

Imunobiologija citomegalovirusnih proteina kao liganada za aktivacijske receptore NK-stanicama

Bubić, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2005

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:188:870527>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivan Bubić

**IMUNOBIOLOGIJA CITOMEGALOVIRUSNIH PROTEINA KAO
LIGANADA ZA AKTIVACIJSKE RECEPTORE NA NK-STANICAMA**

Doktorska disertacija

Rijeka, 2005.

Mentor rada: prof. dr sc. Stipan Jonjić

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

1. Prof. dr sc. Pero Lučin.
2. Prof. dr sc. Siniša Volarević
3. Doc. dr sc. Ivica Pavić
4. Prof. dr sc. Sabina Rabatić
5. Prof. dr sc. Stipan Jonjić

Rad ima 118 listova.

UDK klasifikacija: _____

Rad je izrađen na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Rad je financijski potpomognut sredstvima Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske (projekt broj 0062004, glavni istraživač prof. dr sc. Stipan Jonjić).

Iskreno se zahvaljujem svom mentoru prof. dr sc. Stipanu Jonjiću na vodstvu, savjetima i podršci tijekom izrade ovog rada.

Hvala svim članovima Zavoda za histologiju i embriologiju; ljepšu i zdraviju radnu sredinu teško je zamisliti.

Zahvaljujem se laborantici Dijani Rumori čije su mi pomoć i stručnost bile od velikog značaja pri izvođenju pokusa. Posebno se zahvaljujem dr sc. Mileni Hasan na prijateljstvu, podršci i pomoći te doc. dr sc. Astrid Krmpotić, mojoj prijateljici i učiteljici, bez čijeg bi strpljenja, razumijevanja i požrtvornosti ovaj rad bilo nemoguće napraviti.

Hvala mojoj majci na brizi i ljubavi koju mi je pružila.

Najveće hvala mojoj obitelji, Silvii i Leonu, na razumijevanju i strpljenju. Hvala im što su me na mom putu uvijek podržavali i vjerovali u mene. Hvala im na bezgraničnoj ljubavi i radosti koje mi pružaju.

«Svijet je onoliko zanimljiv koliko smo mi radoznali.»

William Shakespeare

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ispitati biološki značaj gena *m157* mišjeg citomegalovirusa (MCMV) u nadzoru MCMV-infekcije posredovanom NK-stanicama u Ly49H⁺ i Ly49H⁻ sojeva miševa.

Materijal i metode: Rekombinantni MCMV u kojem je uklonjen gen *m157* te njegov odgovorajući revertantni virus u kojem je na ektopično mjesto u genomu vraćen gen *m157* testirali smo u različitim Ly49H⁻ i Ly49H⁺ sojevima miševa. Također smo koristili rekombinante MCMV-a u kojima je uklonjeno više imunoregulacijskih gena. Miševe smo injicirali intravenski ili intraperitonealno s virusima u dozi od 2×10^5 infektivnih čestica virusa (engl. *plaque forming unit*, PFU) za MCMV-osjetljive miševe odnosno u dozi od 5×10^5 PFU za MCMV-otporne miševe. Dan prije infekcije miševima smo uklonili NK-stanice ili smo ih ostavili netretirane te ih žrtvovali 3-4 dana nakon infekcije. Pratili smo aktivaciju Ly49H⁺ NK-stanica na način da smo protočnom citometrijom određivali razinu interferona gama (IFN- γ) u njima. Protočnom citometrijom smo pomoću tetramera NKG2D-PE te protutijela specifičnih za pojedine NKG2D ligande pratili njihovo ispoljavanje na membrani inficiranih mišjih embrionalnih fibroblasta (MEF).

Rezultati: Tijekom ranog razdoblja MCMV-infekcije sojevi laboratorijskih miševa mogu biti osjetljivi ili otporni na infekciju što je određeno lokusom *Cmv1^f* tj. genom *Ly49h* koji određuje aktivacijski receptor NK-stanica, Ly49H. Ligand za ovaj receptor je protein *m157*, određen genom *m157* MCMV-a. Infekcija Ly49H⁺ miševa virusom u kojem je uklonjen gen *m157* dovodi do povećane virulencije takvog virusa u usporedbi s divljim tipom MCMV-a ili revertantnim virusom. Nadalje, uklanjanje NK-stanica nema učinka na titar delecijske mutante tj. ovaj se virus u Ly49H⁺ miševa ponaša poput divljeg tipa virusa u Ly49H⁻ miševa. Uklanjanjem Ly49H⁺ NK-stanica te infekcijom novookočenih miševa ili miševa kojima nedstaje receptor Ly49H (miševi BXD-8) pokazali smo da su ove stanice ključne u nadzoru MCMV-infekcije. Također smo pokazali da je međudjelovanje proteina *m157* i receptora Ly49H u nadzoru MCMV-infekcije ključno u slezeni i plućima, ali ne u i jetri inficiranih životinja. Miševi 129/Svj ne posjeduju aktivacijski receptor Ly49H, ali njihove NK-stanice ispoljavaju inhibicijski receptor Ly49I koji može vezati protein *m157*. Miševi BALB/c također posjeduju receptor Ly49I, ali on u ovih miševa nije u stanju vezati protein *m157*. Slaba atenuacija delecijske mutante za gen *m157* bila je prisutna u oba soja miševa što upućuje na to da međudjelovanje proteina *m157* i receptora Ly49I nema značajnu

ulogu u inhibiciji NK-stanica *in vivo*. Uporaba delecijske mutante za gen *m157* dala nam je priliku izučavanja značaja i drugih gena MCMV-a koji su važni u izbjegavanju NK-posredovanog nadzora MCMV-infekcije. U istraživanjima gena MCMV-a odgovornih za otpornost divljih miševa soja PWK/Pas na infekciju koristili smo delecijske mutante MCMV-a za jedan ili dva gena unutar regije $\Delta 6$ (*m145-m158*) kojima smo inficirali miševe PWK/Pas x BALB/C F1 generacije. Nažalost, niti jedna od testiranih mutanti MCMV-a nije se u ovih miševa ponašala slično delecijskoj mutanti za gen *m157* u Ly49H⁺ miševa. Nadalje, infekcija stanica MEF-a porijeklom iz ovih životinja divljim tipom MCMV-a pokazala je da virus u potpunosti negativno regulira ligande za aktivacijski receptor NKG2D što upućuje na to da je neki drugi mehanizam, a ne aktivacija NK-stanica putem NKG2D-a, odgovoran za otpornost ovih miševa na MCMV-infekciju. U ovome smo radu također pokazali da je nadzor MCMV-infekcije posredovan prirođenom imunošću u miševa na C57BL/6 genskoj pozadini nedostatan u slučaju da domaćin ne posjeduje mehanizme stečene imunosti. Nakon samo jedne pasaže MCMV-a kroz imunodeficitne Ly49H⁺ miševe dolazi do pojave MCMV mutanti za gen *m157* koje su sposobne izbjeći prepoznavanje od strane NK-stanica.

Zaključak: Ovim radom je po prvi puta pokazano da je protein *m157* jedini protein MCMV-a koji služi kao ligand za aktivacijski receptor Ly49H te da međudjelovanje proteina *m157* i inhibicijskog receptora Ly49I nije važno u nadzoru MCMV-infekcije *in vivo*. Nadalje, pokazali smo da pod snažnim selekcijskim tlakom od strane Ly49H⁺ NK-stanica, MCMV aktivno mutira gen *m157* i na taj način izbjegava NK-posredovani nadzor infekcije.

Ključne riječi: Citomegalovirus; gen *m157*; imunološki nadzor, izbjegavanje; imunost, prirođena; NK-stanice; receptor Ly49H

SUMMARY

Objectives: To investigate the biological role of murine cytomegaloviral (MCMV) *m157* gene in the surveillance of MCMV-infection mediated by NK cells in Ly49H⁺ and Ly49H⁻ mouse strains.

Material and Methods: The recombinant MCMV carrying deletion of *m157* gene and its corresponding revertant virus with ectopically positioned *m157* gene within MCMV genome were tested in different Ly49H⁻ and Ly49H⁺ mouse strains. Recombinant MCMV viruses carrying deletion of a few immunoregulatory genes were also used. MCMV-sensitive or -resistant mice were infected intravenously or intraperitoneally with 2×10^5 plaque forming unit (PFU) and 5×10^5 PFU, respectively. A day prior to infection NK-cells were depleted and mice were sacrificed 3-4 days post infection. In order to monitor activation of Ly49H⁺ NK cells intracellular interferon gamma (IFN- γ) was measured. NKG2D-PE tetramer or antibodies specific for single NKG2D ligands were used for analyzes of NKG2D ligands expression on infected mouse embryonic fibroblasts by flow cytometry.

Results: Based on their early susceptibility to MCMV infection, mouse strains are classified as susceptible or resistant and this susceptibility/resistance is determined by a single locus named *Cmv1^f* or *Ly49h* that encodes for an activating NK-cell receptor, Ly49H. The ligand for this receptor is *m157* protein encoded by MCMV *m157* gene. Infection of Ly49H⁺ mice with *m157* deletion mutant results in gain of virulence of this mutant as compared to wild type (w.t.) infection or to infection with *m157* revertant virus strain. Furthermore, depletion of NK cells has no influence on *m157* deletion mutant virus titer. In the absence of *m157*, Ly49H⁺ mice react like MCMV-susceptible mouse strains. Depletion of Ly49H⁺ NK-cells and infection of newborn mice or mice that do not possess Ly49H receptor (BXD-8 mice) demonstrated that Ly49H⁺ NK cells are crucial in control of MCMV-infection. The *m157*/Ly49H interaction plays a role in MCMV control in the spleen and lungs, but not in the liver of infected animals. 129/Svj mice lack the activating receptor Ly49H but do express the inhibitory Ly49I NK cell receptor that binds to the *m157* protein. BALB/c mice also possess inhibitory receptor Ly49I. However, it is not capable of binding to *m157* protein. The inhibitory phenotype of *m157* deletion mutant was weak and equal in both 129/Svj and BALB/c mice indicating that *m157*/Ly49I interaction does not play a role in MCMV evasion of NK cell response. The absence of the *m157* gene gave us the opportunity to reveal the function of viral genes that down-modulate

NK cell activity in Ly49H⁺ mice. When searching for the gene involved in MCMV-resistance of PWK/Pas wild mice MCMV mutants carrying deletion of one or two genes within the $\Delta 6$ region (*m145-m158*) were tested in PWK/Pas x BALB/C F1 hybrid mice. No deletion mutant was found that has a phenotype similar to that of *m157* deletion mutant virus in Ly49H⁺ mice. Infection of MEFs derived from PWK/Pas x BALB/c F1 hybrid mice with w.t. MCMV revealed complete down-regulation of all known NKG2D ligands, indicating that another mechanism is involved in MCMV-resistance of these mice. In this study we also demonstrated that NK cell control of MCMV infection in mice of the C57BL/6 background is insufficient for a long-term survival if the host lacks the adaptive immunity. After only a single inoculum, a recrudescence of disease occurred due to MCMV mutants that escape NK cell control rather than to re-emergence of the original virus.

Conclusion: We showed for the first time that *m157* is the only MCMV-encoded ligand for the activating receptor Ly49H and that *m157*/Ly49I interaction is not important for efficient control of MCMV-infection *in vivo*. We also found that the strong selective pressure by Ly49H⁺ NK cells during the primary infection of C57BL/6 immunodeficient mice is sufficient for rapid selection of a large number of escape MCMV mutants.

Key words: Cytomegalovirus; gene *m157*; Immuno-evasion; Innate immunity; Ly49H receptor; NK cells.

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Općenito o citomegalovirusima	1
1.2	Imunosni nadzor CMV-infekcije	3
1.2.1	Uloga limfocita T u nadzoru CMV-infekcije	4
1.2.2	Uloga NK-stanica u nadzoru CMV-infekcije	5
1.3	NK-stanice	7
1.3.1	Aktivacija NK-stanica	8
1.3.2	Djelovanje NK-stanica	10
1.3.3	Receptori NK-stanica	11
1.3.3.1	Signaliranje receptora NK-stanica	13
1.3.3.2	Receptori s domenama sličnim imunoglobulinu	14
1.3.3.3	Receptori s domenama sličnim C-tipu lektina	16
1.3.3.3.1	Obitelj receptora Ly49	18
1.3.3.3.1.1	Inhibicijski receptori Ly49	19
1.3.3.3.1.2	Aktivacijski receptori Ly49	21
1.3.3.4	Manje specifični receptori NK-stanica	22
1.3.3.5	Ligandi za receptore NK-stanica	22
1.4	Osjetljivost MCMV-a na NK-stanice u ovisnosti o soju miševa	25
1.5	Mehanizmi CMV-a za izbjegavanje nadzora posredovanog NK-stanicama	28
1.5.1	Ispoljavanje homologa molekula MHC skupine I	30
1.5.2	Selektivna modulacija ispoljavanja molekula MHC skupine I	31
1.5.3	Inhibicija aktivacijskih receptora	32
1.5.4	Ispoljavanje proteina koji vežu citokine ili su antagonisti receptora citokina	33
1.5.5	Ispoljavanje virusnog receptora Fc	34
2	CILJ ISTRAŽIVANJA	35
3	MATERIJALI I METODE	37
3.1	Mediji za uzgoj stanica	37
3.2	Puferi	37

3.3 Monoklonska protutijela i poliklonski serumi	38
3.4 Virusi	39
3.4.1 Ciljana mutageneza MCMV BAC-a	40
3.4.2 Northern blot virusne RNA	42
3.4.3 Priprema virusa porijeklom iz žlijezda slinovnica	43
3.4.4 Umnožavanje virusa	43
3.4.5 Određivanje krivulje rasta virusa <i>in vitro</i>	44
3.4.6 Infekcija miševa	44
3.5 Laboratorijske životinje	45
3.6 Stanice	45
3.6.1 Proizvodnja stanica MEF-a	46
3.7 Hibridomi	46
3.7.1 Uzgoj hibridoma u životinjama	47
3.7.2 Precipitacija protutijela pomoću amonijevog sulfata	47
3.7.3 Određivanje koncentracije protutijela	48
3.7.4 Provjera specifičnosti protu-NK1.1 monoklonskih protutijela	49
3.8 Proizvodnja kunićjeg protuseruma na AGM1 antigen	50
3.9 Uklanjanje NK-stanica <i>in vivo</i>	51
3.10 Test aktivacije NK-stanica <i>in vitro</i>	52
3.11 Određivanje liganada za NKG2D protočnom citometrijom	53
3.12 Određivanje količine virusa u organima	54
3.13 Statističke metode	55
4 REZULTATI	56
4.1 Stvaranje rekombinantnih MCMV-a	56
4.2 Virusi $\Delta m157$ i $m157Rev$ ne razlikuju se od divljeg tipa MCMV-a <i>in vitro</i>	58
4.3 Nedostatak gena $m157$ povećava virulentnost MCMV-a u Ly49H ⁺ miševa	59
4.4 Nadzor MCMV-a od strane Ly49H ⁺ NK-stanica ovisan je o perforinu	62
4.5 Vraćanje gena $m157$ u genom MCMV-a rezultira ponovnom osjetljivošću MCMV-a na nadzor posredovan NK-stanicama	63

4.6	Transkript gena <i>m157</i> javlja se ranije tijekom infekcije virusom <i>m157Rev</i> nego tijekom infekcije virusom w.t. MCMV	66
4.7	Uklanjanje Ly49H ⁺ NK stanica nema značaja u kontroli virusa $\Delta m157$	67
4.8	Gen <i>m157</i> nije značajan u kontroli MCMV-a u miševa koji ne posjeduju receptor Ly49H	69
4.9	Gen <i>m157</i> nema značaj u MCMV-osjetljivim sojevima BALB/c i 129/Svj	71
4.10	Geni MCMV-a za izbjegavanje nadzora od strane NK-stanica sprječavaju nadzor nad virusom $\Delta m157$	73
4.11	Otpornost divljih miševa soja PWK/Pas na MCMV-infekciju nije posredovana djelovanjem gena <i>m157</i>	78
4.12	Otpornost miševa PWK/Pas na MCMV-infekciju nije posljedica aktivacije receptora NKG2D	82
4.13	Izbjegavanje imunosnog nadzora posredovanog NK-stanicama mutacijom gena MCMV-a koji određuje ligand za aktivacijski receptor NK-stanica	85
5	RASPRAVA	89
6	ZAKLJUČCI	99
7	CITIRANA LITERATURA	100

1 UVOD

1.1 Općenito o citomegalovirusima

Citomegalovirusi (CMV) su članovi obitelji *Herpesviridae*, podobitelji *Betaherpesvirina*. Kao i u ostalih članova ove obitelji, njihov genom izgrađen je od dvolančane deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA), koja je okružena proteinskim omotačem (kapsidom) ikozaedrične simetrije. Kapsidu tvori 12 pentameričkih i 150 heksameričkih kapsomera, a izvana je obavijena asimetričnom ovojnicom (tegumentom) izgrađenom od amorfne tvari. Oko tegumenta nalazi se dvoslojna lipidna ovojnica u koju su uloženi glikoproteini koji strše s površine viriona.

CMV-e karakterizira specifičnost za vrstu, tropizam za krvotvorno tkivo i žlijezde slinovnice, dug replikacijski ciklus, spori rast u kulturi stanica te relativno veliki genom od približno 235 kbp. Stanice inficirane CMV-om postaju povećane (citomegalične) te sadrže karakteristične uklopine u jezgri i citoplazmi. Stvaranjem novih virusa dolazi do nepovratnog oštećenja i uništenja inficirane stanice.

Primarna infekcija s CMV-om u imunokompetentnog domaćina obično prolazi bez kliničkih znakova i simptoma, a manifestna bolest javlja se uslijed infekcije imunološki nezrelih ili imunološki kompromitiranih domaćina. Tako je npr. infekcija humanim CMV-om (HCMV) vodeća oportunistička infekcija u bolesnika s AIDS-om, a vrlo je česta i kod pacijenata na imunosupresivnoj terapiji (npr. pacijenti nakon transplantacije organa). Osim toga, kongenitalna infekcija HCMV-om najčešći je infektivni uzročnik kongenitalnih malformacija u razvijenim zemljama s incidencijom od 0,2-2,2% (1, 2). Premda CMV-infekcija u imunokompetentnog domaćina ne izaziva kliničke smetnje, imunosni sustav ne uspijeva u cijelosti ukloniti virus iz organizma. Naprotiv, CMV u domaćinu uspostavlja doživotnu perzistenciju tijekom

koje se izmjenjuju razdoblja latencije, karakterizirana odsutnošću umnožavanja virusnog genoma, s razdobljima produkcije malih količina novih viriona. Zbog velikog značaja infekcija HCMV-om, njegova su svojstva dobro proučena, a i dalje se vrše brojna istraživanja. Međutim, zbog već navedene specifičnosti za vrstu HCMV se ne može izučavati na animalnom modelu. S druge strane, pojedini CMV-i međusobno su vrlo slični u biološkim osobitostima, građi genoma te u mehanizmima imunskog nadzora. Zbog toga je infekcija miševa mišjim citomegalovirusom (MCMV) najčešći model ispitivanja patogeneze i imunobiologije CMV- infekcija (3).

Proces infekcije stanice CMV-om vrlo je složen. Virus najprije prijanja za površinu stanice, a zatim dolazi do fuzije virusne ovojnice sa staničnom membranom nakon čega virion uđe u stanicu. Potom dolazi do postupne razgradnje virusne nukleokapside i njezinog transporta do stanične jezgre u kojoj započinje proces prepisivanja virusnih gena s njegove DNA (4). Ispoljavanje gena CMV-a odvija se kaskadno te je čitav replikacijski ciklus CMV-a podijeljen u tri razdoblja: neposredno rano (engl. *immediate early*, IE), rano (engl. *early*, E) i kasno razdoblje (engl. *late*, L) (2). U skladu s tim i geni CMV-a su podijeljeni u tri skupine: IE, E i L.

Neposredno rano razdoblje replikacijskog ciklusa CMV-a započinje odmah nakon prijenosa virusne DNA u jezgru inficirane stanice i kod MCMV-a traje 2 sata. Virusni geni ovog razdoblja određuju nestrukturane regulacijske bjelančevine koje potiču ispoljavanje gena ranog razdoblja. Rano razdoblje kod MCMV infekcije traje 14 sati, a funkcija gena ovog razdoblja je stvaranje uvjeta za replikaciju virusne DNA i morfogeneza viriona (2, 5). Tijekom ranog razdoblja replikacije virusa ispoljavaju se i geni čiji su produkti uključeni u mehanizme kojima CMV nastoji izbjeći imunski odgovor domaćina (npr. geni *m04*, *m06*, *m152*, *m145*, *m155*) (6-10). Kasno razdoblje replikacije virusa traje 8 sati kod infekcije MCMV-om i u tom razdoblju dolazi do

prepisivanja gena čiji su produkti uglavnom strukturni glikoproteini i dolazi do umnažanja virusne DNA (5). Na kraju, u jezgri stanice dolazi do stvaranja virusne nukleokapside koja potom prelazi u citoplazmu gdje se omata tegumentom od amorfnog matriksa. U vezikularnom sustavu citoplazme inficirane stanice virus se oblaže lipoproteinskom ovojnicom (5).

Putevi kojima CMV-i ulaze u domaćina još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Infektivni virus može se naći u slini kronično inficiranih miševa, u epitelnim stanicama žlijezda slinovnica, epitelu probavnog, dišnog i urogenitalnog sustava miša (11). U ljudi, HCMV je također pronađen u epitelu probavnog, respiratornog te urogenitalnog trakta (12). Smatra se da se MCMV uglavnom širi preko sline i spolnim putem, dok se HCMV uglavnom širi spolnim putem i krvlju.

1.2 Imunosni nadzor CMV-infekcije

Učinkoviti imunosni nadzor zaslužan je za izostanak značajnijih kliničkih simptoma CMV- infekcije u imunokompetentnih domaćina. Imunosni nadzor MCMV- infekcije posredovan je različitim sastavnicama imunosnog sustava od kojih stanična imunost i interferoni (IFN) imaju ključnu ulogu kako u nadzoru primarne infekcije tako i u uspostavi latencije i sprječavanju reaktivacije virusa (11, 13). Inficirana stanica unutar nekoliko sati odgovara na infekciju lučenjem protuvirusnih citokina kao što su IFN- α i IFN- β koji sprječavaju umnažanje virusa te uzrokuju migraciju upalnih stanica na mjesto infekcije i potiču njihovu preobrazbu u efektorske stanice. IFN- α/β također pospješuju predočavanje virusnih peptida u sklopu jakih antigena tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) skupine I, što dovodi do prepoznavanja inficirane stanice od strane citotoksičnih CD8⁺ limfocita T (engl. *Cytotoxic T lymphocytes*, CTL) i njihove aktivacije. Tijekom CMV-infekcije također

dolazi i do stvaranja specifičnih protuvirusnih protutijela. Međutim, istraživanja provedena na mišjem modelu pokazala su da protutijela nisu neophodna za nadzor akutne MCMV-infekcije (14). Sukladno tome, primjena imunog seruma u novorođenčadi inficiranoj HCMV-om ublažila je simptome bolesti, ali nije suzbila replikaciju virusa u tkivima (15). Nadalje, uočeno je da se simptomi bolesti u imunokompromitiranih osoba javljaju unatoč prisustvu specifičnih protuvirusnih protutijela (16). Na mišjem je modelu također pokazano da protutijela ne mogu spriječiti pojavu rekurentnog virusa, ali mogu ograničiti njegovo širenje (17).

1.2.1 Uloga limfocita T u nadzoru CMV-infekcije

Ključnu ulogu u nadzoru CMV-infekcije imaju limfociti T. Značaj limfocita T u nadzoru infekcije MCMV-om pokazali su pokusi na atimičnim miševima koji ne posjeduju limfocite T. Ovakvi miševi povećano su osjetljivi na infekciju MCMV-om u odnosu na normalne eutimične miševе (18). Uloga pojedinih subpopulacija limfocita T u nadzoru MCMV-infekcije izučavana je na modelu adoptivnog prijenosa limfocita T ili uklanjanjem njihovih pojedinih subpopulacija.

Adoptivnim prijenosom CD8⁺ limfocita T izoliranih iz limfnih čvorova miševa tijekom akutne MCMV-infekcije (19) ili iz slezene miševa tijekom latentne infekcije (20) u imunosuprimirane singenične primatelje, dokazano je da su upravo CD8⁺ limfociti T najvažnija populacija stanica u imunosnom nadzoru MCMV-a. U skladu s tim su i rezultati koji pokazuju da u miševa inficiranih MCMV-om u kojih je provedeno dugotrajno uklanjanje CD4⁺ limfocita, preostali CD8⁺ limfociti T uspješno nadziru infekciju (21). Štoviše, aktivirani CD8⁺ limfociti T djelotvorni su i u terapiji manifestne CMV-bolesti. Naime, klinička primjena aktiviranih limfocita T u imunosuprimiranih

bolesnika s HCMV-bolešću nakon transplanatacije koštane srži pokazala se kao uspješan način imunoterapije (22).

Iako najvažniji, CD8⁺ limfociti T nisu i nezamjenjivi u nadzoru infekcije CMV-om, odnosno postoji velika mogućnost prilagodbe imunskog sustava tijekom infekcije. Naime, u miševa koji su deficitni za β 2-mikroglobulin (β 2m^{-/-}) i posljedično ne posjeduju molekule MHC skupine I i CD8⁺ limfocite T (23, 24) kinetika klirensa MCMV-a ne razlikuje se od one u kontrolnim miševima (25). Također, nakon uklanjanja CD8⁺ limfocita T infektivni virus biva uklonjen iz tkiva i organa kinetikom sličnom onoj kod životinja kojima nisu uklonjeni limfociti T (26). U pokusima adoptivnog prijenosa pokazano je da su kompenzacijski mehanizmi odgovorni za nadzor virusa kod nedostatka CD8⁺ limfocita T ovisni o CD4⁺ limfocitima T i citokinima (27, 28). Prema tome može se zaključiti da imunski sustav može nadomjestiti nedostatak jedne od svojih sastavnica. Izuzetak od ovog pravila je nadzor MCMV-infekcije u žlijezdama slinovnicama u čemu ključnu ulogu imaju CD4⁺ limfociti T dok sami CD8⁺ limfociti T, u slučaju uklanjanja CD4⁺ limfocita T, nisu u stanju ukloniti virus iz ovog organa (21).

1.2.2 Uloga NK-stanica u nadzoru CMV-infekcije

Premda ključnu ulogu u dugoročnom nadzoru CMV-infekcije imaju limfociti T, prirođena imunost važna je za imunološki nadzor infekcije unutar prvih nekoliko dana po infekciji (11, 17, 19, 26). NK-stanice (engl. *natural killer*), zajedno s granulocitima, NKT-stanicama (engl. *natural killer T cells*), makrofagima i dendritičkim stanicama, čine stanične sastavnice prirođene imunosti. Za razliku od antigen-specifičnih receptora efektorskih stanica stečene imunosti, stanice prirođene imunosti koriste receptore koji prepoznaju konzervirane molekularne obrasce ispoljene na velikom

broju mikroorganizama i na inficiranim stanicama. Jedni od najvažnijih receptora kojima se služe stanice prirodene imunosti slični su receptorima Toll pronađenim u drozofili (engl. *Toll-like receptor*, TLR) koji prepoznaju molekularne obrasce patogena (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) te endogene ligande kao što su proteini pobuđeni toplinom (engl. *heat shock proteins*, shp) (29). Tijekom ranog razdoblja CMV-infekcije važnu ulogu u nadzoru replikacije i širenja virusa imaju NK-stanice (30). NK-stanice na mjesto infekcije dospijevaju privučene citokinima i kemokinima što ih luče inficirane stanice i ostale stanice prirodene imunosti (31). Aktivnost NK-stanica najizrazitija je od 3. do 5. dana infekcije da bi nakon toga postupno slabila, a ulogu u nadzoru infekcije preuzimaju limfociti T. Prema do sada poznatim podacima čini se da upravo aktivacija protuvirusnog odgovora limfocita T na neki način «isključuje» djelovanje NK-stanica, najvjerojatnije lučenjem transformirajućeg čimbenika rasta β (engl. *transforming growth factor β* , TGF β) kojeg luče makrofazi pod utjecajem signala iz aktiviranih limfocita T (32).

Značaj NK-stanica u kontroli HCMV-infekcije opisan je u prikazu slučaja pacijentice s rijetkim poremećajem kojega karakterizira nedostatak NK-stanica (33). Pacijentica je imala diseminiranu infekciju hepresivirusima, uključujući i infekciju HCMV-om, unatoč normalnoj razini protutijela i limfocita T. Nadalje, slaba citotoksična aktivnost NK-stanica u vezi je s povećanom osjetljivošću na infekciju HCMV-om (34) i obrnuto, pojačana aktivnost NK-stanica povezana je s dobrim oporavkom od infekcije u transplantiranih pacijenata (35).

Brojna istraživanja u miševa s urođenim nedostatkom NK-stanica odnosno u miševa kojima su ove stanice uklonjene specifičnim protutijelima, pokazala su važnost NK-stanica u nadzoru MCMV-infekcije (36-39). Atimični miševi, iako bez limfocita T, mogu do određene razine nadzirati MCMV. Nakon uklanjanja NK-stanica

njihova sposobnost nadzora infekcije izrazito opada (40). SCID (engl. *severe combined immunodeficiency*) miševi također predstavljaju dobar model za proučavanje uloge NK-stanica tijekom virusne infekcije (41). Ovim miševima nedostaju limfociti T i B te je stoga kod njih moguće izučavati NK-stanice i njihovu važnost u nadzoru MCMV-infekcije bez uplitanja mehanizama stečene imunosti. Infekcija ovih miševa MCMV-om dovodi do povećane proliferacije i aktivacije NK-stanica, koja ostaje prisutna i kasnije tijekom infekcije, kada kod miševa s normalnom stečenom imunosti nadzor infekcije preuzimaju limfociti T. Iako ovi miševi nisu u stanju u potpunosti odstraniti MCMV iz tkiva i organa, uklanjanje NK-stanica povećava njihovu osjetljivost na virus (38, 39). Važnost NK-stanica potvrđena je i u pokusima s prijenosom tih stanica u inficirane, singenične, netom okoćene ili odrasle imunodepletirane miševe (42).

1.3 NK-stanice

NK-stanice su veliki granulirani limfociti koji nastaju u koštanoj srži i u zdravih ljudi čine približno 5%-10% limfocita periferne krvi odnosno oko 3% splenocita u zdravih miševa (43). Mali postotak NK-stanica može se naći i u drugim tkivima uključujući jetru, koštanu srž i placentu (43). Istraživanja u miševa s mutacijama gena koji određuju citokine ili njihove receptore pokazala su da je IL-15 kojega luče stromalne stanice koštane srži ključan u razvoju i održanju NK-stanica (44, 45). Međutim, modeli istraživanja razvoja NK-stanica u staničnoj kulturi pokazali su da su za njihov potpuni razvoj neophodni i drugi signali koji najvjerojatnije dolaze od stromalnih stanica koštane srži, a čiji učinak ne može nadomjestiti IL-15 (46, 47).

U ljudi NK-stanice ispoljavaju CD56, ali ne i antigen-specifični receptor limfocita T (engl. *T-cell antigen receptor complex*, TCR). Na osnovu količine molekula CD56 i CD16 na staničnoj membrani mogu se podijeliti u dvije skupine. Glavnoj je skupini

svojevrsna niska razina molekule CD56 (CD56^{dim}) i visoka razina molekule CD16 (CD16^{bright}), dok se manja skupina odlikuje visokom razinom molekule CD56 (CD56^{bright}) i niskom ili nikakvom razinom molekule CD16 (CD16^{dim}) (48). Za sada nije u potpunosti jasna uloga ovih dviju populacija NK-stanica *in vivo*. NK-stanice u miša ne ispoljavaju molekulu CD56, već na svojoj membrani posjeduju molekule NK1.1, DX5 i asialo ganglio-N-tetraosilceramid (AGM1). Iako su navedeni biljezi NK-stanica u miša ispoljeni i na dijelu limfocita T, na osnovu njih NK-stanice u miša opisuju se kao NK1.1⁺CD3⁻ i DX5⁺CD3⁻ (49). AGM1 ispoljen je i na NK-stanicama u ljudi (43).

Iako su NK-stanice prvi puta otkrivene zbog njihove «prirodne» sposobnosti da ubiju tumorske stanice *in vitro*, danas se zna da one sudjeluju i u obrani domaćina od unutarstaničnih bakterija (50) i parazita (51) te da igraju ključnu ulogu u nadzoru infekcija uzrokovanih različitim virusima, prije svega herpesvirusima (31, 33). Djelovanje NK-stanica najsnažnije je prvih dana infekcije tijekom kojih dolazi do pobuđivanja stečene imunosti te klonalne ekspanzije limfocita T i B koji će kasnije preuzeti imunološki nadzor infekcije.

1.3.1 Aktivacija NK-stanica

Načini na koje NK-stanice prepoznaju ciljne stanice razlikuju se od onih u limfocitima T i B. Dok limfociti T i B somatskom rekombinacijom i klonalnim odabirom stvaraju receptore koji su specifični za određene antigene, NK-stanice ispoljavaju receptore koji ne podliježu somatskoj rekombinaciji i klonalnom odabiru, već prepoznaju konzervirane molekule prisutne na površini inficiranih ili tumorskih stanica. Štoviše, NK-stanice ispoljavaju brojne inhibicijske i aktivacijske receptore o čijem ravnotežnom djelovanju ovisi da li će ili ne doći do aktivacije NK-stanica (49).

Putem inhibicijskih receptora, kojima kao ligandi služe molekule MHC skupine I, NK-stanice nadziru fiziološku razinu ispoljavanja navedenih molekula na površini normalnih, zdravih stanica. Istraživanja na tumorskim staničnim linijama *in vitro* koje su imale smanjenu razinu molekula MHC skupine I pokazala su da NK-stanice učinkovito ubijaju takve stanice (52, 53). Nadalje, T-stanični limfom RMA nesmetano se razvijao u singeničnim miševima, dok je njegova varijanta RMA-S, koja ne posjeduje molekule MHC skupine I, odbačena djelovanjem NK-stanica (54). Odbacivanje alogenog transplantata, koji posjeduje drugačije alele molekula MHC skupine I od primatelja također je posljedica djelovanja NK-stanica (55). Navedene su spoznaje dovele do postavljanja teorije da NK-stanice prepoznaju odsustvo vlastitoga (engl. *missing-self recognition*), prema kojoj izostanak ili smanjenje količine molekula MHC skupine I dovode do smanjenja inhibicijskih signala u NK-stanicama i posljedične lize ciljne stanice (56). Važno je međutim naglasiti da samo odsustvo liganada za inhibicijski receptor tj. molekula MHC skupine I, najčešće nije dostatno za aktivaciju NK-stanica. Naime, NK-stanice aktivacijskim receptorima vežu molekule čije je površinsko ispoljavanje pobuđeno infekcijom, stresom ili transformacijom i na taj način prepoznaju strano (engl. *missing self*), tumorske stanice (engl. *altered self*) ili patogene (engl. *pathogen non-self*) (57, 58).

Osim izravnim kontaktom sa ciljnom stanicom putem vezivanja receptor-ligand, NK-stanice mogu se aktivirati i djelovanjem različitih citokina. Inficirane stanice, dendritičke stanice i makrofagi izlučuju IFN- α , IFN- β , IL-12, IL-15 i IL-18 koji privlače NK-stanice na mjesto imunosne reakcije i stimuliraju ih na stvaranje citokina i kemokina (31, 59). Stvaranjem citokina i kemokina NK-stanice necitolitički nadziru virusne infekcije i doprinose razvoju specifične stečene imunosne reakcije (60).

1.3.2 Djelovanje NK-stanica

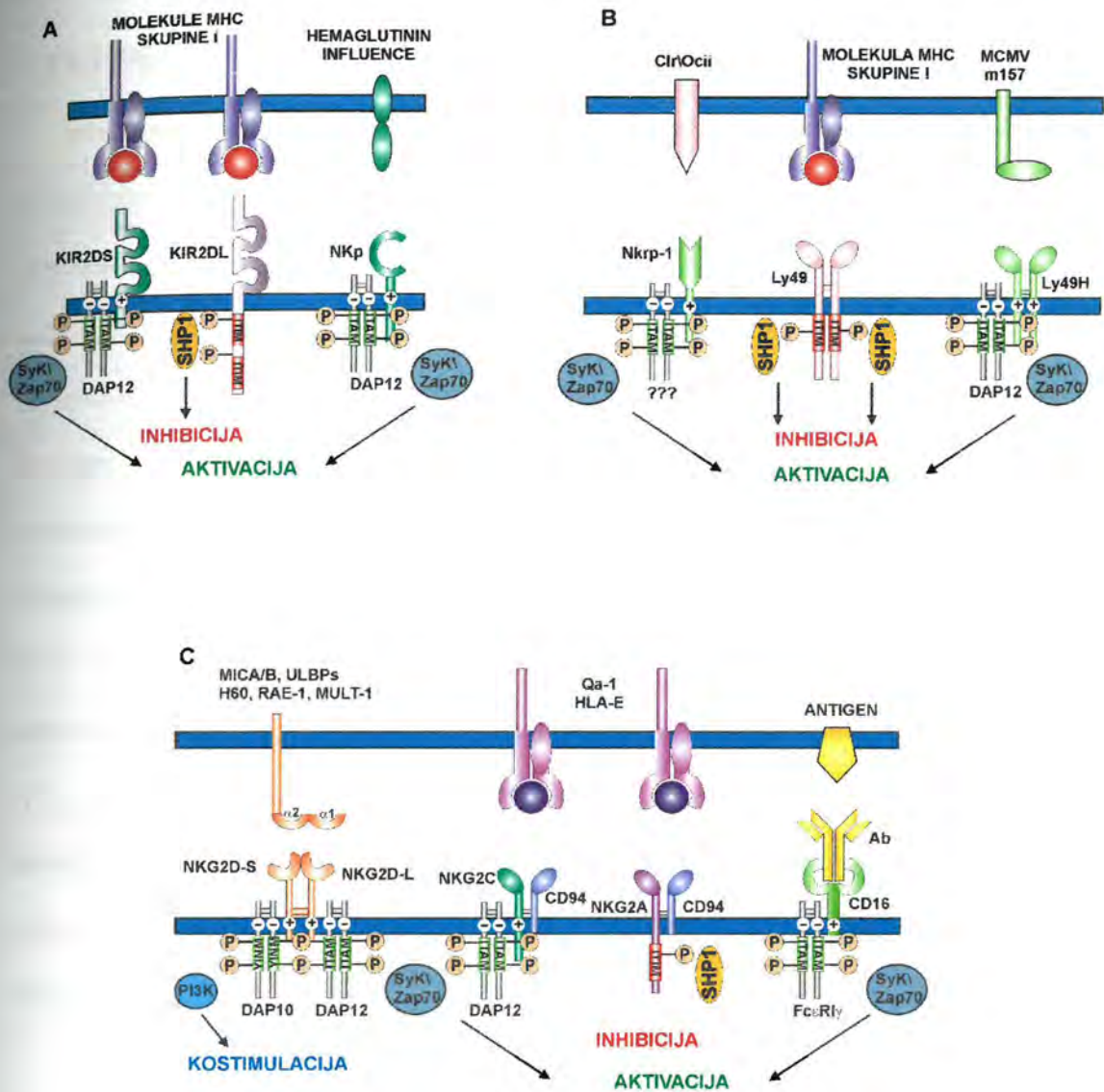
Slično citotoksičnim limfocitima T, NK-stanice na ciljnu stanicu djeluju izravno ili posredno. Glavni mehanizam izravnog djelovanja na ciljnu stanicu podrazumijeva otpuštanje citotoksičnih granula koje sadržavaju perforin i granzime, što ima za posljedicu razaranje ciljne stanice (61). NK-stanice mogu razoriti ciljnu stanicu i vezivanjem za stanične receptore čije pobuđivanje za posljedicu ima apoptozu. Tu su uključeni signalni put Fas-Fas ligand (62), put apoptoze TRAIL (engl. *tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand*) (63), put preko membranskog TNF- α (64) te stanična citotoksičnost ovisna o antitijelima (engl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) posredovane molekulom CD16 (43).

Posredni učinak NK-stanice ostvaruju lučenjem citokina kao što su IFN- γ , TNF- α , GM-CSF (engl. *granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*) (31) i kemokina kao što su MIP1- α /MIP1- β (engl. *macrophage inflammatory protein 1 α and 1 β*), RANTES (engl. *the factor regulated on activation-normal T cell expressed and secreted*) (65) i limfotaktin (engl. *activation induced, T cell-derived and chemokine-related cytokine*, ATAC) (66, 67). Presudnu ulogu među njima imaju IFN- γ i TNF- α . U početnom stadiju imunosnog odgovora tijekom velikog broja virusnih infekcija NK-stanice su glavni izvor IFN- γ (31). Njegovo je lučenje posljedica povišene razine IL-12 što ga luče inficirane stanice i makrofagi (68-70). IFN- γ , kao i drugi interferoni, povećava otpornost stanica na virusne infekcije, ali posreduje i brojne druge funkcije, među ostalima i sposobnost pobuđivanja makrofaga (71). Pobuđeni makrofagi lakše spajaju fagosome s lizozimima te stvaraju snažne antimikrobne tvari kao što su kisikovi radikali, dušikov oksid i proteaze (72). Nadalje, IFN- γ pojačava ispoljavanje molekula MHC skupine I i II na brojnim tipovima stanica te potiče diferencijaciju pomoćničkih limfocita T skupine 1 (71). Za razliku od IFN- γ , TNF- α luče i brojne

druge stanice prirodene imunosti te NK-stanice nisu glavni izvor ovog citokina čije je djelovanje u kontekstu infekcija s virusima slično djelovanju IFN- γ (68, 69).

1.3.3 Receptori NK-stanica

Kao što je već navedeno, NK-stanice ne koriste jedinstveni specifični receptor za antigen kao što je to slučaj za klonove limfocita T i B. Umjesto toga NK-stanice na svojoj površini ispoljavaju različite receptore prisutne na svim NK-stanicama ili nekim njihovim subpopulacijama. Obzirom na kemijsku građu receptori NK-stanica podijeljeni su u dvije glavne obitelji: receptori s domenama sličnim imunoglobulinu i receptori s domenama sličnim C-tipu lektina (73). Svaka od ovih obitelji sadržava receptore inhibicijskog ili aktivacijskog djelovanja koji svojom ravnotežom signaliranja reguliraju efektorske funkcije NK-stanica (**slika 1**).



Slika 1. Receptori NK-stanica i njihovi ligandi.

Shematski su prikazani glavni receptori NK-stanica i njihovi ligandi. **(A)** Receptori obitelji KIR i NKp (s izuzetkom NKp46) ispoljeni su samo na NK-stanicama ljudi, a kao ligandi im služe molekule MHC skupine I odnosno hemaglutinin virusa influence. **(B)** Receptori obitelji Ly49 i Nkrp-1 ispoljeni su samo na NK stanicama miševa. Ligandi za inhibicijske receptore Ly49 su molekule MHC skupine I, a za Nkrp-1 ligandi su molekule nazvane Ctr ili Ocii. **(C)** Receptori obitelji CD94/NGK2, receptor NKG2D i CD16 ispoljeni su na NK-stanicama i ljudi i miševa. Receptori CD94/NGK2 prepoznaju nekalsične molekule MHC skupine I, a aktivacijski receptor NKG2D prepoznaje široku paletu liganada čije se ispoljavanje može pobuditi stresom, infekcijom ili transformacijom stanica. Receptor CD16 veže se za segment Fc protutijela.

1.3.3.1 Signaliranje receptora NK-stanica

Inhibicijski receptori NK-stanica u citoplazmatskim domenama sadrže ITIM (engl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) sa slijedom aminokiselina V/IxYxxLV (74, 75). Po vezivanju inhibicijskog receptora za odgovarajući ligand dolazi do fosforilacije tirozinskih ostataka ITIM-a, što dovodi do aktivacije protein-tirozin-fosfataze SHP-1 koja zatim inhibira aktivaciju NK-stanice (76). Aktivacijski receptori NK-stanica ne posjeduju ITIM, već se preko pozitivno nabijenih aminokiselina u svom transmembranskom dijelu povezuju s posredujućim (adapterskim) proteinima koji su odgovorni za prijenos aktivacijskih signala u stanicu (77). Glavnina aktivacijskih receptora povezana je s proteinom DAP12 (DNAX-aktivirajući protein od 12 kDa), dok drugi signaliziraju preko $Fc\epsilon RI\gamma$, $CD3\zeta$ ili DAP10 (77). Vezivanje aktivacijskih receptora za ligande dovodi do aktivacije tirozin kinaza iz obitelji Src, posljedične fosforilacije tirozinskih ostataka na adapterskim proteinima i aktivacije protein-tirozin kinaza kao što su Syk/ZAP70 ili fosfatidil inozitol-3-kinaza (PI3-K) (76).

Adapterski proteini su transmembranski proteini s kratkom izvanstaničnom domenom, a u svom unutarstaničnom dijelu posjeduju ITAM (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) ili aminokiselinski motiv YxxM. Većina adapterskih proteina, uključujući DAP12, posjeduje ITAM. DAP12 se ispoljava kao homodimer vezan disulfidnim mostovima i sadrži jedan ITAM. Kao što je već navedeno, posljedica vezivanja liganda za aktivacijski receptor je fosforilacija tirozinskih ostataka na ITAM-u te aktivacija protein-tirozin kinaza Syk/ZAP70 nakon koje slijedi nizvodna fosforilacija i aktivacija NK-stanice (78).

DAP10 je također transmembranski protein ispoljen kao homodimer povezan disulfidnim mostovima, a u svojoj unutarstaničnoj domeni umjesto ITAM-a sadrži

aminokiselinski motiv YxNM (79). Po tome je sličan kostimulacijskim molekulama CD28, ICOS (engl. *inducible co-stimulatory molecule*) i CD137 koje svojim signaliranjem pojačavaju učinak primarnog receptora. Za razliku od drugih adapterskih molekula, DAP10 se ne veže niti s jednim aktivacijskim receptorom osim NKG2D. Signaliranje preko DAP10 dovodi do fosforilacije tirozinskog ostatka u YxNM motivu te se na njega veže p85 podjedinica PI3 kinaze što dovodi do aktivacije Grb2 (80, 81). Nizvodno ovome događaju je fosforilacija serin/treonin antiapoptotičke kinaze koja pospješuje preživljavanje stanica. Put signaliziranja PI3 kinaze potiče pomicanje perforina i granzima B prema ciljnim stanicama i lučenje citokina (82, 83). Tim se putem signaliziranja koristi kostimulacijski receptor NKG2D prilikom aktivacije limfocita T (84), ali i niz drugih proteina uključenih u razaranje ciljnih stanica te kostimulaciju, proliferaciju i lučenje citokina.

1.3.3.2 Receptori s domenama sličnim imunoglobulinu

Receptori iz ove obitelji strukturno su monomerni, transmembranski proteini tipa I. U ovu obitelj receptora pripadaju KIR (engl. *killer Ig-like receptors*), LIR (engl. *leukocyte Ig-like receptors*) te nedavno otkriveni NCR (engl. *natural cytotoxicity receptors*) (49, 73) (**slika 1A i C**). Svi su ovi receptori prisutni samo u ljudi, s izuzetkom receptora NKp46 iz obitelji receptora NCR čiji je homolog pronađen i u glodavaca (85).

Receptore KIR određuje 10 gena smještenih unutar LRC (engl. *leukocyte receptor cluster*) na 19. kromosomu. Ovi receptori posjeduju dvije ili tri imunoglobulinske domene u svom izvanstaničnome dijelu koje su u imenu receptora označene s 2D za dvije ili 3D za tri domene. Osim toga, mogu imati dug (engl. *long*, L) citoplazmatski rep od 76 do 84 aminokiselina ili kratak (engl. *short*, S) rep od 39

aminokiselina (76, 86). Oni s dugačkim citoplazmatskim repom u istom posjeduju motiv ITIM i signaliziraju inhibicijski, dok su oni s kratkim repom povezani s adapterskim proteinom DAP12 i imaju aktivacijska svojstva (86, 87) (**slika 1A**). Npr. KIR2DL ima 2 imunoglobulinske domene i dugačak citoplazmatski rep i stoga služi za inhibiciju NK-stanica, dok KIR3DS ima 3 imunoglobulinske domene i kratak citoplazmatski rep te dovodi do aktivacije NK-stanica. Na osnovu gore navedenih obilježja receptori KIR podijeljeni su u 13 grupa: KIR3DL1-2, KIR3DS1, KIR2DL1-5 i KIR2DS1-5 (86). Svaki pojedini KIR prepoznaje točno određene molekule MHC skupine Ia tj. HLA (engl. *human leucocytes antigen*) skupine Ia.

Receptori iz obitelji LIR ispoljeni su na limfocitima B, dendritičkim stanicama, granulocitima i NK-stanicama (88, 89). Geni koji ih određuju također se nalaze unutar LRC-a na 19. kromosomu. Obzirom da su ovi receptori uglavnom ispoljeni na stanicama mijeloičke loze, a samo rijetko ili uopće ne na NK-stanicama, smatra se da imaju malu ulogu u njihovoj inhibiciji odnosno aktivaciji (73).

NCR su aktivacijski receptori koji posreduju citotoksičnost neovisno o molekulama MHC skupine I (77). Ova obitelj uključuje receptore NKp30 (90), NKp44 (91) i NKp46 (92, 93). Gen za NKp46 nalazi se unutar LRC na 19. kromosomu, a geni koji određuju NKp44 i NKp30 smješteni su unutar genskog kompleksa koji određuje molekule MHC na 6. kromosomu (87, 94). NKp30 i NKp44 posjeduju po jednu imunoglobulinsku domenu, a NKp46 dvije takve domene u svom izvanstaničnom dijelu (77). NKp30 i NKp46 ispoljavaju sve NK-stanice neovisno o stupnju aktivacije uključujući i nezrele oblike (77). NKp30 povezan je sa adapterskim proteinom CD3 ζ , a NKp46 sa CD3 ζ ili Fc ϵ R1 γ od kojih prvi ima tri, a drugi jedan ITAM. Vezu s adapterskim proteinima ostvaruju posredstvom aminokiseline ariginina smještene u njihovim transmemembranskim domenama. NKp44 je posredstvom

aminokiseline lizina povezan s adapterskim proteinom DAP12. Budući je NKp44 ispoljen samo na NK-stanicama koje su aktivirane citokinima, a nije ispoljen na stanicama izoliranim iz periferne krvi, smatra se biljegom ljudskih aktiviranih NK-stanica. Stanični ligandi za receptore iz obitelji NCR nisu poznati, ali se zna da NKp46 i NKp44 vežu hemaglutinin virusa influence te hemaglutinin i neuraminidazu Sendai virusa (95, 96) (**slika 1A**). *In vivo* funkcija ovog međudjelovanja još je uvijek nepoznata.

1.3.3.3 Receptori s domenama sličnim C-tipu lektina

Receptori ove grupe su transmembranski proteini tipa II koji uključuju molekule CD94 kovalentno vezane u heterodimere s izoformama NKG2, receptor NKG2D, obitelj receptora Nkrp-1 (engl. *natural killer receptor protein-1*) koji su ispoljeni i u ljudi i u glodavaca te obitelj receptora Ly49 (engl. *lymphocyte antigen 49 complex*) koji su ispoljeni u glodavaca (49, 73) (**slika 1B i C**). Sve ove receptore određuju geni smješteni unutar NKC (engl. *natural killer gene complex*) na ljudskom kromosomu 12 odnosno mišjem kromosomu 6 (97).

Članove obitelji receptora CD94/NKG2 karakterizira sačuvanost između vrsta jer su to do sada jedini poznati receptori koji su aktivni i u ljudi i u miševa te u mnogih drugih životinja (73). Različite izoforme NKG2 (NKG2A, NKG2B, NKG2C i NKG2E) kovalentno su povezane s molekulom CD94. Ovisno o NKG2 komponenti heterodimera, receptori CD94/NKG2 imaju inhibicijska (CD94/NKG2A, CD94/NKG2B) ili aktivacijska svojstva (CD94/NKG2C, CD94/NKG2E) (98-100) (**slika 1C**). CD94/NKG2A i njegova varijanta CD94/NKG2B svoje inhibicijsko djelovanje posreduju preko ITIM motiva u svojim citoplazmatskim domenama. Aktivacijski receptori CD94/NKG2C i CD94/NKG2E povezani su s adapterskim proteinom DAP12

(101). Ovi receptori prepoznaju neklasične molekule MHC skupine Ib: HLA-E u ljudi i Qa1 u miša, povezane s peptidom porijeklom iz klasičnih molekula skupine I (100, 102, 103).

U obitelj CD94/NKG2 pripada i receptor NKG2D iako je strukturno i funkcionalno različit od ostalih članova ove obitelji. Ispoljava se kao homodimer i umjesto molekula MHC skupine Ib prepoznaje nekoliko različitih liganada male sličnosti s molekulama MHC skupine I (98, 104). Njegova je osobitost da aminokiselinama transmembranske domene može vezati adapterski protein DAP10 ili DAP12 te na taj način ostvaruje dvojako djelovanje: u vezi s proteinom DAP12 djeluje kao aktivacijski, a u vezi s DAP10 kao kostimulacijski receptor (105, 106) (**slika 1C**). U miša se NKG2D javlja u dva oblika koji su posljedica alternativnog prekrajanja RNA (engl. *RNA splicing*). Duži oblik NKG2D (engl. *long*, L) je za trinaest aminokiselina u citoplazmatskoj domeni duži od kratkog (engl. *short*, S) oblika (105, 106). Funkcionalna različitost signaliziranja ovog receptora posljedica je upravo postojanja tih dviju izoformi: NKG2D-S veže DAP10 i DAP12, a NKG2D-L samo DAP10. NKG2D-L ispoljavaju nestimulirane NK-stanice, dok je NKG2D-S ispoljen na aktiviranim NK-stanicama i aktiviranim CD8⁺ limfocitima T. U čovjeka je pronađen samo dugi oblik NKG2D. Nalazi se na aktiviranim NK-stanicama i CD8⁺ limfocitima T (107). Prema tome, NKG2D djeluje kao primarni aktivacijski receptor na mišjim i ljudskim NK-stanicama i NK1.1⁺ limfocitima T (81, 108). Nasuprot tome, na stanicama stečene imunosti (limfociti T) ima kostimulacijski učinak, tj. pojačava aktivaciju posredovanu TCR-om (84).

Obitelj receptora Nkrp-1 također je sačuvana u ljudi i glodavaca i uključuje aktivacijske receptore Nkrp-1c i Nkrp-1f te inhibicijski receptor Nkrp-1d (109-111) (**slika 1C**). Nkrp-1c (NK1.1) biljeg je aktiviranih NK-stanica u nekih sojeva miševa

kao npr. C57BL/6 (112). Ligandi za aktivacijske receptore još su uvijek nepoznati, a inhibicijski receptor Nkrp-1d prepoznaje specifične molekule slične C-tipu lektina (engl. *C-type lectin-related*, Clr) poznate i kao lektin koji inhibira osteoklaste (engl. *osteoclast inhibitory lectin*, Ocil) ispoljen na dendritičkim stanicama i makrofagima (113). Obzirom da su geni koji određuju Nkrp-1d i Clr/Ocil smješteni unutar istog dijela NKC-a, pretpostavlja se da njihovo međudjelovnje predstavlja alternativni način na koji NK-stanice razlikuju strano od vlastitog.

1.3.3.3.1 Obitelj receptora Ly49

Receptori Ly49 su prvi otkriveni i najbolje ispitani inhibicijski receptori NK-stanica koji prepoznaju molekule MHC skupine I (114) (**slika 1B**). To su transmembranski proteini tipa II koji su ispoljeni kao homodimeri povezani disulfidnim mostovima (115). U svom izvanstaničnom dijelu sadržavaju domenu sličnu C-tipu lektina (engl. *C-type lectin-like domain*, CTLD). CTLD je odlika obitelji proteina koji vežu ugljikohidrate na kalcij-ovisan način, a prototip ove obitelji je protein A koji veže manozu (engl. *mannose binding protein A*, MBP-A) koji veže ugljikohidrate na površini mikroorganizama i ubija ih aktivacijom komplementa (116). Iako posjeduju CTLD čini se da receptori Ly49 prepoznaju epitope na molekulama MHC skupine I neovisne o ugljikohidratima (117, 118). Do sada su poznata 23 receptora iz obitelji Ly49 i označeni su slovima od A do W, a određuju ih geni smješteni u području veličine 500 kb na samome kraju NKC-a na mišjem kromosomu 6 (119). Obitelj receptora Ly49 vrlo je polimorfna te su različiti receptori Ly49 različito ispoljeni u pojedinim sojeva miševa. Tako je npr. Ly49H ispoljen u soju miševa C57BL/6, ali ne i u soju BALB/c (120). U ljudi postoji jedan pseudogen koji određuje receptor Ly49L, ali u usporedbi s

mišjim molekulama Ly49 sekvenca Ly49L sadrži prijevremeni stop kodon što rezultira stvaranjem neaktivnog receptora (121).

Za razliku od inhibicijskog receptora CD94/NKG2A koji je ispoljen na NK-stanicama u mišjim fetusima ili tek okoćenim miševima (122) i u ljudskoj jetri (123), receptori Ly49 nisu ispoljeni tijekom intrauterinog života miša (124, 125). Udio NK-stanica koje ispoljavaju receptore Ly49 progresivno raste tijekom prvih nekoliko tjedana nakon okota, a postotak stanica koje ispoljavaju CD94/NKG2A opada. U dobi od oko 8 tjedana sve NK-stanice ispoljavaju jedan ili više receptora Ly49, a oko 50% NK-stanica ispoljava CD94/NKG2A. Još se uvijek ne zna kakav je uzorak ispoljavanja receptora KIR tijekom ontogeneze u ljudi.

Većina receptora Ly49 djeluje na način da inhibira NK-stanice dok su do sada istražena samo dva aktivacijska receptora, Ly49D i Ly49H.

1.3.3.3.1.1 Inhibicijski receptori Ly49

Inhibicijski receptori Ly49 u svom citoplazmatskom dijelu posjeduju ITIM putem kojega sprječavaju aktivaciju NK-stanica (**slika 1B**). Pojedinačni receptori specifično se vežu za neke izoforme molekula MHC skupine I, a za neke ne, čime omogućavaju NK-stanicama razlikovanje stanica koje ispoljavaju različite alele MHC skupine I (118, 126). Iako pripadaju obitelji receptora s domenama sličnim C-tipu lektina koji normalno vežu ugljikohidrate, receptori Ly49 vežu se na neglikozilirane molekule MHC skupine I (118, 127). Inhibicijski receptori Ly49 nisu ispoljeni samo na NK-stanicama već i na CD8⁺ limfocitima T (128).

Prototip receptora Ly49 je Ly49A (114). Osjetljivost tumorske stanične linije na lizu posredovanu Ly49A⁺ NK-stanicama ovisna je o prisustvu molekula MHC skupine I određenog haplotipa. Tako Ly49A⁺ NK-stanice uspješno ubijaju stanice tumora

porijeklom iz H-2^b, ali ne i one porijeklom iz H-2^d miša (114). Kada se H-2^b stanice tumora transficiraju pojedinim molekulama MHC skupine I H-2^d (K^d, D^d i L^d) Ly49A⁺ NK-stanice ne ubijaju samo one stanice koje su bile transficirane s H-2D^d i taj se učinak može spriječiti dodavanjem protutijela specifičnih za H-2D^d molekulu (114). Prema tome ligand za receptor Ly49A je molekula MHC skupine I H-2D^d. Vezivanje Ly49A za H-2D^d neovisno je o vrsti peptida koji je prezentiran u sklopu H-2D^d (129). Kristalizacija kompleksa Ly49A/D^d dovela je do spoznaje da postoje dva potencijalna mjesta na H-2D^d molekuli na koja se veže Ly49A (130). Jedno mjesto nalazi se u blizini krajnjeg dijela žlijeba u kojem je na H-2D^d vezan peptid, a drugo se nalazi ispod ovog veznog mjesta i podrazumijeva vezivanje za sve četiri domene molekule MHC skupine I ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ i $\beta 2m$). Daljnja istraživanja pokazala su da je najvjerojatnije ovo drugo mjesto ključno u vezivanju Ly49A i H-2D^d (131, 132). Za razliku od Ly49A, receptori Ly49I i Ly49C vežu se za H-2K^d odnosno H-2K^b samo kada su u sklopu tih molekula MHC predočeni određeni peptidi (127).

Razina ispoljavanja određenih inhibicijskih receptora Ly49 ovisi o ispoljavanju molekula MHC skupine I koje mu služe kao ligand i o afinitetu vezivanja za iste (133, 134). Npr. miševi koji posjeduju molekulu MHC skupine I za koju određeni receptor Ly49 ima slabi afinitet, imaju višu razinu ispoljavanja tog receptora Ly49 od miševa koji posjeduju ligand visokog afiniteta za isti receptor. Ovo najvjerojatnije služi za finu regulaciju aktivnosti NK-stanica. Nedavno istraživanje provedeno na ljudima inficiranim virusom hepatitisa C (HCV) potvrđuje ulogu inhibicijskih receptora u preciznoj regulaciji djelovanja NK-stanica (135). Lokus HLA-C određuje dvije izoforme molekule HLA-C koje se razlikuju prema tome da li na 80-om mjestu u proteinu posjeduju aminokiselinu asparagin (HLA-C1) ili lizin (HLA-C2) i služe kao ligand za inhibicijske receptore obitelji KIR. Receptori KIR funkcionalni su homolozi

receptora Ly49 u ljudi. HLA-C1 veže se slabim afinitetom za KIR2DL2 i KIR2DL3, dok KIR2DL1 ima visoki afinitet za HLA-C2. U ljudi koji su homozigoti za HLA-C1 inhibicija NK-stanica je relativno slaba u odnosu na ljude koji su heterozigoti ili homozigoti za HLA-C2, što ima za posljedicu snažniju aktivaciju NK-stanica i u ovom slučaju klirens HCV-infekcije.

1.3.3.3.1.2 Aktivacijski receptori Ly49

Do sada su istražena samo dva aktivacijska receptora iz ove obitelji: Ly49D i Ly49H (115). U svom citoplazmatskom repu ne posjeduju motiv ITIM, već su preko pozitivno nabijenih aminokiselina u svom transmembranskom dijelu povezani s adapterskim proteinom DAP12 (136) (**slika 1B**). Ly49D veže nekoliko različitih molekula MHC skupine I, uključujući i H-2D^d (137, 138) te može na sebe vezati i neke ksenogenične molekule MHC (139). Receptor Ly49H ispoljen je na oko 50% NK-stanica u miševa C57BL/6 (140), a njegova aktivacija dovodi do mobilizacije kalcija, produkcije citokina i lize ciljne stanice (141). Ligand za receptor Ly49H bio je sve donedavno nepoznat, ali se znalo da igra važnu ulogu u nadzoru MCMV-infekcije (142-144). Budući receptori iz obitelji Ly49 vežu molekule MHC skupine I, pretpostavljalo se da Ly49H veže molekulu MHC u sklopu koje je predočen virusni peptid ili molekulu MHC čije je ispoljavanje povećano tijekom MCMV-infekcije. Međutim, MCMV-infekcija fibroblasta porijeklom iz miševa koji ne posjeduju β_2m niti TAP-1, a samim time niti molekule MHC, pokazala je da Ly49H⁺ stanice ipak prepoznaju inficirane stanice (120). Ispoljavanje pojedinih gena MCMV-a *in vitro* dovelo je do otkrića da Ly49H veže protein što ga određuje gen *m157* MCMV-a (120, 145).

1.3.3.4 Manje specifični receptori NK-stanica

Prvi aktivacijski receptor otkriven na NK-stanicama je receptor za segment Fc imunoglobulina (146). Kada specifična protutijela vežu antigene na površini inficiranih stanica, na njihov se segment Fc veže receptor Fc tipa III (Fc γ RIII, CD16) što dovodi do ADCC-a. Receptor CD16 sadrži dvije izvanstanične imunoglobulinske domene te se ispoljava kao transmembranski ili vezani za glikozil-fosfatidil-inozitol (GPI) (147) (**slika 1C**). Signalizira putem posredujućih proteina Fc ϵ RI γ ili CD3 ζ (148), a njegovo vezivanje za segment Fc imunoglobulina na površini opsonizirane stanice dovodi do otpuštanja perforina i granzima iz citolitičkih granula NK-stanica.

Neke uobičajene membranske molekule također mogu pobuditi ili modulirati citotoksičnost i lučenje citokina od strane NK-stanica. Među njima su CD2, 2B4 (CD244), CD11a-CD18, CD56 i CD69 (149). 2B4 je, primjerice, molekula vezana za GPI koju u ljudi ispoljavaju NK-stanice i dio CD8⁺ limfocita T, a u miša NK-stanice, CTL-i i $\gamma\delta$ limfociti T. Član je obitelji proteina CD2, a ligand joj je vjerojatno molekula CD48. Obzirom da ima citoplazmatsku domenu bogatu tirozinima 2B4 za signaliranje ne koristi adapterske proteine (77). Adhezijska molekula LFA-1 (engl. *lymphocyte-function-associated protein 1*) također može djelovati kao aktivacijski receptor NK-stanica budući njezino vezivanje liganda ICAM-1 (engl. *intracellular adhesion molecule 1*) na ciljnim stanicama rezultira preuređenjem citoskeleta i pojačavanjem signala drugih aktivacijskih receptora (150, 151).

1.3.3.5 Ligandi za receptore NK-stanica

Molekule MHC skupine I ligandi su za tri glavna tipa inhibicijskih receptora NK-stanica: KIR, Ly49 i CD94/NKG2 (**slika 1**). Nadzor nad ispoljavanjem molekula MHC skupine I na ciljnim stanicama može biti izravan i posredan. Dok obitelj receptora KIR

i Ly49 izravno prepoznaje molekule MHC skupine I, obitelj receptora CD94/NKG2 posredno prepoznaje navedene molekule (73). Receptori CD94/NKG2 vežu se za neklasične molekule MHC skupine Ib (100, 102, 103). U sklopu ovih molekula predložen je peptid od devet aminokiselina porijeklom iz signalne sekvence klasičnih molekula MHC skupine Ia (152, 153). Samo one stanice koje stvaraju molekule MHC skupine Ia ispoljavati će na sebi ligande za receptore CD94/NKG2.

Aktivacijski receptori NK-stanica, osim što prepoznaju molekule MHC skupine I, vežu na sebe i molekule koje su po građi slične molekulama MHC, ali se njihovo ispoljavanje može povećati transformacijom, stresom ili infekcijom (57). Nije do kraja razjašnjena svrha postojanja aktivacijskih receptora koji prepoznaju molekule MHC ispoljene na normalnim, zdravim stanicama. Pretpostavlja se da oni mogu služiti za praćenje razine ispoljavanja tih molekula ili pak za prepoznavanje molekula MHC koje predložuju mikrobne peptide.

Najsnažniji aktivacijski receptor NKG2D prepoznaje širok spektar liganada (**slika 1C**) čija je razina ispoljavanja na površini zdravih stanica jako niska, ali se može povećati infekcijom, transformacijom ili stresom (154). NKG2D u ljudi prepoznaje dvije obitelji proteina koji su slični molekulama MHC skupine I, a određuju ih geni smješteni na 6. kromosomu (104, 107, 154). Prvu skupinu čini jako polimorfna obitelj gena MIC (engl. *MHC class I-related chain*) koja uključuje MICA i MICB. Ovi proteini posjeduju domene $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ molekula MHC skupine I, ali za razliku od njih ne vežu β_2m i peptid (154). Iako u miša nisu pronađeni homolozi obitelji gena MIC, opisana su dva gena smještena na 7. kromosomu koji pokazuju određenu sličnost s njima (155). Druga grupa liganada uključuje polimorfnu obitelj proteina ULBP (engl. *UL16-binding protein*) koja se naziva i RAET (156). Članovi ove obitelji također posjeduju $\alpha 1$ i $\alpha 2$ domene molekula MHC skupine I, a za membranu se uglavnom vežu GPI-vezom

(157). Od svih poznatih članova ove obitelji samo RAET1E (ULBP4) i RAET1G imaju transmembranske domene, tj. nisu GPI-vezani proteini (104). Ova obitelj gena homologna je nekim mišjim genima koji određuju ligande za NKG2D (156). Ligandi za receptor NKG2D u miša su: H60, prekursorski protein dominantnog H-antigena (engl. *minor histocompatibility H-antigen*), RAE-1 (engl. *Retinoic acid early inducible genes 1*) koji uključuje izoforme α , β , γ , δ , i ϵ te MULT-1 (engl. *murine UL-16 binding protein like transcript 1*) (104, 107, 154). Geni koji određuju ove ligande smješteni su na 10. kromosomu. Sva tri liganda posjeduju domene $\alpha 1$ i $\alpha 2$ molekula MHC skupine I. H60 je za sada jedini NKG2D ligand za koji je potvrđeno ispoljavanje na površini normalnih stanica odraslih životinja: pronađen je u velikim količinama u timusu miševa soja BALB/c. Osim toga glasnička RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA) za H60 ispoljava se u splenocitima, makrofagima slezene i dendritičkim stanicama (158). H60 nije pronađen u soju miševa C57BL/6. Proteini obitelji RAE-1 imaju ulogu tijekom embrionalnog razvoja miša, a njihovo je ispoljavanje moguće pobuditi retinoičnom kiselinom (159). Proteini RAE-1 nisu pronađeni niti u jednom organu odraslog miša, dok su transkripti RAE-1 pronađeni u malim količinama samo u slezeni i jetri. Važno je naglasiti da infekcija MCMV-om dovodi do pojačanog ispoljavanja ovog proteina (160), a posljedica je signaliziranja preko receptora Toll 3 i 9 (161). Posljednji identificirani NKG2D ligand je MULT-1 koji je ime dobio na osnovu sličnosti s ULBP-om, NKG2D ligandom u ljudi (162, 163). Za razliku od prethodna dva liganda, MULT-1 mRNA je široko rasprostranjena u nelimfoidnom tkivu odraslih životinja te se njegovo ispoljavanje, poput proteina RAE-1, povećava prilikom infekcije MCMV-om (9).

Ligand za aktivacijski receptor Ly49H je protein što ga određuje gen *m157* MCMV-a (120, 145) (**slika 1B**). Njegova primarna struktura ne pokazuje homologiju s

niti jednim do sada poznatim proteinom (osim s proteinom m157 štakorskog CMV-a). Računalnom predikcijom sekundarne strukture proteina m157 uočeno je da on nalikuje neklasičnim molekulama MHC kao što su CD1, T22 i H-2M3 (120). Gen *m157* pripada *m145*-genskoj obitelji MCMV-a, a određuje GPI-vezani protein koji posjeduje domene $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ molekula MHC skupine I (145). Ova povezanost proteina m157 sa molekulama MHC upućuje na mogućnost da je MCMV zapravo «prisvojio» gene od svog domaćina i promijenio ih u vlastite svrhe. Važno je naglasiti da se protein m157 veže i na inhibicijski receptor NK-stanica Ly49I u soju miševa 129/Svj.

1.4 Osjetljivost MCMV-a na NK-stanice u ovisnosti o soju miševa

Različiti sojevi laboratorijskih miševa pokazuju različitu razinu osjetljivosti odnosno otpornosti na MCMV-infekciju. Ta je osjetljivost/otpornost pojedinih sojeva miševa posljedica višegenske kontrole koja uključuje gene koji određuju molekule MHC skupine I i druge gene čije djelovanje nije u vezi s molekulama MHC, tzv. ne-MHC gene. Sojevi miševa haplotipa H-2^k kao što su C3H i CBA vrlo su otporni na infekciju MCMV-om, soj C57BL/6 (H-2^b) je također otporan na infekciju, dok su sojevi BALB/c i DBA koji su haplotipa H-2^d osjetljivi na infekciju (164, 165) što je u suglasju s rezultatima dobivenim *in vitro* na staničnim linijama makrofaga i fibroblasta te ulogom pojedinih molekula H-2 pri ulasku virusa u stanicu (166, 167). Međutim, i geni koji ne određuju molekule MHC imaju utjecaja na otpornost miševa na MCMV (168). Jedan od takvih gena je i gen *Cmv1* smješten unutar NKC-a na mišjem kromosomu 6 (169, 170) koji je odgovoran za kontrolu MCMV-infekcije u slezeni, koštanoj srži i timusu (171). Aleli lokusa *Cmv1* određuju osjetljivost (*Cmv1^s* – recesivni alel) odnosno otpornost (*Cmv1^r* – dominantni alel) na MCMV-infekciju (172, 173). Alel

Cmv1^f prisutan je u soju miševa C57BL/6, a *Cmv1^s* u soju BALB/c. Četvrtog dana po MCMV-infekciji *Cmv1^s* sojeva miševa virus u slezeni dostiže titar koji je 10^3 do 10^4 puta veći od onog u *Cmv1^f* miševima. Nadalje, uklanjanje NK-stanica u miševa *Cmv1^f* dovodi do povišenja titra virusa, za razliku od miševa *Cmv1^s* u kojih isti postupak ne utječe na titar MCMV-a (8). Obzirom na to moglo bi se reći da je u miševa *Cmv1^s* MCMV otporan na NK-stanice, dok je u miševa *Cmv1^f* MCMV osjetljiv na kontrolu posredovanu NK-stanicama.

Godine 2001. tri su istraživačke grupe neovisno otkrile da je učinak *Cmv1^f* na MCMV-infekciju zapravo posredovan genom *Ly49h* koji određuje aktivacijski receptor na NK-stanicama, Ly49H (142, 143, 174). Naime, uočeno je da populacija NK-stanica koja ispoljava ovaj receptor biva aktivirana tijekom MCMV-infekcije te da njihovo uklanjanje, ali ne i uklanjanje NK-stanica koje ispoljavaju druge receptore Ly49 dovodi do povećanja titra virusa (143). Do gotovo istog zaključka dovela su i istraživanja na rekombinantnom soju miševa BXD8 nastalog križanjem miševa C57BL/6 (MCMV-otporni) i DBA/2 (MCMV-osjetljivi) (175). Iako ovi miševi posjeduju NKC iz soja C57BL/6 te bi prema tome trebali biti otporni na infekciju MCMV-om, oni zbog mutacije gena *Ly49h* ne posjeduju aktivni receptor Ly49H te su stoga osjetljivi na MCMV-infekciju (142, 174). Istraživanja na miševima s mutacijom motiva ITAM unutar adapterskog proteina DAP12, preko kojega Ly49H prenosi aktivacijski signal u stanicu, pokazala su da su ovi miševi pojačano osjetljivi na MCMV-infekciju zbog nemogućnosti aktivacije NK-stanica (176). Dodatnu potvrdu značaja ovog receptora dala su i istraživanja na miševima osjetljivim na MCMV u kojih je transgenskom tehnologijom nadomješten nedostatak receptora Ly49H te su oni stoga postali otporni na MCMV-infekciju (177).

Kao što je već navedeno, Ly49H specifično prepoznaje MCMV-inficirane stanice. Prije dvije godine dvije su grupe autora koristeći ispoljavanje pojedinih gena MCMV-a *in vitro*, pokazale da se protein što ga određuje gen *m157* veže na receptor Ly49H i dovodi do aktivacije NK-stanica (120, 145). Tijekom infekcije MCMV-om dolazi do proliferacije i nakupljanja NK-stanica na mjestu infekcije (31). Obzirom na ispoljavanje receptora Ly49H proliferacija NK-stanica u miševa C57BL/6, koji ispoljavaju ovaj receptor, može se podijeliti u dvije faze: specifičnu i nespecifičnu (144). Proliferacija NK-stanica tijekom prva dva dana od infekcije je nespecifična obzirom na Ly49H. Ona se dešava pod utjecajem IFN- α/β koji potiče dendritičke stanice i makrofage na izlučivanje IL-15, a on potiče NK-stanice na proliferaciju (69, 178). Između 2-6 dana infekcije dolazi do specifične proliferacije Ly49H⁺ stanica (144) koje su ključne u otpornosti na MCMV-infekciju, a važnu ulogu u tome imaju IL-18, IL-12 i CD8 α^+ dendritičke stanice (59). Specifičnost ove druge faze proliferacije NK-stanica za MCMV-infekciju pokazuje i podatak da u miševa inficiranih virusom vakcinije dolazi do prve, nespecifične proliferacije, ali ne i Ly49H-specifične proliferacije NK-stanica (144). Nakon 6. dana infekcije dolazi do smanjenja broja i Ly49H⁻ i Ly49H⁺ NK-stanica i ulogu nadzora nad MCMV-infekcijom preuzimaju stanice stečene imunosti. To smanjenje broja NK-stanice moglo bi biti pod utjecajem IL-21 kojeg luče aktivirani CD4⁺ limfociti T (179).

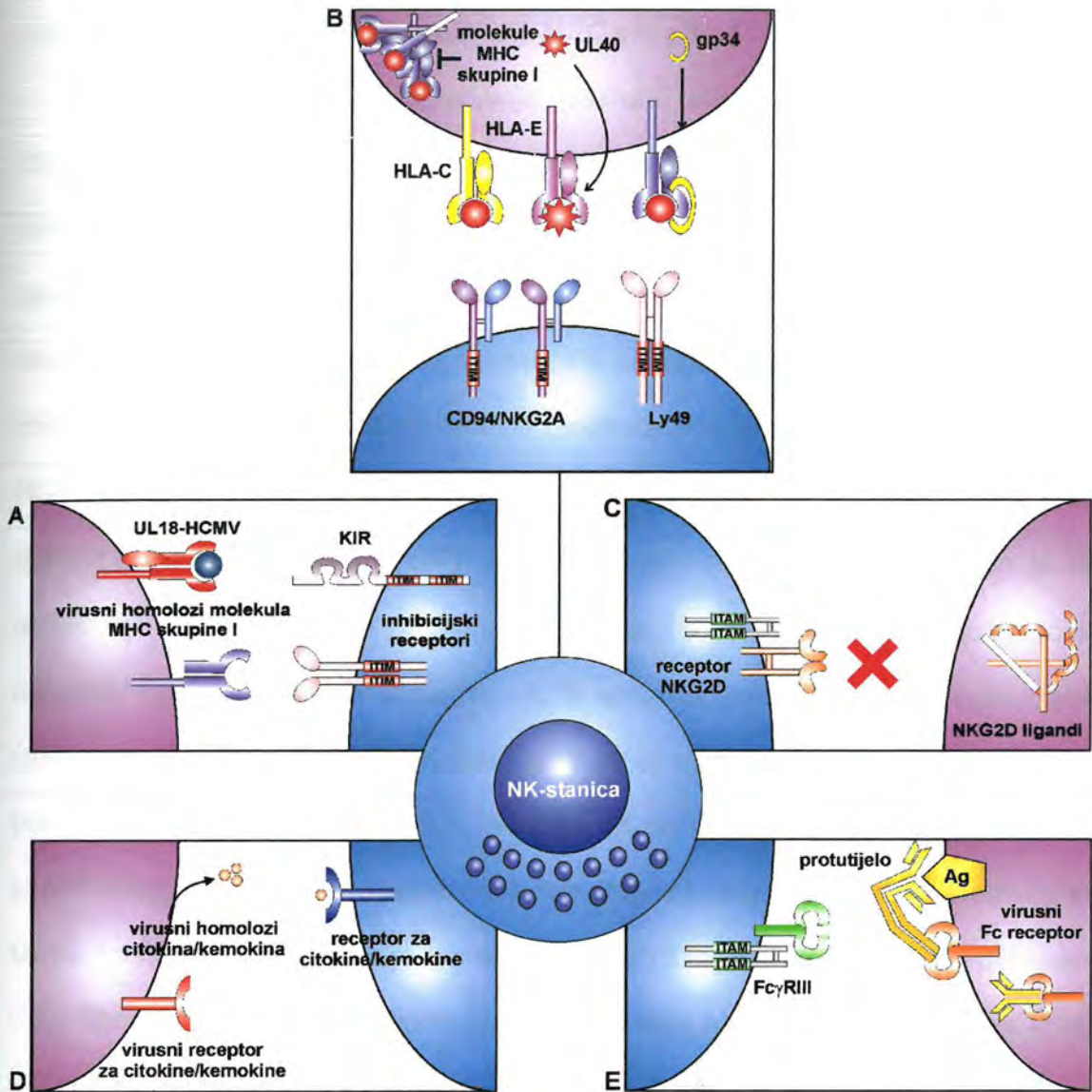
Osim što se rani nadzor nad MCMV-infekcijom razlikuje između pojedinih sojeva, on je različit i u različitim organima. Najbolji primjer za to je NK-ovisan nadzor MCMV-infekcije u slezeni i jetri. U normalnoj jetri prisutno je vrlo malo NK-stanica, ali one tijekom MCMV-infekcije bivaju privučene iz krvi na mjesta upale u jetrenom parenhimu (180, 181). Ovo privlačenje NK-stanica u jetru neovisno je o citokinima IL-12, IFN- γ i TNF- α (180). Budući je u MCMV-inficiranih miševa kojima nedostaje

kemokin MIP-1 α smanjen broj NK-stanica u jetri pretpostavlja se da je upravo ovaj kemokin odgovoran za njihovu migraciju u blizinu inficiranih hepatocita (182, 183). U bliskom kontaktu s inficiranim hepatocitima NK-stanice se aktiviraju i luče IFN- γ te na taj način kontroliraju MCMV-infekciju u jetri (70, 184). Za razliku od jetre, u slezeni postoji relativno veliki broj NK-stanica. MCMV inficira marginalnu zonu slezene neposredno uz crvenu pulpu (180, 181). Ova je zona bogata makrofagima i dendritičkim stanicama što upućuje na to da bi upravo ove stanice mogle biti meta djelovanja NK-stanica koje kontrolu MCMV-infekcije u ovom organu posreduju putem izlučivanja citolitičkih granula ispunjenih perforinom i granzimima (184).

1.5 Mehanizmi CMV-a za izbjegavanje nadzora posredovanog NK-stanicama

Citomegalovirusi su, poput drugih članova obitelji herpesvirusa, razvili brojne mehanizme kojima se opiru imunosnom nadzoru posredovanom i prirođenom i stečenom imunosti (185, 186). Mehanizmi kojima se CMV-i opiru imunosnom nadzoru posredovanom NK-stanicama (**slika 2**) uključuju:

- 1) ispoljavanje homologa molekula MHC skupine I
- 2) selektivnu modulaciju ispoljavanja molekula MHC skupine I
- 3) inhibiciju aktivacijskih receptora
- 4) ispoljavanje proteina koji vežu citokine ili su antagonisti receptora citokina
- 5) ispoljavanje virusnog receptora Fc



Slika 2. Mehanizmi CMV-a u izbjegavanju nadzora posredovanog NK-stanicama.

Shematski je prikazano 5 glavnih načina kojima CMV nastoji izbjeći nadzor posredovan NK-stanicama: (A) ispoljavanje homologa molekula MHC skupine I, (B) selektivna modulacija ispoljavanja molekula MHC skupine I, (C) inhibicija aktivacijskih receptora, (D) ispoljavanje proteina koji vežu citokine ili su antagonisti receptora citokina, (E) ispoljavanje virusnog receptora Fc

1.5.1 Ispoljavanje homologa molekula MHC skupine I

U cilju izbjegavanja prepoznavanja inficirane stanice od strane CD8⁺ CTL-a CMV-i posjeduju brojne gene čiji produkti negativno reguliraju ispoljavanje molekula MHC skupine I na površini inficirane stanice (185). Međutim, uslijed nedostatka membranskih molekula MHC skupine I inficirane bi stanice mogle postati ciljem stanične lize posredovane NK-stanicama. Da do toga ne bi došlo i HCMV i MCMV posjeduju gene koji određuju homologe molekula MHC skupine I (186) (**slika 2A**). HCMV određuje glikoprotein UL18 veličine 66 kDa, koji se poput molekula MHC udružuje s β_2m i peptidom (187). Njegov stanični receptor LIR-1 ispoljen je na makrofagima i monocitima te na dijelu NK-stanica (188). Postojanje potpuno oprečnih rezultata koji pokazuju da prisustvo UL18 uzrokuje povećanje osjetljivosti ciljnih stanica na lizu posredovanu NK-stanicama (150) upućuje na mogućnost da virus putem UL18 izbjegava samo neku populaciju NK-stanica. S druge strane, obzirom da pored receptora LIR nije pronađen niti jedan drugi inhibicijski receptor NK-stanica za UL18, postoji mogućnost da je učinak UL18 na izbjegavanje NK-stanica posredan (57). Gen *m144* MCMV-a također određuje protein homologan molekulama MHC skupine I (189). Njegova je funkcija *in vivo* potvrđena otkrićem da NK-stanice bolje nadziru mutantu kojoj nedostaje ovaj gen, nego virus divljeg tipa. Obzirom da receptor za *m144* nije pronađen mehanizam njegova djelovanja još je uvijek nepoznat. Za razliku od UL18, *m144* ne može vezati peptid. Strukturni homolog molekula MHC skupine I MCMV-a je i *m157* čiji učinak može biti aktivacijski ili inhibicijski, ovisno o soju miševa. Naime, on u miševa C57BL/6 služi kao ligand za aktivacijski receptor Ly49H, a u soju 129/Svj kao ligand za inhibicijski receptor Ly49I (120).

1.5.2 Selektivna modulacija ispoljavanja molekula MHC skupine I

Kao što je već navedeno CMV-i s površine inficiranih stanica uklanjaju molekule MHC skupine I. Među molekulama MHC skupine I neke služe kao ligandi za TCR, a druge kao ligandi za inhibicijske receptore NK-stanica. Tu je činjenicu iskoristio HCMV. Iako ovaj virus ispoljava nekoliko gena (US3 i US6) koji neselektivno s površine inficiranih stanica uklanjaju sve molekule HLA, proteini US2 i US11 HCMV-a smanjuju membransko ispoljavanje samo onih molekula HLA (HLA-A, HLA-B) koje prepoznaju citotoksični limfociti T, a ostavljaju na površini molekule HLA-C i HLA-E koje su ligandi za receptore NK-stanica (**slika 2B**) (190). Na taj način HCMV balansira između kontrole posredovane stečenom i prirođenom imunošću. Osim što dovodi do selektivnog smanjenja ispoljavanja molekula MHC skupine I, HCMV određuje protein UL40 koji potiče ispoljavanje neklasične molekule skupine I, HLA-E, liganda za inhibicijski receptor NK-stanica CD94/NKG2A (102, 191, 192). Da bi se molekula HLA-E ispoljila na površini stanice prethodno mora vezati peptid. Preradom proteina UL40 u proteasomima nastaje peptid koji se veže na HLA-E i pospješuje njegovo ispoljavanje na membrani inficirane stanice (**slika 2B**) (191, 193). UL40 je neophodan za izbjegavanje učinka NK-stanica na stanice inficirane HCMV-om, ali važnost ovog virusnog proteina još nije potvrđena *in vivo*. Budući je HLA-E ligand i za aktivacijski receptor NK-stanica CD94/NKG2C, konačna uloga UL40 i dalje je nejasna. I geni MCMV-a *m04*, *m06* i *m152* određuju proteine koji svojim djelovanjem uklanjaju molekule MHC skupine I s površine inficirane stanice, čime sprječavaju prepoznavanje od strane citotoksičnih limfocita T (194). gp34, određen genom *m04*, je integralni membranski glikoprotein koji se čvrsto vezuje na molekule MHC skupine I (195) i to na način da istovremeno služi izbjegavanju CD8⁺ limfocita T i NK-stanica. Njegovo je vezivanje za molekule MHC skupine I neovisno o β_2m i različito je za

različite molekule MHC (194, 196). Nakon što nastanu u endoplazmatskoj mrežici, kompleksi gp34 s molekulama MHC skupine I dospjevaju na površinu inficirane stanice te se pretpostavlja da se vežu za inhibicijski receptor NK-stanica (**slika 2B**). Međutim, još uvijek nema dokaza da bi ovi kompleksi zaista mogli sudjelovati u zavaravanju NK-stanica.

1.5.3 Inhibicija aktivacijskih receptora

Citomegalovirusi su razvili niz načina kojima inhibiraju funkciju aktivacijskih receptora NK-stanica. Najbolji primjer za to je djelovanje CMV-a na ligande za aktivacijski receptor NKG2D (**slika 2C**). Prvi takav otkriveni virusni protein je UL16 HCMV-a (156). UL16 u endoplazmatskoj mrežici i staničnom odjeljku *cis*Golgi veže ULBP-1, ULBP-2 i MICB, blokira njihov daljnji transport i ispoljavanje na površini inficiranih stanica (197, 198). Sukladno tome, uklanjanje gena UL16 iz genoma HCMV-a dovelo je do povećanog ubijanja stanica inficiranih takvim virusom od strane NK-stanica u odnosu na stanice inficirane divljim tipom virusa (199). Obzirom da UL16 djeluje samo na neke ligande za NKG2D u ljudi za pretpostaviti je da HCMV posjeduje još neke gene čiji su produkti odgovorni za negativnu regulaciju preostalih liganada.

Za razliku od HCMV-a, u MCMV-a su poznata tri gena čiji su produkti usmjereni na uklanjanje različitih liganada za NKG2D, djelujući tako na sva tri poznata liganda. Gp40 je glikoprotein MCMV-a kojeg određuje gen *m152*. Ovaj protein ima dvostruku ulogu u izbjegavanju imunskog sustava: dovodi do negativne regulacije membranskih molekula MHC skupine I čime sprječava prepoznavanje inficirane stanice od strane limfocita T (6) i uzrokuje uklanjanje RAE-1 s površine inficiranih stanica, izbjegavajući na taj način aktivaciju NK-stanica (6, 160). Važnost gp40 u

izbjegavanju nadzora posredovanog NK-stanicama pokazana je i *in vivo* (8). Naime, virusna mutanta kojoj je uklonjen gen *m152* pojačano je osjetljiva na kontrolu posredovanu NK-stanicama i nakon njihova uklanjanja doseže titar divljeg tipa virusa (8). Produkt gena *m145* sprječava ispoljavanje MULT-1 proteina, djelujući na njega najvjerojatnije iza ERGIC/*cis*-Golgi-staničnog odjeljka (9), dok produkt gena *m155* sprječava ispoljavanje proteina H60 na površini inficirane stanice (10, 200). Djelovanje i ova dva gena na zavaravanje NK-stanica pokazano je *in vivo* uporabom virusnih mutanti kojima su uklonjeni geni *m145* ili *m155* (9, 10). Zasad nije poznat mehanizam djelovanja ovih gena MCMV-a na ligande za NKG2D. Zanimljivo je da su sva tri gena MCMV-a zadužena za uklanjanje liganada za NKG2D članovi obitelji virusnih gena *m145*, baš kao i već spomenuti gen *m157*.

1.5.4 Ispoljavanje proteina koji vežu citokine ili su antagonisti receptora

citokina

Mnogi virusi, uključujući i herpesviruse, ispoljavaju homologe citokina i kemokina s agonističkom ili antagonističkom funkcijom ili receptore koji vežu citokine i kemokine domaćina, ali samo u malom broju slučajeva takvi virusni proteini sudjeluju i u zavaravanju NK-stanica (**slika 2D**) (186). Često djeluju inhibicijski ili antagonistički na IL-12, IL-18, TNF- α , IL-1 ili IL-15 koji su uključeni u indukciju citotoksičnosti NK-stanica i stvaranje IFN- γ . Također mogu sudjelovati u regulaciji lučenja citokina koji djeluju na kemotaksiju NK-stanica kao što su: CCL3, CCL4, MCP-1 (CCL2), MCP2 (CCL8), MCP3 (CCL7), RANTES (CCL5). MCMV određuje protein MCK-2 (*m131-m129*), vjerojatni homolog CC-kemokina koji je nejasnog mehanizma djelovanja, ali pokazuje fenotip *in vivo* ovisan o NK-stanicama (201, 202). HCMV određuje homolog citokina IL-10 čijim se djelovanjem smanjuje razina lučenja citokina tipa I (203, 204).

1.5.5 Ispoljavanje virusnog receptora Fc

Stanični receptor Fc važan je u posredovanju ADCC-a i lizi opsonizirane stanice. HCMV posjeduje tri gena koji određuju dva glikoproteina (gp68 i gp34) sa svojstvom vezivanja za segment Fc protutijela (205, 206). MCMV posjeduje protein m138 koji djeluje kao virusni receptor Fc (207). Iako je MCMV kojem nedostaje gen *m138* oslabljen *in vivo* taj fenomen nije ovisan o protutijelima (208). Postoji nekoliko mogućih načina djelovanja virusnih receptora Fc (**slika 2E**). Budući gp68 HCMV-a posjeduje mogući motiv ITIM (206) pretpostavlja se da bi on mogao djelovati kao kompetitivni antagonist staničnog receptora Fc. Nadalje, citoplazmatski rep gp34 HCMV-a posjeduje dileucinski motiv što upućuje na njegovu sposobnost unosa protuvirusnih protutijela u stanicu i njihovo usmjeravanje u endolizosome na razgradnju (206).

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Obzirom na ranu osjetljivost na MCMV-infekciju laboratorijski sojevi miševa mogu se podijeliti u dvije grupe: (i) sojevi koji su osjetljivi na MCMV (npr. BALB/c) i u kojih virus dosiže visoki titar u raznim organima tkivima i (ii) sojevi miševa koji su otporni na MCMV (npr. C57BL/6) s niskim titrom virusa (165, 209). Ova otpornost odnosno osjetljivost na MCMV ovisna je o sposobnosti pojedinih sojeva miševa da generiraju učinkovit protuvirusni odgovor NK-stanica. Otpornost na MCMV-infekciju pripisuje se produktu gena *Cmv1* (*Ly49h*). Aleli lokusa *Cmv1* određuju osjetljivost (*Cmv1^s* – recesivni alel) odnosno otpornost (*Cmv1^r* – dominantni alel) na MCMV-infekciju (172, 173). Gen *Ly49h* određuje aktivacijski receptor Ly49H ispoljen na oko 50% NK-stanica u miševa C57BL/6 te je pokazano da ima važnu ulogu u nadzoru MCMV-infekcije (140, 142).

Do sada nije poznat stanični ligand za receptor Ly49H. Jedini poznati ligand je produkt MCMV gena *m157* (120, 145). Istraživanja u kojima je korišten rekombinantni protein m157 pokazala su da njegovo vezivanje za receptor Ly49H dovodi do stvaranja citokina i lize ciljne stanice. Neobično je da virus određuje protein koji svojim ispoljavanjem na membrani inficirane stanice dovodi do aktivacije NK-stanica. Međutim, obzirom da se rekombinantni protein m157 može vezati i na inhibicijski receptor Ly49I ispoljen u miševa 129/Svj, najvjerojatnije je da je on nastao kako bi svojim djelovanjem inhibirao NK-stanice i na taj način omogućio izbjegavanje virusa NK-ovisnom nadzoru.

Dosadašnja istraživanja bavila su se međudjelovanjem proteina m157 i receptora Ly49H u *in vitro* modelima i u izoliranim uvjetima ostavivši otvoreno pitanje je li protein m157 zaista jedini protein MCMV-a koji je odgovoran za Ly49H-posredovanu

otpornost na MCMV-infekciju te kakav je značaj njihovog međudjelovanja *in vivo*. Nadalje, postoje sojevi miševa koji su otporni na MCMV, a ne posjeduju aktivacijski NK-stanični receptor Ly49H što ukazuje na postojanje drugih virusnih proteina koji mogu poslužiti kao ligandi za neki drugi aktivacijski receptor na NK-stanicama ili pak staničnih liganada za aktivacijske receptore koji izbjegavaju negativnu regulaciju od strane virusa (58).

Metodom homologne rekombinacije proizveli smo rekombinantni virus s delecijom gena *m157* te njegov odgovarajući revertantni virus u kojem smo gen *m157* ubacili u nekodirajuću regiju virusnog genoma između gena *m16* i *m17*. Koristeći ove rekombinantne viruse željeli smo ispitati značaj gena *m157* u otpornosti Ly49H⁺ miševa na MCMV-infekciju *in vivo* te može li protein *m157* zaista inhibirati NK-stanice miševa 129/Svj *in vivo*. Osim navedenih virusa u ovim smo se istraživanjima služili i brojnim drugim virusnim mutantama u kojima su uklonjeni pojedini geni MCMV-a koji nisu važni za njegovo umnožavanje, ali imaju imunoregulacijsku funkciju.

Neposredni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi biološki značaj gena *m157* u nadzoru MCMV-a posredovanom NK-stanicama, a napose značaj proteina *m157* u aktivaciji odnosno inhibiciji NK-stanica *in vivo*. Također smo pratili dolazi li u soju miševa C57BL/6 u odsustvu gena *m157* do vidljivog učinka gena MCMV-a čiji produkti negativno reguliraju ligande za receptor NKG2D. Budući divlji miševi soja PWK/Pas ne posjeduju receptor Ly49H, a otporni su na MCMV-infekciju slično miševima C57BL/6, pokušali smo razjasniti je li otpornost miševa ovog soja posredovana nekim drugim aktivacijskim receptorom na NK-stanicama koji prepoznaje protein *m157* ili, pak, nekim drugim virusnim proteinom.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Mediji za uzgoj stanica

Dulbeccov modificirani minimalni esencijalni medij (DMEM)

Medij DMEM, 10% fetalni teleći serum (FCS), 0.05 g/l genatmicinsulfat, 0.1 g/l streptomycin sulfat, 1×10^5 U/l penicilin, 10mM hepes (pH 7.2), 2 mM L-glutamin

Minimalni esencijalni medij (MEM)

Medij MEM, 3% fetalni teleći serum (FCS), 0.05 g/l gentamicin sulfat, 0.1 g/l streptomycin sulfat, 1×10^5 U/l penicilin, 2 mM L-glutamin

Kompletni RPMI medij

RPMI 1640 medij, 10% fetalni teleći serum (FCS), 0.05 g/l genatmicin sulfat, 0.1 g/l streptomycin sulfat, 1×10^5 U/l penicilin, 10mM hepes (pH 7.2), 2 mM L-glutamin, 5×10^{-5} M 2-merkaptoetanol

Medij za smrzavanje stanica

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

Metil-celulozni medij

MEM, 2.2% metil-celuloza, 10% fetalni teleći serum (FCS)

Medij za protočnu citometriju (FACS medij)

PBS, 10mM EDTA, 20 mM hepes (pH 7.2), 2% fetalni teleći serum (FCS), 0.1% natrij azid (NaN_3)

3.2 Puferi

Bikarbonatni pifer, pH 9.6

0.5 mM natrij karbonat (Na_2CO_3), 45 mM natrij hidrogenkarbonat (NaHCO_3)

Citratni pufer, pH 5.0

50 mM limunska kiselina ($C_6H_8O_7 \times H_2O$), 50 mM natrij hidrogenfosfat-2-hidrat ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$)

Fosfatima puferirana fiziološka otopina (PBS), pH 7.2

140 mM natrij klorid (NaCl), 2.7 mM kalij klorid (KCl), 6.5 mM natrij hidrogen fosfat-2-hidrat ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$), 1.5 mM kalij dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), 0.7 mM kalcij klorid ($CaCl_2$), 0.7 mM magnezij klorid-6-hidrat ($MgCl_2 \times 6H_2O$)

Otopina za liziranje eritrocita

140 mM amonij klorid (NH_4Cl), 27 mM kalij klorid (KCl), 1.5 mM kalij dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), 6.5 mM natrij hidrogen fosfat (Na_2HPO_4), 0.7 mM magnezij klorid ($MgCl_2$), 0.7 mM kalcij klorid ($CaCl_2$)

Otopina OPD (supstrat za peroksidazu), pH 5.0

Citratni pufer, 0.3 mg/ml OPD, 0.88 μM H_2O_2

SSC pufer, pH 7.0

3 M natrij klorid (NaCl), 0.3 M natrij citrat

VBS pufer, pH 7.8

50 mM TRIS-klorovodična kiselina (TRIS-HCl), 12 mM kalij klorid (KCl), 5 mM natrij-EDTA (Na_2EDTA)

3.3 Monoklonska protutijela i poliklonski serumi

kozji protu-mišiji IgG, Boehringer

kozji protu-mišiji IgG-POD, Boehringer

kozji protu-štakorski IgG-PE, Caltag Laboratories

kozji protu-štakorski Ig-FITC, Sigma

kunićj protu-AGM1 serum, WAKO Chemicals

mišji protu-mišiji Ly49C/I, dobiven ljubaznošću dr J. R. Ortalda, SAD

mišji protu-mišji Ly49H, dobiven ljubaznošću dr W. M. Yokoyame, SAD

mišji protu-mišji DX5-biotin, BD Pharmingen

mišji protu-mišji NK1.1-PE, BD Pharmingen

mišji protu-mišji NK1.1, (klon PK136)

streptavidin-FITC, BD Pharmingen

streptavidin-PE, BD Pharmingen

štakorski protu-mišji Ly49C/H/I, dobiven ljubaznošću dr J. R. Ortalda, SAD

štakorski protu-H60, dobiven ljubaznošću dr J.P. Houchinsa, SAD

štakorski protu-RAE-1 α,β,γ , dobiven ljubaznošću dr L. L. Laniera, SAD

štakorski protu-MULT-1, supernatant staničnog hibridoma 1D6

tetramer NKG2D-PE dobiven ljubaznošću dr D. H. Buscha, Njemačka

3.4 Virusi

U pokusima je umjesto divljeg tipa MCMV-a korišten virus MW97.01 dobiven kloniranjem iz umjetnog bakterijskog kromosoma (engl. *bacterial artificial chromosome*, BAC) koji je biološki ekvivalentan soju Smith MCMV-a (ATCC VR-194, odnedavno preimenovan u VR-1399) (210). U ovome radu za taj je virus rabljen naziv divlji tip (engl. *wild type*, w.t.). Nadalje, korištena je delecijaska mutanta za gen *m157* ($\Delta m157$) te njoj odgovarajući revertantni virus (*m157Rev*) kao i dvostruka delecijaska mutanta za gene *m155* i *m157* ($\Delta m155\Delta m157$). Također su korištene i delecijaska mutante za pojedinačne gene unutar MCMV $\Delta 6$ regije (*m144-m158*) koje ispoljavaju zeleni fluorescentni protein (engl. *green fluorescence protein*, GFP), virus $\Delta 6$ MCMV u kojem su uklonjeni svi geni od *m144* do *m158*, te delecijaska mutanta $\Delta MS94.5$ kojoj nedostaje 15 gena (*m151* do *m165*) koji nisu bitni za umnožavanje

virusa, a imaju imunoregulacijsku funkciju (207). Svi navedeni virusi dobiveni su BAC-tehnologijom.

3.4.1 Ciljana mutageneza MCMV BAC-a

Genomi mutanti MCMV-a $\Delta m157$ i $\Delta m155\Delta m157$ nastali su uporabom BAC-mutageneze bazirane na PCR-u (211).

Da bi se uklonio gen *m157*, na mjesto slijeda nukleotida MCMV-a 216291 do 216874 (pozicije nukleotida su prema (212)), u BAC je unesen gen rezistencije na kanamicin (*kn'*). On je umnožen pomoću kompleta *High Fidelity Expand PCR System* (Roche) na kalupu pACYC177, početnicama (primerima) 5-*m157-Kan* (5'cgt ggt caa gcc ggt cgt gtt gta cca gaa ctc gac ttc ggt cgc gtt cga tta ttc aac aaa gcc acg'3) i 3-*m157-Kan* (5'gca aag gtt cgg cca gca caa cat ggt ctt gag cta cga'3). Navedeni je linearni fragment metodom homologne rekombinacije u *E. coli* umetnut u plazmid pSM3fr MCMV-BAC. Na taj je način nastala mutanta $p\Delta m157$. Ispravnost isjecanja gena *m157* provjerena je restrikcijskom analizom.

Da bi gen *m157* bio vraćen na ektopično mjesto u genom MCMV-a napravljen je linearni PCR-fragment koji sadržava gen *kn'* omeđen s dva ciljna mjesta za rekombinazu FLP (engl. *FLP recombinase target site*, FRT) veličine 48bp, te mjesto homologno nekodirajućem dijelu genoma između gena *m16* i *m17* MCMV-a. Homolognom rekombinacijom u *E. Coli* ubačen je navedeni fragment u plazmid pSM3fr, a gen *kn'* isječen ciljanom mutagenezom posredovanom rekombinazom FLP kao što je ranije opisano (213). Na taj je način ostalo jedno FRT mjesto između gena *m16* i *m17* koje može poslužiti za ciljano umetanje bilo kojeg gena od interesa na to mjesto. Ispravna mutageneza plazmida pSM3fr-FRT potvrđena je restrikcijskom analizom i sekvencioniranjem gena *m16* i *m17* primerima MCMV-15461-*down* (5'gaa

gtc cat gta tct cct tca'3) i MCMV-15939-up (5'tcg gac aaa ttc taa acc tcg'3). Novonastali virus nazvan je w.t.-FRT-MCMV.

Zatim je homolognom rekombinacijom linearnog fragmenta korištenog u izradi p Δ m157 iz plazmida pSM3fr-FRT uklonjen gen *m157*. Na taj je način nastao plazmid p Δ m157-FRT u kojem nedostaje gen *m157*, a u nekodirajućem dijelu genoma MCMV-a između gena *m16* i *m17* ima jedno mjesto FRT. Nadalje, PCR-om je na osnovi plazmida pOri6k-m157 kao kalupa napravljen linearni fragment koji sadržava gen *m157* te gen za otpornost na zeocin. Pri tome su korišteni primeri 5-m157-Zeo-m16/17 (5'ccc tct taa tca tga caa tta taa gtg tct tat acg caa tac ttt tat cat aat aca tgt gga att gtg agc'3) i 3-m157-Zeo-m16/17 (5'gag gaa tag gaa taa ctc acc acc gat ttc agc gtc tgc ccc aag tct gat tag cac gtg tca gtg gt'3). Homolognom rekombinacijom ovog plazmida s p Δ m157-FRT u *E. Coli*, stvoren je plazmid MCMV-BAC pm157rev. Ispravno umetanje gena *m157* na ektopično mjesto između gena *m16* i *m17* potvrđeno je restriksijskom analizom i sekvencioniranjem regije *m157* umnožene primerima M157-1 (5'tgt tga ccg cca tct gtt ctt ga'3), M157-2rev (5'ggg aag att aat att caa gga tca'3) i M157-3 (5'gga ttg aaa att gtt aca gca cg'3).

Izrada dvostruke delecije mutante $\Delta m155\Delta m157$ opisana je ranije (10). Ukratko, gen *m155* uklonjen je iz genoma MCMV-a na isti način kao i gen *m157*, samo što je ovoga puta za homolognu rekombinaciju korišten plazmid p Δ m157-FRT i linearni fragment kojim je na mjesto slijeda nukleotida MCMV-a 214443-215531 (pozicije nukleotida su prema (212)) u BAC unesen gen rezistencije na zeocin.

Delecije mutante virusa koje određuju GFP također su nastale rekombinacijom linearnih fragmenata DNA i MCMV BAC pSM3fr-GFP, a njihova je izrada opisana drugdje (9, 10). Ukratko, PCR-om su stvoreni linearni fragmenti koji nose gen *kn'* na osnovi plazmida pOri6K-F5 (u slučaju MCMV-GFP Δ 6) ili pGP704-Kan (za sve ostale

MCMV-GFP viruse) kao kalupa. Linerani fragmenti su homolognom rekombinacijom uneseni u ciljnu virusnu DNA preko rubnih homologa nukleotida i tako zamijenili ciljane gene.

Rekombinantni virusi MCMV-BAC rekonstituirani su elektroporacijom DNA mutiranih MCMV BAC-ova u stanice M2-10B4 ili mišje embrionalne fibroblaste (MEF) kao što je ranije opisano (213). Ukratko, 2-3 μg odgovarajuće MCMV-BAC DNA elektroporirano je u 10^6 ciljnih stanica pri 250 V i 1500 mF pomoću elektroporatora *Easyject Optima* (Peqlap). Primarni virus je radi uklanjanja BAC-kazete šest puta pasažiran na stanicama M2-10B4.

Izrada i uporaba virusa $\Delta\text{MS94.5}$ kojem nedostaje 15 gena (*m151* do *m165*) koji nisu bitni za replikaciju virusa opisana je drugdje (207).

3.4.2 Northern blot virusne RNA

Provjera ispoljavanja gena *m157* nakon njegova uklanjanja odnosno njegovog vraćanja u genom MCMV-a napravljena je Northern blot-om. Fibroblasti NIH3T3 uzgojeni su u Petrijevim posudama za staničnu kulturu (Greiner) u 10% DMEM-u na 37°C uz 5% CO_2 i 90% vlažnosti. Stanice su inficirane Δm157 , *m157Rev* i divljim tipom MCMV-a u dozi od 3 MOI (engl. *multiplicity of infection*) po stanici na način kako je to opisano za infekciju stanica virusom. Nakon 6 i 24 h stanice su sakupljene te dvaput oprane u PBS-u i centrifugirane na $200 \times g$. Ukupna RNA iz inficiranih stanica izdvojena je pomoću otopine TriZol (Invitrogen) sukladno uputama proizvođača. DNA sonda obilježena [α - ^{32}P]dCTP-om, koja prepoznaje 528 bp gena *m157* (nukleotidi 216350-216878 prema (212)) napravljena je pomoću *Nick Translation* kita (Amersham) sukladno uputama proizvođača. Po 3 μg ukupne RNA iz svakoga uzorka virusom inficiranih stanica razdvojeno je na formaldehidnom (2.2 M)

agaroznom gelu pri konstantnom naponu od 5 V/cm. RNA je potom prebačena na najlonsku membranu kapilarnim transferom u 10 x SSC puferu preko noći. Potom je hibridizirana s navedenom sondom na 37°C u hibridizacijskoj peći (Hoefer) preko noći te dvaput isprana 2 x SSC puferom. Hibridizacijski signal vizualiziran je pomoću uređaja za vizualizaciju radioaktivnog fosfora (engl. *phosphor imager*).

3.4.3 Priprema virusa porijeklom iz žlijezda slinovnica

MCMV porijeklom iz žlijezda slinovnica (MCMV-SGV) proizveli smo u miševima BALB/c koje smo prehodno intraperitonealno injicirali w.t. MCMV-om u dozi od 2×10^5 PFU u ukupnom volumenu 0,5 ml. Nakon 12 dana miševe smo žrtvovali, sakupili njihove slinovnice i propasirali ih kroz metalne mrežice u čistom MEM-u u količini od 3 ml po slinovnici. Tako dobivene homogenate žlijezda slinovnica razdijelili smo u alikvote od po 1 ml i čuvali u hladnjaku na -80°C do uporabe.

3.4.4 Umnožavanje virusa

Virusi dobiveni rekombinantnom tehnologijom umnoženi su u dovoljnoj količini za izvođenje pokusa. Za to su korišteni MEF-ovi porijeklom iz miševa BALB/c.

Stanice MEF-a su inficirane odgovarajućim virusom u dozi od 0.01 infektivnih jedinica virusa (engl. *plaque forming unit*, PFU) po stanici te inkubirane na 37°C uz 5% CO₂ i 90% vlažnosti kroz 4-5 dana. Zatim je nadtalog pokupljen i centrifugiran na 200 x g tijekom 10 min kako bismo se riješili stanica i staničnog detritusa. Nadtalog je zatim centrifugiran na 72 000 x g kroz 90 min, na 4°C kako bi se iztaložilo virus. Virusni talog resuspendiran je u «poslednjoj kapi» (cca 300 μl) te ostavljen na ledu 12 h. Nakon toga je nadslojen na sterilnu 15% sukrozu u VSB puferu te ultracentrifugiran na 56 000 x g kroz 90 minuta na 4°C. Tako dobiveni virusni talog

ostavljen je u 300 μ l PBS-a tijekom noći, a onda dobro resuspendiran i profiltriran kroz filter od 45 μ m. Alikvoti virusnih pripravaka (po 25 μ l) čuvani su do upotrebe na –80°C. Titar virusa određen je testom virusnih čistina.

3.4.5 Određivanje krivulje rasta virusa *in vitro*

Stanice MEF-a odmrznute su 3 dana prije izvođenja testa te su kultivirane u Petrijevim posuadama (Greiner) u 3% MEM-u na 37°C uz 5% CO₂ i 90% vlažnosti. Kada su se stanice MEF-a dovoljno namnožile odvojene su tripsinizacijom od podloge, prebrojane te preseljene na ploče za uzgoj stanica od 24 jažice (Costar) u količini od 100 000 stanica po jažici. Stanice su inficirane virusima $\Delta m157$, $m157Rev$ te w.t. MCMV-om u dozi od 0,01 PFU/stanici. Nakon 12, 24, 48 i 72 h od infekcije nadtalog inficiranih stanice je sakupljen i smrznut na –20°C. Titracija virusa napravljena je u triplicatu svakog uzorka na način kako je to opisano za titraciju virusa.

3.4.6 Infekcija miševa

Miševi su injicirali intravenski ili intraperitonealno (ovisno o protokolu pojedinog pokusa) odgovarajućim virusima u dozi od 5×10^5 PFU virusa za MCMV-otporne sojeve ili 2×10^5 PFU virusa za MCMV-osjetljive sojeve. Pri uporabi MCMV-a porijeklom iz žlijezda slinovnica korišteno je intraperitonealno injiciranje virusa u dozi od 2.5×10^4 PFU. Ukupan volumen injiciranog virusa iznosio je 0.5 ml medija bez FCS-a. Novookoćeni miševi inficirani su intraperitonealno s 10^3 PFU virusa u volumenu od 50 μ l.

3.5 Laboratorijske životinje

Miševi BALB/c ($H-2^d$), C57BL/6 ($H-2^b$), BXD8/Ty ($H-2^b$), BALB.B6-Cmv1^r ($H-2^d$), 129/SvJ ($H-2^b$), soj divljih miševa PWK/Pas, PWK/Pas x BALB/c F1 generacije te imunodeficitni miševi C57BL/6 Prf^{-/-} ($H-2^b$) i C57BL/6 RAG^{-/-} ($H-2^b$) uzgojeni su u Središnjem vivariju Medicinskog fakulteta u Rijeci, u skladu s uputstvima sadržanim u *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*. Etičko povjerenstvo Sveučilišta u Rijeci odobrilo je sve ovdje primijenjene pokuse na životinjama. Tijekom pokusa miševi su držani u kavezima na ventilacijskim policama s filtriranim zrakom, kako bi se spriječila mogućnost heterologne infekcije. Soj divljih miševa PWK/Pas pribavljen je ljunaznošću dr F. Coluccija s *The Babraham Institute, Babraham Research Campus, Cambridge, Engleska*. U pokusima su korištene 6-8 tjedana stare ženke miševa.

Osim miševa, za proizvodnju protuseruma na AGM1 korišteni su kunići.

3.6 Stanice

U pokusima su upotrijebljene stanice M2-10B4 (stanična linija iz strome koštane srži, ATCC CRL1972), NIH3T3 (ATCC CRL1658), makrofagna stanična linija IC21 te MEF porijeklom iz BALB/c skotnih ženki. Stanice su uzgajane u plastičnim Petrijevim posudama (Greiner) za kulturu tkiva u inkubatoru na temperaturi od 37°C, uz 5% CO₂ i 90% vlažnosti. Redovito su dohranjivane, a vrsta korištenog hranjivog medija ovisila je o tipu stanica (za MEF 3% MEM, za IC-21 10% RPMI, za M2-10B4 i NIH3T3 10% DMEM, a za hibridome 10% RPMI ili 10% DMEM). Prema potrebi stanice su zamrzavane u mediju za smrzavanje i pohranjene u tekućem dušiku na -176°C. Prije ponovne upotrebe stanice su naglo odmrznute, isprane u odgovarajućem hranjivom mediju i iznova kultivirane.

3.6.1 Proizvodnja stanica MEF-a

MEF je korišten za proizvodnju virusa, test virusnih čistina (za detekciju virusa) te testiranje ispoljavanja pojedinih liganada za aktivacijski receptor NKG2D. Za proizvodnju MEF-a korištene su skotne ženke kojima su 17.-18. dana skotnosti sterilno izvađeni fetusi. Nakon odstranjenja trbušnih organa i mehaničkog usitnjavanja, tkiva su podvrgnuti enzimatskom probavljanju tripsinom tijekom 90 min, na magnetskoj miješalici pri 37°C. Ukupni volumen od 30 ml tripsina dodavan je u obrocima od po 10 ml. Tako dobiveni homogenat propušten je kroz metalnu mrežicu da bi se uklonili krupniji, neprobavljeni komadi, stanice su isprane 3% MEM-om i prebrojane pomoću tripsanskog modrila. 2×10^7 stanica stavljeno je u Petrijeve posude i inkubirano na 37°C, uz 5% CO₂ i 90% vlažnosti. Nakon 24 h stanicama je promijenjen hranjivi medij (3% MEM). Stanice MEF-a su potom uzgajane 3-4 dana tijekom kojih su se dijelile i stvorile konfluentni sloj preko cijelog dna Petrijevih posuda. Zatim su tripsinizacijom odvojene od podloge, sakupljene i isprane u 30 ml 3% MEM-a. Nakon centrifugiranja na 200 x g stanice su resuspendirane u svježem mediju, prebrojane, razrijeđene u mediju za smrzavanje i alikvotirane po 5×10^6 stanica/ml te smrznute i do uporabe čuvane na -80°C.

3.7 Hibridomi

Za produkciju monoklonskih protutijela neophodnih za naša istraživanja korišten je hibridom PK136 koji izlučuje mišje IgG2a protutijelo na NK1.1⁺ stanice te hibridom 1D6 koji stvara štakorsko IgG2a protu-MULT-1 protutijelo. Navedeni hibridomi uzgajani su u plastičnim bočicama za kulturu stanica i dohranjivani odgovarajućim hranjivim medijima (PK136 u 10% DMEM-u, a 1D6 u 10% RPMI-u), a dugoročno su bili pohranjeni u banci hibridoma u tekućem dušiku na -176°C. Njihova sposobnost

lučenja protutijela testirana je određivanjem koncentracije protutijela u supernatantu kultura metodom *sandwich-ELISA* (engl. *enzim-linked immunosorbent assay*). Protutijela na MULT-1 proizvedena su na način da je sakupljan nadtalog kulture hibridoma 1D6 te centrifugiran na 200 x g kako bismo se riješili stanica. Tako sakupljeni nadtalog čuvan je na -20°C . Kad je sakupljena dovoljna količina nadtaloga iz njega su izdvojena protutijela.

3.7.1 Uzgoj hibridoma u životinjama

Budući se znatno veća koncentracija protutijela dobije uzgojem hibridoma u trbušnoj šupljini odgovarajućih laboratorijskih životinja, monoklonska protutijela na NK1.1⁺ stanice proizvedena su miševima BALB/c x CBA/J F1 generacije. Prvo je u trbušnu šupljinu miševa injiciran pristan (0.5 ml/mišu) kako bi se izazvala upalna reakcija koja će pospješiti rast hibridomskih stanica. Nakon tjedan dana u tako pripremljenu trbušnu šupljinu injicirano je 1×10^6 stanica hibridoma PK136 i tijekom idućih tjedan dana došlo je do stvaranja ascitesa. Ascites je sakupljan svaki drugi dan te smrzavan na -20°C , nakon što su se centrifugiranjem odvojile u njemu prisutne stanice. Kad je sakupljena dovoljna količina ascitesa iz njega su izdvojena protutijela.

3.7.2 Precipitacija protutijela pomoću amonijevog sulfata

Sakupljeni nadtalog hibridoma 1D6 ili ascites hibridoma PK136 prvo su odmrznuti, a ascites još i propušten kroz staklenu vunu u svrhu uklanjanja krupnih nečistoća i masnoće. Potom je u nadtalog, odnosno ascites uz stalno miješanje na magnetskoj mješalici dodavana kap po kap zasićene otopine amonijevog sulfata u odnosu 55% : 45%. Tako dobivena mješavina ostavljena je naredna 2 h na 4°C te

centrifugirana na 5000 okretaja/min kroz 45 min na 4°C. Talog nastao centrifugiranjem resuspendiran je u PBS-u, i to obično u volumenu dvostruko manjem od početnog volumena ascitesa, kako bi se protutijela još više koncentrirala. Tako dobivena otopina stavljena je u prethodno prokuhanu dijalizacijsku membranu koja ne propušta čestice veće od 18 kDa i dijalizirana u PBS-u. Pomoću 0,1M barijevog klorida ispitivana je prisutnost amonijevog sulfata u PBS-u i kada ga više nije bilo moguće dokazati dijaliza je prekinuta. Dijalizat je profiltriran kroz filter od 0.45 µm, alikvotiran po 1 ml te do uporabe čuvan na -20°C. Prije uporabe određena je koncentracija te provjerena specifičnost i sterilnost tako dobivenih otopina protutijela.

3.7.3 Određivanje koncentracije protutijela

Koncentracija protutijela određivana je *sandwich*-ELISA-om. Ploče za ELISA-u su prethodno obložene s primarnim protutijelima (protu-mišji IgG u slučaju protu-NK1.1 protutijela te protu-štakorski IgG u slučaju protu-MULT-1 protutijela) u koncentraciji od 10 µg/ml u volumenu od 50 µl po jažici. Nakon inkubacije tijekom noći na 4°C, ploče su isprane PBS-om te blokirane sa 150 µl blokirajućeg reagensa (Boehringer) tijekom 2 sata na 4°C. Sadržaj ploča je zatim izbačen van, a ploče dvaput isprane PBS-om. Zatim su na jedan dio ploče nanešeni odgovarajući standardi (mišji ili štakorski IgG) priređeni u više različitih poznatih koncentracija. Na drugi dio ploče nanešena je otopina protutijela čiju smo koncentraciju željeli odrediti i to na način da su prvo pripremljena odgovarajuća razrijeđenja (1:100 za protutijela dobivena iz ascitesa, a 1:2 za protutijela dobivena iz nadtaloga) te su na ploči dalje serijski razrjeđivana. Sva razrijeđenja standarda i uzoraka pripremana su u otopini PBS-a s 1% FCS-om uz dodatak 0.05% TWEEN-a 20, a uzorci su na ploče nanešeni u duplikatu. Nakon inkubacije od 60 min na sobnoj temperaturi ploče su isprane

otopinom PBS-a s 0.01% TWEEN-a 20 pomoću ispiraća za ELISA ploče (Awarrenes) te je dodano 50 μ l/jažici sekundarnog protutijela. Sekundarno protutijelo razrijeđeno je 1:1000 u već navedenoj otopini (PBS s 1% FCS-a i 0,05% TWEEN-a 20). Ovisno o porijeklu primarnog protutijela, kao sekundarno protutijelo korišten je protu-mišji ili protu-štakorski IgG obilježen peroksidazom. Tijekom 60 min ploče su ponovo inkubirane na sobnoj temperaturi te im je nakon ispiranja dodan supstrat. Kao supstrat korištene su OPD tablete (Sigma), koje su prema uputama proizvođača prethodno otopljene u citratnom puferu (pH 5.5) uz dodatak vodikova peroksida. U svaku jažicu stavljeno je 50 μ l tako pripremljenog supstrata. Nakon inkubacije od nekoliko minuta u tami na sobnoj temperaturi supstrat je počeo mijenjati boju kao posljedica njegove reakcije s peroksidazom na sekundarnim protutijelima. Tada je reakcija zaustavljena dodavanjem 50 μ l/jažici 2 M sulfatne kiseline. Na optičkom čitaču za ELISA ploče (Awarrenes) uz filter od 492 nm očitane su apsorpcije svjetlosti. Iz očitanih vrijednosti te poznatih koncentracija standarda napravljena je krivulja iz čijeg se ravnog dijela izračunala jednadžba pravca. Uvrštavanjem u tako dobivenu jednadžbu vrijednosti očitane apsorpcije svjetlosti za testirana protutijela te uzimajući u obzir odgovarajuće razrjeđenje, određena je koncentraciju protutijela.

3.7.4 Provjera specifičnosti protu-NK1.1 monoklonskih protutijela

Za provjeru specifičnosti proizvedenih protu-NK1.1 monoklonskih protutijela korištena je protočna citometrija. Budući su navedena protutijela korištena za uklanjanje NK-stanica *in vivo*, testirana su tako da je prvo izvršeno uklanjanje NK-stanica na način na koji je to rađeno i u pokusima. Idući dan životinje su žrtvovane i testirana je učinkovitost uklanjanja NK-stanica u slezeni. Slezena je pažljivo usitnjena te propasirana kroz najlonsku mrežicu, a dobivena suspenzija stanica isprana je u 20

ml 10% RPMI-a. Nakon centrifugiranja na 200 x g kroz 5 min na talog stanica dodano je 4 ml otopine za razaranje eritrocita, talog resuspendiran te ostavljen da otopina djeluje 5 min na 4°C i nakon toga centrifugiran na 200 x g kroz 5 min. Stanice su zatim dvaput isprane u 10 ml FACS medija, propuštene kroz najlonsku mrežicu te prebrojane. Broj stanica je podešen na 10^6 po uzorku te je na njih dodano odgovarajuće protutijelo obilježeno s fluorescentnom bojom PE (protu-NK1.1-PE, BD Pharmingen). Stanice su inkubirane 30 min na 4°C te dvaput isprane u FACS mediju. Na kraju su resuspendirane u 1 ml FACS medija s propidij jodidom (10 μ l propidij jodida/1 ml FACS medija) te je na protočnom citometru očitavano po 10 000 limfocita, isključujući pomoću propidij jodida mrtve stanice. Usporedbom sa životinjom kojoj nisu dana protu-NK1.1 protutijela moglo se ustanoviti učinkovitost uklanjanja NK-stanica, odnosno potvrditi specifičnost proizvedenih protutijela.

Na gotovo isti način provjeravana je i učinkovitost uklanjanja NK-stanica u pojedinim pokusima. Na dan žrtvovanja miševa jednoj životinji kojoj su injicirana protutijela i jednoj kojoj nisu uzeto je pola slezene i stanice su testirane prema gore opisanom protokolu.

3.8 Proizvodnja kunićjeg protuseruma na AGM1 antigen

Za proizvodnju kunićjeg protuseruma korišteni su kunići teški 4-5 kg imunizirani s AGM1 antigenom intradermalno na tri mjesta. AGM1 antigen priremljen je na slijedeći način. Jedan miligram AGM1 otopljen je u 1 ml fiziološke otopine (0.9% NaCl) s 2 mg metiliranog BSA. U 300 μ l tako otopljenog antigena, dodano je još 500 μ l fiziološke otopine, te 500 μ l kompletnog Freundovog adjuvansa. Ove dvije otopine miješane su tako dugo dok nije nastala stabilna mliječnobijela emulzija. Ponovljena imunizacija napravljena je nakon tri tjedna, s tom razlikom da smo ovoga puta koristili inkompletni

Freundov adjuvans u omjeru 1:1, ukupnog volumena 500 μ l. Antigen je ponovo injiciran na tri mjesta, no ovaj puta dva intradermalno i jedno intramuskularno. Postupak je ponovljen za dva tjedna. Pet dana od zadnjeg injiciranja kunići su iskrvareni kardijalnom punkcijom u općoj anesteziji s pentobarbitalom (10 mg/kg tjelesne težine). Dobivena krv (oko 150 ml po kuniću) sakupljena je u erpuvete te ostavljena 4 sata na sobnoj temperaturi da nastane ugrušak. Epruvete sa zgrušanom krvi centrifugirane su na 1500 okretaja/min tijekom 10 min i odvojen je serum. Serum je dekomplementiran na 56°C kroz 30 min te alikvotiran po 1 ml i pohranjen u hladnjak na -80°C. Prije upotrebe testirana je specifičnost i učinkovitost protuseruma protočnom citometrijom.

Testiranje je provedeno na gotovo identičan način kako je to opisano za testiranje protu-NK1.1 protutijela. Pojedinom mišu C57BL/6 injicirana je određene količina protuseruma (50; 100; 250 ili 500 μ l) uz dodatak PBS-a do ukupnog volumena od 500 μ l. Jednom mišu injiciran je 1 mg protu-NK1.1 protutijela porijeklom od hibridoma PK136. Idući dan miševi su žrtvovani, slezene izvađene te pripremljene za protočnu citometriju na isti način kako je to opisano za provjeru specifičnosti protu-NK1.1 protutijela. Protočna citometrija rađena je također na isti način. Učinkovitost protu-AGM1 protuseruma u različitim dozama uspoređena je s brojem NK-stanica u netretirane životinje te životinje injicirane s protu-NK1.1 protutijelima.

3.9 Uklanjanje NK-stanica *in vivo*

Za uklanjanje pojedinih populacija NK-stanica *in vivo* korištena su protu-NK1.1 monoklonska protutijela porijeklom iz hibridoma PK136 te monoklonska protutijela na receptore Ly49C/I (5E6) i Ly49C/H/I (1F8) koja su dobivena ljubaznošću dr J. R. Ortalda. Navedena protutijela korištena su za uklanjanje NK-stanica u NK1.1⁺ sojeva

miševa (C57BL/6, BXD8/Ty, BALB.B6-*Cmv1'*). Protu-NK1.1 protutijela injicirana su intraperitonealno u koncentraciji od 1mg po životinji, a anti-Ly49C/I i anti-Ly49C/H/I 150 µg po životinji u 500 µl sterilnog PBS-a, dan prije infekcije s MCMV-om.

Za ostale sojeve miševa korišten je kunići protu-AGM1 protuserum i to na slijedeće načine. Ukoliko je korišten komercijalni pripravak (Wako Chemicals) tada su životinje injicirane intraperitonealno s 20 µl protu-AGM1 po životinji u 500 µl 1% MEM-a, dan prije infekcije s MCMV-om. U pokusima u kojima je korišten protu-AGM1 protuserum koji smo sami proizveli, životinje su u dva navrata injicirane s 250 µl protuseruma po životinji u 500 µl PBS-a. Prvi puta protuserum je injiciran dan prije infekcije, a drugi puta 4 sata nakon injiciranja odgovarajućeg MCMV-a.

Učinkovitost deplecije provjeravana je protočnom citometrijom kako je prethodno opisano.

3.10 Test aktivacije NK-stanica *in vitro*

Test aktivacije NK-stanica *in vitro* rađen je kokultivacijom NK-stanica i ciljnih stanica IC-21 te je protočnom citometrijom mjerena količina unutarstaničnog IFN- γ na način kako je to ranije opisano (145). Ukratko, makrofagna stanična linija IC-21 uzgojena je u plastičnim Petrijevim posudama (Greiner) u 10% RPMI-u u inkubatoru na 37°C uz 5% CO₂ i 90% vlažnosti. Kada je namnoženo dovoljno stanica IC-21 tripsinom su odvojene od podloge, sakupljene, prebrojane i preseljene u ploče od 96 jažica (150 000 stanica po jažici). Nakon što su se stanice prilijepile za dno posude inficirane su s 5 MOI/ stanici odgovarajućeg MCMV-a ili su ostavljene neinficirane. Stanice su po infekciji inkubirane 24 h na 37°C uz 5% CO₂ i 90% vlažnosti. Zatim je miš C57BL/6 RAG^{-/-} žrtvovan i izvađena mu je slezena i pažljivo usitnjena iglama te propasirana kroz najlonsku mrežicu, a dobivena smjesa stanica isprana je u 20 ml

10% RPMI-a. Nakon centrifugiranja na 200 x g kroz 5 min na talog stanica dodano je 4 ml otopine za razaranje eritrocita, talog resuspendiran te pušten da otopina djeluje 5 min na 4°C i nakon toga centrifugiran na 200 x g kroz 5 min. Stanice su zatim dvaput isprane u 10 ml 10% RPMI-a, propuštene kroz najlonsku mrežicu te prebrojane. Broj stanica je podešen na 150 000 po uzorku te su dodane u jažice sa stanicama IC-21 i kokultivirane kroz 12 h. Sat vremena nakon dodavanja stanica slezene u kulturu je dodan i brefeldin A.

Nakon 12 sati kokultivacije stanice su sakupljene i dvaput isprane u FACS mediju, centrifugirane na 1 500 okretaja/min i pomiješane s protu-Ly49H protutijelima obilježenim biotinom. Nakon inkubacije kroz 30 min na 4°C stanice su dvaput isprane FACS medijem te im je dodano odgovarajuće sekundarno protutijelo (SA-PE za kontrolu ili PK-136 obilježen s alofikocijaninom). Nakon inkubacije od 30 min na 4°C stanice su isprane u hladnom PBS-u te fiksirane i permeabilizirane pomoću *Cytofix/Cytoperm* kita (BD Pharmingen) sukladno uputama proizvođača. Potom su tako pripremljene stanice obojane s protu-IFN- γ protutijelom XMG1.1 obilježenim izotiocijanatom koje je otopljeno u puferu za permeabilizaciju. Stanice su analizirane protočnom citometrijom na način da je izdvojena Ly49H⁺ populacija stanica i u njima mjerena razina IFN- γ .

3.11 Određivanje liganada za NKG2D protočnom citometrijom

MEF iz skotnih BALB/c ženki parenih s PWK/Pas mužjacima napravljen je kako je prethodno opisano. Stanice MEF-a su uzgajane u Petrijevim posudama (Greiner) te inficirane odgovarajućim MCMV-om ili ostavljene neinficiranim tijekom 12 sati. Uklonjen im je medij pa su oprane u 1 ml tripsina i nekoliko minuta inkubirane na 37°C uz 5% CO₂ i 90% vlažnosti da bi se odlijepile od podloge. Pri ispitivanju

ispoljavanja membranskog H60, umjesto tripsina korištena je 2 mM EDTA. U oba slučaja je zatim stanicama dodano 10 ml medija za uzgajanje stanica te su sakupljene i centrifugirane 5 min na 1 200 okretaja/min. Nadtalog je uklonjen, stanice su resuspendirane u FACS mediju, prebrojene i podijeljene na 500 000 stanica po uzorku.

Za bojanje stanica korištena su slijedeća protutijela: tetramer NKG2D-PE (8), SA-PE, štakorsko protu-H60 protutijelo (10), štakorsko protu-RAE-1 α , β , γ protutijelo (160), štakorsko protu-MULT-1 protutijelo (9), zečji protu-štakorski IgG-PE te zečji protu-štakorski-FITC.

Stanice su inkubirane s odgovarajućim protutijelima kroz 25 min na ledu i oprane 2 puta s po 1 ml FACS medija te su na kraju resuspendirane u 1 ml FACS medija s propidij jodidom (10 μ l propidij jodida/1 ml FACS medija). Kao negativna kontrola bojanja korištene su stanice obojene irelevantnim protutijelom istog porijekla kao i specifična protutijela ili su obojane samo sekundarnim protutijelima u odsustvu primarnih. Budući su mrtve stanice vizualizirane propidij jodidom, u analizu je uključeno samo 10 000 živih stanica.

3.12 Određivanje količine virusa u organima

Količina virusa u organima inficiranih životinja određena je standardnom metodom virusnih čistina (engl. *virus plaque forming assay*) u homogenatima organa na MEF-u porijeklom iz miševa BALB/c (19).

Tri dana prije titracije virusa stanice MEF-a su odmrznute i uzgojene u Petrijevim posudama. Dan prije izvođenja testa preseljene su u ploče za kulturu stanica od 48 jažica u količini od 50 000 stanica/jažici. Organi u kojima je određivana količina virusa su na dan testiranja odmrznuti i propasirani kroz metalnu mrežicu u volumenu od 2

ml 3% MEM-a. Homogenati organa su zatim u istom mediju razrijeđeni 200, 2 000 i 20 000 puta te u takvim razrijeđenjima nanoseni na ploče obložene MEF-om s kojih je prethodno uklonjen višak medija. Ploče su potom inkubirane 30 min na 37°C uz 5% CO₂ i 90% vlažnosti, a zatim centrifugirane 30 min na 800 x g. Nakon centrifugiranja ploče su ponovo inkubirane 30 min na 37°C uz 5% CO₂ i 90% vlažnosti te je u svaku jažicu dodanu približno 0.5 ml metil-celuloznog medija koji svojom viskoznošću onemogućava širenje virusa na bilo koji način osim vodoravnog. Ploče su inkubirane tijekom 3-4 dana na 37°C uz 5% CO₂ i 90% vlažnosti nakon čega su pomoću invertnog mikroskopa (Olympus) prebrojane virusne čistine (plakovi) u pojedinačnim rupicama. Svaka čistina odgovara jednoj infektivnoj jedinici virusa (engl. *plaque forming unit*, PFU). Na osnovi razrijeđenja homogenata organa izračunat je titar virusa u organima inficiranih životinja. Donja razina detekcije bila je 100 PFU/organu.

3.13 Statističke metode

Statistička značajnost razlika vrijednosti titra virusa između pojedinih organa određena je testom Mann-Whitney. Prema tom testu titrovi virusa (x i y) se značajno razlikuju ukoliko je P (x nasuprot y) manji od $\alpha=0,005$, pri čemu je P očekivana vrijednost pojave preklapanja vrijednosti, a α izabrana vrijednost značajnosti.

4 REZULTATI

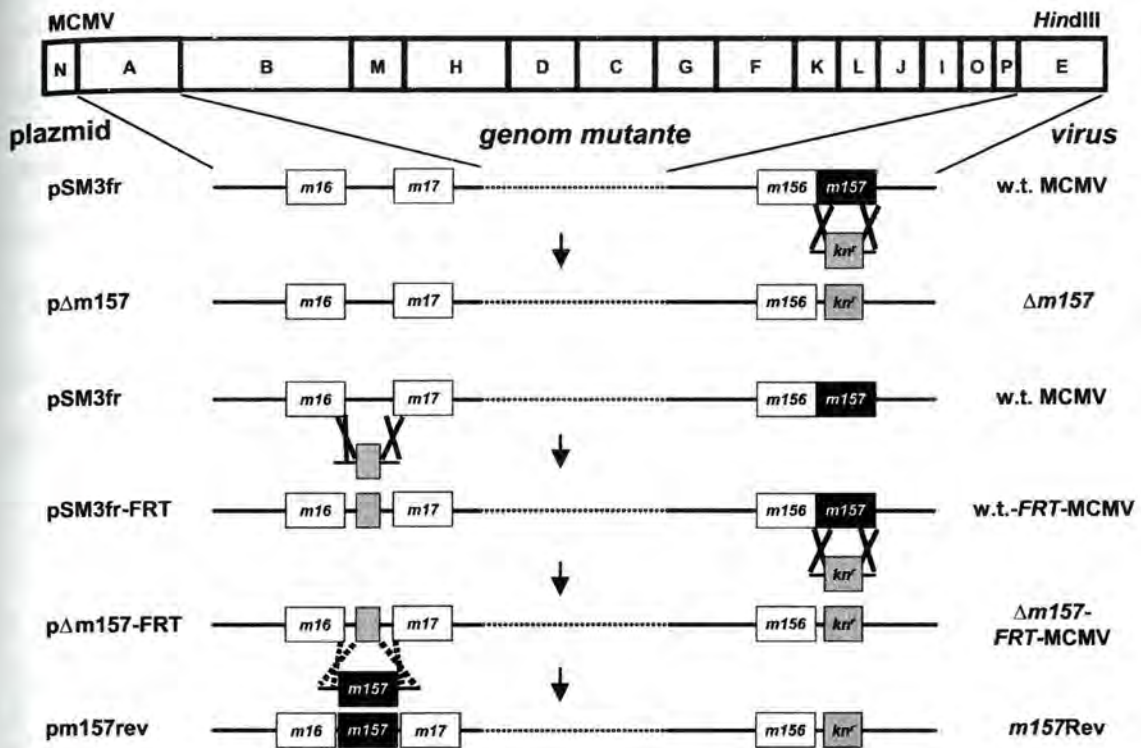
4.1 Proizvodnja rekombinantnih MCMV-a

Kao što je to istaknuto u uvodu, protein m157, određen genom *m157* MCMV-a, je ligand za aktivacijski receptor Ly49H ispoljen na NK-stanicama. Međutim, nejasno je da li postoji neki drugi virusni ili virusom inducirani stanični protein koji također dovodi do aktivacije NK-stanica posredstvom receptora Ly49H. Osim toga nepoznata je uloga međudjelovanja receptora Ly49H i proteina m157 u nadzoru MCMV-infekcije *in vivo*. Da bismo dobili uvid u ta biološka pitanja, homolognom rekombinacijom u *E. Coli* napravili smo mutantu MCMV-a u kojoj smo uklonili gen *m157* ($\Delta m157$) te njezin odgovarajući revertantni virus (*m157Rev*) u kojem smo navedeni gen vratili na ektopično mjesto u genom MCMV-a. Sve mutante MCMV-a napravili smo od roditeljskog plazmida pSM3fr MCMV-BAC (slika 3), iz kojeg je nastao virus MW97.01, za kojeg je ranije pokazano da posjeduje osobitosti w.t. MCMV-a *in vitro* i *in vivo* (210). Zbog jednostavnosti u daljnjem je tekstu za njega korišten naziv w.t. MCMV. Rekombinantni virus $\Delta m157$ dobili smo iz plazmida p $\Delta m157$ (slika 3) kojeg smo napravili homolognom rekombinacijom u *E. Coli* na način da smo na mjesto gena *m157* umetnuli gen *kn'*, kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode.

Kako bismo formalno potvrdili fenotip virusa u kojem je uklonjen gen *m157* napravili smo revertantni virus tj. virus u kojem smo navedeni gen vratili u genom MCMV-a. Treba napomenuti da je gen *m157* umetnut na ektopično mjesto u genomu MCMV-a, u nekodirajući dio genoma između gena *m16* i *m17*. Da bi to napravili prvo smo između gena *m16* i *m17* umetnuli jedno mjesto FRT od 48 bp pri čemu smo isjekli nekodirajuću regiju između ta dva gena veličine 70 bp (između nukleotida 15678 i 15748; slijed nukleotida je prema (212)). Na taj način napravili smo plazmid

pSM3fr-FRT te iz njega dobili virus w.t.-FRT-MCMV (**slika 3**) koji je između gena *m16* i *m17* imao jedno mjesto FRT, a koje nam je kasnije poslužilo za umetanje gena *m157* u taj dio genoma. Zatim smo iz plazmida pSM3fr-FRT uklonili gen *m157* skupa s njegovim pretpostavljenim promotorom, te smo iz novonastalog plazmida p Δ m157-FRT dobili virus Δ m157-FRT-MCMV (**slika 3**). Na koncu smo, također metodom homologne rekombinacije, gen *m157* skupa s njegovim pretpostavljenim promotorom, umetnuli na mjesto FRT-a između gena *m16* i *m17* te dobili virus *m157*Rev (**slika 3**).

Ispravnost mutageneze novostvorenih virusa Δ m157, Δ m157-FRT te *m157*Rev potvrdili smo restrikcijskom analizom i sekvencioniranjem regije gena *m157*. U ovdje prikazanim istraživanjima biološke uloge gena *m157 in vivo* korišten je mutantni virus Δ m157 te njegov odgovorajući revertantni virus *m157*Rev.



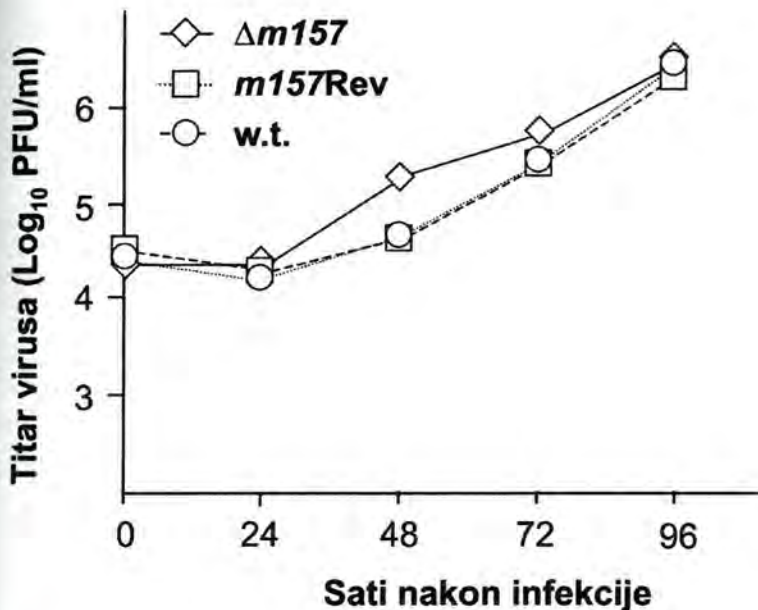
Slika 3. Genska struktura rekombinantnih MCMV-a.

Mapa djelovanja restrikcijskog enzima *HindIII* na MCMV Smith soja prikazana je na vrhu slike. Uklanjanje i umetanje gena *m157* učinjeno je homolognom rekombinacijom između roditeljskog MCMV BAC-a i linearnog DNA plazmida koji je sadržavao željeni genski slijed, gen rezistencije na kanamicin (*kan^r*) te homologiju s ciljnim mjestom virusnog genoma. Plazmid $p\Delta m157$ napravljen je homolognom rekombinacijom lineranog DNA fragmenta i plazmida pSM3fr w.t. MCMV BAC-a. Vraćanje gena *m157* napravljeno je u nekoliko koraka. Prvo je stvoren plazmid pSm3fr-FRT na način da je jedno mjesto FRT (sivi kvadrat) ubačeno u nekodirajući dio genoma između gena *m16* i *m17*. Zatim je iz navedenog plazmida uklonjen gen *m157* pri čemu je stvoren plazmid $p\Delta m157$ -FRT u koji je na kraju gen *m157* umetnut na FRT mjesto. Nazivi plazmida navedeni su s lijeve strane. Rekombinantni virusi dobiveni su transfekcijom plazmida u stanice MEF-a. Nazivi virusa dobivenih iz pojedinih plazmida navedeni su s desne strane.

4.2 Virus $\Delta m157$ i *m157Rev* ne razlikuju se od divljeg tipa MCMV-a *in vitro*

Testiranje biloške funkcije gena *m157 in vivo* treba početi od pretpostavke da genska manipulacija u smislu uklanjanja gena ili njegova umetanja na ektopično mjesto nema za posljedicu promjenu u sposobnosti rasta virusa u kulturi stanica. Naime, bilo kakav fenotip *in vitro* u smislu narušene kinetike rasta virusa u kulturi, u usporedbi s kontrolnim virusom, onemogućio bi njegovu uporabu u *in vivo* istraživanjima. Da bismo isključili tu mogućnost napravili smo test rasta virusnih mutanti *in vitro*. U tu smo svrhu MEF porijeklom iz miševa BALB/c inficirali virusima

$\Delta m157$, $m157Rev$ ili w.t. MCMV-om u dozi od 0,01 PFU po stanici. Nakon 24, 48, 72 i 96 h od infekcije odredili smo titar navedenih virusa u nadtalogu inficiranog MEF-a (slika 4). Na osnovu krivulja rasta virusnih mutanti uspoređenih s krivljom rasta w.t. MCMV-a zaključili smo da gen $m157$ nije neophodan za rast virusa u kulturi stanica, te da vraćanje navedenog gena na ektopično mjesto u genom virusa nema utjecaja na rast virusa *in vitro*. Prema tome, oba se virusa mogu koristiti u daljnjim istraživanjima *in vivo*.



Slika 4. Krivulje rasta rekombinantnih virusa *in vitro*.

Stanice MEF-a porijeklom iz miševa BALB/c inficirane su virusima $\Delta m157$, $m157Rev$ ili w.t. MCMV-om u dozi od 0,01 PFU po stanici. Nadtalozni inficiranih MEF-ova sakupljeni su u označenim vremenskim razmacima od infekcije te je u njima određena količina virusa.

4.3 Nedostatak gena $m157$ povećava virulentnost MCMV-a u Ly49H⁺ miševa

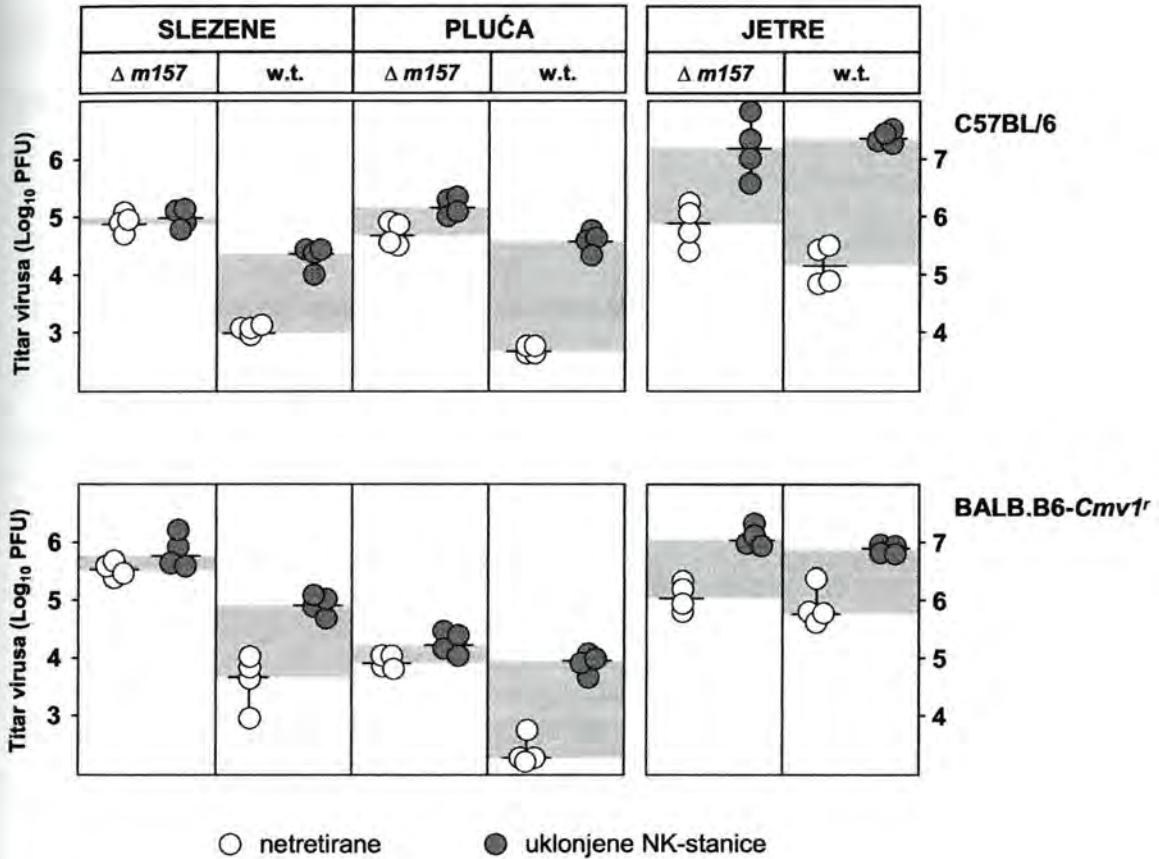
Tijekom ranog razdoblja MCMV-infekcije umnažanje virusa *in vivo* obrnuto je proporcionalno sposobnosti pojedinih sojeva miševa da posredstvom NK-stanica nadziru MCMV (169, 172). Ta je sposobnost određena genom $Ly49h$ ($Cmv1^l$) koji

određuje aktivacijski receptor Ly49H ispoljen na oko 50% NK-stanica (140, 174). Jedini do sada pronađeni ligand za ovaj receptor je protein m157 određen genom *m157* MCMV-a, čije vezivanje dovodi do stvaranja citokina i citotoksičnosti od strane NK-stanica (120, 145). Međutim, nije isključeno postojanje još nekog gena MCMV-a koji određuje protein što se može vezati na receptor Ly49H, tim više što neki proteini MCMV-a ostvaruju svoju funkciju jedino u kompleksu s drugim virusnim proteinima (214).

Da bi ispitali da li je protein m157 jedini protein MCMV-a koji djeluje na receptor Ly49H koristili smo rekombinantni virus $\Delta m157$ kojim smo inficirali Ly49H⁺ sojeve miševa. Miševe C57BL/6, kao i kongenične miševe BALB.B6-*Cmv1^r*, koji posjeduju NKC soja C57BL/6 na genetičkoj podlozi soja BALB/c (215), injicirali smo virusima $\Delta m157$ i w.t. MCMV-om u dozi od 5×10^5 PFU po mišu. Tri dana po infekciji miševe smo žrtvovali te smo odredili titrove virusa u njihovim organima (**slika 5**). U slezeni i plućima inficiranih miševa virus $\Delta m157$ dosegao je titar približno dva logaritma veći u usporedbi s titrom w.t. MCMV-a. Sukladno prethodno objavljenim podacima o značaju NK-stanica u kontroli MCMV-infekcije (37-39), uklanjanje NK-stanica pomoću specifičnih protutijela dovelo je do značajnog porasta titra w.t. MCMV-a, ali ne i virusa $\Delta m157$ (**slika 5**). Na osnovu navedenih rezultata može se zaključiti da uklanjanjem gena *m157* iz genoma MCMV-a virus postaje virulentniji u odnosu na w.t. MCMV te otporan na nadzor posredovan NK-stanicama *in vivo*. Ovi rezultati također upućuju na to da MCMV ne posjeduje drugi gen koji određuje protein koji bi se vezao na receptor Ly49H i tako doveo do aktivacije NK-stanica.

Za razliku od slezene i pluća, NK-stanice uspješno su nadzirale MCMV-infekciju u jetri inficiranih miševa neovisno o odsustvu ili prisustvu gena *m157* (**slika 5**). Ovaj je rezultat u skladu s prethodno objavljenim rezultatima prema kojima je gen *Ly49h*

(*Cmv1^f*) odgovoran za kontrolu MCMV-a u slezeni, ali ne i jetri inficiranih životinja (142, 169, 184). Zanimljivo je da je i u plućima, za razliku od jetre, virus $\Delta m157$ bio otporan na kontrolu posredovanu NK-stanicama. Dakle, $Ly49H^+$ NK-stanice važne su u nadzoru MCMV-infekcije ne samo u slezeni već i u plućima inficiranih životinja.



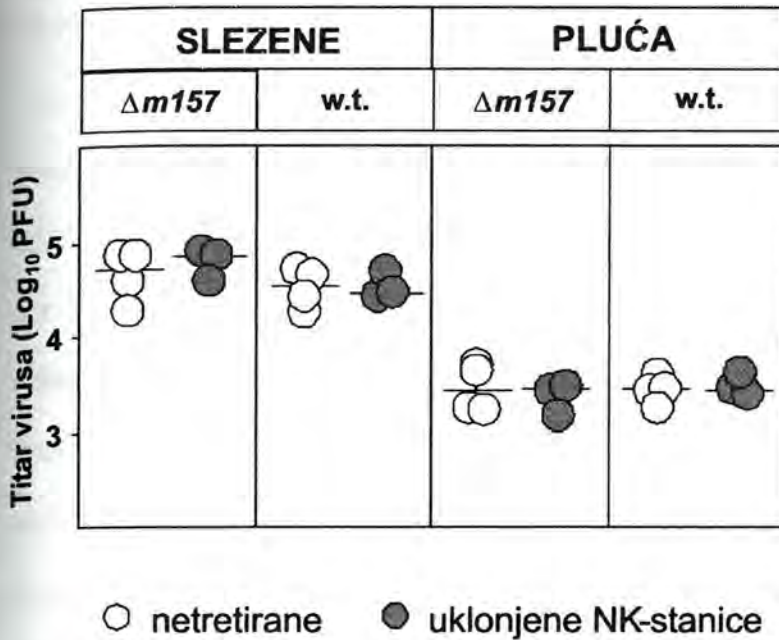
Slika 5. Uklanjanje gena *m157* ukida osjetljivost MCMV-a na nadzor posredovan NK-stanicama u $Ly49H^+$ miševa.

Miševi C57BL/6 i kongenični BALB.B6-*Cmv1^f* su ostavljeni netretiranima ili su im injiciranjem protu-NK1.1 protutijela uklonjene NK-stanice. Miševi su potom intravenski injicirani $\Delta m157$ ili w.t. MCMV-om u dozi od 5×10^5 PFU po mišu te žrtvovani tri dana kasnije. Testom virusnih čistina određen je virusni titar u njihovim organima. Prikazan je titar virusa u organima pojedinačnih životinja. Titar virusa u slezeni i plućima izražen je po organu, a u jetri po gramu tkiva. Horizontalne linije pokazuju vrijednost medijana. Razlike titra virusa između organa netretiranih miševa i organa miševa tretiranih s protu-NK1.1 protutijelima prikazane su osjenčanim poljima.

4.4 Nadzor MCMV-a od strane Ly49H⁺ NK-stanica ovisan je o perforinu

Nadzor MCMV-infekcije od strane NK-stanica razlikuje se ne samo između sojeva miševa već i u različitim organima. Nadzor MCMV-a u jetri posredovan je IFN- γ kojega luče NK-stanice privučene u ovaj organ djelovanjem kemokina MIP-1 α (70, 182-184). NK-stanice slezene posreduju svoju protu-MCMV aktivnost putem izlučivanja citolitičkih granula ispunjenih perforinom i granzimima (184). U skladu s navedenim činjenicama su i naši rezultati prikazani na **slici 5** iz kojih je vidljivo da je protein m157 važan u nadzoru virusa u slezeni i plućima, ali ne i u jetri.

Da bismo ispitali da li je protein m157 važan za pokretanje citolitičke aktivnosti NK-stanica posredovane perforinom koristili smo miševe C57BL/6 Prf^{-/-} kojima nedostaje gen za perforin, a na genskoj su pozadini soja C57BL/6. Miševe C57BL/6 Prf^{-/-} injicirali smo virusima $\Delta m157$ ili w.t. MCMV-om u dozi od 2×10^5 PFU po mišu. Tri dana kasnije miševe smo žrtvovali te odedili titrove virusa u njihovim organima (**slika 6**). Za razliku od miševa C57BL/6, virusna mutanta za gen *m157* imala je u slezeni i plućima inficiranih miševa C57BL/6 Prf^{-/-} približno isti titar kao i w.t. MCMV. Nadalje, uklanjanje NK-stanica nije dovelo do povišenja titra niti virusa $\Delta m157$ niti w.t. MCMV-a. Na osnovu dobivenog rezultata zaključili smo da je izlučivanje perforina od strane NK-stanica glavni mehanizam nadzora MCMV-a u slezeni i plućima inficiranih životinja te da u slučaju njegova nedostatka NK-stanice nisu u stanju posredovati nadzor virusa putem međudjelovanja proteina m157 i receptora Ly49H. Ovi rezultati potvrđuju dosadašnje spoznaje o različitosti pojedinih mehanizama djelovanja NK-stanica na MCMV u različitim organima te pokazuju da je perforinom posredovana citotoksičnost glavni mehanizam nadzora ovog virusa ne samo u slezeni već i u plućima inficiranih životinja.



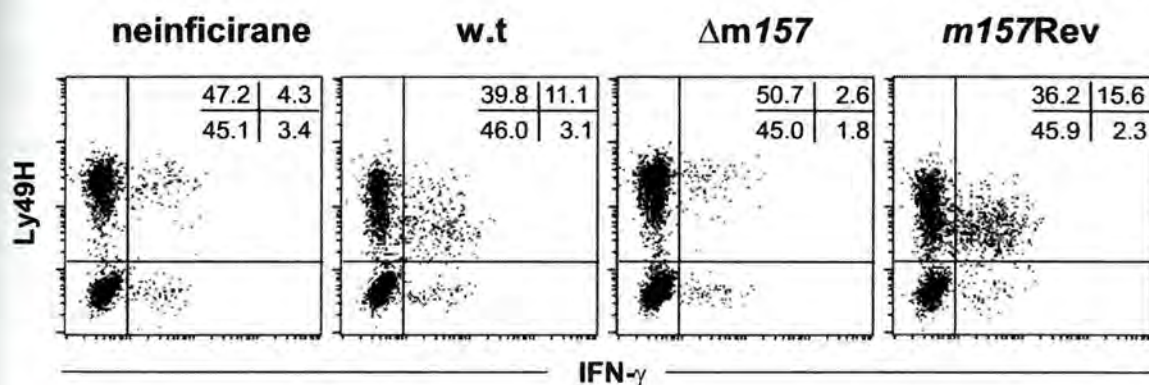
Slika 6. Replikacija virusne mutante za gen *m157* u miševa s nedostatkom perforina.

Miševi C57BL/6 Prf^{-/-} su ostavljeni netretiranima ili su im injiciranjem protu-NK1.1 protutijela uklonjene NK-stanice. Miševi su potom intravenski injicirani virusima $\Delta m157$ ili w.t. MCMV-om u dozi od 2×10^5 PFU po mišu te žrtvovani tri dana kasnije. Testom virusnih čistina određen je virusni titar u njihovim organima. Prikazan je titar virusa u organima pojedinačnih životinja. Horizontalne linije pokazuju vrijednost medijana.

4.5 Vraćanje gena *m157* u genom MCMV-a rezultira ponovnom osjetljivošću MCMV-a na nadzor posredovan NK-stanicama

Da bismo potvrdili da je otpornost virusne mutante $\Delta m157$ na nadzor posredovan NK-stanicama isključivo posljedica nedostatka proteina *m157*, a ne nekog drugog učinka u mutanti, usporedili smo sposobnost virusa $\Delta m157$, *m157Rev* i w.t. MCMV-a da aktiviraju Ly49H⁺ NK-stanice. U tu smo svrhu koristili splenocite porijeklom iz miševa C57BL/6 RAG1^{-/-}, kojima nedostaje gen *RAG1* (engl. *recombination activating gene 1*) neophodan za preuređenje gena koji određuje stanični receptor na limfocita T i B. Samim tim ovi miševi ne posjeduju zrele limfocite T i B, ali posjeduju funkcionalne NK-stanice. Splenocite miševa C57BL/6 RAG1^{-/-} kokultivirali smo sa stanicama IC-21 koje smo prethodno inficirali virusima $\Delta m157$, *m157Rev* ili w.t.

MCMV-om u dozi od 5 MOI po stanici ili ih ostavili neinficiranim kroz 24 h. Nakon 12 h kokultivacije protočnom citometrijom smo određivali prisustvo IFN- γ u Ly49H⁺ NK-stanicama. Prisustvo IFN- γ poslužilo nam je u ovome testu kao znak aktivacije NK-stanica. Kokultivacija splenocita sa stanicama IC-21 inficiranim virusima *m157Rev* ili w.t. MCMV-om dovela je do značajne aktivacije Ly49H⁺ NK-stanica (15.6% u slučaju infekcije *m157Rev* i 11.1% u slučaju infekcije w.t. MCMV-om) (slika 7). Nasuprot tome, IC-21 stanice inficirane virusnom mutantom $\Delta m157$ nisu bile sposobne aktivirati Ly49H⁺ NK-stanice te je udio aktiviranih NK-stanica (2.6%) bio čak manji od udjela aktiviranih NK-stanica kokultiviranih s neinficiranim stanicama IC-21 (4.3%) (slika 7). Ovi rezultati pokazuju da je protein m157 ključan u aktivaciji Ly49H⁺ NK-stanica.

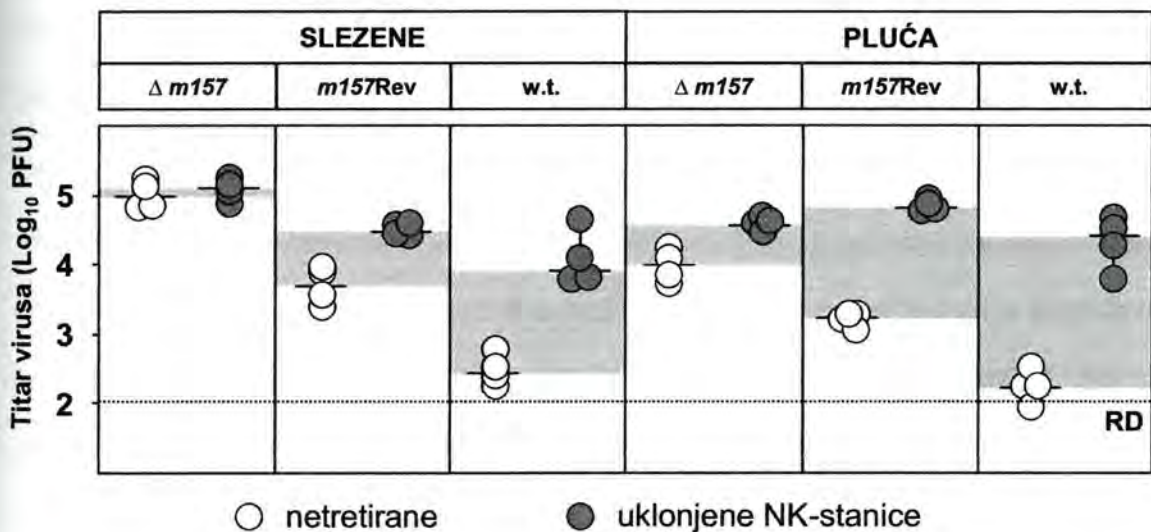


Slika 7. Aktivacija NK-stanica posredstvom proteina m157.

Splenociti porijeklom iz miševa C57BL/6 RAG^{-/-} kokultivirani su kroz 12 h sa stanicama IC-21 koje su prethodno kroz 24 h bile inficirane navedenim virusima ili su ostavljene neinficirane. Površina stanica je potom obojana protu-Ly49H protutijelima i protu-NK1.1 protutijelima, a unutrašnjost s protu-IFN- γ protutijelima. Prikazane su Ly49H⁺NK1.1⁺ stanice. Postoci stanica u svakom kvadrantu prikazani su u gornjem desnom uglu.

Da bismo testirali da li vraćanje gena *m157* u genom MCMV-a ponovo dovodi do osjetljivosti MCMV-a u Ly49H⁺ miševa na nadzor posredovan NK-stanicama, miševe C57BL/6 injicirali smo virusima $\Delta m157$, *m157Rev* ili w.t. MCMV-om u dozi od 5×10^5

PFU po mišu. Tri dana kasnije miševе smo žrtvovali te odredili titrove virusa u njihovim organima (**slika 8**). Kao što se vidi na **slici 8**, vraćanje gena *m157* u virusni genom rezultiralo je povratkom osjetljivosti virusa *m157Rev* na nadzor posredovan NK-stanicama. Virus *m157Rev* imao je statistički značajno manji titar od virusa $\Delta m157$ u slezeni i plućima inficiranih miševa, a uklanjanje NK-stanica imalo je za posljedicu povećanje titra virusa *m157Rev* dok nije imalo utjecaja na titar virusa $\Delta m157$. Međutim, virus *m157Rev* pokazao se virulentnijim u odnosu na w.t. MCMV te je, osobito u slezeni inficiranih miševa, bio manje osjetljiv na uklanjanje NK-stanica. Premda se virus *m157Rev* nije *in vivo* u potpunosti ponašao kao w.t. MCMV rezultati su dovoljno jasno potvrdili značaj *m157* proteina u nadzoru MCMV-infekcije.

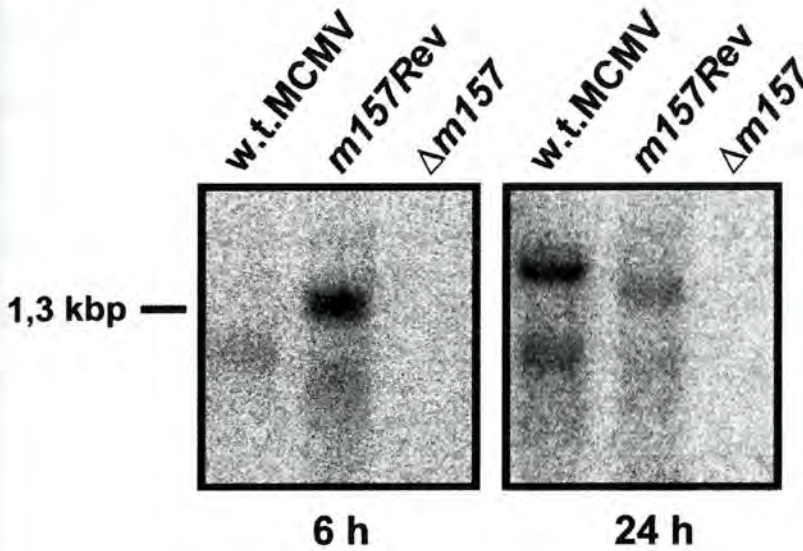


Slika 8. Vraćanjem gena *m157* MCMV je ponovo osjetljiv na nadzor posredovan NK-stanicama. Miševi C57BL/6 su ostavljeni netretiranima ili su im injiciranjem protu-NK1.1 protutijela uklonjene NK-stanice. Miševi su potom intravenski injicirani virusima $\Delta m157$, *m157Rev* ili w.t. MCMV-om u dozi od 5×10^5 PFU po mišu te žrtvovani tri dana kasnije. Testom virusnih čistina određen je virusni titar u njihovim organima. Prikazan je titar virusa u organima pojedinačnih životinja. Horizontalne linije pokazuju vrijednost medijana. Razlike titra virusa između organa netretiranih miševa i organa miševa tretiranih s protu-NK1.1 protutijelima prikazane su osjenčanim poljima. RD, razina detekcije

4.6 Transkript gena *m157* javlja se ranije tijekom infekcije virusom *m157Rev* nego tijekom infekcije virusom w.t. MCMV

Iako smo korištenjem virusa *m157Rev* potvrdili značaj proteina *m157* u aktivaciji NK-stanica *in vivo*, nešto drugačija osjetljivost na nadzor posredovan NK-stanicama u odnosu na w.t. MCMV ukazivala je na to da je posrijedi drugačija kinetika ispoljavanja gena *m157* u revertantnom virusu zbog njegova umetanja na ektopično mjesto u genomu MCMV-a. Da bismo to ispitali napravili smo Northern blot virusne RNA. Fibroblaste NIH3T3 inficirali smo virusima w.t. MCMV, *m157Rev* ili $\Delta m157$ u dozi od 3 MOI po stanici. Nakon 6 i 24 h izdvojili smo ukupnu RNA iz inficiranih stanica, razdvojili je na denaturirajućem formaldehidnom gelu, prebacili je na najlonsku membranu i hibridizirali s DNA sondom karakterističnom za 528 bp gena *m157* i obilježenom s [α - 32 P]dCTP-om. Kao što smo i očekivali, u stanicama inficiranim virusom $\Delta m157$ nismo mogli detektirati *m157*-specifičnu mRNA (slika 9). Specifičnu mRNA detektirali smo u stanicama inficiranim w.t. MCMV-om i u stanica inficiranih virusom *m157Rev*. Međutim, 6 h nakon infekcije mRNA specifičnu za *m157* našli smo samo u stanica inficiranih *m157Rev*, ali ne i u stanicama inficiranim w.t. MCMV-om, u kojima je specifična mRNA pronađena tek nakon 24 h (slika 9). To je najvjerojatnije posljedica činjenice da smo pri izradi revertante za gen *m157* na ektopično mjesto između gena *m16* i *m17* ubacili ne samo ORF *m157* već i dio genoma za koji smo pretpostavljali da ima ulogu promotora ovog gena. Kraći mRNA transkript u stanicama inficiranim virusom *m157Rev* posljedica je činjenice da smo se pri umetanju gena *m157* na ektopično mjesto koristili signalom polyA iz goveđeg hormona rasta. Nadalje, u stanicama inficiranim w.t. MCMV-om vidljiv je još jedan dodatni transkript 24 h nakon infekcije koji možda također može biti odgovoran za razliku u fenotipu između virusa *m157Rev* i w.t. MCMV-a *in vivo*. Navedene razlike

ispoljavanja ektopičnog gena *m157* mogle bi objasniti blage razlike u ponašanju virusa *m157Rev* *in vivo*.



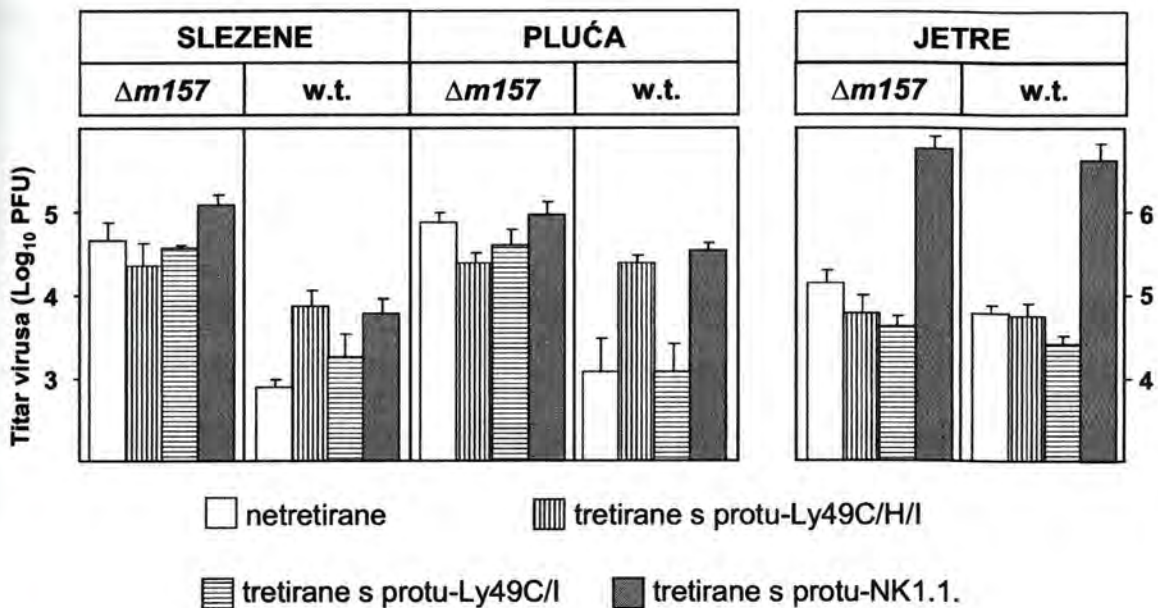
Slika 9. Razlike u kinetici *m157*-specifične mRNA u virusima *m157Rev* i w.t. MCMV-u.

Fibroblasti NIH3T3 inficirani su navedenim virusima u dozi od 3 MOI/stanici i iz njih je nakon 6 i 24 h infekcije izdvojena ukupna RNA. Uzorci koji su sadržavali jednake količine RNA razdvojeni su na denaturirajućem formaldehidnom gelu. Uslijedio je Northern blot i hibridizacija s DNA sondom karakterističnom za 528 bp gena *m157* i obilježenom [α - 32 P]dCTP-om.

4.7 Uklanjanje Ly49H⁺ NK stanica nema značaja u kontroli virusa $\Delta m157$

U svrhu testiranja značaja Ly49H⁺ NK-stanica u nadzoru virusne infekcije, miševi C57BL/6 injicirani su dan prije infekcije protutijelima koja uklanjaju pojedine ili sve subpopulacije NK-stanica. Koristili smo protutijela 5E6 koja specifično prepoznaju receptore Ly49C/I te protutijela 1F8 koja specifično prepoznaju receptore Ly49C/H/I na NK-stanicama. Kao kontrolna protutijela upotrijebili smo protu-NK1.1 protutijela koja su i inače korištena za uklanjanje NK1.1⁺ stanica. Dan nakon injiciranja specifičnih protutijela, miševe C57BL/6 injicirali smo virusima $\Delta m157$ ili w.t. MCMV-om u dozi od 5×10^5 PFU po mišu. Tri dana kasnije miševe smo žrtvovali te odredili titrove virusa u njihovim organima. Uklanjanje Ly49C/H/I⁺ stanica u miševa inficiranih

w.t. MCMV-om dovelo je do porasta titra virusa na razinu titra kod miševa kojima su uklonjene NK1.1⁺ stanice u svim ispitivanim organima dok uklanjanje Ly49C/I⁺ stanica nije imalo utjecaja na titar w.t. MCMV-a (slika 10). Za razliku od toga uklanjanje bilo koje populacije NK-stanica nije dovelo do porasta titra virusa $\Delta m157$ u slezeni i plućima inficiranih miševa. U skladu s rezultatima prikazanim na slici 5, uklanjanje NK1.1⁺ stanica, ali ne i uklanjanje Ly49C/H/I⁺ stanica dovelo je do porasta titra virusa $\Delta m157$ u jetri. Prema tome može se zaključiti da je samo subpopulacija Ly49H⁺ NK stanica odgovorna za nadzor MCMV-infekcije u slezeni i plućima inficiranih životinja te da druge subpopulacije imaju mali značaj u nadzoru MCMV-a. Nadalje, Ly49H⁺ NK stanice nisu važne u nadzoru MCMV-infekcije u jetri inficiranih miševa.



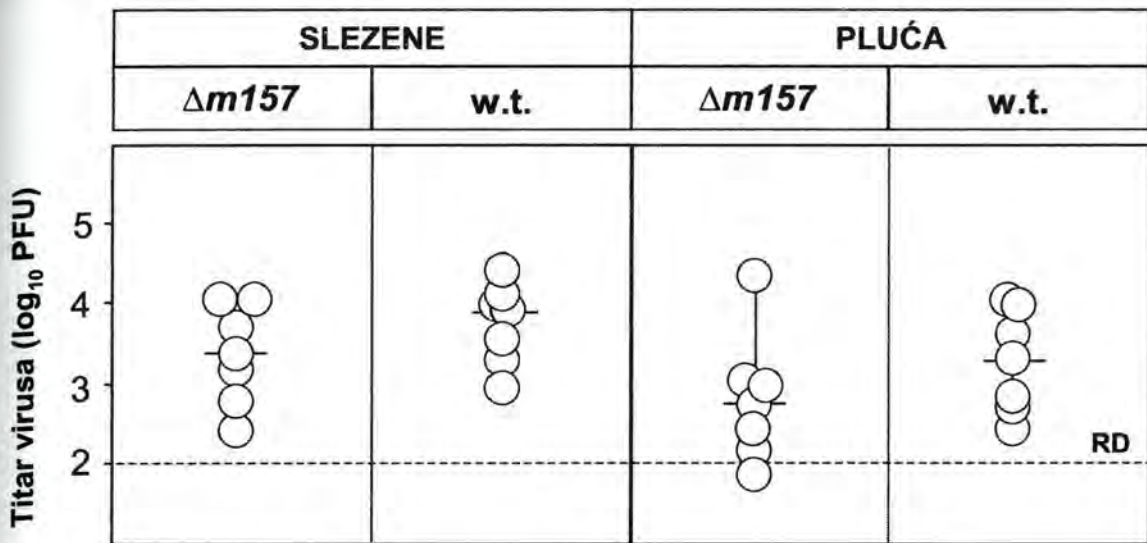
Slika 10. Ly49H⁺ NK-stanice nemaju značaj u kontroli virusa $\Delta m157$.

Miševi C57BL/6 su ostavljeni netretiranima ili su im injicirana protu-Ly49C/I protutijela (5E6), protu-Ly49C/H/I protutijela (1F8) ili protu-NK1.1 protutijela. Miševi su potom intravenski injicirani virusima $\Delta m157$ ili w.t. MCMV-om u dozi od 5×10^5 PFU po mišu te žrtvovani tri dana kasnije. Testom virusnih čistina određen je virusni titar u njihovim organima. Prikazana je srednja vrijednost virusnih titrova od 5 miševa po grupi te standardna devijacija.

4.8 Gen *m157* nije značajan u kontroli MCMV-a u miševa koji ne posjeduju receptor Ly49H

Receptori NK-stanica miša različito su ispoljeni tijekom njihova razvoja i sazrijevanja. Tako su inhibicijski receptor CD94/NKG2A i aktivacijski receptor NKG2D ispoljeni na NK-stanicama vrlo rano, još tijekom intrauterinog života miša (122). Za razliku od njih receptori Ly49 počinju se ispoljavati tek po okotu i to na način da se udio NK-stanica koji ispoljava ove receptore povećava na račun NK-stanica koje ispoljavaju receptor CD94/NKG2A (124, 125). U dobi od oko 8 tjedana sve NK-stanice miša ispoljavaju jedan ili više receptora Ly49, a samo 50% NK-stanica ispoljava CD94/NKG2A. Zbog činjenice da mladi miševi ne posjeduju zrele NK-stanice tj. da njihove NK-stanice ne ispoljavaju receptore Ly49, prepostavili smo da će nadzor MCMV-infekcije u novookoćenih miševa, čije odrasle jedinice normalno posjeduju receptor Ly49H na oko 50% svojih NK-stanica, biti neovisan o prisustvu ili odsustvu gena *m157*.

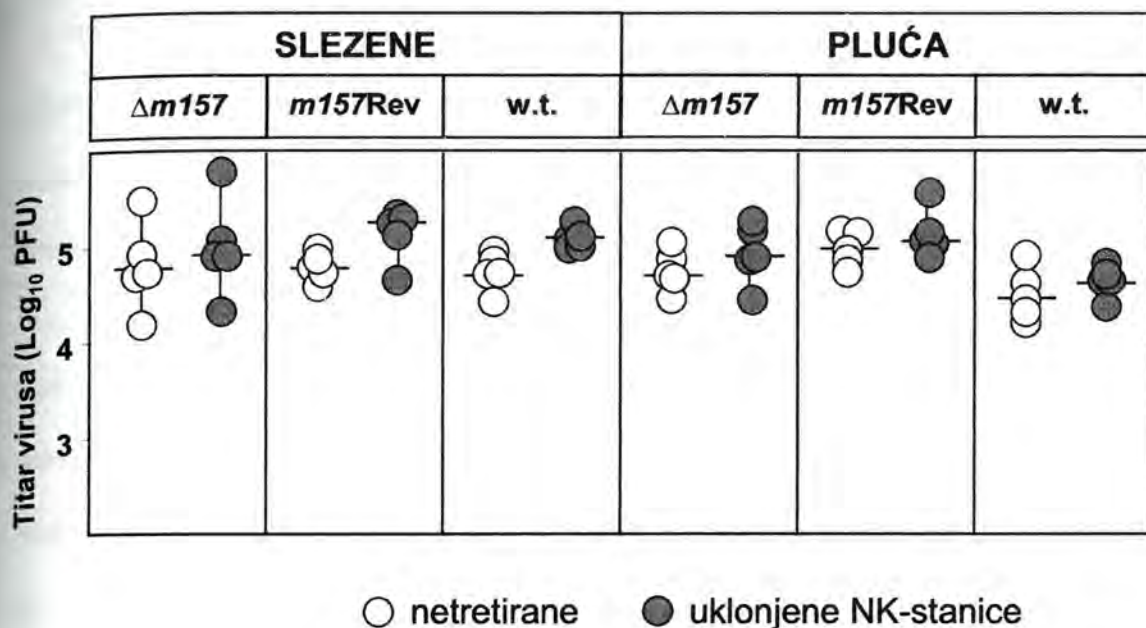
Da bismo ispitali ovu pretpostavku novookoćene miševe C57BL/6 injicirali smo 12 sati po okotu virusima $\Delta m157$ ili w.t. MCMV-om u dozi od 1 000 PFU po mišu te ih žrtvovali 4. dan po infekciji i u njihovim organima odredili virusni titar. Sukladno našim očekivanjima, virus $\Delta m157$ nije bio virulentniji od w.t. MCMV-a ni u slezenama ni u plućima inficiranih novookoćenih miševa (**slika 11**). Prema tome, dok odrasli miševi C57BL/6 uspješno nadziru MCMV preko vezivanja proteina *m157* na receptor Ly49H NK-stanica, ispoljavanje proteina *m157* na površini inficiranih stanica novookoćenih miševa istog soja ne dovodi do aktivacije NK-stanica odnosno indirektno se može zaključiti da NK-stanice novookoćenih miševa, poput ostalih receptora obitelji Ly49, još ne ispoljavaju receptor Ly49H.



Slika 11. Replikacija virusne mutante za gen *m157* u novookoćenim miševa C57BL/6.

Novookoćeni miševi C57BL/6 injicirani su intraperitonealno 12 h po okotu virusima $\Delta m157$ ili w.t. MCMV u dozi od 1000 PFU po mišu te žrtvovani 4 dan. Testom virusnih čistina određen je virusni titar u njihovim organima. Prikazan je titar virusa u organima pojedinačnih životinja. Horizontalne linije pokazuju vrijednost medijana. RD, razina detekcije

Soj miševa BXD8 je rekombinantni soj nastao od miševa C57BL/6 (Ly49H⁺) i DBA/2 (Ly49H⁻) (175). Miševi BXD8 posjeduju NKC od soja C57BL/6, ali su ipak osjetljivi na infekciju s MCMV-om. Razlog tome je mutacija gena *Ly49h* koja ima za posljedicu nemogućnost ispoljavanja receptora Ly49H na površini NK-stanica (142, 174). Kako bismo ispitali da li u ovog soja miševa protein *m157* ima učinka u NK-ovisnom nadzoru MCMV-infekcije, miševima BXD8 smo uklonili NK-stanice te ih inficirali virusima $\Delta m157$, *m157Rev* ili w.t. MCMV-om u dozi od 2×10^5 PFU po mišu. Tri dana po infekciji miševe smo žrtvovali i odredili titrove virusa u njihovim organima (**slika 12**). Sukladno rezultatima dobivenim na novookoćenim miševima, i u miševa BXD8 virus kojem je uklonjen gen *m157* nije bio virulentniji u odnosu na svoj revertantni virus i w.t. MCMV, a uklanjanje NK-stanica nije imalo učinka na titar virusa. Navedeni rezultati pokazuju da u odsustvu receptora Ly49H protein *m157* nije važan u nadzoru MCMV-a od strane NK-stanica.



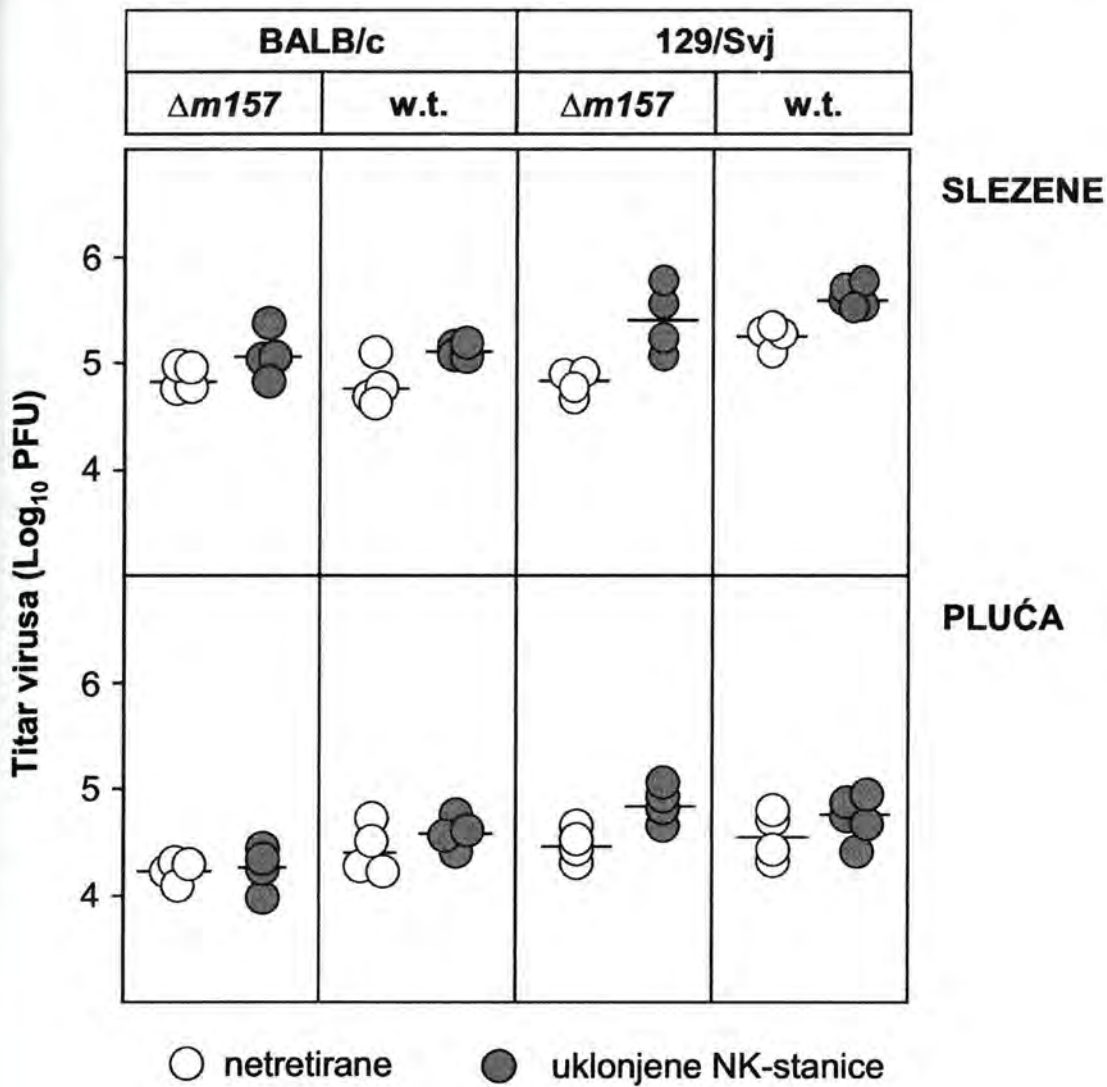
Slika 12. Replikacija virusa $\Delta m157$ u miševa BXD8.

Miševi BXD8 su ostavljeni netretiranima ili su im injiciranjem protu-NK1.1 protutijela uklonjene NK-stanice. Miševi su potom intravenski injicirani virusima $\Delta m157$, *m157Rev* ili w.t. MCMV-om u dozi od 2×10^5 PFU po mišu te žrtvovani tri dana kasnije. Testom virusnih čistina određen je virusni titar u njihovim organima. Prikazan je titar virusa u organima pojedinačnih životinja. Horizontalne linije pokazuju vrijednost medijana.

4.9 Gen *m157* nema značaj u MCMV-osjetljivim sojevima BALB/c i 129/Svj

Osim što služi kao ligand za aktivacijski receptor Ly49H na NK-stanicama miševa C57BL/6, pokazano je da se rekombinantni protein *m157* može vezati *in vitro* i za inhibicijski receptor Ly49I na NK-stanicama miševa 129/Svj (120). Na osnovu toga moglo bi se zaključiti da je u tog soja miševa značaj proteina *m157* zapravo u inhibiciji NK-stanica te da je on odgovoran za izbjegavanje prepoznavanja virusa od strane NK-stanica. Zanimljivo je da i neki drugi MCMV-osjetljivi sojevi miševa, poput BALB/c, posjeduju receptor Ly49I, ali on ne može na sebe vezati rekombinantni protein *m157* (120). Ako se rezultati dobiveni u *in vitro* testovima mogu primijeniti *in vivo*, onda bi rekombinantni virus koji ne posjeduje gen *m157* trebao biti atenuiran u odnosu na w.t. MCMV i to samo u miševa 129/Svj, a ne i u miševa BALB/c.

Kako bismo provjerili ovu pretpostavku miševu 129/Svj i BALB/c inficirali smo virusima $\Delta m157$ ili w.t. MCMV-om u dozi od 2×10^5 PFU po mišu. Tri dana kasnije miševu smo žrtvovali i odredili titar virusa u njihovim organima (**slika 13**). U slezeni i plućima miševa BALB/c titar virusa $\Delta m157$ bio je sličan titru w.t. MCMV-a, sukladno rezultatima dobivenim *in vitro*. Međutim, u miševa 129/Svj, u kojih je dokazano vezivanje proteina m157 s inhibicijskim receptorom Ly49I, bilo je za očekivati atenuaciju virusa $\Delta m157$. Međutim naši rezultati nisu potvrdili ovu pretpostavku. Naime, kao što je prikazano na **slici 13** titar virusa $\Delta m157$ u miševima 129/Svj nije bio značajnije manji u odnosu na tita w.t. MCMV-a. Osim toga, uklanjanje NK-stanica nije dovelo do rasta virusnog titra što je u skladu s nemogućnošću NK-stanica da nadziru virus u MCMV-osjetljivih miševa. Prema tome vezivanje proteina m157 za inhibicijski receptor Ly49I vjerojatno nema značaj u kontroli virusa *in vivo*.



Slika 13. Replikacija virusa $\Delta m157$ u miševa BALB/c i 129/Svj.

Miševi BALB/c i 129/Svj su ostavljeni netretiranima ili su im injiciranjem protu-AGM1 protuseruma uklonjene NK-stanice. Miševi su potom intravenski injicirani virusima $\Delta m157$ ili w.t. MCMV-om u dozi od 2×10^5 PFU po mišu te žrtvovani tri dana kasnije. Testom virusnih čistina određen je virusni titar u njihovim organima. Prikazan je titar virusa u organima pojedinačnih životinja. Horizontalne linije pokazuju vrijednost medijana.

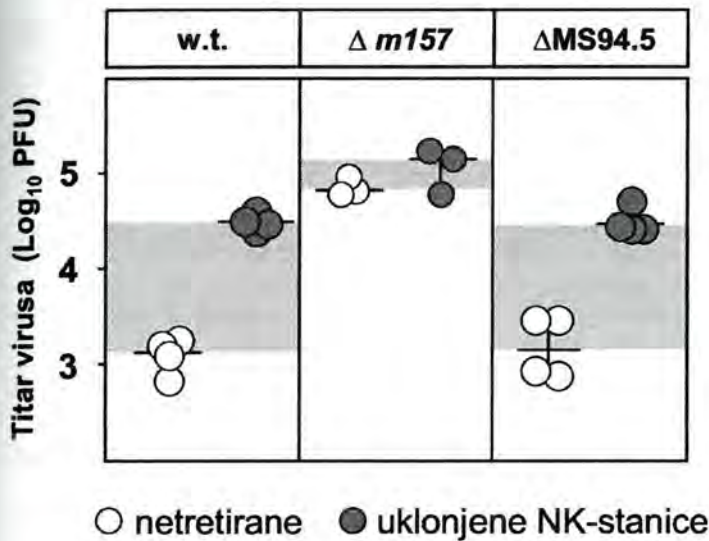
4.10 Geni MCMV-a za izbjegavanje nadzora od strane NK-stanica sprječavaju nadzor nad virusom $\Delta m157$

MCMV posjeduje brojne gene koji određuju proteine čiji je zadatak sprječavanje prepoznavanja inficiranih stanica od strane NK-stanica. Među njima najbolje su karakterizirani geni koji određuju proteine odgovorne za regulaciju staničnih liganada

za aktivacijski receptor NKG2D. Tako gp40, određen genom *m152*, posreduje negativnu regulaciju proteina RAE-1 (160), a proteini MCMV-a *m145* i *m155* negativno reguliraju MULT-1 odnosno H60 na površini inficirane stanice (9, 10). Učinak navedenih virusnih proteina na NK-ovisan nadzor MCMV-infekcije vidljiv je samo u MCMV-osjetljivih sojeva miševa kao što je soj BALB/c. Na taj način spriječena je aktivacija NK-stanica u ovih miševa, pa uklanjanje NK-stanica ne dovodi do bitnog porasta titra w.t. MCMV-a. Miševi C57BL/6 ispoljavaju proteine RAE-1 i MULT-1, a njihove NK-stanice također posjeduju receptor NKG2D. Usprkos tome oni uspješno nadziru MCMV-infekciju. Naši dosadašnji rezultati pokazali su da je u ovih miševa nadzor MCMV-a od strane NK-stanica posredovan vezivanjem virusnog proteina *m157* za aktivacijski receptor Ly49H. Iako je ovaj receptor ispoljen na svega 50% NK-stanica, čini se da njegova aktivacija nadjačava učinak virusa na druge receptore NK-stanica.

Kako bismo ispitali da li se u odsustvu Ly49H-posredovane aktivacije NK-stanica mogu izučavati učinci gena MCMV-a zaduženih za nadzor aktivnosti NK-stanica, koristili smo deleciju mutantu MCMV-a Δ MS94.5 kojoj uz gen *m157* nedostaje još 14 drugih gena (*m151-m165*) koji nisu bitni za replikaciju virusa, a imaju imunoregulacijsku funkciju. Među njima je i gen *m152* koji određuje protein odgovoran za negativnu regulaciju proteina RAE1 (160), a kao što smo već napomenuli ovaj je protein ispoljen u miševa C57BL/6. Miševe C57BL/6 injicirali smo intravenski virusima w.t. MCMV, Δ *m157* ili Δ MS94.5 u dozi od 5×10^5 PFU po mišu. Tri dana kasnije miševe smo žrtvovali te odredili titrove virusa u njihovim plućima. Kao što se vidi na **slici 14**. NK-stanice ovih miševa uspješno su nadzirale w.t. MCMV te je nakon njihova uklanjanja došlo do porasta titra virusa. Virus Δ *m157* bio je, sukladano dosada prikazanim rezultatima, virulentniji u odnosu na w.t. MCMV i otporan na

djelovanje NK-stanica. Međutim, životinje koje smo inficirali virusom Δ MS94.5 imale su titar virusa na razini w.t. MCMV-a (slika 14) te je također rastao nakon uklanjanja NK-stanica, usprkos činjenici da njihove NK-stanice nisu mogle biti aktivirane putem vezivanja proteina m157. Navedeno pokazuje da je u nedostatku gena *m157* moguće izučavati značaj i drugih virusnih gena koji određuju proteine zadužene za nadzor djelovanja NK-stanica.

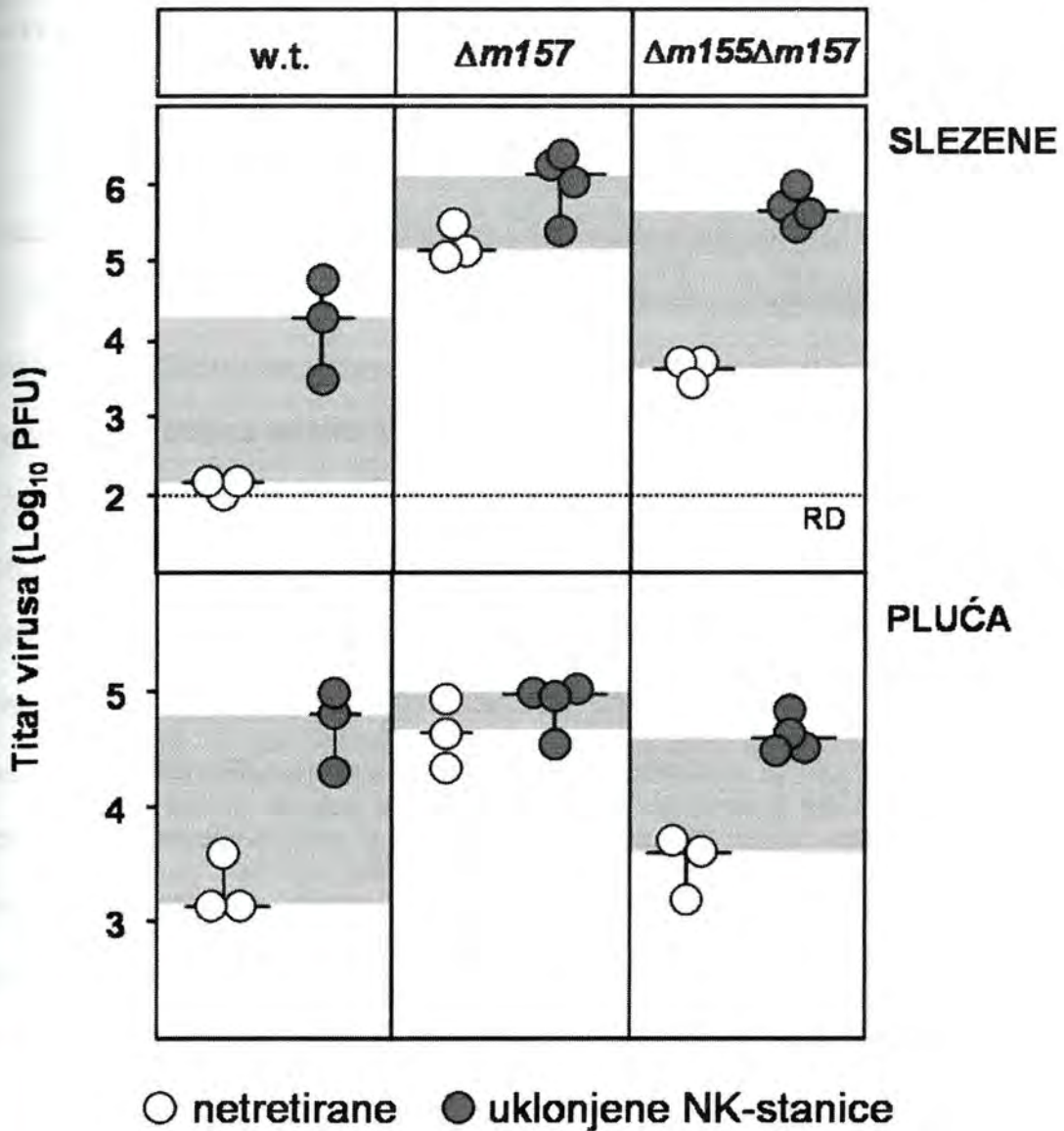


Slika 14. Uklanjanje gena *m157* omogućava djelovanje drugih virusnih gena za izbjegavanje NK-stanica

Miševi C57BL/6 su ostavljeni netretiranima ili su im injiciranjem protu-NK1.1 protutijela uklonjene NK-stanice. Miševi su potom intravenski injicirani virusima w.t. MCMV, Δ *m157* ili Δ MS94.5 u dozi od 5×10^5 PFU po mišu te žrtvovani tri dana kasnije. Testom virusnih čistina određen je virusni titar u njihovim plućima. Prikazan je titar virusa u plućima pojedinačnih životinja. Horizontalne linije pokazuju vrijednost medijana. Razlike titra virusa između organa netretiranih miševa i organa miševa tretiranih s protu-NK1.1 protutijelima prikazane su osjenčanim poljima.

Kao što je već ranije spomenuto protein m155, određen genom *m155* MCMV-a, negativno regulira NKG2D ligand H60 (10). Zanimalo nas je da li će nedostatak ovoga gena u kombinaciji s nedostatkom gena *m157* imati učinka na aktivaciju NK-stanica. Stoga smo napravili dvostruku deleciju mutantu (Δ *m155* Δ *m157*) u kojoj su homolognom rekombinacijom uklonjeni geni *m155* i *m157* (10). Kako je protein H60

ispoljen u miševa BALB/c, ali ne i u miševa C57BL/6, u idućim istraživanjima koristili smo kongenične miševe BALB.B6-*Cmv1^f* koji posjeduju NKC od miševa C57BL/6 na genetičkoj podlozi miševa BALB/c. Navedene miševe smo inijcirali intravenski virusima $\Delta m157$, $\Delta m155\Delta m157$ ili w.t. MCMV-om u dozi od 5×10^5 PFU po mišu. Četiri dana kasnije miševe smo žrtvovali i odredili titrove virusa u njihovim organima. U skladu s prethodno navedenim rezultatima NK-stanice ovih miševa uspješno su nadzirale divlji tip virusa za razliku od virusa $\Delta m157$ koji je bio otporan na djelovanje NK-stanica (**slika 15**). Nakon uklanjanja gena *m155* virus $\Delta m155\Delta m157$ je još uvijek bio virulentniji od w.t. MCMV-a, ali je postao osjetljiv na nadzor posredovan NK-stanicama te je njegov titar rastao nakon njihova uklanjanja. Ovime smo pokazali da u nedostatku aktivacije putem receptora Ly49H, NK-stanice miševa koji su inače otporni na infekciju MCMV-om, mogu uspješno nadzirati infekciju putem aktivacije receptora NKG2D odnosno da posjeduju funkcionalan receptor NKG2D. Nadalje, ovi rezultati pokazuju da je nadzor nad virusom $\Delta m157$ spriječen djelovanjem virusnih gena odgovornih za inhibiciju aktivacije receptora NKG2D.



Slika 15. NK-ovisan nadzor virusa $\Delta m155\Delta m157$.

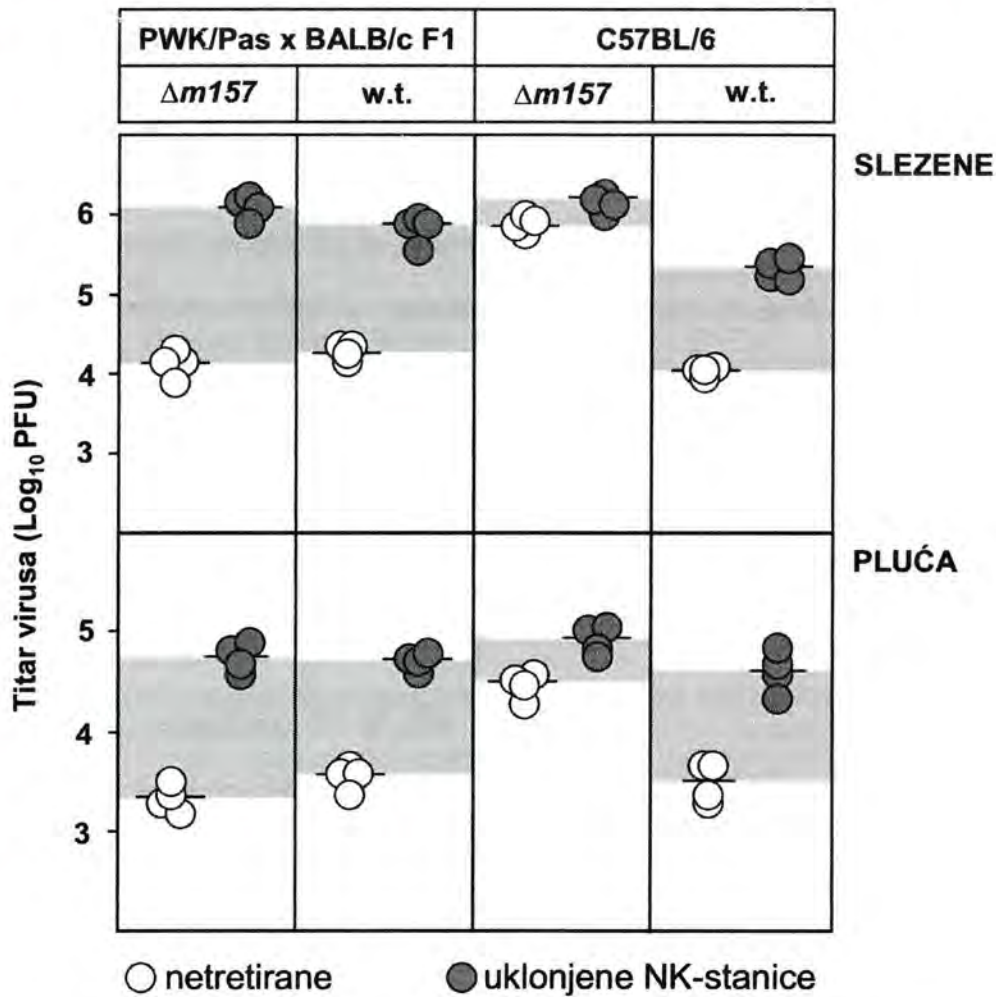
Miševi BALB.B6-*Cmv1^f* su ostavljeni netretiranima ili su im injiciranjem protu-NK1.1 protutijela uklonjene NK-stanice. Miševi su potom intravenski injicirani virusima w.t. MCMV-om, $\Delta m157$ ili $\Delta m155\Delta m157$ u dozi od 5×10^5 PFU po mišu te žrtvovani tri dana kasnije. Testom virusnih čistina određen je virusni titar u njihovim organima. Prikazan je titar virusa u organima pojedinačnih životinja. Horizontalne linije pokazuju vrijednost medijana. Razlike titra virusa između organa netretiranih miševa i organa miševa tretiranih s protu-NK1.1 protutijelima prikazane su osjenčanim poljima. RD, razina detekcije

4.11 Otpornost divljih miševa soja PWK/Pas na MCMV-infekciju nije posredovana djelovanjem gena *m157*

Pitanje koje se dugo postavlja u ovom istraživačkom području je da li je otpornost miševa na MCMV posljedica isključivo međudjelovanja receptora Ly49H i proteina *m157* ili postoje i drugi virusni proteini i receptori NK-stanica koji dovode do otpornosti MCMV-a na djelovanje NK-stanica. Od ranije je poznato da je otpornost nekih sojeva miševa na MCMV-infekciju ovisna o njihovom MHC haplotipu. F. Colucci i suradnici nedavno su karakterizirali soj divljih miševa PWK/pas koji su otporni na MCMV iako ne posjeduju receptor Ly49H. Divlji miševi PWK/Pas otporni su na MCMV-infekciju poput miševa C57BL/6 tj. infekcija ovih miševa w.t. MCMV-om rezultira niskim titrom virusa u slezeni koji značajno raste nakon uklanjanja NK-stanica. Analiza NK-stanica miševa PWK/Pas pokazala je da, iako se one mogu obojiti protutijelima 1F8 (protu-Ly49C/H/I), ne posjeduju unutarstanični epitop receptora Ly49H, a samim tim ni funkcionalan receptor (F. Colucci, osobno priopćenje). Prema tome, otpornost ovih miševa na MCMV-infekciju nije posljedica aktivacije NK-stanica putem receptora Ly49H. Međutim, time nije isključena mogućnost da NK-stanice miševa PWK/Pas ispoljavaju neki drugi aktivacijski receptor Ly49 koji na sebe može vezati protein *m157*.

Budući je naš laboratorij karakterizirao ulogu gena *m157 in vivo*, u suradnji s Dr. F. Coluccijem s *The Babraham Institute, Babraham Research Campus, Cambridge, Engleska* pokušavamo odrediti mogući mehanizam otpornosti ovih miševa na MCMV-infekciju. Obzirom na vrlo slabu reprodukcijску sposobnost divljih miševa PWK/Pas, kao i činjenicu da su miševi PWK/Pas x BALB/c F1 generacije također otporni na MCMV-infekciju (F. Colucci, osobno priopćenje), u našim daljnjim istraživanjima koristili smo miševe F1 generacije.

Da bismo provjerili mogućnost da se protein m157 veže na neki drugi aktivacijski receptor NK-stanica osim Ly49H, miševe PWK/Pas x BALB/c F1 generacije injicirali smo virusima w.t. MCMV ili $\Delta m157$ u dozi od 5×10^5 PFU po mišu. Miševe C57BL/6, injicirane na isti način, istim virusima i u istoj dozi, koristili smo kao kontrolnu skupinu. Tri dana kasnije životinje smo žrtvovali i odredili titrove virusa u njihovim organima. Virus divljeg tipa u oba je soja miševa imao podjednak titar i bio je pod učinkovitim nadzorom NK-stanica te je nakon njihova uklanjanja titar virusa značajno porastao (**slika 16**). Za razliku od miševa C57BL/6 u kojih je virus $\Delta m157$ bio virulentniji u odnosu na w.t. MCMV i otporan na djelovanje NK-stanica, u miševa PWK/Pas x BALB/c F1 generacije ovaj je virus imao titar u visini w.t. MCMV-a te je nakon uklanjanja NK-stanica značajno rastao (**slika 16**). Iz navedenih rezultata može se zaključiti da otpornost PWK/Pas miševa na MCMV-infekciju nije ovisna o proteinu m157 te da se ovaj protein ne veže na drugi aktivacijski receptor NK-stanica osim Ly49H.



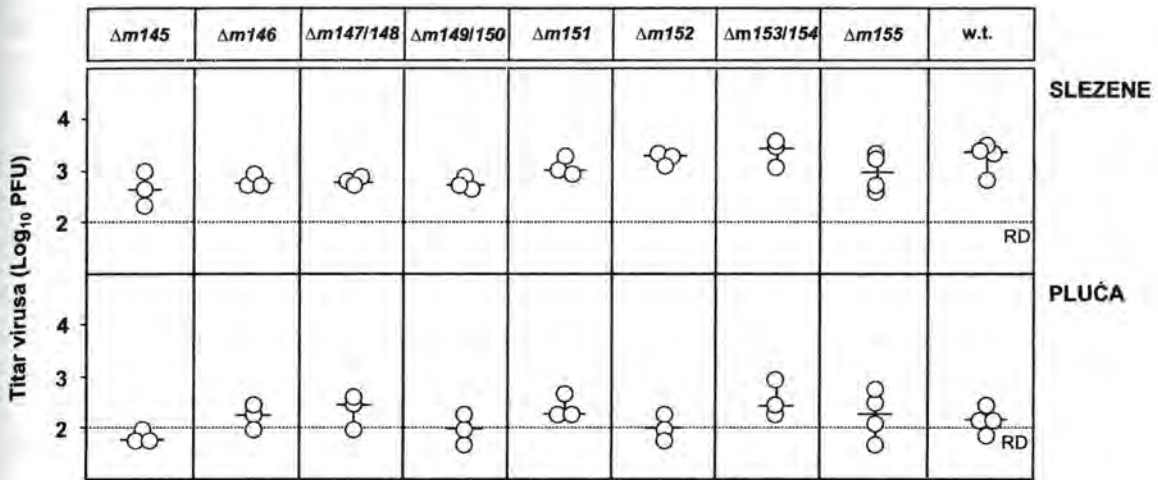
Slika 16. Gen *m157* nije odgovoran za otpornost miševa PWK/Pas x BALB/c F1 generacije na MCMV-infekciju.

Miševi PWK/Pas x BALB/c F1 generacije i C57BL/6 su ostavljeni netretiranima ili su im injiciranjem protu-AGM1 protuseruma uklonjene NK-stanice. Miševi su potom intravenski injicirani virusima $\Delta m157$ ili w.t. MCMV-om u dozi od 5×10^5 PFU po mišu te žrtvovani tri dana kasnije. Testom virusnih čistina određen je virusni titar u njihovim organima. Prikazan je titar virusa u organima pojedinačnih životinja. Horizontalne linije pokazuju vrijednost medijana. Razlike titra virusa između organa netretiranih miševa i organa miševa tretiranih s protu-AGM1 protuserumom prikazane su osjenčanim poljima.

Gen *m157* pripada MCMV genskoj obitelji *m145* čiji su članovi i geni *m145*, *m152* i *m155* koji određuju proteine zadužene za izbjegavanje nadzora posredovanog NK-stanicama. Većina gena MCMV-a koji pripadaju genskoj obitelji *m145* smješteni su unutar $\Delta 6$ regije virusnog genoma koja obuhvaća gene od *m144* do *m158* (145). U našim prethodnim istraživanjima, u kojima smo otkrili da proteini MCMV-a *m145* i *m155* negativno reguliraju proteine MULT-1 i H60 koji služe kao ligandi za aktivacijski

receptor NKG2D te na taj način inhibiraju aktivaciju NK-stanica, koristili smo delecijske mutante MCMV-a za jedan ili dva gena unutar $\Delta 6$ regije (9, 10). Obzirom da posjedujemo brojne virusne mutante unutar navedene regije te da čak četiri gena iz genske obitelji *m145* imaju imunoregulacijsku funkciju, odlučili smo postojeće delecijske mutante MCMV-a testirati *in vivo*. Naša je pretpostavka bila da je možebitno postojanje gena koji određuje protein koji služi kao ligand za neki aktivacijski NK receptor najlakše utvrditi klotiranjem delecijских mutanti za pojedine gene unutar ove regije. Naime, sukladno učinku delecije gena *m157* na virulenciju u Ly49H^+ miševa, nedostatak gena koji određuje protein odgovoran za otpornost miševa PWK/Pas na MCMV-infekciju također bi morala rezultirati snažnijom virulencijom u odnosu na w.t. MCMV.

U tu smo svrhu miševe PWK/Pas x BALB/c F1 generacije intraperitonealno injicirali virusima $\Delta m145$, $\Delta m146$, $\Delta m147\Delta m148$, $\Delta m149\Delta m150$, $\Delta m151$, $\Delta m152$, $\Delta m153\Delta m154$, $\Delta m155$ ili w.t. MCMV u dozi od 5×10^5 PFU po mišu. Svi navedeni virusi ispoljavali su protein GFP za koji smo ranije pokazali da ne utječe na rast virusa *in vivo* (9, 10). Tri dana nakon infekcije miševe smo žrtvovali te odredili titrove virusa u njihovim organima. Kao što je prikazano na **slici 17**, sve su testirane mutante, uz manje, statistički neznačajne razlike, imale titar približno jednak titru w.t. MCMV-a. Prema tome, MCMV gen koji je odgovoran za otpornost ovih miševa na MCMV-infekciju ne nalazi se unutar genske regije $\Delta 6$. Ovo naravno ne isključuje mogućnost da je neki drugi gen MCMV-a smješten negdje drugdje u genomu odgovoran za otpornost miševa PWK/Pas.



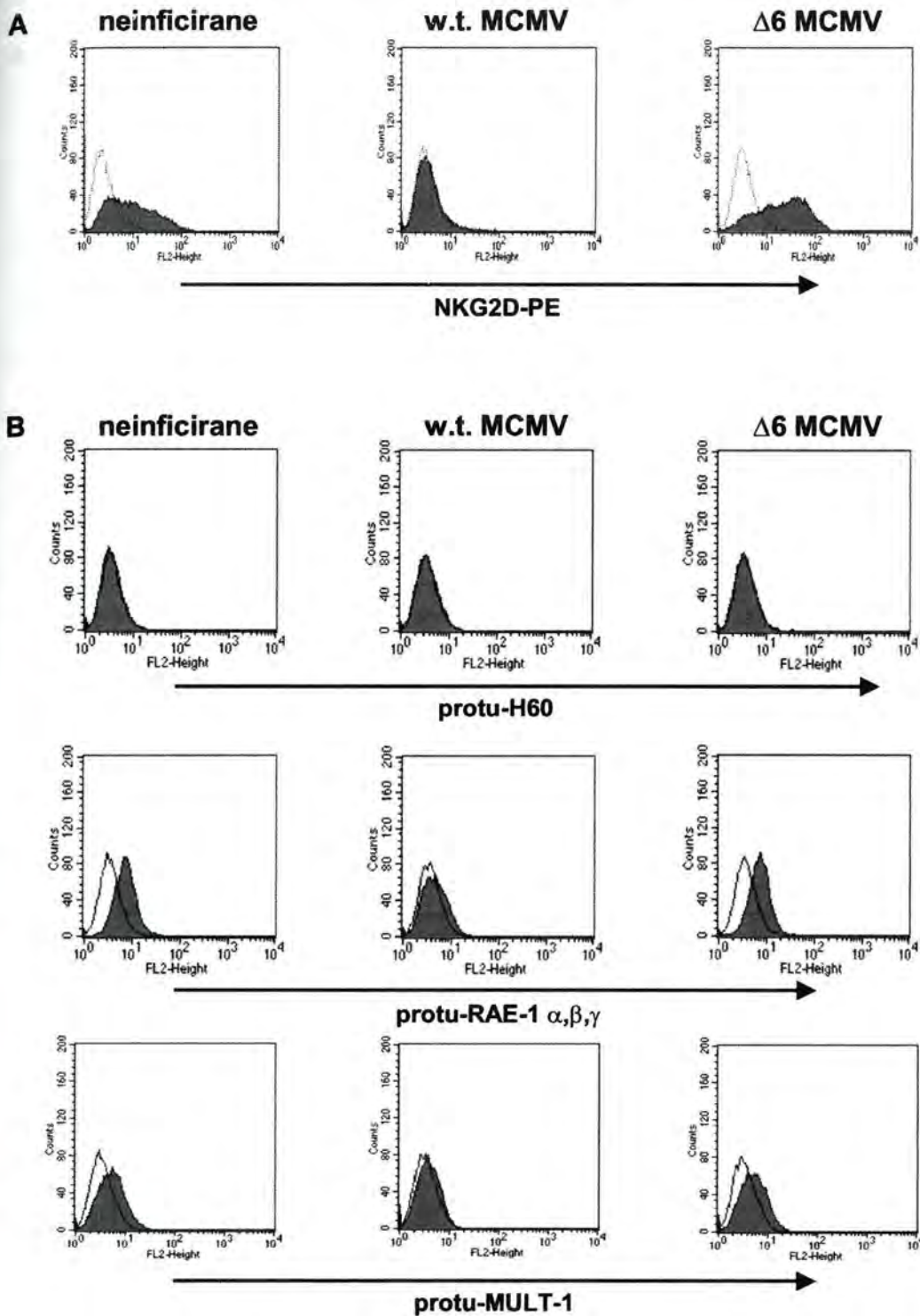
Slika 17. Gen odgovoran za otpornost miševa PWK/Pas x BALB/c F1 generacije na MCMV-infekciju ne nalazi se unutar regije $\Delta 6$.

Miševi PWK/pas x BALB/c F1 generacije su intravenski injicirani navedenim virusima u dozi od 5×10^5 PFU po mišu te žrtvovani tri dana kasnije. Testom virusnih čistina određen je virusni titar u njihovim organima. Prikazan je titar virusa u organima pojedinačnih životinja. Horizontalne linije pokazuju vrijednost medijana. RD, razina detekcije

4.12 Otpornost miševa PWK/Pas na MCMV-infekciju nije posljedica aktivacije receptora NKG2D

Otpornost divljih miševa PWK/Pas na MCMV-infekciju mogla bi se objasniti time što oni na svojim stanicama ispoljavaju neki još do sada nepoznati ligand za receptor NKG2D ili što MCMV u ovih miševa ne može djelovati na neki od postojećih liganada za NKG2D (H60, RAE-1, MULT-1). Na taj način bi se otpornost ovog soja divljih miševa na MCMV-infekciju mogla pripisati aktivaciji NK-stanica putem receptora NKG2D. Da bismo ispitali tu mogućnost stanice MEF-a miševa PWK/Pas x BALB/c F1 generacije inficirali smo w.t. MCMV-om ili delecijском mutantom $\Delta 6$ (*m145-m158*) u dozi od 1 PFU po stanici ili smo ih ostavili neinficiranim. Nakon 12 h od infekcije protočnom citometrijom smo pratili ispoljavanje ukupnih ili pojedinačnih liganada za NKG2D. Bojenje tetramerom NKG2D-PE pokazalo je da neinficirane stanice MEF-a konstitucionalno ispoljavaju nisku razinu liganada za NKG2D (slika 18A). Stanice inficirane virusom $\Delta 6$ ispoljavale su nešto povećanu razinu liganada za NKG2D, a

stanice inficirane w.t. MCMV-om više nisu ispoljavale ligande na svojoj površini (**slika 18A**). Stanice MEF-a nisu ispoljavale protein H60, niti je njegovo ispoljavanje bilo pobuđeno u slučaju infekcije s virusoma $\Delta 6$ (**slika 18B**). Sukladno rezultatima dobivenim s tetramerom NKG2D-PE, neinficirane stanice MEF-a ispoljavale su nisku razinu proteina RAE-1 α , β , γ i MULT-1 (**slika 18B**). Nakon infekcije virusom $\Delta 6$ navedenih proteini bili su ispoljeni na stanicama MEF-a, a u slučaju infekcije w.t. MCMV-om niti jedan od ispitivanih proteina nije bio ispoljen na staničnoj površini (**slika 18B**). Ovi rezultati pokazuju da u miševa PWK/Pas MCMV negativno regulira sve postojeće ligande za NKG2D te da njihova otpornost na virusnu infekciju nije posljedica aktivacije NK-stanica putem receptora NKG2D.



Slika 18. MCMV negativno regulira NKG2D-ligande na stanicama MEF-a miševa PWK/Pas x BALB/c F1 generacije

Stanice MEF-a miševa PWK/pas x BALB/c F1 generacije inficirane su navedenim virusima i 12 h po infekciji protočnom citometrijom analizirane na ispoljavanje ukupnih NKG2D-liganada (A) ili pojedinačnih liganada (B). Histogrami prikazuju 10 000 propidij-jodid-negativnih stanica. Kao kontrola korišteno je bojanje irelevantnim štakorskim protutijelom.

4.13 Izbjegavanje imunosnog nadzora posredovanog NK-stanicama mutacijom gena MCMV-a koji određuje ligand za aktivacijski receptor NK-stanica

Naši dosadšnji rezultati pokazali su da je protein m157 jedini protein MCMV-a koji služi kao ligand za aktivacijski receptor Ly49H te da se ovaj protein ne može vezati niti na jedan drugi aktivacijski receptor NK-stanica. Iako su prethodna istraživanja s rekombinantnim proteinom m157 pokazala da se on može vezati i na inhibicijski receptor Ly49I u miševima soja 129/Svj, naši rezultati govore da, ako takvo međudjelovanje i postoji, ono nije važno u inhibiciji NK-stanica od strane MCMV-a. Miševi C57BL/6 jedini su do sada poznati soj miševa koji posjeduje funkcionalan receptor Ly49H i u kojih se otpornost na MCMV-infekciju može objasniti aktivacijom NK-stanica posredstvom virusnog proteina. Međutim, obzirom da MCMV posjeduje brojne mehanizme kojima izbjegava prepoznavanje inficiranih stanica od strane NK-stanica, ostalo je nejasno zašto virus «dozvoljava» ispoljavanje proteina koji aktivira NK-stanice i dovodi do ubijanja inficiranih stanica. Naime, kao što smo pokazali, protein m157 nije bitan za replikaciju samog virusa pa bi se moglo pretpostaviti da će virus izložen selekcijskom tlaku NK-stanica ukloniti takav gen.

U sklopu znanstvene suradnje s Dr. W. M. Yokoyamom s *Howard Hughes Medical Institute, Washington University School of Medicine, St. Louis, SAD*, provedena su istraživanja na imunodeficitnim miševima C57BL/6 SCID i C57BL/6 RAG^{-/-} koji nisu u stanju pokrenuti stečeni imunosni odgovor, ali posjeduju učinkovite NK-stanice. Usprkos tome, ovi miševi ne mogu u potpunosti odstraniti MCMV iz organizma. Dapače, kada su miševi C57BL/6 RAG^{-/-} intraperitonealno injicirani w.t. MCMV-om porijeklom iz žlijezda slinovnica BALB/c miševa (MCMV-SGV) u dozi od 2.5×10^4 , 90% inficiranih miševa uginulo je između 3-5 tjedna po infekciji dok su svi miševi C57BL/6 preživjeli navedenu infekciju (nije prikazano). Analiza kinetike rasta

MCMV-a u imunodeficitnim miševima pokazala je da 3. dana po infekciji ovi miševi imaju značajno niži titar virusa u usporedbi s titrom virusa u miševima C57BL/6, što se može objasniti povećanim brojem NK-stanica u ovih miševa. Međutim, od drugog tjedna infekcije na dalje dolazi do povećanja titra virusa u imunodeficitnih miševa, ali ne i miševa C57BL/6 u kojih se 28. dana po infekciji više ne može naći infektivni virus.

Ovakav se nalaz može objasniti na nekoliko načina. Jedna od mogućnosti je da je povećanje titra virusa u imunodeficitnih miševa posljedica reaktivacije MCMV-a iz latencije ili da je tijekom umnažanja virusa *in vivo* došlo do izdvajanja one virusne populacije koja više nije osjetljiva na nadzor posredovan NK-stanicama. Treća mogućnost je da je došlo do iscrpljivanja NK-stanica zbog njihova stalna pobuđivanja malim količinama novostvorenog virusa, kao što je to slučaj s limfocitima T tijekom infekcije virusom limfocitnog koriomeningitisa (engl. *lymphocytic choriomeningitis virus*, LCMV) (216). Navedene pretpostavke testirane su tako da je 28. dana po infekciji iz slezena preživjelih imunodeficitnih miševa izoliran MCMV i pročišćen na stanicama MEF-a. Dva tako dobivena izolata, nazvana A1.05 i A1.10 ili w.t. MCMV injicirani su u miševa C57BL/6 te su tri dana po infekciji određeni titrovi virusa u slezeni inficiranih miševa. Oba su izolata bila mnogo virulentnija od w.t. MCMV-a što je podsjećalo na nalaz u miševa C57BL/6 injiciranih virusom $\Delta m157$ (nije prikazano). Na osnovu toga pretpostavljeno je da izolati više ne posjeduju funkcionalan gen *m157*. Ova pretpostavka testirana je na način da je napravljena je sekvencijska analiza gena *m157* iz virusa izoliranim iz slezena imunodeficitnih miševa. Sukladno pretpostavci, u 95% izolata nađene su mutacije unutar gena *m157*, dok niti u jednom izolatu nisu pronađene mutacije susjednih gena *m158* i *m159*, koji su poslužili kao kontrola. Kao što je prikazano na **tablici 1** većina mutacija imala je za posljedicu

nedostatak 13 nukleotida u pretpostavljenom repu proteina m157 kojim se on inače veže za staničnu membranu posredstvom GPI-a. Ostale mutacije imale su za posljedicu nedostatak ili promjenu u kodirajućem slijedu ili prerani stop kodon. Prema tome, MCMV može pod djelovanjem snažnog selekcijskog tlaka Ly49H⁺ NK-stanica mutirati gen odgovoran za prepoznavanje inficiranih stanica od strane NK-stanica te na taj način osigurati svoje postojanje i daljnje širenje unutar populacije.

Tablica 1.* Mutacije gena *m157* u izolatima MCMV-a dobivenim iz slezena imunodeficitnih miševa inficiranih MCMV-SGV-om

MIŠ	UČESTALOST	MUTACIJE	KOMENTAR
A1	1/5 4/5	delecija 305-323 delecija 961-973	prerani stop na 431-433 nedostatak hidrofobnog repa
A2	3/4	delecija 961-973	nedostatak hidrofobnog repa
A3	1/2	delecija 961-973	nedostatak hidrofobnog repa
B1	1/10 1/10 6/10	bez mutacija delecija 647-648 delecija 961-973	prerani stop na 699-701 nedostatak hidrofobnog repa
B2	1/8 2/8 1/8 1/8 2/8	bez mutacija G509A delecija 820-918 dodan A na 789 delecija 961-973	gly → asp prerani stop (TAA) nedostatak hidrofobnog repa
B3	1/10 5/10 4/10	bez mutacija delecija 647-648 delecija 961-973	prerani stop na 699-701 nedostatak hidrofobnog repa
C1	1/5 2/5	delecija 412-414 delecija 961-973	delecija tirozina nedostatak hidrofobnog repa
C2	2/5	delecija 961-973	nedostatak hidrofobnog repa
C3	4/5	delecija 961-973	nedostatak hidrofobnog repa
C4	5/5	delecija 961-973	nedostatak hidrofobnog repa
C5	1/5 1/5	delecija 647-648 dodan A na 789	prerani stop na 699-701 prerani stop (TAA)

* načinjeno prema (217). Prikazani su rezultati iz tri različita pokusa označeni kao A, B i C.

5 RASPRAVA

Postojanje dominantnog lokusa *Cmv1*, smještenog unutar genskog kompleksa NKC, koji je odgovoran za otpornost, odnosno osjetljivost pojedinih sojeva miševa na MCMV-infekciju poznato je već dugi niz godina (169, 172, 218). Aleli lokusa *Cmv1* određuju osjetljivost (*Cmv1^s* – recesivni alel) odnosno otpornost (*Cmv1^f* – dominantni alel) na MCMV-infekciju (172, 173). U *Cmv1^s* mišjih sojeva MCMV je otporan na nadzor od strane NK-stanica što ima za posljedicu visoki titar virusa (**slika 19 B**), dok je u *Cmv1^f* mišjih sojeva MCMV osjetljiv na djelovanje NK-stanica što rezultira nižim titrom virusa (**slika 19 A**). Prije nekoliko godina tri su skupine istraživača neovisno otkrile da je učinak *Cmv1^f* na MCMV-infekciju zapravo posredovan genom *Ly49h* koji određuje aktivacijski receptor Ly49H ispoljen na oko 50% NK-stanica (142, 143, 174). Dok ostali članovi obitelji receptora Ly49 prepoznaju molekule MHC skupine I na ciljnim stanicama (115), Ly49H specifično prepoznaje MCMV-inficirane stanice (143). Tek prije tri godine dvije su grupe autora koristeći ekspresiju pojedinih MCMV gena *in vitro* pokazale da se protein m157 veže na receptor Ly49H NK-stanica što rezultira njihovom aktivacijom (120, 145). Gen *m157* pripada obitelji gena *m145* MCMV-a, a određuje protein m157 koji je na membrani inficirane stanice vezan za GPI i ima strukturu sličnu molekulama MHC skupine I (145).

Postavlja se pitanje je li receptor Ly49H univerzalni receptor NK-stanica za sve viruse ili je specifičan samo za MCMV? Pokazano je da su lokusi odgovorni za otpornost na herpes simpleks virus (HSV) i ektromelija virus (EV) također smješteni unutar NKC-a miša te su nazvani *Rhs1* odnosno *Rmp1* (219, 220). Međutim, mapiranja genske regije *Ly49h* i navedenih gena pokazala su da se radi o odvojenim, međusobno neovisnim lokusima (58). Zanimljiva je činjenica da su miševi C57BL/6

otporni ne samo na MCMV već i na HSV i EV tj. da uz *Cmv1^f* posjeduju i *Rhs1* i *Rmp1*. Receptor Ly49H nije jedini aktivacijski receptor NK-stanica koji prepoznaje protein virusa. Pokazano je da ljudski aktivacijski receptori NKp44 i NKp46 posjeduju sijaličnu kiselinu preko koje vežu hemaglutinin-neuraminidazu Sendai virusa odnosno hemaglutinin virusa influence (95, 96). Međutim, njihov značaj u nadzoru virusnih infekcija navedenim virusima je upitan budući se sijalična kiselina nalazi i na drugim staničnim strukturama.

U ovome smo radu korištenjem rekombinanih virusa bez gena *m157* te virusa u kojem je gen *m157* bio vraćen u genom MCMV-a pokazali biološki značaj ovog virusnog gena u NK-ovisnom nadzoru MCMV-infekcije u Ly49H⁺ i Ly49H⁻ sojeva miševa. Uklanjanjem gena *m157* iz genoma MCMV-a pokazali smo da je protein *m157* zaista jedini protein MCMV-a koji može poslužiti kao ligand za receptor Ly49H te da njihovo međudjelovanje dovodi do snažne aktivacije NK-stanica. Infekcija Ly49H⁺ miševa rekombinantnim virusom $\Delta m157$ rezultirala je povećanom virulentnošću takvog virusa koji je bio otporan na nadzor od strane NK-stanica te su inače MCMV-otporni miševi postali osjetljivi na MCMV-infekciju (**slika 19 C**). Iako revertantni virus s vraćenim genom *m157* nije u potpunosti pokazivao osobitosti divljeg tipa MCMV-a *in vivo*, tim smo virusom potvrdili da je upravo protein *m157* odgovoran za otpornost Ly49H⁺ miševa na MCMV-infekciju. U skladu s time, u novookoćenih miševa, čije NK-stanice još ne ispoljavaju receptore obitelji Ly49 uključujući i receptor Ly49H, kao i u kongeničnih miševa kojima nedostaje ovaj receptor (miševi BXD8) nedostatak gena *m157* nije imao učinka na otpornost na MCMV-infekciju.

Rezultati prikazani u ovom radu potvrđuju, ali i proširuju poznatu složenost djelovanja NK-stanica u različitim organima miša (68, 184). Poznato je da je

spomenuti dominantni lokus *Cmv1^f* (*Ly49h*) odgovoran za otpornost na MCMV-infekciju u slezeni, ali ne i u jetri inficiranih životinja (169). S tim u skladu su i naši rezultati dobiveni u slezeni miševa inficiranih virusom $\Delta m157$. Uz to, naši rezultati ukazuju na to da je NK-ovisan nadzor MCMV-infekcije u plućima, a ne samo u slezeni, također posljedica aktivacije $Ly49H^+$ NK-stanica. Potvrda tome je i rezultat koji pokazuje da uklanjanje $Ly49H^+$ NK-stanica rezultira porastom titra w.t. MCMV-a u slezeni i plućima inficiranih životinja na razinu titra w.t. virusa u miševa kojima su uklonjene $NK1.1^+$ stanice. Za razliku od slezene i pluća, čini se da je nadzor MCMV-a u jetri neovisan o aktivaciji $Ly49H^+$ NK-stanica na što upućuje i činjenica da primjena protu-*Ly49C/H/I* protutijela nije imala učinak na titar virusa u jetri.

Nakon MCMV-infekcije NK-stanice u C57BL/6 miševa prolaze kroz dva aktivacijska razdoblja. U prvom, nespecifičnom razdoblju, koje se dešava tijekom prva 2 dana po infekciji, dolazi do snažne produkcije $IFN-\gamma$ od strane NK-stanica i njihove proliferacije. Aktivacija NK-stanica u prvome razdoblju neovisna je o receptoru *Ly49H*, dok je drugo razdoblje obilježeno specifičnom proliferacijom $Ly49H^+$ NK-stanica i traje od 3. do 6. dana po infekciji (144). Rana, nespecifična aktivacija NK-stanica mogla bi biti dovoljna za uklanjanje virusa iz jetre, ali ne iz slezene i pluća. Osim toga, način protuvirusnog djelovanja NK-stanica također se razlikuje između slezene i jetre. Dok je u slezeni NK-ovisan nadzor MCMV-a posredovan citolitičkim mehanizmima koji uključuju izlučivanje granula ispunjenih perforinom i granzimima, nadzor virusa u jetri podrazumijeva djelovanje citokina, prvenstveno $IFN-\gamma$ kojega izlučuju NK-stanice i NKT-stanice (68, 184). U skladu s tim su i naši rezultati dobiveni na miševima s nedostatkom perforina (miševi C57BL/6 *Prf¹*) u kojih i $\Delta m157$ i w.t. MCMV dosežu podjednak titar u slezeni i plućima što

potvrđuje da je izlučivanje perforina ključan mehanizam djelovanja NK-stanica u nadzoru MCMV-infekcije u navedenim organima.

U prethodnim radovima pokazano je da rekombinantni protein m157 može poslužiti i kao ligand za inhibicijski receptor Ly49I ispoljen u MCMV-osjetljivog soja miševa 129/Svj (120). Na osnovu toga postavljena je pretpostavka da protein m157 ima ulogu u izbjegavanju prepoznavanja inficiranih stanica od strane NK-stanica te da su Ly49H⁺ miševi prije izuzetak od pravila nego uobičajena situacija. Međutim, do sada nije bilo podataka koji bi ukazivali da se NK-stanice zaista mogu inhibirati djelovanjem proteina m157. U ovdje prikazanim istraživanjima na miševima 129/Svj inficiranim virusom kojem nedostaje gen *m157* također nismo mogli uočiti njegov inhibicijski učinak na NK-stanice. Infekcija miševa BALB/c i 129/Svj virusom $\Delta m157$ rezultirala je vrlo slabom atenuacijom ovog virusa u oba soja miševa. Međutim, budući je pokazano da se protein m157 veže na receptor Ly49I u miševa 129/Svj, ali ne i BALB/c (120) nije jasno da li se opaženi rezultat može pripisati međudjelovanju proteina m157 i receptora Ly49I. S druge strane, snažna atenuacija virusa $\Delta m157$ u ovih miševa nije se ni mogla očekivati jer svega 10% njihovih NK-stanica ispoljava receptor Ly49I. Imajući u vidu navedene činjenice može se pretpostaviti da je receptor Ly49H nastao tijekom evolucije prirodnom rekombinacijom receptora Ly49I. Naime, receptori Ly49I miševa 129/Svj i C57BL/6 mogu vezati molekulu MHC H-2K^d, ali receptor Ly49I miševa C57BL/6 nije u stanju vezati protein m157 (120). S druge strane, receptor Ly49H ne veže molekule MHC skupine I, ali prepoznaje protein m157. Nadalje, poznato je postojanje receptora NK-stanica čija je izvanstanična domena identična domeni aktivacijskog receptora Ly49D, a transmembranska i citoplazmatska domena identične su inhibicijskom receptoru Ly49A (221). I u ljudi pojedini geni koji određuju aktivacijske receptore obitelji KIR posjeduju sekvencu za

potencijalni motiv ITIM na 3' kraju (222). Sukladno tome, receptor Ly49H mogao je nastati kombinacijom egzona koji određuje izvanstanični dio inhibicijskog receptora Ly49I i nekog drugog egzona koji određuje transmembranski dio koji omogućava povezivanje ovog receptora s adapterskim proteinom DAP12. Funkcionalni homolozi receptora Ly49 u ljudi su receptori obitelji KIR. Inhibicijski receptori KIR vežu molekule HLA-A, -B i -C dok aktivacijski receptori KIR ili uopće ne vežu molekule MHC skupine I ili ih vežu slabim afinitetom (86). Izvanstanične domene aktivacijskih receptora KIR vrlo su slične domenama inhibicijskih receptora KIR što upućuje na njihovu srodnost, a glavnina aktivacijskih receptora KIR prisutna je u samo maloj populaciji ljudi (86). Usporedba ovih receptora u ljudi i čimpanza upućuje da bi njihov nastanak također mogao biti određen djelovanjem patogena (223).

Odsustvo aktivacije NK-stanica u Ly49H⁺ miševa inficiranih virusom $\Delta m157$ pružila nam je priliku da izučavamo ulogu drugih gena MCMV-a čije djelovanje dovodi do inhibicije NK-stanica. Rezultati prethodnih istraživanja u našem laboratoriju pokazali su da proteini određeni genima *m152*, *m145* i *m155* MCMV-a smanjuju ispoljavanje membranskih proteina koji služe kao ligandi za aktivacijski receptor NK-stanica, NKG2D (**slika 19 B**). Sva tri do danas poznata liganda za receptor NKG2D u miša, H60, RAE-1 i MULT-1 podložni su negativnoj regulaciji od strane MCMV-a (8-10, 160, 200). Tako gp40, određen genom *m152*, za koji je ranije pokazano da zaustavlja izlazak novostvorenih MHC-molekula iz ER-Golgi intermedijarnog staničnog odjeljka (ERGIC/*cis*-Golgi) i na taj način sprječava predočavanje antigena na površini stanice citolitičkim CD8⁺ limfocitima T (6, 224), istovremeno sprječava ispoljavanje proteina RAE-1, inhibirajući tako aktivaciju NK-stanica preko aktivacijskog receptora NKG2D (8, 160). Protein *m145*, određen genom *m145* MCMV-a sprječava ispoljavanje MULT-1 proteina, djelujući na njega najvjerojatnije

iza ERGIC/*cis*-Golgi-staničnog odjeljka (9), dok protein m155, određen genom *m155*, sprječava ispoljavanje proteina H60 na površini inficirane stanice (10). Međutim, učinak ovih virusnih gena u svrhu izbjegavanja NK-staničnog odgovora može se očitovati samo u Ly49H⁻ mišjih sojeva, dok je njihov učinak na inhibiciju NK-stanica nemoguće pratiti u Ly49H⁺ mišjih sojeva zbog već navedene snažne aktivacije NK-stanica putem vezivanja receptora Ly49H za protein m157 MCMV-a (slika 19 A i B). Nesposobnost NK-stanica Ly49H⁺ miševa da učinkovito nadziru infekciju virusom $\Delta m157$ najvjerojatnije je posljedica djelovanja navedenih imunoregulacijskih gena MCMV-a na ligande za NKG2D. Nedostatak liganda za receptor Ly49H uz istovremeno prisustvo liganada za NKG2D, kao što je to slučaj pri infekciji Ly49H⁺ miševa s virusima kojima u kombinaciji s genom *m157* nedostaju drugi NKG2D-regulacijski geni MCMV-a, rezultira ponovnom uspostavom nadzora virusa od strane NK-stanica. Ovo je ujedno prvi dokaz da ovi NKG2D-regulacijski geni MCMV-a mogu biti učinkoviti i u Ly49H⁺ miševa *in vivo*. Nadalje, međusobna ovisnost učinka receptora NKG2D i Ly49H postoji i u odnosu dendritičkih i NK-stanica. Tijekom virusnih infekcija dendritičke stanice izravnim kontaktom i posredno, lučenjem citokina IFN- α/β , IL-2 i IL-12 sudjeluju u aktivaciji NK-stanica (225). Infekcija dendritičkih stanica MCMV-om dovodi do smanjene aktivnosti NK-stanica (59, 226). Otkriveno je da su dendritičke stanice potrebne za ekspanziju Ly49H⁺ NK-stanica, ali su i Ly49H⁺ NK-stanice važne za održanje CD8 α^+ dendritičkih stanica u slezeni (59). Tijekom MCMV-infekcije Ly49H⁻ miševa BALB/c ili miševa C57BL/6 kojima su uklonjene Ly49H⁺ NK-stanice dolazi do smanjenja broja dendritičkih stanica (59). Jedno od objašnjenja za nemogućnost NK-stanica da u inficiranih Ly49H⁻ miševa zaštite dendritičke stanice je virusom posredovano ometanje ispoljavanja liganada za NKG2D. U skladu s tim, moguće je pretpostaviti da će NK-stanice Ly49H⁺ miševa pri

infekciji virusom kojem nedostaje gen *m157* također biti u nemogućnosti zaštititi dendritičke stanice. Obrnuto, infekcija Ly49H⁻ miševa mutantama virusa kojima nedostaju geni uključeni u regulaciju liganada za NKG2D, ili infekcija Ly49H⁺ miševa mutantama kojima uz navedene gene nedostaje i gen *m157*, potaknut će odgovor NK-stanica koji će biti učinkovit u zaštiti dendritičkih stanica poput onog u Ly49H⁺ miševa inficiranih s divljim tipom MCMV-a.

Postojanje divljih miševa PWK/Pas koji su otporni na MCMV-infekciju, a ne posjeduju funkcionalni receptor Ly49H otvara mogućnost za postojanje ili još nekog aktivacijskog receptora NK-stanica koji je dominantan u tih miševa, a može na sebe vezati protein *m157* ili nekog drugog proteina MCMV-a čije ispoljavanje na inficiranim stanicama rezultira aktivacijom NK-stanica. U ovome smo radu pokazali da protein *m157* ne služi kao ligand za neki drugi aktivacijski receptor NK-stanica osim Ly49H. Obzirom da i gen *m157* i NKG2D-regulacijski geni MCMV-a pripadaju obitelji gena *m145* može se pretpostaviti da se gen koji određuje ligand za neki drugi aktivacijski receptor NK-stanica miševa PWK/Pas također nalazi unutar ove obitelji gena. Međutim, rezultati prikazani ovdje isključili su navedenu pretpostavku, ostavivši otvorenim mogućnost postojanja nekog drugog gena MCMV-a čiji je protein odgovoran za MCMV-otpornost ovih miševa. Obzirom da receptor NKG2D prepoznaje veliki broj različitih liganada i u ljudi i u miševa nije isključeno da stanice miševa PWK/Pas ispoljavaju još nepoznati ligand za receptor NKG2D ili pak da u ovih miševa MCMV ne može djelovati na neki od postojećih liganada. Suprotno ovim pretpostavkama, bojenje inficiranih stanica ovih miševa tetramerom NKG2D-PE pokazalo je da divlji tip MCMV-a uspješno regulira sve ligande za ovaj receptor. Otpornost na MCMV-infekciju može međutim biti ovisna i o genima koji određuju molekule MHC skupine I, kao što je to slučaj s miševima soja CBA ili C3H. Budući

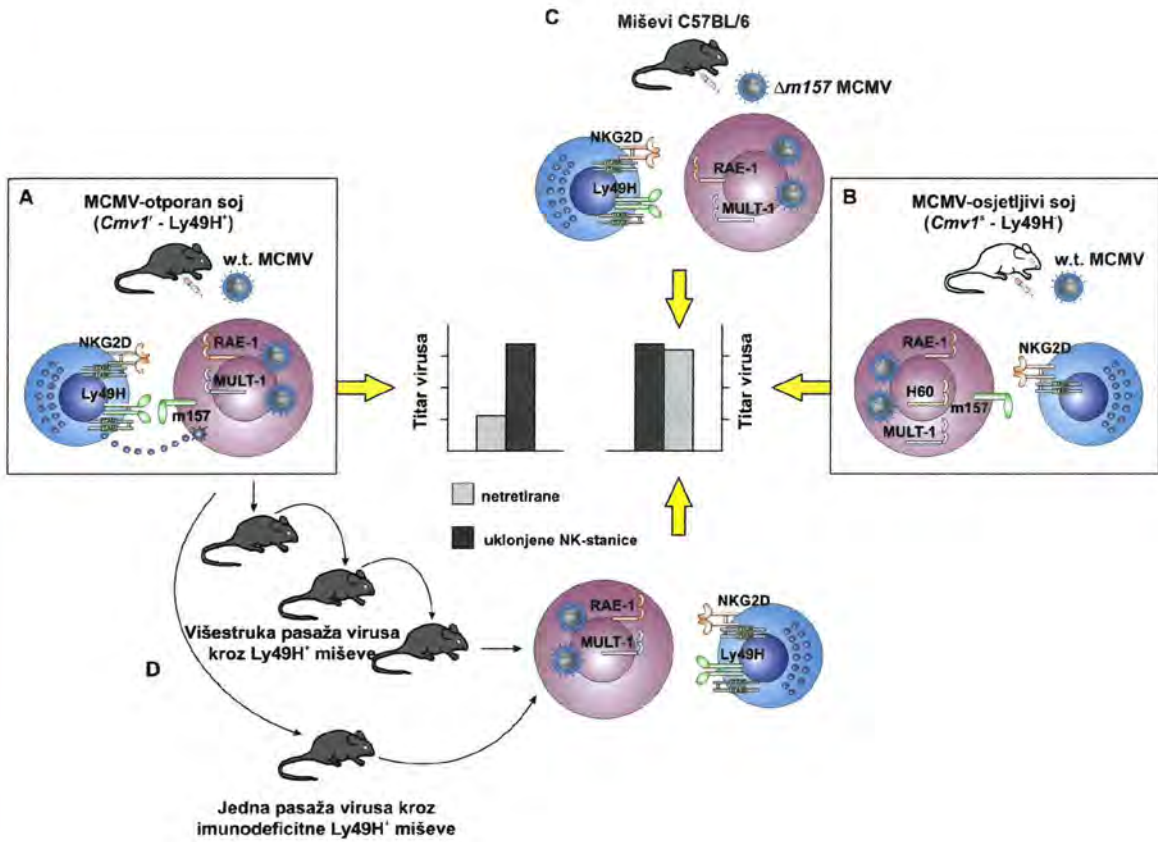
smo zbog otežanog rasplodivanja miševa PWK/Pas bili prisiljeni naša istraživanja provesti na miševima PWK/Pas x BALB/c F1 generacije, nije isključena mogućnost utjecaja mješovitog haplotipa ovih miševa na MCMV-otpornost. S druge strane, miševi F1 generacije otporni su na MCMV-infekciju poput svojih PWK/Pas roditelja, što govori protiv uloge gena koji određuju molekule MHC skupine I.

Virusi, posebice herpesvirusi, su tijekom milijuna godina ko-evolucije sa svojim domaćinima razvili brojne mehanizme kojima se opiru imunološkom nadzoru domaćina (227). Dok je postojanje virusnih gena koji određuju proteine zadužene za «zavaravanje» imunskog sustava logično, postojanje virusnog gena koji određuje protein koji služi kao ligand za aktivacijski receptor na NK-stanicama evolucijski je neopravdano. Za očekivati je stoga da bi se virus tijekom ko-evolucije sa svojim domaćinom pokušao riješiti takvog proteina, a napose ukoliko on nije bitan za njegovu replikaciju, te se postavlja pitanje nastanka i održanja ovog gena, odnosno njegova proteina. Jedan od mogućih odgovora proizlazi iz već navedene činjenice da protein m157 može poslužiti kao ligand za inhibicijski receptor Ly49I (120). Međutim, naši su rezultati pokazali da navedeno međudjelovanje nije bitno za NK-ovisan nadzor virusa *in vivo*. S druge strane, treba imati na umu da je, za razliku od većine drugih virusa, važno obilježje herpesvirusa uspostava latencije u domaćinu s povremenim razdobljima reaktivacije virusa. Stoga je možda značaj proteina m157 upravo u omogućavanju bržeg ulaska virusa u latenciju, a povremene reaktivacije omogućile bi virusu daljnje širenje na druge jedinke. Prema tome, iako paradoksalno, stimulacija imunskog sustava proteinom m157 može ipak, s točke gledišta virusa, predstavljati mehanizam «zavaravanja» imunskog sustava. Naša istraživanja u suradnji s Dr. W. M. Yokoyamom provedena na imunodeficitnim miševa C57BL/6 genske pozadine pokazala su da pod djelovanjem snažnog selekcijskog tlaka od

strane NK-stanica MCMV može aktivno mutirati gen *m157* (slika 19 D). Novonastale mutante virusa otporne su na nadzor posredovan $Ly49H^+$ NK-stanicama poput MCMV-a kojem smo homolognom rekombinacijom uklonili gen *m157*. To je u skladu s nedavno objavljenim istraživanjima u kojima je pokazano stvaranje virusnih mutanti za gen *m157* tijekom nekoliko serijskih pasaža virusa kroz imunokompetentne miševe C57BL/6 (228) (slika 19 D). U našim istraživanjima bio je dovoljan svega jedan prolaz MCMV-a, ali kroz imunodeficitne miševe. Zanimljivo je da su istraživanja na divljim sojevima miševa također pokazala postojanje mutacija gena *m157* u MCMV-izolatima tih miševa, iako divlji miševi ne posjeduju gen *Ly49h* (58, 228). Mutacije gena *m157* nisu jedini takav opisan slučaj mutacija MCMV-a. Naime, poznate su i mutacije gena *M55* MCMV-a koji određuje glikoprotein B ovojnice virusa te se može pretpostaviti da su one također nastale uslijed selekcijskog tlaka od strane neutralizirajućih antitijela (229).

Spoznaje o tome da MCMV može aktivno mutirati svoje gene i time spriječiti aktivaciju imunskog sustava domaćina mogle bi, gledano u širem kontekstu, imati važan značaj i za klinička istraživanja virusnih infekcija u ljudi. Naime, u imunodeficitnih ljudi, kao što su oboljeli od AIDS-a ili pacijenti na imunosupresivnoj terapiji nakon transplantacije organa, nedostatak učinkovitog stečenog imunskog odgovora dovodi do nastanka teških virusnih bolesti uključujući i CMV-infekciju (230). Zanimljivo je da se CMV-infekcija u pacijenata na imunosupresivnoj terapiji javlja relativno kasno, nešto više od mjesec dana nakon početka terapije (230), što podsjeća na kasnu pojavu MCMV-a u imunodeficitnih miševa korištenih u našim istraživanjima. Stoga se može pretpostaviti da se određene virusne infekcije u imunosuprimiranih pacijenata mogu javiti kao posljedica nastanka novih virusnih mutanti koje su u stanju izbjeći nadzor od strane prirođenog imunskog sustava.

Genetska analiza kliničkih izolata virusa biti će ključna u istraživanjima ne samo navedene pretpostavke već i u otkrivanju novih virusnih proteina koji djeluju na različite sastavnice prirodne imunosti.



Slika 19. Genetski određena otpornost na MCMV-infekciju i nastanak mutanti virusa za gen *m157*

(A) U *Ly49H⁺* miševa otpornost na MCMV-infekciju posljedica je aktivacije NK-stanica posredstvom međudjelovanja receptora Ly49H i proteina m157 MCMV-a. Uklanjanje NK-stanica rezultira povećanjem titra virusa. (B) *Ly49H⁻* miševi osjetljivi su na MCMV-infekciju zbog negativne regulacije NKG2D-liganada od strane virusa te uklanjanje NK-stanica nema utjecaja na titar virusa. (C) Infekcija *Ly49H⁺* miševa $\Delta m157$ MCMV-om ima za posljedicu gubitak njihove otpornosti na MCMV te uklanjanje NK-stanica nema utjecaja na titar virusa. (D) Pod snažnim selekcijskim tlakom *Ly49H⁺* NK-stanica MCMV aktivno mutira gen *m157* što ima za posljedicu nastanak virusnih mutanti koje više ne ispoljavaju protein m157 te mogu izbjeći nadzor posredovan NK-stanicama.

6 ZAKLJUČCI

1. Protein m157, određen genom *m157* MCMV-a, jedini je protein ovog virusa koji služi kao ligand za aktivacijski receptor NK-stanica Ly49H *in vivo* te je njihovo međudjelovanje odgovorno za otpornost na MCMV-infekciju u Ly49H⁺ sojeva miševa.
2. Protein m157 MCMV-a ne može se vezati za drugi aktivacijski receptor NK-stanica u miša, osim za receptor Ly49H.
3. Iako je rekombinantnim proteinom m157 pokazano vezivanje ovog proteina za inhibicijski receptor NK-stanica Ly49I *in vitro*, protein m157 MCMV-a nema značaj u inhibiciji NK-stanica *in vivo*.
4. NKG2D-regulacijski geni MCMV-a djeluju i u Ly49H⁺ sojeva miševa, ali je njihov učinak prikriven snažnom aktivacijom NK-stanica putem m157/Ly49H međudjelovanja.
5. Pod djelovanjem selekcijskog tlaka Ly49H⁺ NK-stanica, MCMV aktivno mutira gen *m157* te su novostvoreni virusi u stanju izbjeći nadzor posredovan NK-stanicama.

7 CITIRANA LITERATURA

1. Pass RF. Cytomegalovirus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2001. p. 2675-2705.
2. Mocarski ES, Courcelle CT. Cytomegaloviruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2001. p. 2629-2674.
3. Hudson JB. The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections. *Arch Virol* 1979;62(1):1-29.
4. Weiland F, Keil GM, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Studies on the morphogenesis of murine cytomegalovirus. *Intervirology* 1986;26(4):192-201.
5. Luèin P, Jonjiæ S. Cytomegalovirus replication cycle: an overview. *Period Biolog* 1995;97:13-22.
6. Ziegler H, Thäle R, Lucin P, Muranyi W, Flohr T, Hengel H, et al. A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity* 1997;6(1):57-66.
7. Reusch U, Muranyi W, Lucin P, Burgert HG, Hengel H, Koszinowski UH. A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *Embo J* 1999;18(4):1081-91.
8. Krmptotic A, Busch DH, Bubic I, Gebhardt F, Hengel H, Hasan M, et al. MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo. *Nat Immunol* 2002;3(6):529-35.
9. Krmptotic A, Hasan M, Loewendorf A, Saulig T, Halenius A, Lenac T, et al. NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145. *J Exp Med* 2005;201(2):211-20.
10. Hasan M, Krmptotic A, Ruzsics Z, Bubic I, Lenac T, Halenius A, et al. Selective Down-Regulation of the NKG2D Ligand H60 by Mouse Cytomegalovirus m155 Glycoprotein. *J Virol* 2005;79(5):2920-30.
11. Krmptotic A, Bubic I, Polic B, Lucin P, Jonjic S. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect* 2003;5(13):1263-77.
12. Sinzger C, Jahn G. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* 1996;39(5-6):302-19.
13. Reddehase MJ. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol* 2002;2(11):831-44.

14. Jonjic S, Pavic I, Polic B, Crnkovic I, Lucin P, Koszinowski UH. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med* 1994;179(5):1713-7.
15. Emanuel D. The use of passive immune therapy with intravenous immunoglobulin for the prevention and treatment of cytomegalovirus infection following solid organ and marrow transplantation. *Excerpta Med Int Congr Ser* 1993;1032:295-303.
16. Rasmussen L. Immune response to human cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990;154:221-54.
17. Polic B, Hengel H, Krmpotic A, Trgovcich J, Pavic I, Luccaroni P, et al. Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J Exp Med* 1998;188(6):1047-54.
18. Starr SE, Allison AC. Role of T lymphocytes in recovery from murine cytomegalovirus infection. *Infect Immun* 1977;17(2):458-62.
19. Reddehase MJ, Weiland F, Munch K, Jonjic S, Luske A, Koszinowski UH. Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J Virol* 1985;55(2):264-73.
20. Reddehase MJ, Jonjic S, Weiland F, Mutter W, Koszinowski UH. Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adenitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *J Virol* 1988;62(3):1061-5.
21. Jonjic S, Mutter W, Weiland F, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4+ T lymphocytes. *J Exp Med* 1989;169(4):1199-212.
22. Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 1992;257(5067):238-41.
23. Zijlstra M, Li E, Sajjadi F, Subramani S, Jaenisch R. Germ-line transmission of a disrupted beta 2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 1989;342(6248):435-8.
24. Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenisch R. Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature* 1990;344(6268):742-6.
25. Polic B, Jonjic S, Pavic I, Crnkovic I, Zorica I, Hengel H, et al. Lack of MHC class I complex expression has no effect on spread and control of cytomegalovirus infection in vivo. *J Gen Virol* 1996;77 (Pt 2):217-25.

26. Jonjic S, Pavic I, Lucin P, Rukavina D, Koszinowski UH. Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *J Virol* 1990;64(11):5457-64.
27. Lucin P, Pavic I, Polic B, Jonjic S, Koszinowski UH. Gamma interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. *J Virol* 1992;66(4):1977-84.
28. Pavic I, Polic B, Crnkovic I, Lucin P, Jonjic S, Koszinowski UH. Participation of endogenous tumour necrosis factor alpha in host resistance to cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* 1993;74 (Pt 10):2215-23.
29. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4(7):499-511.
30. Biron CA. Natural killer cell regulation during viral infection. *Biochem Soc Trans* 1997;25(2):687-90.
31. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999;17:189-220.
32. Su HC, Ishikawa R, Biron CA. Transforming growth factor-beta expression and natural killer cell responses during virus infection of normal, nude, and SCID mice. *J Immunol* 1993;151(9):4874-90.
33. Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 1989;320(26):1731-5.
34. Quinnan GV, Manischewitz JE, Ennis FA. Cytotoxic T lymphocyte response to murine cytomegalovirus infection. *Nature* 1978;273(5663):541-3.
35. Slavin M, Dobbs S, Crawford S, Bowden R. Interleukin-2, interferon-gamma and natural killer cell activity in bronchoalveolar lavage fluid from marrow transplant recipients with cytomegalovirus pneumonia. *Bone Marrow Transplant* 1993;11(2):113-8.
36. Shellam GR, Allan JE, Papadimitriou JM, Bancroft GJ. Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(8):5104-8.
37. Bukowski JF, Woda BA, Welsh RM. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J Virol* 1984;52(1):119-28.
38. Welsh RM, Brubaker JO, Vargas-Cortes M, O'Donnell CL. Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function. *J Exp Med* 1991;173(5):1053-63.

39. Welsh RM, O'Donnell CL, Shultz LD. Antiviral activity of NK 1.1+ natural killer cells in C57BL/6 scid mice infected with murine cytomegalovirus. *Nat Immunol* 1994;13(5):239-45.
40. Bukowski JF, Woda BA, Habu S, Okumura K, Welsh RM. Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J Immunol* 1983;131(3):1531-8.
41. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983;301(5900):527-30.
42. Bukowski JF, Warner JF, Dennert G, Welsh RM. Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J Exp Med* 1985;161(1):40-52.
43. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989;47:187-376.
44. Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 1998;9(5):669-76.
45. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 2000;191(5):771-80.
46. Williams NS, Klem J, Puzanov IJ, Sivakumar PV, Bennett M, Kumar V. Differentiation of NK1.1+, Ly49+ NK cells from flt3+ multipotent marrow progenitor cells. *J Immunol* 1999;163(5):2648-56.
47. Roth C, Carlyle JR, Takizawa H, Raulet DH. Clonal acquisition of inhibitory Ly49 receptors on developing NK cells is successively restricted and regulated by stromal class I MHC. *Immunity* 2000;13(1):143-53.
48. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22(11):633-40.
49. Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol* 2001;19:291-330.
50. Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2002;3(11):1033-40.
51. Scharton-Kersten TM, Sher A. Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. *Curr Opin Immunol* 1997;9(1):44-51.

52. Ljunggren HG, Karre K. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med* 1985;162(6):1745-59.
53. Storkus WJ, Howell DN, Salter RD, Dawson JR, Cresswell P. NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J Immunol* 1987;138(6):1657-9.
54. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986;319(6055):675-8.
55. Murphy WJ, Kumar V, Bennett M. Rejection of bone marrow allografts by mice with severe combined immune deficiency (SCID). Evidence that natural killer cells can mediate the specificity of marrow graft rejection. *J Exp Med* 1987;165(4):1212-7.
56. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990;11(7):237-44.
57. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 2001;1(1):41-9.
58. Scalzo AA. Successful control of viruses by NK cells--a balance of opposing forces? *Trends Microbiol* 2002;10(10):470-4.
59. Andrews DM, Scalzo AA, Yokoyama WM, Smyth MJ, Degli-Esposti MA. Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection. *Nat Immunol* 2003;4(2):175-81.
60. French AR, Yokoyama WM. Natural killer cells and viral infections. *Curr Opin Immunol* 2003;15(1):45-51.
61. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002;2(10):735-47.
62. Arase H, Arase N, Saito T. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J Exp Med* 1995;181(3):1235-8.
63. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Takeda K, Akiba H, Tsutsui H, et al. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol* 1999;163(4):1906-13.
64. Caron G, Delneste Y, Aubry JP, Magistrelli G, Herbault N, Blaecke A, et al. Human NK cells constitutively express membrane TNF-alpha (mTNFalpha) and present mTNFalpha-dependent cytotoxic activity. *Eur J Immunol* 1999;29(11):3588-95.

65. Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 2002;71(2):173-83.
66. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, et al. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 1994;266(5189):1395-9.
67. Muller S, Dorner B, Korthauer U, Mages HW, D'Apuzzo M, Senger G, et al. Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule exclusively expressed in CD8+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1995;25(6):1744-8.
68. Orange JS, Wang B, Terhorst C, Biron CA. Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J Exp Med* 1995;182(4):1045-56.
69. Orange JS, Biron CA. Characterization of early IL-12, IFN- α , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 1996;156(12):4746-56.
70. Orange JS, Biron CA. An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN- γ production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *J Immunol* 1996;156(3):1138-42.
71. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(4):778-809, table of contents.
72. Gordon S. The role of the macrophage in immune regulation. *Res Immunol* 1998;149(7-8):685-8.
73. Raulet DH. Natural Killer Cells. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. p. 365-391.
74. Long EO, Burshtyn DN, Clark WP, Peruzzi M, Rajagopalan S, Rojo S, et al. Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. *Immunol Rev* 1997;155:135-44.
75. Vivier E, Daeron M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today* 1997;18(6):286-91.
76. Lanier LL. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 2003;15(3):308-14.
77. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001;19:197-223.

78. Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 1998;391(6668):703-7.
79. Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999;285(5428):730-2.
80. Chang C, Dietrich J, Harpur AG, Lindquist JA, Haude A, Loke YW, et al. Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties. *J Immunol* 1999;163(9):4651-4.
81. Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, Cosman D. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* 2002;168(2):671-9.
82. Jiang K, Zhong B, Gilvary DL, Corliss BC, Hong-Geller E, Wei S, et al. Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells. *Nat Immunol* 2000;1(5):419-25.
83. Lanier LL. On guard--activating NK cell receptors. *Nat Immunol* 2001;2(1):23-7.
84. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001;2(3):255-60.
85. Biassoni R, Pessino A, Bottino C, Pende D, Moretta L, Moretta A. The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity. *Eur J Immunol* 1999;29(3):1014-20.
86. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:217-51.
87. Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, Wilson MJ. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev* 2001;181:20-38.
88. Samaridis J, Colonna M. Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *Eur J Immunol* 1997;27(3):660-5.
89. Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L, et al. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 1997;7(2):273-82.

90. Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 1999;190(10):1505-16.
91. Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, et al. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 1998;187(12):2065-72.
92. Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L, et al. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* 1998;188(5):953-60.
93. Sivori S, Pende D, Bottino C, Marcenaro E, Pessino A, Biassoni R, et al. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol* 1999;29(5):1656-66.
94. Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, et al. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev* 2001;181:203-14.
95. Arnon TI, Lev M, Katz G, Chernobrov Y, Porgador A, Mandelboim O. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* 2001;31(9):2680-9.
96. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 2001;409(6823):1055-60.
97. Brown MG, Scalzo AA, Matsumoto K, Yokoyama WM. The natural killer gene complex: a genetic basis for understanding natural killer cell function and innate immunity. *Immunol Rev* 1997;155:53-65.
98. Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 1991;173(4):1017-20.
99. Vance RE, Tanamachi DM, Hanke T, Raulet DH. Cloning of a mouse homolog of CD94 extends the family of C-type lectins on murine natural killer cells. *Eur J Immunol* 1997;27(12):3236-41.
100. Vance RE, Kraft JR, Altman JD, Jensen PE, Raulet DH. Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J Exp Med* 1998;188(10):1841-8.

101. Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 1998;8(6):693-701.
102. Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, Lopez-Botet M, et al. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(9):5199-204.
103. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998;391(6669):795-9.
104. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003;3(10):781-90.
105. Diefenbach A, Tomasello E, Lucas M, Jamieson AM, Hsia JK, Vivier E, et al. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol* 2002;3(12):1142-9.
106. Gilfillan S, Ho EL, Cella M, Yokoyama WM, Colonna M. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol* 2002;3(12):1150-5.
107. Watzl C. The NKG2D receptor and its ligands-recognition beyond the "missing self"? *Microbes Infect* 2003;5(1):31-7.
108. Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 2002;17(1):19-29.
109. Giorda R, Rudert WA, Vavassori C, Chambers WH, Hiserodt JC, Trucco M. NKR-P1, a signal transduction molecule on natural killer cells. *Science* 1990;249(4974):1298-300.
110. Lanier LL, Chang C, Phillips JH. Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol* 1994;153(6):2417-28.
111. Plougastel B, Matsumoto K, Dubbelde C, Yokoyama WM. Analysis of a 1-Mb BAC contig overlapping the mouse Nkrp1 cluster of genes: cloning of three new Nkrp1 members, Nkrp1d, Nkrp1e, and Nkrp1f. *Immunogenetics* 2001;53(7):592-8.
112. Karlhofer FM, Yokoyama WM. Stimulation of murine natural killer (NK) cells by a monoclonal antibody specific for the NK1.1 antigen. IL-2-activated NK cells possess additional specific stimulation pathways. *J Immunol* 1991;146(10):3662-73.

113. Iizuka K, Naidenko OV, Plougastel BF, Fremont DH, Yokoyama WM. Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKRP1 family of natural killer cell receptors. *Nat Immunol* 2003;4(8):801-7.
114. Karlhofer FM, Ribaldo RK, Yokoyama WM. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* 1992;358(6381):66-70.
115. Dimasi N, Moretta L, Biassoni R. Structure of the Ly49 family of natural killer (NK) cell receptors and their interaction with MHC class I molecules. *Immunol Res* 2004;30(1):95-104.
116. Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev* 1998;163:19-34.
117. Matsumoto N, Ribaldo RK, Abastado JP, Margulies DH, Yokoyama WM. The lectin-like NK cell receptor Ly-49A recognizes a carbohydrate-independent epitope on its MHC class I ligand. *Immunity* 1998;8(2):245-54.
118. Hanke T, Takizawa H, McMahon CW, Busch DH, Pamer EG, Miller JD, et al. Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors. *Immunity* 1999;11(1):67-77.
119. Yokoyama WM, Plougastel BF. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol* 2003;3(4):304-16.
120. Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 2002;296(5571):1323-6.
121. Westgaard IH, Berg SF, Orstavik S, Fossum S, Dissen E. Identification of a human member of the Ly-49 multigene family. *Eur J Immunol* 1998;28(6):1839-46.
122. Sivakumar PV, Gunturi A, Salcedo M, Schatzle JD, Lai WC, Kurepa Z, et al. Cutting edge: expression of functional CD94/NKG2A inhibitory receptors on fetal NK1.1+Ly-49- cells: a possible mechanism of tolerance during NK cell development. *J Immunol* 1999;162(12):6976-80.
123. Jaleco AC, Blom B, Res P, Weijer K, Lanier LL, Phillips JH, et al. Fetal liver contains committed NK progenitors, but is not a site for development of CD34+ cells into T cells. *J Immunol* 1997;159(2):694-702.
124. Sivakumar PV, Bennett M, Kumar V. Fetal and neonatal NK1.1+ Ly-49- cells can distinguish between major histocompatibility complex class I(hi) and class I(lo) target cells: evidence for a Ly-49-independent negative signaling receptor. *Eur J Immunol* 1997;27(12):3100-4.

125. Dorfman JR, Raulet DH. Acquisition of Ly49 receptor expression by developing natural killer cells. *J Exp Med* 1998;187(4):609-18.
126. Takei F, Brennan J, Mager DL. The Ly-49 family: genes, proteins and recognition of class I MHC. *Immunol Rev* 1997;155:67-77.
127. Franksson L, Sundback J, Achour A, Bernlind J, Glas R, Karre K. Peptide dependency and selectivity of the NK cell inhibitory receptor Ly-49C. *Eur J Immunol* 1999;29(9):2748-58.
128. Peacock CD, Xu W, Stepp SE, Welsh RM. Dynamics of Ly49 expressing cytotoxic lymphocyte subsets in response to virus infection. *Microbes Infect* 2002;4(15):1481-90.
129. Correa I, Raulet DH. Binding of diverse peptides to MHC class I molecules inhibits target cell lysis by activated natural killer cells. *Immunity* 1995;2(1):61-71.
130. Tormo J, Natarajan K, Margulies DH, Mariuzza RA. Crystal structure of a lectin-like natural killer cell receptor bound to its MHC class I ligand. *Nature* 1999;402(6762):623-31.
131. Nakamura MC, Hayashi S, Niemi EC, Ryan JC, Seaman WE. Activating Ly-49D and inhibitory Ly-49A natural killer cell receptors demonstrate distinct requirements for interaction with H2-D(d). *J Exp Med* 2000;192(3):447-54.
132. Matsumoto N, Mitsuki M, Tajima K, Yokoyama WM, Yamamoto K. The functional binding site for the C-type lectin-like natural killer cell receptor Ly49A spans three domains of its major histocompatibility complex class I ligand. *J Exp Med* 2001;193(2):147-58.
133. Karlhofer FM, Hunziker R, Reichlin A, Margulies DH, Yokoyama WM. Host MHC class I molecules modulate in vivo expression of a NK cell receptor. *J Immunol* 1994;153(6):2407-16.
134. Olsson-Alheim MY, Salcedo M, Ljunggren HG, Karre K, Sentman CL. NK cell receptor calibration: effects of MHC class I induction on killing by Ly49A^{high} and Ly49A^{low} NK cells. *J Immunol* 1997;159(7):3189-94.
135. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004;305(5685):872-4.
136. Smith KM, Wu J, Bakker AB, Phillips JH, Lanier LL. Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors. *J Immunol* 1998;161(1):7-10.

137. Nakamura MC, Linnemeyer PA, Niemi EC, Mason LH, Ortaldo JR, Ryan JC, et al. Mouse Ly-49D recognizes H-2Dd and activates natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med* 1999;189(3):493-500.
138. George TC, Mason LH, Ortaldo JR, Kumar V, Bennett M. Positive recognition of MHC class I molecules by the Ly49D receptor of murine NK cells. *J Immunol* 1999;162(4):2035-43.
139. Idris AH, Smith HR, Mason LH, Ortaldo JR, Scalzo AA, Yokoyama WM. The natural killer gene complex genetic locus Chok encodes Ly-49D, a target recognition receptor that activates natural killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(11):6330-5.
140. Smith HR, Chuang HH, Wang LL, Salcedo M, Heusel JW, Yokoyama WM. Nonstochastic coexpression of activation receptors on murine natural killer cells. *J Exp Med* 2000;191(8):1341-54.
141. Gosselin P, Mason LH, Willette-Brown J, Ortaldo JR, McVicar DW, Anderson SK. Induction of DAP12 phosphorylation, calcium mobilization, and cytokine secretion by Ly49H. *J Leukoc Biol* 1999;66(1):165-71.
142. Brown MG, Dokun AO, Heusel JW, Smith HR, Beckman DL, Blattenberger EA, et al. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 2001;292(5518):934-7.
143. Daniels KA, Devora G, Lai WC, O'Donnell CL, Bennett M, Welsh RM. Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *J. Exp. Med.* 2001;194(1):29-44.
144. Dokun AO, Kim S, Smith HR, Kang HS, Chu DT, Yokoyama WM. Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol* 2001;2(10):951-6.
145. Smith HR, Heusel JW, Mehta IK, Kim S, Dorner BG, Naidenko OV, et al. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002;99(13):8826-31.
146. Merrill JE, Ullberg M, Jondal M. Influence of IgG and IgM receptor triggering on human natural killer cell cytotoxicity measured on the level of the single effector cell. *Eur J Immunol* 1981;11(7):536-41.
147. Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol* 1998;76(6):231-48.
148. Budt M, Reinhard H, Bigl A, Hengel H. Herpesviral Fcγ receptors: culprits attenuating antiviral IgG? *Int Immunopharmacol* 2004;4(9):1135-48.
149. Colucci F, Di Santo JP, Leibson PJ. Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? *Nat Immunol* 2002;3(9):807-13.

150. Leong CC, Chapman TL, Bjorkman PJ, Formankova D, Mocarski ES, Phillips JH, et al. Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: the role of endogenous class I major histocompatibility complex and a viral class I homolog. *J Exp Med* 1998;187(10):1681-7.
151. Riteau B, Barber DF, Long EO. Vav1 phosphorylation is induced by beta2 integrin engagement on natural killer cells upstream of actin cytoskeleton and lipid raft reorganization. *J Exp Med* 2003;198(3):469-74.
152. Llano M, Lee N, Navarro F, Garcia P, Albar JP, Geraghty DE, et al. HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur J Immunol* 1998;28(9):2854-63.
153. Kraft JR, Vance RE, Pohl J, Martin AM, Raulet DH, Jensen PE. Analysis of Qa-1(b) peptide binding specificity and the capacity of CD94/NKG2A to discriminate between Qa-1-peptide complexes. *J Exp Med* 2000;192(5):613-24.
154. Cerwenka A, Lanier LL. NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. *Tissue Antigens* 2003;61(5):335-43.
155. Kasahara M, Watanabe Y, Sumasu M, Nagata T. A family of MHC class I-like genes located in the vicinity of the mouse leukocyte receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(21):13687-92.
156. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001;14(2):123-33.
157. Strong RK. Asymmetric ligand recognition by the activating natural killer cell receptor NKG2D, a symmetric homodimer. *Mol Immunol* 2002;38(14):1029-37.
158. Malarkannan S, Shih PP, Eden PA, Horng T, Zuberi AR, Christianson G, et al. The molecular and functional characterization of a dominant minor H antigen, H60. *J Immunol* 1998;161(7):3501-9.
159. Nomura M, Takihara Y, Shimada K. Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: one of the early inducible clones encodes a novel protein sharing several highly homologous regions with a *Drosophila* polyhomeotic protein. *Differentiation* 1994;57(1):39-50.
160. Lodoen M, Ogasawara K, Hamerman JA, Arase H, Houchins JP, Mocarski ES, et al. NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J Exp Med* 2003;197(10):1245-53.

161. Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. Cutting edge: toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor. *J Immunol* 2004;172(4):2001-5.
162. Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Fremont DH, Yokoyama WM. Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol* 2002;169(8):4079-83.
163. Diefenbach A, Hsia JK, Hsiung MY, Raulet DH. A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity. *Eur J Immunol* 2003;33(2):381-91.
164. Chalmer JE, Mackenzie JS, Stanley NF. Resistance to murine cytomegalovirus linked to the major histocompatibility complex of the mouse. *J Gen Virol* 1977;37(1):107-14.
165. Grundy JE, Mackenzie JS, Stanley NF. Influence of H-2 and non-H-2 genes on resistance to murine cytomegalovirus infection. *Infect Immun* 1981;32(1):277-86.
166. Price P, Winter JG, Nikolett S, Hudson JB, Shellam GR. Functional changes in murine macrophages infected with cytomegalovirus relate to H-2-determined sensitivity to infection. *J Virol* 1987;61(11):3602-6.
167. Wykes MN, Shellam GR, McCluskey J, Kast WM, Dallas PB, Price P. Murine cytomegalovirus interacts with major histocompatibility complex class I molecules to establish cellular infection. *J Virol* 1993;67(7):4182-9.
168. Lee SH, Webb JR, Vidal SM. Innate immunity to cytomegalovirus: the *Cmv1* locus and its role in natural killer cell function. *Microbes Infect* 2002;4(15):1491-503.
169. Scalzo AA, Fitzgerald NA, Simmons A, La Vista AB, Shellam GR. *Cmv-1*, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J Exp Med* 1990;171(5):1469-83.
170. Forbes CA, Brown MG, Cho R, Shellam GR, Yokoyama WM, Scalzo AA. The *Cmv1* host resistance locus is closely linked to the *Ly49* multigene family within the natural killer cell gene complex on mouse chromosome 6. *Genomics* 1997;41(3):406-13.
171. Price P, Olver SD, Gibbons AE, Teo HK, Shellam GR. Characterization of thymic involution induced by murine cytomegalovirus infection. *Immunol Cell Biol* 1993;71 (Pt 3):155-65.
172. Scalzo AA, Lyons PA, Fitzgerald NA, Forbes CA, Yokoyama WM, Shellam GR. Genetic mapping of *Cmv1* in the region of mouse chromosome 6 encoding the NK gene complex-associated loci *Ly49* and *musNKR-P1*. *Genomics* 1995;27(3):435-41.

173. Scaizo AA, Brown MG, Chu DT, Heusel JW, Yokoyama WM, Forbes CA. Development of intra-natural killer complex (NKC) recombinant and congenic mouse strains for mapping and functional analysis of NK cell regulatory loci. *Immunogenetics* 1999;49(3):238-41.

174. Lee SH, Girard S, Macina D, Busa M, Zafer A, Belouchi A, et al. Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nat. Genet.* 2001;28(1):42-5.

175. Taylor BA, Wnek C, Kotlus BS, Roemer N, MacTaggart T, Phillips SJ. Genotyping new BXD recombinant inbred mouse strains and comparison of BXD and consensus maps. *Mamm Genome* 1999;10(4):335-48.

176. Sjolín H, Tomasello E, Mousavi-Jazi M, Bartolazzi A, Karre K, Vivier E, et al. Pivotal role of KARAP/DAP12 adaptor molecule in the natural killer cell-mediated resistance to murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med* 2002;195(7):825-34.

177. Lee SH, Zafer A, de Repentigny Y, Kothary R, Tremblay ML, Gros P, et al. Transgenic expression of the activating natural killer receptor Ly49H confers resistance to cytomegalovirus in genetically susceptible mice. *J Exp Med* 2003;197(4):515-26.

178. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, Liew FY, et al. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* 2002;169(8):4279-87.

179. Kasaian MT, Whitters MJ, Carter LL, Lowe LD, Jussif JM, Deng B, et al. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity* 2002;16(4):559-69.

180. Dokun AO, Chu DT, Yang L, Bendelac AS, Yokoyama WM. Analysis of in situ NK cell responses during viral infection. *J Immunol* 2001;167(9):5286-93.

181. Andrews DM, Farrell HE, Densley EH, Scalzo AA, Shellam GR, Degli-Esposti MA. NK1.1+ cells and murine cytomegalovirus infection: what happens in situ? *J Immunol* 2001;166(3):1796-802.

182. Salazar-Mather TP, Orange JS, Biron CA. Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways. *J Exp Med* 1998;187(1):1-14.

183. Salazar-Mather TP, Lewis CA, Biron CA. Type I interferons regulate inflammatory cell trafficking and macrophage inflammatory protein 1alpha delivery to the liver. *J Clin Invest* 2002;110(3):321-30.

184. Tay CH, Welsh RM. Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J Virol* 1997;71(1):267-75.
185. Alcami A, Koszinowski UH. Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today* 2000;21(9):447-55.
186. Orange JS, Fasset MS, Koopman LA, Boyson JE, Strominger JL. Viral evasion of natural killer cells. *Nat Immunol* 2002;3(11):1006-12.
187. Beck S, Barrell BG. Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* 1988;331(6153):269-72.
188. Chapman TL, Heikeman AP, Bjorkman PJ. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity* 1999;11(5):603-13.
189. Farrell HE, Vally H, Lynch DM, Fleming P, Shellam GR, Scalzo AA, et al. Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature* 1997;386(6624):510-4.
190. Jun Y, Kim E, Jin M, Sung HC, Han H, Geraghty DE, et al. Human cytomegalovirus gene products US3 and US6 down-regulate trophoblast class I MHC molecules. *J Immunol* 2000;164(2):805-11.
191. Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, Gadola S, et al. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 2000;287(5455):1031.
192. Wang EC, McSharry B, Retiere C, Tomasec P, Williams S, Borysiewicz LK, et al. UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(11):7570-5.
193. Ulbrecht M, Martinozzi S, Grzeschik M, Hengel H, Ellwart JW, Pla M, et al. Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J Immunol* 2000;164(10):5019-22.
194. Wagner M, Ruzsics Z, Koszinowski UH. Herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol* 2002;10(7):318-24.
195. Kleijnen MF, Huppa JB, Lucin P, Mukherjee S, Farrell H, Campbell AE, et al. A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. *Embo J* 1997;16(4):685-94.
196. Kavanagh DG, Koszinowski UH, Hill AB. The murine cytomegalovirus immune evasion protein m4/gp34 forms biochemically distinct complexes with class I MHC at the cell surface and in a pre-Golgi compartment. *J Immunol* 2001;167(7):3894-902.

197. Dunn C, Chalupny NJ, Sutherland CL, Dosch S, Sivakumar PV, Johnson DC, et al. Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med* 2003;197(11):1427-39.
198. Wu J, Chalupny NJ, Manley TJ, Riddell SR, Cosman D, Spies T. Intracellular retention of the MHC class I-related chain B ligand of NKG2D by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *J Immunol* 2003;170(8):4196-200.
199. Vales-Gomez M, Browne H, Reyburn HT. Expression of the UL16 glycoprotein of Human Cytomegalovirus protects the virus-infected cell from attack by natural killer cells. *BMC Immunol* 2003;4(1):4.
200. Lodoen MB, Abenes G, Umamoto S, Houchins JP, Liu F, Lanier LL. The Cytomegalovirus m155 Gene Product Subverts Natural Killer Cell Antiviral Protection by Disruption of H60-NKG2D Interactions. *J Exp Med* 2004.
201. Fleming P, Davis-Poynter N, Degli-Esposti M, Densley E, Papadimitriou J, Shellam G, et al. The murine cytomegalovirus chemokine homolog, m131/129, is a determinant of viral pathogenicity. *J Virol* 1999;73(8):6800-9.
202. Saederup N, Aguirre SA, Sparer TE, Bouley DM, Mocarski ES. Murine cytomegalovirus CC chemokine homolog MCK-2 (m131-129) is a determinant of dissemination that increases inflammation at initial sites of infection. *J Virol* 2001;75(20):9966-76.
203. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993;178(3):1041-8.
204. Kotenko SV, Sacconi S, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Pestka S. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(4):1695-700.
205. Lilley BN, Ploegh HL, Tirabassi RS. Human cytomegalovirus open reading frame TRL11/IRL11 encodes an immunoglobulin G Fc-binding protein. *J Virol* 2001;75(22):11218-21.
206. Atalay R, Zimmermann A, Wagner M, Borst E, Benz C, Messerle M, et al. Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fc-gamma receptor homologs. *J Virol* 2002;76(17):8596-608.
207. Thäle R, Lucin P, Schneider K, Eggers M, Koszinowski UH. Identification and expression of a murine cytomegalovirus early gene coding for an Fc receptor. *J Virol* 1994;68(12):7757-65.

208. Crnkovic-Mertens I, Messerle M, Milotic I, Szepan U, Kucic N, Krmpotic A, et al. Virus attenuation after deletion of the cytomegalovirus Fc receptor gene is not due to antibody control. *J Virol* 1998;72(2):1377-82.
209. Allan JE, Shellam GR. Genetic control of murine cytomegalovirus infection: virus titres in resistant and susceptible strains of mice. *Arch Virol* 1984;81(1-2):139-50.
210. Wagner M, Jonjic S, Koszinowski UH, Messerle M. Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J Virol* 1999;73(8):7056-60.
211. Wagner M, Koszinowski UH. Mutagenesis of viral BACs with linear PCR fragments (ET recombination). *Methods Mol Biol* 2004;256:257-68.
212. Rawlinson WD, Farrell HE, Barrell BG. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol* 1996;70(12):8833-49.
213. Wagner M, Gutermann A, Podlech J, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Major histocompatibility complex class I allele-specific cooperative and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus. *J Exp Med* 2002;196(6):805-16.
214. Menard C, Wagner M, Ruzsics Z, Holak K, Brune W, Campbell AE, et al. Role of murine cytomegalovirus US22 gene family members in replication in macrophages. *J Virol* 2003;77(10):5557-70.
215. Scalzo AA, Lyons PA, Fitzgerald NA, Forbes CA, Shellam GR. The BALB.B6-Cmv1r mouse: a strain congenic for Cmv1 and the NK gene complex. *Immunogenetics* 1995;41(2-3):148-51.
216. Zinkernagel RM, Planz O, Ehl S, Battegay M, Odermatt B, Klenerman P, et al. General and specific immunosuppression caused by antiviral T-cell responses. *Immunol Rev* 1999;168:305-15.
217. French AR, Pingel JT, Wagner M, Bubic I, Yang L, Kim S, et al. Escape of mutant double-stranded DNA virus from innate immune control. *Immunity* 2004;20(6):747-56.
218. Scalzo AA, Fitzgerald NA, Wallace CR, Gibbons AE, Smart YC, Burton RC, et al. 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* 1992;149(2):581-9.
219. Delano ML, Brownstein DG. Innate resistance to lethal mousepox is genetically linked to the NK gene complex on chromosome 6 and correlates with early restriction of virus replication by cells with an NK phenotype. *J Virol* 1995;69(9):5875-7.

220. Pereira RA, Scalzo A, Simmons A. Cutting edge: a NK complex-linked locus governs acute versus latent herpes simplex virus infection of neurons. *J Immunol* 2001;166(10):5869-73.
221. Mehta IK, Smith HR, Wang J, Margulies DH, Yokoyama WM. A "chimeric" C57I-derived Ly49 inhibitory receptor resembling the Ly49D activation receptor. *Cell Immunol* 2001;209(1):29-41.
222. Arase H, Lanier LL. Specific recognition of virus-infected cells by paired NK receptors. *Rev Med Virol* 2004;14(2):83-93.
223. Khakoo SI, Rajalingam R, Shum BP, Weidenbach K, Flodin L, Muir DG, et al. Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans. *Immunity* 2000;12(6):687-98.
224. Krmpotic A, Messerle M, Crnkovic-Mertens I, Polic B, Jonjic S, Koszinowski UH. The immunoevasive function encoded by the mouse cytomegalovirus gene m152 protects the virus against T cell control in vivo. *J Exp Med* 1999;190(9):1285-96.
225. Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol* 2004;25(1):47-52.
226. Andrews DM, Andoniou CE, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P, Degli-Esposti MA. Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nat Immunol* 2001;2(11):1077-84.
227. Tortorella D, Gewurz B, Schust D, Furman M, Ploegh H. Down-regulation of MHC class I antigen presentation by HCMV; lessons for tumor immunology. *Immunol Invest* 2000;29(2):97-100.
228. Voigt V, Forbes CA, Tonkin JN, Degli-Esposti MA, Smith HR, Yokoyama WM, et al. Murine cytomegalovirus m157 mutation and variation leads to immune evasion of natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(23):13483-8.
229. Xu J, Lyons PA, Carter MD, Booth TW, Davis-Poynter NJ, Shellam GR, et al. Assessment of antigenicity and genetic variation of glycoprotein B of murine cytomegalovirus. *J Gen Virol* 1996;77 (Pt 1):49-59.
230. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998;338(24):1741-51.

ŽIVOTOPIS

Opći podaci:

- Ime i prezime: Ivan Bubić
- Datum i mjesto rođenja: 04. ožujka 1972. Rijeka
- Bračno stanje: oženjen, otac jednog sina
- Adresa stalnog boravka: E. Randića 9, Rijeka
- telefon: 051 676 720
- e-mail: ibubic@medri.hr
- Zaposlenje: znanstveni novak na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

Školovanje i zaposlenja:

- 1979 – 1987 Osnovna škola Vežica u Rijeci
- 1987 – 1991 CUO za kadrove u zdravstvu "Mirko Lenac" u Rijeci
- 1991 – 1998 Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
- 11. srpanj 1998 stekao naziv doktora medicine
- 1998 – 2000 obavio liječnički pripravnički staž u KBC-u Rijeka
- 1999 upisao poslijediplomski studij "Biomedicina" na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci
- 1999 zaposlen kao znanstveni novak na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci
- 2001 položio stručni ispit za doktora medicine

Članstvo u znanstvenim udrugama:

Hrvatsko biokemijsko društvo
Hrvatsko imunološko društvo

Nagrade i priznanja:

2004. Godišnja nagrada Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci za mlade znanstvenike

Ljetne škole i tečajevi:

1. FEBS International Summer School of Immunology on "Immune System: genes, receptors and regulation", September 09-16, 2002, Ionian Village, Grčka;

2. EMBO Practical Course on Cytometry and Cell Sorting for Functional Genomics and Proteomics, July 07-11, 2003, Berlin, Njemačka;
3. FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference, May 21-27, 2004, Dubrovnik, Hrvatska

Znanstveni radovi:

1. W. Brune, M. Hasan, M. Krych, I. Bubić, S. Jonjić and U.H. Koszinowski: Secreted Virus-Encoded Proteins Reflect Murine Cytomegalovirus Productivity in Organs. *Journal of Infectious Disease* 184: 1320-1324, 2001.
2. A. Krmpotić, D.H. Busch, I. Bubić, F. Gebhardt, H. Hengel, M. Hasan, A.A. Scalzo, U.H. Koszinowski and S. Jonjić: MCMV Glycoprotein gp40 Confers Virus Resistance to CD8(+) T Cells and NK Cells *in vivo*. *Nature Immunology* 3(6):529-535, 2002.
3. L. Čičin Šain, W. Brune, I. Bubić, S. Jonjić and U.H. Koszinowski: Vaccination of Mice with Bacteria Carrying a Cloned Herpesvirus Genome Reconstituted In Vivo. *Journal of Virology* 77: 8249-8255, 2003.
4. A. Krmpotić, I. Bubić, B. Polić, P. Lučin, and S. Jonjić: Pathogenesis of Murine Cytomegalovirus Infection. *Microbes and Infection* 5(13):1263-1277, 2003.
5. I. Bubić, M. Wagner, A. Krmpotić, T. Saulig, S. Kim, W.M. Yokoyama, S. Jonjić and U.H. Koszinowski: Gain-of-Virulence Caused by Loss of a Gene in Murine Cytomegalovirus. *Journal of Virology*, 78:7536-7544, 2004.
6. A.R. French, J.T. Pingle, M. Wagner, I. Bubić, L. Yang, S. Kim, U.H. Koszinowski, S. Jonjić and W.M. Yokoyama: "Escape of mutant double-stranded DNA virus from innate immune control", *Immunity*, 20(6):747-56, 2004.
7. A. Krmpotić, M. Hasan, A. Loewendorf, T. Saulig, A. Halenius, T. Lenac, B. Polić, I. Bubić, A. Kriegeskorte, E. Pernjak-Pugel, M. Messerle, H. Hengel, D. Busch, U.H. Koszinowski and S. Jonjić: NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145 product", *The Journal of Experimental Medicine*, 201 (2):211-220, 2005.
8. M. Hasan, A. Krmpotić, Z. Ruzsics, I. Bubić, T. Lenac, A. Halenius, A. Loewendorf, M. Messerle, H. Hengel, S. Jonjić and U.H. Koszinowski: "Selective down-regulation of the NKG2D ligand H60 by mouse cytomegalovirus m155 glycoprotein", *Journal of Virology*, 79:2920-2930, 2005

9. A. Zimmermann, M. Trilling, M. Wagner, M. Wilborn, I. Bubić, S. Jonjić, U.H. Koszinowski and H. Hengel: "A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- γ signaling and antiviral responses", *The Journal of Experimental Medicine*, u tisku

Poglavlja u knjizi:

1. S. Jonjić, I. Bubić, A. Krmpotić: "Innate Immunity to Cytomegalovirus" u: "Cytomegaloviruses: Pathogenesis, Molecular Biology and Infection Control", urednik: M.J. Reddehase, izdavač: Horizon Scientific Press, 2005.

SVEUČILIŠTE RIJEKA