

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Dubravka Karner

**IMUNOLOŠKA ULOGA PROTEINA PrP^C
TIJEKOM VIRUSNE INFEKCIJE**

Doktorski rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Dubravka Karner

**IMUNOLOŠKA ULOGA PROTEINA PrP^C
TIJEKOM VIRUSNE INFEKCIJE**

Doktorski rad

Mentor: Prof. dr. sc Tihana Lenac Roviš

Rijeka, 2024.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE

Dubravka Karner

**IMMUNE ROLE OF PrP^C PROTEIN
DURING VIRAL INFECTION**

Doctoral Thesis

Mentor: Prof. Dr. Sc. Tihana Lenac Roviš, full prof.

Rijeka, 2024.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Tihana Lenac Roviš

Doktorski rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

Rad ima 112 listova, 37 slika, 9 tablica i 232 literaturna navoda.

UDK:

Rad je izrađen u Centru za proteomiku i na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci pod vodstvom prof. dr. sc. Tihane Lenac Roviš, u sklopu doktorskog studija "Doktorska škola Biomedicina i zdravstvo" pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Rad je izrađen u sklopu projekata "Projekt razvoja karijera mladih istraživača - izobrazba novih doktora znanosti", pod brojem 6543, te "Imunoregulatorna uloga proteina PrPC u imunološkom antivirusnom odgovoru i otpornosti na citomegalovirusnu infekciju", pod brojem IP-2020-02-6617 Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ), te sveučilišne potpore "Međudnos proteina PrPC i imunološkog sustava tijekom virusne infekcije", pod brojem: uniri-biomed-18-233, sve pod vodstvom prof. dr. sc. Tihane Lenac Roviš; te Znanstvenog centra izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva „Jačanje kapaciteta CerVirVac-a za istraživanja u virusnoj imunologiji i vakcinologiji”, pod brojem KK.01.1.1.01.0006, sufinanciranom sredstvima Europskog fonda za regionalni razvoj, pod vodstvom prof. dr.sc. Stipana Jonjića.

Zahvale

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Stanični prionski protein, PrP, mali je glikoprotein na površini stanica poznat prvenstveno po svojoj ključnoj ulozi u patogenezi neurodegenerativnih poremećaja poznatih kao prionske bolesti. Sve veći broj istraživanja ukazuje na ulogu proteina PrP u moduliranju imunskog sustava, posebno u utišavanju imunskog odgovora u tkivima poput mozga, gdje izražena upala može prouzročiti značajna oštećenja. PrP nije samo prisutan na površini imunskih stanica, već se može vezati na njih i modulirati njihovu funkciju, što ukazuje na njegovo prepoznavanje od strane imunskih receptora. U slučaju prirodene infekcije citomegalovirusom (CMV-om), pojačana aktivacija imunskog odgovora može uzrokovati ozbiljna neurološka oštećenja. Stoga je glavni cilj ovog istraživanja odrediti imunsku funkciju proteina PrP u modelu prirodene infekcije mišjim CMV-om (MCMV-om).

Materijali i metode: Za istraživanje utjecaja infekcije MCMV-om na biologiju proteina PrP, primijenili smo protočnu citometriju, konfokalnu mikroskopiju i metodu imunoblota za analizu razine PrP-a u inficiranim stanicama te identificirali mehanizam odstranjivanja proteina PrP iz stanica inficiranih MCMV-om korištenjem inhibitora i detekcije proteina PrP. U modelu prirodene infekcije MCMV-om kod novookoćenih miševa divljeg tipa i miševa kojima nedostaje PrP, uklanjanjem populacije limfocita identificirali smo stanice odgovorne za utjecaj PrP-a na tijek infekcije. Karakterizirali smo te stanice fenotipski i funkcionalno protočnom citometrijom i sekvenciranjem RNK na razini jedne stanice. Za analizu ispoljavanja topivih imunskih medijatora u uzorcima tkiva nakon prirodene infekcije MCMV-om, proveli smo multipleks analizu citokina i kemokina. Također smo proveli funkcionalne testove proizvodnje proupalnih citokina kako bismo istražili utjecaj slobodnog proteina PrP na efektorsku funkciju imunskih stanica te istražili utjecaj prisustva proteina PrP na ishod imunopatologije mozga.

Rezultati: CMV utječe na ispoljavanje proteina PrP, prvenstveno potičući njegov pojačan izražaj, pri čemu ujedno dolazi do odcjepljivanja sa stanične membrane pod utjecajem proteaze ADAM10 i uklanjanja PrP-a iz stanica. Slobodni protein PrP se veže na limfocite CD8 T kod novookoćenih miševa inficiranih MCMV-om, smanjujući njihovu sposobnost proizvodnje proupalnih citokina. U miševa kojima nedostaje protein PrP, limfociti CD8 T pokazuju povećanu aktivnost, uključujući veći broj virus-specifičnih stanica, povećanu citotoksičnost i izlučivanje citokina. Ovi miševi su pokazali poboljšanu sposobnost uklanjanja virusa bez izazivanja povećane imunopatologije.

Zaključak: Protein PrP modulira imunski odgovor tijekom prirodene infekcije CMV-om, umanjujući aktivnost imunskih stanica CD8 T i posljedično uklanjanja virusa.

Ključne riječi: Citomegalovirus, mišji, Imunosni odgovor; Prionski protein.

SUMMARY

Objectives: The cellular prion protein, PrP, is a small glycoprotein on the cell surface primarily known for its critical role in the pathogenesis of neurodegenerative prion diseases. An increasing body of research points to the role of PrP in modulating the immune system, particularly in dampening immune responses in tissues such as the brain, where severe inflammation can cause significant damage. PrP is not only present on the surface of immune cells but also binds to them and modulates their function, implying its recognition by immune receptors. In the case of congenital cytomegalovirus (CMV) infection, enhanced activation of the immune response can lead to serious neurological damage. Therefore, the main goal of this research is to determine the immune function of PrP protein in a model of congenital infection with murine CMV (MCMV).

Materials and methods: To investigate the impact of MCMV infection on the biology of the PrP protein, we used flow cytometry, confocal microscopy and immunoblot to analyze the levels of PrP in infected cells and identified the mechanism of PrP protein cleavage by detecting PrP in MCMV infected cells treated by inhibitors. In a model of MCMV congenital infection in newborn wild-type mice and mice lacking PrP, by depleting the lymphocyte population, we identified the cells responsible for the influence of PrP on the course of the infection. We characterized these cells phenotypically and functionally by flow cytometry and single cell RNA sequencing. To analyze the expression of soluble immune mediators in tissue samples after congenital MCMV infection, we used a multiplex assay of cytokines and chemokines. We also conducted functional assay of pro-inflammatory cytokine production to investigate the influence of cleaved PrP protein on the effector function of immune cells and investigated the influence of the PrP protein on the outcome of brain immunopathology.

Results: CMV affects the expression of the PrP protein primarily by promoting its increased expression, while simultaneously causing its removal from the cell membrane through cleavage by the ADAM10 protease. Cleaved PrP protein binds to CD8 T lymphocytes in neonatal mice infected with MCMV, reducing their ability to produce pro-inflammatory cytokines. In mice lacking the PrP protein, CD8 T lymphocytes show increased activity, including a higher number of virus-specific cells, increased cytotoxicity, and cytokine secretion. These mice showed an improved ability to clear the virus without causing excessive immunopathology.

Conclusion: The protein PrP modulates the immune response during congenital CMV infection, reducing the activity of CD8 T immune cells and consequently clearing the virus.

Key words: Cytomegalovirus, Mouse; Immune response; Prion Protein.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. Stanični prionski protein	1
1.1.1. Struktura i sinteza proteina PrP	1
1.2. Ispoljavanje proteina PrP	4
1.3. Post-translacijsko cijepanje proteina PrP	5
1.3.1. α -, β - i γ -proteolitička cijepanja PrP-a	6
1.3.2. Endoproteolitičko odcjepljivanje PrP-a pod utjecajem ADAM10 proteaze.....	7
1.3.3. Proteaze obitelji ADAM	8
1.4. Fiziološke funkcije proteina PrP	9
1.4.1. Uloga proteina PrP u središnjem živčanom sustavu	9
1.4.2. Uloga PrP-a u imunskom sustavu	10
1.5. Citomegalovirus	12
1.5.1. Biologija i infekcija CMV-om	12
1.5.2. Prirodna infekcija HCMV-om.....	13
1.6. Model prirodne infekcije MCMV-om.....	14
1.7. Imunosni odgovor na infekciju CMV-om.....	15
1.7.1. Urođeni odgovor na infekciju CMV-om.....	16
1.7.2. Stečeni odgovor na infekciju CMV-om	17
1.7.3. Imunosni odgovor u mozgu nakon prirodne infekcije MCMV-om	19
1.7.4. Topivi posrednici u prirodnoj infekciji CMV-om.....	20
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	22
3. MATERIJALI I METODE	23
3.1. Materijali i kemikalije	23
3.1.1. Mediji otopine i puferi	23
3.1.2. Protutijela.....	25

3.1.3. Drugi materijali	27
3.2. Metode.....	28
3.2.1. Stanične linije.....	28
3.2.2. Virusi.....	31
3.2.3. Mišji sojevi.....	31
3.2.4. Metode u analizi tkiva i stanica <i>ex vivo</i>	33
3.2.5. Biokemijske metode i mikroskopija	37
3.2.6. Statističke metode u obradi podataka.....	39
4. REZULTATI.....	40
4.1. Infekcija MCMV-om utječe na ispoljenost proteina PrP	40
4.1.1. Infekcija MCMV-om smanjuje površinsku ispoljenost PrP-a.....	40
4.1.2. Infekcija humanih stanica HCMV-om smanjuje površinsku ispoljenost PrP-a....	41
4.1.3. Kinetika ispoljavanja PrP-a na plazmatskoj membrani po infekciji MCMV-om.	42
4.2. PrP se uklanja iz stanica tijekom infekcije CMV-om	43
4.3. PrP se ne razgrađuje staničnim putevima razgradnje tijekom infekcije MCMV-om ..	45
4.4. PrP se uklanja kao zreli protein s plazmatske membrani pod utjecajem metaloproteinaze ADAM10	48
4.4.1. MCMV smanjuje količinu TIMP3, inhibitora proteaze ADAM10.....	48
4.4.2. Pod utjecajem CMV-infekcije PrP se uklanja s površine plazmatske membrane procesom enzimatskog cijepanja	49
4.5. Utjecaj PrP-a na tijek MCMV-infekcije <i>in vivo</i>	52
4.5.1. Nedostatak PrP-a nema utjecaja na infekciju MCMV-om u odraslih miševa	52
4.5.2. PrP KO novookočeni miševi bolje kontroliraju infekciju MCMV-om, poglavito u tkivu mozga.....	54
4.6. Utjecaj nedostatka proteina PrP na prirodenu MCMV infekciju u tkivu mozga	55
4.6.1. Utjecaj infekcije MCMV-om na broj stanica mikroglia se smanjuje ukoliko nedostaje protein PrP	55

4.6.2. Nedostatak PrP-a smanjuje neurorazvojne promjene u mozgu MCMV inficiranih miševa.....	56
4.7. Novookoćeni miševi PrP KO bolje kontroliraju infekciju MCMV-om na periferiji ...	57
4.8. Limfociti CD8 T su zaslužni za bolju kontrolu virusa u PrP KO novookoćenih miševa te su fenotipski drugačiji od onih divljeg tipa.....	58
4.8.1. MCMV-inficirani novookoćeni PrP KO miševi imaju više virus-specifičnih limfocita CD8 T u odnosu na miševe divljeg tipa.	59
4.8.2. Limfociti CD8 T miševa PrP KO imaju različit profil transkripcije u odnosu na one divljeg tipa u prirođenoj MCMV-infekciji.	65
4.8.3. Funkcionalni status limfocita CD8 T, mjerenjem IFN γ i TNF α , pokazuje jaču aktivnost limfocita CD8 T u miševa PrP KO u odnosu na divlji tip.....	68
4.9. MCMV-infekcija u novookoćenih miševa drastično mijenja profil velikog broja citokina, pri čemu je samo manji broj izmijenjen ovisno o prisutnosti proteina PrP	70
4.10. Vežanje sPrP na limfocite CD8 T limfocite slabi njihovu efektorsku funkciju.....	76
5. DISKUSIJA.....	81
6. ZAKLJUČCI.....	87
7. LITERATURA.....	88
ILUSTRACIJE.....	105
POPIS POKRATA.....	107
ŽIVOTOPIS.....	110

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Stanični prionski protein

Stanični prionski protein, PrP, mali je glikoprotein na površini stanica poznat prvenstveno po svojoj ključnoj ulozi u patogenezi neurodegenerativnih poremećaja poznatih kao prionske bolesti. Obilježje prionskih bolesti je pretvorba PrP-a u nepravilno savijenu izoformu proteina, s karakteristikama netopivosti i iznimne otpornosti na proteaze. Ovakva forma, tzv. PrP^{Sc}, postaje predložak za daljnju patogenu pretvorbu staničnog PrP-a direktnim kontaktom, omogućujući bolesti da se širi sa stanice na stanicu i, u nekim okolnostima, da se prenese na novog domaćina. Proces neurodegenerativne bolesti uključuje još uvijek diskutabilnu neurotoksičnost oblika PrP^{Sc}, eliminaciju stanica izazvanu imunskim sustavom koja dovodi do konačne smrti te gubitak normalne funkcije PrP-a (1). Posljedično smrtnom ishodu u slučaju konverzije, desetljećima su istraživački naponi usmjereni na određivanje fizioloških funkcija proteina PrP, koje su pridonijele tome da ostane dijelom našeg evolucijskog nasljeđa.

1.1.1. Struktura i sinteza proteina PrP

Prionski protein može postojati u dva osnovna oblika: stanični prionski protein PrP (punim imenom PrP^C, engl. *cellular*) te prion, (punim imenom PrP^{Sc}, engl. *scrapie*). Razlika je u savijanju (engl. *folding*) proteina. Kod netopivog, patološkog oblika radi se o različitoj konformaciji koja umjesto alfa-zavojnica obiluje beta-pločama (2) što ju čini sklonom stvaranju netopivih agregata. Specifično za prione, nastala konformacija služi kao kalup i dovodi do pogrešnog savijanja zdravih proteina čime se smatra da je prion infektivan (1). Za ovo otkriće dodijeljena je Nobelova nagrada (3). Rastući agregati s vremenom se cijepaju i stvaraju klice koje potiču brzu daljnju agregaciju slaganjem jedne molekule na drugu (4). Sam naziv bolesti, spongiformna encefalopatija, odnosi se na spužvastu strukturu mozga koja nastaje obzirom da imunski sustav uklanja stanice u kojima se agregati nakupljaju (1,3). U fokusu našeg istraživanja je uloga staničnog prionskog proteina (PrP^C) u imunskom odgovoru na virusne infekcije te ćemo se u daljnjem tekstu fokusirati samo na stanični protein i nazivati ga, u doktorskoj tezi i u pratećim publikacijama, jednostavno PrP.

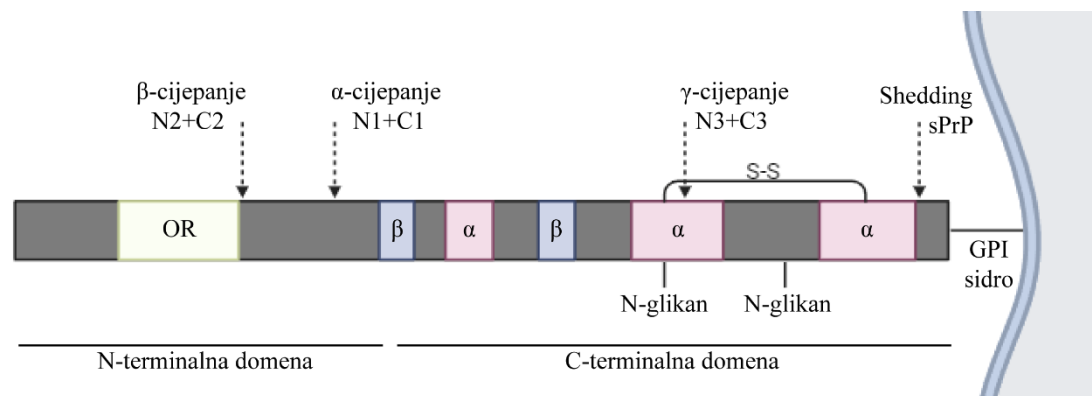
Stanični prionski protein je normalan stanični oblik proteina koji se nalazi na staničnim membranama i ne uzrokuje bolest. Dapače, pripisane su mu brojne važne uloge, a mnoge se tek otkrivaju. Ovaj protein je kodiran evolucijski visoko konzerviranim genom *Prnp* koji se u

ljudi nalazi na p kraku 20. kromosoma (5), na kromosomu 2 u miševa te kromosomu 13 u goveda, koza i ovaca. Gen je visoko očuvan između vrsta te se homologija uočava među sisavcima, pticama, gmizavcima i vodozemcima. Kod miševa, ovaca, goveda i štakora, *Prnp* gen se sastoji od tri egzona, dok su samo dva prisutna kod ljudi, od kojih samo jedan egzon kodira zreli protein (6,7). Obitelj prionskih gena u sisavaca uključuje *Sprn*, koji kodira protein pod nazivom shadoo (Sho), i *Prnd*, koji kodira protein poznat kao doppel (Dpl). Sho i Dpl dijele strukturne sličnosti s PrP-om, no njihove uloge se razlikuju (8,9). Kontrola izražaja gena *Prnp* pripisana je promotorskim sekvencama unutar 5-kraja prvog introna i post-transkripcijskim modifikacijama unutar sekvence 3-kraja. Transkripcija gena *Prnp* je regulirana mjestima vezanja za mnoge transkripcijske faktore (10). Promotoru gena *Prnp* nedostaje TATA kutija, uobičajeni motiv koji se nalazi u mnogim promotorima, te umjesto toga sadrži regiju bogatu GC-bazama s veznim mjestima za faktor transkripcije SP1, kakvi su primjerice pronađeni u 'housekeeping' genima (11).

Zreli protein PrP (slika 1) sastoji se od nestrukturiranog N-terminalnog područja od oko 100 aminokiselina i C-terminalnog segmenta, također dugog oko 100 aminokiselina (12). Njegova sinteza započinje od prekursora proteina dugog 253 aminokiseline s N-terminalnim signalnim peptidnim slijedom endoretikularnog prijenosa koji kodira za ulazak u endoplazmatsku mrežicu (engl. *Endoplasmatic reticulum*, ER). Međutim, zbog neučinkovitosti u ER-signalnoj sekvenci, mali dio prekursora proteina ne uspijeva preći u ER. Dio nezrelog PrP-a stoga ostaje u citoplazmi (6,12). Postoji i oblik proteina PrP koji nastaje kada PrP svojim C-krajem ili N-krajem djelomično uđe u ER te nastaje transmembranski oblik $C^{tm}PrP$, odnosno $N^{tm}PrP$. Tada hidrofobna domena PrP-a djeluje kao transmembranska domena, ostavljajući C-terminalni i N-terminalni kraj unutar ER lumena, a suprotni u citoplazmi (13). U homeostatskim uvjetima $N^{tm}PrP$ i $C^{tm}PrP$ čine iznimno mali dio ukupnog PrP-a i smatra se da su povezani s neurotskičnim učincima (13,14). Konačno, dominantna forma proteina PrP nije citoplazmatska niti transmembranske, već je usidrena na membranu. Nakon pravilnog ulaska u ER, dolazi do nekoliko post-translacijskih modifikacija proteina, uključujući cijepanje C-terminalnog signalnog peptida, dodavanje glikofosfatidilinozitolnog (GPI) sidra te N-glikozilacije (6,15). Signalne sekvence se uklanjaju, a ostaju aminokiselinski ostatci 23-230 kao zreli protein PrP od 208 aminokiselina. N-terminalna domena je fleksibilna i sadrži nekoliko karakterističnih regija (6). Četiri tandemska ponavljanja sekvence od osam aminokiselina čine tzv. okta-ponavljajuću regiju koja veže monovalentne i divalentne iona bakra i cinka (6,16). C-terminalni kraj PrP-a ima globularnu strukturu koja se sastoji od tri α -

zavojnice i dvije kratke, antiparalelne β -ploče (17). Ovakva konformacija C-terminalnog dijela je iznimno konzervirana u sisavaca. Na C-kraju proteina PrP disulfidni most povezuje aminokiselinske ostatke 179 i 214, dajući strukturi PrP-a dodatnu stabilnost (18). Dva N-glikozilacijska mjesta ostvaruju se na aspariginskim ostacima na pozicijama 181 i 197 u ljudi (15), odnosno 180 i 196 u miševa (19). Dva potencijalna N-glikozilacijska mjesta pružaju mogućnost sklapanja 4 izoforme: neglikoziliranog, monoglikoziliranog proteina na jednom od aspariginskih ostataka te diglikoziliranog proteina (15). Iako se smatra da je velika većina proteina PrP diglikozilirana, to nije slučaj u svim tipovima tkiva, odnosno stanica. Budući da glikozilacija sudjeluje u važnim funkcijama proteina poput poticanja staničnog prometovanja PrP-a na plazmatsku membranu te pogoduje vezanju liganada, mjesta glikozilacije u sisavaca su strogo očuvana (20).

Sljedeći korak u sekrecijskom putu membranskih proteina je ulazak u Golgijev aparat gdje N-vezani glikani sazrijevaju, a protein se sortira za stanično prometovanje do stanične membrane. GPI sidro pričvršćuje PrP na vanjsku stranu membrane, primarno unutar mikrodomena obogaćenih kolesterolom i sfingolipidima, poznatim kao lipidne splavi (engl. *lipid rafts*) (21). Sekretorni put PrP-a obuhvaća brzu konstitutivnu endocitozu aktivacijom i klatrin-ovisnih i kaveolinskih puteva, nakon čega se vraća natrag na staničnu membranu putem reciklirajućih endosoma (12,22). Smatra se da samo sazrijevanje PrP-a, do dolaska na plazmatsku mebranu, traje oko pola sata, a poluživot proteina je procijenjen na 4-8 sati (23).



Slika 1. Shematski prikaz strukturalnih dijelova proteina PrP. Zreli protein PrP usidren u plazmatsku membranu GPI-sidrom. Njegova N-terminalna domena se smatra intrinzično neuređenom i sadrži oktaponavljajuće regije (OR). Globularna C-terminalna domena sadrži tri α -zavojnice, dvije kratke β -ploče, disulfidni most te dva mjesta za N-glikozilaciju. Naznačena su mjesta za proteolitičko procesuiranje proteina tijekom post-translacijske obrade: α -, β - i γ -cijepanje kojima nastaju fragmenti N i C različitih duljina, te mjesto za odcjepljivanje (engl. *shedding*) cijele ektodomene proteina kojim nastaje sPrP.

Zaključno, velika većina proteina PrP je usidrena u plazmatskoj membrani, a procesi internalizacije i recikliranja vjerojatno postoje kako bi se omogućila kontrola PrP-a na staničnoj površini.

1.2. Ispoljavanje proteina PrP

PrP je gotovo pa ubikvitarno ispoljen protein s predominantnom pojavom u središnjem i perifernom živčanom sustavu, gdje njegove razine variraju u različitim dijelovima mozga. Amigdala, hipotalamus, zatiljni i čeonni dio mozga su neki od dijelova s visokim izražajem na razini mRNA (6). Velike količine se mogu pronaći u neuronima u hipokampusu, neokorteksu, spinalnim motoričkim neuronima i Purkinjeovim stanicama (24,25). Povišene razine ispoljavanja PrP-a povezane su s razvojem mozga i diferencijacijom neurona, pogotovo u vrijeme embrionalnog razvoja (26). Manje količine PrP-a također se ispoljavaju u glija stanicama unutar mozga i leđne moždine tijekom razvoja (27). Osim u živčanom sustavu, visoke razine prisutne su u tkivima oka, testisa te maternice tijekom trudnoće. Zanimljivo je da se ova mjesta, zajedno sa centralnim živčanim sustavom, preklapaju s imunoprivilegiranim područjima u ljudskom tijelu (28,29). Uz to, PrP je također prisutan u neurovaskulaturi, uključujući endotelne stanice, stoga može biti jedan od čimbenika koji moduliraju funkcije krvno-moždane barijere (28).

U slučaju tkiva koja ne pripadaju navedenima, izražaj je obično niži. Manje količine PrP-a uočene su u tkivu pluća, glatkog mišićja te bubrega (6). Značajne količine PrP-a također ispoljavaju različite stanične komponente imunskog sustava, uključujući one koje se nalaze u koštanoj srži, krvi i perifernim tkivima (6,28,30). Prisutnost PrP-a potvrđena je kod gotovo svih tipova imunskih stanica, uključujući one prirođenog i stečenog odgovora, poput primjerice prirodno-ubilačkih stanica (engl. *natural killer*, NK), makrofaga i sličnih mijeloidnih stanica, poput mikroglije (28,30). Kod ljudi, razina ovog proteina se povećava tijekom diferencijacije stanica NK, s posebno visokim udjelom na CD56⁺ CD16⁺ stanicama NK (31). Specijalizirane antigen-prezentirajuće stanice, dendritičke stanice (engl. *dendritic cells*, DC), s druge strane pokazuju heterogenost u ispoljavanju proteina PrP. U mišjim modelima bolesti najviše četvrtina stanica DC izolirana iz slezene miševa ispoljava PrP, pri čemu se razina PrP-a povećava s diferencijacijom i aktivacijom ovih stanica (30,32,33). U adaptivnom imunskom odgovoru, limfociti B i T ispoljavaju PrP, uz višu razinu prisutnu općenito na površini limfocita T u odnosu na limfocite B, s time da citotoksični limfociti CD8 T iskazuju veći izražaj nego pomoćnički limfociti CD4 T (31,34). Pokazano je kako se kod

aktiviranih limfocita T uočava viša razina PrP-a nego u naivnih limfocita T, poglavito u populaciji CD45RO+ memorijskih stanica (34). Protein PrP kolokalizira s imunskim sinapsama limfocita T i stanica DC, dok je pri nedostatku PrP-a na stanicama DC smanjena proliferacija limfocita T nakon antigen prezentacije i njihove aktivacije (35). Prisutnost proteina PrP detektirana je u stanicama mikroglija. Međutim, nije jasno korelira li njegovo ispoljavanje s proupalnim fenotipom M1, karakteriziranim proizvodnjom citokina TNF α , IL-1 β i IL-6, ili s imunosupresivnim fenotipom M2, obilježenim lučenjem citokina IL-10 i TGF- β (36,37). Smanjena proizvodnja obično protuupalnog citokina IL-10, kao odgovor na LPS-induciranu kroničnu upalu u miševa kojima nedostaje PrP, sugerira izražaj proteina PrP u M2-fenotipu (38). Protein PrP je prisutan na matičnim stanicama, neuronskim i ne-neuronskim (39), uključujući krvotvorne matične stanice (engl. *hematopoietic stem cells*, HSC) (40) gdje ima ulogu u obnavljanju matičnih stanica (41,42). Tijekom diferencijacije HSC duž limfoidnih ili monocitnih linija, površinsko ispoljavanje PrP-a je uglavnom održano, dok se primjerice tijekom sazrijevanja granulocita razine proteina PrP smanjuju (43).

Ispoljavanje PrP-a podložno je utjecaju stresa, pri čemu različite vrste staničnog stresa mogu rezultirati pojačanim izražajem. Na primjer, u stanicama neuroblastoma, toplinski šok izaziva povećanje razine mRNK PrP-a i proteina (44). Oksidativni stres te stres endoplazmatskog retikuluma također dovode do povišenih razina PrP-a (45,46). Dodatno, upala kože i gastrointestinalnog epitela povezana sa stresom dovodi do povećane ispoljenosti PrP-a na razini proteina (28). Upalni stres, čini se, ključan je čimbenik koji može utjecati na PrP. Naime, opaženo je da PrP induciraju TNF α i IL-1 β u nekim staničnim linijama *in vitro* (47), a lipopolisaharid (LPS) podiže razine TGF- β i glukokortikoida u serumu te na taj način potiče sintezu PrP-a u neutrofilima (48).

U konačnici, protein PrP je pronađen u različitim tipovima stanica, iako u različitim količinama. Vjeruje se da bi njegova ispoljenost mogla imati veće značenje u specifičnim podskupovima funkcionalno diferenciranih limfocita koji djeluju unutar određenih imunoloških okvira.

1.3. Post-translacijsko cijepanje proteina PrP

Većinu života molekula proteina PrP nalazi se usidrena na površini stanice, gdje također prolazi kroz kontinuirano prometovanje i recikliranje unutar endosomalnog sustava. Neki od staničnih mehanizama u kojima PrP sudjeluje uključuju prijenos signala, neuroprotekciju, odgovor na oksidativni stres, regulaciju cirkadijalnog ritma, homeostazu metalnih iona,

proliferaciju i diferencijaciju neurona (6,12). Smatra se da PrP pune duljine i njegovi fragmenti pokazuju različite fiziološke funkcije, potencijalno pridonoseći multifunkcionalnoj prirodi ovog proteina u različitim tkivima, osobito u mozgu. Proteolitička obrada, kao vrsta post-translacijske modifikacije kojom nastaju fragmenti, služi kao regulator funkcije proteina te je ireverzibilne prirode. Proteolitička cijepanja provode endogene proteaze tako stvarajući proteinske fragmente s jedinstvenim biološkim funkcijama različitim od svojih prekursora. Protein PrP može proći kroz četiri post-translacijska cijepanja, odnosno postoje 4 mjesta na kojima proteaze djeluju. α -cijepanje i β -cijepanje odvijaju se u nestrukturiranoj N-terminalnoj domeni, dok se γ -cijepanje odvija unutar strukturirane C-terminalne domene. α -, β - i γ -cijepanje dovodi do stvaranja C-terminalnih fragmenata, koji ostaju u stanici, i N-terminalnih fragmenata koji se oslobađaju u izvanstanični prostor. Odcjepljivanje proteina sa stanične membrane (engl. *shedding*) je četvrti način cijepanja PrP-a. Varijacije u mjestu cijepanja, duljini nastalih fragmenata i posjedovanju usidrenosti na membranu omogućuju fragmentima da se uključe u različite biološke procese (6,49).

1.3.1. α -, β - i γ -proteolitička cijepanja PrP-a

U fiziološkim uvjetima, α -cijepanje je glavni proces proteolitičke obrade proteina PrP s mjestima cijepanja smještenim na His-110, Ala-117 ili Val-120 u sekvenci PrP-a, ovisno o enzimu koji ga provodi (50,51). Cijepanjem se oslobađa topljivi N-terminalni fragment N1 od otprilike 11 kDa te \sim 18 kDa C-terminalni fragment C1 koji ostaje vezan za staničnu membranu pomoću GPI-sidra (52). Zanimljivo je da fragment C1 predstavlja od 5-50% ukupnog membranskog PrP-a u tkivu mozga, a varijacija udjela ovisi o dijelu mozga i tipu stanica (52,53). Fragment N1 ima relativno nisku stabilnost, no unatoč tome, utvrđeno je da je prisutan u tjelesnim tekućinama, homogenatima tkiva ili supernatantima staničnih kultura (54). Također je za istaknuti da se mjesto α -cijepanja nalazi u području sklonom pogrešnom savijanju proteina PrP te stvaranju amiloida koji nastaju prilikom pretvorbe PrP-a u PrP^{Sc} (53). Amiloid je naziv za vrstu proteina ili fragmenta koji ima sklonost da formira stabilne strukture bogate beta-nabranim pločama, prilikom čega se formiraju netopivi agregati poznati kao amiloidna vlakna (55). Posljedično, α -cijepanje sprječava pretvorbu priona, služeći kao neuroprotektivni mehanizam protiv prionskih bolesti (53). Nije u potpunosti razjašnjen identitet svih enzima odgovornih za α -cijepanje, no implicirana je obitelj metaloproteinaza ADAM (engl. *disintegrin and metalloproteinase*), poglavito ADAM8, ADAM10 i ADAM17, a postoji mogućnost da još neka stanična proteaza sudjeluje u cijepanju (51,56). Nedavna istraživanja s ADAM10 KO primarnom kulturom neurona pokazala su da se α -cijepanje odvija neovisno o

prisutnosti ADAM10, a potencijalno i u većoj količini nego kad je ADAM10 prisutan na stanicama (57). U početku se smatralo da se cijepanje događa unutar kiselih endosomalnih odjeljaka (23). Međutim, kasnije je utvrđeno da se α -cijepanje odvija tijekom vezikularnog prometa PrP duž sekretornog puta (58).

β -cijepanje, koje se javlja manje često, vrši se između aminokiselinskih ostataka 90/91, što rezultira 9 kDa topivim fragmentom N2 i 20 kDa membranski vezanim fragmentom C2 (52). Za razliku od C1, C2 zadržava oktaPONAVLJAJUĆU domenu sklonu agregaciji. U napredovanju prionskih bolesti, cijepanje PrP-a na β -mjestu događa se češće nego cijepanje α -mjestu, što dovodi do povišenih razina fragmenata C2 u modelima prionske bolesti (49). U početku se smatralo da fragment C2 ima patološku ulogu u prionskim bolestima (52). Međutim, *in vitro* istraživanja sugeriraju da β -cijepanje proteina PrP može biti inducirano reaktivnim vrstama kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) kao zaštitni mehanizam pod uvjetima staničnog stresa. Osim ROS-a, β -cijepanje induciraju kalpaini, lizosomske proteaze i ADAM8 (51,59).

Osim α - i β -cijepanja, PrP može biti podvrgnut γ -cijepanju u blizini GPI-sidra u području između aminokiselinskih ostataka 170 i 200, stvarajući topljivi fragment N3 i kratki fragment C3 od 6 do 7 kDa (60). Istraživanja sugeriraju da se γ -cijepanje uglavnom događa kasno u sekretornom putu na neglikoziliranom proteinu, pod utjecajem članova obitelji matričnih metaloproteaza (engl. *matrix metalloproteases*, MMP). Selektivnost za neglikozilirani PrP pripisuje se steričkoj smetnji koju predstavljaju glikani, onemogućujući djelovanje proteaze (61). γ -cijepanje je opaženo u različitim vrstama, tkivima i staničnim modelima. Iako njegova uloga zahtijeva daljnje istraživanje, otkrivanje povišenih razina fragmenata C3 u tkivu mozga u prionskoj bolesti ukazuje na potencijalni patogeni značaj (60).

1.3.2. Endoproteolitičko odcjepljivanje PrP-a pod utjecajem ADAM10 proteaze

Osim iznad opisanih proteolitičkih mjesta cijepanja, postoji još jedno mjesto uz samo GPI- sidro, gdje djelovanjem proteolitičkog enzima nastaje tzv. odcjepljeni PrP. Uglavnom se oslobađa puna struktura ektodomene, no moguće je i da se već nastali fragmenti C tim putem odcjepljuju. Kao što je već spomenuto, ovaj način cijepanja se naziva “shedding”, odnosno odcjepljivanje, a proizvod koji nastaje “shed” PrP, tj. sPrP. Pokazano je da ovakvo endolitičko odcjepljivanje provodi proteaza ADAM10 na mjestu između Gly228 i Arg229 u sekvenci, dok se ADAM9 implicira kao njen regulator (62,63). Odcjepljivanjem nastaje otpušteni protein pune dužine, bez GPI sidra, koji se smatra topivim u vanstaničnim tekućinama (57,62).

Odcjepljivanje je opisano u ranim istraživanjima, ali je posljednjih godina dobilo više pozornosti zbog uključenosti sPrP-a u bolesti (49). Također je pokazano kako proteolitičko mjesto u sekvenci humanog PrP-a nije isključivo smješteno između aminokiselinskih ostataka 228 i 229, već u blizini C-kraja, prvenstveno zbog postojanja više od jedne dužine odcjepljenog sPrP-a čija distribucija u mozgu korelira s onom PrP^{Sc}-a (64). Korištenjem životinjskih modela pokazana je negativnu korelaciju između cijepanja PrP-a s površine stanica i pretvorbe priona (65). Zanimljiv je vrlo specifičan utjecaj vezanja protutijela usmjerenog na PrP na sklonost ovakvom cijepanju, obzirom da su protutijela koja prepoznaju različite epitope, kao i protutijela koja imaju različitu strukturu dovodila do sasvim različitih učinaka. Vezanje cijelih protutijela specifičnih za C-terminalnu domenu ili jednolančanih derivata protutijela koji ciljaju ponavljajuće epitope unutar oktaponavljajuće regije N-terminalne domene stimuliralo je odcjepljivanje u vanstanični prostor. Nasuprot tome, vezanje cijelih protutijela na oktaponavljajuću regiju N-terminalne domene potiče površinsko grupiranje PrP-a, endocitozu te naposljetku i lizosomsku razgradnju (66). Značajno je da je sPrP identificiran u cerebrospinalnoj tekućini (engl. *cerebrospinal fluid*, CSF) i krvi u ljudi (67,68). Odcjepljivanje PrP-a prepoznato je kao ključni mehanizam za regulaciju njegovih razina na plazma membrani, s implikacijama na ulogu PrP-a kao receptora i posrednika fizioloških i toksičnih signalnih kaskada (6,12,49,65,66,69). Odcjepljivanje ovim putem može osloboditi C-terminalne fragmente koji potječu iz drugih cijepanja, čime se širi niz topivih, vanstaničnih PrP-fragmenta s potencijalnim funkcionalnim posljedicama. Proces odcjepljivanja PrP-a sličan je u različitim tkivima i značajne količine sPrP-a pojavljuju se u mediju splenocita i zrnatih stanica malog mozga (70).

1.3.3. Proteaze obitelji ADAM

Proteaze su enzimi koji posreduju katalitičku hidrolizu peptidnih veza brojnih supstrata. Članovi obitelji metaloproteinaza ADAM pretežito su ispoljeni na membrani stanica gdje mogu ulaziti u interakciju s integrinima i tako utjecati na interakciju stanica s vanstaničnim matriksom. Također imaju proteolitičku domenu kojom odcjepljuju mnoge supstrate u vanstanični prostor. Proteaze ADAM su regulirane na razini izražaja gena, aktivacijom pro-ADAM-forme u zreli protein i fiziološkom inhibicijom (71). Tkivni inhibitori metaloproteinaza (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*, TIMP) endogeni su proteini koji svojim izražajem kontroliraju aktivnost obitelji proteaza ADAM (72). TIMP3, primjerice, služi kao inhibitor metaloproteaza ADAM17 i ADAM10. Zanimljivo je da infekcija HCMV-om rezultira smanjenjem ekspresije TIMP3, što potom dovodi do povećanog odcjepljivanja

NKG2D-liganda MICA pomoću enzima ADAM17 (73), odnosno aktivnost proteaza ADAM može podleći virusnoj manipulaciji.

Proteaza ADAM10 je nedavno identificirana kao čimbenik u stvaranju prekursora amiloida ublažavajući pretjeranu proizvodnju amiloidnog beta peptida koji je uključen u napredovanje Alzheimerove bolesti. ADAM17, još poznat kao TACE (engl. *TNF α converting enzyme*), provodi hidrolizu mnogih prekursorskih proteina na membrani među kojima je i TNF α po čemu je i dobio ime (74). Iako obje proteaze dijele mnoge supstrate, među kojima se mogu pronaći važne imunosne molekule, ADAM10 je jedina proteaza koja odcjepljuje protein PrP (57). Djelujući u blizini plazma membrane, ADAM10 sudjeluje u modulaciji aktivnosti proteina stanične adhezije i površinskih receptora (71). Uz PrP, supstrati proteaze ADAM10 u mozgu uključuju neuronsku adhezijsku molekulu NCAM (engl. *neural cell adhesion molecule*), efrine, N-kadherin i receptor Notch, a osim fiziološke funkcije, ADAM10 je uključen u procese napredovanja mnogih vrsta tumora, neurodegenerativnih bolesti i imunosnih poremećaja (75,76).

1.4. Fiziološke funkcije proteina PrP

Literaturnim pregledom može se uvidjeti da funkcija PrP-a nije singularna, već obuhvaća velik broj različitih procesa. Obzirom na pretvorbu PrP-a u prion i razvoj posljedične neurodegeneracije, funkcija proteina PrP većinom je istraživana u središnjem živčanom sustavu. Na primjer, neuroprotekcija je dobro karakterizirana funkcija ovog proteina. Kao GPI-usidreni protein na staničnoj membrani, PrP može stupati u interakcije s mnogim partnerima zbog intrinzično neuređene prirode proteinskog N-kraja. Također treba uzeti u obzir da otpuštanje fragmenata u tjelesne tekućine omogućava proteinu djelovanje u različitim tkivima, ne samo na mjestu izražaja (6). Sve je veći broj dokaza kako bi PrP mogao igrati važnu imunološku ulogu. Ne samo da se PrP ispoljava na mnogim staničnim vrstama imunosnog sustava, već se može i vezati na imunosne stanice, što sugerira na njegovo prepoznavanje od strane imunosnih receptora. Iako je ograničen broj istraživanja koje su uključivale izlaganje patogenima, svi podupiru hipotezu da protein PrP ima ulogu tijekom infekcije (28).

1.4.1. Uloga proteina PrP u središnjem živčanom sustavu

Zbog iznimne ispoljenosti proteina PrP u mnogim regijama mozga, poglavito na neuronima, prvenstveno mu se pripisuje uloga neuroprotekcije. Naime, pokazano je kako PrP štiti primarne neurone hipokampusa od stanične smrti izazvane staurosporinom što je povezano

s njegovom interakcijom s proteinom ST1 (77). Fragment N1, koji po mnogim navodima iz literature ima protektivna svojstva, također štiti od tretmana staurosporinom *in vivo* i *in vitro* kroz smanjenje p53 aktivnosti (78). Neuroprotekcija se u nekim slučajevima pripisuje aktivaciji signalnih puteva cAMP/PKA i Erk (79). PrP ujedno štiti od staničnog stresa i apoptoze izazvane nepovoljnim uvjetima i tako pospješuje preživljavanje neurona (45,80,81). Zaštitna uloga PrP-a kod oksidativnog stresa nije vezana samo uz neurone, već i uz druge vrste stanica. Naime, ispoljavanje PrP-a kako u primarnim neuronima, tako i u astrocitima i raznim staničnim linijama povezana je sa smanjenim razinama oštećenja nakon izlaganja oksidativnim toksinima poput iona metala i vodikovog peroksida. Potonje se pripisuje činjenici da je pri izostanku PrP-a aktivnost superoksid dismutaze i drugih enzima koji smanjuju reaktivne kisikove vrste značajno smanjena (82). Poznato je da protein PrP veže do šest različitih vrsta dvovalentnih metalnih iona, uključujući ione bakra i cinka, pomoću dvije različite domene s različitim afinitetima prema ionima. Mogućnost PrP-a da veže ione bakra povezana je s transmembranskim transportom bakra te zaštitom neurona (83).

Osim neuroprotekcije, smatra se da je PrP uključen u širok raspon staničnih procesa u centralnom i perifernom živčanom sustavu poput adhezije neurona, neuritogeneze, izrastanja neurita, održavanja mijelina te općenito preživljavanja stanica, a također se smatra da djeluje kao receptor za brojne ligande uključujući laminin, heparin i niz sinaptičkih proteina (6). Neuriti (engl. *neurites*) su mali izdanci na neuronima u razvoju. Na poslijetku, oni izrastaju u aksone ili dendrite pod kontrolom čimbenika iz njihove izravne izvanstanične okoline (84). Poticanje rasta te njihovo održavanje je pripisano PrP-u kroz interakciju s molekulom NCAM1, proteinom izvanstaničnog matriksa, lamininom, integrinima te raznim faktorima rasta (6,85–87). Održavanje mijelina jedan je od bitnih procesa u živčanom sustavu, a pokazalo se da u održavanju mijelina sudjeluju proteolitički odcjepljeni fragmenti PrP-a te njegova dominantna forma na površini stanice (88).

Zaključno, funkcije PrP-a u centralnom živčanom sustavu obuhvaćaju mnoge načine putem kojih se štite neuroni i omogućava neometano funkcioniranje mozga te ostalih dijelova živčanog sustava. PrP sudjeluje u mnogim procesima na staničnoj membrani, ali i u slobodnoj formi u obliku odcjepljenih fragmenata prisutnih u vanstaničnom prostoru.

1.4.2. Uloga PrP-a u imunosnom sustavu

Postoji sve više naznaka da bi PrP mogao imati ulogu u imunosnom sustavu (28,89–91), posebno u inhibiranju imunosnog odgovora u organima gdje je potrebna precizna kontrola kako

ne bi izazvao više štete nego koristi (28), prije svega u mozgu, a zatim u uterusu i testisima. Nedavna istraživanja pokazuju da PrP ne samo da se ispoljava na površini imunskih stanica, nego i utječe na njihovu funkciju (31,35,48,92,93), te se može i vezati za ove stanice, što sugerira njegovu interakciju s imunskim receptorima (94–96). Istraživanja s neurotrofnim virusima i drugim patogenima potvrđuju ulogu PrP-a u infekciji (97–99). Unatoč tome, njegova neuroprotektivna funkcija često se pripisuje isključivo utjecaju na staničnu smrt i fiziologiju stanica na kojoj je ispoljen, dok se utjecaj na imunski odgovor često zanemaruje ili podcjenjuje. Prema hipotezi našeg istraživanja, PrP može biti važna molekula čije bi proučavanje moglo doprinijeti boljem razumijevanju i smanjenju dugotrajnih oštećenja mozga uzrokovanih prirodnom HCMV-infekcijom.

Kada je riječ o specifičnim učincima ekspresije i vezanja PrP na imunske stanice, opisan je kao površinska molekula koja sudjeluje u aktivaciji limfocita (92,93), modulira aktivaciju i status razvoja hematopoetskih stanica (42), te utječe na memorijske i akutne upalne reakcije, proliferaciju stanica, adheziju i diferencijaciju putem interakcije s brojnim partnerima (100). Ispoljavanje PrP-a regulira se tijekom sazrijevanja monocita i dendritičkih stanica, gdje ostaje konstitutivno izražen (30,101). Ispitivanje imunskog odgovora u miševa bez PrP-a (PrP KO) izloženih zimosanu (engl. *zymosan*), tvari koja izaziva eksperimentalnu upalu, rezultiralo je povećanom infiltracijom monocita u usporedbi s divljim miševima, što sugerira na funkcionalnu važnost proteina PrP u imunskom odgovoru. Makrofazi iz miševa bez PrP-a pokazali su povećanu fagocitozu, iako se taj fenotip kasnije povezao i s genom koji se nalazi u blizini gena za PrP, no kodira drugi protein, Sirpa (102). Ispoljavanje PrP-a poboljšava učinkovitost prezentacije antigena u dendritičkim stanicama, potičući proliferaciju stanica T uz jači odgovor (19). Povećana razina PrP-a u neutrofilima, posredovana glukokortikoidima i TGF- β , povećava neutrofilnu citotoksičnost (48). Vezanje PrP na monocite inducira njihovu diferencijaciju u makrofage, s pojačanim prijanjanjem, fagocitnom aktivnošću, stimuliranjem proizvodnje upalnih citokina poput TNF α , IL-1 β i IL-6, te aktivacijom ERK i NF- κ B signalnih putova (95,96). Nedavna istraživanja pokazuju da vezanje PrP-a na stanice NK potiče proizvodnju citokina, kemokina, degranulaciju granzima B, te aktivaciju signalnih putova ERK i JNK (94). S obzirom na izuzetan broj vanstaničnih i transmembranskih liganda, PrP je nedavno predložen kao dinamična platforma za sklapanje signalnih modula na površini stanica (103).

Ukratko, dosad je dokumentirano da imunosne stanice izražavaju i reagiraju na PrP. Ipak, postoje ograničenja u poznavanju molekularnih puteva koje pokreće PrP, a identifikacija imunosnih receptora koji prepoznaju PrP još nije provedena.

1.5. Citomegalovirus

Citomegalovirus (CMV) pripada potporodici β -herpesvirusa. Ovaj iznimno vrsno-specifičan i široko rasprostranjen virus je u mogućnosti uspostaviti doživotnu latenciju nakon primarne infekcije (104–106). Virion CMV-a se sastoji od dvolančane molekule DNK okružene virusnom ikozaedralnom kapsidom, amorfnim proteinskim tegumentom te dvoslojnom lipidnom ovojnicom s mnogo glikoproteina. Genom citomegalovirusa najveći je od svih humanih herpesvirusa te sadrži preko 200,000 parova baza s mogućnošću kodiranja proteina od skoro 200 otvorenih okvira čitanja (engl. open reading frame, ORF) (107,108).

Životni ciklus produktivne infekcije CMV-a započinje prihvaćanjem virusnih proteina na površini ovojnice za stanične receptore i fuzijom same ovojnice sa staničnom membranom. Tada kapsida putuje do jezgre uz pomoć proteina staničnog transporta te proteina virusnog tegumenta nakon čega virusna DNK ulazi kroz jezgrene pore i poprima cirkularni oblik. U jezgri stanice domaćina odvijaju se procesi virusne transkripcije i replikacije genoma te uklapanja virusnog genoma u kapsidu (107–109). Ispoljavanje virusnih gena je fino regulirana kaskada podijeljena u tri vremenske faze: izrazito rana faza, rana faza te kasna faza (112). Svaka od ovih grupa gena regulira različite vidove infektivnog ciklusa CMV-a. Geni izrazito rane faze umnožavanja virusa utječu na stanični ciklus i proizvodnju proteina u korist virusa te reguliraju izražaj produkata gena sljedećih faza (110,113). Da bi došlo do umnažanja virusne DNK potrebni su produkti ranih gena, od kojih neki sudjeluju u izbjegavanju imunosnog nadzora (114,115). Produkti gena kasne faze obuhvaćaju strukturne proteine ovojnice i kapside virusa, odnosno to su proteini bitni za formiranje virusnih čestica i njihov izlazak iz stanice (111,112). Većina protivirusnih lijekova za liječenje i prevenciju infekcije izazvane CMV-om djeluju na način da zaustavljaju samu replikaciju virusne DNK (116).

1.5.1. Biologija i infekcija CMV-om

Pokazano je kako HCMV može inficirati i replicirati u mnogim tipovima stanica: epitelnih i endotelnih stanica, neurona, hepatocita, fibroblasta, glatkih mišićnih stanica, ali i imunosnih stanica poput fagocita i dendritičkih stanica, čime se omogućava sistemska infekcija (117). U zdravih osoba primarna infekcija uglavnom prolazi asimptomatski, ali virus

uspostavlja doživotnu latenciju te predstavlja ozbiljan rizik za imunokompromitirane osobe, najčešće pacijente koji boluju od sindroma stečene imunodeficijencije i transplantacijske pacijente (106). Iako do danas nije razvijeno cjepivo, relativno učinkoviti protuvirusni lijekovi koji uglavnom blokiraju virusnu polimerazu koriste se za ublažavanje posljedica HCMV-infekcije kod imunokompromitiranih osoba (118,119).

Infekcija CMV-om može rezultirati litičkom ili latentnom infekcijom (111,120). Litička infekcija karakterizirana je intenzivnom replikacijom virusa i posljedičnom lizom inficiranih stanica. Odnosno, u domaćina inicijalno dolazi do primarne produktivne infekcije, koja se razriješi uspostavom imunosnog odgovora u vidu i urođene i adaptivne imunosti. Sposobnost uspostave latencije jedna je od značajki obitelji herpesvirusa, iz koje se može javiti produktivna reaktivacija virusa ukoliko je imunosni odgovor oslabljen. Latencija je stanje mirovanja replikacije virusa pri čemu je kod CMV-a replikacijski sposobna DNK prisutna u jezgri stanice bez intenzivnog prepisivanja gena i sastavljanja infektivnih viriona (105,120). Glavno mjesto latencije HCMV-a je koštana srž, odnosno hematopoetske progenitorske stanice (121,122). Za razliku od herpes simpleks virusa 1 (HSV-1), gdje su specifični transkripti povezani s latencijom dobro karakterizirani (123), geni izraženi tijekom latencije CMV-a nisu specifični za latenciju, budući da se njihov izražaj opaža i tijekom litičke infekcije (121).

HCMV se prenosi horizontalno, izravnim kontaktom s tjelesnim tekućinama zaražene osobe, uključujući slinu, sjemensku tekućinu, cervikalni sekret, urin, majčino mlijeko i krv, te transplantacijom solidnih organa ili krvotvornih matičnih stanica (106,124). Od navedenih, dominantan način širenja je putem sline budući da nakon primarne infekcije virus može biti prisutan u tjelesnim tekućinama i nekoliko mjeseci (120). Osim horizontalnog prijenosa, HCMV se može prenijeti i vertikalno sa zaražene majke na plod: intrauterino (prijenosom virusa iz krvi majke kroz placentu) i perinatalno (prolaskom kroz porođajni kanal), te kroz majčino mlijeko (124–126).

1.5.2. Prirodna infekcija HCMV-om

Seroprevalencija HCMV-a procjenjuje se na 83% inficiranih diljem svijeta, s time da određene regije imaju više odnosno niže postotke. Tako se npr. za Europu procjenjuje raspon od 60%-90% (106,127). HCMV je najčešći uzročnik prirodnih virusnih infekcija s prosječnom incidencijom od 0,2-2% inficirane novorođenčadi (126,128). Slično onom u imunokompromitiranih pacijenata, prisutno je oportunističko iskorištavanje neučinkovitog imunosnog nadzora. Simptomatska infekcija je prisutna u 10% inficirane novorođenčadi.

Simptomi mogu biti blažeg oblika, no i umjerenog do težeg te obuhvaćaju sporiji intrauterini rast, anemiju, hepatosplenomegaliju sa žuticom, trombocitopeniju s petehijama, a velika većina razvija i dugotrajne abnormalnosti središnjeg živčanog sustava kao što su gubitak sluha, oštećenje vida, mikrocefalija, te mentalne i fizičke poteškoće (129,130). Iako je asimptomatska infekcija karakterizirana odsutnošću kliničkih znakova bolesti pri porodu, povećan je rizik od razvoja dugoročnih neuroloških oštećenja od kojih su senzorneuralna gluhoća i mentalna retardacija najteži poremećaji (130). Unatoč imunosti majke na HCMV prije začeća, fetalni prijenos ili razvoj bolesti ne mogu se potpuno spriječiti (126,128). Sposobnost HCMV-a da dođe do mozga, pogotovo ukoliko do infekcije dođe u drugom tromjesečju trudnoće, može dovesti do katastrofalnih oštećenja u novorođenčadi. Patogene manifestacije prirodne infekcije u mozgu većinom su uzrokovane upalnim odgovorom (131,132). Nažalost, dostupne mogućnosti protuvirusnih lijekova ograničene su zbog potencijalnih rizika za dijete u razvoju, a nedavne longitudinalne kohortne studije otkrile su da tretmani, uključujući klasične protuvirusne lijekove koji se koriste za tretman infekcije HCMV-om ganciklovir i valganciklovir, ne daju trajne koristi (133,134).

1.6. Model prirodne infekcije MCMV-om

Specifičnost CMV-a za određenu vrstu ograničava mogućnost istraživanja s HCMV-om na stanične kulture i ne-invazivne uzorke pacijenata. Stoga se za istraživanje imunobiologije i patogeneze koriste modeli laboratorijskih životinja koji odgovaraju ljudskoj bolesti što je moguće bliže. Mišji CMV je prirodni patogen u miša (lat. *Mus Musculus*), a laboratorijski miševi su već desetljećima korišteni za istraživanje sustavne infekcije CMV-om, što iz razloga sličnosti genoma humanog i mišjeg virusa pokazane sekvenciranjem (108), što zbog sličnog tijeka patogeneze virusne infekcije (135,136). Razvijanje laboratorijskih životinjskih modela za prirodnu HCMV-infekciju je predstavljalo značajan izazov. Iako neki modeli, poput zamoraca i nečovjekolikih primata, omogućuju prijenos virusa na fetus *in utero*, oni su ograničeni zbog nedostatka genetskih modela, visokih troškova i etičkih razloga (137). Posljedično, mišji modeli ostaju dominantan izbor za istraživanje CMV-bolesti, igrajući ključnu ulogu u otkrivanju mehanističkih detalja o različitim aspektima imunskog odgovora i patologije izazvane infekcijom.

Razvijeni mišji model prirodne infekcije CMV-om razlikuje se od prirodne infekcije u ljudi na nekoliko načina. Prvenstveno riječ je o putu infekcije gdje se humani virus najčešće prenosi s majke na fetus kroz samu posteljicu (128), dok u miša to nije slučaj. Budući da

transplacentarni prijenos nije moguć u mišjem modelu, novookoćeni miševi se inficiraju MCMV-om intraperitonealnim iniciranjem male virusne doze (138). Ovakav način uvelike oponaša tijek prirodne infekcije u ljudi poglavito iz razloga što je razvoj središnjeg živčanog sustava novo-okoćenih miševa istoznačan drugom tromjesečju fetusa (139) kada se i najčešće virus transplacentarno prenosi s majke na dijete (140). Širok tropizam doprinosi replikaciji velike količine virusa u raznim organima, odnosno postiže se sustavna infekcija, koja, kao što je već spomenuto, zahvaća središnji živčani sustav i dovodi do narušenog neurorazvoja.

Infekcija novookoćenih miševa karakterizirana je visokom razinom viremije, uspostavom produktivne infekcije u gotovo svim organima te pojavom snažnog imunskog odgovora (128,134,137). Možda i najbitnija karakteristika je produktivna infekcija tkiva mozga, gdje su neuralne progenitorske stanice u mozgu fetusa izrazito osjetljive na infekciju (142). Ulazak virusa u mozak moguć je samo kod mladih miševa kod kojih krvno-moždana barijera nije u potpunosti razvijena (138,141), a u odraslih miševa se infekcija središnjeg živčanog sustava jedino postiže direktnim injiciranjem virusa u tkivo mozga. U modelu prirodne infekcije MCMV-om može se pratiti priljev imunskih stanica u tkivo mozga te oštećenja koja nastaju uslijed upale izazvane infekcijom (132,143,144). Naime, primijećeno je da smanjenje upale, primjerice tretmanom glukokortikoidima (145) ili neutralizacijom TNF α (146), može spriječiti poremećaje u razvoju malog mozga, što ukazuje da upalni čimbenici igraju ključnu ulogu u manifestaciji neurorazvojnih poremećaja. Budući da mišji model dijeli mnoga obilježja patologije opažene u prirodnoj infekciji HCMV-om, novookoćeni miševi su idealan model za proučavanje imunskog odgovora prirodne infekcije.

1.7. Imunosni odgovor na infekciju CMV-om

Citomegalovirusi su razvili različite strategije za izbjegavanje imunskog odgovora, osiguravajući svoj opstanak unutar domaćina i uspostavljanje latentne infekcije. Naime, MCMV posjeduje brojne gene posvećene izbjegavanju i manipuliranju imunskog odgovora domaćina. Ti geni omogućuju virusu aktivno uklanjanje molekula koje potiču imunski odgovor, odnosno aktivno smirivanje imunskog sustava. S druge strane, zajednički doprinos različitih aspekata imunskog odgovora rezultira kontrolom i zaustavljanjem produktivne infekcije (147–149).

1.7.1. Urođeni odgovor na infekciju CMV-om

U početku se javlja urođeni imunski odgovor, primarno kroz prepoznavanje putem receptora na mononuklearnim stanicama poput monocita i makrofaga. Monociti, makrofagi i dendritičke stanice specijalizirane su za otkrivanje patogena i proizvodnju citokina (150). Dendritičke stanice, ključne u početnom imunskom odgovoru, prepoznaju viruse te pokreću aktivaciju, sazrijevanje i migraciju u sekundarne limfne organe. Tada one predočavaju virusne antigene imunskim stanicama stečene imunosti i moduliraju imunski odgovore proizvodnjom citokina, uključujući interferon tipa I (IFN- α/β) (151,152). Makrofagi, poput dendritičkih stanica, proizvode citokine kako bi spriječili širenje MCMV-a, no i sami mogu biti inficirani. Monociti, iako ključni za ranu kontrolu virusa, mogu poslužiti kao mjesta latencije virusa (122,153,154). Često nakon inficiranja mijeloidnih stanica, CMV smanjuje njihovu sposobnost prezentiranja antigena smanjenjem izražaja molekula MHC (engl. *major histocompatibility complex*) klase I i II, kao i kostimulacijskih molekula (148). Usprkos tim mehanizmima izbjegavanja, javlja se brzi odgovor stečene imunosti, poglavito limfocita T (155).

Stanice NK, limfociti urođene imunosti, su također vitalne komponente urođenog protuvirusnog imunskog odgovora. One luče interferone i direktnom citotoksičnošću uklanjaju virusom inficirane stanice (156–158). Stanice NK djeluju ovisno o zbirnoj rezultanti zaprimljenih inhibitornih i aktivacijskih signala te se potom se aktiviraju ili ne aktiviraju (156,158). Stanice NK razlikuju se u djelotvornosti protiv MCMV među sojevima miševa, pri čemu neki sojevi pokazuju prirodnu otpornost zbog snažnog odgovora NK-stanica. Naime, aktivacijski Ly49H receptor mišjih NK-stanica jedinstven je po tome što specifično prepoznaje glikoprotein mišjeg citomegalovirusa m157 (157). Ovaj receptor je prisutan u C57BL/6J soju miševa te kontrolira infekciju CMV-om u odraslih jedinki. U nezrelom imunskom sustavu novookoćenih miševa to nije slučaj, kod kojih je smanjena ispoljenost Ly49H na stanicama NK (159,160) te putem njega ne kontroliraju virusnu infekciju.

Zaključno, nakon ulaska u stanice domaćina, citomegaloviruse odmah detektira imunski sustav, pokrećući aktivaciju urođene protuvirusne virusne obrane kao što je odgovor interferona tipa I (IFN) i stanica prirodnih ubojica (NK). Ovaj urođeni imunski odgovor igra ključnu ulogu u orkestriranju učinkovitog stečenog odgovora limfocita T, uključujući citotoksične limfocite CD8 T i pomoćničke limfocite CD4 T.

1.7.2. Stečeni odgovor na infekciju CMV-om

Dok stanice urođene imunosti mogu inicijalno odgovoriti na infekciju MCMV-om i kontrolirati je u odraslim jedinkama, prijelaz u latentno stanje i zaustavljanje produktivne infekcije zahtijevaju odgovor limfocita T (122,155). O limfocitima CD8 T bit će detaljnije riječi dalje u tekstu, no važno je spomenuti i limfocite CD4 T i B. Iako su prvotno smatrani nevažnima u kontroli replikacije MCMV-a, limfociti CD4 T potrebni su za stvaranje specifičnih antitijela protiv virusa od strane limfocita B, što pomaže u kontroli širenja virusa u slučaju reaktivacije tijekom latentne faze (122,148). Također, CD4+ stanice imaju važnu ulogu u kontroli virusne replikacije u žlijezdama slinovnicama i djelomično u plućima (161,162).

1.7.2.1. Limfociti T u odgovoru na infekciju CMV

Limfociti T su ključni posrednici stečenog imunskog odgovora. Navedene stanice detektiraju strane antigene prisutne na površini inficiranih stanica ili profesionalnih predočnih stanica koje prezentiraju antigene putem MHC-I molekula. Limfociti CD8 T ostvaruju svoju funkciju kroz izravnu citotoksičnost, dok se limfociti CD4 T diferenciraju u podskupine s različitim citotoksičnim, regulatornim ili pomoćničkim svojstvima. U akutnoj fazi odgovora stečene imunosti tijekom virusne infekcije naivni limfociti T koji nose specifične T-stanične receptore (engl. *T cell receptor*, TCR) dolaze u susret sa stranim antigenima, u ovom slučaju antigenima virusa (163,164). Tada se aktiviraju i prolaze kroz brzu klonsku ekspanziju virus-specifičnih stanica. Nakon što je virus uklonjen, virus-specifične stanice T podliježu kontrakciji, a zadržava se samo mali broj stanica koje čine populaciju memorijskih limfocita T. Limfociti CD8 T djeluju putem mehanizama kao što je induciranje apoptoze ciljnih stanica otpuštanjem citotoksičnih granula koje sadrže molekule perforina i granzima, uključivanjem receptora stanične smrti ili otpuštanjem proupalnih citokina poput $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ i $TNF\beta$ (165,166). Citokini imaju različite učinke, uključujući izravnu inhibiciju virusne replikacije (167), regulaciju ispoljavanja MHC molekule kako bi se poboljšala prezentacija antigena (168) i aktivaciju drugih imunskih stanica.

Za aktivaciju naivnih limfocita CD8 T potrebna su najmanje tri signala. Prvi signal uključuje predstavljanje antigena na predočnim ili ciljnim stanicama u obliku peptida vezanog na molekule MHC-I T-staničnom receptoru (164,169). Drugi signal nastaje vezanjem liganada izraženih na predočnim stanicama s kostimulacijskim receptorom CD28, dajući neophodan signal za aktivaciju. Bez ovog kostimulacijskog signala, samo prepoznavanje antigena pomoću TCR-a dovodi do tolerancije, a ne aktivacije limfocita T (169,170). Treći signal uključuje

citokine koji pokreću diferencijaciju antigen-specifičnih limfocita T u efektorske stanice (169). Stanice koje poprime efektorsku funkciju moraju proći kroz fazu klonalne ekspanzije, nakon čega slijedi faza kontrakcije, i naposljetku, uspostava memorijske faze. Ovisno o izražaju površinskih molekula i transkripcijskih faktora, te posljedično sposobnostima stanica, memorijski limfociti CD8 T se dijele na efektorske memorijske limfocite T (T_{EM}), centralne memorijske limfocite T (T_{CM}), i tkivno-rezidentne memorijske limfocite T (T_{RM}) (155).

Karakteristično je za odgovor na infekciju CMV-om da kada limfociti CD8 T prvi put naiđu na svoj specifični antigen, prolaze kroz klonalnu ekspanziju i diferenciraju se u efektorske stanice. Tijekom ove rane faze odgovora, limfociti CD8 T mogu diferencirati u kratkoživuće efektorske stanice (engl. *short-lived effector cells*, SLEC) ili preteče memorijskih stanica (engl. *memory precursor effector cells*, MPEC). SLEC stanice su citotoksične i podliježu apoptozi tijekom faze kontrakcije, a karakterizirane su ispoljavanjem molekula KLRG1 i CD44, ali ne i CD127 na svojoj površini. Spomenuti CD127 je pak biljeg MPEC stanica zajedno s CD44, no ove stanice ne ispoljavaju KLRG1 (155,171,172). Iako je rezervoar memorijskih limfocita CD8 T relativno malen, oni pokazuju sposobnost brzog odgovora nakon ponovnog susreta s istim antigenom. U infekciji MCMV-om, limfociti CD8 T reagiraju na nekoliko virusnih epitopa, razvijajući konvencionalne i inflacijske stanice specifične za virus (155,173). Dio takvih virus-specifičnih stanica pokazuje specifičan obrazac klonalne ekspanzije, odnosno progresivno povećavaju svoj udio tijekom vremena. Ovakav inflacijski obrazac ponašanja povezan je sa slučajevima u kojima infekcija postaje latentna, gdje se virus povremeno reaktivira no u pravilu bez produktivne replikacije (173). Zanimljivo je da nakon prirodene MCMV-infekcije, u mozgu miševa udio inflacijskih virus-specifičnih limfocita CD8 T se povećava cijeli životni vijek miševa, iako se virus u tkivu više ne može detektirati već tri tjedna nakon infekcije (174).

1.7.2.2. Limfociti CD8 T u prirodnoj infekciji CMV-om

Slično opaženom u infekciji odraslih, tijekom infekcije novorođenčadi ili infekcije *in utero* urođeni odgovor javlja se neposredno po infekciji, nakon kojeg slijedi odgovor stečene imunosti.

Prirodna infekcija HCMV-om potiče snažan odgovor limfocita CD8 T, koji se pojavljuje već u 22. tjednu trudnoće (175). U mišjim modelima prirodene infekcije je pokazano kako su limfociti CD8 T vitalni za zaustavljanje replikacije MCMV-a, jer njihovo uklanjanje dovodi do smrtnog ishoda (141). Konvencionalni limfociti T specifični za epitop M45

pojavljaju se u akutnoj fazi infekcije i dosežu vrhunac između 10. i 20. dana nakon infekcije novoookoćenih miševa, a zatim se kontrahiraju (174,176). U odraslih miševa, pokazano je kako su virus-specifični limfociti T prisutni u raznim organima gdje se odvija produktivna infekcija. Naime, limfociti CD8 T iz slezene, pluća i limfnih čvorova izolirani tijekom akutne faze (ali i kronične) infekcije prepoznaju imunodominantne epitope te reagiraju na njih u obliku proizvodnje proupalnih citokina (177,178). Važno je za istaknuti da limfociti CD8 T iz slezene novoookoćenih miševa pokazuju približnu specifičnost na razne virusne epitope uočene kod odraslih miševa (176). Što se tiče funkcionalnosti, virus-specifične stanice CD8 T novoookoćenih miševa sposobne su proizvesti perforin, granzim, IFN γ , te TNF α nakon stimulacije (141,174).

1.7.3. Imunosni odgovor u mozgu nakon prirodene infekcije MCMV-om

Nakon intraperitonealne infekcije novorođenih miševa s MCMV-om, virus se može detektirati u mozgu oko 7. dana nakon infekcije, dostižući vrhunac titra između 10. i 14. dana prije nego što postupno opada i postane nemjerljiv nakon 17. dana (141,174). Dodatno, opaženo je da MCMV inficira različite rezidentne stanične vrste u mozgu, uključujući neurone i astrocite. Također, virus je histološkom analizom detektiran u različitim regijama mozga uključujući frontalni korteks, hipokampus i cerebelum (138). Prisutna histopatologija infekcije centralnog živčanog sustava vrlo je slična onoj kod ljudi, gdje se opažaju raspršena žarišta inficiranih stanica povezana s priljevom mononuklearnih stanica u mozak (131,138). Krvno-moždana barijera dopušta strogo kontrolirano kretanje molekula u tkivo, a prolaz stanica je još selektivniji i uključuje regulirane migracijske procese. Iz tog razloga stanice urođene i stečene imunosti iz cirkulacije ne prelaze krvno-moždanu barijeru ukoliko nije narušena homeostaza (29). Obzirom na očiglednu opasnost koju predstavlja infekcija mozga u razvoju, uloženi su iznimni naponi u razumijevanje imunosnog odgovora te imunopatologije koja doprinosi oštećenjima.

Nakon infekcije moždanog tkiva dolazi do snažnog upalnog odgovora, obilježenog pojačanim izražajem gena induciranih interferonom, povećanom proizvodnjom kemokina, aktivacijom rezidentnih stanica poput mikroglije i astrocita te priljevom imunosnih stanica s periferije (138,179) koje imaju konačnu ulogu u kontroli virusne replikacije i uklanjanja virusa (141).

Budući da se tijekom virusne infekcije narušava krvno moždana barijera, imunosni medijatori dovode limfocite iz cirkulacije koji infiltriraju u tkivo mozga. Mikroglija stanice

rezidentne su imunodne stanice koje se mogu pronaći u tkivu mozga pri homeostazi i stoga su prve koje reagiraju na virusnu infekciju u tkivu. Infekcija izaziva brzu aktivaciju mikroglije, rezultirajući proupalnim fenotipom M1. Naime mikroglija stanice mogu polarizirati prema već spomenutom proupalnom fenotipu, no i protuupalnom M2 fenotipu, ovisno o signalima iz okoliša. Proupalna polarizacija obuhvaća izražaj molekula MHC-I i MHC-II na njihovoj površini, a praćena je pojačanim lučenjem čimbenika nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF α) te drugih proupalnih medijatora poput IL-6 i IL-1(180). Štoviše, istraživanja su otkrila da stanice mikroglije, a do određene mjere i astrociti, otpuštaju kemokine CXCL9 i CXCL10, čime posreduju privlačenje NK-stanica i T-limfocita putem CXCR3 receptora (144,181). Priljev stanica NK je povezan s oštećenjima mozga fetusa nakon infekcije HCMV-om, a njihovo uklanjanje u mišjem modelu smanjuje neurorazvojena promijene u malom mozgu. IFN γ , kojeg između ostalog luče stanice NK i limfociti CD8 T, doprinosi patogenezi razvojnih poremećaja, kao što je cerebelarna displazija gdje se uočava zakašnjela migracija prekursora zrnatih neurona i zaostajanje vanjskog zrnatog sloja (engl. *external granular layer*, EGL). Posljedično, neutralizacija IFN γ smanjuje upalu i pridonosi normalnom razvoju i folijaciji malog mozga unatoč infekciji (181).

Kao što je spomenuto, u središnjem živčanom izostaju limfociti. Međutim, nakon virusne infekcije, virus specifični CD8 T limfociti prodiru u moždani parenhim. Navedene stanice imaju sposobnost degranulacije te proizvode IFN γ i TNF α . Ukoliko se stanice CD8 T uklone, titar virusa se povisi u jetri, slezeni i središnjem živčanom sustavu, te često rezultira smrtnim ishodom u novookoćenih miševa, što ukazuje na važnu ulogu ovih stanica u kontroli replikacije MCMV-a.

1.7.4. Topivi posrednici u prirodnoj infekciji CMV-om

Složenost CMV-infekcije uključuje dinamičnu interakciju različitih vidova imunodnog odgovora, karakteriziranu snažnom indukcijom proupalnih posrednika. Istraživanja pokazuju brzu pojavu citokina poput IL-12, TNF α , IFN γ i IL-1 α u odraslih miševa nakon intraperitonealne MCMV-infekcije (182). Istovjetan se upalni obrazac odvija i u novorođenih miševa, iako s odgođenom kinetikom (145,146,181). U prirodnoj infekciji miševa se uočava plato koncentracije IFN γ u serumu oko 8 dana nakon infekcije, sa sličnom kinetikom opaženom u mozgu (181), te sa sličnom kinetikom izmjenom za druge proupalne citokine poput TNF α i IL-6 (146). Što se tiče kemokina, povišeni izražaj CXCL9, CXCL10, CCL5 i CCL2 pokazan je u mozgu MCMV-inficiranih novookoćenih miševa (138,146,181). Kao što je već

napomenuto, u središnjem živčanom sustavu očit je snažan upalni odgovor kroz aktivaciju mikroglije, infiltraciju imunskih stanica, uz pojačan izražaj proupalnih citokina (138,181). Također, neutralizacijom IFN γ i TNF α , ili uklanjanjem, odnosno utišavanjem aktivacije stanica koje ih luče, smanjuje se upala u tkivu mozga te posljedično tome i oštećenja koja nastaju prilikom upalnog odgovora (145,146,181).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Predloženo istraživanje polazi od hipoteze da protein PrP ima ulogu tijekom prirodene infekcije citomegalovirusom, prvenstveno u mozgu. Njegova uloga je utišavanje imunskog odgovora kako bi se spriječila pretjerana oštećenja mozga izazvana imunopatologijom.

Istraživanja sugeriraju uključenost proteina PrP u modulaciju imunskog sustava, posebno u ograničavanju upalnog odgovora unutar organa koji zahtijevaju delikatnu regulaciju, poput mozga. Nedavna otkrića pokazuju da protein PrP ne samo da se ispoljava na površini imunskih stanica već i utječe na njihovu funkcionalnost putem vezanja za te stanice.

Stoga je opći cilj istraživanja odrediti imunsku funkciju proteina PrP koristeći model prirodene infekcije mišjim citomegalovirusom.

Specifični ciljevi:

1. Odrediti biologiju proteina PrP u virusom inficiranim i neinficiranim stanicama te ispitati mehanizam putem kojeg citomegalovirus utječe na biologiju proteina PrP.
2. Odrediti ulogu proteina PrP u imunskom nadzoru *in vivo*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali i kemikalije

3.1.1. Mediji otopine i puferi

U Tablici 1 nalazi se popis i sastav korištenih medija, otopina i reagensa za održavanje staničnih kultura, smrzavanje stanica, pripremu i ispiranje stanica za protočnu citometriju te određivanje titra virusa.

Tablica 1. Mediji, otopine i reagensi za stanične kulture, protočnu citometriju i određivanje titra virusa

Otopina	Sastav
Medij DMEM - Dulbeccov modificirani minimalni esencijalni medij (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle medium</i>)	Medij DMEM (Pan Biotech), 3-10% fetalni goveđi serum (engl. <i>Fetal Bovine Serum</i> , FBS, Pan Biotech), 10 mM HEPES (pH 7.2), 2 mM L-glutamin, 10 U/ml Penicilin, 0.1 g/L Streptomycin
Medij RPMI (engl. <i>Roswell park memorial institute medium</i>)	Medij RPMI (Pan Biotech), 3-10% fetalni goveđi serum (FBS, Pan Biotech), 10 mM HEPES-a (pH 7.2), 2 mM L-glutamin, 10 U/ml Penicilin, 0.1 g/L Streptomycin
Pufer za lizu eritrocita (10x)	2.7 mM kalijev klorid, 140 mM amonijev klorid, 0.7 mM kalcijev klorid, 1.5 mM kalijev dihidrogenfosfat, 6.5 mM natrijev hidrogenfosfat, H ₂ O
10x fosfatima puferirana fiziološka otopina (engl. <i>Phosphate-Buffered Saline</i> , PBS)	140 mM natrijev klorid, 2.7 mM kalijev klorid, 6.5 mM natrijev hidrogenfosfat-2-hidrat, 1.5 mM kalijev dihidrogenfosfat, 0.7 mM kalcijev klorid, 0.7 mM magnezijev klorid-6-hidrat
Izotonični Percoll (GE Healthcare)	Percoll, 10x PBS
Medij za protočnu citometriju (FACS medij)	PBS, 1% goveđi serumski albumin (engl. bovine serum albumin, BSA), 0.1% natrijev azid, 1 mM etilendiamintetraoctena kiselina
Medij za smrzavanje stanica	70% RPMI-medij, 20% fetalni teleći serum (FCS),
Medij za smrzavanje izoliranih imunskih stanica	90% fetalni teleći serum (FCS), 10% dimetilsulfoksid (DMSO)
Metil-celulozni medij	DMEM, 10% FBS, 2.2% metil-celuloza

U Tablici 2. se nalaze puferi i otopine za elektroforetsko razdvajanje proteina (SDS-PAGE) i njihovu vizualizaciju metodom Western blot i imunobojanja na membrani.

Tablica 2. Puferi i otopine za SDS-PAGE i Western blot

Otopina	Sastav
RIPA pufer za lizu stanica	25 mM Tris, 150 mM natrijev klorid, 1.0% NP-40, 1% natrijev deoksikolat, 1% natrijev dodecil sulfat (engl. <i>sodium dodecil sulfat</i> , SDS), 1 mM EDTA, inhibitori proteaza
Denaturirajući pufer za nanošenje uzoraka (engl. <i>sample buffer</i>)	4% SDS, 10% 2-merkaptetanol, 20% glicerol, 0.004% bromofenol plavilo, 0.125 M Tris HCl
Gel za razdvajanje uzoraka (10%)	30% otopina akrilamida/bisakrilamida, H ₂ O, Tris pufer (1.5 M, pH 8.8), 10% SDS, TEMED, 10% amonijev persulfat
Gel za sabijanje (4%)	30% otopina akrilamida/bisakrilamida, H ₂ O, Tris pufer (0.5 M, pH 6.8), 10% SDS, TEMED, 10% amonijev persulfat
Laemmli pufer za elektroforezu	25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS
Pufer za prijenos proteina iz gela na membranu	20 mM Tris, 150 mM glicin, 10% metanol, 0.005% SDS
Otopina za blokiranje i vezanje primarnih protutijela	5% bezmasno mlijeko, 0.02% NaN ₃ , 0.1% Tween20, PBS
Pufer za ispiranje membrane i sekundarna protutijela (TBST)	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20

U Tablici 3 se nalaze otopine i puferi koji nisu navedeni ranije.

Tablica 3. Ostale otopine i puferi

Otopina	Sastav
Pufer za ispiranje ploča kod multipleks analiza topivih medijatora	PBS, 0,1% BSA, 0,05% tween

3.1.2. Protutijela

U tablici 4 nalazi se popis protutijela korištenih u protočnoj citometriji. Uz svako protutijelo navedena je molekula koju prepoznaje (ciljani antigen), organizam iz kojeg protutijelo dolazi (domaćin), organizam na čiji je protein protutijelo specifično (specifičnost), jedinstveno ime klona ukoliko se radi o monoklonskom protutijelu te proizvođač.

Tablica 4. Popis korištenih protutijela u protočnoj citometriji

Ciljani antigen	Domaćin	Specifičnost	Klon	Proizvođač
CD3	armenijski hrčak	miš	145-2C11	Thermo Fischer Scientific
CD19	štakor	miš	eBio1D3	Thermo Fischer Scientific
NK1.1	miš	miš	PK136	Thermo Fischer Scientific
KLRG1	sirijski hrčak	miš	2F1	Thermo Fischer Scientific
IFN γ	štakor	miš	XMG1.2	Thermo Fischer Scientific
CD8	štakor	miš	53-6.7	Thermo Fischer Scientific
CD4	štakor	miš	RM4-5	Thermo Fischer Scientific
CD44	štakor	čovjek, miš	IM7	Thermo Fischer Scientific
CD16/CD32	štakor	miš	2.4G2	BD Pharmingen
TNF α	štakor	miš	MP6-XT22	Thermo Fischer Scientific
CD62L	štakor	miš	MEL-14	Thermo Fischer Scientific
Granzim B	štakor	miš	NGZB	Thermo Fischer Scientific
PrP	čovjek	miš	D18	Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati, Trst, Italija
IgG FITC	koza	čovjek	poliklonalno	Jackson Immunoresearch
IgG PE-Cy7	štakor	čovjek	M1310G05	BioLegend
PrP	miš	čovjek	HuPrP.02	Centar za proteomiku
Ig PE	štakor	miš	poloklonalno	Thermo Fischer Scientific
IgG FITC	štakor	miš	poloklonalno	Thermo Fischer Scientific

U tablici 5 nalazi se popis protutijela korištenih u Western blot metodi i imunobojanju. Kategorije su istovjetne kao u Tablici 4.

Tablica 5. Popis korištenih protutijela u Western blot metodi

Ciljani antigen	Domaćin	Specifičnost	Klon	Proizvođač
PrP	miš	Miš, čovjek	POM1	Merck Milipore
PrP	miš	miš	W226	Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati, Trst, Italija
sPrP	zec	miš	G228	Institut za neuropatologiju, Hamburg, Njemačka
PrP	miš	miš	MoPrP.03	Centar za proteomiku
PrP	miš	čovjek	3F4	BioLegend
Anti-β-aktin	zec	miš	EP1123Y	Merck Milipore
Ig POD	koza	miš	115-035-003	Jackson Immunoresearch
Ig POD	koza	zec	poliklonal	Jackson Immunoresearch
PrP	miš	čovjek	3F4	BioLegend
MCMV M57	miš	MCMV	M57.01	Centar za proteomiku
MCMV M04	miš	MCMV	m04.17	Centar za proteomiku
PVR	miš	miš	mPVR.13	Centar za proteomiku

U tablici 6 nalazi se popis protutijela korištenih u metodi konfokalne laserske pretražne mikroskopije. Kategorije su istovjetne kao u Tablici 4.

Tablica 6. Popis korištenih protutijela u metodi konfokalne laserske pretražne mikroskopije

Ciljani antigen	Domaćin	Specifičnost	Klon	Proizvođač
PrP	miš	Miš, čovjek	POM1	Merck Milipore
PrP	miš	čovjek	HuPrP.02	Centar za proteomiku
PrP	čovjek	miš	D18	Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati, Trst, Italija
PrP	čovjek	miš	D13	Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati, Trst, Italija
IgG FITC	koza	miš	poliklonalno	ThermoFisher (Invitrogen)
IgG TRITC	zec	miš	poliklonalno	BD Pharmingen
IgG FITC	koza	čovjek	poliklonalno	Jackson Immunoresearch
IgG FITC	koza	miš	poliklonalno	BD Pharmingen
MCMV IE1	miš	MCMV	IE1.01	Centar za proteomiku
HCMV IE1	miš	HCMV	E13	Argene

3.1.3. Drugi materijali

U tablici 7 nalazi se popis komercijalnih reagensa, kompleta i materijala

Tablica 7. Ostali komercijalni reagensi, kompleti i materijali

Reagensi, kompleti i materijali	Proizvođač
Akrlamid/bisakrlamid,	Alfa Aesar
Ampicilin	Amresco
β -merkaptetanol	Carl Roth
Bezmasno mlijeko u prahu	Roche
Brefeldin A	Thermo Fischer Scientific
DMSO	Kemika
Dynabead	Thermo Fischer Scientific
EDTA	Carl Roth
Fetalni govedi serum (FBS)	Pan Biotech
Fiksirajuća boja za detekciju živih stanica eFluor780 (<i>engl. fixable viability dye eFluor 780, FVD</i>)	Thermo Fischer Scientific
GI254023X	Merck Milipore
Glicin	ROTH
Komplet Hematoksin	Epredia
Inhibitori proteaza cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Krioepuvete	Greiner Bio-One GmbH
Komplet za određivanje koncentracije proteina, Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific
Komplet kemikalija za kemiluminescentnu detekciju	GE Healthcare
Komplet otopina za fiksaciju i permeabilizaciju stanica	Thermo Fischer Scientific
Komplet otopina za fiksaciju i permeabilizaciju, Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set	Thermo Fischer Scientific
Komplet kemikalija za kemiluminescentnu detekciju	GE Healthcare
Komplet za stimulaciju s dodatkom inhibitora transporta, eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors) (500X)	Thermo Fischer Scientific
Komplet za stimulaciju, eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail (500X)	Thermo Fischer Scientific
Komplet „Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kit“	10x Genomics
Komplet ProcartaPlex™ Mouse Immune Monitoring Panel 48-Plex, EPX480-20834-901	Thermo Fischer Scientific
Komorica za pripremanje GEM-ova (Chromium Next GEM Chip G Single Cell Kit)	10x Genomics
Leupeptin	Sigma-Aldrich
Laktacistin	Sigma-Aldrich
Marker veličine proteina za Western blot	Thermo Fischer Scientific
Mowiol	Sigma-Aldrich
Natrijev deoksikolat, Na-DOC	Sigma-Aldrich
Nitrocelulozna membrana	Amersham, Life sciences
Opti-MEM (<i>engl. Minimal Essential Medium, MEM</i>) medij, medij reduciranog sastava seruma (<i>engl. Reduced Serum Medium</i>)	Gibco
Pufer za lizu Procartaplex™	Thermo Fischer Scientific
SPRIselect	Beckman Coulter
TEMED	AppliChem Panreac
Trikloroctena kiselina, 10 %	CarlRoth
Tripansko modrilo	Biological Industries
Trypsin	Sigma Aldrich

U istraživanju odgovora limfocita CD8 T korišteni su MHC I- restriktivni tetrameri MCMV M45 i MCMV M57 (Tablica 8).

Tablica 8. MHC I- restriktivni tetramer MCMV

Antigen	Epitop	MHC	Proizvođač
MCMV M45	985-993 HGIRNASFI	H-2D(b)	NIH Tetramer Core Facility
MCMV M57	816-824 SCLEFWQRV	H-2D(b)	NIH Tetramer Core Facility

3.2. Metode

3.2.1. Stanične linije

U izradi ovog rada korištene su sljedeće stanične kulture: MEF stanice mišjih embrijskih fibroblasta (*engl. Mouse embryonic fibroblast*) porijeklom iz BALB/c, C57BL/6J te PrP KO miševa, HFF stanice humanih fibroblasta (*engl. Human foreskin fibroblasts*). Također su korištene mišje trajne stanične linije: N2a (stanice neuroblastoma), DC2.4 (dendritičke stanice), NIH 3T3 (fibroblasti), SVEC4-10, (endotelne stanice).

3.2.1.1. Izolacija i uzgoj primarne kulture MEF stanica

Mišji embrionalni fibroblasti porijeklom iz soja BALB/c, C57BL/6J ili PrP KO uzgajani su u DMEM-mediju s 3% FBS-a. MEF-stanice dobivene su žrtvovanjem 17 dana skotnih ženki miševa po protokolu iz literature. Ukratko, fetus životinja se izvade sterilno u posudu s PBS-om na ledu, odvoje od placente te im se uklone trbušni organi. Potom se homogeniziraju usitnjavanjem škaricama i pasiranjem kroz sterilne metalne mrežice. Ovako dobiven homogenat miješa se magnetnom miješalicom uz prisustvo tripsina na 37°C. Svakih trideset minuta supernatant se izdvoji, a talogu se dodaje svježi tripsin. Skupljeni supernatant se centrifugira te se talog resuspendira u 3% DMEM-mediju. Ovaj postupak se ponavlja 3-4 puta nakon čega se stanice rasporede u Petrijeve zdjelice u količini od 10⁶ stanica/ml i inkubiraju na 37°C. Ovako pripremljene stanice mogu se koristiti u pasažama od 2 do 6 ili smrznuti za daljnju upotrebu.

3.2.1.2. Uzgoj trajnih staničnih linija

DC2.4 stanična linija je uzgajana u RPMI-mediju s 10% FBS-a, N2a stanična linija u MEM-mediju s dodatkom 5% FBS-a i neesencijalnih aminokiselina, NIH 3T3 i SVEC4-10 stanične linije su rasle u DMEM-mediju s 10% FBS-a.

3.2.1.3. Održavanje staničnih kultura i linija

Sve stanične linije uzgajane su u staničnom inkubatoru s 5% CO₂ na 37°C. Rast linija svakodnevno je povjeravan mikroskopom, a stanice su presađivane kada bi postigle 70%-tnu gustoću. Prilikom presađivanja, za odvajanje adherentnih stanica od podloge korišten je tripsin u kojem su stanice ostavljane nekoliko minuta. Djelovanje tripsina zaustavljano je dodavanjem odgovarajućeg medija suspenziji, nakon čega su stanice centrifugirane 5' na 1500 rpm te resuspendirane u odgovarajućem broju u svježem mediju. Presađivanje neadherentnih stanica provedeno je njihovim prikupljanjem, centrifugiranjem i resuspendiranjem u svježem mediju. Sve stanične linije održavale su se u odgovarajućim uvjetima prema uputama „American Type Culture Collection“ (ATCC).

3.2.1.4. Krioprezervacija i odmrzavanje staničnih linija

Smrzavanje stanica se provodilo na način da su stanice, prikupljene na način opisan u odlomku 3.2.1.3., nakon centrifugiranja resuspendirane u mediju za smrzavanje, prenijete u plastične epruvete za smrzavanje (krioeprovete) te pohranjene na -80°C. U slučaju dužeg čuvanja, tako pripremljene stanice su prenijete u tekući dušik.

Neke od korištenih staničnih kultura su čuvane zamrznute na -80° C u mediju za smrzavanje. Pri odmrzavanju, započelo se zagrijavanjem u vodenoj kupelji na 37°C. Zatim se stanice ispiru s 30 ml MEM-medija (minimalni esencijalni medij, engl. *minimal essential medium*). Potom se suspenzija stanica centrifugira na 1500 rpm, 5 minuta, na sobnoj temperaturi kako bi uklonili medij za smrzavanje. Nakon uklanjanja supernatanta, pelet stanica se resuspendira u prethodno zagrijanom mediju. Ovisno o staničnoj kulturi koristi se medij koji im odgovara za uzgoj.

3.2.1.5. Određivanje broja stanica

Broj i vijabilnost stanica određivan je bojenjem stanica s tripanskim modrilom i brojanjem u Neubauerovoj komorici pri čemu žive stanice ostaju nebojane. Ukupan broj stanica određen je množenjem srednje vrijednosti broja stanica po kvadrantu komorice s korektivnim faktorom 10 000, faktorom razrjeđenja u tripanskom modrilu i ukupnim volumenom uzorka.

3.2.1.6. Proizvodnja virusa

Pripravci virusa korištenih u pokusima umnoženi su u kulturi BALB/c MEF-a inficiranim virusom u dozi od 0.01 infektivnih jedinica virusa (engl. *plaque forming unit, PFU*)

po jednoj stanici. Tako inficirane stanične kulture inkubirane su u odgovarajućim uvjetima (37°C, 5% CO₂, 90% vlažnost) kroz 5 do 6 dana. Supernatant se zatim skupio, a dobiveni virus se prikupio na način kako je to prethodno opisano (183). Virusi su se potom razdijelili u alikvote od 25 µl i do uporabe pohranili u hladnjak na -80°C.

3.2.1.7. Infekcija stanica

Odgovarajuće stanične linije navedene u odlomku 3.2.1., inficirane su različitim virusima MCMV-a u dozi od 1,5-3 PFU/stanici (ovisno o staničnoj liniji) uz centrifugalno povećanje infekcije ili infekcijom u suspenziji s visokom koncentracijom stanica, na taj način osiguravajući visok postotak inficiranih stanica. Prvi način infekcije uključivao je prebrojavanje stanica nekoliko sati prije infekcije koje su se ovisno o samom eksperimentu dodale ili u Petrijevu zdjelicu ili u ploču s jažicama (6-, 12-, 24-jažična ploča). Kada su se stanice pričvrstile za površinu, uklonio se medij i na stanice dodao prethodno pripremljen virus u minimalnom volumenu odgovarajućeg medija. Stanice su se zatim inkubirale 30 minuta pri 37°C u atmosferi s 5% CO₂ uz povremeno lagano miješanje. Nakon toga, stanicama se nadodao medij u volumenu koji je optimalan za njihov rast te je uslijedilo centrifugiranje 30 minuta na 800 g na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja, stanice su inkubirane 2-24 sati na 37°C u atmosferi s 5% CO₂ (ovisno o potrebama eksperimenta). Infekcija u suspenziji je provedena na način da se prije same infekcije određeni broj stanica resuspendira u malom volumenu virusne suspenzije (10000 stanica/µl medija) i inkubira 60 min na 37°C uz povremeno miješanje nakon čega se stanicama dodaje odgovarajući medij do konačnog volumena potrebnog za prijenos u 6-jažične ploče ili Petrijeve zdjelice. Infekcija s HCMV-om je provedena kao s MCMV-om, 0,5 PFU/stanici s inkubacijom od 48 sati.

3.2.1.8. Protočna citometrija staničnih linija i kultura

Za bojanje stanica korišteno je $1 \cdot 10^6$ stanica po uzorku raspoređenih u ploče s 96 jažica s okruglim dnom. Prije površinskog bojanja, stanice su isprane u FACS-mediju te su na stanice dodana direktno obilježena ili neobilježena primarna protutijela te boja za određivanje živih i mrtvih stanica (FVD). Nakon inkubacije 25 minuta na ledu i ispiranja 2x u FACS-mediju, stanicama su dodana sekundarna, fluorescentno obilježena protutijela ili drugi reagensi dodatnih 25 minuta. Obojane stanice isprane su 2 puta u FACS-mediju, resuspendirane u 200 µL istog medija te analizirane na protočnom citometru FACS Aria (BD Bioscience).

3.2.1.9. Tretman stanica inhibitorima

U pojedinim pokusima stanice su tijekom infekcije tretirane inhibitorima različitih staničnih puteva, koji su dodavani u odgovarajući stanični medij 4 h nakon infekcije: leupeptin u koncentraciji 75 µg/ml, laktacistin konačne koncentracije 10 µM te Brefeldinom A po preporuci proizvođača. U pokusima zaustavljanja proteolitičkog cijepanja proteina PrP, stanice su tijekom infekcije tretirane inhibitorom GI 254023X (dalje u tekstu GI) koji je dodan u stanični medij Opti-MEM nakon infekcije u 6-jažičnim pločama. Inhibitor GI je pripremljen u mediju u koncentraciji od 3 µM.

3.2.2. Virusi

U pokusima je korišten virus MCMV dobiven iz umjetnog bakterijskog kromosoma (engl. *bacterial artificial chromosome*, BAC) pSM3fr (C3X), temeljen na divljem tipu MCMV-a soj Smith (ATCC VR-1399), koji je ekvivalentan divljem tipu MCMV-a Smith soja (184), rekombinantni MCMV kojem je uklonjen gen *m138* ($\Delta m138$ -MCMV), te rekombinantni MCMV kojem je uklonjen gen *m157* ($\Delta m157$ -MCMV). Za humane stanice je korišten HCMV-soj TB40/E.

3.2.3. Mišji sojevi

U ovom istraživanju korišteni su sojevi miševa PrP KO (ZurichIII/ZurichIII) i C57BL/6J uzgojeni u Centru za uzgoj i inženjering laboratorijskih miševa (LAMRI) Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Rijeci. Miševi su držani u posebnim uvjetima SPF (engl. *specific pathogen free*), individualno ventiliranim kavezima (engl. *individually ventilated cages*, IVC), uz prosječnu temperaturu zraka od 23°C, vlažnost od 55%, režim od 12 sati svjetlosti i 12 sati mraka te konstantno dostupnu hranu i vodu. U istraživanju su korištene životinje starosti između 8 i 12 tjedana te novo-okoćeni miševi.

Etički aspekti istraživanja na eksperimentalnim životinjama: Korištenje laboratorijskih životinja provođeno je u skladu s važećim Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/06, 37/13, 125/13), Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe te bioetičkim standardima o provođenju pokusa na laboratorijskim životinjama (izbjegavanje nepotrebnih pokusa i patnje laboratorijskih životinja). Poseban naglasak stavljen je na tzv. 3R pristup koji podrazumijeva: a) zamjenu korištenja životinja u pokusima drugim metodama gdje god je to moguće (engl. *replacement*), b) smanjenje broja životinja (engl. *reduction*) i c) oplemenjivanje

postupaka prema životinjama (engl. *refinement*) u skladu s Europskom direktivom 2010/63/EU. Provođenje pokusa odobreno je od strane Ministarstva poljoprivrede i Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane te Povjerenstva za dobrobit životinja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci u sklopu projekta: HR-POK-004.

3.2.3.1. Infekcija životinja virusom

Odrasli miševi inficirani su intraperitonealno (i.p.) virusom divljeg tipa ili $\Delta m157$ -MCMV u dozi od $2-5 \times 10^5$ PFU po mišu. Odgovarajuća količina virusa pripremljena je u ukupnom volumenu od 500 μ L PBS-a po mišu. Novo-okoćene životinje inficirane su intraperitonealno virusom divljeg tipa 1 dan nakon okota u dozi od 400 PFU/mišu u 50 μ L PBS-a ili DMEM-medija (185).

3.2.3.2. Uklanjanje populacija imunskih stanica

Uklanjanje populacija imunskih stanica vršilo se putem protutijela. Stanice CD8 T su uklonjene i.p. injekcijom 50 μ g anti-CD8 (YTS 169.4, BioXcell) pripremljenog u 50 μ l sterilnog PBS-a. Tretman miševa se vršio od 4. post-natalnog dana svaka tri dana do žrtvovanja.

3.2.3.3. Žrtvovanje životinja, prikupljanje i procesuiranje organa

Životinje se usmrćuju cervikalnom dislokacijom ili anesteziranjem ovisno o dobi. Odrasli miševi podliježu cervikalnoj dislokaciji. Tada ih se ispere dezinficijensom i 70%-tnim etanolom i položi u sterilnu radnu komoru na pripremljenu radnu površinu. Mladi miševi (do 3 tjedna starosti) se anesteziraju anestetikom i dezinficiraju kako je prethodno opisano. Za prikupljanje organa se koristi sterilni kirurški pribor tako da set škara i pinceta koje se koriste za uklanjanje vanjskog materijala ne dolazi u dodir s organima, te se između žrtvovanih jedinki pribor sterilizira uranjanjem u etanol i paljenjem na plameniku. Za rad s novo-okoćenim miševima koristi se poseban pribor za kojeg vrijedi isti postupak sterilizacije.

Ovisno o daljnjim eksperimentima organi se različito prikupljaju i procesuiraju. Za titraciju, pripreme se dvo-mililitarske sterilne epruvete ispunjene s 1 ml čistog DMEM-a koje se čuvaju na ledu ili +4°C. Organi se urone u medij u epruvete koje se nalazi na hladnome. Za izolaciju stanica za protočnu citometriju organi se protiskuju kroz filter mrežicu uz pomoć tučaka i nadodavanja tekućine medija. Narednim centrifugiranjem se uklone stanični otpadci te se radi daljnja izolacija željenih stanica. Za morfolometrijsku analizu uzorci mozga su sakupljeni u komorice i fiksirani u 4% paraformaldehidu 24 sata na sobnoj temperaturi. Potom su procesuirani u aparatu histokinet (Leica TP1020) sljedećih 18 sati. Nakon toga uzorci su

stavljani 2 x 1 sat u parafin (56°C-58°C) i uklopljeni u parafinske blokove. Pripremljeni blokovi rezani su pomoću aparata mikrotom (Microtome HM340E) na rezove debljine 3-5 µm. Tkivni rezovi su preneseni na silanizirana stakalca te pušteni da se osuše preko noći u inkubatoru na 37°C. Nakon sušenja, tkivni rezovi su pohranjeni na +4°C do daljnje uporabe. Tkivo mozga, slezene i jetre sakupljeno je u krioepruvete, izvagano, brzo zamrznuto uranjanjem epruvete u tekući dušik i pohranjeno na -80 °C do daljnje obrade.

3.2.4. Metode u analizi tkiva i stanica *ex vivo*

3.2.4.1. Određivanje virusnog titra u organima

Količina virusa u organima inficiranih životinja određena je standardnom metodom testa virusnih čistina u homogenatima organa (185). Organi inficiranih miševa pohranjeni su u epruvete s 1 ml kompletnog DMEM-medija s dodatkom 3% FCS-a i zamrznuti na -20°C. Nakon odmrzavanja, tkivo je homogenizirano korištenjem metalnih kuglica i automatskog sustava za homogenizaciju (MillMix 20, Tehtnica). Homogenat se zatim razrijedi 200, 2000, 20000 i 200000 puta u kompletnom DMEM-mediju s dodatkom 3% FCS-a. Iz ploča sa 48 jažica koje su obložene MEF-om uklonjen je višak medija te je nanoseno po 100 µL odgovarajućeg razrjeđenja homogenata u duplikatu. Ploče su zatim inkubirane 30 min na 37°C uz 5% CO₂, centrifugirane 30 min na 2100 rpm, te ponovno inkubirane 30 min na 37°C uz 5% CO₂. Potom je u svaku jažicu dodano oko 0,5 mL metil-celuloznog medija. Nakon 3 dana inkubacije na 37°C uz 5% CO₂ pomoću invertnog mikroskopa prebrojane su virusne čistine u svakoj jažici. Ploče se potom inkubiraju 3-4 dana, do brojanja virusnih plakova. Broj virusnih čistina izračuna se prema broju čistina u odgovarajućim razrjeđenjima homogenata organa s donjom razinom detekcije od 100 PFU/organu.

3.2.4.2. Izolacija imunskih stanica iz organa i krvi

Analiza populacija imunskih stanica iz neinficiranih i inficiranih životinja *ex vivo* kao i njihova sposobnost lučenja citokina određena je metodom protočne citometrije (protočni citometar FACSaria, BD Bioscience, San Jose, CA). U *ex vivo* analizama korištene su stanice dobivene iz slezene i jetre neinficiranih i inficiranih životinja. Stanice iz jetre i slezene pripremljene su prema standardnim protokolima [34]. Ukratko, organi su homogenizirani protiskivanjem kroz stanično sito uz ispiranje s 10 mL medija RPMI s dodatkom 3% FCS-a. Uzorci su zatim centrifugirani 5 min na 1500 rpm. Za izolaciju limfocita iz slezene, stanični talog je zatim resuspendiran u 5 mL pufera za lizu eritrocita te inkubiran 5 min na ledu. Učinak

pufera za lizu eritrocita neutraliziran je dodatkom 10 mL medija RPMI s dodatkom 3% FCS-a. Zatim je slijedilo centrifugiranje 5 min na 1500 rpm te je talog resuspendiran u 10 mL medija RPMI s dodatkom 3% FCS-a, prosijan kroz stanično sito te je određen broj stanica. Za izolaciju limfocita iz jetre, stanični talog je resuspendiran u 5 mL 40% Percolla te je stanična suspenzija naslojena na 80% Percoll i centrifugirana 25 minuta na 1800 rpm uz smanjenje brzine. Stanice u interfazi sakupljene su, isprane dodatkom 5 mL medija RPMI s dodatkom 3% FCS-a te je određen broj stanica. Ukoliko su stanice korištene za funkcionalne testove resuspendirane su u mediju RPMI s dodatkom 10% FCS-a, dok su za fenotipsku analizu metodom protočne citometrije resuspendirane u FACS-mediju. Broj stanica je određen kako je to opisano u odjeljku 3.2.1.5.. Izolacija imunskih stanica iz krvi je provedena tako da se krv sakupljala u epruvice od 1,5 ml u koje je pripremljeno 500 μ l 2mM EDTA kako ne bi došlo do zgrušavanja. Stanice su dalje obrađivane kao što je to opisano za stanice slezene s razlikom da se liza eritrocita vršila dva puta, a po potrebi i ponavljala sve dok vidno nisu uklonjeni eritrociti.

3.2.4.3. Fenotipska i funkcionalna analiza imunskih stanica protočnom citometrijom

Fenotipska analiza imunskih populacija i drugih parametara ispitanih u ovom radu napravljena je korištenjem protutijela navedenih u Tablici protutijela 4. Ukratko, za bojanje stanica korišteno je $1-2 \cdot 10^6$ stanica po uzorku raspoređenih u ploče s 96 jažica s okruglim dnom. Prije površinskog bojanja, stanice su isprane u FACS-mediju. Na stanice su dodana direktno obilježena primarna protutijela za karakterizaciju imunskih biljega te boja za određivanje živih i mrtvih stanica (FVD). Obojane stanice isprane su 2 puta u FACS-mediju, resuspendirane u 200 μ L istog medija te analizirane na protočnom citometru FACSAria (BD Bioscience). Kod bojanja imunskih stanica, kako bi se izbjeglo nespecifično vezanje protutijela na stanične Fc-receptore, stanice su prvo inkubirane 20 minuta na ledu s 2.4G2 protutijelom specifičnim na CD16/32, a potom bojane kako je opisano. U slučaju karakterizacije virus-specifičnih stanica, stanicama su dodani tetramerski kompleksi prije bojanja primarnim protutijelima, nakon čega su oprane u mediju i dalje bojane kako je to opisano. Kod ispitivanja vezanja solubilnog PrP-a, stanicama je dodan mPrP-hFc ili izotipska kontrola (hPVR-hFc) u količini od 5 μ g po uzorku pripremljenom u FACS mediju. Nakon toga, stanice su isprane dva puta u FACS-mediju te bojane sa sekundarnim protutijelom za detekciju vezanog PrP-a preko njegovog hFc biljega, a dalje su stanice bojane primarnim protutijelima za karakterizaciju imunskih biljega kako je to već opisano.

Za unutarstanično bojanje citokina, stanice su prvo 4 h inkubirane u 10% RPMI-mediju uz prisustvo otopine za stimulaciju s dodatkom inhibitora transporta, u koncentracijama prema preporuci proizvođača. Nakon toga, stanice su obojane površinski kao što je prethodno opisano, fiksirane inkubacijom u otopini za fiksaciju stanica za unutarstanično bojanje 30 minuta na sobnoj temperaturi te su im dodana protutijela na citokine u otopini za unutarstanično bojanje. Nakon inkubacije 25 minuta na ledu, stanice su isprane u istoj otopini, resuspendirane u FACS-mediju te analizirane protočnim citometrom. U slučaju unutarstaničnog bojanja citokina nakon inkubacije u prisutstvu PrP-a, uz otopinu za stimulaciju s dodatkom inhibitora proteina dodan je hPrP-hFc ili izotipska kontrola (hPVR-hFc) u količini od 5 µg po uzorku, a dalje su stanice bojane kako je to u ovom odlomku opisano. Za analizu podataka korišten je FlowJo program (FlowJo Tree Star, Ashland, USA).

3.2.4.4. Morfometrijska analiza i imunohistokemijsko bojanje

Za morfometrijske analize malog mozga, miševi su žrtvovani 8 dana nakon infekcije i tkivo mozga je prikupljeno po postupku opisanom u odjeljku 3.2.4.3.. Serijski sagitalni presjeci (debljine 3 µm) obojeni su kretil ljubičastom. Mjerenje debljine vanjskog zrnatog sloja malog mozga provedeno je na osam točaka duž primarne fisure malog mozga na svakom desetom stakalcu. Slike preparata dobivene su pomoću DP 71 digitalne kamere montirane na Olympus BX51 mikroskopu. Debljina vanjskog zrnatog sloja malog mozga mjerena je koristeći računalni softver za morfometrijske analize Cell-Sens Dimension (Olympus) te izražena kao srednja vrijednost dobivenih rezultata po životinji. Imunohistokemijska analiza mikroglije provedena je na parafinskim rezovima mozga koristeći protu-mišje IBA-1 protutijelo specifično za mikrogliju. Vezanje protutijela vizualizirano je pomoću kozjeg protu-zečjeg IgG protutijela konjugiranog peroksidazom te kromogena 3,3'-diaminobenzidina. Stakla su zatim kontrastirana hematoksilinom.

3.2.4.5. Priprema uzoraka i RNK-sekvenciranje na razini jedne stanice (engl. *single cell RNA sequencing*, scRNAseq) i analiza podataka

Imunosne stanice izolirane su iz slezene 14 dana inficiranih i naivnih miševa sojeva C57BL/6J i PrP KO kako je to opisano u odjeljku 3.2.4.2. Nakon brojanja, stanice su kriokonzervirane u fetalnom govedem serumu (FBS) dopunjenom s 10% DMSO na -80°C. Nježno otopljeni uzorci potom su bojani fiksirajućom bojom za određivanje živih stanica i protutijelima konjugiranim s fluorokromom, a živa ciljana populacija sortirana je pomoću

MoFlo EQ Astrios (Beckman Coulter) uređaja za FACS. Limfociti CD8 T su određeni kao populacija FVD-CD45.2+CD3+CD19-CD8+, a stanice NK kao FVD-CD45.2+CD3-CD19-NK1.1+. Koristili smo 10 000 stanica po uzorku za analizu u omjeru stanica CD8 T : NK - 9:1. Izolacija RNK i konstrukcija knjižnice transkripata provedene su u skladu s uputama proizvođača za korištenje kompleta „Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kit“. Ukratko, gel kuglice u emulziji (engl. *gel bead-in-emulsion*, GEM) pripremljene su korištenjem komorice za pripremanje GEM-ova (Chromium Next GEM Chip G Single Cell Kit) tako da se uzorak stavio u komorice i inkubirao. Nakon toga slijedila je reverzna transkripcija GEM-pripremljenih uzoraka da bi se dobila komplementarna DNK (cDNK). Početnica za sekvenciranje Illumina TruSeq Read 1 jedinstveni molekularni identifikator (UMI), sekvenca poli(dT) i barkod 10x dodani su uzorcima kroz kuglice gela. Barkodirana cDNK pune duljine proizvedena je iz poli-adenilirane mRNK, pročišćena je pomoću kuglica Dynabeads. Zatim je cDNK umnožena i ponovno pročišćena, ovaj put koristeći SPRIselect za odabir odgovarajuće veličine fragmenata. Knjižnica je sekvencionirana na uređaju NovaSeq6000 S4 (Illumina) s 20 000 očitavanja po stanici, stvarajući do 1400 M očitanih sekvenci. Mapiranje genoma i generiranje matrice brojanja napravljeni su prateći „10X Genomics Cell Ranger pipeline“ (v6.0.1) s referentnim genomom refdata-gex-mm10-2020-A. Skupovi podataka scRNA-seq obrađeni su pomoću Seurata V3 u R programu (186). Stanice s više od 10% udjela mitohondrijskih gena, manje od 500 detektiranih gena i manje od 1000 UMI su odbačene. Na temelju ispoljavanja markera gena i singleR oznake, prilikom analize populacija CD8 T, stanice koje ne odgovaraju T-stanicama također su odbačene. Normalizacija je provedena pomoću funkcije SCTransform Seurat s 2500 varijabilnih značajki i regresijom na mitohondrijskoj frakciji. Stvaranje UMAP-a i klasteriranje izvedeno je prema Seurat tijekom rada s prvih 30 PC. Svih 5 uzoraka spojeno je pomoću Seurat funkcije spajanja. Dva replikata (PrP-KO-MCMV) u potpunosti su se preklapala, sugerirajući da nisu bile potrebne ispravke ili integracije podataka.

3.2.4.6. Multipleks analiza topivih medijatora metodom Luminex®

9 ili 14 dana nakon infekcije, miševi su žrtvovani te su prikupljeni organi po postupku opisanom u odjeljku 3.2.4.3.. Kriokonzervirani organi lizirani su pomoću pufera za lizu Procartaplex™ i homogenizirani pomoću čeličnih kuglica (3 × 30 s pri frekvenciji 2,5) u homogenizatoru. Količina od 500 uL pufera za lizu je dodana na 100 ug tkiva. Proteini tkiva su kvantificirani korištenjem kompleta ProcartaPlex™ Mouse Immune Monitoring Panel 48-Plex prema uputama proizvođača (EPX480-20834-901). Ukratko, DropArray ploče s 96 jažica

blokirane su s 1% BSA tijekom 30 minuta. Uzorci su razrijeđeni 1:2. Nakon blokiranja, dodano je 10 µL prethodno izmiješanih kuglica, a zatim 10 µL uzoraka, kontrola ili standarda po jažici, čemu je slijedila inkubacija u trajanju od 2 sata. Nakon toga dodano je 5 µL protutijela za detekciju po jažici te su ploče inkubirane na miješalici 30 minuta. Zatim je dodano 10 µL streptavidin-PE uz inkubaciju od 30 minuta na miješalici. Naposljetku je dodano 15 µL pufera za očitavanje po jažici te su uzorci prebačeni na ploče za očitavanje rezultata. Između koraka inkubacije, ploče su isprane puferom za ispiranje tri puta na stanici za pranje DropArray LT210 MX (Curiox Biosystems, Woburn, MA, SAD). Uzorci su očitani instrumentom Bio-Plex200™ (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) u 70 µL pufera za očitavanje (187). U analizu su uključene vrijednosti koje je softver instrumenta za očitavanje rezultata automatski ekstrapolirao. Kada je više od polovice uzoraka u rezultatima inficirane skupine miševa bilo ispod granice detekcije i prikazano kao "OOR< " (engl. *out of range below*), smatralo se da nisu mjerljivi. S obzirom na to da mnogi proupalni citokini nisu prisutni u zdravim tkivima bez povoda, uzorci naivnih miševa dodijeljena je vrijednost 0 u slučaju "OOR<", tako da se statistička analiza ipak može provesti. "OOR>" (engl. *out of range above*), dodijeljena je vrijednost uzimanjem najveće mjerljive vrijednosti analita na ploči koja je onda množena s 2 (188,189).

3.2.5. Biokemijske metode i mikroskopija

3.2.5.1. Priprema staničnih lizata

Stanice se prikupe na način opisan u odjeljku 3.2.1.3.. Uzorke stanica se centrifugiralo na 1500 rpm, 5 minuta, pri sobnoj temperaturi. Dobiveni talog se resuspendirao u PBS-u kako bi se stanice isprale. Zatim ponovno slijedi centrifuga pri istim parametrima. Uklanjanjem supernatanta, preostalom talogu stanica dodao se RIPA pufer za lizu stanica. Liza stanica traje 20 minuta te se uzorci drže na ledu uz povremeno protresanje. Slijedi centrifugira 20 minuta na 13000 rpm, 4°C. Sada se u supernatantu nalaze proteini za daljnju analizu te ih se pohranjuje na -20°C.

3.2.5.2. Određivanje koncentracije proteina u lizatima

Koncentracija proteina određena je korištenjem komercijalno dostupnog kompleta (BCA kit) koji koristi BSA-standard, prema uputama proizvođača.

3.2.5.3. Natrijdodecil sulfat poliakrilamidna gel-elektroforeza (engl. *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel-electrophoresis, SDS-PAGE*)

U svrhu Western blot analize i imunodetekcije proteini se razdvajaju SDS-PAGE-om pomoću sustava Hoefer pri 30 mA, 300 V, 1-2 h. Ukratko, 50 µg lizata prvo je denaturirano zagrijavanjem 5 minuta na 95°C u puferu za nanošenje uzoraka u ukupnom volumenu od 45 µl. Nakon toga, lizat je kratko centrifugiran kako bi se istaložili neotopljeni proteini i ostaci staničnih membrana, ohlađen na ledu te nanesen u jažicu sabijajućeg gela korištenjem Hamilton igle. Prethodno se pripremi 12% poliakrilamidni gel za razdvajanje te 4% poliakrilamidni gel za sabijanje uzoraka. Za određivanje veličine proteina korišten je proteinski standard. Elektroforeza je provedena u sustavu za elektroforezu pri konstantnom naponu od 300 V, dok se jačinu struje pomjerilo na 70 mA ukoliko se provodi na dva gela istovremeno. Korišten je pufer za elektroforezu pripremljen razrjeđivanjem 100 ml koncentrirane otopine pufera s 900 ml destilirane vode. Vremensko trajanje elektroforeze je ovisilo o dolasku fronte do kraja gela (obično oko 90 min).

3.2.5.4. Western blot

Nakon završetka elektroforeze, gel se prebaci u puferu za transfer, a u međuvremenu se pripremi nitrocelulozna membrana aktivacijom u metanolu, nakon čega slijedi ispiranje u destiliranoj vodi i naposljetku namakanje u puferu za transfer. Gel i membrana su složeni između filter papira te umetnuti u držače koji se zatim stavljaju u kadicu za Western blot tako da negativni proteini putuju prema pozitivnoj elektrodi, a između se nalazi membrana na kojoj će proteini zastati. Transfer je proveden na 80V, 400 mA, 75 minuta. Nakon prijenosa proteina na membranu, traženi proteini su detektirani pomoću protutijela. Ukratko, membrana je prvo inkubirana 30 minuta u puferu za blokiranje nespecifičnog vezanja, a zatim joj je, u istom puferu, dodano primarno protutijelo. Komercijalna protutijela su dodana u omjeru sukladno uputama proizvođača, a vlastita protutijela koncentracije 1 mg/ml u omjeru 1:1000. Nakon prekonoćne inkubacije uz miješanje na 4°C, membrana je ispirana u TBST-puferu 1 h te inkubirana sa sekundarnim protutijelom obilježenim peroksidazom u otopini pufera TBST 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon dodatnog ispiranja u puferu TBST slijedi vizualizacija proteina po principu kemiluminescencije korištenjem kompleta kemikalija prema uputama proizvođača na uređaju Image Quant LAS 4000 mini (GE Healthcare). Za određivanje veličina razdvojenih proteina korišten je marker predefinirane veličine proteina. Za kontrolu količine nanesenih proteina korištena je imunodetekcija proteina β-aktina, a za potvrdu infekcije stanica detektirane su količina virusnih proteina m04 ili m57.

3.2.5.5. Konfokalna laserska pretražna mikroskopija

Jedan dan prije infekcije, stanice su uzgajane na pokrovnim stakalcima kako bi se pričvrstile na površinu stakalaca. Zatim su stanice inficirane MCMV-virusom kojem nedostaje virusni Fc- receptor ($\Delta m138$) (182) kako bi se isključila mogućnost nespecifičnog vezanja protutijela. Određeno vrijeme nakon infekcije, stakalca sa stanicama u pločama za uzgoj kulture stanica s 12 jažica su fiksirana i permeabilizirana u 70% hladnom metanolu na -20°C . Nakon 5 min metanol je uklonjen i stanice isprane PBS-om. U vlažnoj komorici na stakalca se doda otopina od 30 μL primarnog protutijela razrijeđenog u PBS-u te se preparati inkubiraju 1 h na sobnoj temperaturi. Zatim se suvišak protutijela ukloni ispiranjem nekoliko puta PBS-om te se stanicama doda fluorescentno obilježeno sekundarno protutijelo. Nakon 1 h inkubacije na sobnoj temperaturi i ponovnog ispiranja PBS-om, stakalca se sredstvom za uklapanje (mowiol) zalijepe na predmetno stakalce i pohrane zaštićena od svjetla. U svim pokusima stanice inkubirane s irelevantnim protutijelima odgovarajućeg izotipa korištene su kao negativna kontrola za podešavanje aparata. Uzorci su analizirani na konfokalnom skenirajućem mikroskopu Leica TCS SP8 i obrađivani programom LAS X.

3.2.5.6. Sakupljanje medija za analizu odcjepljenog PrP-a

Medij stanica tretiranih sa i bez GI 254023X su sakupljeni 10-24 h nakon infekcije MCMV-om. Potom su proteini taloženi dodatkom 10 %-tne trikloroetene kiseline uz 0.1 % Na-DOC. Nakon inkubacije 30 min na ledu uzorci su centrifugirani 12000 g 15 min na $+4^{\circ}\text{C}$ te je uklonjen supernatant s preostalog taloga. Dalje su uzorci pripremljeni SDS-PAGE metodom (3.2.5.3.) i provedena je imunodetekcija metodom Western blot (3.2.5.4.) koristeći sPrP protutijelo specifično za odcjepljenu formu PrP-a.

3.2.6. Statističke metode u obradi podataka

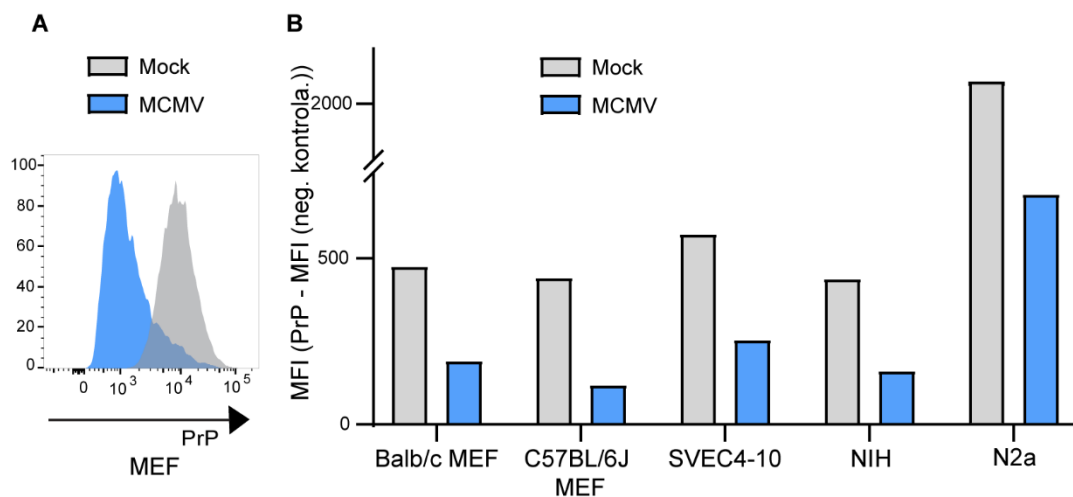
Prikupljeni podaci su podvrgnuti statističkoj analizi korištenjem softvera GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc.). Analiza podataka uključivala je korištenje Mann-Whitneyjevog testa i Studentovog t-testa, odabranih na temelju eksperimentalne metode i broja životinja unutar svake skupine. Statističke značajnosti naznačene su na slikama.

4. REZULTATI

4.1. Infekcija MCMV-om utječe na ispoljenost proteina PrP

4.1.1. Infekcija MCMV-om smanjuje površinsku ispoljenost PrP-a

Infekcija MEF stanica MCMV-om je pokazala kako se površinsko ispoljavanje PrP-a smanjuje 24h poslije infekcije (slika 2 A). Ovo je prvo opažanje kako se ispoljavanje proteina PrP mijenja pod utjecajem bilo kojeg virusa. Dobiveni rezultat na jednoj vrsti stanica, kako MCMV utječe na biologiju ovog proteina, potvrđen je potom inficiranjem nekoliko mišjih staničnih linija na kojima smo protočnom citometrijom odredili ispoljavanje PrP-a na površini (slika 2 B). Stanice smo inficirali divljim tipom (engl. *wild type*, WT) MCMV-a korištenjem 1,5 PFU/stanici primarne kulture, odnosno 3 PFU/stanici imortalizirane stanične linije. Dio stanica smo ostavili za kontrolu, odnosno bez infekcije (engl. *mock*). Nakon 24-satne infekcije, stanice smo sakupili te im dodali protutijelo specifično za PrP ili kontrolno protutijelo istog izotipa. Signal očit na protočnom citometru izražen je kao medijan jačine fluorescencije, (engl. *Median Fluorescence Intensity*, MFI) te je od MFI PrP-a oduzet MFI izotipske kontrole. Korištenje protutijela istog izotipa te oduzimanje MFI izotipske kontrole od MFI PrP-a smo provodili u svakom pokusu praćenja površinske razine PrP-a protočnom citometrijom te se ovaj dio opisa pripreme dalje u tekstu neće ponavljati.

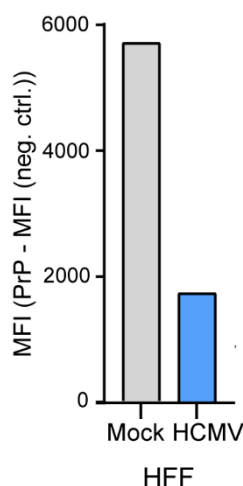


Slika 2. Infekcija MCMV-om uzrokuje smanjenje površinske ispoljenosti proteina PrP. (A) Stanice MEF inficirane su s 1,5 PFU/stanici MCMV-a te im je 24 sata nakon infekcije površinskim bojanjem i protočnom citometrijom određena ispoljenost proteina PrP u odnosu na neinficirane (mock) stanice. Histogramski prikaz. (B) Primarne stanice MEF porijeklom iz Balb/c ili C57BL/6J miševa i stanične linije SVEC4-10, NIH i N2a inficirane su s 1,5 PFU/stanici MCMV-a u slučaju primarne kulture, odnosno 3 PFU/stanici MCMV-a u slučaju staničnih linija. Nakon 24 sata infekcije površinskim bojanjem i protočnom citometrijom određena je ispoljenost proteina PrP u odnosu na neinficirane (mock) stanice.

Učinak virusa MCMV na protein PrP kod MEF stanice iz Balb/c miševa sada smo potvrdili i u stanica MEF porijeklom iz C57BL/6J mišjeg soja. Analizom staničnih linija fibroblasta NIH 3T3 i endotelnih SVEC4-10 stanica također smo izmjerili niže površinske razine PrP-a po infekciji. Uključili smo i staničnu liniju mišjeg neuroblastoma, N2a, obzirom na visoku ispoljenost PrP-a u tkivu mozga zbog čega se uobičajeno koristi za istraživanja biologije PrP-a (63,190). Prilikom svake analize smo uočili da se razina površinskog PrP-a ponaša jednako te smo na temelju ovih rezultata zaključili da smanjeno ispoljavanje PrP-a pod utjecajem infekcije CMV-om ne ovisi o tipu stanične kulture ili linije.

4.1.2. Infekcija humanih stanica HCMV-om smanjuje površinsku ispoljenost PrP-a

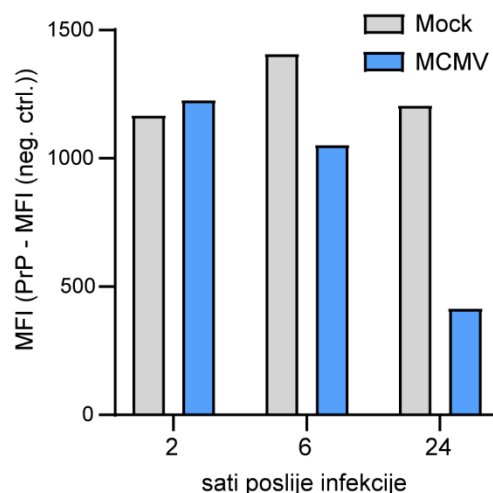
Osim isključive specifičnosti za jednog domaćina, MCMV dijeli mnoge sličnosti s humanim CMV-om (Odjeljak 1.5.). Iz ovog razloga pretpostavili smo da se fenomen utjecaja na površinsku ispoljenost PrP-a također može uočiti u slučaju HCMV-om inficirane humane kulture stanica. Staničnu kulturu humanih fibroblasta HFF (engl. *human foreskin fibroblast*) inficirali smo s 0,5 PFU HCMV-a te nakon 48 sati odredili količinu proteina PrP na površini stanica. Uočili smo smanjenu ispoljenost PrP-a u slučaju inficiranih stanica (slika 3).



Slika 3. Infekcija HCMV-om uzrokuje smanjenje površinske ispoljenosti proteina PrP u primarnoj humanoj staničnoj kulturi fibroblasta. Stanice HFF inficirane su s 0,5 PFU/stanici HCMV-a te im je 48 sati nakon infekcije površinskim bojanjem i protočnom citometrijom određena ispoljenost proteina PrP u odnosu na neinficirane (mock) stanice.

4.1.3. Kinetika ispoljavanja PrP-a na plazmatskoj membrani po infekciji MCMV-om

Kako bi odredili kinetiku utjecaja MCMV-a na ispoljavanje PrP-a proveli smo pokuse u kojima su stanice analizirane u ranoj i kasnoj fazi infekcije MCMV-om. Replikacija mišjeg virusa je u slučaju MCMV-a puno brža od virusa koji inficira ljude. Iz tog razloga smo kao ranu fazu odabrali 6h poslije infekcije, a za kasnu fazu smo stanice analizirali kao u prethodno opisanim pokusima 24 h nakon infekcije. Stanice MEF smo inficirali s 1,5 PFU po stanici, sakupili ih u navedenim vremenskim točkama te protočnom citometrijom odredili količinu PrP-a na površini stanica. U vrlo ranoj (engl. *immediate early*) vremenskoj točki, 2 sata poslije infekcije, nije bilo razlike u površinskoj ispoljenosti PrP-a, dok se u kasnijoj fazi ponovio rezultat uklanjanja PrP-a s površine MEF stanica (slika 4). Kao što se vidi na slici 3 smanjenje količine PrP-a na površini stanica započinje u ranoj fazi infekcije (6 h poslije infekcije), a 24 h poslije infekcije PrP-a je ostalo iznimno malo.

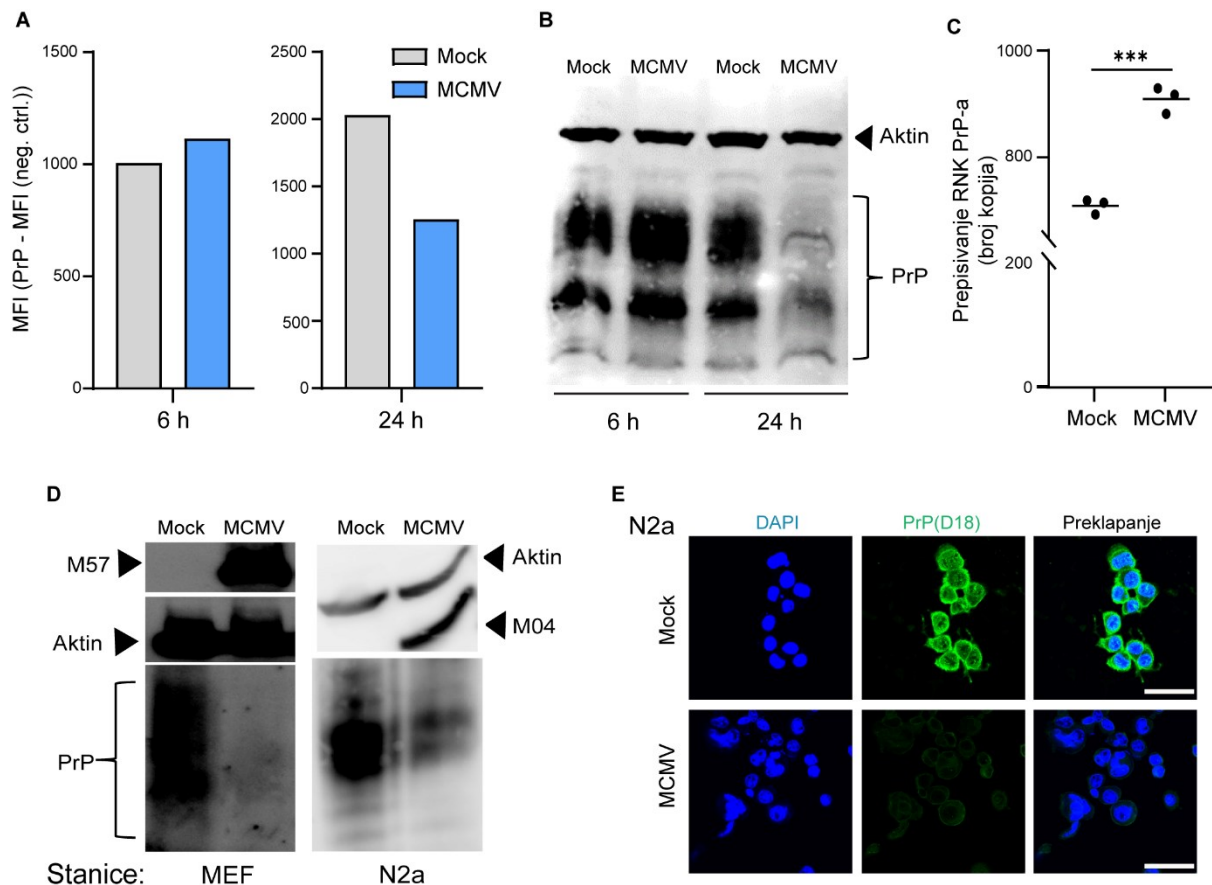


Slika 4. Kinetika površinske ispoljenosti proteina PrP tijekom infekcije MCMV-om. Stanice MEF inficirane su s 1,5 PFU/stanici MCMV-a te im je 2, 6 i 24 sata nakon infekcije površinskim bojanjem i protočnom citometrijom određena ispoljenost proteina PrP u odnosu na neinficirane (mock) stanice.

4.2. PrP se uklanja iz stanica tijekom infekcije CMV-om

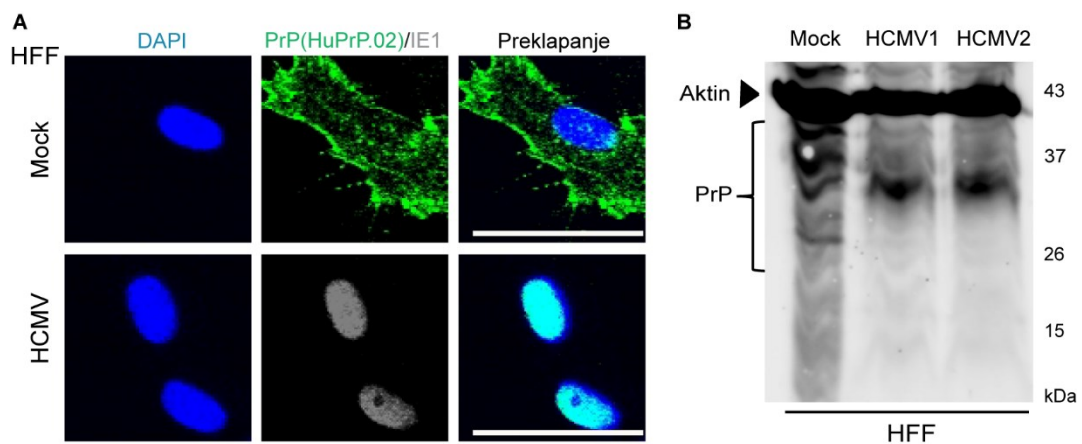
Pokazali smo površinski nestanak proteina PrP po infekciji MCMV-om iz čega je proizašlo pitanje da li se PrP nakuplja u samoj stanici, bilo da je uklonjen s plazmatske membrane ili biva spriječen u pristizanju na plazmatsku membranu. Kako bismo to provjerili, pratili smo ukupnu količinu proteina PrP unutarstaničnim bojenjem u protočnoj citometriji, tehnikom imunoblota lizata stanica te konfokalnom mikroskopijom. Stanice MEF smo inficirali s 1,5 PFU/stanica te nakon 6 ili 24 h sakupili. U slučaju protočne citometrije stanice su fiksirane nakon čega je provedeno unutarstanično bojenje PrP-a odgovarajućim sekundarnim protutijelom. Za imunoblot detekciju, uzorci stanica su lizirani te im je određena koncentracija proteina prije provedbe separacije proteina, prijenosa na membranu i detekcije odgovarajućim sekundarnim protutijelom. Obje metode su pokazale da se količina ukupnog PrP-a proteina povećava u ranoj fazi infekcije (slika 5 A i B). Uočena snažna indukcija ispoljavanja PrP-a u ranoj vremenskoj točki infekcije MCMV-om u skladu je sa činjenicom poznatom iz literature da se PrP ponaša kao stresom inducirana molekula. Isto je potkrijepljeno podacima iz našeg transkriptoma MCMV-inficiranih stanica (191) rezultatima povišene transkripcije gena *Prnp* po MCMV infekciji stanica DC2.4 (slika 5 C). Nakon 24 sata od infekcije, ispoljavanje PrP-a je bilo značajno niže u inficiranim stanicama u usporedbi s neinficiranim kontrolama odnosno praćenjem ukupne količine PrP-a moglo se zaključiti da je protein po infekciji uklonjen iz stanica (slika 5 A i B). Ovaj fenomen smo potvrdili imunoblotom lizata stanica MEF i N2a gdje smo također potvrdili infekciju stanica detekcijom virusnih proteina M57 ili m04 (slika 5 D). Detekcija virusnih proteina se koristi kao potvrda

virusne infekcije, dok u konfokalnoj mikroskopiji dozvoljava diferencijaciju inficiranih i neinficiranih stanica u samom uzorku. U svrhu potvrde rezultata u metodi konfokalne mikroskopije, stanice N2a su naseljene na 6-jažične ploče u kojima su već postavljena sterilna stakalca te nakon toga inficirane u ploči. 24 sata nakon infekcije adherentne N2a stanice primljene na stakalce su fiksirane i analizirane na PrP. Slično dosadašnjim rezultatima i ovom metodom opažamo da izostanak signala PrP u inficiranim stanicama N2a 24 sata nakon infekcije (slika 5 E).



Slika 5. Infekcija MCMV-om uzrokuje nestajanje proteina PrP iz MCMV-inficiranih stanica. (A) Stanice MEF inficirane su s 1,5 PFU/stanici MCMV-a te im je 6 i 24 sata nakon infekcije intracelularnim bojenjem i protočnom citometrijom određena ispoljenost proteina PrP u odnosu na neinficirane (mock) stanice. (B) Stanice MEF inficirane su s 1,5 PFU/stanici MCMV-a i sakupljene te lizirane 6 i 24 sata nakon infekcije. PrP je detektiran MoPrP.03 protutijelom u metodi imunoblota. Aktin je detektiran kao kontrola. (C) Transkripcija PrP gena (*Prnp*) u neinficiranim i MCMV-inficiranim DC2.4 stanicama nakon 3 sata infekcije. (D) Stanice N2a i MEF su inficirane MCMV-om (1,5 PFU/stanica za MEF, 3 PFU/stanica za N2a), a dio je ostao neinficiran. 24 sata nakon infekcije pripremljeni su lizati. Imunoblot tehnikom detektiran je PrP koristeći protutijelo MoPrP.03, virusni protein M57 ili m04 te aktin kao kontrola. (E) Stanice N2a su inficirane s 3 PFU/stanica MCMV-a ili puštene neinficirane. Nakon 24 sata infekcije, provedena je detekcija PrP-a s D18 protutijelom te DAPI za vizualizaciju jezgri.

Kako bi prokazali da ovaj rezultat nije specifičan samo za mišje stanice inficirane mišjim CMV-om, proveli smo analize na humanoj staničnoj kulturi. Stanice HFF su inficirane s 0,5 PFU/stanica HCMV-a te nakon 48 sati infekcije stanice analizirane konfokalnom mikroskopijom ili prikupljene za lizu. Kod metode konfokalne mikroskopije razinu površinskog PrP-a ispitali smo korištenjem HuPrP.02 protutijela, a infekciju stanica potvrdili bojenjem virusnog proteina IE1. Uklanjanje PrP iz stanica smo također pratili imunoblotom korištenjem 3F4 protutijela za detekciju PrP-a. Rezultat ove analize pokazuje kako se količina PrP-a na površini humanih stanica značajno smanjila te je PrP uklonjen iz inficiranih stanica pozitivnih na marker infekcije IE1 (slika 6 A), odnosno PrP nestaje iz humanih stanica pod utjecajem HCMV-infekcije (slika 6 A i B).

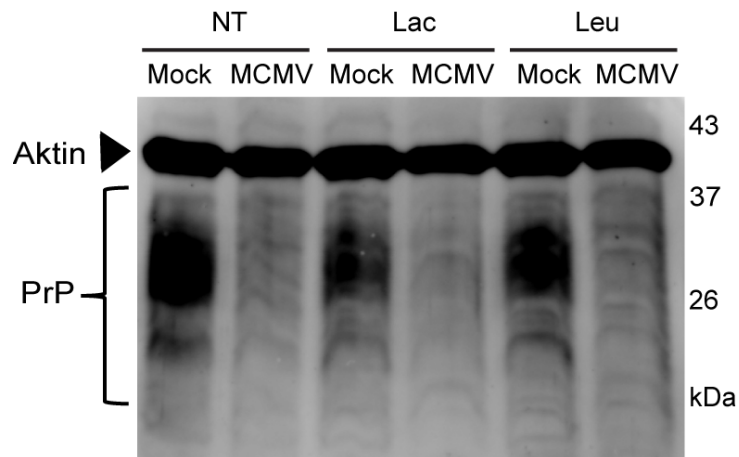


Slika 6. Infekcija HCMV-om uzrokuje nestajanje proteina PrP iz HCMV-inficiranih stanica. (A) Stanice HFF inficirane su s 0,5 PFU/stanici HCMV-a te im je 48 sati nakon infekcije konfokalnom mikroskopijom određena ispoljenost proteina PrP u odnosu na neinficirane (mock) stanice. Humani PrP je analiziran pomoću protutijela HuPrP.02, a marker infekcije pomoću virusnog proteina IE1 koji se izražava u jezgri. Sve jezgre su detektirane pomoću fluorescentne boje DAPI. (B) Stanice HFF inficirane su s 0,5 PFU/stanici HCMV-a i sakupljene te lizirane 48 sati nakon infekcije. PrP je detektiran protutijelom 3F4 u metodi imunoblota. Aktin je detektiran kao kontrola.

4.3. PrP se ne razgrađuje staničnim putevima razgradnje tijekom infekcije HCMV-om

Unatoč početnoj indukciji transkripcije i ispoljavanja, u kasnoj fazi infekcije prisutno je manje PrP-a u inficiranim stanicama. Slijedeći je korak bio utvrditi na koji način virus uklanja PrP. Postoji nekoliko proteina koji se razgrađuju po CMV-infekciji (192–194), npr. kao dio virusnog izbjegavanja imunskog odgovora domaćina. Putevi koje virusna mašinerija se pri tome koriste su raznovrsni te smo htjeli provjeriti kako CMV utječe na PrP. Dva iznimno bitna stanična puta razgradnje proteina su proteasomski i lizosomski (195), te na tržištu postoje

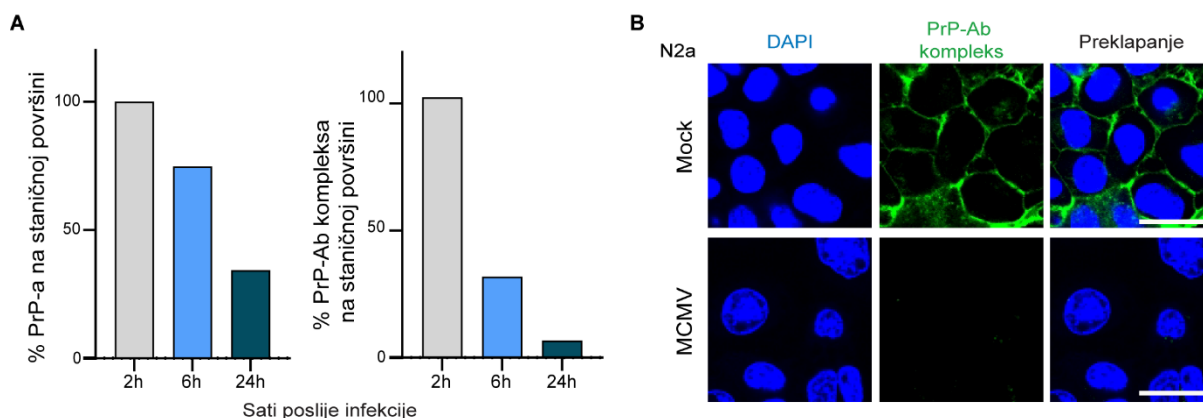
validirani inhibitori koji se koriste u istraživanjima. Kako bismo istražili da li se PrP uslijed infekcije CMV-om razgrađuje nekim od ovih putova, tretirali smo stanice inhibitorima tijekom infekcije MCMV-om. Infekcija je trajala 24 sata do trenutka sakupljanja stanica nakon čega su napravljeni lizati, a inhibitori su dodavani u medij stanica 4 sata nakon infekcije. Niti inhibitor proteasoma, Laktacistin, niti inhibitor lizosomalnih proteaza, Leupeptin nisu zaustavili nestajanje proteina PrP iz inficiranih stanica (slika 7).



Slika 7. Uklanjanje proteina PrP iz stanica inficiranih MCMV-om nije pod utjecajem proteasomskog niti lizosomalnog puta stanične razgradnje proteina. Stanice MEF inficirane su s 1,5 PFU/stanici, a dio je ostao neinficiran (mock). Laktacistin i Leupeptin su dodani u medij 4 h nakon infekcije te nakon ukupnih 24 h stanice su sakupljene i lizirane. PrP je detektiran protutijelom MoPrP.03 u metodi imunoblota. Aktin je detektiran kao kontrola. NT – netretirane stanice; Lac – Laktacistin; Leu – Leupeptin.

Sljedeći korak je bio istražiti kinetiku nestajanja proteina s plazmatske membrane inficiranih stanica. Dio stanica analizirali smo analogno pokusu prikazanom na slici 4, stanice smo dakle inficirali i prikupili nakon određenog broja sati te analizirali na površinsko ispoljavanje PrP-a (slika 8 A, lijevi panel). Kako bismo paralelno ispitali što se događa s proteinom PrP koji se nalazio na samoj plazmatskoj membrani u trenutku infekcije, stanice smo odmah po infekciji obilježili dodatkom protutijela na PrP i nakon toga proveli inkubaciju određenog broja sati. U ovom slučaju, predformirani kompleks protutijelo-PrP fluorescentno se obilježi sekundarnim protutijelom po završetku inkubacije te se preostali kompleks detektira protočnom citometrijom (slika 8 A desni panel) ili konfokalnom mikroskopijom (slika 8 B). Kod drugog eksperimentalnog pristupa (slika 8 A, desni panel i 8 B) ne pratimo novosintetizirani PrP koji pristiže na površinu, nego samo onaj koji je bio označen protutijelom (PrP-Ab kompleks) u trenutku infekcije. Obje metode pokazuju kako se uklanjanje PrP-a koji je već bio prisutan na površini stanica u trenutku infekcije odvija se brže nego kada pratimo

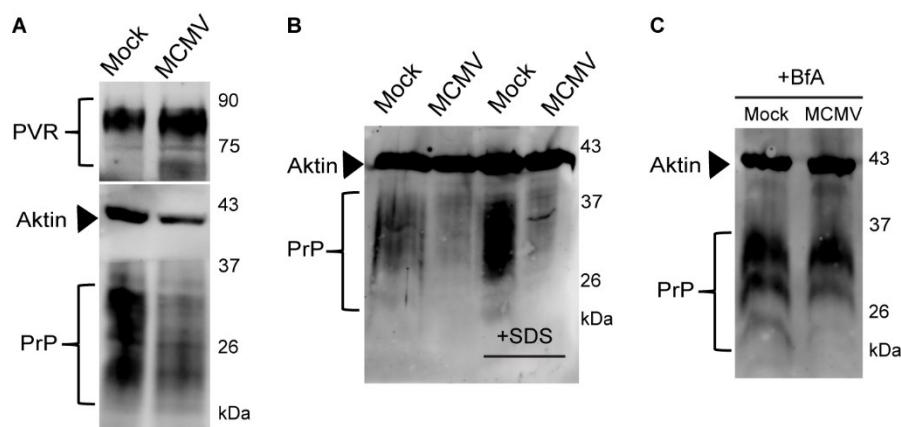
ukupnu količinu proteina na površini, što znači da virus aktivno uklanja protein sa same plazmatske membrane gdje ga u početku infekcije djelomično nadomješta novosintetizirani protein.



Slika 8. Uklanjanje proteina PrP koji je prisutan na površini stanice u trenutku infekcije odvija se brže nego ukupni površinski PrP tijekom MCMV-infekcije. (A) Stanice MEF su inficirane s 1,5 PFU/stanica MCMV-a. Analiza površinskih razina PrP-a u MEF stanicama 2, 6 i 24 sata poslije infekcije te u MEF stanicama obilježenim D18 protutijelom prije 2-satnog, 6-satnog ili 24-satnog razdoblja infekcije protočnom citometrijom. Podaci su prikazani kao postotak površinskog PrP-a u odnosu na vremensku točku od 2 sata nakon infekcije (100%). (B) N2a stanice su obilježene D18 protutijelom pa inficirane s 3 PFU/stanica MCMV-a ili ostavljene neinficirane. Prikazane su slike snimljene konfokalnim mikroskopom na kojima se može vidjeti PrP-protutijelo kompleks 24 sata poslije infekcije.

Kako bismo isključili mogućnost da je razgradnja proteina PrP u stanicama inficiranim virusom dio nespecifičnog fenomena u kojem se razgrađuju stanični proteini, provedena je detekcija drugog proteina za koji se po literaturnim navodima ne razgrađuje tijekom MCMV infekcije, polio-virusnog receptora (PVR) (196). Količina proteina PVR nije se značajno promijenila uslijed infekcije MEF stanica nakon 24 sata (slika 9 A). PrP je površinski protein koji se često nalazi u lipidnim splavima (21), iznimno hidrofobnim područjima membrane stanica iz kojih može biti teško izolirati proteine uobičajenom koncentracijom deterdženata korištenih u puferima za lizu (197). Iako smo pokazali izostanak PrP-a iz inficiranih stanica korištenjem tri različite metode (protočna citometrija, konfokalna mikroskopija i imunoblot) dodatno smo ispitali da li je PrP ostao u talogu staničnog lizata. U tu svrhu smo koristili pufer s povećanom količinom anionskog deterdženta SDS-a (s 0,1% na 0,5%) u uobičajenom puferu za lizu stanica te dalje lizirali stanice na već opisani način. Ovime smo pokazali da PrP nije zaostao u talogu, odnosno da ga nismo propustili detektirati jer je talog frakcija stanica koja zaostaje nakon što je lizat pripremljen i kao takva se ne analizira, već je virus zaista uklonio PrP iz inficiranih stanica (slika 9 B). Jedini inhibitor staničnog puta koji je povećao količinu PrP-a

u inficiranim stanicama bio je brefeldin A (slika 9 C). Brefeldin A smo koristili kao svojevrsnu pozitivnu kontrolu obzirom da brefeldin A sprječava sekretorni put novოსintetiziranih proteina na razini Golgijeva aparata (198) te tako zadržava novოსintetizirani PrP unutar stanice. Sumarno smo zaključili kako virus vrši dominantan utjecaj na zreli protein PrP, nakon što je već dospio na plazmatsku membranu.



Slika 9. Virusna infekcija specifično djeluje na zreli oblik PrP-a i smanjuje mu količinu. (A) U lizatima inficiranih i neinficiranih stanica detektiran je protein PrP te protein aktin kao kontrola količine lizata i protein PVR kao kontrola staničnog proteina čije količina nije smanjena infekcijom. (B) Lizati inficiranih i neinficiranih stanica pripremljeni su uz dvije koncentracije SDS-a, uobičajenu koncentraciju 0.1% (lijevo) te pojačanu koncentraciju 0.5% (desno). U svim lizatima izvršena je detekcija PrP-a i aktina pomoću specifičnih protutijela. (C) Detekcija PrP-a i aktina u lizatima inficiranih i neinficiranih stanica koje su tretirane inhibitorom Brefeldin A za vrijeme kultivacije stanica.

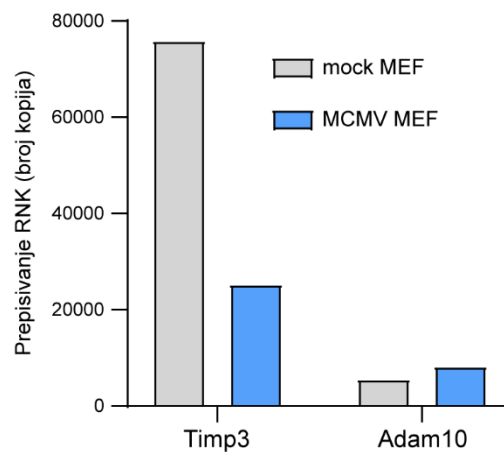
Obzirom da smo različitim tehnikama protočne citometrije, konfokalne mikroskopije i metode imunoblot utvrdili da je protein PrP uklonjen iz inficiranih stanica u svom zrelom obliku i to dominantno s površine stanice te da istovremeno nismo uočili značajni utjecaj staničnih puteva razgradnje na smanjenu količinu PrP-a, istraživanje molekularnog mehanizma kojim MCMV utječe na PrP usmjerili smo na plazmatsku membranu.

4.4. PrP se uklanja kao zreli protein s plazmatske membrani pod utjecajem metaloproteinaze ADAM10

4.4.1. MCMV smanjuje količinu TIMP3, inhibitora proteaze ADAM10

Poznato je da HCMV-infekcija dovodi do smanjenja ispoljavanja proteina TIMP3 i posljedično tome povećanog cijepanja imunskih liganda pomoću enzima ADAM17 (73). Naime, TIMP3 je inhibitor metaloproteinaze ADAM17 (72). Ujedno je TIMP3 i inhibitor metaloproteinaze ADAM10 koja cijepa mnoge proteine. Ključno je kako je ADAM10 pri tome

jedina proteaza koja cijepa protein PrP (57,63). Iz tog razloga smo ispitali utjecaj MCMV infekcije na razinu ispoljavanja TIMP3 i ADAM10. U slučaju da postoji analogija s virusom HCMV, možemo očekivati da će MCMV inhibirati Timp3 što će dovesti do pojačanog djelovanja proteaze ADAM10 i pojačanog cijepanja proteina PrP na plazmatskoj membrani. Pomoću transkriptomске analize MCMV-inficiranih i neinficiranih MEF stanica provjerali smo podatke o transkripciji ADAM10 i TIMP3 gena. Samo su transkripti gena za TIMP3 bili značajno smanjeni u inficiranim stanicama dok je ADAM10 bio prisutan u jednakoj količini neovisno o statusu infekcije stanica (slika 10). Time smo pokazali kako MCMV ima isti učinak na ispoljavanje TIMP3 RNA kao i u literaturi opisani HCMV što dovodi do smanjene razine TIMP3 inhibitora ADAM proteaza u inficiranim stanicama.

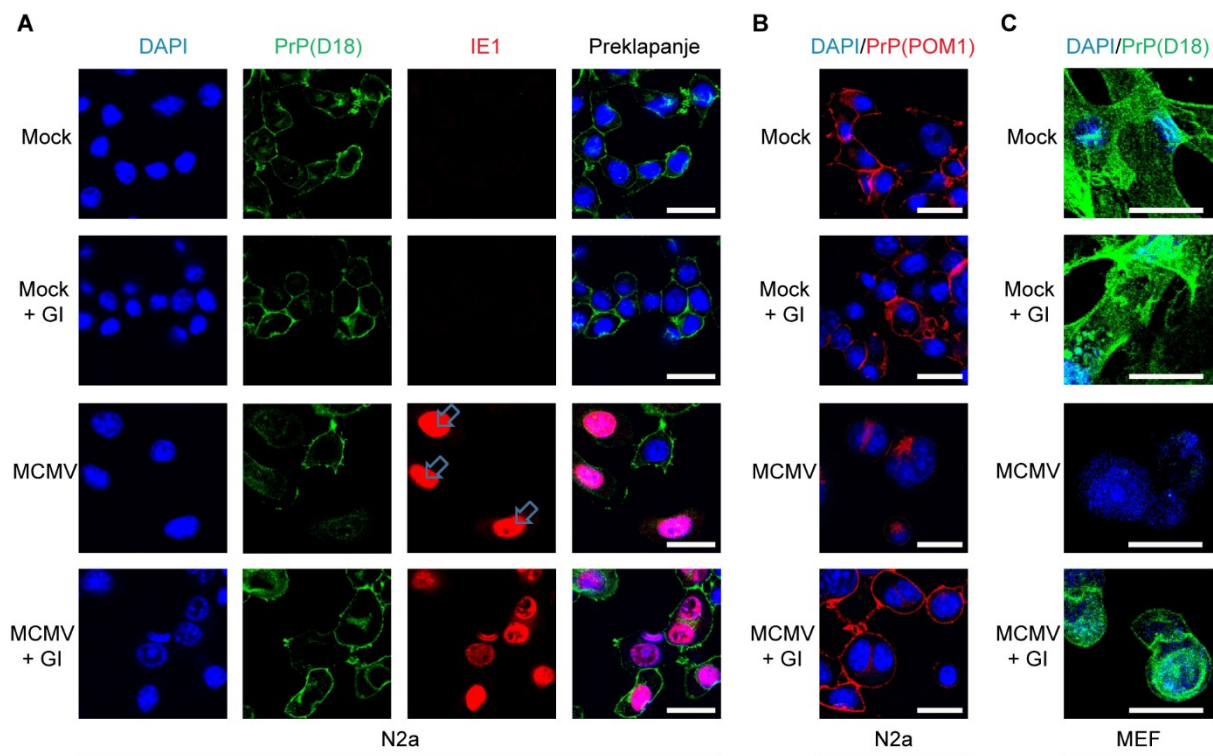


Slika 10. Infekcija MCMV-om smanjuje izražaj tkivnog inhibitora TIMP3 dok razine ADAM10 ostaju podjednake. Transkriptomška analiza provedena je na neinficiranim (mock) i MCMV-inficiranim MEF stanicama (191). Prikazane su razine transkriptata *Adam10* i *Timp3*.

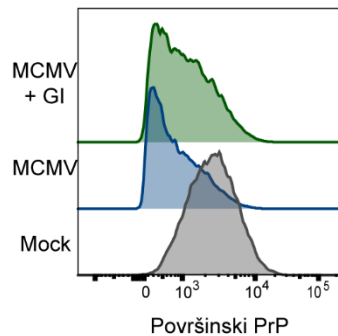
4.4.2. Pod utjecajem CMV-infekcije PrP se uklanja s površine plazmatske membrane procesom enzimatskog cijepanja

Kako bismo istražili utječe li proteaza ADAM10 na uklanjanje PrP s površine inficiranih stanica, koristili smo specifični inhibitor ADAM10 proteaze GI4503X (dalje u tekstu GI). Nakon 24h infekcije MCMV-om uz prisutnost GI inhibitora stanice smo fiksirali i analizirali količinu preostalog PrP-a konfokalnim mikroskopom. Na stanicama N2a određen je i protein PrP i virusni protein IE1 (slika 11 A). Neinficirane netretirane stanice pokazuju jasno membransko bojenje proteina PrP koje se nije značajnije mijenjalo uslijed dodatka inhibitora GI, a signal za virusni protein IE1 izostaje. U MCMV-inficiranom uzorku stanice koje nisu inficirane, odnosno nisu pozitivne na marker infekcije IE1, zadržavaju plazmatsko ispoljavanja PrP-a za razliku od onih u kojima je marker infekcije prisutan (slika 11 A treći

red, strelicom su označene IE1 pozitivne, PrP negativne stanice). S druge strane, N2a stanice tretirane GI-om nisu mogle ukloniti PrP s površine unatoč MCMV- infekciji (slika 11 A četvrti red). Ovaj nalaz je potvrdilo da je ADAM10 odgovoran za cijepanje proteina PrP tijekom MCMV-infekcije. Kao dodatnu potvrdu koristili smo drugo protutijelo specifično za PrP (POM1 klon umjesto D18, slika 11 B) a nakon toga proveli i pokus na drugoj vrsti stanica (MEF fibroblasti umjesto N2a neuroblastomske stanične linije, slika 11 C). Time smo pokazali da izostanak signala proteina PrP u inficiranim stanicama nije posljedica vezanja protutijela na specifični epitop koji biva maskiran u slučaju infekcije te da je djelovanje proteaze ADAM10 na PrP univerzalno i ne ovisi o tipu stanica . Zaključno, PrP se uslijed infekcije MCMV-om odstranjuje kao zreli protein s plazmatske membrane pod utjecajem cijepanja proteazom ADAM10. Rezultat smo potvrdili protočnom citometrijom gdje smo pokazali da se povećana količina proteina PrP zadržava na inficiranim stanicama kada onemogućimo djelovanje enzima ADAM10 (slika 12).

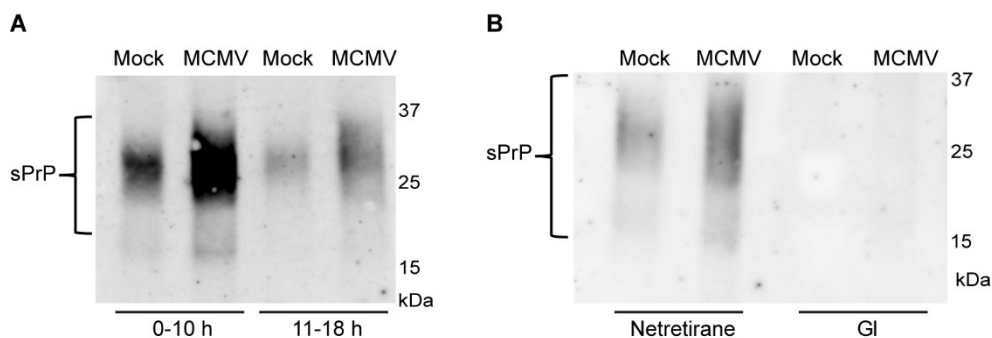


Slika 11. Inhibicija ADAM10 proteaze rezultira zadržavanjem PrP-a na MCMV-inficiranim stanicama. N2a i MEF stanice su inficirane MCMV-om (1,5 PFU/stanica za MEF, 3 PFU/stanica za N2a), a dio je ostao neinficiran tijekom 24 sata. Dio stanica je tretiran s 3 μ M GI inhibitora ADAM10 ili netretiran. (A) N2a stanice analizirane D18 anti-PrP protutijelom, anti-IE1 protutijelom na biljeg infekcije i DNA-interkalatorom DAPI za vizualizaciju jezgri. Strelice označavaju stanice koje pri prisustvu infekcijskog biljega gube PrP na površini. (B) N2a stanice analizirane POM1 anti-PrP protutijelom i DAPI za vizualizaciju jezgri. (C) MEF stanice analizirane D18 anti-PrP protutijelom i DAPI za vizualizaciju jezgri.



Slika 12. Inhibicija proteaze ADAM10 rezultira zadržavanjem PrP-a na površini MCMV-inficiranih stanica. MEF stanice su inficirane s 1,5 PFU/stanica MCMV-a. Dio stanica je tretiran s 3 μ M GI inhibitora ADAM10. 24h nakon infekcije stanice su površinski analizirane protočnom citometrijom na površinski PrP. Histogramski prikaz signala PrP.

Proteazom ADAM10 odcjepljena forma PrP-a (engl. *shed PrP*, sPrP), sPrP može detektirati u izvanstaničnom prostoru te vanstaničnim tekućinama u organizmu kao i u mediju u kojem su stanice rasle *in vitro* (63,67). U tu svrhu smo stanice MEF inficirali s 1,5 PFU MCMV-a po stanici u 6-jažičnim pločama te im odmah po infekciji zamijenili medij u kojem su stanice rasle Opti-MEM medijem sa smanjenom količinom proteina. U određenim vremenskim točkama uzorke medija smo prikupili i dodali inhibitor proteaza. Dalje smo iz uzoraka medija taložili proteine pomoću TCA/Na-DOC metode i detektirali sPrP imunoblotom. Također smo pripremili uzorke medija stanica koje su ujedno bile tretirane inhibitorom GI. Za istaknuti je da smo isprobali i druge metode pripreme medija u koji stanice luče sPrP, poput taloženja ledeno hladnim acetonom ili jednostavnog ukoncentriravanja medija, što nije rezultiralo uspješnom detekcijom sPrP-a. Također, naša protutijela kojima smo raspolagali nisu detektirala PrP u ovim uvjetima te smo se iz tog razloga odlučili nabaviti posebno protutijelo koje detektira samo „shed“ oblik PrP proteina, sPrP, odcjepljen putem ADAM10 proteaze vežući se na oslobođeni epitop nastao tijekom cijepanja. Korištenjem TCA/Na-DOC taloženja i protutijela specifičnog za sPrP, pokazali smo kako se količina izlučenog PrP-a povećava u mediju inficiranih stanica, posebno u prvim satima nakon infekcije (slika 13 A). Također, inhibicijom proteaze ADAM10 korištenjem inhibitora GI, odcjepljena forma PrP-a se nije mogla detektirati niti u mediju neinficiranih, niti MCMV-inficiranih stanica nakon 24h infekcije (slika 13 B).



Slika 13. Virusna infekcija specifično djeluje na zreli oblik PrP-a na način da ga uklanja cijepanjem s plazmatske membrane u vanstanični prostor. (A) Imunoblot detekcija sPrP-a u supernatantima inficiranih i neinficiranih MEF stanica pomoću protutijela koje prepoznaje epitop nastao cijepanjem detektiran specifični oblik proteina PrP, cijepani PrP, sPrP. (B) Imunoblot detekcija sPrP-a u supernatantima inficiranih i neinficiranih MEF stanica 24 sata nakon infekcije. Dio stanica je tretiran inhibitorom proteaze ADAM10, GI.

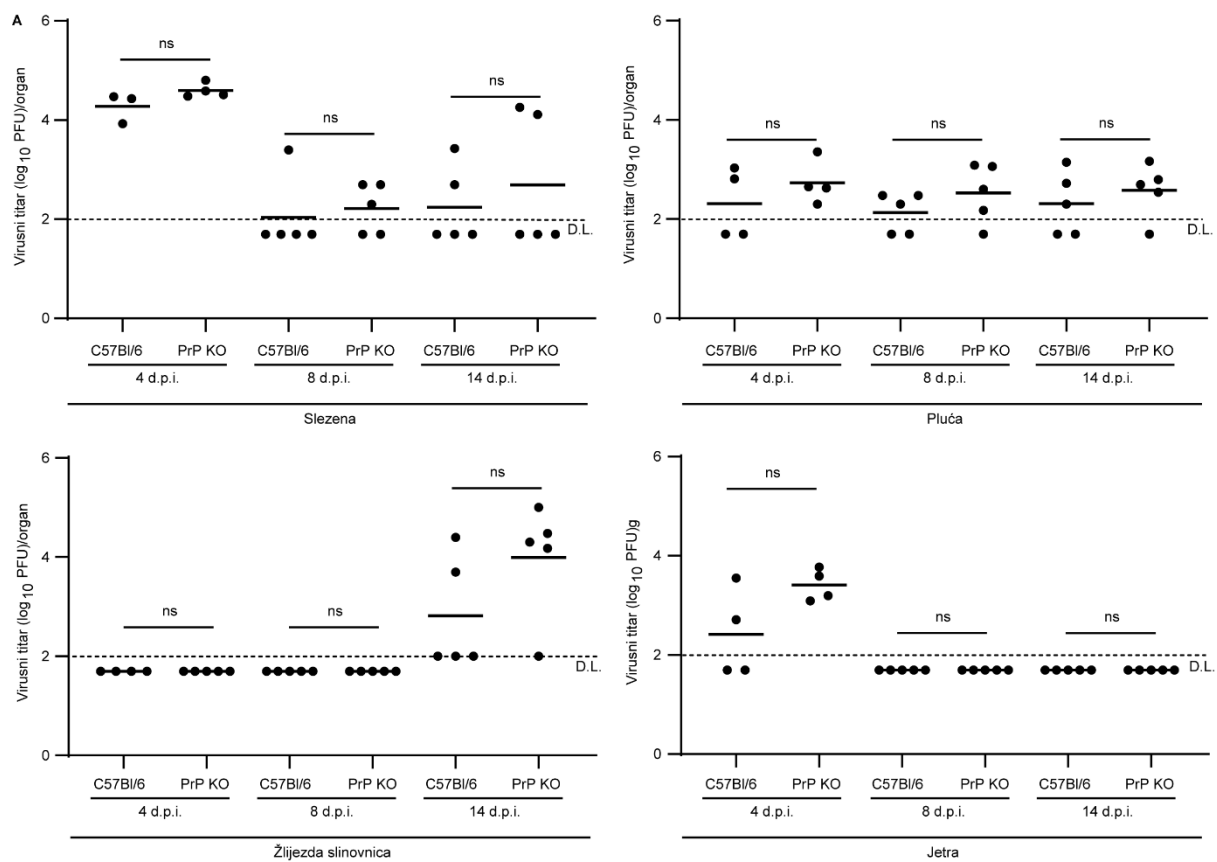
Na temelju navedenog može se zaključiti da, iako upotreba inhibitora GI ne vraća površinsku količinu proteina PrP na razinu identičnu onoj u neinficiranim stanicama (slika 12), ADAM10-posredovano cijepanje je snažan mehanizam putem kojeg se PrP uklanja s plazmatske membrane i otpušta u izvanstanični prostor pod utjecajem infekcije MCMV-om (slika 13). Na taj način dolazimo do činjenice da inficirane stanice imaju manje PrP-a na površini, a istovremeno povećanu količinu slobodnog PrP u svojoj okolini. Budući da su *in vitro* rezultati pokazali da postoji veza između CMV-infekcije i proteina PrP, krenuli smo utvrditi hoće li učinak ispoljavanja proteina PrP imati učinak na ishod infekcije miša s MCMV.

4.5. Utjecaj PrP-a na tijek MCMV-infekcije *in vivo*

4.5.1. Nedostatak PrP-a nema utjecaja na infekciju MCMV-om u odraslih miševa

Uloga PrP-a u ispitivanim virusnim infekcijama bila je uglavnom protektivna za domaćina (ref revija). Njegov izostanak nije dovodio do drastičnih posljedica, osim u slučaju virusa gripe (ref gripa). Utjecaj proteina PrP na infekciju MCMV-om do sada nije bio istraživani niti u jednom obliku. Za potrebe analize uloge proteina PrP u MCMV infekciji, upotrijebili smo mišji soj s najmanjom mutacijom u genu Prnp za koji je dokazano kako su svi geni koji se nalaze blizu gena Prnp ostali netaknuti, što nije bio slučaj s prethodnim generacijama miševa kojima je uklonjen gen za PrP (engl. Knock out, KO). Soj ZH3/ZH3 stvoren je uklanjanjem 8 parova baza iz genoma C57Bl/6J miševa (199). Prvim pokusom smo ispitali utjecaj nedostatka ovog proteina u slučaju infekcije odraslih životinja divljeg soja C57BL/6J i PrP KO soja. Za potrebe pokusa analiziran je titar virusa kojem je uklonjen gen za *m157*, mutanta virusa koja se koristi da bi se izbjegla dominantna Ly49H-ovisna kontrola MCMV-infekcije u C57BL/6J

soja putem stanica NK. Aktivacijski receptor Ly49H mišjih stanica NK jedinstven je po tome što specifično prepoznaje glikoprotein m157 mišjeg CMV-a. Ovaj receptor je prisutan u C57BL/6J soju miševa te kontrolira infekciju CMV-om u odraslih jedinki, dok u nezrelom imunom sustavu novookoćenih miševa to nije slučaj. 8-10 tjedana stari mužjaci soja C57BL/6J i PrP KO inficirani su intraperitonealno s dozom virusa od 2×10^5 PFU. Slezena, jetra, žlijezda slinovnica te pluća odraslih miševa C57BL/6J i PrP KO prikupljeni su u različitim vremenskim točkama (4, 8 i 14 dana) poslije infekcije. Na slici 14 vidimo da nema statistički značajnih razlika u titru virusa između PrP KO i WT miševa niti u jednom organu niti u različitim vremenskim točkama.



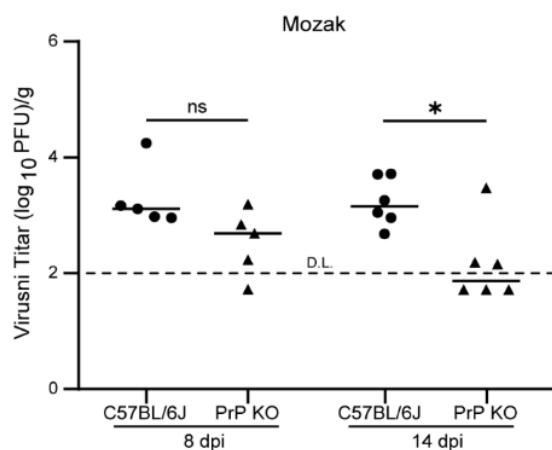
Slika 14. Nedostatak PrP-a ne utječe na tijek infekcije MCMV-om u odraslih miševa. C57BL/6J i PrP KO miševi, stari 8-10 tjedana, inficirani su intraperitonealno s 2×10^5 PFU $\Delta m157$ -MCMV. Uzorci organa prikupljeni su u određenim vremenskim točkama (4, 8 i 14 dana poslije infekcije). Virusni titar određen je standardnim testom virusnih čistina. Pojedinačni miševi prikazani su kao krugovi, s vodoravnim crtama koje označavaju srednje vrijednosti. Granica detekcije označena je kao DL (engl. *detection limit*). Prikazani podaci reprezentativni su za dva neovisna eksperimenta (n=3-5). Statistička analiza provedena je Mann-Whitneyjevim (U) testom.

Zaključno, titrovi virusa u organima odraslih životinja su bili usporedivi pa smo istraživanje usmjerili na model prirodene infekcije MCMV-om, što je bila naša primarni cilj,

obzirom da samo u slučaju infekcije novookoćenih miševa MCMV dolazi u mozak, mjesto najintenzivnijeg ispoljavanja proteina PrP

4.5.2. PrP KO novookoćeni miševi bolje kontroliraju infekciju MCMV-om, poglavito u tkivu mozga

PrP je, između ostalog, važna molekula tijekom embrionalnog razvoja uključujući ulogu u staničnom prijanjanju, angiogenezi te odgovoru na oksidativni stres (6,200). Uzimajući u obzir iznimnu ispoljenost proteina PrP u tkivu mozga, naše istraživanje se usmjerilo na model u kojem virus inficira mozak, odnosno model prirođene CMV-infekcije. Kako je detaljnije opisano u uvodu (odjeljak 1.6.) mišji CMV ne prelazi posteljicu pa se u mišjem laboratorijskom modelu novookoćeni miševi inficiraju po okotu kada im je razvojni stupanj središnjeg živčanog sustava istoznačan onom u ljudskog fetusa u vrijeme drugog tromjesečja razvoja. Ovim pristupom se blisko oponaša infekcija u ljudi, obzirom da i kod ljudi HCMV dolazi u mozga isključivo u slučaju infekcije *in utero* ili neposredno po rođenju. Kako bi odredili utjecaj proteina PrP na posljedice virusne infekcije i utvrdili ima li PrP aktivirajući ili inhibicijski učinak na imunski sustav nakon MCMV-infekcije, usporedili smo miševe divljeg tipa, C57BL/6J, i PrP KO miševe. S obzirom da se MCMV u mozgu može detektirati između 7. i 17. dana nakon infekcije, s najznačajnijim neurorazvojnim anomalijama koje se događaju između 8. i 10. dana, ispitali smo titar virusa na 8. i 14. dan poslije infekcije. 8 dan poslije infekcije nema razlike u titru među sojevima, dok se u kasnijoj vremenskoj točki očituje razlika (slika 15), odnosno, tkivu mozga miševa PrP KO uočen je manji titrar virusa.



Slika 15. Miševi PrP KO bolje kontroliraju virusnu infekciju u mozgu od miševa divljeg tipa. Novookoćeni PrP KO ili C57BL/6J miševi inficirani su intraperitonealno s 400 PFU MCMV-a na postnatalni dan 1. Virusni titar u mozgu 8. i 14. dan nakon infekcije određen je standardnim testom virusnih čistina. Pojedinačni miševi prikazani su kao krugovi (C57BL/6J) i trokuti (PrP KO), s vodoravnim crtama koje označavaju srednje vrijednosti. Granica detekcije označena je kao DL. Prikazani podaci reprezentativni su za >3 neovisna eksperimenta (n=5-6). Statistička analiza provedena je Mann-Whitneyjevim (U) testom. Naznačena je statistička značajnost ns = nije statistički značajno, * p < 0,05.

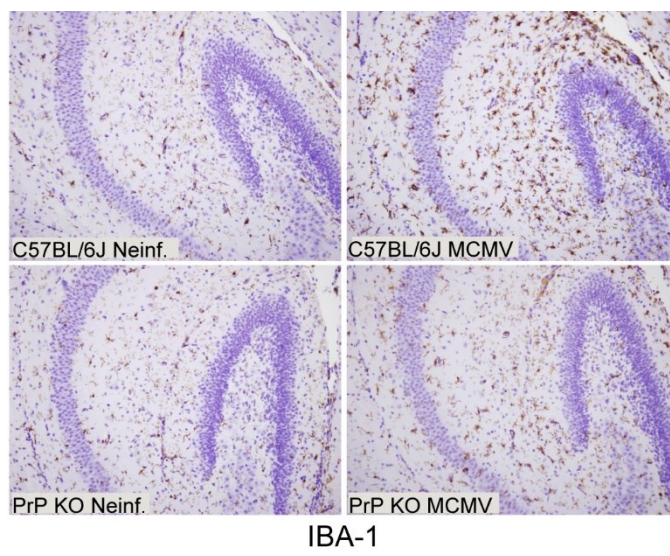
4.6. Utjecaj nedostatka proteina PrP na prirodenu MCMV infekciju u tkivu mozga

4.6.1. Utjecaj infekcije MCMV-om na broj stanica mikroglija se smanjuje ukoliko nedostaje protein PrP

MCMV inficira mnoge stanične tipove, pa tako i rezidentne stanice mozga, neurone i astrocite. Kao odgovor na infekciju mozga pojavljuje se snažan upalni odgovor u tkivu, karakteriziran izražajem citokina i kemokina koji orkestriraju priljev i nakupljanje imunskih stanica s periferije te aktivaciju rezidentnih stanica mikroglije. Iako se tijekom virusne infekcije narušava krvno-moždana barijera te citokini i kemokini dovode limfocite koji infiltriraju tkivo mozga, mikroglije su jedine imunostanice koje se mogu pronaći u tkivu mozga pri homeostazi i stoga su prve koje reagiraju na virusnu infekciju u tkivu. Prilikom prirodene infekcije CMV-om, virus može inficirati središnji živčani sustav, te se kao prva crta obrane aktivira mikroglija, što se može pratiti kroz povećanu aktivnost ovih stanica pod utjecajem upalnih medijatora. (141,181).

Proveli smo imunohistokemijsku metodu koristeći protutijelo na IBA-1 (engl. *ionized calcium-binding adaptor protein 1*), biljeg karakterističan za mikrogliju (slika 16). Imunohistokemijska analiza mozgovca provedena je 8 dana nakon infekcije, u vrijeme kad se

moгу uočiti određene razvojne promjene i kada znamo da je moguće utvrditi snažnu aktivaciju mikroglije u slučaju soja divljeg tipa. Imunohistokemijsko bojenje na marker IBA-1 pokazuje razliku između C57BL/6J inficiranih miševa gdje uočavamo više IBA-1 pozitivnih stanica, u odnosu na inficirane miševe PrP KO. Ovaj rezultat je u skladu je s sa opažanjima iz literature da perinatalna infekcija MCMV-om dovodi do povećanog broja mikroglije počevši od 8. dana nakon infekcije (181). Ovi nalazi su nas potakli na istraživanje već poznatih neurorazvojnih promjena uslijed MCMV-infekcije.

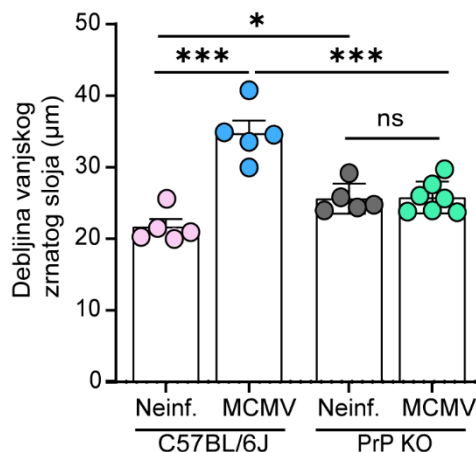


Slika 16. Razlika u broju IBA-1+ stanica između PrP KO i C57BL6J miševa nakon infekcije MCMV-om. Novookoćeni C57BL/6J i PrP KO miševi inficirani su s 400 PFU MCMV-a na postnatalni dan 1 ili su ostavljeni neinficirani (engl. *Naive*). Prikazane su IBA-1+ stanice u hipokampusu inficiranih miševa i njihovih neinficiranih kontrola 8 dana nakon infekcije.

4.6.2. Nedostatak PrP-a smanjuje neurorazvojne promjene u mozgu MCMV inficiranih miševa

Infekcija moždanog tkiva tijekom njegovog razvoja može dovesti do niza neuroloških oštećenja izazvanih nepravilnim razvojem (131,138). Kod mišjeg modela prirodene infekcije CMV-om zastoj u razvoju često se prati analizom malog mozga na kojem se vide promjene u smislu smanjene folijacije te smanjene površine. Osim toga, pokazano je kako nepravilnosti u malom mozgu obuhvaćaju smanjenu debljinu molekularnog i unutarnjeg znatog sloja kore malog mozga te povećanu debljinu privremenog vanjskog znatog sloja (138). Navedena opažanja ukazala su da infekcija novookoćenih miševa MCMV-om dovodi do narušenog staničnog migriranja u kori malog mozga.

Obzirom da je infekcija u smislu virusnog titra manja u PrP KO miševa time bi i razvojni put inficiranih PrP KO novo-okoćenih miševa mogao biti bliži onome u zdravih jedinki a. Novookočene miševе smo inficirali sa 400 PFU MCMV-a dan nakon okota te žrtvovali 8 dana nakon infekcije jer su 7-9 dana poslije MCMV-infekcije u C57BL/6J novookoćenih najizraženije razvojne promjene u malom mozgu (138). Parafinski preparati mozga pripremljeni kao što je opisano u metodama (3.2.3.3.) i morfometrijski analizirani na debljinu vanjskog zrnatog sloja (engl. *external granular layer*, EGL) (slika 17).



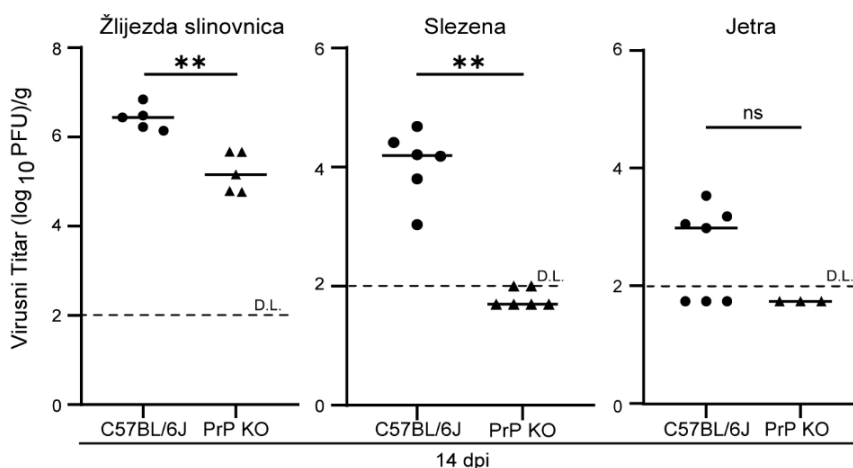
Slika 17. Nedostatak PrP-a ispravlja abnormalnosti u razvoju malog mozga kao posljedice MCMV-infekcije. Prikazana je debljina vanjskog zrnatog sloja malog mozga kod MCMV inficiranih i neinficiranih C57BL/6J i PrP KO miševa 8 dana nakon MCMV-infekcije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM (n = 6-9). Naznačena je statistička značajnost (ns, nije statistički značajno; *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$).

Zaključno, u soju PrP KO nismo primijetili tipično povećanje broja mikroglije, što pridonosi oštećenju mozga kod CMV infekcije, niti smo uočili karakteristično zadebljanje vanjskog zrnatog sloja malog mozga (EGL) koje ukazuje na zastoj u razvoju kod inficiranih miševa. Iz navedenog možemo zaključiti da je imunski odgovor u PrP KO miševa bio efikasniji u uklanjanju virusa iz mozga što je dovelo do manjih oštećenja u razvoju, nego u slučaju miševa divljeg tipa. Nismo uočili znakove povećane imunopatologije koji bi mogli biti prateća posljedica aktivnijeg imunskog sustava.

4.7. Novookočeni miševi PrP KO bolje kontroliraju infekciju MCMV-om na periferiji

Obzirom da je put infekcije životinja interperitonealni te da virus u tkivo mozga i kod MCMV i kod HCMV infekcije dolazi nakon početne replikacije na periferiji, smanjena količina virusa u mozgu može biti posljedica bolje kontrole virusa na periferiji. Sljedeće smo ispitali

razlikuje li se razina virusa na periferiji u PrP KO miševa u odnosu na miševе divljeg tipa. U tu svrhu smo inficirali PrP KO i C57BL/6J novookočene miševе MCMV-om i ispitali titar virusa u slezeni, jetri, žlijezdi slinovnici 14 dana poslije infekcije. Slično opažanju u tkivu mozga (slika 15), virusni titar je manji u miševa PrP KO u odnosu na WT, statistički značajno u slučaju slezene i žlijezde slinovnice (slika 18).

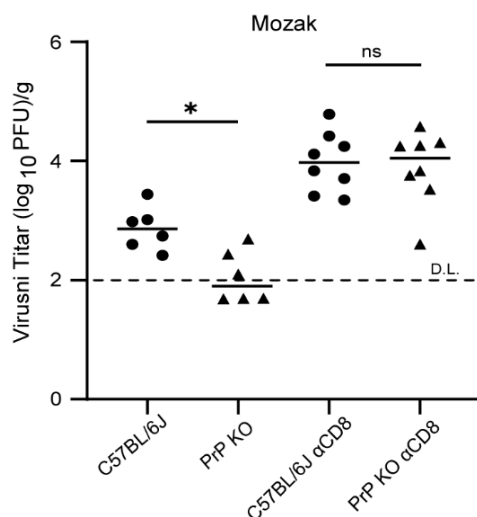


Slika 18. Miševi PrP KO bolje kontroliraju virusnu infekciju u perifernim organima od miševa divljeg tipa. Novookočeni PrP KO ili C57BL/6J miševi inficirani su intraperitonealno s 400 PFU MCMV-a na postnatalni dan 1. Virusni titar u slezeni, jetri i žlijezdi slinovnici 14. dan nakon infekcije određen je standardnim testom virusnih čistina. Pojedinačni miševi prikazani su kao krugovi (C57BL/6J) i trokuti (PrP KO), s vodoravnim crtama koje označavaju srednje vrijednosti. Granica detekcije označena je kao DL (engl. *detection limit*). Prikazani podaci reprezentativni su za >3 neovisna eksperimenta (n=5-6). Statistička analiza provedena je Mann-Whitneyjevim (U) testom. Naznačena je statistička značajnost ns = nije statistički značajno, * p< 0,05.

4.8. Limfociti CD8 T su zaslužni za bolju kontrolu virusa u PrP KO novookočenih miševa te su fenotipski drugačiji od onih divljeg tipa

Dosadašnja istraživanja na modelu prirodene infekcije pokazala su da je aktivacija CD8+ i CD4+ limfocita T neophodna za prekid umnožavanja virusa i završetak akutne infekcije CMV-om, pri čemu je značaj pojedine populacije limfocita T različit ovisno o organu (201). Slično je uočeno u odraslih jedinki (161,162,202). Također je pokazano da virus specifični limfociti CD8 T prodiru u tkivo mozga tijekom drugog tjedna prirodene infekcije MCMV-om te imaju ključnu ulogu u kontroli i prekidu aktivnog umnožavanja virusa u mozgu (141,174). Ukoliko se stanice CD8 T uklone, titar virusa se povisi ne samo u središnjem živčanom sustavu, već i u jetri i slezeni (141). Budući da je najznačajnija razlika u količini virusa između C57BL/6J i PrP KO primijećena 14. dana poslije infekcije (slika 15), pretpostavili smo da novookočeni PrP KO imaju bolju kontrolu virusa zbog limfocita CD8 T i

uklonili limfocite CD8 T kako bismo utvrdili mogu li te stanice objasniti uočenu razliku. Deplecija stanica CD8 T rezultirala je povećanjem titra virusa u miševa PrP KO do razine slične onoj izmjerenoj u C57BL/6J životinja (slika 19).



Slika 19. Bolja kontrola MCMV-a u mozgu miševa PrP KO ovisna je o limfocitima CD8 T. Novookočeni PrP KO ili C57BL/6J miševi inficirani su intraperitonealno s 400 PFU MCMV-a na postnatalni dan 1. Miševi su tretirani CD8 T-uklanjajućim protutijelom svakih tri dana od postnatalnog dana 4. Virusni titar u mozgu 14. dan nakon infekcije određen je standardnim testom virusnih čistina. Pojedinačni miševi prikazani su kao krugovi (C57BL/6J) i trokuti (PrP KO), s vodoravnim crtama koje označavaju srednje vrijednosti. Granica detekcije označena je kao DL (engl. *detection limit*). Prikazani podaci reprezentativni su za >2 neovisna eksperimenta (n=6-8). Statistička analiza provedena je Mann-Whitneyjevim (U) testom. Naznačena je statistička značajnost ns = nije statistički značajno, * p<0,05.

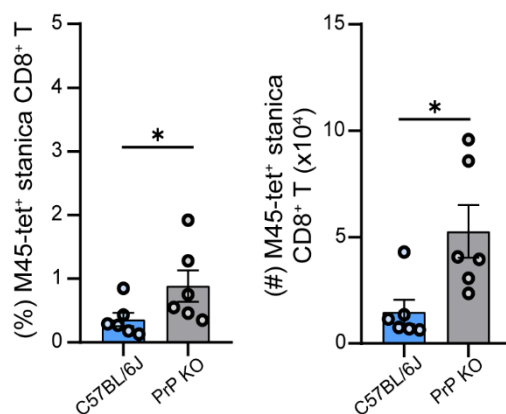
Time smo identificirali populaciju stanica adaptivnog imunskog sustava koja dovodi do primijećene razlike u titru miševa kojima nedostaje PrP, te smo limfocite CD8 T nadalje iscrpno istražili u kontekstu kongenitalne MCMV-infekcije oba soja.

4.8.1. MCMV-inficirani novookočeni PrP KO miševi imaju više virus-specifičnih limfocita CD8 T u odnosu na miševe divljeg tipa.

U MCMV-infekciji, stanice CD8 T reagiraju na nekoliko virusnih epitopa. Pri tome razlikujemo konvencionalne i inflacijske stanice CD8 T specifične za MCMV. Konvencionalni limfociti T specifični za epitop M45 pojavljuju se u akutnoj fazi prirodene infekcije i dosežu vrhunac između 10. i 20. dana, a zatim kontrahiraju. Stanice CD8 T specifične za epitop M57 do sada nikad nisu bile ispitane u prirodnom modelu MCMV-infekcije, no za pretpostaviti je da se ponašaju slično M45-specifičnim limfocitima CD8 T, a kao što je to slučaj u odraslim miševa. Za razliku od spomenutih tzv. konvencionalnih epitopa, epitopi virusnih proteina poput

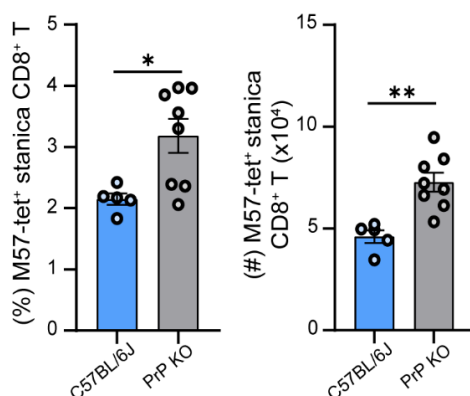
M38 dovode do populacije inflacijskih limfocita CD8 T koji se u novookoćenih miševa počinju nakupljati tek iza 20. dana infekcije (174).

Obzirom na razliku u titru uočenu 14 dana nakon infekcije novookoćenih miševa, pretpostavili smo da je odgovor stanica CD8 T bio učinkovit u akutnoj fazi i usredotočili se na tu vremensku točku te na limfocite CD8 T koji su specifični na konvencionalne epitope M45 i M57. Tetramerski kompleksi MHC molekula klase I i virusnih peptida (dalje u tekstu tetramer) omogućuju direktnu fenotipsku analizu te kvantifikaciju protu-virusnog odgovora limfocita CD8 T te se često koriste u izučavanju CMV-infekcije. Detekcija virus-specifičnih stanica CD8 T određuje se protočnom citometrijom nakon što one na sebe vežu tetramere, npr. M45-tetramer ili M57-tetramer. Slezene su prikupljene 14 dana poslije infekcije novookoćenih miševa, iz njih su izolirane imunosne stanice te je protočnom citometrijom određena količina tetramer-pozitivnih stanica CD8 T po uzorku. U protočnoj citometriji, limfociti CD8 T su određeni pomoću standardnih biljega za analizu imunosnih stanica, pri čemu smo ih detektirali kao žive stanice pozitivne na CD3, odnosno molekulu standardno izraženu na imunokompetentnim limfocitima CD8 T, CD44 kao biljeg stanica koje su došle u dodir s antigenom, negativne za površinski marker mišjih limfocita B - CD19 i naposljetku pozitivne na sam površinski glikoprotein CD8 (203). Slezena je najveći sekundarni limfni organ u tijelu, a njena organizacija omogućuje domaćinu da filtrira patogene iz krvi. Kao takva, sadrži mnoge leukocite te je pogodna za analizu imunosnih stanica. Također, sam virus MCMV inficira slezenu i dovodi do snažne imunosne reakcije unutar tkiva. Usporedbom slezena inficiranih miševa WT i PrP KO tipa, pronašli smo značajno veću učestalost te broj M45-tetramer-pozitivnih stanica CD8 T u novorođenih miševa PrP KO soja 14 dana poslije infekcije (slika 20).



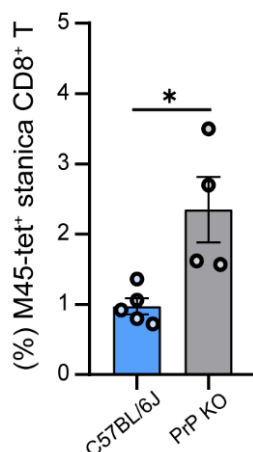
Slika 20. Udio te broj virus-specifičnih limfocita CD8 T u slezeni miševa PrP KO je povišen u odnosu na miševe WT soja. Miševi C57BL/6J i PrP KO inficirani su na postnatalni dan 1 sa 400 PFU MCMV-a. Prikazan je postotak (lijevo) te broj (desno) limfocita CD8⁺ T specifičnih za virusni epitop M45 u tkivu slezene inficiranih miševa C57BL/6J i PrP KO 14 dana poslije infekcije MCMV-om. Prikazane su pojedine životinje (krugovi) te srednja vrijednost ± SEM (n = 6) Prikazani podaci reprezentativni su za >3 neovisna eksperimenta. Statistička analiza provedena je Mann-Whitneyjevim (U) testom. Naznačena je statistička značajnost (*, P < 0,05).

Sukladno prethodnom, na isti način je analizirana specifičnost limfocita CD8 T za virusni epitop M57 u tkivu slezene. Na slici (slika 21) se može vidjeti da smo u slezeni miševa PrP KO pronašli statistički značajno veću učestalost te broj M57-tetramer pozitivnih stanica u odnosu na soj C57BL/6J. Iz navedenog možemo zaključiti da novoookočeni miševi PrP KO po MCMV-infekciji razvijaju jači virus-specifični odgovor konvencionalnih limfocita CD8 T u tkivu slezene.



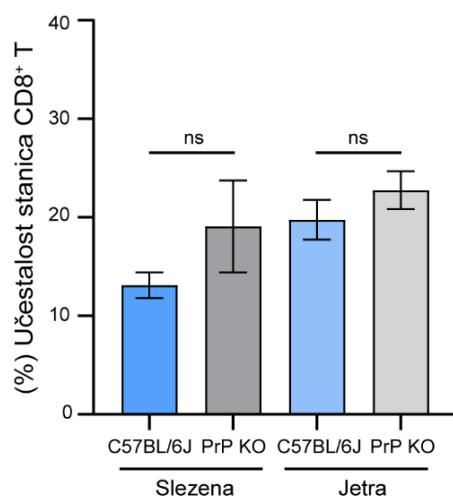
Slika 21. Udio te broj virus-specifičnih limfocita CD8 T u slezeni miševa PrP KO je povišen u odnosu na miševe WT 14 dana poslije infekcije MCMV-om. Miševi C57BL/6J i PrP KO inficirani su na postnatalni dan 1 sa 400 PFU MCMV-a. Prikazan je postotak (lijevo) te broj (desno) limfocita CD8⁺ T specifičnih za virusni epitop M57 u tkivu slezene miševa C57BL/6J i PrP KO inficiranih 14 dana poslije infekcije MCMV-om. Prikazane su pojedine životinje (krugovi) te srednja vrijednost ± SEM (n= 5-8) Prikazani podaci reprezentativni su za >3 neovisna eksperimenta. Statistička analiza provedena je Mann-Whitneyjevim (U) testom. Naznačena je statistička značajnost (*, P < 0,05; **, P < 0,01).

Jetra je još jedan od organa gdje MCMV-infekcija dovodi do masivne infekcije stanica pri čemu limfociti prodiru u tkivo. Analizom tkiva jetre potvrdili smo statistički značajnu razliku u učestalosti M45-tetramer pozitivnih limfocita CD8 T između miševa PrP KO i WT (slika 22).



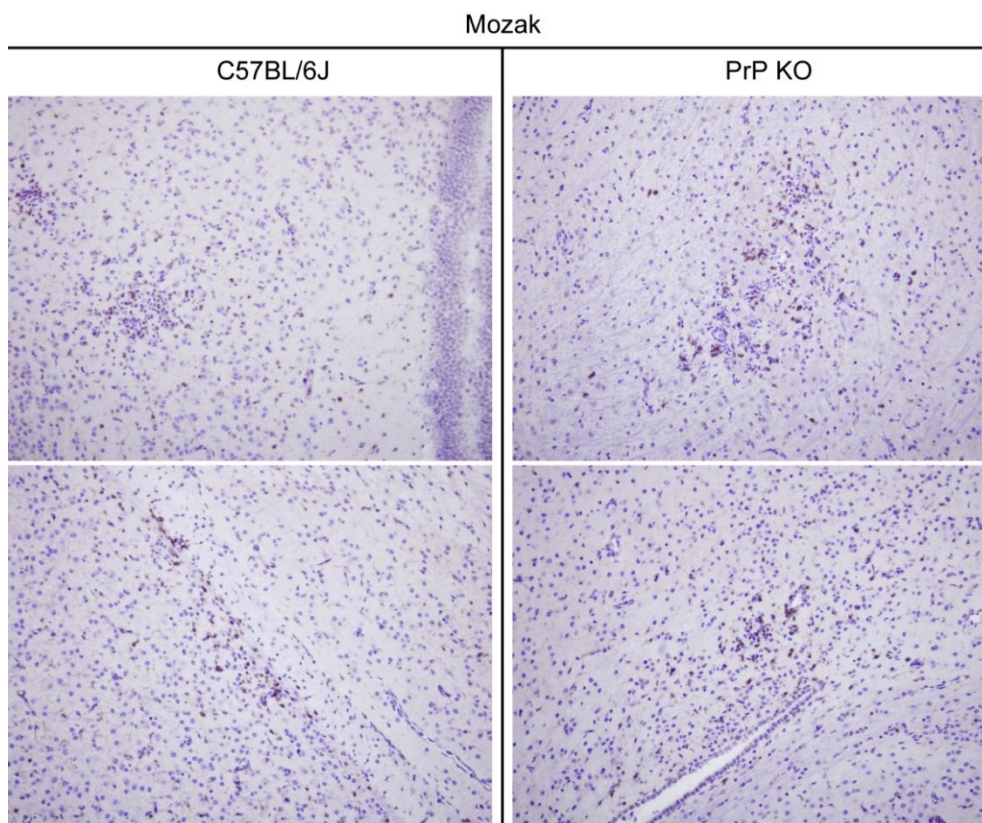
Slika 22. Udio virus-specifičnih limfocita CD8 T u jetri miševa PrP KO je povišen u odnosu na miševa WT. Miševi C57BL/6J i PrP KO inficirani su na postnatalni dan 1 sa 400 PFU MCMV-a. Prikazan je postotak limfocita CD8 T specifičnih za epitop virusnog proteina M45 u tkivu jetre miševa C57BL/6J i PrP KO inficiranih 14 dana nakon infekcije MCMV-om. Prikazane su pojedine životinje (krugovi) te srednja vrijednost grupe \pm SEM (n=4-5) Prikazani podaci reprezentativni su za 3 neovisna eksperimenta. Statistička analiza provedena je Mann-Whitneyjevim (U) testom. Naznačena je statistička značajnost (*, $P < 0,05$).

Postavilo se pitanje da li je veći broj virus-specifičnih stanica CD8 T posljedica općenito većeg broja imunskih stanica u perifernim organima miševa PrP KO, pa smo u tu svrhu analizirali broj limfocita CD8 T. Kao što se vidi na slici (slika 23) nema statistički značajnih razlika u učestalosti limfocita CD8 T između PrP KO i miševa divljeg tipa niti u slezeni niti u jetri. Obzirom da povećana proliferacija virus-specifičnih limfocita CD8 T dovodi do povećanog ukupnog broja limfocita CD8 T ovakav rezultat možemo objasniti ili činjenicom da je primijećeni trend bio nedostatan da pokaže statističku značajnost ili da miševi PrP KO imaju određenu razliku u proliferacijskom kapacitetu (što kasnije kratko komentiramo kod analize RNASeq rezultata) ili da je bolja virusna kontrola u danima prije promatranog dana 14 dovela do smanjene potrebe da se konvencionalni limfociti CD8 T nastavljaју akumulirati u tkivu.



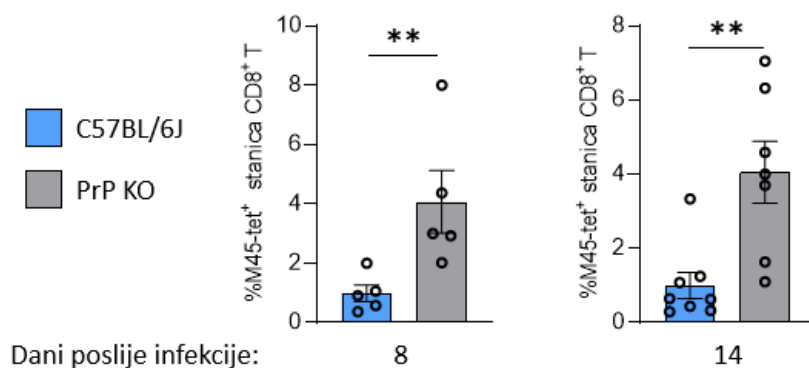
Slika 23. Udio stanica CD8 T u slezeni i jetri MCMV-inficiranih novookoćenih miševa PrP KO se statistički značajno ne razlikuje od udjela CD8 T u slezeni miševa C57BL/6J. Miševi C57BL/6J i PrP KO miševi inficirani su na postnatalni dan 1 sa 400 PFU MCMV-a. Prikazan je postotak limfocita CD8+ T u slezeni i jetri 14 dana polije infekcije. Prikazane su pojedine srednje vrijednosti \pm SEM (n=6-8). Prikazani podaci reprezentativni su za 2 neovisna eksperimenta. Statistička analiza provedena je Mann-Whitneyjevim (U) testom. Naznačena je statistička značajnost ns = nije statistički značajno.

Također, imunohistokemijsko bojenje limfocita CD8 T na parafinskim rezovima mozga miševa PrP KO i C57BL/6J 14 dana inficiranih (slika 24) pokazuje kako nema razlika u broju limfocita CD8 T među sojevima, što je u skladu s rezultatima protočne citometrije u perifernim organima.



Slika 24. Nema razlike u broju stanica CD8 T između miševa PrP KO i C57BL/6J nakon infekcije MCMV-om. Novookočeni miševi C57BL/6J i PrP KO inficirani su sa 400 PFU MCMV-a na postnatalni dan 1. Provedeno je imunohistokemijsko bojenje limfocita CD8 T na parafinskim rezovima mozga sakupljenim 14 dana nakon infekcije (n= 5) Prikazane su dva reprezentativna prikaza po soju.

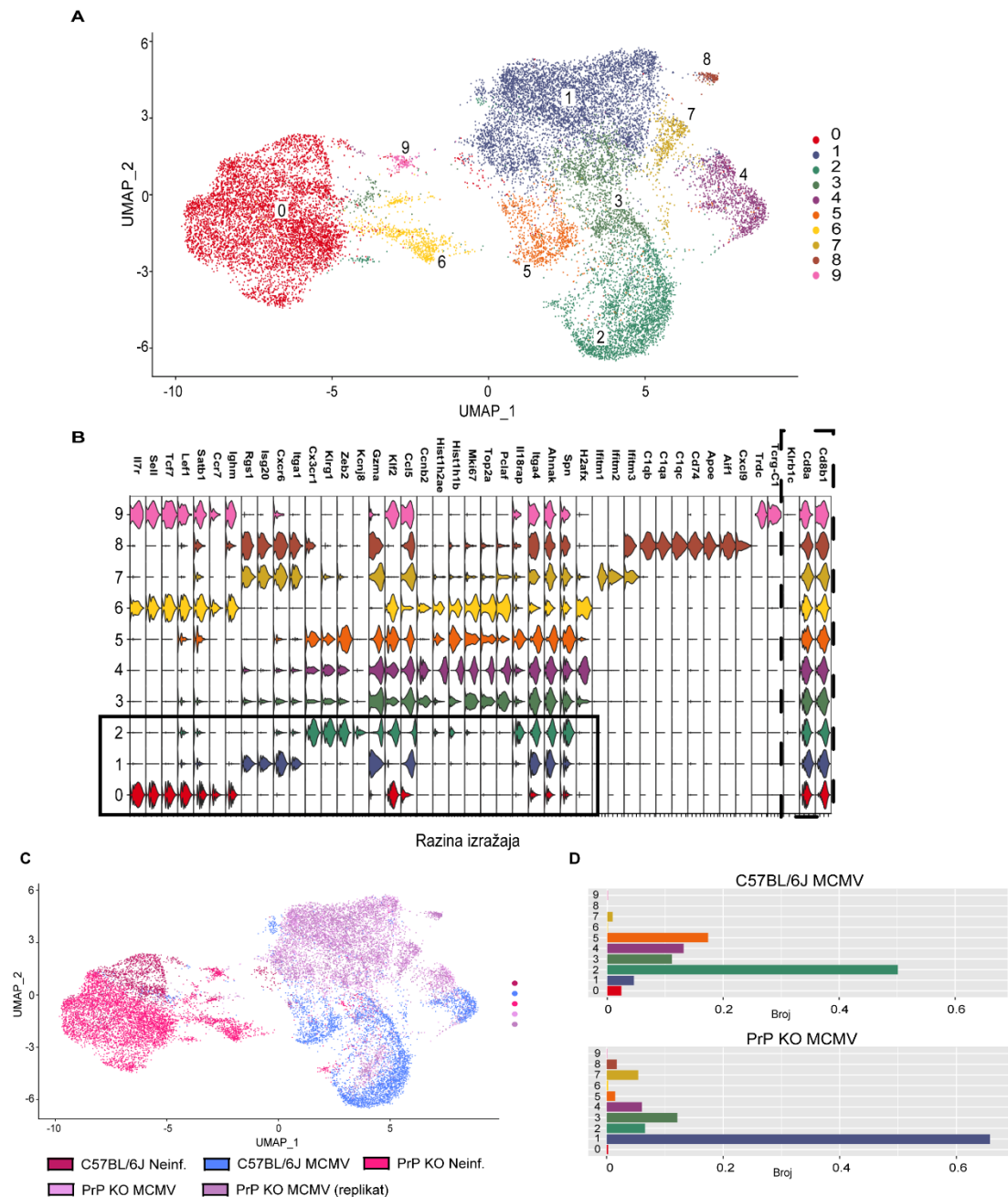
Infekcija moždanog tkiva i perifernih tkiva je praćena infiltracijom mononuklearnih limfocita. Mozak je izuzetno dobro prokrvljeno tkivo, kao što su to i jetra, slezena koje smo do sada analizirali u ovom kontekstu. Drugim riječima, analiza stanica krvi relevantna je za imunosne procese u svim tkivima. Analizom virus-specifičnih stanica CD8 T putem tetramera utvrđeno je kako 14 dana poslije infekcije u miševa PrP KO nalazimo značajno veći postotak ovih stanica nego u miševa WT soja (slika 25). Od važnosti je primijetiti i da je istovjetan rezultat dobiven već 8 dana nakon infekcije, što znači da su limfociti CD8 T zaista mogli utjecati povoljno na kontrolu patoloških promjena u mozgu, poput primijećenog poboljšanja kod debljine sloja EGL ili broja stanica mikroglije, koje se uobičajeno mjere između 9. i 10. dana kad su virusom-izazvane promjene najznačajnije.



Slika 25. Udio virus-specifičnih limfocita CD8+ T u krvi miševa PrP KO je povišen u odnosu na WT miševe. Novookočeni miševi C57BL/6J i PrP KO inficirani su s 400 PFU MCMV-a na postnatalni dan 1. Izolirane su imunosne stanice iz krvi. Prikazan je postotak limfocita CD8+ T specifičnih za virusni epitop M45 u krvi miševa C57BL/6J i PrP KO 8 i 14 dana poslije infekcije MCMV-om. Prikazane su pojedine životinje (krugovi) te srednje vrijednosti \pm SEM (n = 5-8). Statistička analiza provedena je Mann-Whitneyjevim (U) testom. Naznačena je statistička značajnost (**, P < 0,01).

4.8.2. Limfociti CD8 T miševa PrP KO imaju različit profil transkripcije u odnosu na one divljeg tipa u prirodnoj MCMV-infekciji.

Kako bi identificirali karakteristične značajke limfocita CD8 T, proveli smo RNK-sekvenciranje na razini jedne stanice (engl. single cell RNA sequencing, scRNAseq). Prikupljeni su uzorci tkiva slezene neinficiranih i inficiranih životinja oba soja. Kod uzoraka slezene, sortiranjem protočnom citometrijom smo razvrstali stanice CD8 T iz MCMV-inficiranih i neinficiranih miševa PrP KO i C57BL/6J 14 dana nakon infekcije. Knjižnicu transkriptata za sekvenciranje pripremili smo iz sortiranih stanica pomoću 10x Genomics tehnologije (detaljnije opisano u materijalima metodama). Također smo pripremili biološki replikat uzorka slezene inficiranih miševa PrP KO, kako bismo imali internu kontrolu reproducibilnosti analize. Naime, analize transkriptoma na razini jedne stanice (engl. *Single cell RNA Seq*) su financijski zahtjevne i nije moguće ponavljati eksperimente uobičajenom dinamikom od tri replikata. Na temelju transkriptoma, limfocite CD8 T smo odlučili razvrstati na 10 klastera (slika 26 A), svaki sa svojim uzorkom ispoljavanja gena (slika 26 B). Stanice CD8 T neinficiranih miševa nisu se razlikovale između sojeva te su dominantno pripadale istom klasteru, klasteru 0. Limfociti CD8 T dobiveni iz MCMV-inficiranih miševa WT i PrP KO su se značajno razlikovali (slika 26 C i D). U inficiranih miševa, klaster 1 se pokazao dominantnim u miševa PrP KO, dok klaster 2 prevladava u miševa WT (slika 26 C i D).

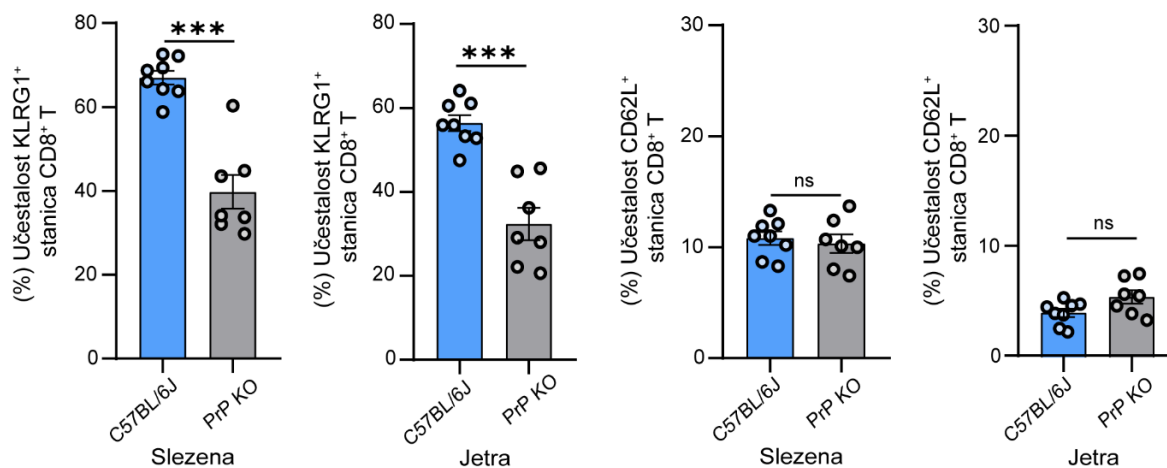


Slika 26. scRNAseq analiza fenotipskih razlika stanica CD8 T miševa PrP KO i WT. (A-D) scRNAseq analiza: (A) UMAP vizualizacija scRNAseq podataka stanica CD8 T s istaknutim klasterima. Klasteri 0-10 označeni su na UMAP-u. (B) Violinski prikaz ekspresije gena specifičnih za pojedini klaster. Naznačeni su klasteri 0, 1 i 2, s linijama koje predstavljaju najvažnije gene (puna linija) te gene koji dokazuju da se radi o stanicama CD8 T (isprekidana linija). (C) UMAP vizualizacija scRNAseq podataka stanica CD8 T s istaknutim nazivima uzoraka. Prikazano je pet uzoraka slezene, neinficirane slezene oba soja te inficirane slezene oba soja; peti uzorak predstavlja biološki replikat slezene inficiranog miša PrP KO. (D) Barplot koji prikazuje raspodjelu klastera u skupinama zaraženim MCMV-om.

Klaster 0 definira naivne stanice CD8 T koje dominiraju u oba soja neinficiranih miševa i karakteriziran je ispoljavanjem markera Sell⁺ (CD62L⁺) i IL7r⁺ (CD127⁺), dok su ti markeri

očekivano odsutni u oba dominantna klastera (1 i 2) zaraženih miševa. Klaster 2 ima karakterističan uzorak koji se očekuje za CD8 T efektorske stanice u fazi početne kontrakcije (CD62L-IL7r-Klrg1+CXCR1+) te ukazuje na kratkotrajne efektorske stanice (204). Nasuprot tome, klaster 1 (PrP KO) karakteriziran je neobičnom kombinacijom markera CD62L-IL7r-Klrg1-CX3CR1- (slika 26 D) smještenih između obrazaca faze ekspanzije i kontrakcije i prema dostupnoj literaturi nije karakterističan za odgovor na MCMV-infekciju (205).

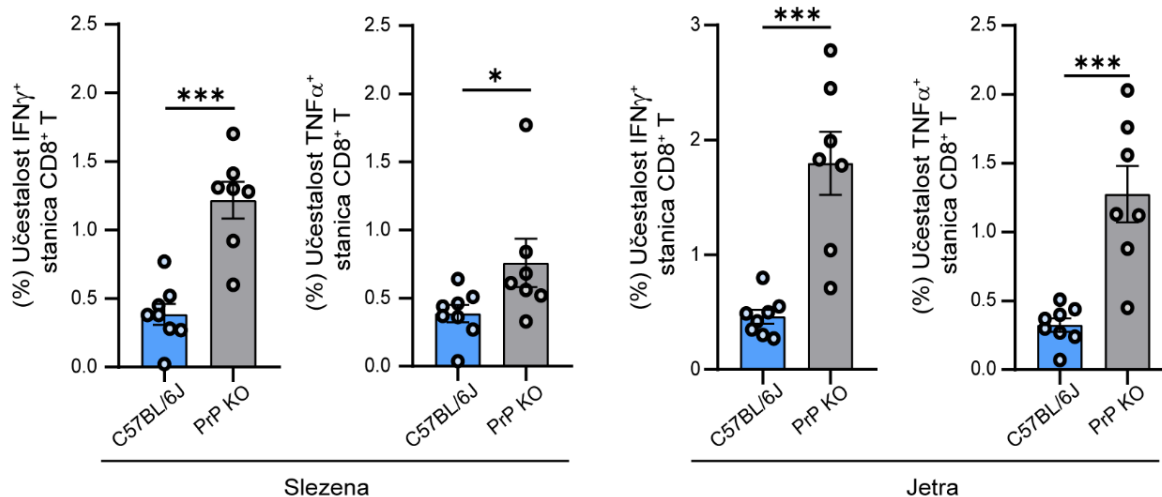
Obzirom da se radi o metodi visoke propusnosti, uobičajeno je podatke dobivene RNASeq analizom potvrditi nekom drugom metodom, za određeni broj nalaza. Također, RNASeq analiza daje informaciju o transkriptima, dok smo mi odlučili provjeriti reflektira li se primijećena razlika ili odsustvo razlike na proteinskom nivou. Odabrane su molekule kandidati CD62L, koja se nije razlikovala između sojeva, te molekula KLRG1 za koju je RNASeq analiza utvrdila razliku između sojeva. Razine ispoljavanja proteina KLRG1 i CD62L na stanicama CD8 T određene su protočnom citometrijom (slika 27) te su bile potpuno u skladu s podacima transkriptomskog sekvenciranja na razini jedne stanice (slika 26). CD62L, još poznat pod nazivom L-selektin, važna je molekula u migriranju limfocita T u periferne limfne čvorove. CD62L je prisutan na naivnim limfocitima, a njegovo prisustvo na memorijskim limfocitima T omogućava razlikovanje centralne memorije i efektorske memorije. Sukladno analizi transkripata, nismo uočili razlike u ispoljavanju proteina CD62L na limfocitima CD8 T iz inficiranih miševa PrP KO i WT. Obzirom da je Klaster 2, karakterističan za limfocite WT miševa, označavao efektorsku fazu karakteriziranu snažnim izražajem transkripta Klrg1, očekivali smo da će stanice iz miševa WT imati povećanu količinu ovog proteina na svojoj površini. U skladu s očekivanjima u miševa C57BL/6J uočili smo statistički značajno veću učestalost markera aktivacije KLRG1 u oba tkiva, slezeni i jetri.



Slika 27 Odnos proteina KLRG1+ i CD62L+ na površini limfocita CD8+ T u slezeni i jetri miševa PrP KO i WT 14 dana poslije infekcije MCMV-om odgovara razini transkripata. Miševi C57BL/6J i PrP KO inficirani su na postnatalni dan 1 sa 400 PFU MCMV-a. Prikazan je postotak limfocita CD8+ T pozitivnih za biljeg KLRG1+ te CD62L+ u tkivu slezene i jetre miševa C57BL/6J i PrP KO 14 dana poslije infekcije MCMV-om. Prikazane su pojedine životinje (krugovi) te srednje vrijednosti \pm SEM (n = 7-8). Statistička analiza provedena je Mann-Whitneyjevim (U) testom. Naznačena je statistička značajnost (ns, nije statistički značajno; ***, P < 0,001).

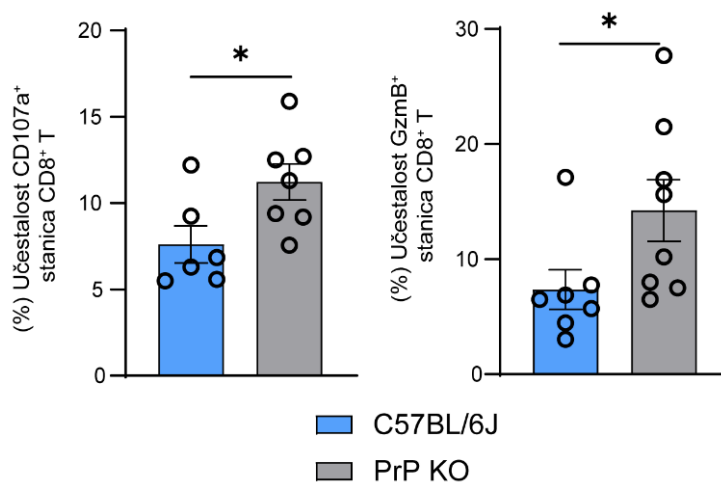
4.8.3. Funkcionalni status limfocita CD8 T, mjerenjem IFN γ i TNF α , pokazuje jaču aktivnost limfocita CD8 T u miševa PrP KO u odnosu na divlji tip

Nakon što smo fenotipski analizirali limfocite CD8 T slijedila je funkcionalna karakterizacija testovima proizvodnje pro-upalnih citokina. IFN γ je ključni citokin urođene i stečene imunosti u obrani domaćina od virusnih infekcija, a TNF α je snažni pro-upalni mediator. Kako bi usporedili sposobnost produkcije citokina između sojeva, limfocite CD8 T smo izolirali iz slezene i jetre inficiranih novoookćenih miševa PrP KO. Protočnom citometrijom smo odredili IFN γ i TNF α pozitivne stanice, te uvidjeli da PrP KO limfociti CD8 T imaju značajno bolju sposobnost proizvodnje citokina IFN γ i TNF α (slika 28).



Slika 28. Udio limfocita CD8 T koji su IFN γ ili TNF α pozitivni je povišen u slezeni i jetri miševa PrP KO miševa u odnosu na miševe WT 14 dana poslije infekcije MCMV-om. Miševi C57BL/6J i PrP KO inficirani su na postnatalni dan 1 sa 400 PFU MCMV-a. Prikazan je postotak limfocita CD8⁺ T pozitivnih za citokine IFN γ i TNF α u tkivu slezene i jetre miševa C57BL/6J i PrP KO 14 dana poslije infekcije MCMV-om. Prikazane su pojedine životinje (krugovi) te srednje vrijednosti \pm SEM (n = 7-8). Statistička analiza provedena je Mann-Whitneyjevim (U) testom. Naznačena je statistička značajnost (*, P < 0,05; ***, P < 0,001).

CD107a/LAMP-1 naširoko se koristi kao marker za degranulaciju citotoksičnih limfocita. Granzim B je jedna od citotoksičnih molekula koja se uobičajeno detektira kod procjene kapaciteta citotoksičnosti limfocita CD8 T. Sljedeći korak u dokazivanju bolje kapaciteta citotoksičnosti limfocita CD8 T iz miševa PrP KO da uklone MCMV bila je usporedba njihove degranulacijske sposobnosti mjerenjem molekule CD107a te količine proizvedenog granzima B.



Slika 29. Udio limfocita CD8 T koji su CD107a ili Granzim B pozitivni je povišen u slezeni miševa PrP KO u odnosu na miševе divljeg tipa 14 dana poslije infekcije MCMV-om. Miševi C57BL/6J i PrP KO inficirani su na postnatalni dan 1 sa 400 PFU MCMV-a. Prikazan je postotak limfocita CD8+ T pozitivnih za CD107a ili Granzim B (GzmB) u tkivu slezene i jetre miševa C57BL/6J i PrP KO 14 dana poslije infekcije MCMV-om. Prikazane su pojedine životinje (krugovi) te srednje vrijednosti \pm SEM (n = 7-8). Statistička analiza provedena je Mann-Whitneyjevim (U) testom. Naznačena je statistička značajnost (*, P < 0,05; ***).

Miševi PrP KO su prethodno pokazali bolju učinkovitost u rješavanju MCMV-infekcije obzirom da su imali manji titar virusa u usporedbi s miševima divljeg tipa te veću učestalost virus-specifičnih limfocita CD8 T. Spomenuti rezultati, zajedno s ovdje prikazanim jačim kapacitetom proizvodnje protuvirusnog IFN γ i proupalnog TNF α citokina te pojačanim kapacitetom citotoksičnosti navode na zaključak da su stanice CD8 T iz miševa PrP KO učinkovitije u razrješavanju infekcije.

4.9. MCMV-infekcija u novookoćenih miševa drastično mijenja profil velikog broja citokina, pri čemu je samo manji broj izmijenjen ovisno o prisutnosti proteina PrP

Studije u kojima su citokini ispitivani u MCMV-modelu prirodene infekcije usredotočile su se na uzorke mozga, kao organa koji biva inficiran samo u slučaju novookoćenih miševa i koji je time primaran cilj analiza čija je uloga razotkriti mehanizme oštećenja mozga u infekciji novorođenčadi. Pri tome periferni organi poput slezena ili jetra nisu testirani ni u jednom od slučajeva. Obzirom da je MCMV virus sa širokim tropizmom i da smo mi utvrdili kako je uloga proteina PrP slična u imunologiji limfocita CD8 T u različitim tkivima, odlučili smo da u prvom koraku napravimo sveobuhvatnu analizu citokina u MCMV-infekciji novookoćenih miševa (Tablica 9).

Tablica 9. Koncentracija citokina i kemokina procijenjena je u prirodno inficiranih miševa soja C57BL/6J (WT) 9 i 14 dana nakon infekcije (dpi). Miševi su inficirani s 400 PFU MCMV-a na postnatalni dan 1. Na 9 ili 14 dpi, miševi su eutanazirani, a tkiva mozga i slezene sakupljena su u obje vremenske točke, dok su tkiva jetre sakupljena samo na 9 dpi. Koncentracije analita u inficiranoj skupini uspoređene su s onima u neinficiranoj kontrolnoj skupini. Ako su se značajno promijenile nakon infekcije, bile su istaknute: zeleno za povišene razine i crveno za smanjene razine. Na 9 dpi, skupine su se sastojale od 4 naivna C57BL/6J miša i 5 C57BL/6J miševa inficiranih MCMV-om, dok je na 14 dpi bilo 5 naivnih C57BL/6J miševa i 5 C57BL/6J miševa zaraženih MCMV-om. Statistička značajnost određena je Studentovim t-testom.

Jetra 9 dpi											
Citokini		IFN α	IFN γ	TNF α							
IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-3								
IL-4	IL-5	IL-6	IL-9								
IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-15								
IL-17A	IL-18	IL-19	IL-22								
IL-23	IL-25	IL-27	IL-28								
IL-31	IL-33										
Kemokini		CXCL5		CXCL10							
CCL2	CCL3	CCL4	CCL5								
CCL7	CCL11	CXCL1	CXCL2								
Slezena 9 dpi				Mozak 9 dpi							
Citokini		IFN α	IFN γ	TNF α	Citokini		IFN α	IFN γ	TNF α		
IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-15
IL-17A	IL-18	IL-19	IL-22	IL-23	IL-25	IL-27	IL-28	IL-31	IL-33		
IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-15				
IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-15	IL-17A	IL-18	IL-19	IL-22				
IL-17A	IL-18	IL-19	IL-22	IL-23	IL-25	IL-27	IL-28				
IL-23	IL-25	IL-27	IL-28	IL-31	IL-33						
IL-31	IL-33										
Kemokini		CXCL5	CXCL10	Kemokini		CXCL5	CXCL10				
CCL2	CCL3	CCL4	CCL5	CCL2	CCL3	CCL4	CCL5				
CCL7	CCL11	CXCL1	CXCL2	CCL7	CCL11	CXCL1	CXCL2				
Slezena 14 dpi				Mozak 14 dpi							
Citokini		IFN α	IFN γ	TNF α	Citokini		IFN α	IFN γ	TNF α		
IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-15
IL-17A	IL-18	IL-19	IL-22	IL-23	IL-25	IL-27	IL-28	IL-31	IL-33		
IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-15				
IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-15	IL-17A	IL-18	IL-19	IL-22				
IL-17A	IL-18	IL-19	IL-22	IL-23	IL-25	IL-27	IL-28				
IL-23	IL-25	IL-27	IL-28	IL-31	IL-33						
IL-31	IL-33										
Kemokini		CXCL5	CXCL10	Kemokini		CXCL5	CXCL10				
CCL2	CCL3	CCL4	CCL5	CCL2	CCL3	CCL4	CCL5				
CCL7	CCL11	CXCL1	CXCL2	CCL7	CCL11	CXCL1	CXCL2				

Za detekciju topivih čimbenika imunskog odgovora korištena je multipleks tehnologija pod nazivom Luminex i pri tome kit koji detektira 48 upalnih medijatora, a koji

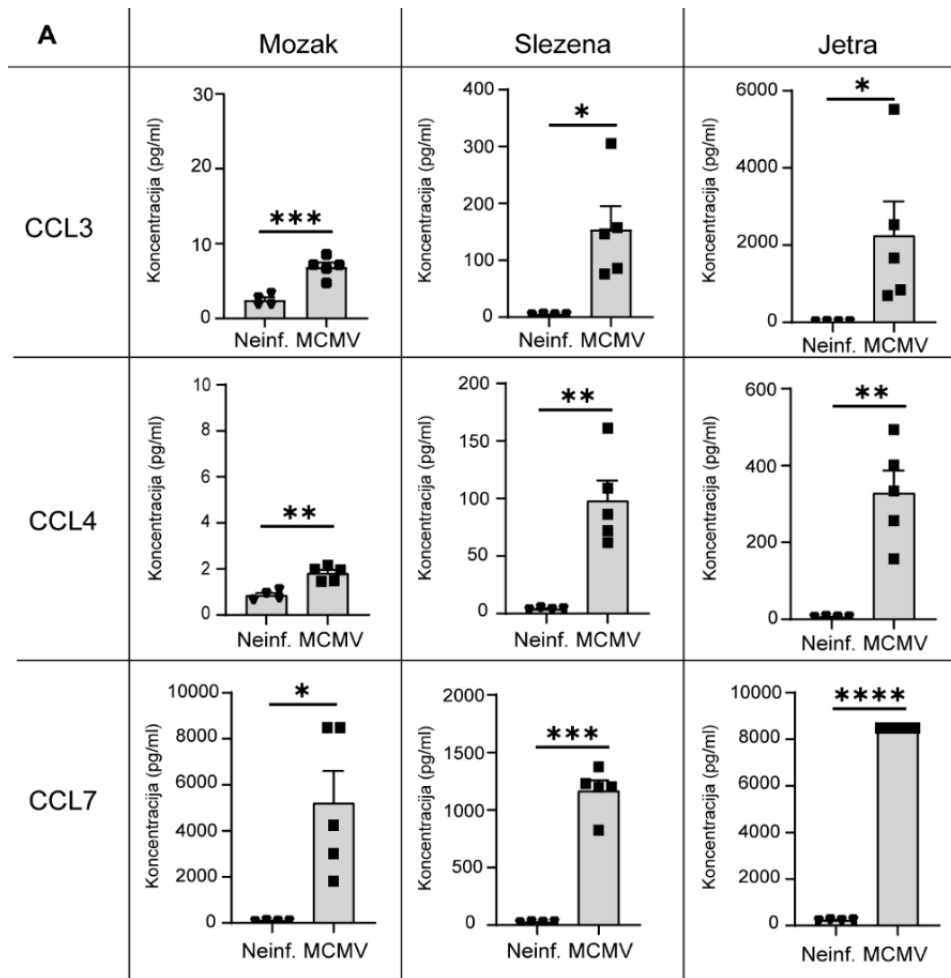
obuhvaćaju 32 citokina, 10 kemokina, 3 čimbenika/regulatora rasta i 3 topljiva receptora. Prikazana su 3 organa pogođena infekcijom: slezena, mozak i jetra. Tkiva su procesirana i rezultati su analizirani kako je detaljnije opisano u materijalima i metodama. Organi su sakupljeni iz MCMV-inficiranih i neinficiranih C57BL/6J i PrP KO miševa 9 dana nakon infekcije, dok su slezena i mozak također analizirani i 14 dana poslije infekcije kako bi se pratila vremenska točka koja odgovara vrhuncu CMV-infekcije u mozgu.

Uspješno smo detektirali 47 od 48 analiziranih molekula u obje vremenske točke, a samo IL-7 nije bio detektiran niti u jednom tkivu. Čak 16 analita bilo je statistički povišeno u svim organima 9 dana poslije infekcije. Među njima, devet citokina i šest kemokina ostali su statistički povišeni u slezeni i mozgu 14 dana poslije infekcije (Tablica 9). Pri tome su potvrđeni i svi proupalni medijatori poput $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-18$, $CCL2$ i $CCL5$ koji su i prethodno su pokazani povišeni po CMV-infekciji u istraživanjima mozga ili seruma.

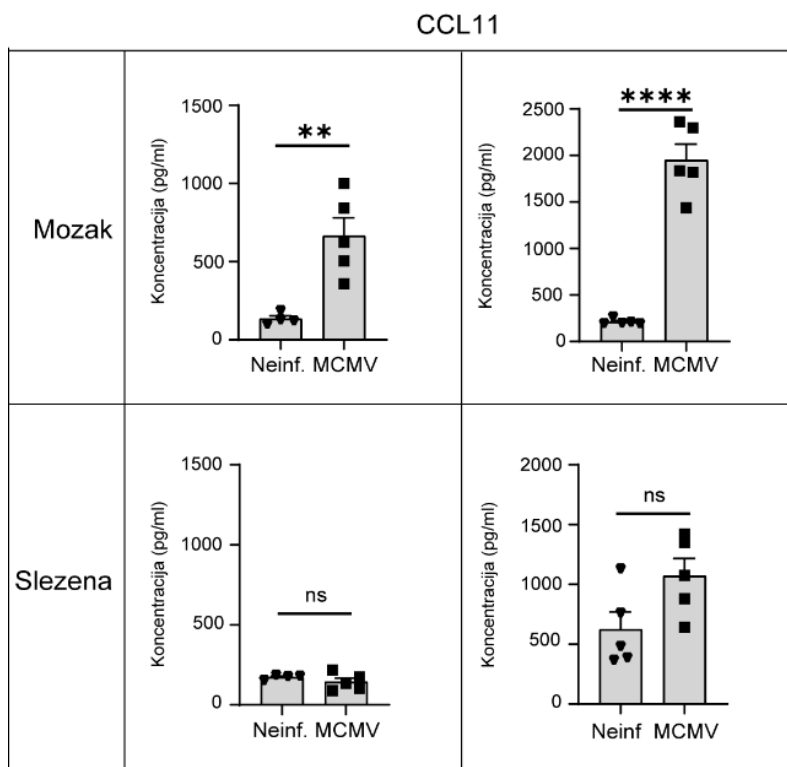
U modelu prirodene MCMV infekcije s intraperitonealnom inokulacijom, slezena je jedan od prvih organa na periferiji koji se inficira, a virus se može detektirati već drugi dan nakon infekcije (138,206). Od 48 analita, u slezeni ih je 26 bilo značajno povišeno na 9. dan infekcije, a 7 nije bilo detektabilno. Također smo mogli uočiti 2 značajno smanjena proteina po infekciji: $IL-33$ i njegov receptor $IL-33R$. U kasnijoj vremenskoj točki, dodatnih pet citokina značajno je poraslo, povećavajući broj na 31. Nijedan od citokina koji su bili značajno niži 9. dan infekcije nije ostao značajno smanjen 14. dana, no $IL-33$ i $IL-33R$ i dalje pokazuju trend pada. U odraslih životinja pokazano je kako prisutnost $IL-33$ potiče ekspanziju i diferencijaciju limfocita CD8 T te njihov efikasniji efektorski odgovor u virusnoj infekciji (207). Sa 33 povišena citokina nakon infekcije, jetra se ponašala slično slezeni. Za razliku od slezene, nismo uočili značajno smanjenje ni jednog od citokina u jetri.

Obzirom da prirodena CMV-infekcija predstavlja najčešći uzrok trajnih neurorazvojnih promjena i naš je fokus na topive medijatore imunskog odgovora bio na tkivu mozga. Pri tome je više od polovice analita koje smo odredili u tkivu MCMV-inficiranog mozga po prvi puta određeno. 9 dana nakon infekcije utvrdili smo značajno povećanje 25 analita po CMV-infekciji (Tablica 9). Među molekulama koje privlače imunosne stanice, a koje do sada nisu analizirane, detektiran je značajan porast razine kemokina $CCL3$, $CCL4$ i $CCL7$ po infekciji. Porast je primijećen u svim ispitivanim tkivima (slika 30). Dodatno, uočili smo da je kemokina $CCL11$ izrazito povišen u mozgu nakon CMV infekcije u obje vremenske točke, dok se takvo povećanje razine nije dogodilo u drugim organima, poput slezene (slika 31). 14 dana poslije

infekcije mozak doseže plato virusnog titra u modelu prirodene infekcije MCMV-om. Osam dodatnih citokina, u početku podjednakih između neinficiranih i inficiranih miševa, postalo je statistički povišeno u skupini MCMV-inficiranih (BAFF, BTC, IL-12p70, IL-27, IL-3, IL-4, LIF, RANKL), što ukazuje na očekivano pogoršavanje upale tijekom vremena.

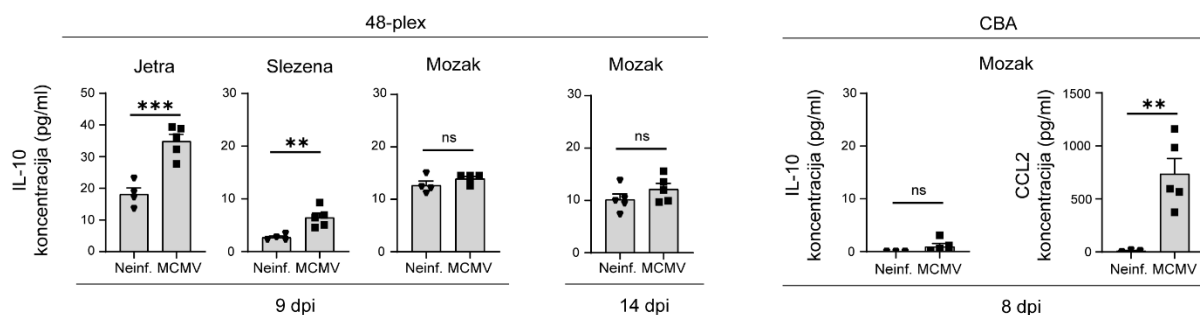


Slika 30. Utjecaj infekcije MCMV-om na porast kemokina CCL3, CCL4 i CCL7 u tkivima. Miševi C57BL/6J inficirani su intraperitonealno sa 400 PFU na postnatalni dan 1. Prikaz koncentracija CCL3, CCL4 i CCL7 u tkivu mozga, slezene i jetre 9 dana poslije infekcije. Koncentracije analita su mjerene ProcartaPlexom izražene kao pg/ml. Prikazane su srednje vrijednosti + SEM (n = 4–5). Korišten je Studentov t-test. Vrijednost $P > 0,05$ ne smatra se statistički značajnom (ns); *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$.



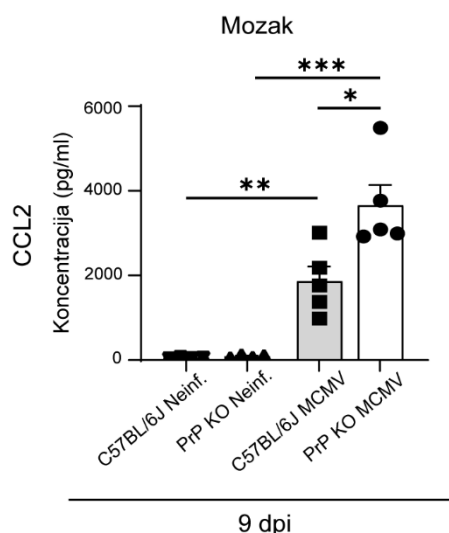
Slika 31. Povišena koncentracija kemokina CCL11 uslijed infekcije u tkivu mozga. Miševi C57BL/6J inficirani su intraperitonealno sa 400 PFU na postnatalni dan 1. Prikaz koncentracija CCL11 u tkivu mozga i slezene 9. i 14. dan poslije infekcije. Koncentracije analita su mjerene ProcartaPlexom izražene kao pg/ml. Prikazane su srednje vrijednosti + SEM (n = 4–5). Korišten je Studentov t-test. Vrijednost $P > 0,05$ ne smatra se statistički značajnom (ns); **, $P < 0,01$; ****, $P < 0,0001$.

Usredotočujući se na protuupalne citokine ključne za kontroliranu regulaciju imunskog odgovora, IL-10 je imao poseban obrazac. Dok je IL-10 pokazao povišene razine u svim tkivima 9 dana poslije infekcije, uočena je iznimka u mozgu (slika 32, lijevi panel). Izostanak povećanja u mozgu izmjeren je i 14 dana po infekciji, kada je virusni titar i upalni odgovor u mozgu naj snažniji. Postojeća istraživanja na odraslim miševima IL-10 KO (208) istaknula su posljedice odsutnosti IL-10, naglašavajući imunopatologiju posredovanu s $TNF\alpha$. Obzirom da je Luminex tehnologija također metoda visoke propusnosti odlučili smo potvrditi neke od analita neovisnom metodom. Odabrali smo upravo analit IL-10. Naša potvrda korištenjem CBA citokinskog kompleta potvrdila je nedostatak povećanja IL-10 u mozgu nakon CMV infekcije 8. dana nakon infekcije (slika 32, desni panel). Istodobno, CCL2, koji je služio kao pozitivna kontrola, pokazao je očekivani porast.



Slika 32. IL-10 je pod utjecajem infekcije MCMV-om u perifernim organima. Miševi C57BL/6J inficirani su intraperitonealno sa 400 PFU na postnatalni dan 1. Koncentracije IL-10 u tkivu mozga, slezene i jetre 9 dana poslije infekcije te u mozgu 14 dana poslije infekcije mjerene su ProcartaPlexom (lijevo). Koncentracije IL-10 i CCL2 mjerene su u tkivu mozga 8. dan nakon infekcije neovisnim testom (CBA) u tkivu mozga. Koncentracije analita izražene kao pg/ml. Prikazane su srednje vrijednosti + SEM (n = 4–5). Korišten je Studentov t-test. Vrijednost $P > 0,05$ ne smatra se statistički značajnom (ns): **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

Za razliku od potpunog preobražaja citokinskog obrasca, kao i obrasca drugih solubilnih medijatora upale koji primjećujemo između neinficiranih i inficiranih životinja, sam protein PrP nije statistički značajno utjecao na veći broj analita sudeći po usporedbi inficiranih uzoraka PrP KO i WT. Možemo istaknuti upravo njegov utjecaj na molekulu CCL2. Model kemokina CCL2 prepoznat je po svojoj središnjoj ulozi u CMV infekciji u mozgu i povezanosti s PrP u virusnim infekcijama kao što je HIV u mozgu (67), ali i kao jedan od snažno ispoljenih kemokina u središnjem živčanom sustavu kod infekcija neurotrofnim virusima (202,203). Ovdje pokazujemo da su razine CCL2 značajno povećane u mozgovima miševa PrP KO zaraženih MCMV-om u odnosu na mozgove miševa WT inficiranih MCMV-om (slika 33). U konačnici, naše istraživanje (209) otkrilo je nove informacije o nizu solubilnih medijatora upale tijekom infekcije novorođenih miševa virusom MCMV, uključujući utjecaj proteina PrP na neke. Unatoč povećanim razinama $IFN\gamma$ i $TNF\alpha$ u virus-specifičnim limfocitima CD8 T kod miševa PrP KO, izostanak PrP-a nije statistički značajno utjecao na ukupne razine $IFN\gamma$ i $TNF\alpha$ u homogenatima tkiva. Ovaj rezultat nije iznenađujuć s obzirom na kompleksnost međusobnih interakcija koje doprinose razinama citokina.



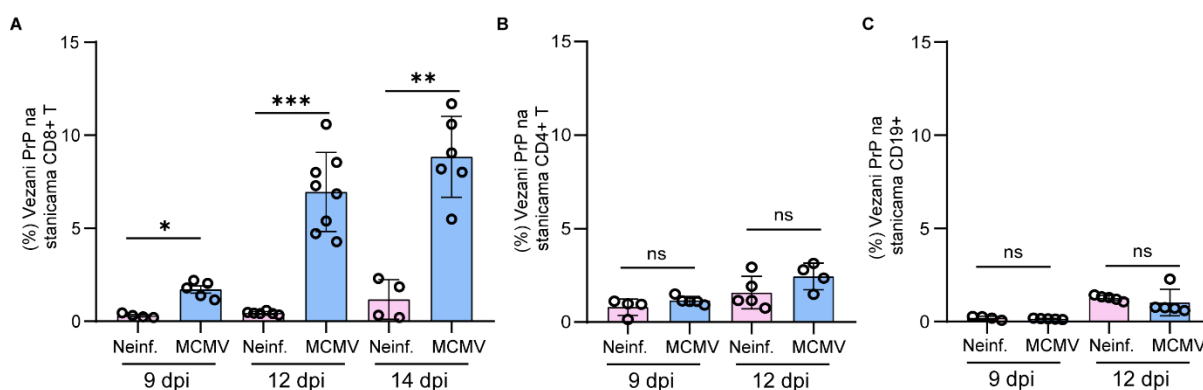
Slika 33. Prisustvo proteina PrP utječe na razine kemokina CCL2. Usporedba koncentracije kemokina CCL2 u tkivu mozga na grafičkom prikazu pokazuje da se u slučaju nedostatka proteina PrP podiže razina kemokina CCL2 u tkivu mozga inficiranih životinja u odnosu na inficirane miševe divljeg tipa. Koncentracije u mozgu 9 dana poslije infekcije MCMV-om mjerene su ProcartaPlexom. Koncentracija CCL2 izražena je kao pg/ml. Prikazane su srednje vrijednosti + SEM (n = 4–5). Korišten je Studentov t-test. Vrijednost $P > 0,05$ ne smatra se statistički značajnom (ns); **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

4.10. Vežanje sPrP na limfocite CD8 T limfocite slabi njihovu efektorsku funkciju

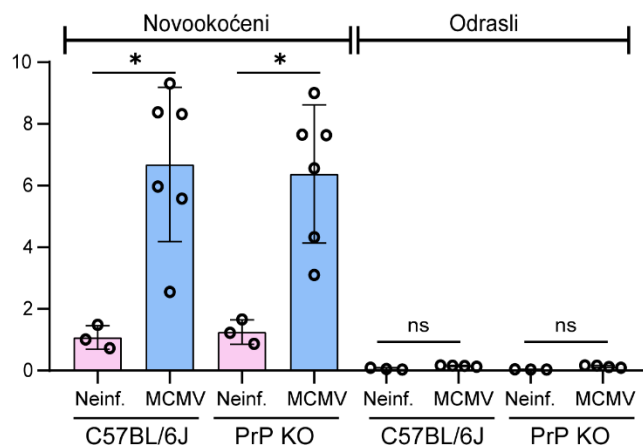
In vitro smo ustanovili da inficirane stanice prvo povećavaju proizvodnju, a zatim i odcjepljivanje proteina PrP. *In vivo* smo ustanovili kako životinje divljeg tipa imaju veći titar virusa od jedinki PrP KO te da je razlika posredovana aktivnijim limfocitima CD8T. U miševa PrP KO detektirali smo veći postotak virus-specifičnih limfocita CD8 T te utvrdili kako oni luče više citotoksičnih molekula i ključnih protuvirusnih citokina, odnosno da su u suštini aktivniji i efikasniji. Obzirom da je dokazano kako imunosne stanice mogu vezati protein PrP, iako sam receptor nije utvrđen, sljedeće smo ispitali postoji li vežanje proteina PrP na limfocite CD8 T izolirane iz inficiranih miševa. U tu svrhu proizveden je mišji rekombinantni fuzijski protein PrP-Fc. PrP-Fc smo prvobitno ispitali na limfocitima neinficiranih miševa WT, no postotak limfocita CD8 T koji su vezali PrP-Fc bio je zanemariv. Također su neuspješni bili pokušaji vežanja PrP-Fc na stanične linije limfocita (RMA, RMA-S, YAC-1). Stoga smo pretpostavili da ukoliko limfociti CD8 T vežu protein PrP, to čine samo u kontekstu MCMV-infekcije. Limfociti iz inficiranih miševa su analizirani 9, 12 i 14 dana poslije infekcije te je uočeno značajno povećanje vežanja proteina PrP kod limfocita CD8 T u usporedbi s neinficiranim miševima (slika 34 A). Istovremeno, limfociti CD4 T i limfociti B nisu vezali

protein PrP, što predstavlja određen vid potvrde specifičnosti mjenenog fenomena (slika 34 B i C).

Iako receptor koji prepoznaje PrP na imunskim stanicama do sada nije utvrđen, poznato je kako sam protein PrP može ostvarivati TRANS-homodimere, odnosno vezivati se sam na sebe. Obzirom da smo pokazali kako se vezanje rekombinantnog PrP na limfocite CD8 T događa i u slučaju stanica izoliranih iz novookoćenih miševa PrP KO zaraženih MCMV-om, učinkovito smo isključili mogućnost PrP-PrP samo-asocijacije (slika 35, novookoćeni miševi). U skladu s izostankom razlika u virusnom titru među odraslim jedinkama dvaju sojeva, nije primijećeno niti vezanje PrP na odrasle stanice CD8 T iz MCMV-inficiranih miševa bilo kojeg genotipa (slika 35, odrasli miševi).

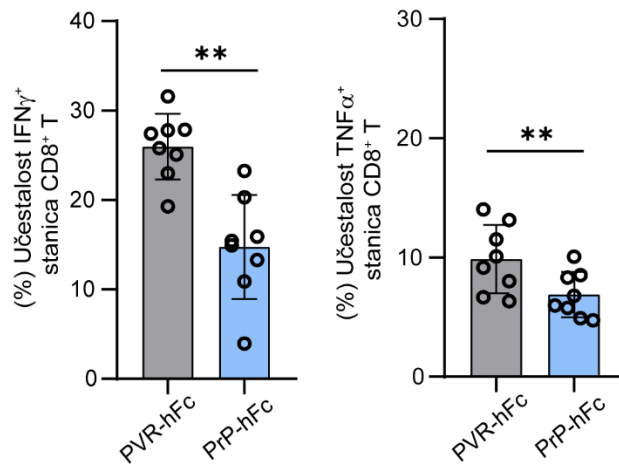


Slika 34. Vezanje rekombinantnog PrP-a specifično je za limfocite CD8 T iz inficiranih životinja. Analizom vezanja PrP-a na stanice izolirane iz novookoćenih miševa 9, 12 i 14 dana poslije infekcije, opazili smo značajno povećanje vezanja proteina PrP u usporedbi sa stanicama CD8 T iz neinficiranih miševa (A). Nasuprot tome, limfociti CD4 T (B) i limfociti B (C) nisu pokazali povećano vezanje rekombinantnog PrP.



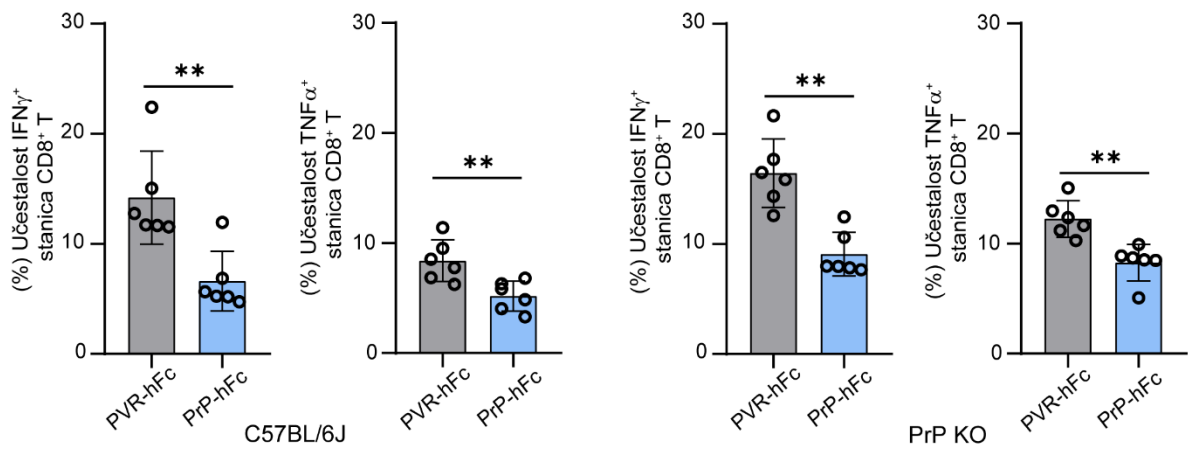
Slika 35. Vežanje rekombinantnog PrP-a specifično je za limfocite CD8 T iz inficiranih novookoćenih životinja. Analizom vežanja PrP-a na stanice izolirane iz novookoćenih miševa PrP KO i C57BL/6J, opazili smo jednako povećanje vežanja proteina PrP na stanice CD8 T iz iz oba soja (novookoćeni) Nasuprot tome, odrasli miševi inficirani MCMV-om nisu pokazali povećano vežanje rekombinantnog PrP.

Kako bismo utvrdili na koji način vezani PrP utječe na efektorske funkcije limfocita CD8 T provedena su mjerenja proizvodnje citokina IFN γ i TNF α u prisutnosti PrP-Fc protočnom citometrijom. Naime, jedno objašnjenje veće količine virusa u životinja divljeg tipa je da se odcjepljeni sPrP - prisutan u novookoćenim miševima WT, ali ne i u miševima PrP KO koji ne posjeduju PrP - veže na limfocite CD8 T i slabi njihovu efektorsku funkciju. U tu svrhu, novookoćeni miševi C57BL/6J i PrP KO inficirani su MCMV-om te su prikupljene njihove slezene iz kojih su izolirane imunostne stanice. Kako bismo procijenili utjecaj vežanja PrP na stanice CD8 T, inkubirali smo splenocite izolirane iz inficiranih novookoćenih miševa WT u prisutnosti ili odsutnosti rekombinantnog PrP i izmjerili njihovu sposobnost da proizvode protuvirusni citokin IFN γ i proupalni citokin TNF α . Prema našoj hipotezi, očekivali smo da će vežanje PrP-a inhibirati limfocite CD8 T. Isto bi bilo u skladu s jačom aktivacijom i poboljšanim uklanjanjem virusa uočenim kod limfocita CD8 T u miševa s nedostatkom PrP-a. Limfociti CD8 T izolirani iz MCMV-inficiranih miševa C57BL/6J pokazali su oslabljenu proizvodnju citokina u prisutnosti rekombinantnog PrP u usporedbi s kontrolama (slika 36). Ovo opažanje potvrđuje da se odgovor stanica CD8 T na MCMV-infekciju kod novorođenih miševa može utišati vežanjem odcjepljenog proteina sPrP.



Slika 36. Vežanje rekombinantnog PrP-a na limfocite CD8 T utišava njihovu aktivaciju, mjereno lučenjem citokina IFN γ i TNF α . Analizom inkubacije PrP-Fc ili irelevantnog rekombinantnog proteina PVR-Fc sa stanicama izoliranim iz novookoćenih miševa 14 dana poslije infekcije, opazili smo značajno smanjenje lučenja citokina IFN γ i TNF α od strane stanica CD8 T koje su inkubirane s proteinom PrP.

Obzirom da su stanice CD8 T iz PrP KO miševa vezale rekombinantni protein PrP podjednako kao i WT stanice, ispitali smo smanjuje li vežanje rekombinantnog PrP-a također i funkcionalni kapacitet stanica iz miševa PrP KO (slika 37).



Slika 37. Vežanje rekombinantnog PrP-a na limfocite CD8 T izolirane iz inficiranih miševa PrP KO utišava njihovu aktivaciju, mjereno lučenjem citokina IFN γ i TNF α . Provedena je analizom inkubacije PrP-Fc ili irelevantnog rekombinantnog proteina PVR-Fc sa stanicama izoliranim iz novookoćenih miševa 14 dana poslije infekcije. Opazili smo značajno smanjenje lučenja citokina IFN γ i TNF α od strane stanica CD8 T koje su inkubirane s proteinom PrP. Porijeklo stanica, bilo to iz miševa WT ili PrP KO nije utjecalo na ishod pokusa.

Potvrdili smo kako je vezivanje PrP na stanice iz miševa PrP KO podjednako učinkovito. Time zaključujemo da je PrP negativni regulator limfocita CD8 T u kontroli MCMV-infekcije u novookoćenim miševima. Obzirom da u miševa PrP KO sam PrP ne

postoji, njihovi limfociti će kao takvi razviti pojačani aktivacijski kapacitet i uspješnije uklanjati virus što dovodi do nižeg titra virusa i manjih virusom-induciranih oštećenja. Sve u svemu, ovi rezultati naglašavaju značajnu ulogu PrP-a u oblikovanju imunskog odgovora i patologije tijekom akutne virusne CMV-infekcije.

5. DISKUSIJA

Stanični prionski protein, PrP, primarno je istraživana zbog svog doprinosa u prionskim bolestima gdje je neophodan za replikaciju i patogenezu priona. Nasuprot tome, prepoznate su mnoge važne uloge u staničnim procesima s naglaskom na zaštitno djelovanje, poput smanjenja reaktivnih kisikovih vrsta, protu-apoptotskog djelovanja signalizacije povezane s preživljenjem stanica, poglavito neurona (6). Vezano uz ulogu u imunom sustavu, poznato je kako se PrP ispoljava na imunostanicama te je pokazano da se može i vezati na neke imunostanice. Nadalje, postoje implikacije ispoljavanja proteina PrP upravo u imunoprivilegiranim područjima organizma.

U virusnim infekcijama uloga PrP-a nije posebno dobro istražena, a njegov učinak je pripisan nekom od protektivnih učinaka nevezanih uz utjecaj na imunostanice tijekom infekcije. Kod virusa herpes simplex tipa 1 (HSV-1), kao jedinog predstavnika obitelji herpesvirusa istraživana u kontekstu uloge PrP-a tijekom infekcije, pokazalo se da PrP potiče autofagiju u astrocitima kao odgovor na infekciju virusom HSV-1 (99). Izravna razgradnja unutarstaničnih patogena putem autofagije je strategija za smanjenje replikacije unutarstaničnih patogena (210) te za olakšano predočavanje antigena stanicama stečene imunosti (211). Slično tome, PrP se pokazao protektivan kod EMCV-B (engl. *encephalomyocarditis virus variant B*) virusne infekcije, smanjujući apoptozu neurona hipokampusa što je povezano s ranije spomenutom funkcijom neuroprotekcije (97). Sprečavanje oštećenja mozga posredovano proteinom PrP je istraživano i pored infekcija neurotrofnim virusima. Upalni odgovor u mozgu kao posljedica eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (engl. *experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE) dovodi do imunopatologije posredovane između ostalog limfocitima T (212). Teži oblik bolesti s jačim upalnim odgovorom u EAE modelu pripisuje se nedostatku PrP-a (213,214), što ide u prilog predloženoj funkciji PrP-a u smirivanju imunostanica (28). U infekciji virusom gripe tipa A (engl. *influenza virus type A*, IAV) osim što je učinak proteina PrP bio povezan s boljim ishodom bolesti na temelju smanjenja apoptoze i ROS-a (215), pokazano je da stimulacija proteina PrP protutijelima dovodi do polarizacije makrofaga u protuupalni fenotip M2 i time smanjuje upalu u inficiranih miševa. Iako fenotip M2 smanjuje upalu i oštećenje, iz istraživanja nije jasno zašto to ujedno znači i manji izmjereni titar virusa gripe (216). U našem slučaju, pojačan odgovor posredovan limfocitima CD8 T u miševa u kojima nedostaje PrP pa time i njime posredovano utišavanje limfocita CD8 T, evidentan je način uklanjanja

citomegalovirusa. Uklanjanje virusa primijetili smo i u mozgu i u perifernim organima, uz izostanak pojačane patologije. Za razliku od našeg istraživanja, sva ostala navedena istraživanja provedena su na odraslim životinjama. U odraslih životinja citomegalovirus ne dospijeva do mozga te one nisu bile u fokusu našeg istraživanja, a korištenjem dobro utvrđenog modela prirodene infekcije (138), pokazali smo da je bolja kontrola infekcije citomegalovirusa u miševa PrP KO karakteristično povezana upravo s neonatalnom infekcijom i da izostaje u odraslih miševa.

HCMV je najčešći uzročnik prirodene infekcije virusom u novorođenčadi. Može rezultirati teškim neurološkim posljedicama koje proizlaze iz činjenice da virus iskorištava neučinkoviti imunski nadzor, prelazi krvno-moždanu barijeru i inficira mozak (127). Unatoč postojećim lijekovima koji su učinkoviti u odraslih (118,119), djeca zahvaćena simptomatskom perinatalnom infekcijom u određenom postotku pokazuju loše dugoročne ishode (133,134,217), a čak i asimptomatska infekcija nosi rizik od razvoja dugoročnih neuroloških oštećenja (130). Opseg oštećenja se uobičajeno pogoršava s protokom vremena, pri čemu imunski sustav igra složenu i često izazovnu ulogu u posredovanju imunopatologije umjesto da kontrolira infekciju i ograničava njome posredovano oštećenje tkiva (134,181). Citomegalovirusna infekcija uspostavlja se u gotovo svim organima, pri čemu je prati snažan upalni odgovor, no stanična imunost se kod novorođenčadi uspostavlja sporije (218). Dok se stanice NK nisu pokazale ključnima za kontrolu infekcije u novo-okoćenih miševa (160), odgovor limfocita CD8 T bio je prijeko potreban kako bi se zaustavila aktivna replikacija virusa (141,201). Naši rezultati su pokazali da novo-okoćeni miševi koji ne posjeduju protein PrP imaju manji titar virusa za vrijeme aktivnog stečenog odgovora na infekciju u ispitanim organima uključujući mozak. Također smo dokazali da je populacija stanica odgovorna za opaženi fenotip populacija limfocita CD8 T. U slučaju PrP KO miševa limfociti CD8 T brojili su više virus-specifičnih stanica uz bolji efektorski odgovor, a njihov obrazac transkripcijske aktivnosti, mjereno *single cell* RNASeq analizom, bio je značajno različit od onog u divljeg soja miševa.

Perinatalna infekcija CMV-om pokreće imunski odgovor karakteriziran pojavom proupalnih citokina i aktivacijom imunskih stanica (138,141,145,174,181,182), što vodi ka priljevu imunskih stanica u tkivo kroz privlačenje topivim medijatorima. Prethodna istraživanja u modelu prirodene MCMV-infekcije prioritetno su bila usredotočena na uzorke mozga sa ciljem da se razjasne mehanizmi oštećenja tkiva, iz razloga što virus inficira mozak isključivo u novo-okoćenih miševa. Uzimajući u obzir široki tkivni tropizam MCMV-a i

konzistentnu ulogu proteina PrP u imunobiologiji limfocita CD8 T u tkivima, proveli smo sveobuhvatnu analizu citokina u novo-okoćenih miševa inficiranih MCMV-om, proširujući naše istraživanje na periferne organe, uključujući slezenu i jetru. Postojeća istraživanja ograničila su se na mjerenje citokina u serumu i moždanom tkivu u prirodnoj infekciji MCMV-om, pri čemu je većina istraživača koristila testove određivanja koncentracije pojedinog proteina temeljene na testu ELISA ili detekciju pojedine RNK na razini prepisivanja. Mi opisujemo prvu sveobuhvatnu upotrebu multipleks analize, Luminexa, za definiranje razina citokina/kemokina u različitim tkivima u modelu prirodne MCMV-infekcije, gdje vidimo snažan porast velikog broja molekula s proupalnom funkcijom. Kvantificirali smo 48 topljivih medijatora imunskog odgovora, uključujući 32 citokina, 10 kemokina, 3 faktora rasta/regulatora i 3 topljiva receptora u slezeni, jetri, plućima i mozgu nakon 9 i 14 dana nakon infekcije. Naša analiza je otkrila 25 induciranih molekula u mozgu 9 dana nakon infekcije, a dodatnih 8 pokazuje statistički povišene odgovore 14 dana nakon infekcije. Specifično, svi analizirani citokini CCL skupine (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7 i CCL11) bili su povišeni 14 dana nakon infekcije u mozgu. Nadalje, podaci su otkrili različito regulirane analite u tkivima, kao što su CCL11, CXCL5 i IL-10 u mozgu, IL-33 / IL-33R u jetri i VEGF-a i IL-5 u plućima. Ispitivanje utjecaja PrP-a na sekretom, putem usporedbe razina u miševima s i bez PrP, ukazalo je kako PrP može utjecati na određene molekule, poput CCL2, i dovesti do njihove statističke razlike u mozgu novo-okoćenih životinja. Što se tiče istraživanja infekcije HCMV-om u ljudi, jedna prethodna studija bavila se analizom krvnog sekretoma nakon stimulacije specifične za CMV koristeći tehniku multipleksne detekcije (219). Međutim, ti su uzorci potjecali od odraslih pacijenata kojima su transplantirani organi, dok je naše istraživanje isključivo bilo usmjereno na profiliranje topivih imunskih medijatora u prirodnoj infekciji. Tematski je bliža studija koja je istražila odgovor citokina/kemokina, provodeći analizu amnionske tekućine fetusa zaraženih HCMV-om, a koja se temelji na multipleks metodi (220). Autori zaključuju kako je fetalna infekcija i njezina ozbiljnost povezana s povećanjem proupalnih citokina uključenih u imunski odgovor Th1 te izdvajaju topive molekule IP-10, IL-18, ITAC i TRAIL.

ADAM10 odcjepljuje PrP u punom obliku ektodomene (sPrP), a topivi PrP otkriven je u ljudskom i mišjem serumu, što sugerira da bi mogao biti od fiziološke važnosti (57,62,63,70). Tijekom našeg istraživanja, primijetili smo pojačano proteolitičko odcjepljivanje PrP-a sa stanica inficiranih MCMV-om, pri čemu je nakon infekcije i sama proizvodnja PrP-a bila povećana. Treba obratiti pozornost na opažanje da su astrociti identificirani kao izvor sPrP u

cerebrospinalnoj tekućini tijekom HIV-1 infekcije središnjeg živčanog sustava (67), budući da tijekom akutne infekcije astrociti predstavljaju prevladavajući tip stanica zaraženih HCMV-om (221), što ih čini potencijalnim izvorom sPrP-a. Naši *in vitro* pokusi pokazali su da infekcija MCMV-om značajno pojačava cijepanje PrP-a iz inficiranih stanica putem metaloproteinaze ADAM10. Kod HCMV-a prethodno je pokazana sposobnost virusa da utječe na tkivni inhibitor članova obitelji proteaza ADAM, TIMP3, kroz indukciju malih molekula RNK (engl. *microRNA*). Posljedično tome dolazi do cijepanja proteaznih supstrata među kojima je MIC-A, ligand receptora NKG2D (73). NKG2D je važan aktivacijski receptor ispoljen na stanicama NK te služi kao kostimulacijski receptor na limfocitima CD8 T (222), a citomegalovirusi su razvili brojne mehanizme za izbjegavanje imunskog odgovora ovisnog o njemu (223), kojima pripada i prethodno opisan utjecaj na ligande NKG2D-receptora na inficiranim stanicama. Obzirom da smo na razini RNK uočili da MCMV-inficirane stanice izražavaju manje razine inhibitora TIMP3, pretpostavili smo da MCMV i HCMV na sličan način dovode do pojačane aktivnosti proteaza ADAM. Pri tome je ADAM10 proteaza, također pod utjecajem TIMP3, jedina proteaza koja odcjepljuje PrP, te smo povećanu količinu odcjepljenog PrP i detektirali po infekciji u supernatantu inficiranih stanica. Nadalje, *ex vivo* vezanje topivog rekombinantnog PrP-a na aktivirane limfocite CD8 T smanjilo je njihovu sposobnost da proizvode IFN γ i TNF α , u skladu s nalazima da farmakološko utišavanje PrP-a *in vivo* potiče proupalni fenotip limfocita T (224). Osim što je ovime prvi put pokazano vezanje PrP-a na limfocite CD8 T, također je i pokazan utjecaj na njihovu funkciju. U literaturi isključivo postoje navodi za stanice NK (94) i monocite (96) na humanim stanicama odraslih donora. Također treba istaknuti recentnije istraživanje (225) gdje je topivi PrP djelovao smirujuće na upalu *in vivo*, vežući receptorski kompleks na stanicama makrofaga koji se sastoji od receptora N-metil-D-aspartata (NMDA-R) i proteina povezanog s receptorom lipoproteina male gustoće (engl. *low-density lipoprotein receptor-related protein 1*, LRP1). Mi nismo utvrdili receptor putem kojeg limfociti CD8T iz novo-okoćenih miševa vežu topivi PrP te treba provjeriti mogućnost da je pronađeni receptorski kompleks mjesto vezanja PrP-a na limfocitima CD8 T u prirodnoj infekciji. U prilog tome bi bila činjenica da *in vitro* aktivirani limfociti CD8 T induciraju izražaj LRP1, no ipak nešto manje nego limfociti CD4 T (226), a u našem istraživanju PrP se nije vezivao na limfocite CD4 T. Niti NMDA receptor se ne koristi često u kontekstu stanica stečene imunosti, no primarni limfociti CD4 T ga izražavaju u određenoj količini na svojoj površini (227). Niti jedno navedeno istraživanje nije uključivalo novo-okoćene životinje čiji repertoar receptora nije istovjetan onome u odraslih životinja, pri čemu, želimo naglasiti, sustavno istraživanje usporedbe limfocita CD8 T odraslih i novo-okoćenih životinja na razini proteina

ili RNK molekula u kontekstu citomegalovirusne infekcije za sada ne postoji. Iz svih naših rezultata proizlazi da je vezanje topivog PrP na limfocite CD8 T specifično obilježje prirodene infekcije miševa. Naime, naši pokušaji aktivacije staničnih linija limfocita T nisu rezultirali vezanjem PrP-a niti se PrP vezao na limfocite izolirane iz neinficiranih miševa, a ne postoji niti vezanje PrP na limfocite CD8 T u odraslih PrP KO miševa. Sukladno tome ne postoji niti bolja kontrola citomegalovirusa od strane odraslih životinja.

Sam solubilni, odcjepljeni PrP, kako smo napomenuli, posljedica je djelovanja isključivo jedne proteaze, ADAM10. Međutim, uz PrP, ADAM10 igra ključnu ulogu u cijepanju nekoliko ključnih molekula, kao što su Notch, PD-L1, TACI, EGFR/HER i ligandi NKG2D receptora (71,73,75,76,228). Posljedično, inhibicija ADAM10 mogla bi utjecati na aktivaciju stanica CD8 T i putem drugih receptora, poput NKG2D ili PD-1. Iako se ciljanje na aktivnost ADAM10 čini privlačnim za terapijske intervencije, s obzirom na njegovu uključenost u razne bolesti poput raka, neurodegenerativnih poremećaja i imunskih stanja, oprez je neophodan zbog mogućih nuspojava koje proizlaze iz njegovog širokog spektra supstrata i široko rasprostranjenog obrasca ekspresije. Postojeća ispitivanja terapija temeljenih na regulaciji ADAM10 za sada su se pokazale neučinkovitim, vjerojatno baš iz razloga što je potrebno sveobuhvatno istraživanje svih čimbenika, uključujući PrP (65,76,228). Nedavna istraživanja na modelima Alzheimerove bolesti pokazala su obećavajući učinak farmakološki stimuliranog ADAM10. Naime dolazi do povećanog odcjepljivanja PrP-a sa stanica, čime se smanjuje količina kritičnog receptora za toksične amiloid-beta peptide na neuronima (69,229,230).

CMV kao cjeloživotna herpesvirusna infekcija obilježena sporadičnim reaktivacijama predstavlja neizvjestan učinak na patologiju mozga (122,144). Nedavni dokazi snažno povezuju herpesviruse, uključujući CMV, s povećanim rizicima od neurodegenerativnih poremećaja poput Alzheimerove bolesti (231). Brojna protutijela i male molekule usmjerene na PrP otkrivene su istraživanjem destruktivne uloge PrP-a u smrtonosnim i prenosivim neurodegenerativnim prionskim bolestima (232). Naša otkrića sugeriraju da bi suzbijanje izlučivanja PrP-a moglo poboljšati aktivaciju T stanica. Kako bismo dodatno proširili naše razumijevanje i istražili relevantnost naših otkrića, ključno je istražiti može li protein PrP ili njegovo odcjepljivanje u obliku topivog PrP-a modulirati odgovore limfocita CD8 T tj. može li njegovo smanjenje dovesti do aktivacije limfocita CD8 T u drugim relevantnim modelima. Za modele glodavaca već postoje protutijela koja specifično prepoznaju izlučeni PrP, a u tijeku su naponi da se razviju analogna protutijela za ljudsku primjenu (66). Osim toga, studije ispituju

precizan utjecaj drugih protutijela i liganada usmjerenih na PrP na odcjepljivanje PrP-a, osiguravajući modulaciju specifičnu za supstrat bez utjecaja na proteazu ADAM10 ili njene druge supstrate. Značajno je da određena protutijela pojačavaju izlučivanje PrP-a vezanjem na zreli protein na površini stanice, dok jedno protutijelo olakšava brzu internalizaciju i razgradnju PrP-a, učinkovito ga uklanjajući iz stanica (66). Slične manipulacije (69) opravdavaju testiranje na modelima virusnih bolesti poput našeg, gdje se očekuje da će uklanjanje PrP-a iz stanica ponuditi dobrobiti bez štetnih učinaka, čime se otvara put za nove terapijske strategije.

6. ZAKLJUČCI

- Protein PrP utječe na imunosni odgovor tijekom prirodene citomegalovirusne infekcije.
- Djelovanje proteina PrP pokazuje očekivani utišavajući učinak na stanice imunosnog sustava.
- CMV modulira ispoljavanje proteina PrP induciranjem uz poticanje njegova odcjepljivanja s plazmatske membrane inficiranih stanica putem djelovanja proteaze ADAM10.
- Limfociti CD8 T u miševa bez PrP pokazuju veću aktivnost, u vidu povećane količine virus-specifičnih stanica, njihove degranulacije i lučenja citokina, obzirom da izostaje vezivanje proteina PrP.
- Limfociti CD8 T u miševa bez PrP-a su aktivniji te bolje uklanjaju virus, pri čemu ne dolazi do povećane imunopatologije.

Opći zaključak: Potvrđena je hipoteza o utjecaju proteina PrP na imunosni odgovor tijekom prirodene citomegalovirusne infekcije miševa, kao i njegov utišavajući učinak na imunosni sustav. Ostvarena su oba specifična cilja. Inicijalno smo očekivali da će odsutnost PrP u miševa PrP KO pojačati imunopatologiju, no rezultati su pokazali specifično pojačan odgovor stanica CD8 T uz smanjenje virusnog titra i istodobno smanjenje patologije.

7. LITERATURA

1. Atkinson CJ, Zhang K, Munn AL, Wiegmans A, Wei MQ. Prion protein scrapie and the normal cellular prion protein. *Prion*. 08. prosinac 2015.;10(1):63–82.
2. Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wüthrich K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature*. 11. srpanj 1996.;382(6587):180–2.
3. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10. studeni 1998.;95(23):13363–83.
4. Lansbury PT. Mechanism of scrapie replication. *Science*. 09. rujan 1994.;265(5178):1510.
5. Robakis NK, Devine-Gage EA, Jenkins EC, Kascsak RJ, Brown WT, Krawczun MS, i ostali. Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p arm of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 30. listopad 1986.;140(2):758–65.
6. Castle AR, Gill AC. Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Front Mol Biosci*. 06. travanj 2017.;4:19.
7. Westaway D, Prusiner SB. Conservation of the cellular gene encoding the scrapie prion protein. *Nucleic Acids Res*. 11. ožujak 1986.;14(5):2035–44.
8. Passet B, Halliez S, Béringue V, Laude H, Vilotte JL. The prion protein family: looking outside the central nervous system. *Prion*. 2013.;7(2):127–30.
9. Westaway D, Daude N, Wohlgemuth S, Harrison P. The PrP-like proteins Shadoo and Doppel. *Top Curr Chem*. 2011.;305:225–56.
10. Pradhan P, Srivastava A, Singh J, Biswas B, Saini A, Siddique I, i ostali. Prion protein transcription is auto-regulated through dynamic interactions with G-quadruplex motifs in its own promoter. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. ožujak 2020.;1863(3):194479.
11. Mahal SP, Asante EA, Antoniou M, Collinge J. Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene*. 02. svibanj 2001.;268(1–2):105–14.
12. Wulf MA, Senatore A, Aguzzi A. The biological function of the cellular prion protein: an update. *BMC Biol*. 02. svibanj 2017.;15(1):34.
13. Stewart RS, Harris DA. Most pathogenic mutations do not alter the membrane topology of the prion protein. *J Biol Chem*. 19. siječanj 2001.;276(3):2212–20.
14. Stewart RS, Harris DA. A Transmembrane Form of the Prion Protein Is Localized in the Golgi Apparatus of Neurons*. *J Biol Chem*. 22. travanj 2005.;280(16):15855–64.
15. Zuegg J, Gready JE. Molecular dynamics simulation of human prion protein including both N-linked oligosaccharides and the GPI anchor. *Glycobiology*. listopad 2000.;10(10):959–74.

16. Taylor DR, Watt NT, Perera WSS, Hooper NM. Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci.* 01. studeni 2005.;118(Pt 21):5141–53.
17. Huang Z, Gabriel JM, Baldwin MA, Fletterick RJ, Prusiner SB, Cohen FE. Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19. srpanj 1994.;91(15):7139–43.
18. Maiti NR, Surewicz WK. The role of disulfide bridge in the folding and stability of the recombinant human prion protein. *J Biol Chem.* 26. siječanj 2001.;276(4):2427–31.
19. Stimson E, Hope J, Chong A, Burlingame AL. Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry.* 13. travanj 1999.;38(15):4885–95.
20. Lawson VA, Collins SJ, Masters CL, Hill AF. Prion protein glycosylation. *J Neurochem.* svibanj 2005.;93(4):793–801.
21. Botto L, Cunati D, Coco S, Sesana S, Bulbarelli A, Biasini E, i ostali. Role of Lipid Rafts and GM1 in the Segregation and Processing of Prion Protein. *PLoS ONE.* 23. svibanj 2014.;9(5):e98344.
22. Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, i ostali. The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J.* 15. srpanj 2003.;22(14):3591–601.
23. Shyng SL, Huber MT, Harris DA. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 25. srpanj 1993.;268(21):15922–8.
24. Jansen GH, Vogelaar CF, Elshof SM. Distribution of cellular prion protein in normal human cerebral cortex--does it have relevance to Creutzfeldt-Jakob disease? *Clin Chem Lab Med.* travanj 2001.;39(4):294–8.
25. McLennan NF, Rennison KA, Bell JE, Ironside JW. In situ hybridization analysis of PrP mRNA in human CNS tissues. *Neuropathol Appl Neurobiol.* listopad 2001.;27(5):373–83.
26. Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Dev Camb Engl.* svibanj 1992.;115(1):117–22.
27. Moser M, Colello RJ, Pott U, Oesch B. Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron.* ožujak 1995.;14(3):509–17.
28. Bakkebo MK, Mouillet-Richard S, Espenes A, Goldmann W, Tatzelt J, Tranulis MA. The Cellular Prion Protein: A Player in Immunological Quiescence. *Front Immunol.* 2015.;6:450.
29. Forrester JV, Xu H, Lambe T, Cornall R. Immune privilege or privileged immunity? *Mucosal Immunol.* rujanj 2008.;1(5):372–81.

30. Zhang B, Shen P, Yin X, Dai Y, Ding M, Cui L. Expression and functions of cellular prion proteins in immunocytes. *Scand J Immunol.* ožujak 2020.;91(3):e12854.
31. Dürig J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Rosenthal C, Schmücker U, Bieschke J, i ostali. Differential constitutive and activation-dependent expression of prion protein in human peripheral blood leucocytes. *Br J Haematol.* ožujak 2000.;108(3):488–95.
32. Martínez del Hoyo G, López-Bravo M, Metharom P, Ardavín C, Aucouturier P. Prion protein expression by mouse dendritic cells is restricted to the nonplasmacytoid subsets and correlates with the maturation state. *J Immunol Baltim Md 1950.* 01. studeni 2006.;177(9):6137–42.
33. Burthem J, Urban B, Pain A, Roberts DJ. The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells. *Blood.* 15. prosinac 2001.;98(13):3733–8.
34. Politopoulou G, Seebach JD, Schmugge M, Schwarz HP, Aguzzi A. Age-related expression of the cellular prion protein in human peripheral blood leukocytes. *Haematologica.* lipanj 2000.;85(6):580–7.
35. Ballerini C, Gourdain P, Bachy V, Blanchard N, Levavasseur E, Grégoire S, i ostali. Functional implication of cellular prion protein in antigen-driven interactions between T cells and dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. lipanj 2006.;176(12):7254–62.
36. Wang M, Zhao D, Yang Y, Liu J, Wang J, Yin X, i ostali. The cellular prion protein negatively regulates phagocytosis and cytokine expression in murine bone marrow-derived macrophages. *PloS One.* 2014.;9(7):e102785.
37. Uraki R, Sakudo A, Ando S, Kitani H, Onodera T. Enhancement of phagocytotic activity by prion protein in PrP-deficient macrophage cells. *Int J Mol Med.* listopad 2010.;26(4):527–32.
38. Liu J, Zhao D, Liu C, Ding T, Yang L, Yin X, i ostali. Prion protein participates in the protection of mice from lipopolysaccharide infection by regulating the inflammatory process. *J Mol Neurosci MN.* siječanj 2015.;55(1):279–87.
39. Lopes MH, Santos TG. Prion potency in stem cells biology. *Prion.* 2012.;6(2):142–6.
40. Liu T, Li R, Wong BS, Liu D, Pan T, Petersen RB, i ostali. Normal cellular prion protein is preferentially expressed on subpopulations of murine hemopoietic cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. ožujak 2001.;166(6):3733–42.
41. Miranda A, Pericuesta E, Ramírez MÁ, Gutierrez-Adan A. Prion Protein Expression Regulates Embryonic Stem Cell Pluripotency and Differentiation. *PLoS ONE.* 04. travanj 2011.;6(4):e18422.
42. Zhang CC, Steele AD, Lindquist S, Lodish HF. Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14. veljača 2006.;103(7):2184–9.
43. Dodelet VC, Cashman NR. Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood.* 01. ožujak 1998.;91(5):1556–61.

44. Shyu WC, Harn HJ, Saeki K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Onodera T, i ostali. Molecular modulation of expression of prion protein by heat shock. *Mol Neurobiol.* kolovoz 2002.;26(1):1–12.
45. McLennan NF, Brennan PM, McNeill A, Davies I, Fotheringham A, Rennison KA, i ostali. Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am J Pathol.* srpanj 2004.;165(1):227–35.
46. Déry MA, Jodoin J, Ursini-Siegel J, Aleynikova O, Ferrario C, Hassan S, i ostali. Endoplasmic reticulum stress induces PRNP prion protein gene expression in breast cancer. *Breast Cancer Res BCR.* 12. ožujak 2013.;15(2):R22.
47. Satoh J, Kurohara K, Yukitake M, Kuroda Y. Constitutive and cytokine-inducible expression of prion protein gene in human neural cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol.* veljača 1998.;57(2):131–9.
48. Mariante RM, Nóbrega A, Martins RAP, Areal RB, Bellio M, Linden R. Neuroimmunoendocrine regulation of the prion protein in neutrophils. *J Biol Chem.* 12. listopad 2012.;287(42):35506–15.
49. Altmeyden HC, Puig B, Dohler F, Thurm DK, Falker C, Krasemann S, i ostali. Proteolytic processing of the prion protein in health and disease. *Am J Neurodegener Dis.* 15. svibanj 2012.;1(1):15–31.
50. Oliveira-Martins JB, Yusa S ichi, Calella AM, Bridel C, Baumann F, Dametto P, i ostali. Unexpected Tolerance of α -Cleavage of the Prion Protein to Sequence Variations. *PLoS ONE.* 08. veljača 2010.;5(2):e9107.
51. McDonald AJ, Dibble JP, Evans EGB, Millhauser GL. A New Paradigm for Enzymatic Control of α -Cleavage and β -Cleavage of the Prion Protein. *J Biol Chem.* 10. siječanj 2014.;289(2):803–13.
52. Chen SG, Teplow DB, Parchi P, Teller JK, Gambetti P, Autilio-Gambetti L. Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J Biol Chem.* 11. kolovoz 1995.;270(32):19173–80.
53. Westergard L, Turnbaugh JA, Harris DA. A naturally occurring C-terminal fragment of the prion protein (PrP) delays disease and acts as a dominant-negative inhibitor of PrPSc formation. *J Biol Chem.* 23. prosinac 2011.;286(51):44234–42.
54. Harris DA, Huber MT, van Dijken P, Shyng SL, Chait BT, Wang R. Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry.* 02. veljača 1993.;32(4):1009–16.
55. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, i ostali. The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry.* listopad 2021.;26(10):5481–503.
56. Vincent B, Paitel E, Saftig P, Frobert Y, Hartmann D, De Strooper B, i ostali. The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J Biol Chem.* 12. listopad 2001.;276(41):37743–6.

57. Altmepfen HC, Prox J, Puig B, Kluth MA, Bernreuther C, Thurm D, i ostali. Lack of a-disintegrin-and-metalloproteinase ADAM10 leads to intracellular accumulation and loss of shedding of the cellular prion protein in vivo. *Mol Neurodegener.* 27. svibanj 2011.;6:36.
58. Walmsley AR, Watt NT, Taylor DR, Perera WSS, Hooper NM. alpha-cleavage of the prion protein occurs in a late compartment of the secretory pathway and is independent of lipid rafts. *Mol Cell Neurosci.* veljača 2009.;40(2):242–8.
59. Liang J, Wang W, Sorensen D, Medina S, Ilchenko S, Kiselar J, i ostali. Cellular Prion Protein Regulates Its Own α -Cleavage through ADAM8 in Skeletal Muscle. *J Biol Chem.* 11. svibanj 2012.;287(20):16510–20.
60. Lewis V, Johanssen VA, Crouch PJ, Klug GM, Hooper NM, Collins SJ. Prion protein „gamma-cleavage“: characterizing a novel endoproteolytic processing event. *Cell Mol Life Sci CMLS.* veljača 2016.;73(3):667–83.
61. Kojima A, Konishi M, Akizawa T. Prion Fragment Peptides Are Digested with Membrane Type Matrix Metalloproteinases and Acquire Enzyme Resistance through Cu²⁺-Binding. *Biomolecules.* 08. svibanj 2014.;4(2):510–26.
62. Taylor DR, Parkin ET, Cocklin SL, Ault JR, Ashcroft AE, Turner AJ, i ostali. Role of ADAMs in the Ectodomain Shedding and Conformational Conversion of the Prion Protein. *J Biol Chem.* 08. kolovoz 2009.;284(34):22590.
63. Linsenmeier L, Mohammadi B, Wetzel S, Puig B, Jackson WS, Hartmann A, i ostali. Structural and mechanistic aspects influencing the ADAM10-mediated shedding of the prion protein. *Mol Neurodegener.* 06. travanj 2018.;13:18.
64. Lukan A, Černilec M, Vranac T, Popović M, Čurin Šerbec V. Regional distribution of anchorless prion protein, PrP^{226*}, in the human brain. *Prion.* 01. ožujak 2014.;8(2):203–9.
65. Altmepfen HC, Prox J, Krasemann S, Puig B, Kruszewski K, Dohler F, i ostali. The sheddase ADAM10 is a potent modulator of prion disease. *eLife.* 4:e04260.
66. Linsenmeier L, Mohammadi B, Shafiq M, Frontzek K, Bär J, Shrivastava AN, i ostali. Ligands binding to the prion protein induce its proteolytic release with therapeutic potential in neurodegenerative proteinopathies. *Sci Adv.* 7(48):eabj1826.
67. Roberts TK, Eugenin EA, Morgello S, Clements JE, Zink MC, Berman JW. PrPC, the Cellular Isoform of the Human Prion Protein, Is a Novel Biomarker of HIV-Associated Neurocognitive Impairment and Mediates Neuroinflammation. *Am J Pathol.* listopad 2010.;177(4):1848–60.
68. Minikel EV, Kuhn E, Cocco AR, Vallabh SM, Hartigan CR, Reidenbach AG, i ostali. Domain-specific Quantification of Prion Protein in Cerebrospinal Fluid by Targeted Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics MCP.* prosinac 2019.;18(12):2388–400.
69. Jarosz-Griffiths HH, Corbett NJ, Rowland HA, Fisher K, Jones AC, Baron J, i ostali. Proteolytic shedding of the prion protein via activation of metalloproteinase ADAM10 reduces cellular binding and toxicity of amyloid- β oligomers. *J Biol Chem.* 26. travanj 2019.;294(17):7085–97.

70. Parizek P, Roeckl C, Weber J, Flechsig E, Aguzzi A, Raeber AJ. Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells. *J Biol Chem.* 30. studeni 2001.;276(48):44627–32.
71. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* listopad 2008.;29(5):258–89.
72. Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol.* 11. studeni 2011.;12(11):233.
73. Estes G, Luzón E, Sarmiento E, Gómez-Caro R, Steinle A, Murphy G, i ostali. Altered microRNA expression after infection with human cytomegalovirus leads to TIMP3 downregulation and increased shedding of metalloprotease substrates, including MICA. *J Immunol Baltim Md 1950.* 01. kolovoz 2014.;193(3):1344–52.
74. Rose-John S. ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets. *Pharmacol Res.* svibanj 2013.;71:19–22.
75. Cheng Y, Lin L, Li X, Lu A, Hou C, Wu Q, i ostali. ADAM10 is involved in the oncogenic process and chemo-resistance of triple-negative breast cancer via regulating Notch1 signaling pathway, CD44 and PrPc. *Cancer Cell Int.* 07. siječanj 2021.;21:32.
76. Gibb DR, Saleem SJ, Chaimowitz NS, Mathews J, Conrad DH. The emergence of ADAM10 as a regulator of lymphocyte development and autoimmunity. *Mol Immunol.* lipanj 2011.;48(11):1319–27.
77. Lopes MH, Hajj GNM, Muras AG, Mancini GL, Castro RMPS, Ribeiro KCB, i ostali. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci.* 01. prosinac 2005.;25(49):11330–9.
78. Guillot-Sestier MV, Sunyach C, Druon C, Scarzello S, Checler F. The alpha-secretase-derived N-terminal product of cellular prion, N1, displays neuroprotective function in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 18. prosinac 2009.;284(51):35973–86.
79. Chiarini LB, Freitas ARO, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* 01. srpanj 2002.;21(13):3317–26.
80. Wu G, Nakajima K, Takeyama N, Yukawa M, Taniuchi Y, Sakudo A, i ostali. Species-specific anti-apoptotic activity of cellular prion protein in a mouse PrP-deficient neuronal cell line transfected with mouse, hamster, and bovine Prnp. *Neurosci Lett.* 28. studeni 2008.;446(1):11–5.
81. Doeppner TR, Kaltwasser B, Schlechter J, Jaschke J, Kilic E, Bähr M, i ostali. Cellular prion protein promotes post-ischemic neuronal survival, angiogenesis and enhances neural progenitor cell homing via proteasome inhibition. *Cell Death Dis.* prosinac 2015.;6(12):e2024.
82. Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretschmar HA. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol.* srpanj 1997.;146(1):104–12.

83. Gielnik M, Szymańska A, Dong X, Jarvet J, Svedružić ŽM, Gräslund A, i ostali. Prion Protein Octarepeat Domain Forms Transient β -Sheet Structures upon Residue-Specific Binding to Cu(II) and Zn(II) Ions. *Biochemistry*. 06. lipanj 2023.;62(11):1689–705.
84. Flynn KC. The cytoskeleton and neurite initiation. *Bioarchitecture*. 2013.;3(4):86–109.
85. Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyn's'ka I, Schachner M. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol*. 25. travanj 2005.;169(2):341–54.
86. Chen S, Mangé A, Dong L, Lehmann S, Schachner M. Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol Cell Neurosci*. veljača 2003.;22(2):227–33.
87. Kanaani J, Prusiner SB, Diacovo J, Baekkeskov S, Legname G. Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *J Neurochem*. prosinac 2005.;95(5):1373–86.
88. Bremer J, Baumann F, Tiberi C, Wessig C, Fischer H, Schwarz P, i ostali. Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci*. 01. ožujak 2010.;13(3):310–8.
89. Salvesen Ø, Reiten MR, Espenes A, Bakkebø MK, Tranulis MA, Ersdal C. LPS-induced systemic inflammation reveals an immunomodulatory role for the prion protein at the blood-brain interface. *J Neuroinflammation*. 22. svibanj 2017.;14(1):106.
90. Wu GR, Mu TC, Gao ZX, Wang J, Sy MS, Li CY. Prion protein is required for tumor necrosis factor α (TNF α)-triggered nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling and cytokine production. *J Biol Chem*. 17. studeni 2017.;292(46):18747–59.
91. Ezpeleta J, Boudet-Devaud F, Pietri M, Baudry A, Baudouin V, Alleaume-Butaux A, i ostali. Protective role of cellular prion protein against TNF α -mediated inflammation through TACE α -secretase. *Sci Rep*. 09. kolovoz 2017.;7:7671.
92. Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kacsak RJ, Bolton DC, i ostali. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell*. 01. travanj 1990.;61(1):185–92.
93. Ingram R, Isaacs JD, Kaur G, Lowther DE, Reynolds CJ, Boyton RJ, i ostali. A role of cellular prion protein in programming T-cell cytokine responses in disease. *FASEB J*. lipanj 2009.;23(6):1672–84.
94. Seong YJ, Sung PS, Jang YS, Choi YJ, Park BC, Park SH, i ostali. Activation of human natural killer cells by the soluble form of cellular prion protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 01. kolovoz 2015.;464(2):512–8.
95. Jeon JW, Park BC, Jung JG, Jang YS, Shin EC, Park YW. The Soluble Form of the Cellular Prion Protein Enhances Phagocytic Activity and Cytokine Production by Human Monocytes Via Activation of ERK and NF- κ B. *Immune Netw*. 01. kolovoz 2013.;13(4):148–56.

96. Krebs B, Dorner-Ciossek C, Schmalzbauer R, Vassallo N, Herms J, Kretzschmar HA. Prion protein induced signaling cascades in monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 03. veljača 2006.;340(1):13–22.
97. Nasu-Nishimura Y, Taniuchi Y, Nishimura T, Sakudo A, Nakajima K, Ano Y, i ostali. Cellular prion protein prevents brain damage after encephalomyocarditis virus infection in mice. *Arch Virol.* 2008.;153(6):1007–12.
98. Nakamura Y, Sakudo A, Saeki K, Kaneko T, Matsumoto Y, Toniolo A, i ostali. Transfection of prion protein gene suppresses coxsackievirus B3 replication in prion protein gene-deficient cells. *J Gen Virol. prosinac 2003.*;84(Pt 12):3495–502.
99. Korom M, Wylie KM, Wang H, Davis KL, Sangabathula MS, DeLassus GS, i ostali. A Proautophagic Antiviral Role for the Cellular Prion Protein Identified by Infection with a Herpes Simplex Virus 1 ICP34.5 Mutant. *J Virol. svibanj 2013.*;87(10):5882–94.
100. Biasini E, Turnbaugh JA, Unterberger U, Harris DA. Prion protein at the crossroads of physiology and disease. *Trends Neurosci.* veljača 2012.;35(2):92–103.
101. Isaacs JD, Jackson GS, Altmann DM. The role of the cellular prion protein in the immune system. *Clin Exp Immunol.* listopad 2006.;146(1):1–8.
102. Nuvolone M, Kana V, Hutter G, Sakata D, Mortin-Toth SM, Russo G, i ostali. SIRP α polymorphisms, but not the prion protein, control phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med.* 18. studeni 2013.;210(12):2539–52.
103. Linden R. The Biological Function of the Prion Protein: A Cell Surface Scaffold of Signaling Modules. *Front Mol Neurosci.* 20. ožujak 2017.;10:77.
104. Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis. prosinac 2004.*;4(12):725–38.
105. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol. srpanj 2006.*;87(Pt 7):1763–79.
106. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol.* srpanj 2010.;20(4):202–13.
107. Murphy E, Shenk T. Human cytomegalovirus genome. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008.;325:1–19.
108. Rawlinson WD, Farrell HE, Barrell BG. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol. prosinac 1996.*;70(12):8833–49.
109. Hirai K. [The mechanisms of human cytomegalovirus DNA replication]. *Nihon Rinsho Jpn J Clin Med.* siječanj 1998.;56(1):36–43.
110. Stenberg RM, Kerry JA. Cytomegalovirus genes: their structure and function. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1995.;99:3–6.

111. Wang YQ, Zhao XY. Human Cytomegalovirus Primary Infection and Reactivation: Insights From Virion-Carried Molecules. *Front Microbiol.* 2020.;11:1511.
112. Wathen MW, Stinski MF. Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection. *J Virol.* veljača 1982.;41(2):462–77.
113. Castillo JP, Kowalik TF. Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene.* 15. svibanj 2002.;290(1–2):19–34.
114. Stinski MF. Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. *J Virol.* lipanj 1978.;26(3):686–701.
115. Fortunato EA, McElroy AK, Sanchez I, Spector DH. Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol.* ožujak 2000.;8(3):111–9.
116. Acosta E, Bowlin T, Brooks J, Chiang L, Hussein I, Kimberlin D, i ostali. Advances in the Development of Therapeutics for Cytomegalovirus Infections. *J Infect Dis.* 15. ožujak 2020.;221(Suppl 1):S32–44.
117. Sinzger C, Digel M, Jahn G. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008.;325:63–83.
118. Chen SJ, Wang SC, Chen YC. Antiviral Agents as Therapeutic Strategies Against Cytomegalovirus Infections. *Viruses.* 23. prosinac 2019.;12(1):21.
119. Razonable RR. Oral antiviral drugs for treatment of cytomegalovirus in transplant recipients. *Clin Microbiol Infect.* 01. rujana 2023.;29(9):1144–9.
120. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev.* siječanj 2009.;22(1):76–98, Table of Contents.
121. Kondo K, Mocarski ES. Cytomegalovirus latency and latency-specific transcription in hematopoietic progenitors. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1995.;99:63–7.
122. Dupont L, Reeves MB. Cytomegalovirus latency and reactivation: recent insights into an age old problem. *Rev Med Virol.* ožujak 2016.;26(2):75–89.
123. Thompson RL, Sawtell NM. The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene regulates the establishment of latency. *J Virol.* srpanj 1997.;71(7):5432–40.
124. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The „silent“ global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* siječanj 2013.;26(1):86–102.
125. Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med.* 03. svibanj 2001.;344(18):1366–71.
126. Pass RF, Anderson B. Mother-to-Child Transmission of Cytomegalovirus and Prevention of Congenital Infection. *J Pediatr Infect Dis Soc.* rujana 2014.;3 Suppl 1(Suppl 1):S2-6.

127. Zuhair M, Smit GSA, Wallis G, Jabbar F, Smith C, Devleesschauwer B, i ostali. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol. svibanj 2019.*;29(3):e2034.
128. Pass RF, Arav-Boger R. Maternal and fetal cytomegalovirus infection: diagnosis, management, and prevention. *F1000Research. 2018.*;7:255.
129. Aldè M, Binda S, Primache V, Pellegrinelli L, Pariani E, Pregliasco F, i ostali. Congenital Cytomegalovirus and Hearing Loss: The State of the Art. *J Clin Med. 01. srpanj 2023.*;12(13):4465.
130. Boppana SB, Ross SA, Fowler KB. Congenital cytomegalovirus infection: clinical outcome. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. prosinac 2013.*;57 Suppl 4(Suppl 4):S178-181.
131. Perlman JM, Argyle C. Lethal cytomegalovirus infection in preterm infants: clinical, radiological, and neuropathological findings. *Ann Neurol. siječanj 1992.*;31(1):64–8.
132. Slavuljica I, Kveštak D, Huszthy PC, Kosmac K, Britt WJ, Jonjić S. Immunobiology of congenital cytomegalovirus infection of the central nervous system—the murine cytomegalovirus model. *Cell Mol Immunol. 01. ožujak 2015.*;12(2):180–91.
133. Kimberlin DW, Jester PM, Sánchez PJ, Ahmed A, Arav-Boger R, Michaels MG, i ostali. Valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *N Engl J Med. 05. ožujak 2015.*;372(10):933–43.
134. Lanzieri TM, Caviness AC, Blum P, Demmler-Harrison G, Congenital Cytomegalovirus Longitudinal Study Group. Progressive, Long-Term Hearing Loss in Congenital CMV Disease After Ganciclovir Therapy. *J Pediatr Infect Dis Soc. 27. siječanj 2022.*;11(1):16–23.
135. Reddehase MJ, Podlech J, Grzimek NKA. Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol. kolovoz 2002.*;25 Suppl 2:S23-36.
136. Schleiss MR. Nonprimate models of congenital cytomegalovirus (CMV) infection: gaining insight into pathogenesis and prevention of disease in newborns. *ILAR J. 2006.*;47(1):65–72.
137. Barry PA, Lockridge KM, Salamat S, Tinling SP, Yue Y, Zhou SS, i ostali. Nonhuman primate models of intrauterine cytomegalovirus infection. *ILAR J. 2006.*;47(1):49–64.
138. Koontz T, Bralic M, Tomac J, Pernjak-Pugel E, Bantug G, Jonjic S, i ostali. Altered development of the brain after focal herpesvirus infection of the central nervous system. *J Exp Med. 18. veljača 2008.*;205(2):423–35.
139. Clancy B, Kersh B, Hyde J, Darlington RB, Anand KJS, Finlay BL. Web-based method for translating neurodevelopment from laboratory species to humans. *Neuroinformatics. 2007.*;5(1):79–94.
140. Enders G, Daiminger A, Bäder U, Exler S, Enders M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol. studeni 2011.*;52(3):244–6.

141. Bantug GRB, Cekinovic D, Bradford R, Koontz T, Jonjic S, Britt WJ. CD8+ T-LYMPHOCYTES CONTROL MCMV REPLICATION IN THE CNS OF NEWBORN ANIMALS. *J Immunol Baltim Md 1950*. 01. kolovoz 2008.;181(3):2111–23.
142. Davis GL, Krawczyk KW, Hawrasiak MM. Age-related neurocytotropism of mouse cytomegalovirus in explanted trigeminal ganglions. *Am J Pathol*. studeni 1979.;97(2):261–75.
143. Garay PA, McAllister AK. Novel Roles for Immune Molecules in Neural Development: Implications for Neurodevelopmental Disorders. *Front Synaptic Neurosci*. 08. rujanj 2010.;2:136.
144. Krstanović F, Britt WJ, Jonjić S, Brizić I. Cytomegalovirus Infection and Inflammation in Developing Brain. *Viruses*. 04. lipanj 2021.;13(6):1078.
145. Kosmac K, Bantug GR, Pugel EP, Cekinovic D, Jonjic S, Britt WJ. Glucocorticoid treatment of MCMV infected newborn mice attenuates CNS inflammation and limits deficits in cerebellar development. *PLoS Pathog*. ožujak 2013.;9(3):e1003200.
146. Seleme MC, Kosmac K, Jonjic S, Britt WJ. Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Recruitment of Inflammatory Mononuclear Cells Leads to Inflammation and Altered Brain Development in Murine Cytomegalovirus-Infected Newborn Mice. *J Virol*. 29. ožujak 2017.;91(8):e01983-16.
147. Brizić I, Lenac Roviš T, Krmpotić A, Jonjić S. MCMV avoidance of recognition and control by NK cells. *Semin Immunopathol*. studeni 2014.;36(6):641–50.
148. Powers C, DeFilippis V, Malouli D, Früh K. Cytomegalovirus immune evasion. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008.;325:333–59.
149. Jackson SE, Redeker A, Arens R, van Baarle D, van den Berg SPH, Benedict CA, i ostali. CMV immune evasion and manipulation of the immune system with aging. *GeroScience*. 24. lipanj 2017.;39(3):273–91.
150. Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, i ostali. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol*. kolovoz 2014.;14(8):571–8.
151. Holzki JK, Dağ F, Dekhtiarenko I, Rand U, Casalegno-Garduño R, Trittel S, i ostali. Type I Interferon Released by Myeloid Dendritic Cells Reversibly Impairs Cytomegalovirus Replication by Inhibiting Immediate Early Gene Expression. *J Virol*. 22. srpanj 2015.;89(19):9886–95.
152. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, i ostali. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med*. travanj 1999.;5(4):405–11.
153. Fish KN, Stenglein SG, Ibanez C, Nelson JA. Cytomegalovirus persistence in macrophages and endothelial cells. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1995.;99:34–40.

154. Collins TM, Quirk MR, Jordan MC. Biphasic viremia and viral gene expression in leukocytes during acute cytomegalovirus infection of mice. *J Virol.* listopad 1994.;68(10):6305–11.
155. Zangger N, Oxenius A. T cell immunity to cytomegalovirus infection. *Curr Opin Immunol.* kolovoz 2022.;77:102185.
156. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, i ostali. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 07. siječanj 2011.;331(6013):44–9.
157. Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science.* 17. svibanj 2002.;296(5571):1323–6.
158. Arase H, Lanier LL. Virus-driven evolution of natural killer cell receptors. *Microbes Infect.* prosinac 2002.;4(15):1505–12.
159. Wu X, Chen Y, Wei H, Sun R, Tian Z. Development of Murine Hepatic NK Cells during Ontogeny: Comparison with Spleen NK Cells. *Clin Dev Immunol.* 2012.;2012:759765.
160. Marcoe JP, Lim JR, Schaubert KL, Fodil-Cornu N, Matka M, McCubbrey AL, i ostali. TGF- β is responsible for NK cell immaturity during ontogeny and increased susceptibility to infection during mouse infancy. *Nat Immunol.* rujanj 2012.;13(9):843–50.
161. Jonjić 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.* 01. travanj 1989.;169(4):1199–212.
162. Lueder Y, Heller K, Ritter C, Keyser KA, Wagner K, Liu X, i ostali. Control of primary mouse cytomegalovirus infection in lung nodular inflammatory foci by cooperation of interferon-gamma expressing CD4 and CD8 T cells. *PLoS Pathog.* kolovoz 2018.;14(8):e1007252.
163. Courtney AH, Lo WL, Weiss A. TCR SIGNALING: MECHANISMS OF INITIATION AND PROPAGATION. *Trends Biochem Sci.* veljača 2018.;43(2):108–23.
164. Hwang JR, Byeon Y, Kim D, Park SG. Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Exp Mol Med.* svibanj 2020.;52(5):750–61.
165. Cassioli C, Baldari CT. The Expanding Arsenal of Cytotoxic T Cells. *Front Immunol.* 2022;13:883010. doi: 10.3389/fimmu.2022.883010
166. Cox MA, Kahan SM, Zajac AJ. Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. *Virology.* 05. siječanj 2013.;435(1):157–69.
167. Kang S, Brown HM, Hwang S. Direct Antiviral Mechanisms of Interferon-Gamma. *Immune Netw.* 17. listopad 2018.;18(5):e33.

168. Alexandre YO, Cocita CD, Ghilas S, Dalod M. Deciphering the role of DC subsets in MCMV infection to better understand immune protection against viral infections. *Front Microbiol.* 2014;5:378. doi: 10.3389/fmicb.2014.00378.
169. Gutmacher I, Becher B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest.* 01. svibanj 2007.;117(5):1119–27.
170. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol.* 2003.;21:305–34.
171. Pardieck IN, Beyrend G, Redeker A, Arens R. Cytomegalovirus infection and progressive differentiation of effector-memory T cells. *F1000Research.* 26. rujun 2018.;7:F1000 Faculty Rev-1554.
172. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol.* travanj 2002.;2(4):251–62.
173. Karrer U, Sierro S, Wagner M, Oxenius A, Hengel H, Koszinowski UH, i ostali. Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8+ T cells over time. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15. veljača 2003.;170(4):2022–9.
174. Brizić I, Šušak B, Arapović M, Huszthy PC, Hiršl L, Kveštak D, i ostali. Brain-resident memory CD8+ T cells induced by congenital CMV infection prevent brain pathology and virus reactivation. *Eur J Immunol.* lipanj 2018.;48(6):950–64.
175. Marchant A, Appay V, Van Der Sande M, Dulphy N, Liesnard C, Kidd M, i ostali. Mature CD8(+) T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J Clin Invest.* lipanj 2003.;111(11):1747–55.
176. Venturi V, Nzingha K, Amos TG, Charles WC, Dekhtiarenko I, Cicin-Sain L, i ostali. The neonatal CD8+ T cell repertoire rapidly diversifies during persistent viral infection. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15. veljača 2016.;196(4):1604–16.
177. Munks MW, Cho KS, Pinto AK, Sierro S, Klenerman P, Hill AB. Four distinct patterns of memory CD8 T cell responses to chronic murine cytomegalovirus infection. *J Immunol Baltim Md* 1950. 01. srpanj 2006.;177(1):450–8.
178. Torti N, Walton SM, Brocker T, Rüllicke T, Oxenius A. Non-hematopoietic cells in lymph nodes drive memory CD8 T cell inflation during murine cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog.* listopad 2011.;7(10):e1002313.
179. Cloarec R, Bauer S, Luche H, Buhler E, Pallesi-Pocachard E, Salmi M, i ostali. Cytomegalovirus Infection of the Rat Developing Brain In Utero Prominently Targets Immune Cells and Promotes Early Microglial Activation. *PLoS ONE.* 29. srpanj 2016.;11(7):e0160176.
180. Guo S, Wang H, Yin Y. Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci.* 2022.;14:815347.
181. Kveštak D, Juranić Lisnić V, Lisnić B, Tomac J, Golemac M, Brizić I, i ostali. NK/ILC1 cells mediate neuroinflammation and brain pathology following congenital CMV infection. *J Exp Med.* 03. svibanj 2021.;218(5):e20201503.

182. Ruzek MC, Miller AH, Opal SM, Pearce BD, Biron CA. Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med*. 01. travanj 1997.;185(7):1185–92.
183. Jonjic S, Krmpotic A, Arapovic J, Koszinowski UH. Dissection of the antiviral NK cell response by MCMV mutants. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2008.;415:127–49.
184. Messerle M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, Ziegler H, Koszinowski UH. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23. prosinac 1997.;94(26):14759–63.
185. Brizić I, Lisnić B, Brune W, Hengel H, Jonjić S. Cytomegalovirus Infection: Mouse Model. *Curr Protoc Immunol*. kolovoz 2018.;122(1):e51.
186. R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. [citirano 20. veljača 2024.]. Dostupno na: <https://www.r-project.org/>
187. Versteeg L, Le Guezennec X, Zhan B, Liu Z, Angagaw M, Woodhouse JD, i ostali. Transferring Luminex® cytokine assays to a wall-less plate technology: Validation and comparison study with plasma and cell culture supernatants. *J Immunol Methods*. siječanj 2017.;440:74–82.
188. Lubin JH, Colt JS, Camann D, Davis S, Cerhan JR, Severson RK, i ostali. Epidemiologic Evaluation of Measurement Data in the Presence of Detection Limits. *Environ Health Perspect*. prosinac 2004.;112(17):1691–6.
189. Uh HW, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M, Houwing-Duistermaat JJ. Evaluation of regression methods when immunological measurements are constrained by detection limits. *BMC Immunol*. 17. listopad 2008.;9:59.
190. Peng Y, Chu S, Yang Y, Zhang Z, Pang Z, Chen N. Neuroinflammatory In Vitro Cell Culture Models and the Potential Applications for Neurological Disorders. *Front Pharmacol*. 2021.;12:671734.
191. Lisnic VJ, Cac MB, Lisnic B, Trsan T, Mefferd A, Mukhopadhyay CD, i ostali. Dual Analysis of the Murine Cytomegalovirus and Host Cell Transcriptomes Reveal New Aspects of the Virus-Host Cell Interface. *PLOS Pathog*. 26. rujanj 2013.;9(9):e1003611.
192. 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*. 15. veljača 1999.;18(4):1081–91.
193. Fielding CA, Aicheler R, Stanton RJ, Wang ECY, Han S, Seirafian S, i ostali. Two novel human cytomegalovirus NK cell evasion functions target MICA for lysosomal degradation. *PLoS Pathog*. svibanj 2014.;10(5):e1004058.
194. Strazić Geljić I, Kucan Brlić P, Angulo G, Brizić I, Lisnić B, Jenus T, i ostali. Cytomegalovirus protein m154 perturbs the adaptor protein-1 compartment mediating broad-spectrum immune evasion. *eLife*. 9:e50803.

195. Zhao L, Zhao J, Zhong K, Tong A, Jia D. Targeted protein degradation: mechanisms, strategies and application. *Signal Transduct Target Ther.* 04. travanj 2022.;7(1):1–13.
196. Lenac Rovis T, Kucan Brlic P, Kaynan N, Juranic Lisnic V, Brizic I, Jordan S, i ostali. Inflammatory monocytes and NK cells play a crucial role in DNAM-1-dependent control of cytomegalovirus infection. *J Exp Med.* 22. kolovoz 2016.;213(9):1835–50.
197. Dawson G. Isolation of Lipid Rafts (Detergent-Resistant Microdomains) and Comparison to Extracellular Vesicles (Exosomes). *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2021.;2187:99–112.
198. Driouich A, Jauneau A, Staehelin LA. 7-Dehydrobrefeldin A, a naturally occurring brefeldin A derivative, inhibits secretion and causes a cis-to-trans breakdown of Golgi stacks in plant cells. *Plant Physiol.* veljača 1997.;113(2):487–92.
199. Nuvolone M, Hermann M, Sorce S, Russo G, Tiberi C, Schwarz P, i ostali. Strictly co-isogenic C57BL/6J-Prnp^{-/-} mice: A rigorous resource for prion science. *J Exp Med.* 07. ožujak 2016.;213(3):313–27.
200. Makzhami S, Passet B, Halliez S, Castille J, Moazami-Goudarzi K, Duchesne A, i ostali. The prion protein family: a view from the placenta. *Front Cell Dev Biol.* 2014.;2:35.
201. Brizić I, Hiršl L, Šustić M, Golemac M, Britt WJ, Krmpotić A, i ostali. CD4 T cells are required for maintenance of CD8 TRM cells and virus control in the brain of MCMV-infected newborn mice. *Med Microbiol Immunol (Berl).* kolovoz 2019.;208(3–4):487–94.
202. Zangger N, Oderbolz J, Oxenius A. CD4 T Cell-Mediated Immune Control of Cytomegalovirus Infection in Murine Salivary Glands. *Pathogens* 2021.,10(12):1531. doi: 10.3390/pathogens10121531.
203. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Abregnani S, Addo R, Akdis M, i ostali. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition). *Eur J Immunol.* prosinac 2021.;51(12):2708–3145.
204. Herndler-Brandstetter D, Ishigame H, Shinnakasu R, Plajer V, Stecher C, Zhao J, i ostali. KLRG1⁺ Effector CD8⁺ T Cells Lose KLRG1, Differentiate into All Memory T Cell Lineages, and Convey Enhanced Protective Immunity. *Immunity.* 17. travanj 2018.;48(4):716-729.e8.
205. van den Berg SPH, Pardieck IN, Lanfermeijer J, Sauce D, Klenerman P, van Baarle D, i ostali. The hallmarks of CMV-specific CD8 T-cell differentiation. *Med Microbiol Immunol (Berl).* kolovoz 2019.;208(3–4):365–73.
206. Hsu KM, Pratt JR, Akers WJ, Achilefu SI, Yokoyama WM. Murine cytomegalovirus displays selective infection of cells within hours after systemic administration. *J Gen Virol.* siječanj 2009.;90(Pt 1):33–43.
207. Bonilla WV, Fröhlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M, Johnson S, i ostali. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8⁺ T cell responses. *Science.* 24. veljača 2012.;335(6071):984–9.

208. Mandaric S, Walton SM, Rüllicke T, Richter K, Girard-Madoux MJH, Clausen BE, i ostali. IL-10 suppression of NK/DC crosstalk leads to poor priming of MCMV-specific CD4 T cells and prolonged MCMV persistence. *PLoS Pathog.* 2012.;8(8):e1002846.
209. Karner D, Kvestak D, Lisnic B, Cokaric Brdovcak M, Juranic Lisnic V, Kucan Brlic P, i ostali. Comprehensive Analysis of Soluble Mediator Profiles in Congenital CMV Infection Using an MCMV Model. *Viruses.* 30. siječanj 2024.;16(2):208.
210. Levine B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell.* 28. siječanj 2005.;120(2):159–62.
211. Schmid D, Pypaert M, Münz C. MHC class II antigen loading compartments continuously receive input from autophagosomes. *Immunity.* siječanj 2007.;26(1):79–92.
212. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature.* 05. ožujak 1992.;356(6364):63–6.
213. Tsutsui S, Hahn JN, Johnson TA, Ali Z, Jirik FR. Absence of the cellular prion protein exacerbates and prolongs neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol.* listopad 2008.;173(4):1029–41.
214. Gourdain P, Ballerini C, Nicot AB, Carnaud C. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in prion protein (PrPc)-null mice: evidence for a critical role of the central nervous system. *J Neuroinflammation.* 26. siječanj 2012.;9:25.
215. Chida J, Hara H, Yano M, Uchiyama K, Das NR, Takahashi E, i ostali. Prion protein protects mice from lethal infection with influenza A viruses. *PLoS Pathog.* svibanj 2018.;14(5):e1007049.
216. Chida J, Hara H, Uchiyama K, Takahashi E, Miyata H, Kosako H, i ostali. Prion protein signaling induces M2 macrophage polarization and protects from lethal influenza infection in mice. *PLoS Pathog.* kolovoz 2020.;16(8):e1008823.
217. Marsico C, Kimberlin DW. Congenital Cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. *Ital J Pediatr.* 17. travanj 2017.;43(1):38.
218. Hassan J, Reen DJ. Reduced primary antigen-specific T-cell precursor frequencies in neonates is associated with deficient interleukin-2 production. *Immunology.* travanj 1996.;87(4):604–8.
219. Fernández-Ruiz M, Parra P, Ruiz-Merlo T, Redondo N, Rodríguez-Goncer I, Andrés A, i ostali. Cytokine and Chemokine Secretome and Risk of CMV Infection Following Discontinuation of Valganciclovir Prophylaxis. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant.* 2023.;36:10979.
220. Bourgon N, Fitzgerald W, Aschard H, Magny JF, Guilleminot T, Stirnemann J, i ostali. Cytokine Profiling of Amniotic Fluid from Congenital Cytomegalovirus Infection. *Viruses.* 28. rujan 2022.;14(10):2145.

221. Teissier N, Fallet-Bianco C, Delezoide AL, Laquerrière A, Marcorelles P, Khung-Savatovsky S, i ostali. Cytomegalovirus-induced brain malformations in fetuses. *J Neuropathol Exp Neurol.* veljača 2014.;73(2):143–58.
222. Diefenbach A, Tomasello E, Lucas M, Jamieson AM, Hsia JK, Vivier E, i ostali. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol.* prosinac 2002.;3(12):1142–9.
223. Slavuljica I, Krmpotić A, Jonjić S. Manipulation of NKG2D Ligands by Cytomegaloviruses: Impact on Innate and Adaptive Immune Response. *Front Immunol.* 28. prosinac 2011.;2:85.
224. Hu W, Nessler S, Hemmer B, Eagar TN, Kane LP, Leliveld SR, i ostali. Pharmacological prion protein silencing accelerates central nervous system autoimmune disease via T cell receptor signalling. *Brain J Neurol.* veljača 2010.;133(Pt 2):375–88.
225. Mantuano E, Azmoon P, Banki MA, Sigurdson CJ, Campana WM, Gonias SL. A Soluble PrPC Derivative and Membrane-Anchored PrPC in Extracellular Vesicles Attenuate Innate Immunity by Engaging the NMDA-R/LRP1 Receptor Complex. *J Immunol Baltim Md* 1950. 01. siječanj 2022.;208(1):85–96.
226. Yang TH, St. John LS, Garber HR, Kerros C, Ruisaard KE, Clise-Dwyer K, i ostali. Membrane-Associated Proteinase 3 on Granulocytes and Acute Myeloid Leukemia Inhibits T Cell Proliferation. *J Immunol Author Choice.* 01. rujan 2018.;201(5):1389–99.
227. Orihara K, Odemuyiwa SO, Stefura WP, Ilarraza R, HayGlass KT, Moqbel R. Neurotransmitter signalling via NMDA receptors leads to decreased T helper type 1-like and enhanced T helper type 2-like immune balance in humans. *Immunology.* ožujak 2018.;153(3):368–79.
228. Wetzels S, Seipold L, Saftig P. The metalloproteinase ADAM10: A useful therapeutic target? *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* studeni 2017.;1864(11 Pt B):2071–81.
229. Gomes LA, Hipp SA, Rijal Upadhaya A, Balakrishnan K, Ospitalieri S, Koper MJ, i ostali. Aβ-induced acceleration of Alzheimer-related τ-pathology spreading and its association with prion protein. *Acta Neuropathol (Berl).* prosinac 2019.;138(6):913–41.
230. Ferreira DG, Temido-Ferreira M, Vicente Miranda H, Batalha VL, Coelho JE, Szegő ÉM, i ostali. α-synuclein interacts with PrPC to induce cognitive impairment through mGluR5 and NMDAR2B. *Nat Neurosci.* studeni 2017.;20(11):1569–79.
231. Blanck G, Huda TI, Chobrutskiy BI, Chobrutskiy A. CMV as a factor in the development of Alzheimer's disease? *Med Hypotheses.* 01. rujan 2023.;178:111140.
232. Zhu C, Aguzzi A. Prion protein and prion disease at a glance. *J Cell Sci.* 01. rujan 2021.;134(17):jcs245605.

ILUSTRACIJE

Popis slika

Slika 1. Shematski prikaz strukturnih dijelova proteina PrP.....	3
Slika 3. Infekcija HCMV-om uzrokuje smanjenje površinske ispoljenosti proteina PrP u primarnoj humanoj staničnoj kulturi fibroblasta	42
Slika 4. Kinetika površinske ispoljenosti proteina PrP tijekom infekcije MCMV-om.....	43
Slika 5. Infekcija MCMV-om uzrokuje nestajanje proteina PrP iz MCMV-inficiranih stanica.	44
Slika 6. Infekcija HCMV-om uzrokuje nestajanje proteina PrP iz HCMV-inficiranih stanica.	45
Slika 7. Uklanjanje proteina PrP iz stanica inficiranih MCMV-om nije pod utjecajem proteasomskog niti lizosomskog puta stanične razgradnje proteina	46
Slika 8. Uklanjanje proteina PrP koji je prisutan na površini stanice u trenutku infekcije odvija se brže nego ukupni površinski PrP tijekom MCMV-infekcije..	47
Slika 9. Virusna infekcija specifično djeluje na zreli oblik PrP-a i smanjuje mu količinu.	48
Slika 10. Infekcija MCMV-om smanjuje izražaj tkivnog inhibitora TIMP3 dok razine ADAM10 ostaju podjednake..	49
Slika 11. Inhibicija ADAM10 proteaze rezultira zadržavanjem PrP-a na MCMV-inficiranim stanicama.	50
Slika 12. Inhibicija proteaze ADAM10 rezultira zadržavanjem PrP-a na površini MCMV-inficiranih stanica.	51
Slika 13. Virusna infekcija specifično djeluje na zreli oblik PrP-a na način da ga uklanja cijepanjem s plazmatske membrane u vanstanični prostor.	52
Slika 14. Nedostatak PrP-a ne utječe na tijek infekcije MCMV-om u odraslih miševa.	53
Slika 15. Miševi PrP KO bolje kontroliraju virusnu infekciju u mozgu od miševa divljeg tipa.....	55
Slika 16. Razlika u broju IBA-1+ stanica između PrP KO i C57BL6J miševa nakon infekcije MCMV-om.	56
Slika 17. Nedostatak PrP-a ispravlja abnormalnosti u razvoju malog mozga kao posljedice MCMV-infekcije..	57
.....	58
Slika 18. Miševi PrP KO bolje kontroliraju virusnu infekciju u perifernim organima od miševa divljeg tipa.	58
Slika 19. Bolja kontrola MCMV-a u mozgu miševa PrP KO ovisna je o limfocitima CD8 T.	59
Slika 20. Udio te broj virus-specifičnih limfocita CD8 T u slezeni miševa PrP KO je povišen u odnosu na miševе WT soja.....	61
Slika 21. Udio te broj virus-specifičnih limfocita CD8 T u slezeni miševa PrP KO je povišen u odnosu na miševе WT 14 dana poslije infekcije MCMV-om.	61
Slika 22. Udio virus-specifičnih limfocita CD8 T u jetri miševa PrP KO je povišen u odnosu na miševе WT.	62
Slika 23. Udio stanica CD8 T u slezeni i jetri MCMV-inficiranih novoookoćenih miševa PrP KO se statistički značajno ne razlikuje od udjela CD8 T u slezeni miševa C57BL/6J.....	63
Slika 24. Nema razlike u broju stanica CD8 T između miševa PrP KO i C57BL/6J nakon infekcije MCMV-om.	64
Slika 25. Udio virus-specifičnih limfocita CD8+ T u krvi miševa PrP KO je povišen u odnosu na WT miševе.....	65
Slika 26. scRNAseq analiza fenotipskih razlika stanica CD8 T miševa PrP KO i WT.	66

Slika 27 Odnos proteina KLRG1+ i CD62L+ na površini limfocita CD8+ T u slezeni i jetri miševa PrP KO i WT 14 dana poslije infekcije MCMV-om odgovara razini transkripata.....	68
Slika 28. Udio limfocita CD8 T koji su IFN γ ili TNF α pozitivni je povišen u slezeni i jetri miševa PrP KO miševa u odnosu na miševe WT 14 dana poslije infekcije MCMV-om.....	69
.....	70
Slika 29. Udio limfocita CD8 T koji su CD107a ili Granzim B pozitivni je povišen u slezeni miševa PrP KO u odnosu na miševe divljeg tipa 14 dana poslije infekcije MCMV-om.	70
Slika 30. Utjecaj infekcije MCMV-om na porast kemokina CCL3, CCL4 i CCL7 u tkivima.	73
Slika 31. Povišena koncentracija kemokina CCL11 uslijed infekcije u tkivu mozga.....	74
Slika 32. IL-10 je pod utjecajem infekcije MCMV-om u perifernim organima.	75
Slika 33. Prisustvo proteina PrP utječe na razine kemokina CCL2.	76
Slika 34. Vezanje rekombinantnog PrP-a specifično je za limfocite CD8 T iz inficiranih životinja....	77
Slika 35. Vezanje rekombinantnog PrP-a specifično je za limfocite CD8 T iz inficiranih novookoćenih životinja..	78
Slika 36. Vezanje rekombinantnog PrP-a na limfocite CD8 T utišava njihovu aktivaciju, mjereno lučenjem citokina IFN γ i TNF α	79
Slika 37. Vezanje rekombinantnog PrP-a na limfocite CD8 T izolirane iz inficiranih miševa PrP KO utišava njihovu aktivaciju, mjereno lučenjem citokina IFN γ i TNF α	79

Popis tablica

Tablica 1. Mediji, otopine i reagensi za stanične kulture, protočnu citometriju i određivanje titra virusa	23
Tablica 2. Pufferi i otopine za SDS-PAGE i Western blot.....	24
Tablica 3. Ostale otopine i pufferi.....	24
Tablica 4. Popis korištenih protutijela u protočnoj citometriji	25
Tablica 5. Popis korištenih protutijela u Western blot metodi.....	26
Tablica 6. Popis korištenih protutijela u metodi konfokalne laserske pretražne mikroskopije.....	26
Tablica 7. Ostali komercijalni reagensi, kompleti i materijali	27
Tablica 8. MHC I- restriktivni tetramer MCMV	28
Tablica 9. Koncentracija citokina i kemokina procijenjena je u prirodno inficiranih miševa soja C57BL/6J (WT) 9 i 14 dana nakon infekcije (dpi).	71

POPIS POKRATA

ADAM - prema engl. a disintegrin and metalloproteinase

BAC - umjetni bakterijski kromosom (engl. bacterial artificial chromosome)

cAMP - ciklički adenzin monofosfat (engl. cyclic adenosine monophosphate)

CCL - prema engl. C-C Motif Chemokine Ligand

CD - prema engl. cluster of differentiation

CMV - citomegalovirus

DCs - dendritičke stanice (engl. dendritic cells)

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

Dpl - doppel

E - rani geni (engl. Early genes)

EGL - vanjski zrnati sloj (engl. external granular layer)

ELISA - imunoenzimni test (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)

ER - endoplazmatski retikulum (engl. endoplasmic reticulum)

GPI - glikofosfatidilinozitol

HCMV - humani citomegalovirus

HFF - stanice humanih fibroblasta (engl. human foreskin fibroblasts)

HSV-1 - virus herpes simpleks tipa 1

IAV - virus gripe tipa A (engl. influenza virus type A)

IBA-1 prema engl. ionized calcium-binding adaptor protein 1

IE - neposredno rani geni (engl. Immediate early genes)

IFN γ - interferon gamma

IL - interleukin

i.p. - intraperitonealno

L - kasni geni (engl. Late genes)

LPS - lipopolisaharid

LRP1 - protein povezan s receptorom lipoproteina male gustoće (engl. low-density lipoprotein receptor-related protein 1)

MCMV - mišji citomegalovirus

MEF - mišji embrionalni fibroblasti

MFI - medijan jačine fluorescencije (engl. Median Fluorescence Intensity)

MHC - molekule tkivne snošljivosti (engl. major histocompatibility complex)

MMP - matričnih metaloproteaza (engl. matrix metalloproteases)

NCAM - od engl. neural cell adhesion molecule

NMDA-R – receptor N-metil-D-aspartata

PFU - infektivna jedinica virusa (engl. plaque forming unit)

PrP - od engl. prion protein

PrP^C - od engl. prion protein cellular

PrP^{Sc} - od engl. prion protein scrapie

PVR - polio-virusni receptor

ROS - reaktivne kisikove vrste (engl. reactive oxigen species)

RPMI - kompletni RPMI medij (engl. Roswell park memorial institute medium) SH2 - prema engl. Src Homology 2

SDS-PAGE - natrijdodecil sulfat poliakrilamidna gel-elektroforeza (engl. sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel-electrophoresis)

Sho - shadoo

SPF - uvjeti bez specifičnih patogena (engl. specific pathogen free)

TACE - od engl. TNF α converting enzyme

T_{CM} - centralni memorijski limfociti T

TCR – T-stanični receptor (engl. T cell receptor)

T_{EM} - efektorski memorijski limfociti T

Th - pomoćnički limfociti T (engl. T-helper)

Treg - regulatorne T stanice

TNF α - čimbenik nekroze tumora alfa (engl. Tumor necrosis factor alpha)

T_{RM} - tkivno-rezidentni memorijski limfociti T

WT – divlji tip od engl. wild type

ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

IME I PREZIME: Dubravka Karner

DATUM ROĐENJA: 24.01.1994.

ADRESA: Franje Račkoga 20, 51 000 Rijeka, Hrvatska

ELEKTRONIČKA POŠTA: dubravka.karner@uniri.hr

TELEFON: +385 51 651 263

ŠKOLOVANJE

2019. – danas **Doktorski studij - Doktorska škola iz znanstvenog područja biomedicina i zdravstvo**

Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet

- Projekt: Projekt razvoja karijera mladih istraživača - izobrazba novih doktora znanosti, pod brojem 6543, Hrvatska zaklada za znanost. Mentor: prof. dr. sc. Tihana Lenac Roviš

2015. – 2017. **Diplomski sveučilišni studij „Biotehnologija u medicini“**

Titula: Magistra biotehnologije u medicini

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju

- Diplomski rad: „Optimizacija protokola za izolaciju proteina mikrobiota izoliranih iz fecesa štakora“. Mentor: izv. prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

2012. – 2015. “ **Preddiplomski sveučilišni studij „Biotehnologija i istraživanje lijekova“**

Titula: Sveučilišna prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju

2008. – 2012. Prva sušačka hrvatska gimnazija u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

RADNO ISKUSTVO

2019. – danas

Asistent na projektu/doktorand (Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Centar za proteomiku)

- Projekt: Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti (6543, Hrvatska zaklada za znanost). Mentor: prof. dr. sc. Tihana Lenac Roviš

USAVRŠAVANJA

1. 06. 2022. - 07. 2022. Institut Pasteur u Parizu, Cytometry and Biomarkers (CB UTechS), Francuska - Internship
2. 2019. Program osposobljavanja za rad sa laboratorijskim životinjama (kategorija C – Broj potvrde: TPŽ 13/19), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb (Hrvatska).

PUBLIKACIJE

1. Karner D, Kvestak D, Lisnic B, Cokaric Brdovcak M, Juranic Lisnic V, Kucan Brlic P, Hasan M, Lenac Roviš T. Comprehensive Analysis of Soluble Mediator Profiles in Congenital CMV Infection Using an MCMV Model. *Viruses*. 2024; 16(2):208. <https://doi.org/10.3390/v16020208> – **prvi autor**
2. Wild M, Karner D, Eickhoff J, Wagner S, Kicuntod J, Chang W, Barry P, Jonjić S, Lenac Roviš T, Marschall M. Combined Treatment with Host Directed and Anticytomegaloviral Kinase Inhibitors: Mechanisms, Synergisms and Drug Resistance Barriers. *Pharmaceutics*. 2023; 15(12):2680. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15122680> – **ko-autor**
3. Strazic Geljic I, Kucan Brlic P, Musak L, Karner D, Ambriović-Ristov A, Jonjic S, Schu P, Roviš TL. Viral Interactions with Adaptor-Protein Complexes: A Ubiquitous Trait among Viral Species. *Int J Mol Sci*. 2021 May 17;22(10):5274. doi: 10.3390/ijms22105274. – **revija, ko-autor**

SUDJELOVANJE NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

1. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Sveti Martin na Muri (Hrvatska), 06.-08.10.2022. – “Immunological role of cellular prion protein (PrP^C) during cytomegaloviral infection.” Dubravka Karner, Daria Kveštak, Paola Kučan Brlić, Maja Cokarić Brdovčak, Berislav Lisnić, Ilija Brizić, Vanda Juranić Lisnić, Mijo Golemac, Jelena Tomac, Giuseppe Legname, Hermann C Altmeppen, Milena Hasan, Stipan Jonjić, Tihana Lenac Roviš – **poster prezentacija**
2. Prion2022 Conference, Gottingen (Njemačka) 13.-16.09.2022.. – “Immunological role of cellular prion protein (PrP^C) during cytomegaloviral infection.” Dubravka Karner, Daria Kveštak, Paola Kučan Brlić, Maja Cokarić Brdovčak, Berislav Lisnić, Ilija Brizić, Vanda Juranić Lisnić, Mijo Golemac, Jelena Tomac, Giuseppe Legname, Hermann C Altmeppen, Milena Hasan, Stipan Jonjić, Tihana Lenac Roviš – **poster prezentacija**
3. 1st Biomedicine and Health PhD Students Congress, Rijeka (Hrvatska) 19.-20.05.2022. – „Immunological role of cellular prion protein (PrP^C) during viral infection.“ Dubravka Karner, Daria Kveštak, Paola Kučan Brlić, Berislav Lisnić, Hermann C Altmeppen, Stipan Jonjić, Tihana Lenac Roviš. – **usmeno izlaganje**
4. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Trogir (Hrvatska), 23.- 25.09.2021. – „Immunological role of cellular prion protein (PrP^C) during viral infection.“ Dubravka Karner, Daria Kveštak, Paola Kučan Brlić, Berislav Lisnić, Hermann C Altmeppen, Stipan Jonjić, Tihana Lenac Roviš. – **poster prezentacija**

RAD NA PROJEKTIMA

- Imunoregulatorna uloga proteina PrP u imunološkom antivirusnom odgovoru i otpornosti na citomegalovirusnu infekciju, (IP-2020-02-6617) Hrvatska zaklada za znanost; Tihana Lenac Roviš
- Međuodnos proteina PrP i imunološkog sustava tijekom virusne infekcije (uniri-biomed-18-23) Sveučilišna potpora projektu, Sveučilište u Rijeci, Tihana Lenac Roviš
- Projekt razvoja karijera mladih istraživača - izobrazba novih doktora znanosti, (6543) Hrvatska zaklada za znanost; Tihana Lenac Roviš
- „Jačanje kapaciteta CerVirVac-a za istraživanja u virusnoj imunologiji i vakcinologiji“, Europski fond za regionalni razvoj, br. ugovora: KK.01.1.1.01.0006

ČLANSTVA

Od 2020. – danas Član Hrvatskog imunološkog društva (HID)