne infekcije u homozigota i heterozigota kojima nije injiciran serum. Na slici 14. je prikazan titar virusa u slezeni i plućima koji smo odredili nakon 2 tjedna od primjene imunodeplecije. Intenzitet rekurentne infekcije u homozigota kojima smo prenijeli imuni serum pokazuje približno iste vrijednosti kao i u imunodepletiranih heterozigota, dok je u homozigota bez protutijela količina virusa u organima 100 - 1000 puta veća. Ovime se jasno pokazuje da je nazočnost protuvirusnih protutijela razlog za uočene razlike u količini rekurentnog virusa između homozigota i heterozigota. Na osnovu iznijetih rezultata može se zaključiti da protutijela imaju ograničenu ulogu u nadzoru rekurentne infekcije. Ona, naime, ne mogu spriječiti pojavu rekurentne infekcije, ali mogu znatno ograničiti njezino širenje iz rekurentnog žarišta. Osim toga, ovi rezultati pokazuju da model  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa, zbog odsutnosti neutralizirajućih protutijela, predstavlja oko 1000 puta osjetljiviji model za utvrđivanje nazočnosti rekurentnog virusa u tkivima od dosadašnjih. To ujedno objašnjava gotovo nepremostive teškoće u istraživanjima pojedinih mehanizama stične imunosti u dosadašnjim modelima.



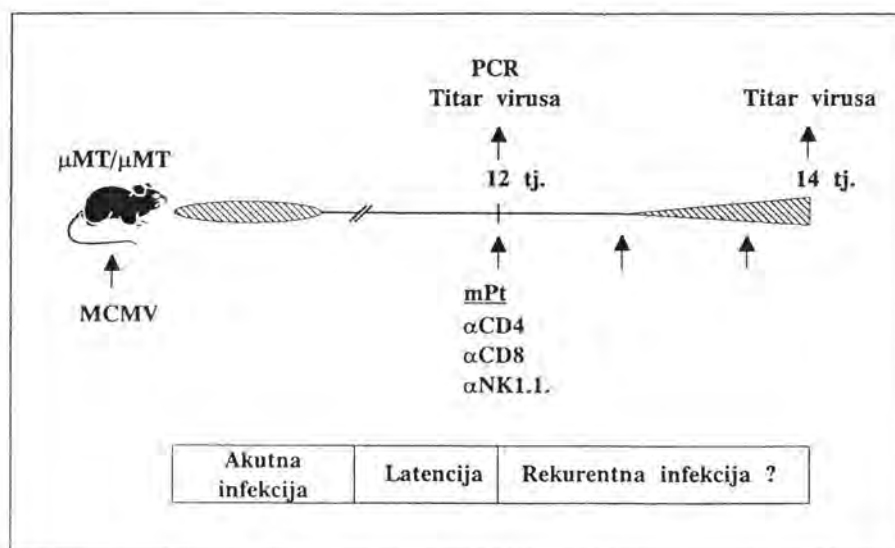
**Slika 14. Prijenos imunog seruma ograničava širenje rekurentnog virusa.** U latentno inficirane  $\mu\text{MT}/\mu\text{MT}$  miševima smo injicirali imuni serume latentno inficiranih  $\mu\text{MT}/+$  miševa, te ih podvrgnuli protokolu neselektivne imunodeplecije. Miševima smo pojedinačno injicirali po 0,5 ml seruma svakih 8 sati (ukupno 2,5 ml seruma). Nakon posljednjeg injiciranja seruma titar protutijela u primatelja je dostigao razinu titra u injiciranom serumu. Pozitivnu kontrolu je činila skupina homozigota, a negativnu skupina heterozigota podvrgnutih samo imunodepleciji. Prikazani su titrovi virusa pojedinačno ( $\bullet$ ), te medijane vrijednosti (-). (RD) Razina detekcije.

#### 4.3.2. Uloga stanične imunosti u nadzoru rekurentne infekcije

##### 4.3.2.1. Učestalost pojave rekurentne infekcije nakon deplecije limfocita T i stanica NK

Pojava rekurentne infekcije u imunoneodostatnih miševa, unatoč nazočnosti protuvirusnih protutijela, ukazuje na presudnu ulogu staničnih mehanizama u nadzoru nad rekurentnim virusom. S obzirom da smo u našim pokusima uočili razliku u količini virusa od 100 do 1000 puta u ispitivanim organima između miševa koji nemaju imunoglobulina ( $\mu\text{MT}/\mu\text{MT}$ ) i seropozitivnih miševa ( $\mu\text{MT}/+$ ), zaključili smo da  $\mu\text{MT}/\mu\text{MT}$  miševi predstavljaju osjetljiv model za izučavanje pojave rekurentne infekcije i mehanizama njezinog imunološkog nadzora *in vivo*. Posjedujući tako osjetljiv model, mogli smo započeti istraživanje uloge staničnih mehanizama imunosti u nadzoru rekurentne infekcije. Pojavu i intenzitet rekurentne infekcije smo

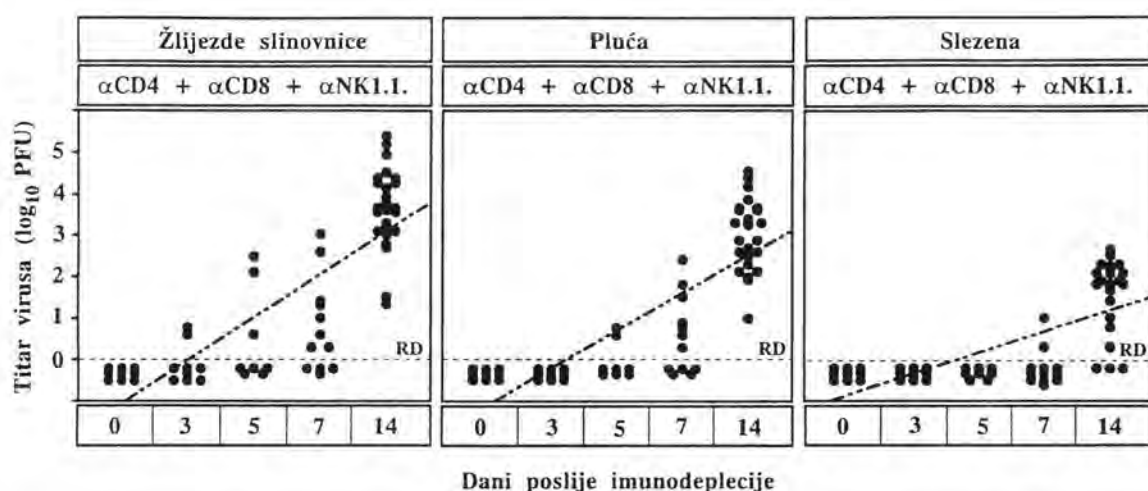
pratili u  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa kojima smo selektivno uklonili CD4<sup>+</sup> i CD8 limfocite T i stanice NK. Životinje smo žrtvovali nakon 3, 5, 7 i 14 dana od deplecije, te smo im u krvi, žlijezdama slinovnicama, plućima i slezeni odredili virus. Rezultati su prikazani na slici 16. gdje se može uočiti da se rekurentni virus pojavljuje već nakon samo tri dana od deplecije u žlijezdama slinovnicama, a nakon 5 dana u plućima. U slezeni se rekurentni virus počinje javljati tek nakon 7 dana od deplecije, a u krvi nismo uspjeli utvrditi nazočnost rekurentnog virusa niti nakon 14 dana (rezultat nije prikazan). Osim toga može se opaziti da se broj životinja u čijim je organima utvrđeno prisustvo rekurentnog virusa povećava u ovisnosti o proteklom vremenu nakon deplecije. Isto tako s vremenom raste i titar rekurentnog virusa u svim organima. Treba uočiti da u žlijezdama slinovnicama i plućima nakon 2 tjedna od deplecije dolazi do pojave rekurentnog virusa u svih, a u slezeni u gotovo svih životinja. Ovi rezultati ukazuju na osjetljivost modela infekcije miševa bez protutijela u izučavanju mehanizama imunološkog nadzora rekurentne infekcije, što do sada nije bilo moguće na modelu seropozitivnih miševa (28, 95).



**Slika 15. Plan pokusa za ispitivanje uloge limfocita T i stanica NK u nadzoru rekurentne infekcije.** Latentno inficirane  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševe (12 tj.p.i.) smo selektivno depletirali s mPt na CD4, CD8 i NK1.1. biljege. Dva tjedna nakon početka deplecije odredili smo titar virusa u prikupljenim organima.



Pojava rekurentnog virusa nakon istovremene deplecije podvrsta limfocita T i stanica NK potvrđuje presudnu ulogu ovih stanica u nadzoru rekurentne infekcije. Rana pojava rekurentnog virusa nakon deplecije ukazuje na potrebu stalne aktivnosti staničnih imunoloških mehanizama u nadzoru mjesta gdje se reaktivira latentni virus. Ovo bi posredno govorilo u prilog spontanosti i ograničenoj aktivnosti latentnog virusnog genoma pod nadzorom imunološkog sustava.

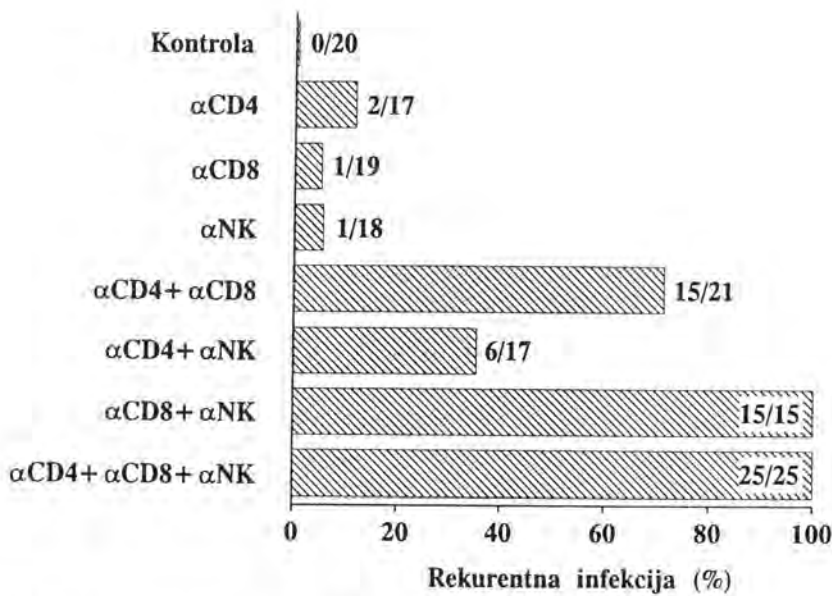


**Slika 16.** Učestalost pojave rekurentne infekcije nakon deplecije limfocita T i stanica NK.  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševima u stanju latencije (12 tj. p.i.) smo istovremeno depletirali CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocite T, te stanice NK. Nazočnost virusa smo odredili u pojedinim organima u različito vrijeme nakon početka deplecije. Prikazani su titrovi virusa pojedinačno (•), te pravac regresije (vodoravne crte). (RD) Razina detekcije.

#### 4.3.2.2. Selektivna uloga limfocita T i stanica NK u nadzoru rekurentnog virusa

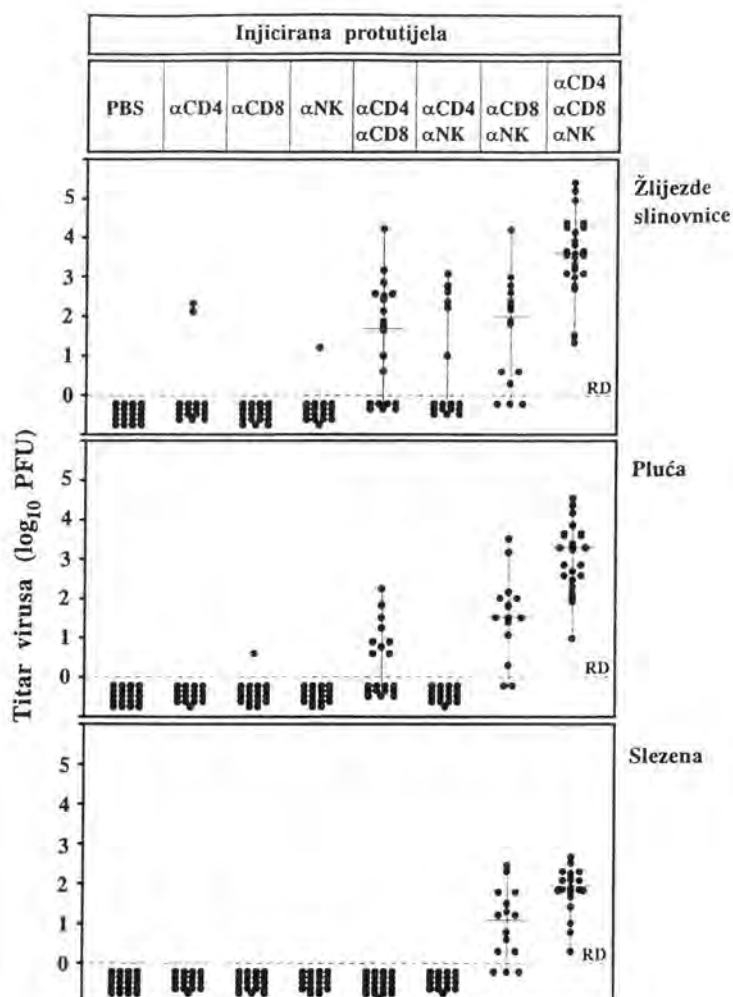
Pojava rekurentne infekcije u svih životinja nakon deplecije glavnih nosilaca stanične imunosti navela nas je da ispitamo ulogu pojedinih podvrsta limfocita u nadzoru rekurentne infekcije. Stoga smo pojedinim skupinama latentno inficiranih  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa depletirali CD4<sup>+</sup> limfocite T, CD8<sup>+</sup> limfocite T, stanice NK pojedinačno ili u dvije kombinacije (slika 15.). Budući da se nakon dva tjedna istovremene deplecije podvrsta limfocita T i stanica NK rekurentna infekcija u svih miševa, uzeli smo to razdoblje kao standardno

za izučavanje uloge pojedinih podvrsta limfocita. Slika 17. prikazuje postotak miševa u kojih je utvrđen rekurentni virus nakon selektivne imunodeplecije. Deplecijom podvrsta limfocita pojedinačno nismo bitnije narušili nadzor nad rekurentnim virusom. Rekurentna infekcija se javlja u manje od 10% životinja, za razliku od istovremene deplecije sve tri populacije stanica gdje je rekurentni virus pronađen u svih životinja. Deplecijom CD4<sup>+</sup> limfocita T i stanica NK istovremeno, rekurentna infekcija se javlja u svega 25% životinja,



**Slika 17. Pojava rekurentne infekcije u  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa kojima su selektivno depletirani mehanizmi stanične imunosti.** Latentno inficiranim  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševima smo selektivno depletirali CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocite T i stanice NK. Nazočnost rekurentne infekcije u tkivima smo odredili dva tjedna nakon početka deplecije. Prikazani su postoci miševa s nazočnošću rekurentnog virusa, ali i odnos između broja miševa s rekurentnom infekcijom i ukupnog broja miševa.

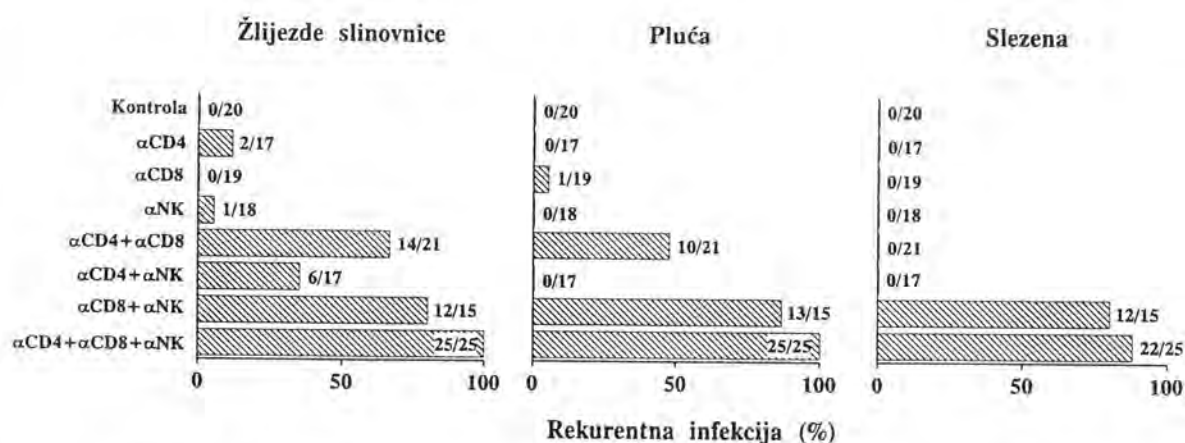
što pokazuje da CD8<sup>+</sup> limfociti T mogu sami nadzirati virus u većine životinja. U slučaju deplecije obje podvrste limfocita T, CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, rekurentna infekcija je prisutna u većine životinja (70%), što upućuje ograničenu moć samih stanica NK u nadzoru latencije. Međutim, nakon istovremene deplecije CD8<sup>+</sup> limfocita T i stanica NK rekurentna infekcija je prisutna u svih životinja. Ovaj podatak pokazuje da niti CD4<sup>+</sup> limfociti T nisu sposobni samostalno nadzirati rekurentnu infekciju. S obzirom da se



**Slika 18. Selektivna uloga limfocita T i stanica NK u nadzoru rekurentnog virusa.** Latentno inficiranim  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševima smo selektivno depletirali CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocite T i stanice NK. Titar virusa smo odredili pojedinačno u žlijezdama slinovnicama, plućima i slezeni nakon 2 tj. od početka deplecije (•). (RD) Razina detekcije

latentni virusni genom nalazi razasut u različitim tkivima u organizmu, zanimalo nas je razlikuje li se imunološki nadzor rekurentnog virusa u pojedinim organima, ili vrijede ista pravila kao pri nadzoru primarne infekcije. Na slici 18. i 19. je prikazana pojava virusa u pojedinim organima. Pojedinačna deplecija CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita T, te stanica NK nije rezultirala pojavom rekurentne infekcije virusa u nijednom ispitivanom organu, osim u nekoliko sporadičnih slučajeva u žlijezdama slinovnicama i plućima. Nasuprot tome, istovremenom deplecijom svih triju podvrsta limfocita rekurentna infekcija se javlja u svim organima, uz veliku količinu virusa.

Rezultati istovremene deplecije limfocitnih podvrsta ukazali su na razlike u nadzoru rekurentne infekcije u pojedinim organima. U slučaju istovremene deplecije  $CD4^+$  i  $CD8^+$  limfocita T rekurentna infekcija je prisutna u žlijezdama slinovnicama (66%) i plućima (48%), dok je u slezeni nismo uspjeli detektirati. S obzirom da dodatna deplecija stanica NK uzrokuje potpunu reaktivaciju virusa u navedenim organima uz razmjerno veliku količinu virusa, može se zaključiti da su stanice NK dostatne za nadzor rekurentnog virusa u slezeni.



**Slika 19. Pojava rekurentne infekcije u pojedinim organima u uvjetima selektivne deplecije mehanizama stanične imunosti.** Rekurentnu infekciju u latentno inficiranih  $\mu MT/\mu MT$  miševa smo potaknuli deplecijom  $CD4^+$  i  $CD8^+$  limfocita T i stanica NK. Dva tjedna od početka deplecije utvrđena je nazočnost virusa u pojedinim organima. Prikazani su postoci organa u kojima je nazočan rekurentni virus. Osim toga, rezultati su prikazani i kao odnos broja organa u kojima je nazočan rekurentni virus i ukupnog broja testiranih organa.

Nakon istovremene deplecije  $CD8^+$  limfocita T i stanica NK rekurentna infekcija je prisutna u gotovo svim organima svih životinja. Pritom je količina virusa u žlijezdama slinovnicama i plućima niža, a u slezeni jednaka količini rekurentnog virusa u miševa kojima su depletirane sve tri populacije limfocita. Nalaz ukazuje na to da  $CD4^+$  limfociti T ne mogu sami nadzirati rekurentnu infekciju. Ipak razlike u količini virusa u žlijezdama slinovnicama i plućima ukazuju na ograničenu ulogu ovih stanica.

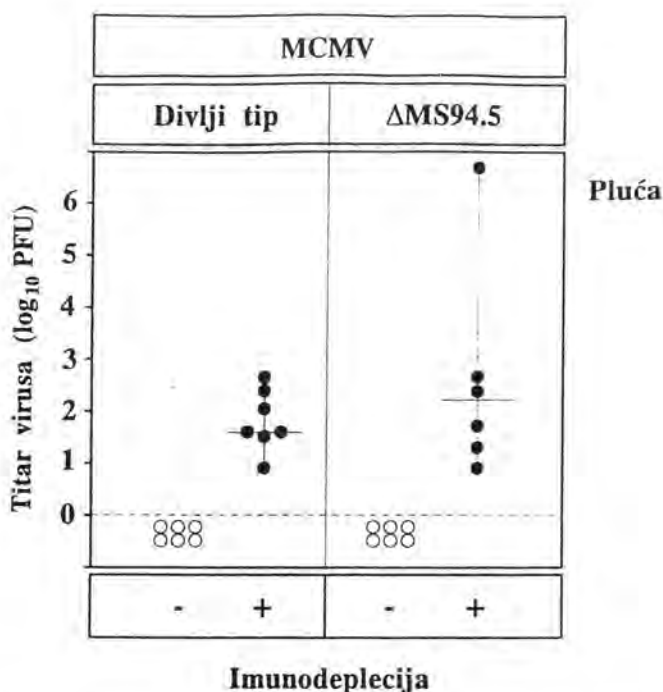
Premda prilikom pojedinačne deplecije CD8<sup>+</sup> limfocita T, CD4<sup>+</sup> limfociti T i stanice NK učinkovito preuzimaju nadzor nad rekurentnim virusom, niti jedna od tih podvrsta limfocita ne može nadzirati pojavu rekurentne infekcije u žlijezdama slinovnicama i plućima bez sudjelovanja druge. Ove činjenice ukazuju na neophodnost međusobne suradnje ovih stanica u nadzoru rekurentne infekcije u navedenim organima. Izuzetak čini slezena gdje stanice NK mogu učinkovito nadzirati rekurentnu infekciju i bez nazočnosti i CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita T.

Istovremenom deplecijom CD4<sup>+</sup> limfocita T i stanica NK nismo polučili pojavu rekurentne infekcije u plućima i slezeni, osim u žlijezdama slinovnicama gdje je ona prisutna u manjem broju životinja (30%). Ovaj podatak govori o mogućnosti CD8<sup>+</sup> limfocita T da bez sudjelovanja CD4<sup>+</sup> limfocita T i NK stanica učinkovito nadziru pojavu rekurentne infekcije u plućima i slezeni, ali i u žlijezdama slinovnicama u većine životinja. Ovi rezultati ukazuju na određene razlike u nadzoru primarne i rekurentne infekcije žlijezda slinovnica. Naime, tijekom primarne infekcije nadzor virusa u epitelnim stanicama žlijezda slinovnicama je neovisan o CD8<sup>+</sup> limfocitima T (91), i posredovan je CD4<sup>+</sup> limfocitima T i NK stanicama (92, slika 8. i 9.). Premda su CD8<sup>+</sup> limfociti T nazočni u infiltratu žlijezda slinovnica tijekom primarne infekcije, oni ne mogu učinkovito nadzirati umnažanje virusa u tim stanicama (91).

#### **4.3.2.3. Epitelne stanice acinusa žlijezda slinovnica nisu izvor rekurentnog virusa**

Poznata je činjenica da su CD8<sup>+</sup> limfociti T neučinkoviti u nadzoru infekcije epitelnih stanica acinusa žlijezda slinovnica tijekom primarne infekcije (91). Nasuprot tome, uočeno učinkovito sudjelovanje ovih limfocita u nadzoru rekurentnog virusa u žlijezdama slinovnicama ukazuje na mogućnost da stanice koje su izvor rekurentnog virusa nisu žlijezdane epitelne stanice. Stoga smo





**Slika 20. Skupina gena u *HIND III* E području genoma MCMV nije od presudne važnosti za uspostavu latencije i pojavu rekurentne infekcije.** Novookočene miševе soja C57BL/6 smo inficirali s 100 PFU divljeg tipa virusa ili s mutantom  $\Delta$ MS94.5. Po uspostavi latencije miševе smo neselektivno imunodepletirali. Prikazani su titrovi virusa pojedinačno u plućima dva tjedna nakon deplecije (•), te medijane vrijednosti (-). Kontrolnim skupinama miševa smo odredili virus na dan imunodeplecije (o). (RD) Razina detekcije.

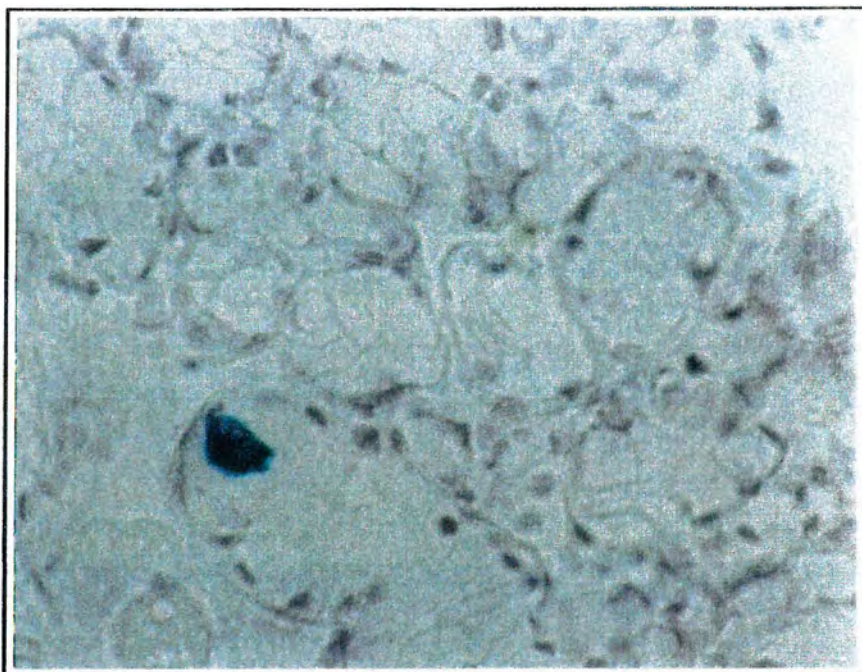
željeli ispitati da li je razlog navedenih razlika posljedica reaktivacije virusa u drugim tipovima stanica koje su podložne nadzoru CD8<sup>+</sup> limfocita T?

Za utvrđivanje mjesta rekurentne infekcije u žlijezdama slinovnicama poslužili smo se s rekombinantnim virusom  $\Delta$ MS94.5, mutantom MCMV, kojem je ubačen gen za enzim  $\beta$ -galaktozidazu *E. Coli* (*lacZ* kazetu) u *HIND III* E regiju virusnog genoma. Ovim smo virusom inficirali novookočene miševе C57BL/6. Kontrolnu skupinu miševa smo inficirali divljim tipom MCMV virusa. Po uspostavi latencije, oko 6 mjeseci nakon primarne infekcije, miševе smo neselektivno imunodepletirali tijekom 2 tjedna. Potom smo

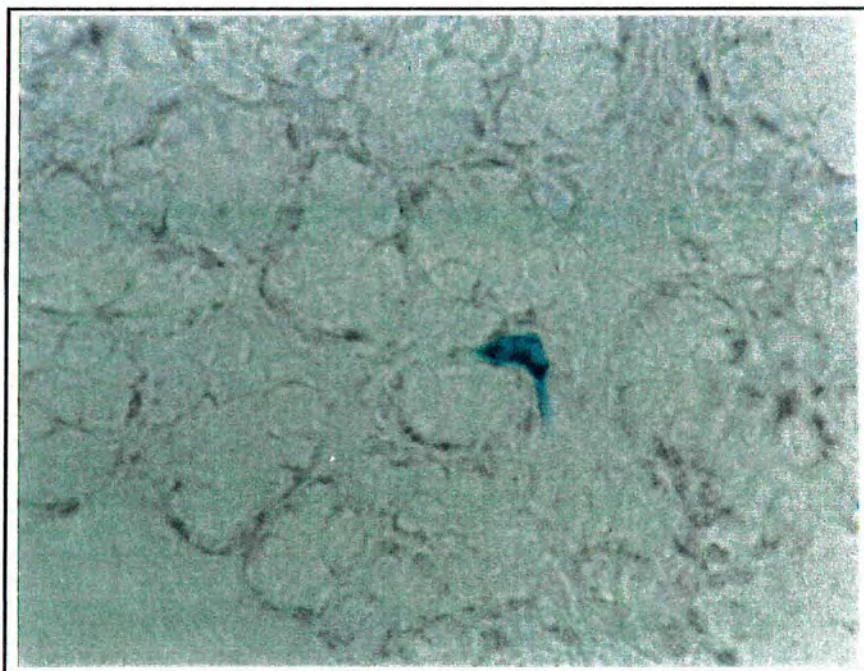
**Skika 21. Epitelne stanice žlijezda slinovnica nisu izvor rekurentnog virusa.**

**A.** Prikazana je histokemijska analiza žlijezda slinovnica C57BL/6 miševa dva tjedna nakon infekcije s  $\Delta$ MS94.5 mutantom MCMV. Inficirane epitelne stanice acinusa su modro-zelено obojene. **B.** Latentno inficirane miševе C57BL/6 s  $\Delta$ MS94.5 virusom smo neselektivno imunodepletirali i nakon dva tjedna histokemijski analizirali žlijezde slinovnice. Mjesto rekurentne infekcije se nalazi u potpornom tkivu i razabire se kao modro-zelено obojenje tkiva.

A

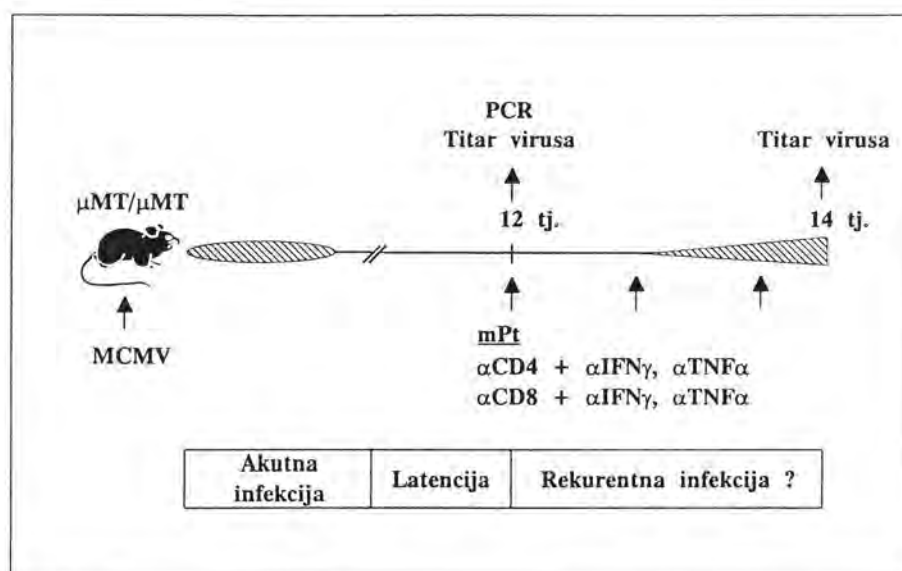


B



Slika 21.

miševima smo neselektivno imunodepletirali tijekom 2 tjedna. Potom smo odredili količinu virusa u pojedinim organima, a žlijezde slinovnice histokemijski analizirali. Na slici 20. je uspoređen titar rekurentnog virusa u plućima obje skupine životinja. Treba uočiti da mutirani virus uspostavlja latenciju kao i divlji tip virusa, a također, nakon primjene protokola imunosupresije dolazi do njegove reaktivacije. S obzirom na spomenutu sličnost dva virusa pristupili smo histokemijskoj analizi tkiva miševa inficiranih mutantom MCMV. Tkivne rezove smo inkubirali u supstratu za enzim  $\beta$ -



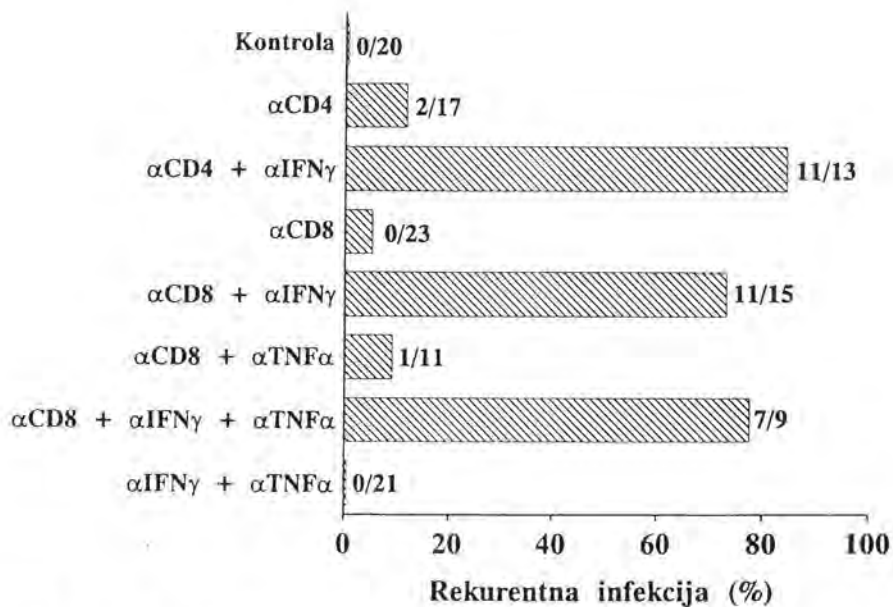
**Slika 22. Plan pokusa za istraživanje uloge citokina u nadzoru rekurentne infekcije.** Latentno inficiranim  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševima smo selektivno depletirali CD4<sup>+</sup> ili CD8<sup>+</sup> limfocite T uz neutralizaciju IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , ili oba citokina zajedno. Dva tjedna nakon početka delecije životinje smo žrtvovali, a u pojedinim organima odredili nazočnost rekurentnog virusa.

galaktozidazu (X-gal) što je rezultiralo modrim-zeleno obojenjem mjesta gdje se taj enzim nalazi, odnosno u produktivno inficiranim stanicama. Na slici 21. su uspoređeni rezovi žlijezda slinovnica tijekom akutne i rekurentne infekcije. U rekurentnoj infekciji produktivno inficirane stanice pripadaju potpornom tkivu žlijezda, dok u žlijezdanim epitelnim stanicama nema znakova za nazočnost virusa. Suprotno tome, u akutnoj infekciji virus se nalazi u žlijezdanim epitelnim stanicama.



### 4.3.3. Uloga citokina u nadzoru rekurentne infekcije

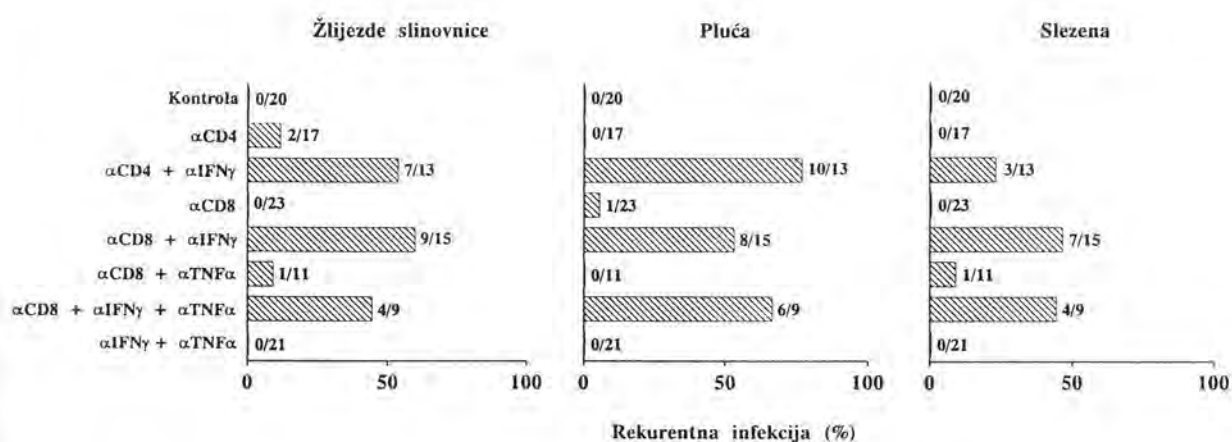
Od prije je poznata uloga citokina, posebice interferona  $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ) i čimbenika nekroze tumora  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ), u nadzoru primarne CMV infekcije (117, 146). Uočeno je njihovo imunoregulacijsko (76), ali i neposredno protuvirusno djelovanje (116). Glavni izvori ovih citokina su limfociti T i stanice NK (133, 134). S obzirom da su te stanice glavni nosioci imunološkog nadzora rekurentne infekcije, htjeli smo ispitati kakva je uloga navedenih



**Slika 23.  $\text{IFN}\gamma$  ima važnu ulogu u nadzoru rekurentne infekcije.** Latentno inficiranim  $\mu\text{MT}/\mu\text{MT}$  miševima smo selektivno depeltivirali  $\text{CD4}^+$  ili  $\text{CD8}^+$  limfocite T uz neutralizaciju  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , ili oba citokina zajedno. Nazočnost virusa u tkivima smo odredili nakon dva tjedna od početka deplecije. Prikazani su postoci miševa u kojih je detektiran rekurentni virus, a također i odnos između broja miševa s rekurentnom infekcijom i ukupnog broja miševa.

citokina u mehanizmima nadzora rekurentne infekcije posredovanim pojedinim od ovih stanica (slika 22.). Latentno inficiranim homozigotima smo protutijelima uklonili  $\text{CD4}^+$  ili  $\text{CD8}^+$  limfocite T i istovremeno neutralizirali  $\text{IFN}\gamma$  i  $\text{TNF}\alpha$ . Nakon 2 tjedna od početka deplecije smo odredili prisutnost virusa u žlijezdama slinovnicama, plućima i slezeni. Na slici 23. su prikazani postoci miševa s rekurentnom infekcijom. Iz prikazanih se rezultata vidi da smo reaktivaciju virusa, u relativno visokom postotku (oko 80%), polučili u

CD8-depletiranih miševa, u kojih smo neutralizirali  $IFN\gamma$  ili istovremeno  $IFN\gamma$  i  $TNF\alpha$ . S obzirom da deplecija  $CD8^+$  limfocita T i  $TNF\alpha$  nije rezultirala reaktivacijom virusa, izvjesno je da ovaj citokin nije bitan u nadzoru rekurentne infekcije. Sličan učinak smo dobili prilikom deplecije  $CD4^+$  limfocita T i navedenih citokina. Naime, mehanizmi nadzora rekurentne infekcije i u odsustvu  $CD4^+$  limfocita T su posredovani  $IFN\gamma$ . Međutim, izostanak reaktivacije virusa u slučaju kombinirane deplecije samo navedenih citokina ukazuje da oni nisu jedini i nezamjenjivi mehanizam u nadzoru



**Slika 24. Nadzor rekurentne infekcije je ovisan o  $IFN\gamma$  u svim organima.** Latentno inficiranim  $\mu MT/\mu MT$  miševima depletirali  $CD4^+$  ili  $CD8^+$  limfocite T uz neutralizaciju  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , ili oba citokina zajedno. Dva tjedna od početka deplecije određena je prisutnost virusa u pojedinim organima. Rezultati su prikazani kao postoci organa pozitivnih na rekurentni virus. Prikazan je i odnos broja pozitivnih u odnosu na broj testiranih organa.

rekurentne infekcije. Naime, prisutnost limfocita T i stanica NK osigurava nadzor rekurentne infekcije, unatoč neutralizaciji spomenutih citokina. Ovo može biti posljedica direktnog citotoksičnog djelovanja ovih stanica, ali i parakrinog lučenja ovih citokina koji stoga nisu bili neutralizirani protutijelima.

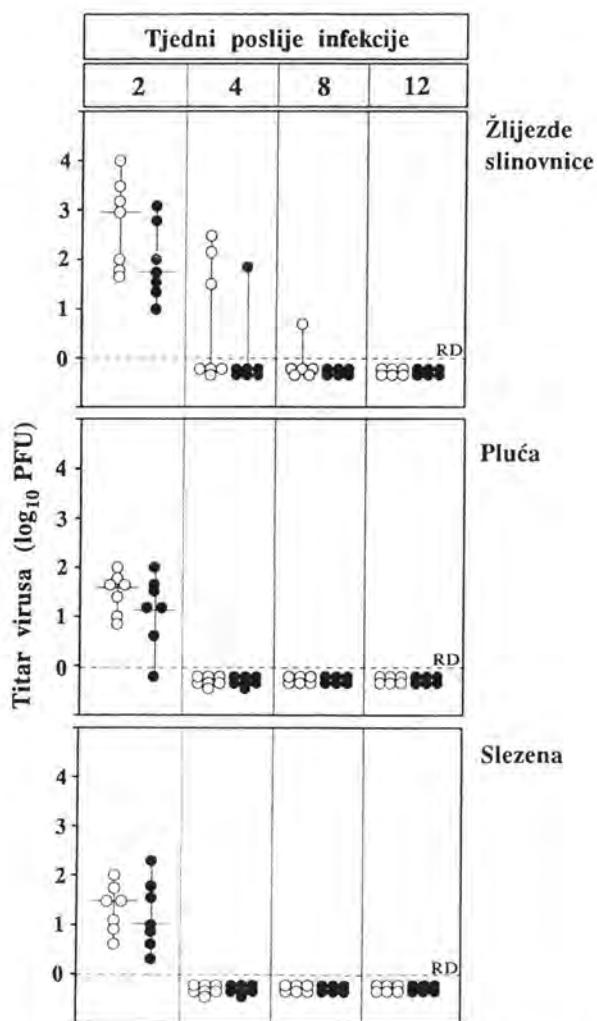
Glede prethodno uočenih razlika u nadzoru latencije u pojedinim organima, zanimalo nas je da li ispitivani citokini imaju različitu ulogu u pojedinim organima. Na slici 24. su prikazani rezultati s obzirom na pojedine



testirane organe. Možemo uočiti da je  $IFN\gamma$ , u nedostatku  $CD4^+$  i  $CD8^+$  limfocita T, važan u nadzoru latentne infekcije u svim testiranim organima.

#### 4.4. Nadzor infekcije u miševa s mutacijom gena za $\beta 2$ -mikroglobulin

Molekule MHC razreda I imaju važnu ulogu u odnosu između CMV i domaćina. One su ograničavajući čimbenik u prepoznavanju virusnih antigena za  $CD8^+$  limfocite T, koji predstavljaju glavni mehanizam nadzora primarne

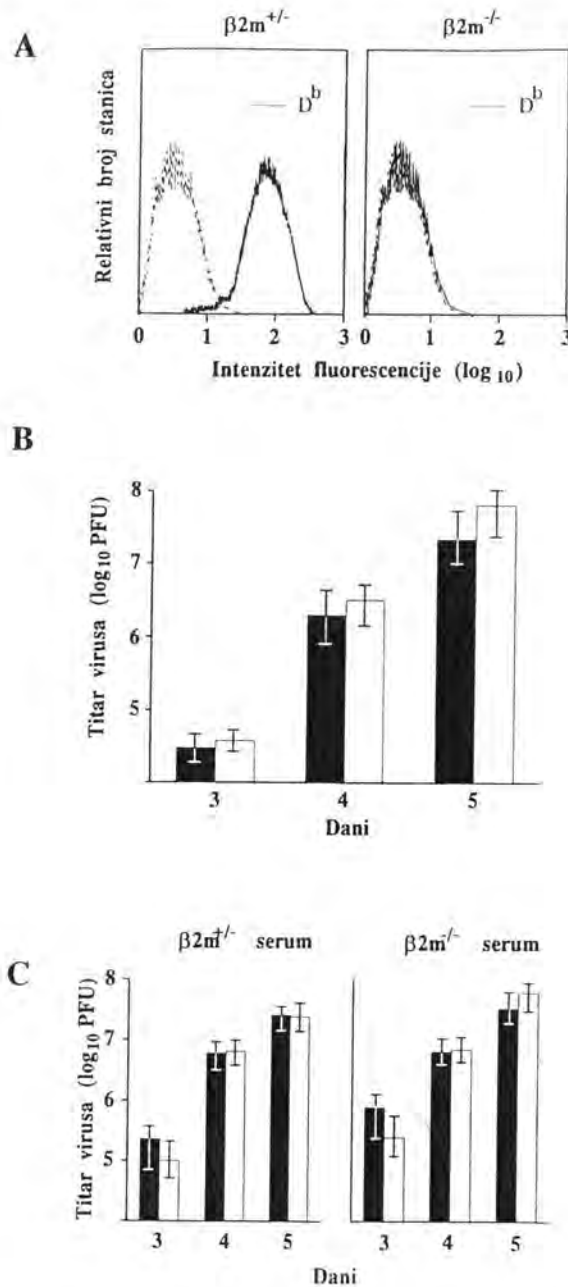


Slika 25. Podjednaka nazočnost i brzina uklanjanja virusa u  $\beta 2m^{-/-}$  i  $\beta 2m^{+/+}$  miševa. Količinu virusa u žlijezdama slinovnicama, plućima i slezeni smo usporedili između  $\beta 2m^{+/+}$  (o) i  $\beta 2m^{-/-}$  (•) miševa u različitim vremenskim razdobljima nakon infekcije s  $10^5$  PFU MCMV. Prikazan je pojedinačan titar virusa (simboli), te medijane vrijednosti (-). (RD) razina detekcije.

infekcije (164, 166, 168). Osim toga, na osnovu različite osjetljivosti pojedinih staničnih linija na infekciju, a koje na svojoj površini imaju različite haplotipove molekula razreda I, stvorena je pretpostavka da ove molekule pravilno oblikovane imaju ulogu receptora za virus (154, 155). S obzirom na ove podatke, ispitali smo tijekom infekcije i mehanizme imunološkog nadzora u miševa s mutacijom gena za  $\beta 2$  mikroglobulin. Naime, posljedica ove mutacije je nemogućnost stabilne pojave MHC molekula razreda I na površini stanica i nedostatak  $CD8^+$  limfocita T zbog onemogućenog sazrijevanja ove populacije (229). Stoga u ovih miševa, u odsutnost glavnog efekorskog mehanizma posredovanog  $CD8^+$  limfocitima T, prirodno sazrijeva nadomjesni mehanizam ovisan o  $CD4^+$  limfocitima T. S obzirom da o replikaciji virusa tijekom primarne infekcije ovisi količina latentnog virusnog genoma što ostaje u tkivima (163), zapitali smo se da li nadomjesni mehanizam može jednako učinkovito zaustaviti replikaciju virusa i dovesti do uspostave latencije, te da li jednako učinkovito kontrolira virus i kojim mehanizmima?

#### **4.4.1. Uspostava latencije u uvjetima nedostatka MHC molekula razreda I i $CD8^+$ limfocita T**

Najprije smo željeli ispitati da li postoje određene razlike u nadrou primarne infekcije virusa između homozigota ( $\beta 2m^{-/-}$ ) i heterozigota ( $\beta 2m^{+/-}$ ) za mutaciju gena za  $\beta 2$  mikroglobulin. Inficirali smo  $\beta 2m^{-/-}$  i  $\beta 2m^{+/-}$  miševe sa standardnom dozom virusa i nakon određenog vremenskog razdoblja poslije inekcije smo odredili količinu virusa u žlijezdama slinovnicama, plućima i slezeni. Rezultati prikazani na slici 25. pokazuju da su  $\beta 2m^{-/-}$  i  $\beta 2m^{+/-}$  miševi podjednako osjetljivi na infekciju s MCMV i da se kinetika uklanjanja virusa iz pojedinih tkiva značajno ne razlikuje među spomenutim skupinama. U homozigota i u heterozigota, dolazi do uspostave latencije nakon 8 tjedana od primarne infekcije.



**Slika 26. Nedostatak MHC molekula razreda I ne utječe na proizvodnju virusa *in vitro*.** A. Nedostatak MHC molekula razreda I na površini fibroblasta podrijetlom iz  $\beta 2m^{-/-}$  miševa. Fibroblaste smo obilježili s mPt 28-14-8S koja prepoznaju  $D^b$  molekule. Nazočnost MHC molekula na površini stanica smo izmjerili protočnim citometrom upotrebom FITC-obilježenih sekundarnih kozjih protumišnjih protutijela. B. Proizvodnja virusa u kulturi inficiranih fibroblasta podrijetlom iz  $\beta 2m^{-/-}$  i  $\beta 2m^{+/-}$  miševa. Fibroblaste smo inficirali s 0,001 PFU/stanici MCMV bez centrifugalnog pojačanja. Nazočnost virusa smo utvrdili u kulturi nakon 3, 4 i 5 dana od infekcije. Prikazani stupići pokazuju srednje vrijednosti titra virusa proizvedenog na fibroblastima  $\beta 2m^{+/-}$  ( $\square$ ) i  $\beta 2m^{-/-}$  ( $\blacksquare$ ) miševa u mediju obogaćenom s FCS. C. Prikazana je proizvodnja virusa kao i u B., osim što je medij bio obogaćen sa serumom  $\beta 2m^{-/-}$  ili  $\beta 2m^{+/-}$  miševa.

#### 4.4.2. Površinska nazočnost MHC molekula razreda I nije neophodna za infekciju fibroblasta *in vitro*

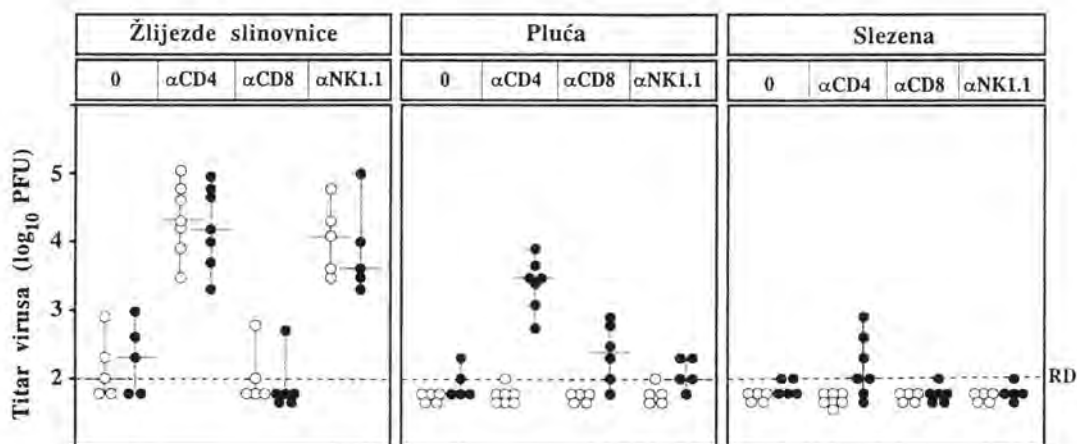
Podjednako učinkovita infekcija  $\beta 2m^{-/-}$  i  $\beta 2m^{+/-}$  miševa ukazuje na činjenicu da nedostatak  $\beta 2m$  i MHC molekula razreda I nije neophodan za infekciju *in vivo*. Ovo je u suprotnosti s pretpostavkom temeljenom na rezultatima *in vitro* da  $\beta 2m$  i MHC molekule razreda I služe kao receptori za CMV. Naime, postoje podaci da osjetljivost pojedinih staničnih linija na infekciju CMV ovisi o haplotipu i konformaciji MHC molekula razreda I (222). Stoga smo željeli provjeriti da li mišji fibroblasti podrijetlom iz  $\beta 2m^{-/-}$  miševa pokazuju razlike u osjetljivosti na MCMV infekciju i proizvodnju virusa u odnosu na fibroblaste iz  $\beta 2m^{+/-}$  miševa. Fibroblaste  $\beta 2m^{-/-}$  miševa smo uzgojili u MEM mediju uz dodatak 2% seruma također podrijetlom iz  $\beta 2m^{-/-}$  miševa kako bismo izbjegli moguću rekonstituciju postojećih teških lanaca MHC molekula razreda I na površini stanica sa serumskim  $\beta 2m$  (174). Nazočnost MHC molekula razreda I provjerili smo indirektnom imunofluorescencijom na sve tri alelne varijante ovih molekula ( $L^b$ ,  $K^b$ ,  $D^b$ ). Na slici 26 A. prikazana je nazočnost molekula  $D^b$  na fibroblastima  $\beta 2m^{-/-}$  i  $\beta 2m^{+/-}$  miševa. Uočljivo je da fibroblasti podrijetlom iz homozigota nemaju na površini molekule  $D^b$ , za razliku od stanica podrijetlom iz heterozigota. Iste rezultate smo polučili i za  $L^b$  i  $K^b$  alel ovih molekula (rezultati nisu prikazani).

Nakon što smo utvrdili ekspresiju MHC molekula razreda I u ovako pripremljenoj kulturi fibroblasta, pristupili smo testiranju njihove podložnosti za infekciju s MCMV i produkciju virusa. Stanice podrijetlom od homozigota i heterozigota smo uzgojili u mediju s dodatkom FCS ili seruma odgovarajućeg podrijetla ( $\beta 2m^{-/-}$  ili  $\beta 2m^{+/-}$ ), te smo ih inficirali s 0.001 PFU/stanici. Ukupnu količinu virusa proizvedenog u kulturi 3., 4. i 5. dana poslije infekcije. Rezultati su prikazani na slici 26. B i C, gdje se može uočiti da nema značajne razlike u produkciji virusa s obzirom na podrijetlo fibroblasta i

seruma u kojemu su kultivirani. Očigledno, odsustvo trimolekulskih kompleksa MHC razreda I ne utječe na replikacijski ciklus virusa.

#### 4.4.3. Mehanizmi nadzora primarne infekcije u $\beta 2m^{-/-}$ miševa

Identična kinetika uklanjanja virusa iz pojedinih organa  $\beta 2m^{-/-}$  i  $\beta 2m^{+/-}$  miševa, ukazuje da je u tih životinja prirodno razvijen nadomjesni mehanizam vrlo učinkovit. Stoga smo željeli, imajući potpuno razvijen nadomjesni mehanizam tijekom ontogeneze, utvrditi koje su njegove glavne



**Slika 27. Mehanizmi nadzora primarne infekcije u  $\beta 2m^{-/-}$  i  $\beta 2m^{+/-}$  miševa.** Miševima smo selektivno uklonili  $CD4^{+}$  i  $CD8^{+}$  limfocite T i stanice NK, te smo ih potom inficirali s  $10^5$  PFU virusa. Prikazani su pojedinačni titrovi virusa u organima  $\beta 2m^{+/-}$  (o) i  $\beta 2m^{-/-}$  (•) miševa dva tjedna nakon infekcije, te medijane vrijednosti (vodoravne crte). (RD) Razina detekcije.

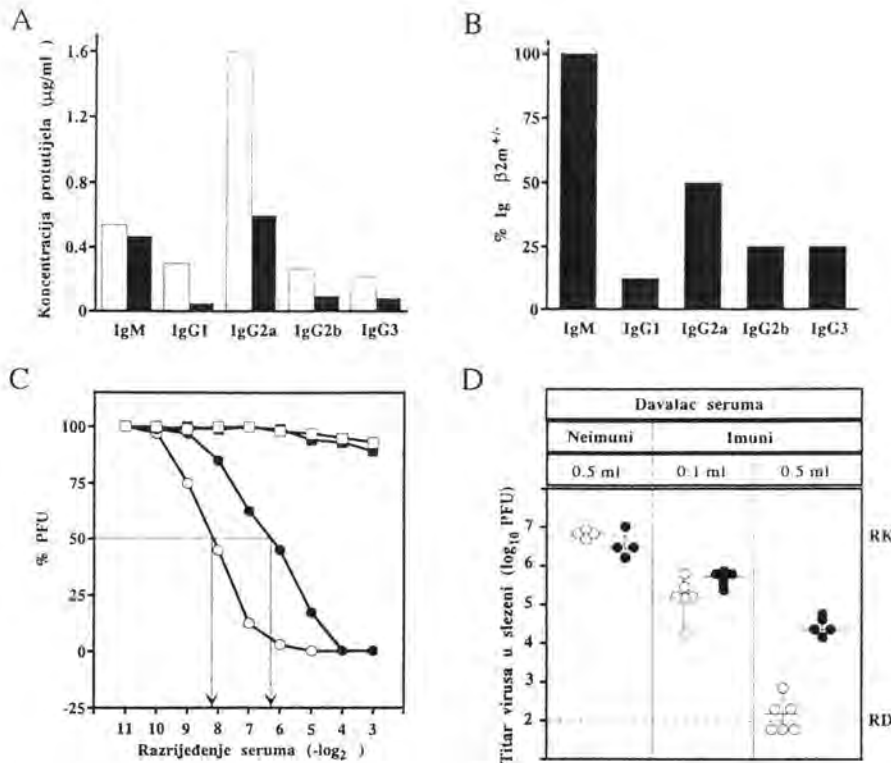
sastavnice što tako učinkovito uklanjaju virus. Skupine  $\beta 2m^{-/-}$  miševa smo inficirali, te smo im depletirali pojedine podvrste limfocita T i stanice NK. Nakon 2 tjedna od infekcije smo odredili titar virusa u žlijezdama slinovnicama, plućima i slezeni (slika 27). Rezultati pokazuju razmjerno veliku količinu virusa u slinovnicama nakon deplecije  $CD4^{+}$  limfocita T u homozigota i heterozigota, što potvrđuje dosadašnja saznanja o nadzoru virusa u ovom organu. Slični rezultati su dobiveni i nakon deplecije stanica NK. Deplecijom  $CD8^{+}$  limfocita T nije narušen nadzor infekcije u slinovnicama u obje skupine miševa. Razlike u imunološkom nadzoru virusa su, međutim, dobivene u



drugim organima. Deplecija CD4<sup>+</sup> limfocita T nije narušila nadzor virusa u plućima i slezeni heterozigota, no u homozigota je zamjećen značajno veća količina. Preostale stanice u homozigota nakon CD4 delecije očitno ne mogu u potpunosti nadomjestiti ovaj nedostatak, što nije slučaj i u heterozigota gdje CD8<sup>+</sup> limfociti T mogu učinkovito vršiti nadzor infekcije. Deplecija CD8<sup>+</sup> T limfocita u homozigota pokazuje mali, ali ponovljivi, učinak u plućima. Ovo ukazuje na mogućnost da u plućima funkciju nadzora virusa ima određena podvrsta CD8<sup>+</sup> limfocita, koji nisu spregnuti sa MHC molekulama, na što upućuju rezultati drugih autora (3, 36, 110). S druge strane, deplecija stanica NK nije narušila nadzor virusa u plućima i slezeni, što bi govorilo protiv uloge ovih stanica kao glavnom nadomjesnom mehanizmu u nedostatku CD8<sup>+</sup> stanica. Ovi rezultati jasno potvrđuju zapažanja iz pokusa s adoptivnim prijenosom limfocita T da postoje barem dva odvojena mehanizma nadzora u različitim organima (144, 147). Ono što su nam dodatno omogućili  $\beta 2m^{-/-}$  miševi je utvrđivanje uloge stanica NK i otkrivanje dodatnog efekorskog mehanizma koji je najizraženiji u slezeni.

Osim postojećih razlika u staničnim mehanizmima nadzora primarne virusne infekcije između heterozigota i homozigota, uočili smo i razlike u titru protuvirusnih protutijela. Naime, u homozigota smo našli osam puta manju koncentraciju protuvirusnih protutijela IgG izotipa, ali ne i IgM izotipa (slika 28A). Ove se razlike ne odnose samo na specifična protutijela, već su i konstitutivna karakteristika homozigota. Na slici 28B je prikazana razina protutijela u serumu neinficiranih homozigota kao postotak pojedinih razreda imunoglobulina u odnosu na razinu u heterozigota. Ovdje također možemo uočiti da je razina protutijela razreda IgM u homozigota jednaka onoj u heterozigota, dok je značajno smanjena razina imunoglobulina G (od 2 do 8 puta).

Da bismo ispitali i funkcijski značaj ovih razlika testirali smo neutralizacijski kapacitet seruma inficiranih homozigota i heterozigota *in vitro* i



**Slika 28. Smanjen humoralni odgovor na virusnu infekciju u  $\beta 2m^{-/-}$  miševa.** **A.** Usporedba specifičnog protuvirusnog odgovora IgG protutijelima između  $\beta 2m^{-/-}$  i  $\beta 2m^{+/+}$  miševa. Stupići prikazuju koncentraciju specifičnih protuvirusnih protutijela određenu u puliranim serumima  $\beta 2m^{+/+}$  ( $\square$ ) i  $\beta 2m^{-/-}$  ( $\bullet$ ) miševa. Protuvirusna protutijela su određena ELISA metodom. **B.** Usporedba normalne razine serumskih imunoglobulina između  $\beta 2m^{-/-}$  i  $\beta 2m^{+/+}$  miševa. Stupići prikazuju postotak normalnih serumskih imunoglobulina  $\beta 2m^{-/-}$  u odnosu na  $\beta 2m^{+/+}$  miševa. **C.** Smanjena sposobnost seruma  $\beta 2m^{-/-}$  miševa u neutralizaciji virusa *in vitro*. Usporedili smo neutralizacijsku sposobnost seruma inficiranih  $\beta 2m^{+/+}$  ( $\circ$ ) i  $\beta 2m^{-/-}$  ( $\bullet$ ) miševa. Smanjenje broja virusnih čistina za 50% u odnosu na maksimalnu vrijednost uzeli smo kao standardnu vrijednost za određivanje razlika u neutralizaciji virusa. Serume neinficiranih  $\beta 2m^{-/-}$  i  $\beta 2m^{+/+}$  smo koristili za kontrolu. **D.** Smanjena sposobnost seruma  $\beta 2m^{-/-}$  miševa u sprečavanju hematogenog širenja virusa. Serum inficiranih  $\beta 2m^{+/+}$  ( $\circ$ ) i  $\beta 2m^{-/-}$  ( $\bullet$ ) smo injicirali  $\gamma$ -ozračenim Balb/c miševima 2 h prije infekcije s  $10^5$  PFU MCMV. Prikazani su pojedinačni titrovi virusa i medijane vrijednosti (vodoravne crte). (RK) Razina virusa u kontrolnoj skupini miševa kojoj nismo injicirali serum. (RD) Razina detekcije virusa.

*in vivo*. Na slici 28C su pokazani rezultati neutralizacije virusa *in vitro* gdje se može uočiti da serum homozigota ima 4 - 8 puta manju sposobnost neutralizacije virusa. Osim toga, i protektivni kapacitet seruma homozigota testiranog *in vivo* je također značajno smanjen u odnosu na serum heterozigota (slika 28D)

#### 4.4.3.1. Smanjena otpornost $\beta 2m^{-/-}$ miševa na infekciju virulentnim virusom

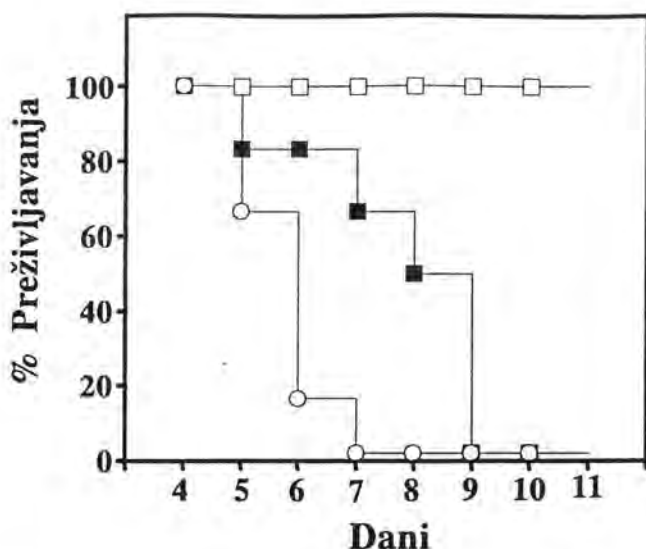
S obzirom da razvijeni nadomjesni imunološki mehanizmi u homozigota mogu učinkovito nadzirati infekciju s manje virulentnim MCMV, upitali smo se da li taj mehanizam može omogućiti preživljavanje životinja nakon infekcije s virulentnijim virusom. Grupe heterozigota i homozigota su inficirane različitim dozama virulentnog virusa izoliranog iz žlijezda slinovnica (SGV), a zatim je praćeno preživljavanje miševa. Rezultati prikazani u tablici 1. pokazuju znatno veću osjetljivost homozigota. Smrtonosna doza za polovinu miševa (LD50) je 5

Tablica 1. Smanjena otpornost  $\beta 2m^{-/-}$  miševa na infekciju virulentnim virusom

Infektivna doza SGV* (PFU)	Broj preživjelih/ ukupan broj miševa	
	$\beta 2m^{+/-}$	$\beta 2m^{-/-}$
$5 \times 10^4$	6/6	5/11
$1 \times 10^5$	5/6	0/6
$2 \times 10^5$	3/6	0/6
$4 \times 10^5$	1/6	0/6

\*Miševima smo injicirali navedene infektivne doze izolata virusa iz žlijezda slinovnica (SGV) intraperitonealno.

$\times 10^4$  u homozigota, dok je  $2 \times 10^5$  u heterozigota. Ovi rezultati pokazuju ograničenu mogućnost nadomjesnih mehanizama razvijenih u homozigota u nadzoru infekcije s virulentnim virusom. Premda je razlog za smanjenu otpornost  $\beta 2m^{-/-}$  miševa na infekciju sa SGV vjerojatno posljedica nedostatka  $CD8^+$  limfocita T, ne mogu se u potpunosti isključiti i druge nedostatnosti uočene u ovih miševa. Naime,  $\beta 2m^{-/-}$  miševi stvaraju normalan broj stanica NK koje, međutim, ne pokazuju citolitičnu aktivnost prema standardnim ciljnim stanicama (44). Osim toga, i konstitutivne razlike u proizvodnji imunoglobulina bi mogle imati određen utjecaj na smanjenu otpornost. Stoga, da bismo ispitali da li je zaista nedostatak  $CD8^+$  limfocita T odgovoran za



**Slika 29.** Smanjena otpornost  $\beta 2m^{-/-}$  miševa na infekciju virulentnim SGV je posljedica nedostatka  $CD8^{+}$  limfocita T.  $\beta 2m^{+/-}$  miševе (n=9) smo inficirali s 1/2 LD50 SGV, te im depletirali  $CD8^{+}$  limfocite T (○) ili injicirali s PBS (□). Skupinu  $\beta 2m^{-/-}$  miševa (n=9) smo inficirali s SGV i injicirali s PBS (□). Preživljavanje miševa smo pratili svakodnevno nakon infekcije.

smanjenu otpornost  $\beta 2m^{-/-}$  miševa pri infekciji s virulentnim SGV, heterozigote smo inficirali s 1/2 LD50 i uklonili im  $CD8^{+}$  limfocte T. Rezultati preživljavanja ove skupine miševa su uspoređeni s preživljavanjem homozigota inficiranih istom dozom virusa. Deplecijom  $CD8^{+}$  limfocita T smo znatno smanjili otpornost heterozigota na virulentniji virus, što je rezultiralo sličnom kinetikom preživljavanja kao u homozigota (slika 29.). Kontrolna skupina heterozigota, koju nismo depletirali, je u potpunosti preživjela ovu infekciju.

#### 4.4.4. Mehanizmi nadzora latentne infekcije u $\beta 2m^{-/-}$ miševa

##### 4.4.4.1. Izostanak reaktivacije virusa u $\beta 2m^{-/-}$ nakon imunodeplecije

Uspostava latentne infekcije u homozigota, unatoč drukčijim mehanizmima nadzora primarne infekcije, nametnula je pitanje da li postoje razlike u nadzoru rekurentne infekcije. S obzirom na postojanje protuvirusnih protutijela koja ometaju detekciju virusa u ispitivanih miševa, primjenili smo kompletan protokol imunodeplecije kako bismo ipak uspjeli otkriti rekurentni

viurs. Latentno inficirane homozigote i heterozigote (12 tj. p.i.) smo ozračili  $\gamma$  izvorom, depletirali mješavinom protutijela ( $\alpha$ CD4,  $\alpha$ CD8 i  $\alpha$  NK1.1), te tretirali hidrokortizonom. Miševе smo žrtvovali nakon 2 tjedna od imunodeplecije, a virus smo odredili u homogenatima žlijezda slinovnica, pluća i slezene. U tablici 2. je prikazan broj reaktiviranih miševa u odnosu na tretirane. Uočljivo je da unatoč primjene protokola neselektivne imunodeplecije gotovo nismo uspjeli utvrditi rekurentni virus u homozigota, za razliku od heterozigota gdje smo utvrdili virus u oko 50% životinja. U nekoliko homozigotnih životinja virus je ipak utvrđen, ali samo u žlijezdama

**Tablica 2. Pojava rekurentne infekcije u  $\beta 2m^{+/-}$  i  $\beta 2m^{-/-}$  miševa nakon primjene neselektivnog protokola imunodeplecije**

Imunodeplecija		Rekur. inf. ukupno*	Rekurentna infekcija po organima**		
Trajanje	Miševi	Svi organi	Ž. S.	Pluća	Slezena
2 tjedna	$\beta 2m^{+/-}$	16/28	4/28	14/28	3/28
	$\beta 2m^{-/-}$	3/30	0/30	0/30	3/30
4 tjedna	$\beta 2m^{-/-}$	0/7	0/7	0/7	0/7

\*Prikazan je broj miševa u kojima je detektiran rekurentni virus u odnosu na broj testiranih miševa

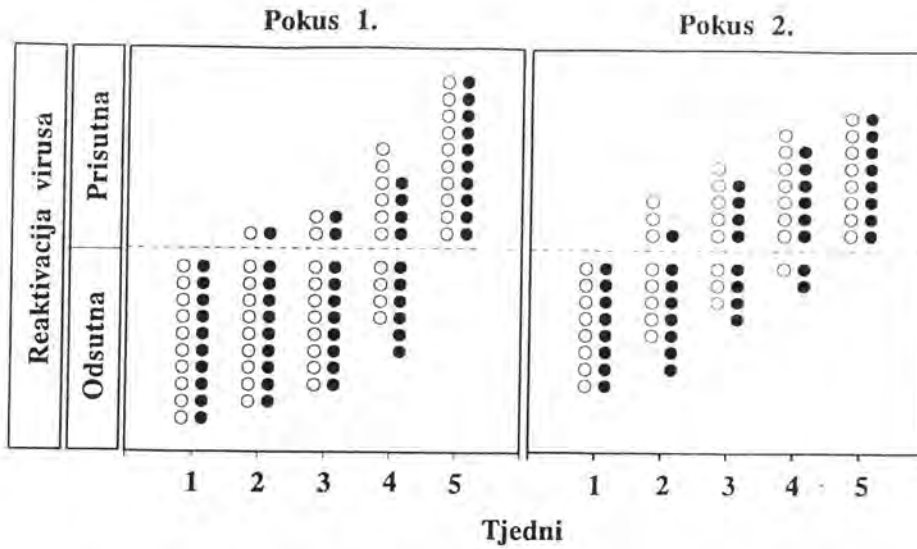
\*\*Prikazan je broj organa u kojima je detektiran rekurentni virus u odnosu na broj testiranih organa

slinovnicama.

#### 4.4.4.2. Reaktivacija virusa kokultivacijom explanta slezene $\beta 2m^{-/-}$ miševa *in vitro*

Da bismo utvrdili nazočnost latentnog virusa u  $\beta 2m^{-/-}$  miševa, nakon primjene imunodeplecijskog protokola smo kokultivirali eksplant slezene ovih životinja sa stanicama mišjih fibroblasta (MEF) u dugotrajnoj kulturi *in vitro*. Nadtaloge kultura smo spremali dva puta tjedno, i zatim ih testirali na prisutnost virusa. Rezultati ovoga pokusa su prikazani na slici 30. Unatoč nemogućnosti reaktivacije virusa *in vivo*, uočljivo je da smo nakon 3-5 tjedana





Slika 30. Podjednaka učestalost pojave rekurentnog virusa u kokultivaciji explanta slezene  $\beta 2m^{-/-}$  i  $\beta 2m^{+/-}$  miševa *in vitro*. Slezene prikupljene iz latentno inficiranih  $\beta 2m^{-/-}$  (•) i  $\beta 2m^{+/-}$  (o) miševa smo pojedinačno usitnili i kokultivirali s mišjim fibroblastima. Supernatante kultura smo prikupljali dva puta tjedno. Prikazana je pojedinačna pojava rekurentnog virusa u kulturi (simboli) u određenom vremenskom razdoblju nakon infekcije.

kokultivacije uspješni detektirati virus u svim testiranim organima. Ovi rezultati potvrđuju prisutnost latentnog virusnog genoma i ukazuju na osobit način nadzora rekurentne infekcije u homozigota

## 5. RASPRAVA

Subklinički tijek primarne infekcije i uspostava latencije su temeljna obilježja infekcije s citomegalovirusima. Reaktivacija latentnog virusnog genoma, u uvjetima narušenog imunološkog nadzora, uzrokuje pojavu rekurentne infekcije i simptoma bolesti. Rekurentna se infekcija u imunosuprimiranih domaćina događa usprkos nazočnosti protuvirusnih protutijela, što ukazuje na presudnu ulogu mehanizama stanične imunosti u nadzoru rekurentnog virusa (130, 163). No, točna uloga pojedinih staničnih mehanizama do sada nije utvrđena. Razlog tome je nedovoljna osjetljivost postojećih modela i testova za utvrđivanje rekurentnog virusa u tkivima zbog neutralizacijskog učinka nazočnih protutijela. S obzirom da su simptomi i posljedice CMV bolesti česta pojava u imunosuprimiranih bolesnika, poznavanje uloge pojedinih staničnih mehanizama nadzora je od posebnog značaja za odgovarajuću prilagodbu imunosupresivne terapije, ali i za nove pristupe u prevenciji i liječenju CMV bolesti prijenosom imunih stanica.

Uporabom miševa s nedostatkom limfocita B i imunoglobulina mogli smo po prvi puta točno odrediti ulogu pojedinih stanica i citokina, ali i protutijela, u nadzoru rekurentne infekcije. Premda mehanizmi stanične imunosti imaju glavnu ulogu u nadzoru infekcije, s postojećim je modelima bilo nemoguće precizno razlučiti ulogu pojedinih staničnih mehanizama od uloge protutijela. Stoga su se miševi s nedostatkom protutijela pokazali kao pogodan i vrlo osjetljiv model za izolirano izučavanje pojedinih mehanizama stanične imunosti i njihovog značaja u nadzoru infekcije *in vivo*. Ovaj model nam je podjednako tako omogućio utvrđivanje stvarne uloge protuvirusnih protutijela u kontroli virusne infekcije. Tijekom ovih istraživanja došli smo do nekoliko glavnih zaključaka. (A) Latencija je stanje potpunog izostanka produktivne infekcije, a rizik od pojave rekurentnog virusa ovisi isključivo o

stećenim nedostatnostima mehanizama stanične imunosti. (B) Protutijela nisu od presudne važnosti za nadzor primarne infekcije i uspostavu latencije, ali ograničavaju širenje rekurentnog virusa. (C) Imunološki sustav pokazuje izuzetnu mogućnost prilagodbe i učinkovito nadomješta nedostatak pojedinog mehanizma stanične imunosti u nadzoru rekurentne infekcije. (D)  $CD8^+$  limfociti T mogu samostalno nadzirati rekurentnu infekciju u svim testiranim organima (E) Stanice NK sudjeluju u nadzoru rekurentne infekcije u svim organima, a njihova uloga je, osim u slezeni, ovisna o  $CD4^+$  limfocitima T. (F)  $IFN\gamma$  je ključni citokin uključen u nadzor rekurentne infekcije.

Već dulje vrijeme se vode rasprave u smislu da li je CMV latencija potpuni izostanak produktivne infekcije virusa (molekulska latencija) ili je to produktivna infekcija niskog intenziteta (mikroperzistencija)? S obzirom da definiranje latencije isključivo ovisi o osjetljivosti testova za detekciju virusa *in vivo*, dvojba je nastala kao posljedica postojanja testova različite i nedovoljne osjetljivosti (151, 163). Osim toga, nalaz transkripcijske aktivnosti virusnih gena  $\alpha$  i  $\beta$  razdoblja tijekom latencije pobudio je sumnju u postojanje stalne produktivne infekcije niske razine (79, 228). Naši rezultati pokazuju da neutralizacijska protutijela mogu smanjiti osjetljivost testa za detekciju virusa za  $10^2$  do  $10^3$  puta, što potvrđuje opravdanost sumnji u nedovoljnu osjetljivost dosadašnjih sustava. S obzirom da prijenosom krvi i homogenata organa latentno inficiranih  $\mu$ MT/ $\mu$ MT miševa u singenične C57BL/6 primatelje nismo mogli utvrditi nazočnost infektivnog virusa, to govori protiv postojanja produktivne infekcije tijekom latencije. Naime, osjetljivost ovoga testa je vrlo visoka i svedena je na najmanju infektivnu jedinicu *in vivo* (0,1 PFU), te je stoga isključena mogućnost nazočnosti infektivnog virusa u testiranim organima. Slično našim rezultatima, prijenos homogenata organa latentno inficiranih miševa u imunoneдостатне SCID miševе nije rezultirao pojavom infektivnog virusa *in vivo* (151). Međutim, osjetljivost ovoga testa je više od 100 puta manja od našega, jer prijenos tek 10 do 25 PFU virusa pomiješanog s

homogenatima organa seropozitivnih miševa omogućuje detekciju virusa u organima većine injiciranih SCID miševa. Razlog za manju osjetljivost ovoga testa treba tražiti u neutralizacijskom učinku protutijela nazočnih u prenijetim homogenatima. Osim navedenog, protiv nazočnosti mikroperzistentne infekcije ukazuje i nalaz stalnog smanjenja broja krvnih stanica koje nose latentni virusni genom (4). S obzirom na stalnu recirkulaciju ovih stanica između krvi i tkiva, za pretpostaviti je da bi nazočnost perzistentne infekcije održavala stalnu razinu stanica koje nose virusnu DNA.

Rezultati naših istraživanja pokazuju da odsustvo protutijela ne utječe bitno na tijek primarne infekcije i uspostavu latencije u domaćina s očuvanom staničnom imunošću, ali može ograničiti širenje rekurentnog virusa. Zanimljiva uloga protutijela u primarnoj infekciji je posljedica širenja virusa na početku infekcije u uvjetima nedostatka protuvirusnih protutijela. Jednom inficirane stanice su tada podložne pretežno staničnim mehanizmima nadzora. Učinkovit nadzor primarne infekcije i u slučaju nedostatka glavnog efekorskog mehanizma posredovanog  $CD8^+$  limfocitima T u potpunosti odbacuje ranije pretpostavljenu mogućnost da je nadomjesni mehanizam nadzora koji je ovisan o  $CD4^+$  limfocitima T posredovan protutijelima (92). S druge strane, u rekurentnoj infekciji situacija je obrnuta. Rekurentna infekcija počinje žarišnom reaktivacijom virusa pri čemu je širenje početno malog broja viriona presudno za razvoj infekcije i stoga je izuzetno podložno neutralizacijskom učinku protutijela. No, razvoj simptoma bolesti, usprkos nazočnosti razmjerno visokog titra neutralizacijskih protutijela, pokazuje da protutijela ne mogu u potpunosti spriječiti širenje virusa. S obzirom da su neutralizacijska protutijela vrlo učinkovita u neutralizaciji slobodnog virusa, što pokazuju pokusi neutralizacije *in vitro*, ograničena uloga protutijela u CMV infekciji može se objasniti njihovom neučinkovitošću u nadzoru unutarstaničnog virusa. Naime, širenje virusa se, osim putem tjelesnih tekućina, odvija i neposrednim međustaničnim prijenosom. Pritom važnu ulogu ima virusni glikoprotein B koji omogućava

stapanje membrana inficiranih i neinficiranih stanica (137). Premda imunološki sustav posjeduje mehanizme za uklanjanje inficiranih stanica s pomoću protutijela koja prepoznaju glikoproteine virusnog podrijetla na površini stanice, očito je da to u potpunosti ne vrijedi za CMV i ukazuje na to da su mehanizmi citotoksičnosti ovisne o protutijelima na neki način onemogućeni. Neučinkovitost protutijela u nadzoru unutarstaničnog virusa može biti posljedica pojave virusnog proteina na površini stanice što pokazuje svojstva Fc receptora za imunoglobuline G (179). Ovaj bi glikoprotein, prema predloženom modelu za sličan protein HSV, mogao vezanjem protutijela onemogućiti učinkovito djelovanje mehanizama citotoksičnosti posredovane protutijelima (49).

Pojava rekurentne infekcije nakon uklanjanja staničnih mehanizama ukazuje da se reaktivacija latentnog virusnog genoma događa spontano, i potvrđuje raniju pretpostavku da je reaktivacija latentnog virusnog genoma spontan i nasumičan događaj (4, 163). Ovu činjenicu podupire i nalaz ograničene transkripcijske aktivnosti virusnih gena  $\alpha$  i  $\beta$  razdoblja tijekom latencije (79, 228). Razmjerno mali udio životinja u kojima je utvrđena rekurentna infekcija nakon 3 do 5 dana poslije deplecije stanica, s obzirom na duljinu trajanja virusnog ciklusa (oko 24 h *in vitro*), ukazuje na malu učestalost spontanih reaktivacija tijekom latencije. Premda je ranije pokazano na soju miševa Balb/c da je nazočnost latentnog virusnog genoma u plućima najveća, te da ona predstavljaju mjesto najvećeg rizika za pojavu rekurentne infekcije, mi nismo uočili razliku u učestalosti pojavljivanja rekurentne infekcije u plućima u odnosu na druge organe (4, 163). Osim toga, rezultati selektivne deplecije limfocitnih podvrsta pokazuju da je rizik od nastanka rekurentne infekcije isključivo posljedica nedostatka pojedinih mehanizama stanične imunosti, a ne nazočnosti latentnog virusnog genoma u tkivima. Ovdje ne treba zanemariti niti mogućnost da je reaktivacija latentnog virusa potaknuta određenim čimbenicima koji su se mogli osloboditi prilikom



deplecije stanica ili injiciranja protutijela stranoga podrijetla u našim pokusima. Ipak, različita pojava rekurentne infekcije u zavisnosti od kombinacije depletiranih podvrsta limfocita T i stanica NK, govori protiv ove mogućnosti.

Premda pojedinačni nedostatak bilo koje podvrste limfocita T ili stanica NK može biti potpuno nadomješten, njihove se uloge u nadzoru rekurentne infekcije razlikuju. Sposobnost CD8<sup>+</sup> limfocita T da samostalno nadziru rekurentnu infekciju pokazuje važnost i moć ovoga mehanizma, što nije i neočekivano, s obzirom da je to glavni efektorski mehanizam nadzora primarne infekcije (164, 165, 166, 167). Ovaj nalaz može objasniti i dobre kliničke rezultate prijenosa specifičnih klonova CD8<sup>+</sup> limfocita T u pokušaju prevencije i liječenja rekurentne CMV infekcije u bolesnika s presadenom koštanom srži (171, 211). Nadzor rekurentne infekcije CD8<sup>+</sup> limfocitima T je dobrim dijelom posredovan s IFN $\gamma$ , slično kao i u kontroli primarne infekcije (102). S obzirom na razmjerno malu učestalost spontanih reaktivacija i nazočnost virusnih antigena, imunosubverzivni mehanizmi virusa bi ovdje mogli doći do punog izražaja. Naime, tijekom  $\beta$  razdoblja virusnog ciklusa se pojavljuju virusni proteini koji ometaju prezentaciju antigena putem MHC molekula razreda I, što može biti uzrokom neučinkovitog neposrednog nadzora CD8<sup>+</sup> limfocitima T (42, 205). Međutim, ovi imunosubverzivni učinci virusa se mogu spriječiti učincima IFN $\gamma$ , pa bi se time mogla objasniti ovisnost mehanizma nadzora posredovanog CD8<sup>+</sup> limfocitima T (76). To je posebice izraženo u uvjetima gdje postoji velika učestalost specifičnih efektorskih stanica, a širenje virusa je usporeno, baš kao kod rekurentne infekcije. S druge strane, ukoliko uzmemo u obzir da je reaktivacija virusa spontan i nasumičan događaj, citolitičko uklanjanje stanica u kojima je ciklus umnažanja virusa u začetku ( $\alpha$  i  $\beta$  razdoblje) bi doveo do smanjenja broja stanica koje su nositelji latentnog virusnog genoma i njihovog potpunog nestanka s vremenom. No, izgleda da to ipak nije slučaj s obzirom na mogućnost reaktivacije virusa i nakon dugotrajne latencije (163). Stoga je jedna od

mogućnosti i necitolitički nadzor latentnog virusnog genoma koji je posredovan citokinima. Može se pretpostaviti da je prezentacija virusnih antigena nedovoljna za oslobađanje citolitičkog potencijala stanice, ali se prilikom reaktivacije virusnog genoma potiče aktivnost određenih čimbenika u inficiranoj stanici, poput IL-1 $\beta$  i IL-12, što mogu potaknuti lučenje IFN $\gamma$  u limfocitima (85, 141). Pokazano je da IFN $\gamma$  može djelovati neposredno inhibicijski na ciklus umnažanja virusa (116). Ovaj citokin to postiže ometanjem prepisivanja kasnih virusnih gena i oblikovanje potpunih viriona u uvjetima *in vitro* (116). O mogućoj učinkovitosti necitolitičnog nadzora posredovanog CD8<sup>+</sup> limfocitima T govori podatak da ove stanice i u nedostatku citolitičke molekule perforin mogu učinkovito nadzirati infekcije s virusom vakcinije, vezikularnog stomatitisa i influence (48). Osim toga, na miševima transgeničnim za površinski antigen virusa hepatitisa B (HBV) je pokazano da necitolitičko sučeljavanje CD8<sup>+</sup> limfocita T sa stanicama jetre koje imaju ovaj gen rezultira smanjenjem njegove aktivnosti (72). Regulacija staničnih gena s pomoću CD8<sup>+</sup> limfocita T, pa tako i latentnog virusnog genoma, bi mogla biti od važnosti za održanje latencije.

Imunološki nadzor rekurentne infekcije u žlijezdama slinovnicama je uglavnom posredovan CD8<sup>+</sup> limfocitima T, za razliku od nadzora tijekom primarne infekcije (91). Tkivna raspodjela CMV u najranijim razdobljima primarne infekcije žlijezda slinovnica nije precizno utvrđena, dok je kasnije produktivna infekcija uglavnom vezana uz acinusne epitelne stanice, koje ne mogu nadzirati CD8<sup>+</sup> limfociti T. Stoga je jednostavno objašnjenje za opažene razlike da acinusne epitelne stanice nisu izvor rekurentnog virusa. To potvrđuju i histokemijski nalazi. Naime, rekurentni virus se može utvrditi u potpornim, ali ne i u epitelnim, stanicama žlijezda slinovnica. Izostanak pojave rekurentnog virusa u epitelnim žlijezdanim stanicama može se objasniti time da inficirane stanice s vremenom propadaju tijekom ciklusa obnove, a njihovo mjesto zauzimaju nove, neinficirane stanice. Imunološki sustav bi pritom imao

ulogu da ograniči širenje virusa do susjednih epitelnih stanica, što smo i pokazali deplecijom CD4<sup>+</sup> limfocita T i stanica NK koja dovodi do perzistentne infekcije u ovom organu. Propadanje inficiranih epitelnih stanica može objasniti i nesrazmjer između visoke razine umnažanja virusa u žlijezdama slinovnicama tijekom primarne infekcije i nalaza razmjerno malog broja kopija latentnog virusnog genoma u ovom organu (163). S obzirom na navedeno, žlijezdane epitelne stanice su samo prolazno mjesto produktivne infekcije i nisu izvor rekurentnog virusa. One se vjerojatno inficiraju prilikom hematogenog širenja virusa i postaju izvor za njegovo horizontalno širenje.

Ograničena uloga stanica NK u nadzoru rekurentne infekcije u plućima i žlijezdama slinovnicama ukazuje na ovisnost njihove uloge o CD4<sup>+</sup> limfocitima T. Slična međuovisnost CD4<sup>+</sup> limfocita T i stanica NK uočena je i u primarnoj infekciji, posebice u žlijezdama slinovnicama gdje je to glavni mehanizam nadzora perzistentne infekcije žlijezdanih epitelnih stanica (91, 92). S obzirom da je učinak stanica NK uglavnom ovisan o IFN $\gamma$ , potpora CD4<sup>+</sup> limfocita je potrebna ovim stanicama za održavanje stvaranja ovoga citokina, ali i njihove citotoksične aktivnosti. Izgleda da su stanice NK glavni efektori u ovom mehanizmu, s obzirom na potpnu neučinkovitost samih CD4<sup>+</sup> limfocita T u nadzoru rekurentne infekcije. Ograničena samostalna uloga stanica NK u plućima objašnjava česte simptome CMV bolesti u bolesnika s presađenim stanicama koštane srži kojima su uklonjeni limfociti T u svrhu prevencije reakcije "transplantata protiv primatelja" (GVHD) (81). U tih je bolesnika je učestala i dominantna pojava intersticijske pneumonije, što nije primjećeno u skupini bolesnika koji su imunodepletirani istovremenom primjenom ciklosporina A i metotreksata (81). Međutim, češća pojava GVHD u bolesnika podvrgnutih ovom kemoterapeutskom protokolu ukazuje na nepotpunu depleciju limfocita T, što objašnjava malu incidenciju CMV bolesti u tih bolesnika. S druge strane, odsutnost rekurentne infekcije u slezeni je odraz nadzora posredovanog stanicama NK koji nije ovisan o CD4<sup>+</sup>

limfocitima T. Ovaj mehanizam je, također, ovisan o  $IFN\gamma$ . Pokusi na SCID miševima pokazuju da se aktivnost ovih stanica može potaknuti i bez nazočnosti limfocita T i B (85, 141). Naime, IL-1 $\beta$  i IL-12 su citokini koji mogu potaknuti ove stanice na lučenje  $IFN\gamma$  u ovih stanica (85, 141). Također, slično je pokazano i za  $TNF\alpha$ , uz nazočnost parazitarnog antigena i antigen prezentirajućih stanica slezene SCID miševa (207, 219). No, rezultati neutralizacije  $TNF\alpha$  govore protiv njegove presudne uloge u poticanju aktivnosti stanica NK u slezeni. Osim toga, specifična uloga stanica NK u slezeni može biti posljedica i drugačijeg načina nadzora virusnog ciklusa u ovom organu, s obzirom na uočenu specifičnu povezanost aktivnosti ovih stanica uz ekspresiju *Cmv-1* lokusa u slezeni miševa (178).

Sudjelovanje stanica NK u nadzoru rekurentnog virusa baca novo svjetlo na sveukupnu njihovu ulogu u nadzoru CMV infekcije. Dosada je pokazana važna uloga ovih stanica u nadzoru virusa tijekom početnog razdoblja primarne infekcije (22, 23, 85, 218). Naime, sa sazrijevanjem limfocita T tijekom infekcije dolazi do opadanja aktivnosti stanica NK (201). Stoga je pretpostavljeno da su one, kao nositelji prirodene imunosti, prva linija obrane od infekcije, prije sazrijevanja i uspostave nadzora posredovanog limfocitima T. No, uključenost stanica NK u mehanizme nadzora rekurentne infekcije ukazuje na sasvim drukčiju ulogu ovih stanica u nadzoru CMV infekcije od pretpostavljene.

Izostanak pojave rekurentnog virusa u uvjetima deplecije  $TNF\alpha$ , pokazuje da ovaj citokin ne igra važnu ulogu u nadzoru latencije u ispitivanim uvjetima, što se razlikuje od njegove uloge u nadzoru primarne infekcije (146). Poznato je da  $TNF\alpha$  pojačava inhibicijski učinak  $IFN\gamma$  na ciklus umnažanja virusa, premda on sam nema izraženu spomenutu aktivnost (116). Stvaranje  $TNF\alpha$  potiču i virusni geni  $\alpha$  razdoblja, što je utvrđeno u monocitnoj staničnoj liniji THP-1 inficiranoj s HCMV (61). Slično je utvrđeno i u različitim stanicama inficiranim sa štakorskim CMV (73). Stoga, naši



rezultati ne isključuju mogućnost da  $\text{TNF}\alpha$ , stvoren prilikom reaktivacije latentnog virusnog genoma, polučuje zajedničke učinke s  $\text{IFN}\gamma$  u regulaciji virusnog ciklusa. S druge strane, postoje podaci koji ukazuju i na aktivacijski učinak  $\text{TNF}\alpha$ . Pokazano je da  $\text{TNF}\alpha$ , preko svojih receptora (p55 i p75), potiče stvaranje transaktivacijskog čimbenika  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  u stanici (107, 148). Utvrđeno je da se ovaj čimbenik veže na specifično mjesto u promotoru  $\alpha$  gena CMV čime potiče njihovu aktivnost (128). Uočena je, također, povezanost pojave rekurentne infekcije i bolesti s porastom koncentracije  $\text{TNF}\alpha$  u serumu (47). Naši rezultati, međutim, govore protiv presudne aktivacijske uloge  $\text{TNF}\alpha$ . Naime, istovremenom neutralizacijom  $\text{IFN}\gamma$  i  $\text{TNF}\alpha$ , u nedostatku  $\text{CD8}^+$  limfocita T, smo izazvali pojavu rekurentne infekcije kao i neutralizacijom samoga  $\text{IFN}\gamma$ . S obzirom da iz navedenih činjenica proizlazi da  $\text{TNF}\alpha$  može ostvarivati i aktivacijske i inhibicijske učinke, krajnji učinak ovoga citokina bi mogao ovisiti o nazočnosti  $\text{IFN}\gamma$ . Naime, unatoč tome što  $\text{TNF}\alpha$  može aktivirati virusne gene  $\alpha$  razdoblja, njegovo sinergističko inhibicijsko djelovanje s  $\text{IFN}\gamma$  na izražavanje kasnih virusnih gena bi moglo biti presudno u zaustavljanju virusnog ciklusa, a time i produktivne infekcije.

### **Imunološki nadzor CMV infekcije u miševa s nedostatkom MHC molekula razreda I**

MHC molekule razreda I imaju središnju ulogu u nadzoru CMV infekcije. Glavni mehanizam nadzora, posredovan  $\text{CD8}^+$  limfocitima T, je spregnut s prepoznavanjem MHC molekula razreda I i prerađenih virusnih antigena. No, u nedostatku glavnoga mehanizma uspostavlja se nadomjesni mehanizam, ovisan o  $\text{CD4}^+$  limfocitima T, koji učinkovito preuzima nadzor nad infekcijom (92). Razvoj ovoga mehanizma upućuje na izuzetnu sposobnost prilagodbe imunološkog sustava i postojanje najmanje dva alternativna mehanizma nadzora CMV infekcije. No, do sada nije u potpunosti poznato koji čimbenici i u kojoj mjeri mogu nadomjestiti nedostatak  $\text{CD8}^+$  limfocita



T. Stoga su nam miševi s mutiranim genom za  $\beta 2$  mikroglobulin ( $\beta 2m^{-/-}$ ), u kojih posljedično postoji nedostatak MHC molekula razreda I i  $CD8^{+}$  limfocita T, poslužili kao pogodan model za izučavanje nadomjesnog nadzornog mehanizma (229, 230). Naime, u ovih su miševa prirodno i u punoj mjeri razvijeni imunološki mehanizmi koji nisu spregnuti s MHC molekulama razreda I, što predstavlja prednost u odnosu na postojeće modele. Rezultati ove studije ukazuju na važnu, ali ipak ograničenu sposobnost nadomjesnog mehanizma u kontroli virusne infekcije, te potvrđuju nezamjenjivu ulogu  $CD8^{+}$  limfocita T za preživljavanje akutne infekcije s virulentnim virusom. Slični rezultati su dobiveni u infekciji ovih miševa s virulentnim sojevima virusa influenze (10, 53). Visokoj osjetljivosti  $\beta 2m^{-/-}$  miševa prema virulentim virusima može doprinijeti i prirodna slabost u proizvodnji protutijela. No, s obzirom da  $\mu MT/\mu MT$  miševi ne pokazuju sličnu osjetljivost na infekciju, unatoč potpunog nedostatka limfocita B i imunoglobulina, ova se pretpostavka ne čini vjerojatnom. Isto tako i nedostatak citotoksične funkcije stanica NK u ovih miševa može biti razlogom povećane osjetljivosti, premda one učinkovito sudjeluju u nadzoru manje virulentnog virusa. No, rezultati deplecije  $CD8^{+}$  limfocita T u  $\beta 2m^{+/-}$  miševa pokazuju da je nedostatak ovih stanica glavni razlog za spomenutu osjetljivost  $\beta 2m^{-/-}$  miševa.

Nedavno je utvrđeno da uvjeti nadzora primarne infekcije određuju prisutnost latentnog virusnog genoma u tkivima (163). Stoga smo željeli ispitati da li postoje razlike u uspostavi i nadzoru latentne infekcije u uvjetima razvijenog nadomjesnog imunološkog mehanizma i nedostatka MHC molekula razreda I. Podjednaka brzina odstranjivanja virusa, te mogućnost reaktivacije latentnog virusnog genoma nakon kokultivacije tkiva s permisivnim stanicama *in vitro* ukazuje na činjenicu da se u  $\beta 2m^{-/-}$  miševa uspostavlja latentna infekcija kao i u odgovarajućih heterozigota. No, uočene razlike u reaktivaciji virusa *in vivo* između latentno inficiranih  $\beta 2m^{-/-}$  miševa i odgovarajućih heterozigota ukazuju na različite mehanizme nadzora latentne infekcije. Razlozi

za uočene razlike u reaktivaciji virusa mogli bi se objasniti razvojem različitih nadomjesnih mehanizama, u nedostatku CD8<sup>+</sup> limfocita T, koji su rezistentni na primjenu imunodeplecijskog protokola, ili je u pitanju osobit tip stanica koji je nosilac latentne infekcije. U  $\beta 2m^{-/-}$  miševa je uočena normalna razina CD8<sup>-</sup> TCR $\gamma\delta^{+}$  limfocita T koji bi mogli sudjelovati u nadzoru latentnog virusa (36). S druge strane nedostatka MHC molekula razreda I, ukoliko pretpostavimo da one sudjeluju kao koreceptori za virus, mogao bi uvjetovati infekciju osobitih tipova stanica u kojima je drugačije kontroliran ciklus umnažanja virusa.

Odredena zapažanja ukazuju na moguću receptorsku ulogu MHC molekule razreda I u virusnoj infekciji (154, 155, 222). Naime, u tegumentu mišjeg i humanog CMV je pronađen  $\beta 2m$ , što ukazuje na mogućnost da ovaj protein vezanjem za membranske MHC molekule razreda I ima važnu ulogu pri infekciji stanice. Međutim, nema jasnih dokaza da  $\beta 2m$  neposredno sudjeluje u postupku infekcije, ali je uočeno da infekcija pojedinih staničnih linija ovisi o alelskom tipu i stabilnoj konformaciji MHC molekula razreda I na površini stanice. Pretpostavlja se da bi uloga  $\beta 2m$  bila upravo u stabilizaciji prostorne strukture ovih molekula na površini stanice, što bi pogodovalo virusnoj infekciji. Stoga smo ulogu stabilno eksprimiranih MHC molekula razreda I u infekciji s MCMV ispitali na modelu  $\beta 2m^{-/-}$  miševa koji zbog nedostatka  $\beta 2$  mikroglobulina nemaju nazočne ove molekule na površini stanica (229, 230). Naši rezultati govore protiv receptorske uloge MHC molekula razreda I za CMV u uvjetima *in vitro* i *in vivo*. Postojanje staničnih linija koje mogu biti inficirane unatoč nedostatku MHC molekula razreda I je u skladu s našim opažanjima (222). Rezultati dobiveni na staničnoj liniji RIE.TL 8X.1, u koje je mutiran gen za  $\beta 2m$ , pokazuju da ova linija može biti inficirana, premda je manje osjetljiva na infekciju u odnosu na roditeljsku staničnu liniju R1.1 (222). S obzirom da se u slučaju R1.1 stanica radi o homogenoj populaciji stanica, za razliku od fibroblasta, postoji mogućnost da u

nedostatku glavnog virusnog receptora (mutacija), MHC molekule razreda I mogu predstavljati pomoćni mehanizam ulaska virusa u stanicu. Drugo objašnjenje je da virus koristi slobodne teške lance MHC molekula razreda I na površini stanice kao svoje receptore. S obzirom na nedostatak  $\beta 2m$  u RIE.TL.8X.1. stanica, za očekivati je da ova linija ima znatno manju nazočnost slobodnih teških lanaca na površini od roditeljske. Naime, slobodni teški lanci na površini stanica nastaju prirodnim razdruživanjem već postojećih heterodimera MHC molekula razreda I na površini stanica, a uvjet za njihov prijenos do stanične membrane je stvaranje pravilno oblikovanih kompleksa u ER, čemu značajno doprinosi  $\beta 2m$  (174, 220). Međutim, nemogućnost infekcije stanične linije RMA-S govori protiv receptorske uloge slobodnih teških lanaca. Naime, ove stanice imaju mutaciju gena za molekulu koja sudjeluje u transportu peptida u ER (TAP-1), pa se u nedostatku peptida stvaraju prilično nestabilni kompleksi između teških lanaca MHC molekula razreda I i  $\beta 2m$  koji dospijevaju na površinu, poslije čega se u fiziološkim uvjetima ( $37^{\circ}\text{C}$ ) ubrzo razdružuju (114). Unatoč nazočnosti slobodnih teških lanaca na površini RMA-S stanica, one su otporne na infekciju (222).

Uloga izvanstaničnog  $\beta 2m$  pri infekciji s MCMV je također razmotrena u ovom radu. Naime, postoje podaci da dodatak  $\beta 2m$  u kulturu stanica povećava učinkovitost infekcije (221). No, naši rezultati govore protiv ovakve uloge  $\beta 2m$ , jer nismo uočili razliku u produktivnosti virusa u uvjetima bez  $\beta 2m$  u odnosu na normalno prisutni  $\beta 2m$  u kulturi.

## 6. ZAKLJUČNI PREGLED

- Latencija je stanje potpunog izostanka produktivne infekcije.
- Protutijela nisu neophodna za nadzor primarne infekcije s CMV i uspostavu latencije.
- Protutijela ne mogu spriječiti pojavu rekurentnog virusa, ali mogu ograničiti njegovo širenje.
- Reaktivacija latentnog virusnog genoma je spontan i slučajan događaj, a rizik od pojave rekurentnog virusa ovisi o stupnju narušenosti mehanizama stanične imunosti.
- Pojedinačno uklanjanje podvsta limfocita T i stanica NK ne narušava nadzor rekurentnog virusa, što ukazuje na izuzetnu sposobnost prilagodbe imunološkog sustava.
- $CD8^+$  limfociti T mogu samostalno nadzirati rekurentni virus u svim organima.
- Stanice NK sudjeluju u nadzoru rekurentnog virusa u svim organima, a njihova uloga je, osim u slezeni, ovisna o  $CD4^+$  limfocitima T.
- $CD4^+$  limfociti T ne mogu samostalno nadzirati rekurentni virus ni u jednom organu.
- $IFN\gamma$  je ključni citokin uključen u nadzor rekurentnog virusa.
- Epitelne stanice acinusa žlijezda slinovnica nisu izvor rekurentnog virusa

## Nadzor infekcije u uvjetima nedostatka MHC molekula razreda I

- Nazočnost MHC molekula razreda I na površini stanica nije neophodna za infekciju s CMV *in vivo* i *in vitro*
- Prirodno razvijen nadomjesni mehanizam imunološkog nadzora ovisan o CD4<sup>+</sup> limfocitima T u  $\beta 2m^{-/-}$  miševa ima ograničenu sposobnost nadzora infekcije s virulentnim virusom
- Stanice NK, u suradnji s CD4<sup>+</sup> limfocitima T, učinkovito nadziru viursnu infekciju unatoč nedostatnoj citotoksičnoj funkciji.
- $\beta 2m^{-/-}$  miševi imaju prirodno nižu razinu imunoglobulina G u odnosu na heterozigote (4 do 8 puta), a također, u istom omjeru je niža razina i specifičnih protutijela
- Nemogućnost poticanja rekurentne infekcije imunodeplecijom  $\beta 2m^{-/-}$  miševa, unatoč mogućnosti reaktivacija virusa u eksplantima slezena istih životinja *in vitro*, ukazuje na osobite mehanizme nadzora rekurentne infekcije u ovih miševa



## 7. LITERATURA

1. Adlish J.D., Lahijani R.S. and Jeor S.C.S. (1990) Identification of a putative cell receptor for human cytomegalovirus. *Virology* 176:337-345
2. Alford C.A. and Britt W. J. (1990) Cytomegalovirus. In: *Virology*, ed. Fields B.N. and Knipe D.M., Raven Press, New York p 1981-2010
3. Apasov S. and Sitkovsky M. (1993) Highly lytic CD8<sup>+</sup>,  $\alpha\beta$  T-cell receptor cytotoxic T cells with major histocompatibility complex (MHC) class antigen-directed cytotoxicity in  $\beta$ 2-microglobulin, MHC class I-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2837-2841
4. Balthesen M., Messerle M. and M.J. Reddehase (1993) Lungs are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. *J. Virol.* 67:5360-5366
5. Bannister A., Cook J. A. And Kouzarides T. (1991) In vitro DNA binding activity of *Fos/Jun* and BZLF1 but not C/EBP is affected by redox changes. *Oncogene* 6:1243-1250
6. Beck S. and Barell B.G. (1988) Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class I antigen. *Nature (Lond.)* 331:269-272

7. Beersma M.F.C., Bijlmakers M.J.E. and Ploegh H.L. (1993) Human cytomegalovirus down-regulates HLA class I expression by reducing the stability of class I H chains. *J. Immunol.* 151:4455-4464
8. Beersma M.F.C., Wertheim van Dillen P.M.E., Geelen J.L.M.C. and Feltkamp T.E.W. (1991) Expression of HLA class I heavy chain and  $\beta$ 2-microglobulin does not affect human cytomegalovirus infectivity. *J. Gen. Virol.* 72:2757-2764
9. Ben-Porat T. and Rixon F.J. (1979) Replication of herpesvirus DNA. IV. Analysis of concatemers. *Virology* 94:61-70
10. Bender B.S., Croghan T., Zhang L. and Small P.A.Jr. (1992) Transgenic mice lacking class I major histocompatibility complex-restricted T cells have delayed viral clearance and increased mortality after influenza virus challenge. *J. Exp. Med.* 175:1143-1145
11. Bezouska K., Yuen C.-T., O'Brien J.O., Childs R.A., Chai W., Lawson A.M., Drbal K., Riserova A., Pospisil M. and Feizi T. (1994) Oligosaccharide ligands for NKR-P1 protein activate NK cells and cytotoxicity. *Nature (Lond.)* 372:150-157
12. Biron C.A. and Welsh R.M. (1982) Blastogenesis of natural killer cells during viral infections in vivo. *J. Immunol.* 129:2788-2795
13. Biron C.A., Byron K.S. and Sullivan J.S. (1989) Severe herpes virus infections in an adolescent without natural killer cells. *N. Engl. J. Med.* 320:1731-1735

14. Biron C.A., Turgiss L.R. and Welsh R.M. (1983) Increase in NK cell number and turnover rate during acute viral infection. *J. Immunol.* 131:1539-1545
15. Bordigoni P., Janot C., Aymar H., Witz F. et al. (1987) Clinical and biological evaluation of the preventative role of anti-cytomegalovirus specific immunoglobulins in bone marrow grafts. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 29:289-293
16. Boshart M., Weber R., Jahn G., Dorsch-Hasler K., Fleckenstein B. and Schaffner W (1985) A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41:521-530
17. Browne H., Churcher H.M. and Minson T. (1992) Construction and characterisation of a human cytomegalovirus mutant with the UL-18 (class I homolog) gene deleted. *J. Virol.* 66:6784-6787
18. Browne H., Smith G., Beck S. and Minson T. (1990) A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and  $\beta 2$  microglobulin. *Nature (Lond.)* 347:770-772
19. Brutkiewicz R.R. and Welsh R.M. (1995) Major Histocompatibility complex class I antigens and the control of viral infections by natural killer cells. *J. Virol.* 69:3967-3971
20. Bühler B., Keil G.M., Weiland F. and Koszinowski U.H. (1990) Characterization of the murine cytomegalovirus early transcription unit e1 that is induced by immediate-early proteins. *J. Virol.* 64:1907-1919

21. Bukowski J.F. and Welsh R.M. (1985) Inability of interferon to protect virus-infected cells against lysis by natural killer (NK) cells correlates with NK cell-mediated antiviral effects in vivo. *J. Immunol.* 135:3537-3541
22. Bukowski J.F., Warner J.F., Dennert G. and Welsh R.M. (1985) Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J. Exp. Med.* 161:40-52
23. Bukowski J.F., Woda B.A. and Welsh R.M. (1984) Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J. Virol.* 52:119-128
24. Bukowski J.F., Woda B.A., Habu S., Okumura K. and Welsh R.M. (1983) Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J. Immunol* 131:1531-1537
25. Cabrera C. V., Wohlenberg C., Openshaw H., Rey-Mendez M., Puga A. and Notkins A. L. (1980) Herpes simplex virus DNA sequences in the CNS of latently infected mice. *Nature (London)* 288:288-290
26. Cambell A.E. and Slater J.S. (1994) Down-regulation of major histocompatibility complex class I synthesis by murine cytomegalovirus early gene expression. *J. Virol.* 68:1805-1811
27. Campbell A.E., Slater J.S.,Cavanaugh V.J. and Stenberg R.M. (1992) An early event in murine cytomegalovirus replication inhibits presentation of cellular antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 66:3011-3015

28. Cardin R.D., Boname J.M., Abenes G.B., Jennings S.A. and Mocarski E.S. (1993) Reactivation of murine cytomegalovirus from latency. *Excerpta Med. Int. Congr. Ser.* 1032:101-110
29. Chadwick B.S., Sambhara S.R., Sasakura Y. and Miller R.G. (1992) Effect of class I MHC binding peptides on recognition by natural killer cells. *J. Immunol.* 149:3150-3156
30. Chantler J.K., Misra V. and Hudson J.B. (1979) Vertical transmission of murine cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 42:621-625
31. Chee M.S., Bankier A.T., Beck S., Bohni R., Brown C.M., Cerny R., Horsnell T., Hutchison A., Kouzarider T., Martignetti J.A., Preddie E., Satchwell S.C., Tomlinson P., Weston K.M. and Barrell B.G. (1990) Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 154:125-169
32. Cherrington J.M. and Mocarski E.S. (1989) Human cytomegalovirus *ie1* transactivates the  $\alpha$  promoter-enhancer via an 18-base pair repeat element. *J. Virol.* 63:1435-1440
33. Ciccone E., Pende D., Viale O., Than A., Donato C.D., Orengo A.M., Biassoni R., Verdiani A., Amoroso A., Moretta A. and Moretta L. (1992) Involvement of HLA class I alleles in natural killer (NK) specific functions: expression of HLA-Cw3 confers selective protection from lysis by alloreactive NK clones displaying a defined specificity. *J. Exp. Med.* 176:963-972



34. Cobbold S.P., Jayasuriya A., Nash A., Prospero T.D. and Waldman H. (1984) Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo. *Nature (Lond.)* 312:548-550
35. Cook M. L. and Stevens J. G. (1973) Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: evidence for intra-axonal transport of infection. *Infect. Immun.* 7:272-288
36. Correa I., Bix M., Liao N.-S., Zijlstra M., Jaenisch R. and Raulet D. (1992) Most  $\gamma\delta$  T cells develop normally in  $\beta 2$ -microglobulin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:653-657
37. Countryman J., Jenson H., Seibl R., Wolf H. and Miller G. (1987) Polymorphic proteins encoded within BZLF of defective and standard Epstein-Barr viruses disrupt latency. *J. Virol.* 61:3672-3679
38. Craighead J.E. (1969) Immunologic response to cytomegalovirus infection in renal allograft recipients. *Am. J. Epidemiol.* 90:506-513
39. Cuturi M.C., Anegon I., Sherman F., Loudon R., Clark S.C., Perussia B. and Tricheiri L. (1989) Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 169:569-583
40. Dambaugh T., Hennessey K., Fennewald S. and Kieff E. (1986) The virus genome and its expression in latent infection. P. 14-45. In M. Epstein and B. Achong (ed.) *The Epstein-Barr virus: recent advances*. William Heinemann, Ltd., London.

41. Daniels, B.F., Karlhofer F.M., Seaman W.E. and Yokoyama W.M. (1994) A natural killer cell receptor specific for major histocompatibility complex class I molecules. *J. Exp. Med.* 180:687-692
42. Del Val M., Hengel H., Hacker H., Hartlaub U., Ruppert T., Lućin P and Koszinowski U.H. (1992) Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. *J. Exp. Med.* 176:729-738
43. Del Val M., Munch K., Reddehase M.J. and Koszinowski U.H. (1989) Presentation of CMV immediate-early antigen to cytolytic T lymphocytes is selectively prevented by viral genes expressed in the early phase. *Cell* 58:305-315
44. Denkers E.Y., Gazzinelli R.T., Martin D. and Sher A. (1993) Emergence of NK1.1<sup>+</sup> cells as effectors of IFN $\gamma$  dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice. *J. Exp. Med.* 178:1465-1472
45. Depto A.S. and Stenberg R.M. (1989) Regulated expression of the human cytomegalovirus pp65 gene octamer sequences in the promoter is required for activation by viral gene products. *J. Virol.* 63:1232-1238
46. Deshmane S. L. and Fraser N. W. (1989) During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J. Virol.* 63:943-947

47. Docke W.D., Prosch S., Fietze E., Kimel V., Zuckermann H., Klug C., Syrbe U., Kruger D.H., von Baehr R. and Volk H.D. (1994)  
Cytomegalovirus reactivation and tumour necrosis factor. *Lancet* 343:268-269
48. Doherty P. (1995) Immunity to viruses. *The immunologist* 3(5/6):231-233
49. Dubin G., Socolof E., Frank I. and Friedman H.M. (1991) Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Virol.* 65:7046-7050.
50. Ebeling A., Keil G.M., Knust E. and Koszinowski U.H. (1983)  
Molecular cloning and physical mapping of murine cytomegalovirus DNA. *J. Virol.* 47:421-433
51. Echtenacher B., Falk W., Männel D.N. and Krammer P.H. (1990)  
Requirement of endogenous tumour necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J. Immunol.* 145:3762-3766
52. Efsthathiou S., Minson H. J., Field H. J., Anderson J. R. and Wildy P. (1986) Detection of herpes simplex virus-specific DNA sequences in latently infected mice and in humans. *J. Virol.* 57:446-455
53. Eichelberger M., Alan W., Zijlstra M., Jaenisch R. and Doherty P.C. (1991) Clearance of influenza virus respiratory infection in mice lacking class I major histocompatibility complex-restricted CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 174:875-880

54. Emanuel D. (1993) The use of passive immune therapy with intravenous immunoglobulin for the prevention and treatment of cytomegalovirus infection following solid organ and marrow transplantation. *Excerpta Med. Int. Congr. Ser.* 1032:295-303
55. Farrell H.E. and Shellam G.R. (1991) Protection against murine cytomegalovirus infection by passive transfer of neutralizing and non-neutralizing antibodies. *J. Gen. Virol.* 72:149-156
56. Forman S.J. (1991) Bone marrow transplantation. *Transplant. Proc.* 23(Supp. 3):118-121
57. Frank L. and Friedman H.M. (1989) A novel function of the herpes simplex virus type 1 Fc receptor: participation in bipolar bridging of antiviral immunoglobulin G. *J. Virol.* 65:4479-4488
58. Frey J. and Einsfelder B. (1984) Induction of surface IgG receptors in cytomegalovirus infection fibroblasts. *Eur. J. Biochem* 138:213-216
59. Friedman H.M., Cohen G.H., Eisenberg R.J., Seidel C.A. and Cines D.B. (1984) Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 act as a receptor for the C3b complement component on infected cells. *Nature (Lond)* 309:633-635
60. Früh K., Ahn K., Djaballah H., Sempe P., van Endert P.M., Tampe R., Peterson P.A. and Yang Y. (1995) A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature (Lond.)* 375:415-418

61. Geist L.J., Monick M.M., Stinski M.F. and Hunninghake G.W. (1994) The immediate early genes of human cytomegalovirus upregulate tumor necrosis factor-alpha gene expression. *J. Clin. Invest.* 93:474-478
62. Ghazal P., Lubon H. and Hennighausen L. (1988) Specific interactions between transcription factors and the promoter-regulatory region of the human cytomegalovirus major immediate gene. *J. Virol.* 62:1076-1079
63. Ghazal P., Lubon H., Fleckenstein B. and Hennighausen L. (1987) Binding of transcription factors and creation of a large nucleoprotein complex on the human cytomegalovirus enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3658-3662
64. Gidlund M., Örn A., Wigzell H., Senik A. and Gresser I. (1978) Enhanced NK activity in mice injected with interferon and interferon inducers. *Nature (Lond.)* 273:759-761
65. Gilbert M.J., Riddell S.R., Li C.R. and Greenberg P.D. (1993) Selective interference with class I major histocompatibility complex presentation of the major immediate-early protein following infection with human cytomegalovirus. *J. Virol.* 67:3461-3469
66. Giorda R. and Trucco M. (1991) NKR-P1 family of genes selectively coexpressed in adherent lymphokine activated killer cells. *J. Immunol.* 147:1701-1708
67. Glenn J. (1981) Cytomegalovirus infections following renal transplantation. *Rev. Infect. Dis.* 3:1151-1178



68. Gold E., Achley R., Handsfield H., Verdon M., Leach L., Mills J., Drew L. and Corey L. (1988) Immunoblot analysis of the humoral immune response in primary cytomegalovirus infection. *J. Infect. Dis.* 157:319-326
69. Gold E., Nankervis G.A. (1982) Cytomegalovirus. In: *Viral infections of humans: epidemiology and control*, ed. Evans A.S, 2nd ed., Plenum Press, New York, p 167-186
70. Grundy J.E., McKeating J.A., and Griffiths P.D. (1987) Cytomegalovirus strain AD 169 binds  $\beta 2$  microglobulin in vitro after release from cells. *J. Gen. Virol.* 68:777-784
71. Grundy J.E., McKeating J.A., Ward P.J., Sanderson A. R. and Griffiths P.D. (1987)  $\beta 2$  microglobulin enhances the infectivity of cytomegalovirus and when bound to the virus enables class I HLA molecules to be used as a virus receptor. *J. Gen. Virol.* 68:793-803
72. Guidotti L.G., Ando D., Hobbs M.V., Ishikawa T., Runkel L., Schreiber R.D. and Chisari F.V. (1994) Cytolytic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3764-3768
73. Haagmans B.L., van-den-Eertwegh A.J., Claassen E., Horzinek M.C. and Schijns V.E. (1994) Tumour necrosis factor-alpha production during cytomegalovirus infection in immunosuppressed rats. *J. Gen. Virol.* 75:779-787

74. Hanshaw J. (1983) Cytomegalovirus. In: Remington J. and Klein J. (eds) Infectious diseases of the fetus and newborn. 2<sup>nd</sup> edition, Saunders, Philadelphia, pp 104-142
75. Hanshaw J.B. (1970) Developmental abnormalities associated with congenital cytomegalovirus infection. *Advances in Teratology* 4:64-93
76. Hengel H., Lučin P., Jonjić S., Ruppert S. and Koszinowski U.H. (1994) Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape. *J. Virol.* 68:289-297
77. Hennessy K., Fennewald S., Hummel M., Cole T. and Kieff E. (1984) A membrane protein encoded by Epstein-Barr virus in latent growth transforming infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7202-7211
78. Hennighausen L. and Fleckenstein B. (1986) Nuclear factor 1 interacts with five DNA elements in the promoter region of the human cytomegalovirus major immediate early gene. *EMBO J.* 5:1367-1371
79. Henry S.C. and Hamilton J.D. (1993) Detection of murine cytomegalovirus immediate-early transcripts in the spleen of latently infected mice. *J. Infect. Dis.* 167:7950-7954
80. Herberman R.B., Bortram S., Hoskily J.S., Nunn M., Holden H.T. and West W.H. (1977) Fc receptors on mouse effector cells mediating natural cytotoxicity against tumor cells. *J. Immunol* 119:322-326

81. Herternstein B., Hampl W., Bunjes D., Wiesneth M., Duncker C., Koszinowski U., Heimpel H., Arnold R. and Mertens T. (1995) *In vivo/ex vivo* T cell depletion for GVHD prophylaxis influences onset and course of active cytomegalovirus infection and disease after BMT. *Bone Marrow Transplantation* 15:387-393.
82. Hill A.B., Barnett C., McMichael A.J. and McGeoch D.J. (1994) HLA class I molecules are not transported to the cell surface in cells infected with herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Immunol.* 152:2736-2741
83. Ho M. (1980) Role of specific cytotoxic lymphocytes in cellular immunity against murine cytomegalovirus. *Infect. Immun.* 27:767-776
84. Ho M. (1991) Observations from transplantation contributing to the understanding of pathogenesis of CMV infection. *Transplant. Proc.* 23(Suppl. 3):104-109
85. Hunter C.A., Chizzonite R. and Remington J.S. (1995) IL-1 $\beta$  is required for IL-12 to induce production of IFN $\gamma$  by NK cells. *J. Immunol.* 155:4347-4354
86. Hynes R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25
87. Ibanez E.C., Schrier R., Ghazal P., Wiley C. and Nelson J.A. (1991) Human cytomegalovirus productively infect primary differentiated macrophages. *J. Virol.* 65:6581-6588

88. Inada T. and Mims C.A. (1985) Association of virulence of murine cytomegalovirus with macrophage susceptibility and with virion bound non-neutralizing antibody. *J. Gen. Virol.* 66:879-882
89. Javier R. T., Stevens J. G., Dissette V. B. and Wagner E. K. (1988) A herpes simplex virus transcript abundant in latently infected neurons is dispensable for establishment of the latent state. *Virology* 166:254-257
90. Jonjić S., Del Val M., Keil G.M., Reddehase M.J. and Koszinowski U.H. (1988) A nonstructural viral protein expressed by a recombinant vaccinia virus protects against lethal cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 62:1653-1658
91. Jonjić S., Mutter W., Weiland F., Reddehase M.J. and Koszinowski U.H. (1989) Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4-positive T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 169:1199-1212
92. Jonjić S., Pavić I., Lučin P., Rukavina D. and Koszinowski U. H. (1990) Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Virol.* 64:4557-5464
93. Jordan M.C. (1983) Latent infection and the elusive cytomegalovirus. *Rev. Infect. Dis.* 5:205-215
94. Jordan M.C. and Mar V.L. (1982) Spontaneous activation of latent cytomegalovirus from murine spleen explants. Role of lymphocytes and macrophages in release and replication of virus. *J. Clin. Invest.* 70:762-768

95. Jordan M.C., Shanley J.D. and Stevens J.G. (1977) Immunosuppression reactivates and disseminates latent murine cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 37:419-423
96. Karlhofer F.M., Ribaldo R.K. and Yokoyama W.M. (1992) MHC class I alloantigen specificity of Ly-49<sup>+</sup> IL-2-activated natural killer cells. *Nature (Lond.)* 358:66-70
97. Keay S., Rasmussen L. and Merigan T. (1988) Syngeneic monoclonal anti-idiotypic antibodies that bear the internal image of a human cytomegalovirus neutralization epitope. *J. Immunol.* 140:944-948
98. Keil G.M., Ebeling K. and Koszinowski U.H. (1987) Immediate-early genes of murine cytomegalovirus: location, transcripts and translation products. *J. Virol.* 61:526-533
99. Keil G.M., Ebeling-Keil A. and Koszinowski U.H. (1984) Temporal regulation of murine cytomegalovirus transcription and mapping of viral RNA synthesized at immediate early times after infection. *J. Virol.* 50:784-795
100. Keil G.M., Ebeling-Keil A. and Koszinowski U.H. (1987) Sequence and structural organization of murine cytomegalovirus immediate-early gene 1. *J. Virol.* 61:1901-1908
101. Kitamura D., Roes J., Kuhn R. and Rajewsky K. (1991) B cell-deficient mouse by targeting disruption of the membrane exon of the immunoglobulin  $\mu$  chain gene. *Nature (Lond.)* 350:423-426



102. Koo G.C., Dumont F.J., Tutt M., Hackett J. and Kumar V. (1986) The NK1.1<sup>-</sup> mouse: a model to study differentiation of murine NK cells. *J. Immunol.* 137:3742-3747
103. Koszinowski U.H., Jonjić S. and Lučin P. (1994) Cytomegalovirus persistence by evasion from immune control. *Seminars in Virology* 5:297-305
104. Koszinowski U.H., Keil G.M., Volkmer H., Fibi M.R., Ebeling-Keil A. and Münch K. (1986) The 89,000-Mr murine cytomegalovirus immediate-early protein activates gene transcription. *J. Virol.* 58:59-66
105. Koszinowski, U.H., Del Val M. and Reddehase M. J. (1990) Cellular and molecular basis of the protective immune response to cytomegalovirus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 154:189-220
106. Kovacs J.A. and Masur H. (1988) Opportunistic infections. In *AIDS*, 2<sup>nd</sup> edition, De Vita V. T. Jr., Hellman S. and Rosenberg S. A., editors, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, pg. 199-226
107. Laegreid A., Medvedev A., Nonstad U., Bombara M.P., Ranges G., Sundan A. and Espevik T. (1994) Tumor necrosis factor receptor p75 mediates cell-specific activation of nuclear factor kappa B and induction of human cytomegalovirus enhancer. *J. Biol. Chem.* 11:7785-7791
108. Lafemina R.L. and Hayward G.S. (1983) Replicative forms of human cytomegalovirus DNA with joined termini are found in permissively infected human cells but not in non-permissive Balb/c 3T3 mouse cells. *J. Gen. Virol.* 64:373-389

109. Lang D.J. (1975) The epidemiology of cytomegalovirus infections. Interpretation of recent observations. In: Infections of the fetus and the newborn infant, ed. Krugman S., Gershon A.A., vol.3, Alan R. Liss, p 35-45
110. Lehman-Grube R., Dralle H., Untermöhlen O. and Löhler J. (1994) MHC class I molecule-restricted presentation of viral antigen in  $\beta 2m^-$  microglobulin-deficient mice. *J. Immunol.* 153:595-603
111. Liao N.-S., Bix M., Zijlstra M., Jaenisch R. and Raulet D. (1991) MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* 253:199-202
112. Lindahl T., Adams A., Bjursell G., Bornakamm G. W., Kaschka-Dierich G. and Jehn U. (1976) Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in human lymphoid cell line. *J. Mol. Biol.* 102:511-530
113. Ljunggren H.-G. and Karre K. (1990) In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today* 11:237-243
114. Ljunggren H.-G., Stam N.J., Ohlen C., Neeffjes J.J., Hoglund P., Heemels M.-T., Bastin J., Schumacher T.N.M., Townsend A., Karre K. and Ploegh H.L. (1990) Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature (Lond.)* 346:476-480
115. Lučin P. and Jonjić S. (1995) Cytomegalovirus replication cycle: an overview. *Period. Biol.* 97:13-22

116. Lučin P., Jonjić S., Messerle M, Polić B., Hengel H. and Koszinowski U.H. (1994) Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon-gamma and tumour necrosis factor. *J. Gen. Virol.* 75:101-110
117. Lučin P., Pavić I., Polić B., Jonjić S. and Koszinowski U.H. (1992) Gamma-interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. *J. Virol.* 66:1977-1984
118. Lycke E., Kristensson K., Svennerholm B., Vahline A. and Ziegler R. (1984) Uptake and transport of herpes simplex virus in neurites of rat dorsal root ganglia cells in culture. *J. Gen. Virol.* 65:55-64
119. Malnati M.S., Lusso P., Cicone E., Morretta A., Morretta L. and Long E.O. (1993) Recognition of virus-infected cells by natural killer cell clones is controlled by polymorphic target cell elements. *J. Exp. Med.* 178:961-969
120. Mannick J. B., Asano K., Izumi K., Kieff E. and Stamler J. S. (1994) Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 79:1137-1146
121. Manning W.C. and Mocarski E.S. (1988) Insertional mutagenesis of the murine cytomegalovirus genome: one prominent  $\alpha$  gene (*ie2*) is dispensable for growth. *Virology* 167:477-484
122. Marks J.R. and Spector D.H. (1988) Replication of the murine cytomegalovirus genome: Structure and role of the termini in the generation and cleavage of concatamers. *Virology* 162:98-107

123. Matsuo T., Heller M., Petti L., O'Shiro E. and Kieff E. (1984) Persistence of the entire Epstein-Barr virus genome integrated into human lymphocyte DNA. *Science* 226:1322-1324
124. Mellerick D. M. And Fraser N. W. (1987) Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state. *Virology* 158:265-275
125. Mercer J.A., Wiley C.A. and Spector D.H. (1988) Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection: identification of infected cells in the spleen during acute and latent infections. *J.Virol.* 62:987-997
126. Meyers J.D., Flournoy N. and Thomas E.D. (1986) Risk factors for cytomegalovirus infection after human bone marrow transplantation. *J. Infect. Dis.* 153:478-488
127. Miller G., Robinson T., Heston L. and Lipman M. (1974) Differences between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection and interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:4006-4010
128. Mocarski E. S. Jr., Abenes G. B., Manning W. C., Sambucetti L. C. and Cherrington J. M. (1990) Molecular genetic analysis of cytomegalovirus gene regulation in growth, persistence and latency. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 154:47-73
129. Mocarski E.S. and Roizman B. (1982) Structure and role of the herpes simplex virus DNA termini in inversion, circularization and generation of virion DNA. *Cell* 31:87-99

130. Mocarski E.S., Abenes G.B., Manning W.C., Sambucetti L.C. and Cherrington J. M. (1990) Molecular genetic analysis of cytomegalovirus gene regulation in growth, persistence and latency. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 154:47-74
131. Moore K.W., Vieira p., Fiorentino D.F., Troustine M.L., Khan T.A. and Mossmann T.R. (1990) Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 248:1230-1233
132. Moretta A., Vitale M., Bottino C., Orengo A. M., Morelli L., Augugliaro R., Barbaresi B., Ciccone E. and Moretta L. (1993) P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J. Exp. Med.* 178:597-604
133. Mosmann T.R. and Coffman R.L. (1989) Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145-173
134. Mosmann T.R. and Moore K.W. (1991) The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. *Immunol. Today* 12:49-53
135. Münch K., Keil G.M., Messerle M. and Koszinowski U.H. (1988) Interaction of the 89K murine cytomegalovirus immediate-early protein with core histones. *Virology* 163:405-412



136. Mutter W., Reddehase M.J., Busch F.W., Bühring H.-J. and Koszinowski U.H. (1988) Failure in generating hematopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J. Exp. Med.* 167:1645-1658
137. Navarro D., Paz P., Tugizov S., Topp K., La Vail J. and Pereira L. (1993) Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology* 197:143-158
138. Nonoyama M. and Pagano J. S. (1971) Detection of Epstein-Barr viral genome in non-productive cells. *Nature (London)* 233:103-106
139. Ojo E. and Wigzell H. (1987) Natural killer cells may be the only cells in normal mouse lymphoid populations endowed with cytolytic ability for antibody-coated tumour target cells. *Scand. J. Immunol.* 7:297-301
140. Oldstone M.B.A. (1989) Viral persistence. *Cell* 56:517-520
141. Orange J.S., Wang B., Terhorst C. and Biron C.A. (1995) Requirement for natural killer cell-produced interferon  $\gamma$  in defence against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defence pathway by interleukin 12 administration. *J. Exp. Med.* 182:1045-1056
142. Osborn J.E. and Walker E.L. (1970) Virulence and attenuation of murine cytomegalovirus. *Infect. Immun.* 3:238-236

143. Pape G., Troye B., Axelsson B. and Perlmann P. (1979) Simultaneous occurrence of immunoglobulin-dependent and immunoglobulin-independent mechanisms in natural cytotoxicity of human lymphocytes. *J. Immunol.* 122:2251-2257
144. Pass R., Hutto C., Ricks R. and Cloud G. (1986) Increased rate of cytomegalovirus infection among parents of children attending day-care centres. *N. Engl. J. Med.* 314:1414-1418
145. Pass R.F., Fowler K.B. and Boppana S. (1991) Clinical importance of cytomegalovirus infection: An overview. *Excerpta Med. Int. Cong. Ser.* 978:3-10
146. Pavić I., Polić B., Crnković I., Lučin P., Jonjić S. and Koszinowski U.H. (1993) Participation of endogenous tumour necrosis factor alpha in host resistance to cytomegalovirus infection. *J. Gen. Virol.* 74:2215-2223
147. Pestka S., Langer J.A., Zoon K.C. and Samuel C.E. (1987) Interferons and their actions. *Ann. Rev. Biochem.* 56:727-777
148. Pfeffer K., Matsuyama T., Kundig T.M., Wakeham A., Kishihara K., Shahinian A., Wiegmann K., Ohashi P.S., Kronke M. and Mak T.W. (1993) Mice deficient for the 55 kd Tumour necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73:457-467

149. Pizzorno M.C., O'Hare P., Sha L., La Femina R.L. and Hayward G.S. (1988) Trans-activation and autoregulation of gene expression by the immediate-early region 2 gene products of human cytomegalovirus. *J. Virol.* 62:1167-1179
150. Pillay D., Webster A., Prentice H.G. and Griffiths P.D. (1992) Risk factors for viral reactivation following bone marrow transplantation. *Ann. Hematol.* 64(Suppl. A):148-151
151. Pollock J.L. and Virgin IV H.W. (1995) Latency, without persistence, of murine cytomegalovirus in the spleen and kidney. *J. Virol.* 69:1762-1768
152. Pomeroy C., Hilleren P.J. and Jordan M.C. (1991) Latent murine cytomegalovirus DNA in splenic stromal cells in mice. *J. Virol.* 65:3330-3334
153. Preiksaitis J.K. and Wieczorek A.J. (1991) Persistence of cytomegalovirus in human long-term bone marrow culture: relationship to hemopoiesis. *J. Med. Virol.* 35:76-84
154. Price P. (1994) Are MHC proteins cellular receptors for CMV? *Immunology Today* 15:295-296
155. Price P., Gibbons A.E. and Shellam G.R. (1990) H-2 class I loci determine sensitivity to MCMV in macrophages and fibroblasts. *Immunogenetics* 32:20-26
156. Price P., Olver S.D., Gibbons A.E., Hui Dun T. and Shellam G.R. (1993) Characterization of thymic involution induced by murine cytomegalovirus infection. *Immuno. Cell Biol.* 71:155-165

157. Rapp M., Lučin P., Messerle M., Loh L.C. and Koszinowski U.H. (1994) Expression of the murine cytomegalovirus glycoprotein H by recombinant vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* 75:183-188
158. Rapp M., Messerle M., Lučin P. and Koszinowski U.H. (1993) In vivo protection studies with MCMV glycoproteins gB and gH expressed by vaccinia virus. *Excerpta Med. Int. Congr. Ser.* 1032:327-332
159. Rasmussen L. (1990) Immune response to human cytomegalovirus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 154:221-253
160. Rasmussen L., Nelson M., Neff M. and Merigan T.C. (1988) Characterization of two different human cytomegalovirus glycoproteins which are targets for virus neutralizing antibody. *Virology* 163:308-311
161. Rasmussen L., Resta S. and Merigan T.C. (1990) Human cytomegalovirus glycoprotein-receptor interactions. *Transplant. Proc.* 23:60-63
162. Rawlins D., Melman G., Hayward S. And Hayward G. (1985) Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1 to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* 42:859-868
163. Reddehase M. J., Balthesen M., Rapp M., Jonjić S., Pavić I. and Koszinowski U.H. (1994.) The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *J. Exp. Med.* 179:185-193

164. Reddehase M.J., Jonjić S., Weiland F., Mutter W. and Koszinowski U.H. (1988) Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adenitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *J. Virol.* 62:1061-1065
165. Reddehase M.J., Keil G.M. and Koszinowski U.H. (1984) The cytolytic T lymphocyte response to the murine cytomegalovirus. I. Distinct maturation stages of cytolytic T lymphocytes constitute the cellular immune response during acute infection of mice with the murine cytomegalovirus. *J. Immunol.* 132:482-489
166. Reddehase M.J., Mutter W., Münch K., Buhring H-J and Koszinowski U.H. (1987) CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J. Virol.* 61:3102-3108
167. Reddehase M.J., Weiland F., Münch K., Jonjić S, Luske A. and Koszinowski U.H. (1985) Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J. Virol.* 22:264-273
168. Reddehase M.J., Rothbard J.B. and Koszinowski U.H. (1989) A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. *Nature (Lond.)* 337:651-653
169. Reiser B.H., Kuhn J., Doerr H.W., Kirchner H., Munk K and Braun R. (1986) Human cytomegalovirus replicates in primary human bone marrow cells. *J. Gen Virol.* 67:2595-2604



170. Reynolds D.W., Stagno S., Hosty T.S. Tiller M. and Alford C.A. Jr. (1973) Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N. Engl. J. Med.* 289:1-5
171. Riddell S.R., Watanabe K.S., Goodrich J.M., Li C.R., Agha M.E. and Greenberg P.D. (1992) Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257:238-241
172. Rock D. L. and Fraser N. W. (1983) Detection of HSV-1 genome in central nervous system of latently infected mice. *Nature (London)* 302:523-525
173. Rock D. L. and Fraser N. W. (1985) Latent herpes simplex virus type 1 DNA contains two copies of the virion DNA joint region. *J. Virol.* 55:849-852
174. Rock K.L., Gamble S., Rothstein L., Gramm C. and Benacerraf B. (1991) Dissociation of  $\beta$ -2 microglobulin leads to the accumulation of a substantial pool of inactive class I MHC heavy chains on the cell surface. *Cell* 65:611-620
175. Roizman B. (1990) Herpesviridae: a brief introduction. In: *Virology*, ed. Fields B.N. and Knipe D.M., Raven Press, New York, p 1787-1794
176. Russell J., Stow N. D. and Preston C. M. (1987) Herpes simplex virus genes involved in latency in vitro. *J. Gen. Virol.* 68:3009-3018

177. Sambucetti L.C., Cherrington J.M., Wilkinson G.W.G. and Mocarski E.S. (1989) NF- $\kappa$ B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *EMBO. J.* 8:4251-4258
178. Scalzo A.A., Fitzgerald N.A., Wallace C.R., Gibbons A.E., Smart Y.C., Burton R.C. and Shellam G.R. (1992) The effect of the *Cmv-1* resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J. Immunol.* 149:581-589
179. Schariton T.M. and Scott P. (1993) Natural killer cells are a source of interferon  $\gamma$  that drives differentiation of CD4<sup>+</sup> T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J. Exp. Med.* 178:567-577
180. Scott P. (1993) IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science* 260:496-497
181. Shanley J.D., Jordan M.C. and Stevens J.G. (1981) Modulation by adoptive humoral immunity of murine cytomegalovirus infection. *J. Infect. Dis.* 143:231-237
182. Shellam G.R., Flexman J.P., Farrel H.E. and Papadimitriou F.M. (1985) The genetic background modulates the effect of the beige gene on susceptibility to cytomegalovirus infection in mice. *Scand. J. Immunol* 22:147-155
183. Sladowski D., Steer S.J., Clothier R.H. and Balls M. (1993) An improved MTT assay. *J. Immunol. Methods* 157:203-207

184. Smith G.L. (1994) Virus strategies for evasion of the host response to infection. *Trends in Microbiology* 2:81-88
185. Smith J.D., DeHarven E. (1973) Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. I. Sequence of viral replication. *J.Virol.* 12:919-930
186. Spaete R.R. and Mocarski E.S. (1985) Regulation of cytomegalovirus gene expression:  $\alpha$  and  $\beta$  promoters are *trans* activated by viral functions in permissive human fibroblasts. *J. Virol.* 56:135-143
187. Spitalny G.L. and Havell E.A. (1984) Monoclonal antibody to murine gamma interferon inhibits lymphokine-induced antiviral and macrophage tumoricidal activities. *J. Exp. Med.* 159:1560-1565
188. Spivak J. G. and Fraser N. W. (1987) Detection of herpes simplex virus type 1 transcripts during latent infection in mice. *J. Virol.* 61:3841-3847
189. Stagno S., Pass R.F., Dworsky M.E., Henderson R.E., Moore E.G., Walton P.D. and Alford C.A. (1982) Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infection. *New. Engl. J. Med.* 306:945-949.
190. Stannard L.M. and Hardie D.R. (1991) An Fc receptor for human immunoglobulin G is located within the tegument of human cytomegalovirus. *J.Virol.* 65:3411-3415

191. Staprans S.I., Rabert D.K. and Spector D.H. (1988) Identification of sequence requirements and trans-acting functions necessary for regulated expression of a human cytomegalovirus early gene. *J. Virol.* 62:3463-3473
192. Starr S.E. and Allison A.C. (1977) Role of T lymphocytes in recovery from murine cytomegalovirus infection. *Infect. Immun.* 17:458-462
193. Stevens J. G. (1989) Human herpesviruses: a consideration of the latent state. *Microbiol. Rev.* 53:318-332
194. Stevens J. G., Wagner E. K., Devi-Rao G. B., Cook M. L. and Feldman L. (1987) RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* 235:1056-1059
195. Stinski M.F. (1976) Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus. early and late virus induced polypeptides. *J. Virol.* 26:686-701
196. Stinski M.F. (1990) Cytomegalovirus and its replication. In: *Virology*, ed. Fields B.N. and Knipe D.M., Raven Press, New York, p 1959-1980
197. Stinski M.F. and Roehr T.J. (1985) Activation of the major immediate-early gene of human cytomegalovirus by *cis*-acting elements in the promoter-regulatory sequence and by virus specific *trans*-acting components. *J. Virol.* 55:431-441

198. Stoddart C.A., Cardin R.D., Boname J.M., Manning W.C., Abenes G.B. and Mocarski E.S. (1994) Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 68:6243-6253
199. Storkus W.J. and Dawson J.R. (1991) Target structures involved in natural killing (NK): characteristics, distribution and candidate molecules. *Rev. Immunol.* 10:393-416
200. Storkus W.J., Slater R.D., Alexander J., Ward F.E., Ruiz R. E., Cresswell P. and Dawson J.R. (1991) Class I-induced resistance to natural killing: identification of nonpermissive residues in HLA-A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5989-5992
201. Su H.C., Ishikawa R. and Biron C.A. (1993) Transforming growth factor- $\beta$  expression and natural killer cell responses during virus infection of normal, nude and SCID mice. *J. Immunol.* 151:4674-4890
202. Takada K., Shumizu N., Sakuma S. and Ono Y. (1986) Trans-activation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment. *J. Virol.* 57:1016-1022
203. Taylor H.P. and Cooper N.R. (1990) The human cytomegalovirus receptor on fibroblasts is a 30-kilodalton membrane protein. *J. Virol.* 64:2484-2490
204. Thäle R., Lučin P., Schneider K., Eggers M. and Koszinowski U.H. (1994) Identification and expression of a murine cytomegalovirus early gene coding for an Fc receptor. *J. Virol.* 68:7757-7765



205. Thäle R., Szepan U., Hengel H., Geginat G., Lučin P. and Koszinowski U.H. (1995) Identification of the mouse cytomegalovirus genomic region affecting major histocompatibility complex class I transport. *J. Virol.* 69:6098-6105
206. Trinchieri G. (1994) Recognition of major histocompatibility class I antigens by natural killer cells. *J. Exp. Med.* 180:417-421
207. Tripp C.S., Wolf S.F. and Unanue E.R. (1993) Interleukin-12 and tumor necrosis factor  $\alpha$  are costimulators of interferon- $\gamma$  production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3725-3729
208. Wagner E. K., Devi-Rao G., Feldman L. T., Dobson A. T., Zhang Y.-F., Flanagan W. M. and Stevens J. G. (1988) Physical characterization of the herpes simplex virus latency-associated transcript in neurons. *J. Virol.* 62:1194-1202
209. Wagner E. K., Flanagan W. M., Devi-Rao G., Zhang Y.-F., Hill J. M., Anderson K. P. and Stevens J. G. (1988) The herpes simplex virus latency-associated transcript is spliced during the latent phase of infection. *J. Virol.* 62:1194-1202
210. Wainberg M.A., Numazaki K., Destephano L., Wong L. and Goldman H. (1988) Infection of human thymic epithelial cells by human cytomegalovirus and other viruses: effect on secretion of interleukin 1-like activity. *Clin. Exp. Immunol.* 72:415-421

211. Walter E.A., Greenberg P.D., Gilbert M.J., Finch R.J., Watanabe K.S., Thomas E.D. and Riddell S.R. (1995) Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* 333(16):1038-1044
212. Wang A.M., Creasey A.A., Ladner M.B., Lin L.S., Strickler J., Vanarsdell J.N., Yamamoto R. and Mark D.F. (1985) Molecular cloning of the complementary DNA for human tumour necrosis factor. *Science* 228:149-154
213. Wang D., Leibowitz D. and Kieff E. (1985) An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established redent cells. *Cell* 43:831-840
214. Warren A.P., Owens C.N., Borysiewicz L.K. and Patel K. (1994) Down-regulation of integrin  $\alpha 1/\beta 1$  expression and association with cell rounding in human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *J. Virol.* 75:3319-3325
215. Wathen M.W. and Stinski M.F. (1982) Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early and late times after infection. *J. Virol.* 41:462-477
216. Weiland F., Keil G.M., Reddehase M.J. and Koszinowski U.H. (1986) Studies on the morphogenesis of murine cytomegalovirus. *Intervirology* 26:192-201
217. Welsh R.M. (1978) Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. I. Characterization of natural killer cell induction. *J. Exp. Med.* 148:163-181

218. Welsh R.M., Brubaker J.O., Vegas-Cortes M. and O'Donnell C.L. (1991) Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infection occur independently of T and B cell function. *J. Exp. Med.* 173:1053-1063
219. Wherry J.C., Schreiber R.D. and Unanue E.R. (1991) Regulation of gamma interferon production by natural killer cells in *scid* mice: roles of tumor necrosis factor and bacterial stimuli. *Infect. Immun.* 59:1709-1715
220. Williams D.B., Barber B.H., Flavell R.A. and Allen H. (1989) Role of  $\beta$ 2-microglobulin in the intracellular transport and surface expression of murine class I molecules. *J. Immunol.* 142:2796-2806
221. Wykes M.N., Price P. and Shellam G.R. (1992) The effects of  $\beta$ 2m-microglobulin on the infectivity of murine cytomegalovirus. *Archives of Virology* 123:59-72
222. Wykes M.N., Shellam G.F., McCluskey J., Kast W.M., Dallas P.B. and Price P. (1993) Murine cytomegalovirus interacts with major histocompatibility complex class I molecules to establish cellular infection. *J. Virol.* 67:4182-4189
223. Yamashita Y., Shimokata K., Saga S., Mizuno S., Tsurumi T. and Nishiyama Y. (1994) Rapid degradation of the heavy chain of class I major histocompatibility complex antigens in the endoplasmatic reticulum of human cytomegalovirus-infected cells. *J. Virol.* 68:7933-7943

224. Yates J. L., Warren N. and Sugden B. (1985) Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in a variety of mammalian cells. *Nature (Lond.)* 313:812-815
225. Yates J. L., Warren N., Reisman D. And Sugden B. (1984) A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3806-3810
226. Yokoyama W.M., Ryan J.C., Hunter J.J., Smith H.R.C., Stark M. and Seaman W.E. (1991) cDNA cloning of mouse NKR-P1 and genetic linkage with Ly-49. Identification of a natural killer cell gene complex on mouse chromosome 6. *J. Immunol.* 147:3229-3236
227. York I.A., Roop C., Andrews D.W., Riddell S R., Graham F.L. and Johnson D.C. (1994) A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Cell* 77:525-535
228. Yuhasz S.A., Dissette V.B., Cook M.L. and Stevens J.G. (1994) Murine cytomegalovirus is present in both chronic active and latent state in persistently infected mice. *Virology* 202:272-280
229. Zijlstra M., Bix M., Simister N.E., Loring J.M., Raulet D.H. and Jaenisch R. (1990)  $\beta$ 2-microglobulin deficient mice lack CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> cytolytic T cells. *Nature (Lond.)* 344:742-746

230. Zijlstra M., Li E., Sajjadi F., Subramani S. and Jaenisch R. (1989)  
Germ-line transmission of a disrupted  $\beta$ 2-microglobulin gene produced by  
homologous recombination in embryonic stem cells. Nature (Lond.) 342:435-  
438

СВЕШКА  
РИЈКА



## ŽIVOTOPIS

Roden sam 1. kolovoza 1964. godine u Rijeci. Osnovnu školu pohađao sam u Čavlima. Srednje obrazovanje završio sam u Rijeci. Studij medicine upisao sam 1984. godine. Obranom diplomskog rada "Mogući mehanizam senzibilizacije izazvane transplantacijom alogene kože u štakora", pod mentorstvom prof. dr. Vlaste Linić-Vlahović, stekao sam zvanje doktora medicine na Medicinskom fakultetu u Rijeci u srpnju 1989. godine. Tijekom studija sam nekoliko puta nagrađivan za postignute uspjehe. U listopadu 1989. godine sam upisao poslijediplomski studij iz Opće kliničke patofiziologije. Tijekom 1990. godine sam završio liječnički staž i položio stručni ispit. Od 20. siječnja 1991. godine zaposlen sam kao liječnik na radu - znanstveni novak na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci, gdje radim na znanstvenom projektu br. 3-01-169 Ministarstva znanosti R Hrvatske čiji je nositelj prof. dr. Stipan Jonjić. Magistarski rad "Učinak citomegalovirusne infekcije i citokina na ekspresiju antigena tkivne podudarnosti na mišjim fibroblastima" obranio sam u prosincu 1992. godine pod mentorstvom prof. dr. Stipana Jonjića. Tijekom 1992. godine aktivno sam sudjelovao u domovinskom ratu. U lipnju 1994. godine izabran sam za asistenta na Zavodu za fiziologiju i imunologiju. Član sam Hrvatskog liječničkog zbora od srpnja 1989. godine, te Hrvatskog imunološkog društva od prosinca 1993. godine.