

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Fran Krstanović

**ULOGA NEURONA I GLIJA-STANICA U
PRODUKTIVNOJ I LATENTNOJ INFEKCIJI
CITOMEGALOVIRUSOM**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2025.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Fran Krstanović

**ULOGA NEURONA I GLIJA-STANICA U
PRODUKTIVNOJ I LATENTNOJ INFEKCIJI
CITOMEGALOVIRUSOM**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ilija Brizić

Rijeka, 2025.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE

Fran Krstanović

**THE ROLE OF NEURONS AND GLIAL
CELLS IN PRODUCTIVE AND LATENT
CYTOMEGALOVIRUS INFECTION**

DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2025

Mentor rada:

Izv. prof. dr. sc. Ilija Brizić, mag. bioteh.

Doktorski rad obranjen je dana . godine na Medicinskom fakultetu, Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. akademik Stipan Jonjić, dr. med.
2. dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju
3. prof. dr. sc. Igor Jurak, dipl. ing. bio

Rad ima 114 stranica, 33 slike, 14 tablica i 238 literaturna navoda.

UDK:

Zahvale

Rad je izrađen u Centru za proteomiku te na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ilije Brizića, u sklopu dokorskog studija „Biomedicina i zdravstvo/Temeljne medicinske znanosti“ pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Rad je izrađen u sklopu projekta: „Biologija citomegalovirusne infekcije u mozgu tijekom razvoja i u latenciji” Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) i Europskog socijalnog fonda pod brojem PZS-2019-02-7879 i projekta „Latentna infekcija citomegalovirusom u središnjem živčanom sustavu,, HRZZ-a pod brojem IP-2022-10-3371 glavnog istraživača izv. prof. dr. sc. Ilije Brizića.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Humani citomegalovirus (HCMV) je vodeći uzročnik prirođenih virusnih infekcija koji često uzrokuje trajna oštećenja živčanog sustava u djece. Tipovi stanica i mehanizmi uključeni u uspostavljanje cjeloživotne latencije citomegalovirusa (CMV) u mozgu još uvijek su nepoznati. Glavni cilj ovog istraživanja je razjasniti diseminaciju virusa i stanični tropizam, te imunološke mehanizme koji nadziru infekciju i uspostavljanje latencije CMV-a u mozgu.

Materijali i metode: U ovom istraživanju koristili smo mišji model prirodne CMV infekcije, u kojem su novookoćeni miševi inficirani mišjim citomegalovirusom (MCMV). Kako bismo izučavali biologiju infekcije MCMV-om u mozgu, koristili smo rekombinantne reporterske viruse i transgenične mišve koji ispoljavaju rekombinazu Cre ili im nedostaju ključni elementi efektorskih funkcija limfocita T. Tropizam, anatomska lokacija i reaktivacija virusa određeni su imunohistokemijskim metodama. Kako bismo testirali ulogu imunoloških medijatora u sprečavanju infekcije neurona HCMV-om, koristili smo staničnu liniju humanog neuroblastoma SH-SY5Y i organotipsku kulturu tkiva ljudskog fetalnog mozga (hfOBSC).

Rezultati: Pokazali smo da je tijekom akutne faze infekcije u novookoćenih miševa hipokampus glavno mjesto produktivne infekcije MCMV-om. Infektivni virus prvo su proizveli astrociti, zatim mikroglije i konačno neuroni, koji su bili glavna mjesta replikacije virusa tijekom kasne faze akutne infekcije. Pokazali smo da su $CD4^{+}$ limfociti T i citokin IFN- γ potrebni za razrješenje produktivne infekcije u neuronima. Citokin IFN- γ također može spriječiti infekciju stanica SH-SY5Y i neurona u hfOBSC HCMV-om. Konačno, pokazali smo da MCMV uspostavlja latenciju u neuronima i da su $CD4^{+}$ limfociti T ključni za sprečavanje reaktivacije virusa iz neurona.

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja po prvi put pokazuju da CMV uspostavlja latenciju u neuronima, te da su $CD4^{+}$ limfociti T i citokin IFN- γ ključni za nadzor produktivne i latentne infekcije u neuronima. Ova studija ima važan translacijski potencijal s obzirom da ukazuje na to da bi poticanje odgovora posredovanog $CD4^{+}$ limfocitima T moglo spriječiti neurološke posljedice uzrokovane prirođenom CMV infekcijom.

Ključne riječi: citomegalovirus, prirodna infekcija, neuroni, virusna latencija

SUMMARY

Objectives: Human cytomegalovirus (HCMV) is the leading cause of congenital viral infections, frequently accompanied with long-term neurological sequelae in children. The cell types and mechanisms involved in establishing lifelong CMV latency in the brain, from which the virus reactivates intermittently, remain enigmatic. This research aims to elucidate viral dissemination and cell tropism, immune mechanisms controlling the infection, and the establishment of MCMV latency in the brain.

Materials and methods: In this research, we used mouse model of congenital CMV infection, in which newborn mice are infected with MCMV postnatally. To study the biology of MCMV infection in the brain, we utilized recombinant reporter viruses and transgenic mouse lines that express Cre recombinase or lack critical elements of T-cell effector functions. Viral tropism, anatomical location, and reactivation were determined with immunohistochemical methods. We employed human cell line SH-SY5Y and human fetal organotypic brain slices cultures (hfOBSCs) to test the role of immune mechanisms in preventing HCMV infection of neurons.

Results: We found that the hippocampus is a major site of productive MCMV infection during the acute phase in newborn mice. Infectious virus was first produced by astrocytes, then microglia, and finally by neurons, which were the major sites of viral replication during the late phase of infection. CD4⁺ T-cells and IFN- γ were pivotal in resolving a productive infection in neurons. IFN- γ can also suppress HCMV infection of SH-SY5Y cell line and neurons in hfOBSCs. Finally, we show that MCMV establishes latency in neurons and that CD4⁺ T-cells are crucial to prevent virus reactivation.

Conclusion: This research shows for the first time that neuron-restricted cytomegalovirus latency in the central nervous system is regulated by CD4⁺ T cells and IFN- γ . This study has important translational potential as it demonstrates that boosting CD4⁺ T-cell-mediated immunity could prevent neurological sequelae following congenital CMV infection.

Keywords: cytomegalovirus, congenital infection, neurons, viral latency

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Humani citomegalovirus	1
1.2. Virusne infekcije središnjeg živčanog sustava	2
1.3. Prirođena HCMV infekcija	3
1.4. Dijagnostički i terapijski pristupi cHCMV infekciji	4
1.5. Animalni modeli cHCMV infekcije	5
1.6. Mišji model cHCMV infekcije	6
1.7. CMV infekcija stanica u mozgu	7
1.7.1. Astrociti	7
1.7.2. Mikroglia	7
1.7.3. Neuroni	8
1.7.4. Neuralne matične prekursorske stanice	8
1.7.5. Oligodendrociti	9
1.7.6. Ependimske stanice	9
1.8. Latencija CMV-a u mozgu	10
1.9. Patogeneza cCMV infekcije u mozgu	11
1.10. Imunološki odgovor na infekciju CMV-om u mozgu	15
1.10.1. Imunološki odgovor na akutnu infekciju CMV-om u mozgu	15
1.10.2. Imunološki odgovor na latentnu infekciju CMV-om u mozgu	16
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	19
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. Materijali	20
3.1.1. Miševi	20
3.1.2. Stanične linije	22
3.1.3. Virusi	22
3.1.4. Mediji, otopine i puferi	23
3.1.5. Monoklonska protutijela	25
3.1.6. Početnice	27

3.1.7. Reagensi za imunohistokemiju	28
3.1.8. Ostale kemikalije i rekombinantni proteini	28
3.2. Metode.....	29
3.2.1. Održavanje staničnih linija	29
3.2.2. Određivanje broja stanica	30
3.2.3. Infekcija miševa.....	30
3.2.4. Uklanjanje podskupina imunskih stanica	30
3.2.5. Tretman tamoksifenom.....	31
3.2.6. Određivanje genotipa miševa	31
3.2.7. Određivanje titra virusa u organima inficiranih miševa	33
3.2.8. Testovi reaktivacije MCMV-a.....	34
3.2.9. Histologija	34
3.2.10. Organotipska kultura tkiva ljudskog fetalnog mozga (hfOBSCs).....	35
3.2.11. Izolacija imunskih stanica iz mozga.....	36
3.2.12. Analiza i sortiranje stanica iz mozga metodom protočne citometrije	37
3.2.13. Kvantitativni PCR (qPCR)	37
3.2.14. Statistička obrada podataka	38
4. REZULTATI.....	39
4.1. Infekcija MCMV-om u mozgu ovisna o dobi	39
4.2. Infekcija MCMV-om u mozgu tijekom razvoja.....	41
4.3. Hipokampus je glavna regija produktivne i latentne infekcije MCMV-om u mozgu miševa	42
4.4. Neuron su glavni izvor infektivnog virusa tijekom kasne faze akutne infekcije	44
4.5. CD4 ⁺ limfociti T su potrebni za razrješenje produktivne infekcije u kortikalnim i hipokampalnim neuronima.....	49
4.6. Razrješenje produktivne infekcije neurona MCMV-om posredovano je citokinima IFN- γ i IL-12.....	53
4.7. Citokin IFN- γ inhibira infekciju ljudskih neurona HCMV-om	59
4.8. Neuron su mjesta latencije i reaktivacije MCMV-a.....	62
5. DISKUSIJA	68

6. ZAKLJUČCI.....	74
7. LITERATURA.....	75

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Humani citomegalovirus

Humani citomegalovirus (HCMV) ili humani herpesvirus 5 (HHV-5) je herpesvirus koji inficira između 40 i >90% populacije u različitim regijama svijeta [1]. HCMV pripada obitelji β -herpesvirusa (*Betaherpesvirinae*). Kao i drugi članovi obitelji herpesvirusa, HCMV posjeduje veliki genom koji se sastoji od dvolančane molekule DNA s preko 230.000 parova baza [2]. Strukturno je genom okružen ikozaedralnom nukleokapsidom, proteinskim omotačem (tegumentom) i lipidnom ovojnicom koja sadrži brojne virusne glikoproteine [2]. Virusni se geni ispoljavaju u tri faze prema čemu se dijele u tri skupine, ovisno o vremenu njihovog ispoljavanja tijekom replikacije virusa. Izrazito rani (engl. *immediate early*, IE) geni ispoljavaju se prvi nakon infekcije i bitni su za sintezu proteina, manipulaciju staničnog ciklusa i regulaciju transkripcije gena rane (engl. *early*, E) faze [3]. Rani geni kodiraju replikacijske proteine, a kasni geni (engl. *late*, L) strukturne proteine tegumenta, nukleokapside i ovojnice [3].

U većini imunokompetentnih osoba primarna infekcija HCMV-om je asimptomatska zbog učinkovitog imunološkog odgovora [4]. U nekim slučajevima infekcija može uzrokovati sindrom infektivne mononukleoze praćen simptomima vrućice, hepatomegalije i limfadenopatije [5]. Međutim primarna infekcija ili reaktivacija virusa može uzrokovati ozbiljnu bolest u imunokompromitiranih osoba. Različite rizične skupine, kao što su primatelji transplantata, pacijenti na intenzivnoj njezi, pacijenti sa sindromom stečene imunodeficijencije (engl. *acquired immune deficiency syndrome*, AIDS) i fetusi/novorođenčad podložni su razvoju bolesti posredovane HCMV-om zbog oslabljena imunološkog odgovora [4,6].

HCMV karakterizira širok stanični tropizam, pri čemu je većina tipova stanica potpuno permisivna za infekciju [7]. Epitelne, endotelne, fibroblastne i glatke mišićne stanice smatraju se glavnim stanicama koje podupiru replikaciju HCMV-a, dok mijeloidne stanice omogućuju diseminaciju virusa kroz organizam, ali ne podupiru snažnu replikaciju virusa [8]. Pretpostavlja se da infekcija novog domaćina HCMV-om započinje infekcijom epitela sluznica ili infekcijom trofoblasta posteljice u slučaju prirođene infekcije. Nakon infekcije inicijalnih stanica mijeloidne stanice posreduju u širenju virusa u organe kao što su slezena, jetra i pluća [9]. Učinkovita replikacija u stanicama kao što su fibroblasti, hepatociti i glatke mišićne stanice omogućuje

stvaranje značajnih količina infektivnog virusa u različitim organima [8]. Nakon infekcije primarnih organa dolazi do sekundarne diseminacije pomoću mijeloidnih stanica u organe kao što su žlijezde slinovnice i bubrezi [9]. Infekcija epitelnih stanica žlijezda i tkiva sluznica omogućuje širenje virusa na nove domaćine lučenjem infektivnih čestica u tjelesne tekućine [9]. Tri glavna glikoproteinska kompleksa CMV-a, gB, gM/gN i gH/gL, posreduju ulazak virusa u stanicu [10]. Smatra se da se njihov doprinos ulasku događa uzastopce, pri čemu gM/gN kompleks posreduje u početnom pričvršćivanju na stanice domaćina, gH/gL kompleksi vežu se na receptore na staničnoj površini, a gB posreduje fuziju sa staničnom membranom [11]. Specifičnost infekcije pojedinih vrsta stanica posreduju kompleksi gH/gL. Trimerni kompleks koji se sastoji od glikoproteina gH/gL i gO (gH/gL/gO) posreduje ulazak u sve stanice, ponajprije u fibroblaste, i potreban je za infektivnost slobodnih viriona [12]. Pentamerni glikoproteinski kompleks gH/gL s glikoproteinima UL128, UL130 i UL131 potreban je za infekciju epitelnih, endotelnih, dendritičnih stanica, te za širenje kontaktom između stanica [12].

Jedna od značajki obitelji herpesvirusa jest uspostavljanje cjeloživotne latentne infekcije iz koje se virus povremeno reaktivira [13]. Ograničavanjem replikacije tijekom latencije HCMV izbjegava aktivaciju imunološkog odgovora domaćina dok istovremeno održava genom u stanicama domaćina. HCMV uspostavlja latenciju u koštanoj srži unutar hematopoetskih progenitorskih stanica [14]. Iako je latencija HCMV-a područje od velikog interesa, ovo virusno stanje još uvijek nije dobro razjašnjeno [15–17]. Za razliku od herpes simplex virusa 1 (HSV-1) čiji su transkripti povezani s latencijom (engl. *Latency Associated Transcripts*, LATs) dobro karakterizirani, geni ispoljeni tijekom latencije HCMV-a nisu specifični samo za latenciju, s obzirom na to da je njihovo ispoljavanje opaženo i tijekom litičkog ciklusa [16,18,19]. U skladu s tim opažanjima, nedavne studije pokazuju da je obilježje latentne infekcije HCMV-om niska razina ispoljavanja širokog spektra gena litičkog ciklusa virusa [14,20,21].

1.2. Virusne infekcije središnjeg živčanog sustava

Neurotropni virusi jesu virusi koji učinkovito inficiraju središnji i periferni živčani sustav (PŽS) [22]. Neurotropne virusne infekcije središnjeg živčanog sustava (SŽS-a) predstavljaju znatnu prijetnju ljudskom zdravlju. Iako se neurotropni virusi mogu međusobno razlikovati po klasifikaciji, načinu ulaska u mozak, tropizmu ili patogenezi, imaju zajedničke neurološke manifestacije nakon infekcije SŽS-a koje mogu dovesti do razvoja meningitisa, encefalitisa i

moždanog udara [23]. Prenatalna izloženost virusnim infekcijama u mozgu ili sistemske virusne upale mogu utjecati na razvoj mozga fetusa, što može dovesti do razvojnih i kognitivnih poremećaja kao i povećanog rizika od razvoja neuropsihijatrijskih poremećaja kasnije u životu, poput shizofrenije, poremećaja autističnog spektra i depresije [24]. Neke kliničke posljedice virusnih infekcija mozga fetusa nisu odmah vidljive, te njihov učinak na živčani sustav može biti manifestiran i prepoznat desetljećima nakon rođenja. Virusne infekcije i upale mogu rezultirati izravnim oštećenjem i odumiranjem neurona i njihovih prekursora ili neizravnim oštećenjem aktivacijom mikroglije i astrocita, što može potaknuti proizvodnju upalnih citokina i oksidativni stres [24]. Nadalje, upalni procesi mogu pridonijeti sinaptičkoj disfunkciji, koja je ključna u neurodegenerativnim, neurorazvojnim i neuropsihijatrijskim poremećajima [25]. Novija istraživanja ukazuju na povezanost herpesvirusnih infekcija s neurološkim i neuropsihijatrijskim poremećajima. Primjerice, HSV-1 se smatra čimbenikom rizika za razvoj Alzheimerove bolesti (AD), dok epidemiološki i mehanistički dokazi upućuju na uzročnu vezu između Epstein-Barr virusa (EBV) i razvoja multiple skleroze (MS) [26,27].

1.3. Prirođena HCMV infekcija

Godišnje se 0,2-2% novorođenčadi rodi se s HCMV infekcijom, što čini prirođenu HCMV (engl. *Congenital HCMV*, cHCMV) infekciju najčešćom prirođenom virusnom infekcijom u razvijenom svijetu [6,28]. Od 10 do 15% zaražene novorođenčadi razvije klinički izražene simptome (simptomatska cHCMV infekcija), kao što su visceralna organomegalija, mikrocefalija s intrakranijalnim kalcifikatima, korioretinitis, žutica, mentalna retardacija, senzorneuralni gubitak sluha (engl. *sensorineural hearing loss*, SNHL) i kožne lezije (petehije i purpura). Osim toga, rjeđe može dovesti do prijevremenog rođenja, male veličine za gestacijsku dob i neonatalne smrti [6,29,30]. cHCMV infekcija pogađa više djece od trisomije 21 ili fetalnog alkoholnog sindroma i vodeći je uzrok nenasljednog gubitka sluha [31,32]. Iako većina zaražene novorođenčadi nema klinički izražene simptome pri rođenju (asimptomatska cHCMV infekcija), u otprilike 10% slučajeva će doći do razvoja neuroloških oštećenja, najčešće gubitka sluha [6,28]. Unatoč manjku klinički izraženih simptoma, zaražena novorođenčad može dugotrajno izlučivati virus u svojim tjelesnim tekućinama, čak i do 5 godina nakon infekcije [33].

Prijenos virusa s HCMV-pozitivnih majki na fetuse počinje na spoju maternice i posteljice, prvo inficirajući glatke mišiće maternice i endotelne stanice u decidui [34]. Pretpostavlja se da

virus ulazi u fetalnu cirkulaciju u obliku slobodnih viriona zbog ograničene propusnosti posteljice za ulazak majčinih stanica u fetalnu cirkulaciju [6]. Kada HCMV prijeđe iz posteljice u krvotok fetusa, inficira brojne organe [35]. Prethodno stečena imunost značajno smanjuje mogućnost intrauterinog prijenosa virusa na fetus, što dokazuje razlika u stopama prijenosa između zaraženih seropozitivnih i seronegativnih trudnica [36]. Sukladno navedenom, nedavna studija je pokazala da vezanje protutijela IgG na HCMV s visokom avidnošću i stanična fagocitoza ovisna o antitijelima (engl. *antibody-dependent cellular phagocytosis*, ADCP) putem aktivacije receptora FcγRI i FcγRII može zaštititi fetus od intrauterinog prijenosa virusa [37]. Opservacijske studije ukazuju da nema korelacije između količine virusa u amnionskoj tekućini i razvoja dugoročnih posljedica, što čini prognoze u pojedinačnim slučajevima izazovnim [30]. Kod primarnih infekcija prijenos HCMV-a na fetus češći je u posljednja dva tromjesečja [38,39]. Međutim, razvoj teških posljedica češći je nakon infekcija tijekom prvog tromjesečja, za što se pretpostavlja da je dijelom povezano sa nižim stupnjem razvoja imunološkog sustava fetusa [40]. U prilog tome govori i činjenica da su više razine virusa u urinu i perifernoj krvi pri rođenju povezane s većim rizikom od neurorazvojnih poremećaja [33,41]. Velike količine virusa mogu dovesti do oštećenja vitalnih organskih sustava fetusa poput hepatobilijarnog, živčanog, hematopoetskog i respiratornog, pri čemu su posljedice po organe s ograničenom sposobnošću regeneracije, poput živčanog i slušnog sustava, često trajne [42].

Iako su direktne posljedice cHCMV infekcije na razvoj živčanog sustava jasno definirane, nove opservacijske studije ukazuju na uzročnu vezu između infekcije HCMV-om i naknadnim razvojem drugih neurokognitivnih i neuropsihijatrijskih poremećaja, kao što su AD, vaskularna demencija, depresivni poremećaj, bipolarni poremećaj, anksioznost i poremećaji iz spektra autizma [43].

1.4. Dijagnostički i terapijski pristupi cHCMV infekciji

Unatoč dugoj povijesti razvoja ne postoji odobreno cjepivo za HCMV [44]. Dijagnostički i terapijski pristupi za cHCMV infekciju još su uvijek vrlo ograničeni, stoga je potrebno bolje razumijevanje patogeneze infekcije i razvoj novih dijagnostičkih i terapijskih pristupa [29]. Korištenje antivirusnih lijekova tijekom trudnoće je problematično s obzirom da većina antivirusnih lijekova koji su efikasni protiv HCMV-a nije odobrena za uporabu tijekom trudnoće jer ciljano djeluju na enzime potrebne za sintezu DNA, te dovode do ozbiljnih nuspojava [38].

Antivirusni lijekovi nove generacije, uključujući letermovir, koji je specifičan za virusnu terminazu, i valaciklovir, pokazuju dobre rezultate kao terapijski pristup tijekom trudnoće [38]. Postnatalno liječenje cHCMV infekcije uključuje uporabu antivirusnih lijekova kao što je ganciklovir, za koji se pokazalo da učinkovito nadzire akutnu infekciju i ublažava progresiju neuroloških abnormalnosti, prvenstveno SHNL [30]. Drugi pristupi liječenja, poput upotrebe hiperimunoglobulina također su testirana u kliničkim ispitivanjima na trudnicama s potvrđenom cHCMV infekcijom no do danas nisu pokazala jasnu korist takvog terapijskog pristupa [45,46].

1.5. Animalni modeli cHCMV infekcije

Istraživanja infekcije HCMV-om u mozgu tijekom prirodene infekcije ograničena su uglavnom na histopatološke i opservacijske studije. Osim navedenog, razlike u vremenskom periodu fetalne infekcije, težini virusne infekcije i velike varijacije u patološkim promjenama, te nedostatak neinvazivnih metoda otežavaju istraživanja infekcije HCMV-om u mozgu [47]. Za izučavanje patogeneze HCMV-a u mozgu nedavno su razvijeni trodimenzionalni (3D) modeli kortikalnih organoida izvedeni iz induciranih pluripotentnih matičnih stanica (engl. *induced pluripotent stem cells*, iPSC) [48–51]. Međutim kortikalni organoidi ne oponašaju složenost ljudskog mozga te im nedostaju relevantni tipovi imunoloških stanica kao što su mikroglia i limfociti T [52]. Dosadašnje studije patogeneze HCMV-a u kortikalnim organoidima temeljile su se na analizi rasta organoida, međustaničnoj komunikaciji, diferencijaciji neurona i ispoljavanja gena uslijed infekcije HCMV-om [48–51].

HCMV je strogo specifičan za vrstu i stoga se patogeneza HCMV-a ne može direktno istraživati na animalnim modelima. Zbog usporedive genetike i patogeneze različiti životinjski citomegalovirusi (CMV-i) korišteni su za modeliranje infekcije HCMV-om [53–55]. Najčešće korišten eksperimentalni animalni model jest model miša, ali se štakori, zamorci i rezus makaki također često koriste za izučavanje infekcije CMV-om. Model rezus makak CMV-a (engl. *Rhesus CMV*, RhCMV) posebno je prikladan za izučavanje cHCMV infekcije kod ljudi [56]. Međutim taj model ima velike nedostatke, uključujući manjak RhCMV-seronegativnih makaka, etičke zapreke te visoke troškove održavanja laboratorijskih životinja i eksperimentalnih postavki. CMV zamorca (engl. *guinea pig*, GPCMV) može prijeći posteljicu, inficirati embrij i izazvati patologiju u živčanom sustavu [57]. Međutim, ovaj model zahtijeva visoku dozu virusa za infekciju ženki, što rezultira znatnim oštećenjem posteljice, gubitkom fetusa i malim brojem jedinki u leglima. Osim

toga virusnim genomima GPCMV-a i RhCMV-a nedostaje detaljna karakterizacija uz nedostatak dostupnih imunoloških i genetskih alata u usporedbi s mišjim modelima [58]. Slični nedostaci također se odnose na CMV modele prirodene infekcije štakora (engl. *Rat CMV*, RCMV) [59].

1.6. Mišji model cHCMV infekcije

Infekcija mišjim citomegalovirusom (MCMV) koristi se za izučavanje brojnih mehanizama infekcije, patogeneze i imunološkog odgovora na infekciju [47]. Iako MCMV ne može proći kroz posteljicu i inficirati embrij, uspostavljene su različite tehnike inokulacije za modeliranje prirodene infekcije [60–62]. Jedan od primjera je izravna inokulacija MCMV-a u cerebralnu hemisferu ili lateralne komore mišjih embrija ili novookočenih miševa [63,64]. Međutim izravna intrakranijalna (engl. *intracranial*, i.c.) inokulacija virusa ne odražava učinkovito patogenezu prirodene infekcije, uključujući neodgovarajuće širenje virusa i imunološki odgovor u perifernim tkivima prije infekcije SŽS-a. Osim toga, ta metoda zahtijeva anesteziju životinja prije zahvata i rukovanje složenim tehnikama, a može dovesti do znatnog gubitka životinja u pokusnim skupinama zbog kolateralnih infekcija i poremećaja krvno-moždane barijere (engl. *blood-brain barrier*, BBB) [65,66].

Intraperitonealna (engl. *intraperitoneal*, i.p.) inokulacija novookočenih miševa s MCMV-om je često rabljena metoda za izučavanje prirodene infekcije [60]. Korištenje novookočenih miševima opravdavano je činjenicom da SŽS neonatalnih miševa razvojno odgovara SŽS-u ljudskih fetusa između 12. i 15. tjedna gestacije te visoko očuvanom strukturom malog mozga (cerebeluma) između glodavaca i čovjeka [67,68]. Nakon inokulacije virus se širi hematogeno, uspostavljajući primarnu viremiju, i inficira periferne organe prije infekcije SŽS-a, što nalikuje predloženom putu diseminacije HCMV-a u SŽS-u tijekom cHCMV infekcije [60]. Kod periferne infekcije imunokompetentnih odraslih miševa virus se ne širi u mozak [69]. Budući da se virus može detektirati i u plazmi i u stanicama krvi nakon i.p. infekcije novookočenih miševa, pretpostavlja se da MCMV ulazi u mozak putem posredničkih stanica (monociti) ili u obliku slobodnih viriona; međutim točan mehanizam prolaska BBB-a još uvijek nije poznat [65,70]. Nakon i.p. infekcije infektivni se virus uobičajeno može detektirati u mozgu počevši od 7. dana nakon infekcije (dni) do 21 dni [71,72]. Inficirani miševi razvijaju patološke promjene u mozgu i neurobihevijske probleme slične onima kod cHCMV infekcije [60,66,73], te pokazuju gubitak sluha povezan s gubitkom neurona spiralnih ganglija i degeneracijom kohlearne vaskulature

[74,75]. Također, infekcija novookočenih miševa MCMV-om oponaša bolest ljudskog oka nakon cCMV infekcije, uključujući žarišni korioretinitis, upalu vaskulature i poremećaj krvno-retinalne barijere [76]. Novookočeni miševi različitih sojeva pokazuju individualne razine osjetljivosti na infekciju MCMV-om [77,78], potencijalno nalik različitoj osjetljivosti na simptomatske infekcije u ljudskoj populaciji. Dosad su se kao mišji modeli prirodene infekcije koristili samo miševi soja BALB/c i C57BL/6, te je kinetika replikacije virusa i patologija izazvana virusom slična je u novookočenih miševa soja BALB/c i C57BL/6 miševa [71,72,79].

1.7. CMV infekcija stanica u mozgu

CMV učinkovito inficira gotovo sve vrste stanica u mozgu (**Slika 1**) [80,81]. Međutim većina objavljenih studija temelji se na *in vitro* analizi primarnih ili imortaliziranih staničnih kultura te im nedostaje popratna *in vivo* potvrda [80,81]. Osim toga, rezultati različitih istraživačkih skupina o sposobnosti stanica mozga da podrže puni ciklus replikacijskog CMV-a se razlikuju.

1.7.1. Astrociti

Astrociti su najzastupljenije glija stanice u mozgu s nizom različitih funkcija, od metaboličke potpore neuronima do regulacije sinaptogeneze [82]. Kako su astrocitni procesi uključeni u formiranje i održavanje BBB-a, oni su stoga rezidentne stanice SŽS-a koje su učestalo prve mete neurotropnih virusnih infekcija [83,84]. Tijekom akutne infekcije histopatološke studije na fetalnim mozgovima pokazale su da među rezidentnim stanicama mozga astrociti predstavljaju prevladavajući tip stanica inficiranih HCMV-om. Sukladno tome, *in vitro* astrociti su potpuno permissivni za infekciju HCMV-om i MCMV-om te podržavaju produktivnu replikaciju [85–89].

1.7.2. Mikroglia

Mikroglia stanice su tkivno rezidentne imunološke stanice SŽS-a koje potječu iz žumanjčane vreće [90]. Tijekom razvoja mikroglia naseljava SŽS i uspostavlja dugoživuću populaciju stanica [91]. Ova vrsta stanica posjeduje obilje specifičnih proteina koji omogućuju mikrogliji da učinkovito odgovori na neurotropne virusne infekcije i druge mikroorganizme koji inficiraju SŽS [92]. *In vitro* analize infekcije staničnih kultura mikroglije nisu dale jednoznačne rezultate o sposobnosti HCMV-a da inficira mikrogliju [85,86,93,94]. Analize mozгова fetusa potvrdile su da je mikroglia doista osjetljiva na infekciju tijekom akutne cHCMV infekcije, te

tijekom infekcije embrija RCMV-om i infekcije novookoćenih miševa MCMV-om [79,95,96]. U slučaju cHCMV infekcije jedna studija je izvijestila da je približno 10 % inficiranih stanica činila mikroglija [95]. Mikroglija je permisivna za infekciju MCMV-om *in vitro* i podržava produktivnu replikaciju virusa [97]. Također je pokazano da MCMV produktivno inficira i razgranate/mirujuće i ameboidne/aktivirane stanične linije mikroglije BV-2 [98].

1.7.3. Neuron

Neuron posjeduje jedinstvenu staničnu morfologiju koja im omogućuje obavljanje vitalnih funkcija primanja i slanja električnih impulsa [99]. Jedna od značajki neurona jest ograničena regeneracija [100]. Stoga su neuron razvili brojne strategije za preživljavanje kako bi izbjegli uništenje od citolitičkih komponenti imunološkog sustava [101]. Tu evolucijsku značajku samoodržanja često iskorištavaju neurotropni virusi u SŽS-u i PŽS-u [101]. Osim toga, neki virusi iskorištavaju metabolizam neurona koristeći se prometom aksona za transport [101]. Histopatološke analize mozga fetusa s teškim manifestacijama intrauterine infekcije HCMV-om pokazale su infekciju neurona, ali u manjoj mjeri od rezidentnih glia stanica [35,95,102,103]. *In vitro* analize pokazale su neujednačene rezultate o permisivnosti neurona na infekciju HCMV-om [85,104–106]. Infekcija neurona MCMV-om zabilježena je u mozgu nakon i.p. i i.c. inokulacije [73,107,108]. Diferencirani zreli neuron izvedeni iz neuralnih matičnih prekursora povezani su sa smanjenjem replikacije virusa u usporedbi s njihovim nediferenciranim prekursorima [105]. Pretpostavlja se da je taj fenomen povezan ili s učinkovitom nadzorom aktivnosti neposrednog ranog promotora (engl. *major immediate-early promoter*, MIEP) ili s virusnim iskorištavanjem slabog antivirusnog odgovora neurona [105,109]. Smatra se da ispoljavanje MIEP-a reguliraju različiti faktori transkripcije koji reagiraju na diferencijaciju stanica ili polarizaciju membrane, dok potonja može biti povezana s niskom ekspresijom molekule glavnog kompleksa histokompatibilnosti (engl. *Major histocompatibility complex*, MHC) tipa I na neuronima. Vjeruje se da taj fenotip štiti neurone od uništenja od strane imunološkog sustava [109,110].

1.7.4. Neuralne matične prekursorske stanice

Tijekom embrionalnog razvoja SŽŠ-a, neuron i glia stanice (osim mikroglije) razvijaju se iz neuralnih matičnih i prekursorskih stanica (engl. *neural stem precursor cells*, NSPC) [111]. Populacija NSPC-a prisutna je i u odrasloj dobi te se nalazi u subgranularnim zonama dentatnog girusa i ventrikularnim zonama korteksa [112]. U fetalnim i neonatalnim mozgovima s teškom

cHCMV infekcijom pronađen je velik broj inficiranih stanica i gubitak germinalnih i radijalnih glija stanica u hipokampusu i blizini ventrikularnih zona [103,113]. Imunohistokemijske analize pokazale su da većina inficiranih stanica ima značajke NSPC-a, što sugerira da su glavne mete infekcije HCMV-om [95,103]. Primarne NSPC-e izolirane iz ljudskih fetusa ili novorođenčadi potpuno su permissivne i podržavaju aktivnu replikaciju HCMV-a s ispoljavanjem ranih i kasnih virusnih gena [104,105,114,115]. Slično je uočeno i sa mišjim NSPC-ama inficiranim MCMV-om *in vitro*, koje podržavaju produktivnu replikaciju virusa [116,117]. Infekcija NSPC-a zabilježena je i u mišjem modelu i.c. infekcije MCMV-om [117–119]. Važno je napomenuti da se broj inficiranih NSPC-a može povezati sa stupnjem razvoja mozga s obzirom na to da se broj inficiranih stanica znatno smanjuje s kako napreduje razvoj mozga [61,107]. U modelu intrauterine i.c. infekcije mišjih fetusa NSPC-e su bile glavne mete infekcije MCMV-om tijekom embrionalne faze, dok je u postnatalnom razdoblju stopa infekcije NSPC-a bila najniža među svim rezidentnim stanicama [66].

1.7.5. Oligodendrociti

Oligodendrociti su glija stanice koje su smještene pretežno u bijeloj tvari i odgovorne su za mijelinizaciju membrana aksona [120]. Infekcija oligodendrocita CMV-om slabo je karakterizirana [121]. Stanična linija ljudskog oligodendroglioma HOG (engl. *Human Oligodendroglioma Cell Line*, HOG), koja ima karakteristike nezrelih oligodendrocita, permissivna je za infekciju HCMV-om, ali je produktivna infekcija primijećena isključivo u stimuliranim stanicama HOG koje nalikuju zrelim oligodendrocitima [121].

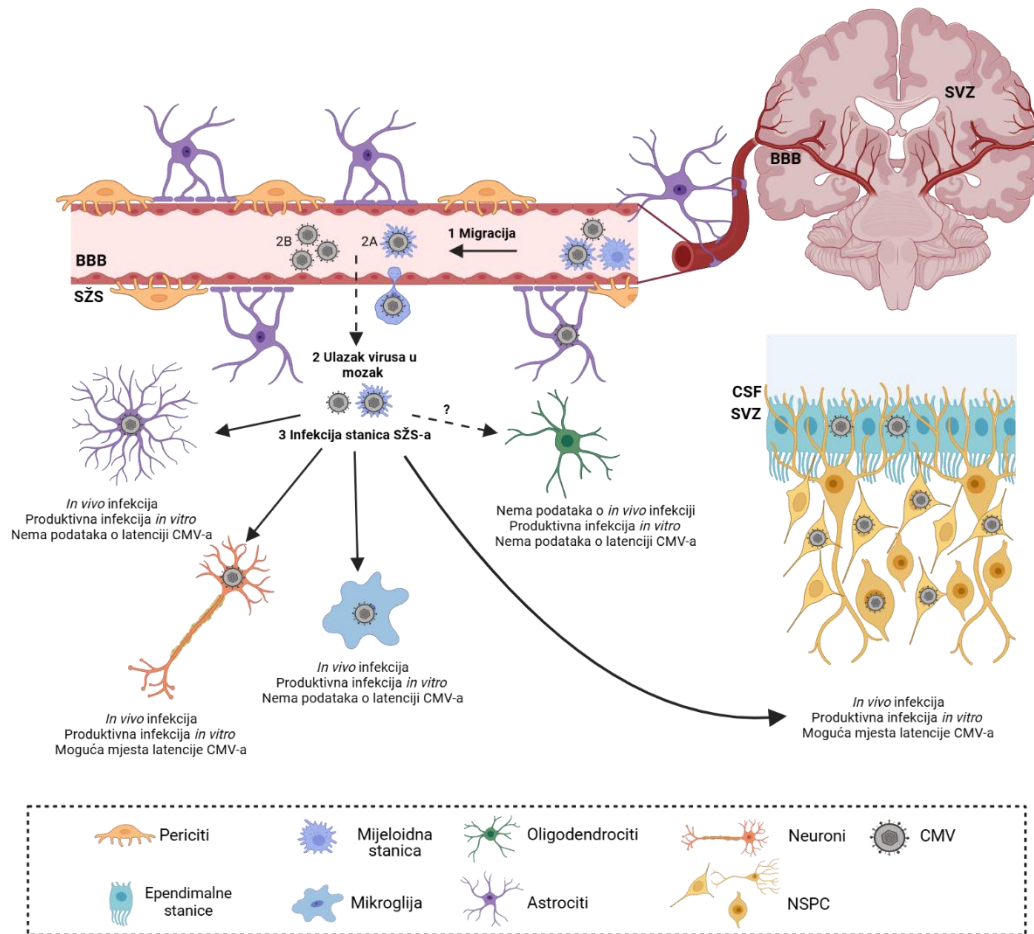
1.7.6. Ependimske stanice

Ependimske stanice jesu kubične glija stanice koje tvore jedan sloj oko ventrikularnog sustava mozga i središnjeg kanala leđne moždine. Smatra se da ependimske stanice pružaju trofičku i metaboličku potporu mozgu. Zbog izravnog kontakta s cerebrospinalnim likvorom (engl. *cerebrospinal fluid*, CSF), ependimske stanice su česte mete virusnih infekcije [122]. Histopatološkim analizama mozga prirođeno inficiranih fetusa potvrđeno je da su ependimske stanice inficirane HCMV-om [113,123], te su *in vitro* primarne ependimske kulture stanica permissivne za infekciju HCMV-om [124]. Infekcija ependimskih stanica zabilježena je i u modelu intrakranijalne infekcije MCMV-om [107].

1.8. Latencija CMV-a u mozgu

Dok drugi herpesvirusi poput HSV-1 i virusa *varicella zoster* (VZV) uspostavljaju cjeloživotnu latenciju u neuronima, iz koje se mogu sporadično reaktivirati, moguća mjesta latencije CMV-a u neuronima ili drugim stanicama SŽS-a do sada nisu bila poznata [125]. U primitivnim kulturama neuralnih matičnih stanica inficiranih HCMV-om, genomi HCMV-a mogli su se detektirati do mjesec dana nakon infekcije, bez ispoljavanja neposrednog ranog proteina 1 (engl. *Immediate early protein 1*, IE1) HCMV-a, što je sugeriralo latentnu infekciju NSPC-a [126]. S druge strane, primjenom infekcije fetalnih NSPC-a *in vitro* pokazano je da zreli neuroni potencijalno djeluju kao rezervoar latentnog HCMV-a [104]. Stanična linija humanog embrionalnog karcinoma NTera2, koja se može diferencirati u zrele neurone nakon tretmana retinoičnom kiselinom, koristila se za izučavanje molekularnih mehanizama latencije CMV-a u neuronima i njegovim progenitorskim stanicama [127,128]. Uočeno je da stimulacija signalnog puta cikličnog adenzin-monofosfata (engl. *Cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) aktivira virusnu reaktivaciju u NTera2 stanicama, što ukazuje na moguću ulogu cAMP-a u latenciji CMV-a u neuronima [127,128]. *In vivo*, nakon infekcije novorođenih miševa, MCMV se može reaktivirati iz latencije u kulturi rezova moždanog tkiva i u mozgu nakon gubitka imunološkog nadzora u latentnoj fazi infekcije [71,129]. Nakon i.c. infekcije neonatalnih miševa, primjenom kulture rezova moždanog tkiva i praćenja reaktivacije virusa uočeno je da se inficirane stanice nalaze oko ventrikularnih zona, što sugerira da bi NSPC-e mogle biti mjesta virusne latencije.

Za reaktivaciju HSV-1 u SŽS-u dovoljni su stresni događaji ili povišena temperatura [130]. U mišjem modelu neonatalne i.p. infekcije, pokazano je da se latentni MCMV može reaktivirati u mozgu uklanjanjem CD8⁺ ili CD4⁺ limfocita T, ali je ostalo nepoznato u kojim stanicama se reaktivira MCMV [71,131]. Utjecaj latentne infekcije CMV-om na homeostazu i funkciju SŽS-a trenutačno nije jasan. Odrasli miševi s poviješću prirodene infekcije MCMV-om mogu kasnije kroz život razviti neurobihevioralne deficite [66,73,132]. Nadalje, pokazano je da latentna infekcija MCMV-om u mozgu potiče razvoj glioma [133,134], što je u skladu s hipotezom da bi HCMV mogao biti onkomodulacijski agens u razvoju glioma [135]. Stoga bi latentni CMV prisutan u SŽS-u mogao biti uključen u razvoj niza bolesti.



Slika 1. Infekcija CMV-om u mozgu. 1) Diseminacija CMV-a u SZŠ odvija se tijekom sekundarne viremije. Pretpostavlja se da CMV prelazi krvno-moždane barijere (BBB) bilo putem 2A) posredničkih stanica (monociti) ili u 2B) obliku slobodnih viriona. 3) Nakon prelaska BBB, CMV inficira sve stanice SZŠ-a osim oligodendrocita (nema podataka). Virusna DNA pronađena je u CSF-u kod cHCMV infekcije. NSPC-e u subventrikularnim zonama (engl. *subventricular zones*, SVZ) značajna su meta infekcije CMV-om. *Modificirano i preuzeto iz [81].*

1.9. Patogeneza cCMV infekcije u mozgu

HCMV infekcija SZŠ-a uzrokuje širok spektar neuropatologija. Lezije se mogu pronaći u različitim regijama mozga kao što su hipokampus, olfaktorni bulbus, oči i unutarnje uho, što dovodi do oslabljenih perceptivnih osjetila (SNHL, korioretinitis) ili neuroloških bolesti praćenih strukturnim deformacijama [38,113]. Histopatološke promjene očituju se u obliku nerazvijenosti ili nepotpunog razvoj mozga (cerebelarna i kortikalna hipoplazija), smanjene veličine glave (mikrocefalija), upale moždanih ovojnica mozga i leđne moždine (meningoencefalomijelitis), atrofije kortikalnih ploča i rupture glije limitans (neuronska heterotopija), proširenja lateralnih

moždanih komora (ventrikulomegalija), kalcifikacija, hemoragijskih lezija, nakupljanja viška željeza (hemosideroza mozga), reaktivnih gliosa, vaskularnih promjena, nekroza i gubitak stanica [103,113]. Mehanizmi patogeneze su i dalje nepotpuno razjašnjeni. Pretpostavlja se da uključuju poremećaje u mikrovaskulaturi mozga, oštećenje BBB-a, narušenu sinaptogenezu, gubitak NSPC-a i poremećenu migraciju stanica koja se očituje u neuređenom staničnom položaju [60,70,103,113,136].

Model prirodene infekcije MCMV-om dosljedno oponaša mnoge aspekte neuropatoloških promjena povezanih s cHCMV infekcijom [60]. U mozgu i.p. inficiranih novookočenih miševa uočen je žarišni i ne-nekrotizirajući encefalitis, praćen infiltratima mononuklearnih stanica i promjenama u morfologiji i veličini cerebeluma [60]. Nisu primijećene znatne razlike u veličini velikog mozga (cerebruma) zaraženih životinja [60,70]. Međutim, za razliku od cerebruma, cerebelum je dio mozga koji u miševa prolazi kroz opsežan postnatalni razvoj, što ga čini osjetljivim na posljedice prirodnih virusnih infekcija [137]. Nakon razrješenja akutne virusne infekcije, rast cerebeluma se normalizira [60,71,72]. Osim toga, uočene su histopatološke lezije u mozgu inficiranih miševa, koje mogu perzistirati čak i nakon povlačenja akutne infekcije, poput edema, reaktivne i nodularne glioze te nakupljanja leukocita u perivaskularnim prostorima [70].

Promjene u diferencijaciji i migraciji NSPC-a mogu dovesti do opsežnih malformacija u kortikalnom razvoju [138]. Produktivna infekcija HCMV-om *in vitro* smanjuje proliferativni i diferencijacijski kapacitet NSPC-a u neuronsku ili astrocitnu lozu [114,115]. Pretpostavlja se da su te promjene u diferencijaciji povezane s virusnim proteinom IE1, koji specifično djeluje na faktor transkripcije STAT3, što posljedično smanjuje razine ispoljavanja faktora transkripcije SOX2 ključnog za pluripotenciju i samoobnavljanje NSPC-a [139]. Osim interakcije STAT3–SOX2, virusni protein IE1 funkcionira kao E3 ubikvitin ligaza, koja cilja i transkripcijski faktor Hes1, koji je uključen u signalni put Notch, ključan u diferencijaciji NSPC-a i razvoju mozga [140]. Nadalje, virusni protein IE2 narušava proliferaciju i diferencijaciju NSPC-a [141]. Infekcija NSPC-a HCMV-om povećava ispoljavanje supresora signalizacije citokina 3 (engl. *suppressor of cytokine signaling 3*, SOCS3), što posljedično narušava njihovu proliferaciju i migraciju [142]. Sposobnost CMV-a da potakne apoptozu NSPC-a nakon *in vitro* infekcije još je nejasna [105,115]. Međutim, histopatološke analize mozгова inficiranih HCMV-om pokazale su opsežan gubitak stanica i nekrozu u zonama mozga bogatim NSPC-ma [113]. Smanjena sposobnost proliferacije i

diferencijacije također je primijećena i nakon *in vitro* infekcije mišjih NSPC-a MCMV-om. Uočeni su i poremećaji u homeostatskim staničnim procesima kao što su sinteza DNA, samoobnavljanje, migracija i utišavanje ispoljavanja molekula MHC-I [114,115]. Nakon i.c. infekcije novookoćenih miševa MCMV-om pokazano je značajno smanjenje broja NSPC-a, njihove sposobnosti proliferacije i samoobnavljanja, te daljnje diferencijacije u neuronsku lozu. Poremećaj neurogeneze povezan je sa smanjenim razinama ispoljavanja neurotrofina kao što su moždani neurotrofni faktor (engl. *Brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) i neurotrofin-3 (engl. *Neurotrophin 3*, NT3) [118].

U novookoćenih miševa inficiranih MCMV-om vanjski zrnati sloj cerebeluma (engl. *external granular layer*, EGL) je deblji, dok su istovremeno unutarnji zrnati sloj (engl. *internal granular layer*, IGL) i molekularni sloj (engl. *molecular layer*, ML) tanji u odnosu na kontrolne životinje [60,70,143,144]. Deblji EGL korelira s većim brojem stanica prekursora granularnih neurona (engl. *granule neuron precursor cells*, GNP), dok se pretpostavlja da se smanjena debljina IGL razvija sekundarno, kao rezultat smanjene migracije GNP-a [60,143,144]. Iako se veličina tijela Purkinjeovih neurona ne razlikuje između inficirane i kontrolne skupine, uočen je smanjen broj Purkinjeovih neurona, popraćen nepravilnim poravnanjem i smanjenom arborizacijom dendrita, što posljedično dovodi do smanjene debljine ML-a [60,70]. Nova je studija pokazala da infekcija MCMV-om dovodi do produljenog staničnog ciklusa GNP-a i smanjenog broja granularnih neurona [145]. Ta opažanja sugeriraju da infekcija MCMV-om blokira ili odgađa proliferaciju GNP-a nizvodno od proteina gli1 i N-myc, efektor proliferacije granularnih neurona u signalnom putu sonic hedgehog (engl. *Sonic hedgehog*, SHH), koji su povišeni tijekom infekcije MCMV-om [143,144,146]. Produljenje staničnog ciklusa GNP-a odgađa ispoljavanje razvojnih gena koji su izravno povezani s odgovarajućim pozicioniranjem i diferencijacijom GNP-a, posljedično dovodeći do smanjenja folijacije i veličine cerebeluma. Infekcija MCMV-om također je smanjila aktivaciju neurotrofinskih receptora, koji su aktivno uključeni u postnatalni razvoj cerebeluma [60,145,147].

Uloga ostalih stanica mozga u razvoju neuropatologije nije u potpunosti istražena. *In vitro* infekcija neurona MCMV-om nije utjecala na morfologiju stanice, ali je narušila homeostatske procese, poput neuronske vodljivosti, stvaranje akcijskih potencijala i sinaptičke aktivnosti [86,148]. U astrocitima inficiranim MCMV-om *in vitro* dolazi do povećanja unutarstanične razine

kalcija (Ca^{2+}), što dovodi do smanjenja sinaptičke aktivnosti neurona i narušene međustanične komunikaciju između astrocita [86]. Poremećaji u signalizaciji Ca^{2+} narušavaju neurogenezu u ventrikularnim zonama, što ukazuje na posljedičnu vezu između promjene međustanične komunikacije posredovane infekcijom CMV-om i smanjene neurogeneze [149]. Nije poznato jesu li oligodendrociti uključeni u neurorazvojne promjene tijekom cHCMV infekcije. Proces mijelinizacije započinje oko 30. tjedna trudnoće u ljudi te se nastavlja intenzivno u postnatalnom razdoblju i tijekom prvih godina života, stoga je moguće da prenatalna infekcija HCMV-om ne utječe znatno na oligodendrocite i proces mijelinizacije [150].

Iako je zaštitna uloga upalnog odgovora domaćina neupitna, postoji delikatna ravnoteža između neuroprotekcije i neuropatologije [151]. Infekcija SŽS-a može uzrokovati pretjeranu aktivaciju astrocita i mikroglije, što rezultira prekomjernom proizvodnjom proupalnih medijatora, što zajedno može dovesti do oksidativnog stresa, propadanja tkiva, odumiranja neurona i kognitivnog pada [151], te pridonijeti raznim neurorazvojnim poremećajima [152]. Morfološke promjene u mozgu nisu ograničene na žarišta infekcije ili infiltraciju imunoloških stanica, već su raspoređene globalno, što sugerira da nisu povezane samo s citopatskom aktivnošću virusa, već i proupalnim odgovorom domaćina [65,136]. Tretman protuupalnim glukokortikoidima u novookočenih miševa inficiranih MCMV-om ublažava upalu SŽS-a i normalizira razvoj cerebeluma, dok istovremeno minimalno utječe na replikaciju virusa [144]. Protuupalni tretman normalizirala ekspresiju gena uključenih u razvoj cerebeluma i proliferaciju GNP-a. Citokini $\text{TNF-}\alpha$ i $\text{IFN-}\gamma$ bitne su komponente upalnog odgovora povezanog s promijenjenim razvojem u inficiranom mozgu [79,143]. Blokiranje citokina $\text{TNF-}\alpha$ ili $\text{IFN-}\gamma$ protutijelima normalizira cerebelarni razvoj [79,143,145]. Slični mehanizmi mogli bi biti odgovorni za gubitak sluha uzrokovan CMV-om s obzirom na to da je tretman protuupalnim kortikosteroidima smanjio kohlearnu upalu te rezultirao očuvanjem spiralnih ganglijskih neurona i poboljšanom funkcijom sluha u miševa inficiranih MCMV-om [74].

1.10. Imunološki odgovor na infekciju CMV-om u mozgu

1.10.1. Imunološki odgovor na akutnu infekciju CMV-om u mozgu

1.10.1.1. Urođeni imunološki odgovor na akutnu infekciju CMV-om u mozgu

Nakon infekcije mozga CMV-om različite rezidentne i infiltrirajuće stanice sudjeluju u imunološkom odgovoru (**Slika 2**) [66,153]. Astrociti su vjerojatno prve stanice izložene infekciji CMV-om zbog svog anatomskeg položaja. Dosad nema dokaza o ulozi astrocita u nadzoru infekcije CMV-om. Međutim, u drugim se neurotrofnim virusnim infekcijama pokazalo da bi astrociti mogli imati važnu ulogu u nadzoru infekcije jer ispoljavaju različite receptore za prepoznavanje uzoraka (engl. *pattern recognition receptors*, PRRs). Aktivacija PRR-ova kao što su Toll-u slični receptori (engl. *Toll-like receptors*, TLR) dovodi do ispoljavanja gena stimuliranih interferonom (engl. *Interferon*, IFN), odnosno aktivacije antivirusnog imunološkog odgovora [154]. Supernatanti primarnih staničnih kultura astrocita inficiranih HCMV-om sadrže visoke razine kemokina, koji mogu privući mikrogliju na mjesto infekcije [94]. Migracija mikroglije u žarište infekcije vjerojatan je izvor proupalnih citokina i medijatora antivirusnog odgovora [94]. Korištenjem i.p. infekcije novookoćenih miševa MCMV-om pokazano je da mikroglija poprima proupalni fenotip i transkripcijski profil, proliferira i proizvodi antivirusne citokine tijekom akutne infekcije [79]. Osim mikroglije aktiviraju se tkivno rezidentni makrofagi SŽS-a, a monociti iz periferne krvi infiltriraju se u mozak rano nakon infekcije [60,72,143,144]. Aktivirana mikroglija nije ograničena na virusna žarišta, već je globalno raspoređena, što ide u prilog hipotezi da virusna infekcija mozga u razvoju rezultira široko rasprostranjenim proupalnim odgovorom [144]. Ispoljavanje gena uključenih u odgovor interferona (Interferonski regulatorni faktor 1/7 [engl. *Interferon regulatory factor 1/7*, IRF-1, IRF-7], Ubikvitin specifična peptidaza 18 [engl. *Ubiquitin specific peptidase 18*, USP18], Protein induciran interferonom s ponavljanjem tetratrikopeptida 1 [engl. *Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 1*, IFIT1], Transduktor signala i aktivator transkripcije 1 [engl. *Signal transducer and activator of transcription 1*, STAT1]), proupalnih citokina (Faktor nekroze tumora alfa [engl. *Tumor necrosis factor alpha*, TNF- α], interferon beta (IFN- β), interleukin (IL) 1, IFN- γ), kemokina (CXC-kemokinski ligand 10 [engl. *C-X-C motif chemokine ligand 10*, CXCL10], CC-kemokinski ligand 2/5/21 [engl. *C-C Motif Chemokine Ligand 2/5/21*, CCL2, CCL5, CCL21]), i molekula MHC-I i MHC-II značajno su povišeni i široko ispoljenji u malom mozgu inficiranih životinja [60,143,144]. U modelu i.c.

infekcije fetusa miševa *in utero* citokini IL-1 β , IL-18, TNF- α , i IFN- γ bili su slično povišeni u mozgu inficiranom MCMV-om [66]. Stanice NK i urođene limfoidne stanice (engl. *innate lymphoid cells*, ILCs) također infiltriraju u mozak i proizvode citokin IFN- γ (**Slika 2A**). Rana proizvodnja citokina IFN- γ dovodi do polarizacije mikroglije, no ne doprinosi direktnom nadzoru virusa u mozgu, što se može potencijalno pripisati narušenoj funkcionalnosti stanica NK tijekom infekcije MCMV-om u novookoćenih miševa [79,155]. Iako nove studije sugeriraju da su neuroni aktivno uključeni u imunološki odgovor SŽS-a [110], uključenost neurona u imunološke odgovore na infekciju CMV-om tek treba utvrditi.

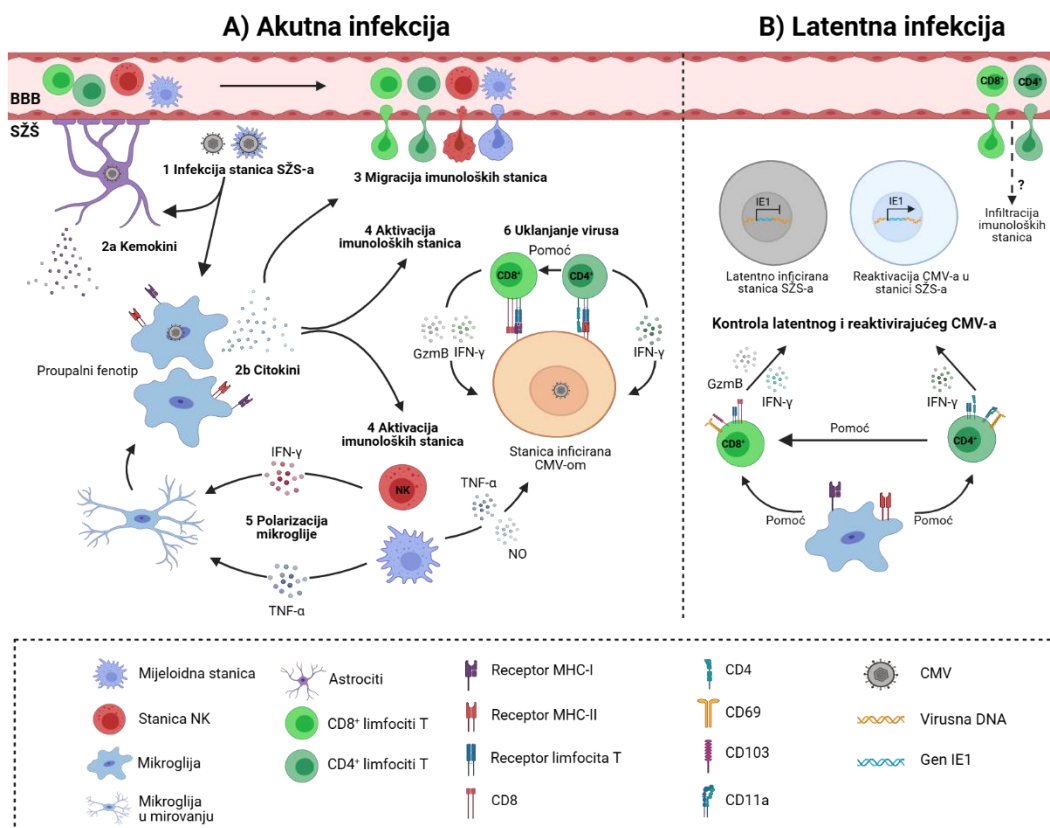
1.10.1.2. Stečeni imunološki odgovor na akutnu infekciju CMV-om u mozgu

Važnost adaptivne imunosti, posebno limfocita T, u nadzoru infekcije CMV-om u mozgu dobro je definirana u ljudi i u mišjem modelu infekcije [66,72,156]. Nakon infekcije novookoćenih miševa CD4⁺ i CD8⁺ limfociti T infiltriraju mozak [72]. Ispoljavanje biljega C-C kemokinskog receptora tipa 9 (engl. *C-C chemokine receptor type 9*, CCR9) na CD8⁺ limfocitima T tijekom prirodene infekcije potiče migraciju stanica i njihovo pozicioniranje u inficiranom mozgu [157]. Količina virusa u SŽS-u proporcionalno se smanjuje povećanjem razine infiltriranih limfocita T (**Slika 2A**) [71,72]. Rano uklanjanje CD8⁺ limfocita T rezultira znatnim povećanjem količine virusa u mozgu i perifernim organima te pridonosi smanjenju preživljavanja [72]. Nedavno je pokazano da stanični prionski protein (engl. *cellular prion protein*, PrP) negativno regulira odgovora CD8⁺ limfocita T u mišjem modelu prirodene infekcije [158]. Iako su razine CD4⁺ limfocita T u mozgu inficiranih miševa znatno niže u usporedbi s CD8⁺ limfocitima T, važne su za nadzor virusne replikacije i razrješenje produktivne infekcije u mozgu [153]. Humoralna imunost također ima važnu ulogu jer antivirusna antitijela smanjuju rizik prijenosa HCMV-a na fetus i poboljšavaju ishod bolesti [159]. Slično tome, u mišjem modelu je pokazano da su potomci majki imuniziranih protiv MCMV-a zaštićeni od infekcije MCMV-om [70,160]. Osim toga, adaptivni prijenos imunog seruma ili monoklonskih protutijela specifičnih za virusne glikoproteine može smanjiti količine MCMV-a u novookoćenim miševima, kao i nastanak patoloških promjena [70].

1.10.2. Imunološki odgovor na latentnu infekciju CMV-om u mozgu

Nadzor latentnog virusa u mozgu slabo je karakteriziran. Nakon razrješenja akutne infekcije MCMV-om limfociti T ostaju u mozgu miševa do kraja životnog vijeka životinje [71].

Limfocite T u mozgu karakterizira uspostavljanje fenotipa tkivno-rezidentnih memorijskih limfocita T (engl. *tissue-resident memory phenotype*, T_{RM}) s obzirom na to da $CD8^+$ limfociti T ispoljavaju biljege CD69 i CD103, a $CD4^+$ limfociti T biljege CD11a i CD69. $CD8^+$ limfociti T_{RM} također ispoljavaju povišene razine biljega proteina programirane stanične smrti 1 (engl. *Programmed cell death protein 1*, PD1), CD44, receptora limfocita T (engl. *T-cell receptor*, TCR) i koreceptora CD8 [71]. Fenotipska i funkcionalna analiza $CD4^+$ limfocita T_{RM} pokazala je fenotip pomoćničkih limfocita T1 (engl. *T helper 1 cells*, T_{H1}) koji ispoljavaju biljege T-box proteina u limfocitima T (engl. *T-box protein in T cells*, T-bet), i CXC-kemokinski receptor 3 (engl. *C-X-C Motif Chemokine Receptor 3*, CXCR3) i citokin IFN- γ [71,131]. Nadalje, populacije limfocita T_{RM} su funkcionalno kompetentne i pružaju zaštitu nakon ponovnih infekcija (**Slika 2B**) [71]. Uklanjanje $CD4^+$ ili $CD8^+$ limfocita T iz latentno inficiranog mozga rezultira reaktivacijom MCMV-a [71,131], te smanjenje broja $CD4^+$ limfocita T u mozgu rezultira gubitkom ispoljavanja biljega CD103 od strane $CD8^+$ limfocita T_{RM} [71]. Ostaje nejasno dovodi li gubitak biljega CD103 na populaciji $CD8^+$ limfocita T_{RM} do oslabljenog nadzora latentnog virusa u mozgu. Važnost $CD8^+$ limfocita T_{RM} nije ograničena samo na nadzor reaktivacije virusa, već i na osiguravanje nadzora nad upalnim odgovorom u latentno inficiranom SŽS-u [71].



Slika 2. Imunološki odgovor na infekciju CMV-om u mozgu. A) Akutna infekcija. 1) Nakon prelaska krvno moždane barijere (BBB), CMV inficira rezidentne stanice središnjeg živčanog sustava (SZS). **2a)** Astroцити produciraju kemokine koji regrutiraju mikrogliju na mjesto infekcije. Mikroglia se aktivira putem PRR-a i citokina. **2b)** Aktivirana mikroglia proizvodi proupalne citokine koji posreduju u **3)** regrutiranju imunoloških stanica u mozak i **4)** aktiviranju imunoloških stanica. **5)** Infiltrirajuće stanice NK i ILC1 proizvode citokin IFN-γ, a mijeloidne stanice proizvode citokin TNF-α, što dovodi do polarizacije mikroglie. **6)** Infiltrirajući limfociti T direktno nadziru produktivnu infekciju MCMV-om. CD8⁺ i CD4⁺ limfociti T prepoznaju virusom inficirane stanice pomoću molekula MHC-I i MHC-II te osiguravaju nadzor virusa citolitičkim ili necitolitičkim mehanizmima. **B) Latentna infekcija.** Nakon razrješenja akutne infekcije CMV-om limfociti T se zadržavaju u mozgu kao T_{RM} i nadziru latentni/reaktivirajući CMV. CD8⁺ limfociti T_{RM} karakterizirani su ispoljavanjem biljega CD69 i integrina CD103, dok CD4⁺ lifociti T_{RM} ispoljavaju biljeg CD69 i CD11a. Nazdor latentnog i reaktivirajućeg CMV-a u SZŠ-u mogla bi biti posredovana citolitičkim mehanizmima i citokinima. Aktivirana mikroglia vjerojatno doprinosi održavanju i funkcionalnom kapacitetu limfocita T_{RM} u mozgu. *Modificirano i preuzeto iz [81].*

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Godišnje se 0,2-2% novorođenčadi rodi s infekcijom HCMV-om, što je čini najčešćom prirođenom infekcijom u razvijenom svijetu. Među zaraženom novorođenčadi 10-15% ima ozbiljne kliničke simptome. Trajne posljedice infekcije manifestiraju se u živčanom sustavu, što može dovesti do problema u razvoju, neuroloških defekata te gubitka vida i sluha. Ne postoji odobreno cjepivo za HCMV, terapijske mogućnosti tijekom trudnoće su limitirane te ne postoji jedinstven dijagnostički pristup, što ukazuje na važnost istraživanja te bolesti. Istraživanja prirođene infekcije HCMV-om u mozgu ograničena su na histopatološke i opservacijske studije, stoga su mehanizmi patogeneze i infekcije SŽS-a HCMV-om i dalje nedovoljno razjašnjeni. Zbog stroge specifičnosti toga virusa za vrstu patogeneza HCMV-a ne može se izravno izučavati na životinjskim modelima.

Cilj ovoga istraživanja jest odrediti ulogu neurona i glija stanica u produktivnoj i latentnoj infekciji citomegalovirusom koristeći se mišjim modelom prirodene infekcije MCMV-om.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- odrediti *in vivo* tropizam MCMV-a u mozgu
- odrediti koje stanice proizvode infektivni virus te širenje MCMV-a između pojedinih stanica u mozgu
- odrediti mehanizme kojima limfociti T posreduju u nadzoru infekcije MCMV-om u mozgu
- odrediti jesu li neuroni mjesta latencije MCMV-a
- odrediti dolazi li do reaktivacije virusa u neuronima prilikom narušavanja imunološkog nadzora

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Miševi

Svi miševi u ovom istraživanju uzgojeni su u Centru za uzgoj i inženjering laboratorijskih miševa (LAMRI) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Miševi su uzgajani u specifičnim uvjetima bez patogena (engl. *specific pathogen free*, SPF) i držani u individualno ventiliranim kavezima (engl. *individually ventilated cages*, IVC) uz prosječnu temperaturu zraka 23°C, vlažnost 55%, režim od 12 sati svjetlosti/mraka te konstantno dostupnu hranu i vodu. U sve pokuse uključeni su novookoćeni miševi oba spola. *Etički aspekti istraživanja na eksperimentalnim životinjama:* Korištenje eksperimentalnih životinja provedeno 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 eksperimentalnim životinjama (izbjegavanje nepotrebnih pokusa i patnje eksperimentalne životinje). Poseban naglasak stavljen je na tzv. pristup 3R 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 na životinjama (engl. *refinement*) u skladu s Europskom direktivom 2010/63/EU. Provođenje pokusa odobrili su Ministarstvo poljoprivrede i Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane (UP/I-322-01/19-01/58, UP/I-322-01/21-01/51, UP/I-322-01/23-01/33) te Etičko povjerenstvo za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci u sklopu projekta „Biologija citomegalovirusne infekcije u mozgu tijekom razvoja i u latenciji” (PZS-2019-02-7879). Popis mišjih sojeva korištenih u ovom istraživanju naveden je u Tablici 1.

Tablica 1. Popis korištenih mišjih sojeva

Mišji soj	Opis soja	Izvor
C57BL/6J	divlji tip	#000664, The Jackson Laboratory
GFAP-Cre line 77.6	miševi koji ispoljavaju rekombinazu Cre pod nadzorom GFAP77.6 regulatornih elemenata	#024098, The Jackson Laboratory

Sall1-Cre ^{ERT2}	miševi koji kondicionalno ispoljavaju rekombinazu Cre pod nadzorom Sall1 regulatornih elemenata	Dar R. Nishinakamura
BAF53b-Cre	miševi koji ispoljavaju rekombinazu Cre pod nadzorom BAF53b regulatornih elemenata	#027826, The Jackson Laboratory
CD4 ^{-/-}	miševi koji nemaju CD4 ⁺ limfocite T	#002663, The Jackson Laboratory
CD8 ^{-/-}	miševi koji nemaju CD8 ⁺ limfocite T	#002665, The Jackson Laboratory
Prf1 ^{-/-}	miševi koji nemaju citolitički protein Perforin-1	#002407, The Jackson Laboratory
Gzma ^{-/-} Gzmb ^{-/-}	miševi koji nemaju citolitičke proteine Granzim A i B	#010608, The Jackson Laboratory
TNFRp55 ^{-/-}	miševi koji nemaju podjedinicu 55 receptora za citokin TNF- α	#002818, The Jackson Laboratory
Ifng ^{-/-}	miševi koji nemaju citokin IFN- γ	#002287, The Jackson Laboratory
Il12rb2 ^{-/-}	miševi koji nemaju podjedinicu b receptora za citokin IL-12	#003248, The Jackson Laboratory
Rosa26-loxP-tdTomato	miševi kojima je gen za ispoljavanje reporterskog proteina tdTomato omeđen flox sekvencama	#007914, The Jackson Laboratory

3.1.2. Stanične linije

3.1.2.1. SH-SY5Y

Koristili smo imortaliziranu staničnu liniju humanog neuroblastoma SH-SY5Y [161]. Stanice SH-SY5Y uzgajane su u obogaćenom mediju DMEM/Ham F-12 (Tablica 3.). Za podizanje adherentnih stanica sa plastične podloge korištena je otopina tripsin/EDTA.

3.1.2.2. Mišji embrionalni fibroblasti (MEF)

Primarne stanične linije mišjih embrionalnih fibroblasta (engl. *mouse embryonic fibroblast*, MEF) korištene su u ovom istraživanju za propagaciju virusa i pokuse određivanje titra virusa. Stanice su uzgajane u obogaćenom mediju DMEM (Tablica 3.) na 37°C s 5% CO₂. Za podizanje adherentnih stanica sa plastične podloge korištena je otopina tripsin/EDTA.

3.1.3. Virusi

U ovom istraživanju korišten je divlji tip MCMV-a rekonstituiran iz umjetnog bakterijskog kromosoma (engl. *bacterial artificial chromosome*, BAC), koji sadrži genom divljeg tipa MCMV-a (soj Smith, WT MCMV). Uz virus divljeg tipa, korišteni su i rekombinantni virusi izvedeni iz divljeg tipa virusa. Osim MCMV-a, korišten je HCMV koji ispoljava reporterski protein EGFP (engl. *Enhanced green fluorescent protein*, EGFP). Popis i kratak opis virusa korištenih u ovom istraživanju naveden je u Tablici 2.

Tablica 2. Popis korištenih virusa

Virus	Opis	Referenca
WT MCMV	Divlji tip virusa, laboratorijski soj dobiven iz BAC-a pSM3fr	[162]
MCMV-Δm157-flox-egfp (MCMV-flox)	Uklonjena sekvenca za virusni protein m157 kojeg prepoznaje aktivacijski receptor Ly49H stanica NK. Kodira za fluorescentni reporterski protein (EGFP) kojemu prethodi stop kodon omeđen flox sekvencama	[163]
MCMV-GFP_Cre (ΔIE2)	Ispoljavanje EGFP-a i rekombinaze Cre pod nadzorom endogenog promotora MIEP-a	Dar L.Čičin Šain

	generiranog zamjenom cijelog otvorenog okvira čitanja IE2	
RV-TB40- BACKL7-SE- EGFP (KL7-EGFP)	BAC klon HCMV-a soja TB40/E sa samoizrezujućom BAC kazetom. Ekspresijska kazeta EGFP-a umetnuta je nizvodno od US34A regije	Dar C. Szinger [164]

3.1.4. Mediji, otopine i puferi

Popis i svojstva medija, otopina i pufera korištenih u ovom radu se nalazi u Tablici 3.

Tablica 3. Korišteni mediji, otopine i puferi

Medij	Sastav
Mediji za uzgoj stanica u kulturi	
Medij za staničnu liniju SH-SY5Y	Medij DMEM (#DMEM-HXA, Capricorn scientific,)/Ham F-12 (#HAM-12-A, Capricorn scientific) (50:50 v/v), natrijev piruvat (1%) (100mM, #11360070, Gibco), MEM neesencijalne aminokiseline (1%) (100x, #11140050, Gibco), fetalni goveđi serum (2%) (engl. <i>fetal bovine serum</i> , FBS, #F75242, Sigma), penicilin/streptomycin (1%) (Pen/Strep, #PS-B, Capricorn scientific)
Dulbeccov modificirani minimalni esencijalni medij (engl. <i>Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM</i>)	Medij DMEM (Pan Biotech), fetalni teleći serum (3%) (engl. <i>fetal calf serum</i> , FCS, Pan Biotech), HEPES (10 mM, pH 7.2), 2 mM L-glutamin (2mM), penicilin (10^5 U/L), streptomycin (0.1 g/L)
Kompletni RPMI medij (engl. <i>Roswell park memorial institute medium, RPMI</i>)	Medij RPMI (Pan Biotech), FCS (3-20%) (Pan Biotech), HEPES (10 mM, pH 7.2), L-glutamin (2 mM), penicilin (10^5 U/L), streptomycin (0.1 g/L) , 2-merkaptetanol (5×10^{-5} M)
Metil-celulozni medij	Medij DMEM (Pan Biotech), FCS (10%), metil-celuloza (2,2%) (#M0512, Sigma-Aldrich)
Otopine za imunohistokemiju	
Citratni pufer	Trinatrijev citrat dihidrat (pH 6.0), redestilirana voda
Otopine za hfOBSC	

medij za oporavak	Neurobasal (#21103049, Gibco)/DMEM/F-12 (#12634010, Gibco) mediji (70:30 v/v), FBS (20%) (#F75242, Sigma), Pen/Strep (#PS-B, Capricorn scientific)
medij za uzgoj	Neurobasal (#21103049, Gibco)/DMEM/F-12 (#12634010, Gibco) mediji (70:30 v/v), B27 (2%) (#17504044, Gibco), N2 (1%) (#17502048, Gibco), glutaMAX (1%) (#35050061, Gibco), primocin, (1:500) (#ant-pm-05, Invivogen), humani transformirajući faktor rasta-beta 2 (engl. <i>transforming growth factor-beta</i> , TGF- β 2, 2 ng/mL, ProspeBio, #CYT-441), kolesterol (1.5 μ g/mL, #C3045, Sigma Aldrich), humani rekombinatni faktor stimulacije kolonija makrofaga (engl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i> , m-CSF, 100 ng/mL, #300-25, Peprotech), moždani neurotrofni čimbenik (engl. <i>brain-derived neurotrophic factor</i> , BDNF, 50 μ g/mL, #450-02, Peprotech), Neurotrofin-3 (engl. <i>Neurotrophin 3</i> , NT-3, 10 ng/mL, #450-03, Peprotech), bazični faktor rasta fibroblasta 2 (engl. <i>basic fibroblast growth factor 2</i> , FGF2, 10 ng/mL, #233-FB, R&D Systems), epidermalni faktor rasta (engl. <i>epidermal growth factor</i> , EGF, 10 ng/mL, #236-EG, R&D Systems)
Otopine za stanice i protočnu citometriju	
10x fosfatima puferirana fiziološka otopina (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> , PBS)	140 mM natrijev klorid (NaCl), 2.7 mM kalijev klorid (KCl), 6.5 mM natrijev hidrogenfosfat-2-hidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), 1.5 mM kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), 0.7 mM kalcijev klorid (CaCl_2), 0.7 mM magnezijev klorid-6-hidrat ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)
Medij za protočnu citometriju (engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i> , FACS)	PBS, goveđi serumski albumina (1%) (engl. <i>bovine serum albumin</i> , BSA), 0.1% natrijev azid (NaN_3) (0.1%), etilendiamintetraoctena kiselina (1 mM, EDTA)
Puferi za agaroznu gel elektroforezu	
50x TAE pufer (Tris-acetatni pufer)	Za 1L pufera: 57.1 mL glacijalne octene kiseline, 242 g Tris baze, 100 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0), redestilirana voda
Agarozni gel	0.5-1.5% agaroz, 1x TAE pufer
Otopine i reagensi potrebni za izolaciju DNA iz tkiva	
Otopina za lizu tkiva (repova)	Tris-HCl (10 mM, pH 8,0), EDTA (10 mM, pH 8,0), NaCl (150 mM), SDS (0,2%)

proteinaza K	(400 µg/mL)
Reagensi potrebni za lančanu reakciju polimerazom (PCR)	
OneTaq Quick-Load 2X Master Mix	#M0482L, New England Biolabs
1 kb DNA marker	#N3232, New England Biolabs
Početnice	Tablica 7.
Reagensi potrebni za kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom (qPCR)	
Plazmid pDrive_gB_PTHrP_Tdy	
Fast Plus EvaGreen qPCR master mix	#31020, Biotium

3.1.5. Monoklonska protutijela

Primarna protutijela korištena za analize imunohistokemijskim metodama, protočnom citometrijom te za uklanjanja podskupina imunskih stanica *in vivo*, navedena su u Tablicama 4 i 5. Sekundarna protutijela koja su korištena za analizu imunohistokemijskim metodama su navedeni u Tablici 6.

Tablica 4. Korištena primarna protutijela u imunohistokemiji i protočnoj citometriji

Protutijelo (anti-)	Domaćin	Specifičnost	Klon	Proizvođač
Popis protutijela korištenih u imunohistokemiji				
IE1	miš	miš	IE1.01	#HR-MCMV-12 Center for Proteomics
Iba-1 (Mikroglia)	zec	miš, štakor	-	#019-19741 Wako Chemicals
GFAP (Astrociti)	zec	miš, čovjek, štakor, majmun	E4L7M	#80788 Cell signaling
MAP2 (Neuorni)	zec	miš, čovjek, štakor	EPR19691	#ab183830 Abcam
NeuN (Neuorni)	zec	miš, čovjek, štakor	D3S3I	#12943 Cell signaling
FITC goat anti-GFP	koza	-	-	#ab6662 Abcam

NeuN (Neuroni)	zec	miš, čovjek, štakor	EPR12763	#ab177487 Abcam
Popis protutijela korištenih u protočnoj citometriji				
CD45.2	miš	miš	104	#14-0454-82 Thermo Fischer Scientific
CD11b	štakor	miš	M1/70	#14-0112-82 Thermo Fischer Scientific
CD8a	štakor	miš	53-6.7	#14-0081-82 Thermo Fischer Scientific
CD4	štakor	miš	RM4-5	#14-0042-82 Thermo Fischer Scientific
CD69	armenijski hrčak	miš	H1.2F3	#14-0691-82 Thermo Fischer Scientific
CD103	armenijski hrčak	miš, čovjek	2E7	#14-1031-82 Thermo Fischer Scientific
F4/80	štakor	miš	BM8	#14-4801-82 Thermo Fischer Scientific
MHC- I (H-2Db)	miš	miš	28-14-8	#11-5999-82 Thermo Fischer Scientific
MHC- I (H-KDb)	miš	miš	AF6-88-5.5.3	#17-5958-82 Thermo Fischer Scientific
MHC class II (I-A/I-E)	miš	miš	M5/114.15.2	#61-5321-82 Thermo Fischer Scientific
CD3e	armenijski hrčak	miš	145-2C11	#16-0031-82 Thermo Fischer Scientific

CD19	štakor	miš	eBio1D3	#14-0193-82 Thermo Fischer Scientific
O1	miš	miš, čovjek, štakor, kokoš	O1	#14-6506-82 Thermo Fischer Scientific
ACSA-2	štakor	miš	IH3-18A3	#130-123-284 Milenyi Biotec
CD16/CD32	štakor	miš	93	#14-0161-82 Thermo FisherScientific

Tablica 5. Popis protutijela korištenih za uklanjanje skupina stanica

Protutijelo (anti-)	Domaćin	Specifičnost	Klon/šifra	Proizvođač
CD4 ⁺	štakor	miš	GK1.5	#BE0003-1, BioXCell

Tablica 6. Popis sekundarnih protutijela korištenih u imunohistokemiji

Protutijelo (anti-)	Domaćin	Specifičnost	Proizvođač
streptavidin-alkalna fosfataza konjugat	-	-	#11089153001, Roche
IgG (H&L) hrenova peroksidaza (HRP)	koza	zec	#ab6721, Abcam
IgG (H&L) Alexa Fluor (AF) 555	koza	zec	#4413, Cell signaling
IgG (H&L) Alexa Fluor (AF) 555	magarac	zec	#A-31572, Invitrogen

3.1.6. Početnice

Popis početnica koje su korištene u lančanoj reakciji polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) za određivanje genotipa miševa nalazi se u Tablici 7.

Tablica 7. Slijed nukleotida početnica korištenih za određivanje genotipa miševa.

Mišji soj	Slijed nukleotida početnica	Očekivana veličina amplikona (bp)	Izvor
-----------	-----------------------------	--------------------------------------	-------

GFAP-Cre line 77.6	F: TCC ATA AAG GCC CTG ACA TC R: TGC GAA CCT CAT CAC TCG T	~350 bp	#024098 The Jackson Laboratory
Sall1CreERT2	P1: AGCTAAAGCTGCCAGAGTGC P2:CAACTTGCGATTGCCATAAA P3: GCGTTGGCTACCCGTGATAT	~350 bp	Dar R. Nishinakamura
BAF53b-Cre	F: GCT GGA AGA TGG CGA TTA GC R: TCA GCC TGG TTA CAA GGA ACA	~650 bp	#027826 The Jackson Laboratory

Popis početnica koje su korištene u reakciji kvantitativnog PCR-a (engl. *Quantitative PCR*, qPCR) za detekciju virusnog gena *gB* i mišjeg gena *Pthrp* nalazi se u Tablici 8.

Tablica 8. Slijed nukleotida početnica koje su korištene za detekcija virusnog gena *gB* i mišjeg gena *Pthrp*.

Gen od interesa	Slijed nukleotida početnica
<i>gB</i>	F: 5'-GCAGTCTAGTCGCTTTCTGC-3', R: 5'-AAGGCGTGGACTAGCGATAA-3'
<i>Pthrp</i>	F: 5'-GGTATCTGCCCTCATCGTCTG-3', R: 5'-CGTTTCTTCCTCCACCATCTG-3'

3.1.7. Reagensi za imunohistokemiju

Popis reagensa koji su korišteni u imunohistokemijskim metodama na parafinskim i smrznutim rezovima nalazi se u Tablici 9.

Tablica 9. Korišteni reagensi u imunohistokemijskim metodama

Reagens	Proizvođač
Paraformaldehid (4%) (PFA)	#F4-1L, Biognost
Predmetna stakalca „Microslide SuperFrost“	#631-0446, VWR
Dvostruki blok endogenih enzima	#S200380, Dako
BSA (1-3%)	#8076.1, Roth
EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin	#A39256, Thermo Fischer Scientific
Kromogen „permanent red“	#K064030, Dako
Kromogen 3,39-diaminobenzidin (DAB)	#GC80611-2, Dako
Hematoksilin	#12687926, Shandon
Medij za smrzavanje „OCT“	#4583, Sakura
Medij za uklanjanje ProLong™	#P36930, Thermo Fischer Scientific

3.1.8. Ostale kemikalije i rekombinantni proteini

Ostale kemikalije i rekombinantni proteini korišteni u ovome radu prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10. Tablica ostalih kemikalija i rekombinantnih proteina

Ostale kemikalije i proteini	Proizvodač
Tripansko modriilo	Biological Industries
Fiksirajuća boja za detekciju živih stanica eFluor780 (engl. <i>fixable viability dye eFluor 780</i>)	#65-0865-14, Thermo Fischer Scientific
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	#422801, Biolegend
Hoechst 33342	#62249, Thermo Scientific
Percoll	#17089101, Cytiva
rekombinatni humani IFN- γ	#300-02, Peprotech
Tamoksifen (<i>eng. Tamoxifen</i> , TAM)	#T5648, Sigma-Aldrich
Kukuruzno ulje	#C8267, Sigma-Aldrich
AllPrep DNA/RNA Micro Kit	#80204, Qiagen
Transwell® s poliesterskim membranskim umetkom od 0,4 μ m	#3470, Corning
Prigušivač autofluorescencije lipofuscina „TrueBlack“	#23007, Biotium
Adult Brain Dissociation Kit	#130-107-677, Miltenyi Biotec
Myelin Removal Beads	#130-096-433, Miltenyi Biotec
gentleMACS™ Octo Dissociator with Heaters	#130-096-427, Miltenyi Biotec

3.2. Metode

3.2.1. Održavanje staničnih linija

Sve stanične linije uzgajane su u sterilnim uvjetima u plastičnim posudama za kulturu stanica i inkubirane u staničnom inkubatoru na 37°C u atmosferi s 5% CO₂. Viabilnost stanica tijekom propagacije provjeravana je svakodnevno mikroskopskom analizom. Kada je stanični monosloj dosegao 70-80% konfluentnosti, stanice su presađene u nove posude. Za podizanje adherentnih stanica od podloge, prvo je uklonjen stari medij, zatim su stanice isprane PBS-om i dodan je tripsin prethodno zagrijan na 37°C, u kojem su stanice ostavljene nekoliko minuta. Djelovanje tripsina je zaustavljeno dodatkom hranjivog medija. Stanice su centrifugirane 5 minuta na 500 $\times$ g, resuspendirane u svježem mediju i nasadene na nove ploče. Primarni MEF je uzgajan u mediju DMEM s 3% FCS-a, dok su stanice SH-SY5Y uzgajane u obogaćenom DMEM/Ham F-12 mediju u koji je dodano 2% FBS-a.

3.2.2. Određivanje broja stanica

Kako bi se odredio broj živih stanica, stanice su obojane tripanskim modrilom i prebrojane u Neubauerovoj komorici. Brojane su samo žive stanice koje se, za razliku od mrtvih stanica, nisu bojale tripanskim modrilom. Ukupan broj živih stanica dobiven je množenjem srednje vrijednosti broja stanica po kvadrantu komorice s faktorom korekcije komorice ($\times 10000$), faktorom razrjeđenja stanica u tripanskom modrilu te ukupnim volumenom uzorka.

3.2.3. Infekcija miševa

Novookoćeni miševi inficirani su intraperitonealnom (i.p.) inokulacijom virusa inzulinskom špricom (30 G) u dozi ovisno o korištenoj virusnoj mutanti. Za WT MCMV virus koristili smo 200 infektivnih virusnih čestica (engl. *plaque forming units*, PFU) po mišu, virus MCMV-flox 1500 PFU, a virus MCMV-GFP_Cre 1000 PFU. Odgovarajuća količina virusa pripremljena je u volumenu od 50 μ l medija DMEM po mišu. Kontrolnim (neinficiranim) miševima injicirali smo 50 μ l medija DMEM.

Za eksperimente infekcije MCMV-om u mozgu tijekom razvoja, miševi su inficirani i.p. s dozom MCMV-a koje bila prilagođena težini miševa, a koja je ekstrapolirana korelacijom težine odraslih miševa i doze infekcije od 2×10^5 PFU i miševa starih 1 dan inficiranih s 200 PFU [53]. Tako su miševi na postnatalni dan (PND) 1 inficirani dozom od 200 PFU, PND 4 sa 10^4 PFU, PND 7 sa 3×10^4 PFU, PND 12 sa 4×10^4 PFU, te PND 21 sa 6×10^4 PFU, dok su odrasli miševi (PND 120) inficirani sa 2.5×10^5 MCMV-a.

Miševi su bili žrtvovani u različitim vremenskim točkama po infekciji ovisno o postavkama pokusa. Tijekom pokusa svakodnevno se pratilo stanje životinja.

3.2.4. Uklanjanje podskupina imunskih stanica

Kako bi se potaknula reaktivacija MCMV-a u mozgu *in vivo*, latentno inficiranim odraslim miševima su uklonjeni $CD4^+$ limfociti T koristeći anti-CD4 uklanjajuće protutijelo u dozi od 150 μ g i.p. Uklanjajuće protutijelo je administrirano svakih 4-5 dana u periodu od 30 dana. Odgovarajuća količina uklanjajućeg protutijela pripremljena je u volumenu od 500 μ l sterilnog PBS-a.

3.2.5. Tretman tamoksifenom

TAM je otopljen u sterilnom kukuruznom ulju i injiciran intragastrično (*eng. intragastric*, i.g.) u volumenu od 50 μ l neonatalnim miševima, 3 dana zaredom u koncentraciji od 50 μ g/dan po životinji [165].

3.2.6. Određivanje genotipa miševa

3.2.6.1. Sakupljanje tkiva u svrhu određivanja genotipa miševa

Metodom PCR-a smo odredili genotip miševa dobivenih križanjem. Kako bi se izolirala DNA, vrh repa (maksimalno 3 mm) je sakupljen od miševa starosti od 14-17 dana pomoću kirurških škara. Miševi su obilježeni bušenjem ušiju. Između miševa, škare su oprane deterdžentom i dezinficirane sa 70%-nim etanolom (EtOH). Genotip križanih miševa korištenih u eksperimentu je određen nakon žrtvovanja životinja.

3.2.6.2. Izolacija DNA iz mišjeg repa u svrhu određivanja genotipa miševa

U 1.5 ml epruvete s uzorkom svježe odrezanog ili smrznutog repa dodano je 300 μ L otopine za lizu tkiva u koju je svježe dodana proteinaza K za razgradnju proteina. Uzorci su inkubirani 2-3 sata ili preko noći u termomikseru na 56°C. Kako bi se istaložili svi nerazgrađeni dijelovi tkiva, uzorci su centrifugirani 5 minuta na 12.000 rpm. Supernatant je prebačen u nove i označene epruvete od 1.5 ml. DNA je precipitirana dodavanjem 400 μ L izopropanola uz lagano okretanje. Uzorci su ponovno centrifugirani 5 minuta na 12.000 rpm, supernatant izliven, a na talog dodano 600 μ L 70% EtOH i centrifugirano 5 minuta na 12.000 rpm. DNA je otopljena u 100 μ L ultra čiste vode (*engl. ultra pure water*, UPW) vode zagrijavanjem 15 minuta na 56°C. Izolirana DNA pohranjena je na +4°C.

3.2.6.3. Određivanje genotipa miševa lančanom reakcijom polimeraze

Metodom PCR-a smo odredili genotip miševa dobivenih križanjem prema programima u Tablici 11. Slijed nukleotida u početnicama naveden je u Tablici 7.

Tablica 11. Uvjeti i program reakcije korištene za dokazivanje alela *GFAP77.6-Cre*

Dokazivanje <i>GFAP-Cre</i> alela	
Uvjeti reakcije:	Program reakcije:

0,1–1 µg DNA	1. 95°C 30s
12,5 µl OneTaq Quick-Load 2X Master Mix	2. 95°C 20s
0,5 µl početnica 1	51°C 30s 35x
0,5 µl početnica 2	68°C 30s
10,5 µl UPW	3. 68°C 5 min
Ukupni volumen reakcijske smjese: 25 µL.	
Veličina očekivanog fragmenta: ~350 parova baza (pb)	

Tablica 12. Uvjeti i program reakcije korištene za dokazivanje alela *Sall1-Cre*

Dokazivanje <i>Sall1-Cre</i> alela	
Uvjeti reakcije:	Program reakcije:
0,1–1 µg DNA	1. 95°C 1 min
12,5 µl OneTaq Quick-Load 2X Master Mix	2. 95°C 20s
0,5 µl početnica 1	48°C 45s 35 x
0,5 µl početnica 2	68°C 30s
0,5 µl početnica 3	3. 68°C 5 min
10 µl UPW	
Ukupni volumen reakcijske smjese: 25 µL.	
Veličina očekivanog fragmenta: ~350 parova baza (pb)	

Tablica 13. Uvjeti i program reakcije korištene za dokazivanje alela *BAF53b-Cre*

Dokazivanje <i>BAF53b-Cre</i> alela	
Uvjeti reakcije:	Program reakcije:
0,1–1 µg DNA	1. 95°C 2 min
12,5 µl OneTaq Quick-Load 2X Master Mix	2. 95°C 20s
0,5 µl početnica 1	53°C 45s 35 x
0,5 µl početnica 2	72°C 45s
10,5 µl UPW	3. 72°C 5 min
Ukupni volumen reakcijske smjese: 25 µL.	
Veličina očekivanog fragmenta: ~650 bp parova baza (pb)	

3.2.6.4. Gel-elektroforeza molekula DNA

Agaroznom gel elektroforezom određene su približne veličine molekula DNA dobivenih amplificiranjem metodom PCR-a. Za pripremu agaroznog gela otopili smo odgovarajuću masu agaroze u TAE puferu i zagrijavali na temperaturi vrenja ($\sim 100^{\circ}\text{C}$) u mikrovalnoj pećnici, odnosno, dok se zrnca agaroze u potpunosti ne otope. Nakon djelomičnog hlađenja (tikvica u kojoj se nalazi smjesa nije vrela na dodir) pomoću miješanja, otopina agaroze je ulivena u nosač gela, na koji je s jedne strane uronjen češljic za formiranje jažica. Nakon potpunog hlađenja i formiranja agaroznog gela, kadica za elektroforezu je napunjena TAE puferom, nosač s formiranim gelom je prebačen u kadicu za elektroforezu i uronjen u TAE pufer, a zatim je uklonjen češalj za formiranje jažice. U pojedinačne jažice gela je nanoseno 5-6 μL uzorka za elektroforezu, kao i mješavina fragmenata DNA poznate veličine (marker). Nakon nanošenja uzoraka u jažice gela, na elektrode kadice za elektroforezu doveden je napon kako bi se započelo odvajanje fragmenata DNA. Primijenjeni napon ovisi o postotku agaroze u gelu. Po završetku elektroforeze gel je inkubiran u otopini fluorescentne interkalirajuće boje etidij bromid, otprilike 15-20 minuta. Veličina DNA fragmenta u gelu je vizualizirana pomoću UV transiluminatora.

3.2.7. Određivanje titra virusa u organima inficiranih miševa

Broj infektivnih virusnih čestica u organima inficiranih životinja je određen standardnom metodom testa virusnih čistina [53]. Ukratko, po žrtvovanju životinja sterilno prikupljeni organi (mozak, pluća, slezena, jetra i žlijezde slinovnice) su pohranjeni u Eppendorf tubice od 2 mL ispunjene sa 1 mL 3% medija DMEM i smrznuti na -20°C . Dan prije testa, primarne stanice MEF su uzgojene na pločama za kulturu stanica s 48 jažica u 3% mediju DMEM, u koncentraciji od 2×10^5 stanica/jažici. Na dan testiranja, stanični monosloj trebao bi biti 80% do 90% konfluentan. Organi su odmrznuti na sobnoj temperaturi, te homogenizirani pomoću metalnih kuglica i automatskog homogenizatora (MillMix 20, Tehtnica). Iz dobivenog homogenata smo uzeli po 100 μL supernatanta i prenijeli ga u prethodno pripremljenih 900 μL medija DMEM, te su na identičan način provedena serijska razrjeđenja u 3% mediju DMEM-u u rasponu od 10^2 do 10^5 . Zatim smo uklonili medij iz prethodno pripremljenih stanica MEF-a te dodali po 100 μL svakog serijskog razrjeđenja u duplikatu na ploču s 48 jažica. Ploče su inkubirane 30 minuta na 37°C . Nakon inkubacije, ploče su centrifugirane na 800 g 30 minuta, te ponovno inkubirane 30 minuta. Kako bismo ograničili širenje virusa putem medija, dodali smo ~ 0.5 mL metil-celuloznog medija. Ploče

su zatim inkubirane 4 dana ili do pojave virusnih čistina (plakova). Broj plakova je izbrojan pomoću invertnog mikroskopa te je izračunat broj jedinica koje stvaraju plak (PFU) prema broju čistina u pojedinim razrjeđenjima homogenata organa, s donjom razinom detekcije od 50 PFU/organu.

3.2.8. Testovi reaktivacije MCMV-a

Reaktivacija MCMV-a *in vivo* je potaknuta uklanjanjem CD4⁺ limfocita T. Miševi su žrtvovani, a mozgovi sterilno sakupljeni. Dan prije eksperimenta, primarne stanice MEF-a su uzgojene na pločama za kulturu stanica sa 24 jažica. Tkivo je homogenizirano i centrifugirano 1 minutu na 400 g. Supernatant je sakupljen i pomiješan sa 5 ml 3% medija DMEM na ledu. Supernatant je raspoređen na ploče s 24 jažice s konfluentnim MEF-om. Ploče su inkubirane 5-6 dana, te su nakon toga supernatanti prebačeni u nove ploče sa 24 jažice s MEF-om. Ploče su zatim inkubirane 4 dana ili do pojave plakova.

Reaktivacija *ex vivo* provedena je pomoću prethodno objavljenog protokola [166]. Ukratko, miševi su žrtvovani, hemisfere mozga su odvojene sagitalno, specifične regije su izolirane iz svake hemisfere, a uzorci su sakupljeni sterilno. Tkiva su uzgajana u 1 ml 3% medija DMEM u pojedinačnim jažicama na ploči sa 24 jažice, u periodu od 6 tjedana. Jednom tjedno skupljao se supernatant i promijenio stanični medij. Reaktivacija infektivnog virusa je detektirana testom virusnih čistina.

3.2.9. Histologija

Mozgovi su prikupljeni nesterilno prilikom žrtvovanja životinja te fiksirani u 4% PFA tijekom 24 sata na sobnoj temperaturi za histološke analize tkiva. Po završetku fiksacije mozgovi su procesuirani u aparatu histokinet (Leica TP1020), stavljeni 2 sata u parafin (56°C-58°C) te uklopljeni u parafinske blokove. Pomoću mikrotoma (Microtome HM340E) parafinski blokovi su rezani na 3-5 µm debele tkivne rezove koji su preneseni na predmetna stakalca i pušteni da se osuše preko noći u inkubatoru na 37°C. Dvostruko imunohistokemijsko bojenje provedeno je na parafinskim tkivnim rezovima mišjih mozgova za detekciju virusnog antigena i rezidentnih stanica SŽS-a. Osim ako nije drugačije navedeno, sve inkubacije su provedene na sobnoj temperaturi. Otkrivanje epitopa je provedeno u citratnom puferu 20 minuta na 97°C. Aktivnost endogenih enzima je blokirana 10 minuta sa komercijalnim reagensom za blokiranje hrenove peroksidaze i

alkalne fosfataze. Nespecifična vezna mjesta su blokirana s 3% BSA 1 sat. Virusni antigen IE1 detektiran je biotiniliranim protutijelom anti-IE1 (Tablica 4.) na 4°C preko noći. Sljedeći dan, vezanje prvog primarnog protutijela vizualizirano je inkubacijom 45 minuta s konjugatom streptavidin-alkalne fosfataze, te potom 10 minuta s crvenim kromogenom „permanent red“. Drugo primarno protutijelo je inkubirano 2 sata (Tablica 4.) i vizualizirano 30-minutnom inkubacijom tkiva sa sekundarnim protutijelom konjugiranim hrenovom peroksidazom, nakon čega je uslijedilo 1-2 minute inkubacije s DAB-om kao smeđim kromogenom. Tkiva su kontrastirana hematoksilinom 2 minute. Slike su snimljene s Olympusom BX51, povećanjem od 40x - 100x (ulje).

Detekcija reporterskog proteina tdTomato provedena je na smrznutim rezovima mozga. Anestezirani miševi su intrakardijalno perfundirani PBS-om te su prikupljeni mozgovi fiksirani u 4% PFA, 24 sata. Po završenoj fiksaciji, mozgovi su uronjeni u 30%-tnu otopinu saharoze-PBS-a, 48 sati. Tkivo je zamrznuto na suhom ledu u mediju OCT (engl. *Optimal cutting temperature compound*, OCT) i pohranjeno na -80°C do rezanja. Pomoću kriokat aparata (Microtome cryostat HM 505E, Microm) smrznuti preparati mozga su rezani na 10 µm debele tkivne rezove. Nespecifična vezna mjesta su blokirana 1 sat s 3% BSA. Primarna protutijela (Tablica 4.) su inkubirana 2 sata i vizualizirana 30-minutnom inkubacijom tkiva sa sekundarnim protutijelom konjugiranim s fluorescentnom bojom Alexa Fluor (AF) 555. Tkiva su kontrastirana DAPI-em, 10 minuta. Slike su snimljene invertnim konfokalnim mikroskopom Leica DMI8.

3.2.10. Organotipska kultura tkiva ljudskog fetalnog mozga (hfOBSCs)

Moždano tkivo ljudskog fetusa iz legalno prekinutih trudnoća u drugom tromjesečju (17-20 tjedana) dobiveno je od HIS-Mouse Facility Academic Medical Center (AMC; Amsterdam, Nizozemska), nakon pisanog informiranog pristanka za korištenja tkiva u istraživanju i uz odobrenje Odbora za medicinsku etiku AMC-a (MEC: 03/038) i Erasmus MC-a (MEC-2017-009). Studijski postupci provedeni su u skladu s Helsinškom deklaracijom te u skladu s relevantnim nizozemskim zakonima i institucionalnim smjernicama. Dobivena tkiva su bila anonimizirana i ne mogu se povezati s donatorom. Na zahtjev istraživača navedeni su samo spol i gestacijska dob. Pobačaji nisu rađeni zbog medicinskih indikacija, a fetusu nisu imali većih anatomskih deformacija (pregledano ultrazvukom prije zahvata) niti trisomije. Zahvat je izveden disekcijom *in utero*. Eksperimenti na organotipskim kulturama tkiva ljudskog fetalnog mozga (hfOBSCs) provedeni su

pomoću prethodno objavljenog protokola [167]. Ukratko, fragmenti moždanog tkiva (veličine $\sim 0,5 \times \sim 0,5$ cm) uronjeni u umjetnom cerebrospinalnom likvoru (engl. *artificial cerebrospinal fluid*, aCSF) pod konstantnom oksigenacijom (95% O₂, 5% CO₂) izrezani su na rezove debljine 350 μ m pomoću vibrirajućeg mikrotoma (vibratoma) (Leica, #VT1200S). Tkivni rezovi su prebačeni u 12-mm „Transwell“ ploče s umetcima od poliesterske membrane i inkubirani 1 sat u mediju za oporavak u CO₂ inkubatoru na 37°C. Nakon završene inkubacije, medij za oporavak zamijenjen je optimiziranim medijem bez seruma za uzgoj hfOBSC-a. Medij za uzgoj je zamijenjen svakih 48 sati. Tkivni rezovi su inficirani sa 10⁷ PFU virusa HCMV KL7-EGFP. Nakon inkubacije od sat vremena na 37°C, inokulum je uklonjen, a tkivni rezovi su isprani PBS-om i vraćeni u medij za uzgoj te ostavljeni u CO₂ inkubatoru na 37°C u sljedećih 48 sati. Jedna skupina tkivnih rezova je tretirana s 1000 U/ml rekombinantnog humanog IFN- γ . Nakon 48 sati tkivni rezovi su fiksirani u PBS-u koji je sadržavao 4% PFA i uklopljeni u parafin za histološke analize. Otkrivanje epitopa je provedeno u citratnom puferu 20 minuta na 97°C. Za prigušivanje autofluorescencije lipofuscina tkivni rezovi su tretirani s TrueBlack-om nakon maskiranja epitopa. Nespecifična vezna mjesta su blokirana pomoću 10% kozijeg seruma, 1 sat. Primarna i sekundarna protutijela korištena za imunofluorescentno bojenje su navedena u Tablici 5. i 6. Primarna protutijela su inkubirana preko noći na 4°C, dok su sekundarna protutijela inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi. Tkiva su kontrastirana otopinom Hoechst 33342, 10 minuta. Slike su snimljene konfokalnim mikroskopom Leica Stellaris 5 Low Incidence Angle.

3.2.11. Izolacija imunskih stanica iz mozga

Populacija imunoloških stanica iz životinja je analizirana metodom protočne citometrije, kojom je također provjereno učinkovito uklanjanje podskupina imunskih stanica s uklanjajućim protutijelima i učinkovitost rekombinacije potaknute TAM-om. Miševi su intrakardijalno perfundirani PBS-om za analizu stanica koje se po infekciji MCMV-om infiltriraju u mozak s periferije. Izolacija imunskih stanica iz mozga je provedena prema standardnim protokolima [72]. Ukratko, mozgovi su homogenizirani protiskivanjem kroz stanično sito sa 10 mL obogaćenog medija RPMI sa 3%-tnim FCS-om. Uzorci su zatim centrifugirani 5 minuta na 1500 g. Kako bi se izolirali limfociti iz mozga, stanični talog je resuspendiran u 5 mL 30% Percoll-a te je potom stanična suspenzija nadslojena na 70% Percoll i centrifugirana na 1800 g, 25 minuta uz program deceleracije 2. Stanice u interfazi su prikupljene za daljnje analize, te je određen broj stanica.

Za učinkovitu izolaciju astrocita, mikroglije i oligodendrocita iz mozga za stanično sortiranje i analize qPCR-om korišten je komercijalni „Adult Brain Dissociation Kit“ temeljen na enzimatskoj razgradnji tkiva (enzim papain) i uklanjanju eritorcita. Mijelin je dodatno uklonjen pomoću magnetskih kuglica (Myelin Removal Beads).

3.2.12. Analiza i sortiranje stanica iz mozga metodom protočne citometrije

Izolirane stanice iz mozгова su raspoređene u ploče sa 96 jažica i okruglim dnom. Nakon centrifugiranja ploča na 1500 g 5 min, stanice su inkubirane 5 minuta na ledu s blokirajućim anti-mišjem CD16/CD32 monoklonskim protutijelom. Primarna protutijela korištena u protočnoj citometriji (navedena u Tablici 4.) su pripremljena u FACS mediju u određenim razrjeđenjima, te dodana na stanice i inkubirana 25 minuta na ledu. Obojane stanice su zatim isprane sa 200 µl FACS medija. Prilikom staničnog sortiranja mikroglija je izdvojena kao CD45.2^{int}CD11b⁺ populacija, dok su astrociti izdvojeni kao CD45.2⁻CD11b⁻O1⁻ACSA-2⁺ populacija. Mrtve stanice su isključene iz analize dodavanjem boje za detekciju živih stanica FVD eFluor780 (engl. *fixable viability dye* eFluor780) zajedno sa primarnim protutijelima. Za sortiranje stromalnih stanica slezene ili makrofaga crvene pulpe stanična suspenzija je podvrgnuta imunomagnetskom uklanjanju CD45⁺ stanica ili pozitivnoj selekciji VCAM-1⁺ stanica korištenjem MACS-a. Analiza i sortiranje je provedeno na protočnom citometru (FACS AriaIIu, BD Bioscience, San Jose, CA). Čistoća sortiranih stanica određena je analizom alikvota sortiranih stanica protočnim citometrom. Podaci su analizirani pomoću aplikacije FlowJo_v10 (Tree Star).

3.2.13. Kvantitativni PCR (qPCR)

Broja genoma MCMV-a u latentnoj fazi infekcije je određen qPCR-om. Ukupna DNA je izolirana iz moždanog tkiva ili sortiranih stanica pomoću komercijalnog AllPrep DNA/RNA Micro kita za izolaciju. Broj genoma MCMV-a i mišjeg genoma su kvantificirani prema standardnim protokolima analizom virusnog gena *M55* i mišjeg gena *Pthrp* [168,169]. Analizirani su tehnički duplikati koristeći 9 µl uzorka (200 µg DNA) po reakciji. Serijska razrjeđenja plazmida pDrive_gB_PTHrP_Tdy od 10¹-10⁶ su korištena po reakciji za generiranje standardnih krivulja. Kvantitativni PCR je proveden korištenjem Fast Plus EvaGreen qPCR master mixa i uređaja 7500 Fast Real Time PCR (Thermo Fisher Scientific). Program qPCR reakcije naveden je u Tablici 14. Specifičnost umnoženih sekvenci potvrđena je za sve uzorke u svakom ciklusu ispitivanjem

odgovarajućih profila krivulje taljenja. Slijedovi početnica koji su korišteni su navedeni u Tablici 8.

Tablica 14. Program reakcije korištene za kvantifikaciju broja virusnih genoma

Program reakcije:		
Enzimaska aktivacija	2 min	95°C
Denaturacija	10s	95°C x 50
Vezivanje početnica	20s	56°C
Ekstenzija	30s	72°C

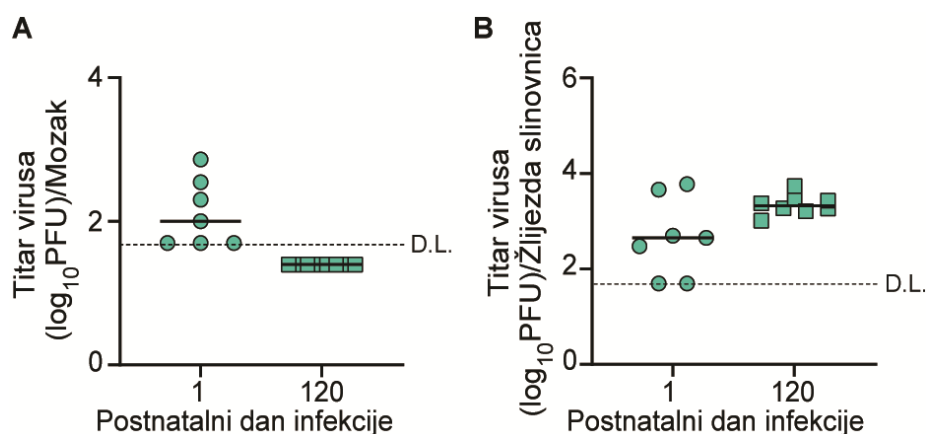
3.2.14. Statistička obrada podataka

Statističke analize provedene su s Prism 5 softverom (GraphPad Software Inc.). Primijenjeni su odgovarajući statistički testovi ovisno o broju životinja po skupini i distribuciji podataka (Studentov t-test, jednosmjerni ANOVA test, dvosmjerni ANOVA test). p vrijednosti manje od 0,05 smatrale su se statistički značajnim.

4. REZULTATI

4.1. Infekcija MCMV-om u mozgu ovisna o dobi

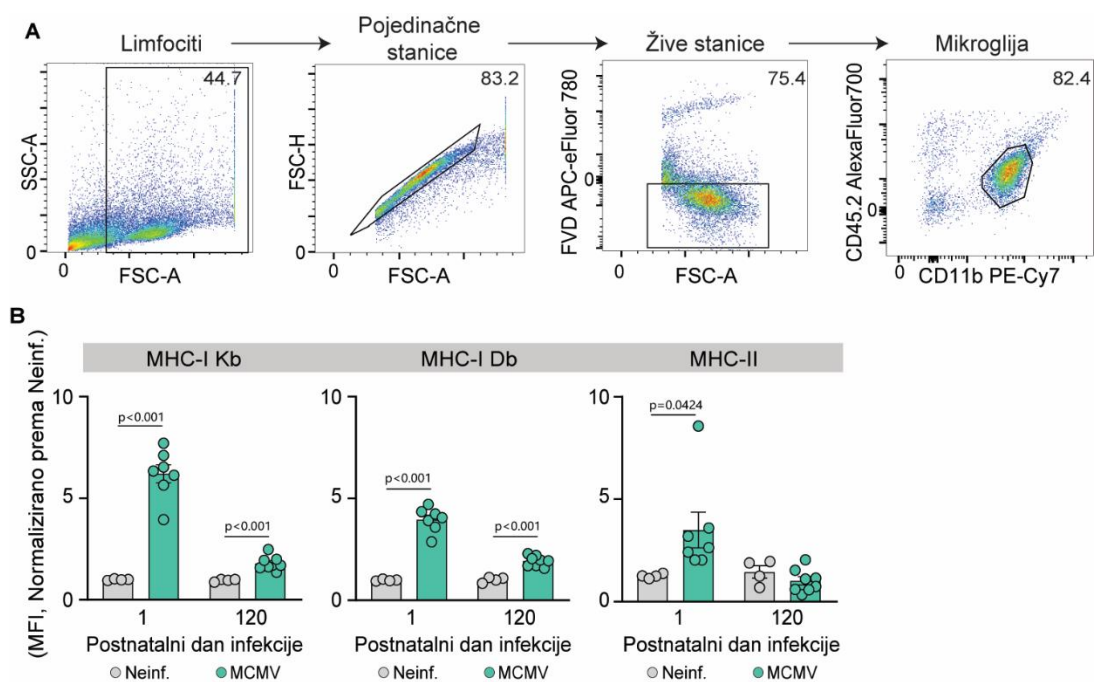
Poznato je da čak i niske doze MCMV-a inokulirane i.p. unutar prvih 24 sata nakon okota dovode do infekcije mozga [60]. Nasuprot tome, mozak se ne može inficirati MCMV-om nakon periferne infekcije (i.p., intravenozno (i.v.) ili intranazalno (i.n.)) odraslih imunokompetentnih miševa [69,170]. Kako bismo potvrdili razlike u osjetljivosti mozga na infekciju MCMV-om inficirali smo novookočene (PND 1) i odrasle (PND 120) miševe. U miševa inficiranih PND 1 detektirali smo infektivni virus u mozgu, što ukazuje na učinkovito širenje virusa u mozak (**Slika 3A**). Nasuprot tome, infektivni virus nije detektiran u mozgu odraslih miševa. Sukladno očekivanjima, infektivni virus bio je prisutan u žlijezdama slinovnicama odraslih i novookočenih miševa (**Slika 3B**).



Slika 3. Infekcija MCMV-om u mozgu ovisna o dobi. A-B) Novookočeni (PND 1) i odrasli (PND 120) miševi soja C57BL/6 inficirani su i.p. MCMV-om. Miševi su žrtvovani 10 dana nakon infekcije, te je titar virusa u **A)** mozgu i **B)** žlijezdama slinovnicama određen testom virusnih čistina (n=8 miševa/grupi). Prikazani su rezultati za pojedinačne miševe (kružići i kvadrati) i medijan vrijednosti (linije); isprekidanom linijom označena je granica detekcije virusa (engl. *detection limit*, DL).

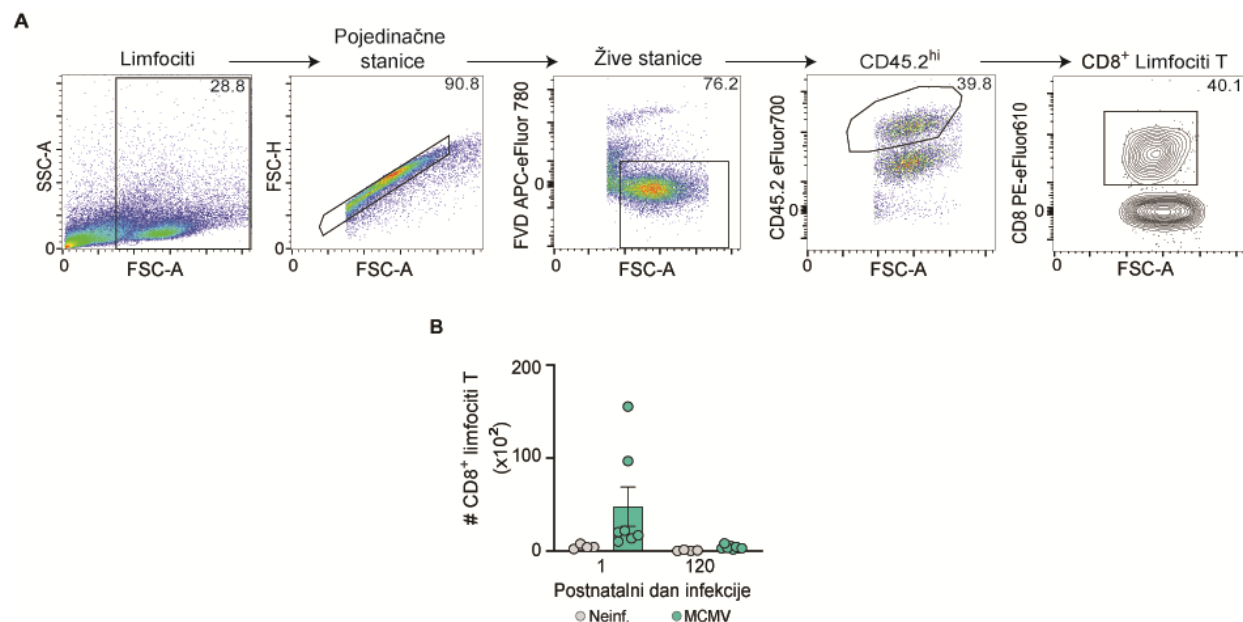
Virusne infekcije SŽS-a pokreću upalni proces aktiviranjem stanica lokalnog imunološkog sustava i poticanjem infiltracije limfocita T [171]. Mikroglije su makrofagi SŽS-a ključni za učinkovit imunološki odgovor protiv neurotropnih virusnih infekcija [172]. Tijekom akutne infekcije MCMV-om u mozgu mikroglija poprima proupalni fenotip, koji je karakteriziran ispoljavanjem molekula MHC-I i MHC-II i značajnom promjenom u njihovom transkripcijskom profilu [79]. Budući da aktivacija mikroglije služi kao pokazatelj infekcije mozga MCMV-om,

analizirali smo ispoljavanje molekula MHC protočnom citometrijom 10 dni u miševa inficiranih na PND 1 i PND 120 (**Slika 4A**). Molekule MHC-I Kb i MHC-I Db bile su značajno ispoljene na mikrogliji nakon infekcije neonatalnih miševa (**Slika 4B**). Zanimljivo je da je infekcija odraslih miševa također rezultirala manjim, ali značajnim povećanjem u ispoljavanju molekula MHC-I unatoč tome što infektivni virus nije detektiran u mozgu (**Slika 4B**). S druge strane, molekula MHC-II bila je ispoljena isključivo nakon infekcije neonatalnih miševa, ali ne i u odraslih miševa (**Slika 4B**).



Slika 4. Aktivacija mikroglije u mozgu neonatalnih i odraslih miševa na infekciju MCMV-om. A-B) Novookočeni (PND 1) i odrasli (PND 120) miševi soja C57BL/6 inficirani su i.p. MCMV-om. Miševi su žrtvovani 10 dana nakon infekcije, a upalni odgovor u mozgu analiziran je protočnom citometrijom (n=7-8). **A)** Mikroglija je definirana kao CD45.2^{int}CD11b⁺ populacija. **B)** Prikazane su normalizirane razine ispoljavanja molekula MHC-I Kb, MHC-I Db i MHC-II na mikrogliji. Prikazane su srednje vrijednosti sa standardnom greškom. Naznačena statistička značajnost određena je Studentovim t-testom za nezavisne uzorke praćena Welchovom korekcijom; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

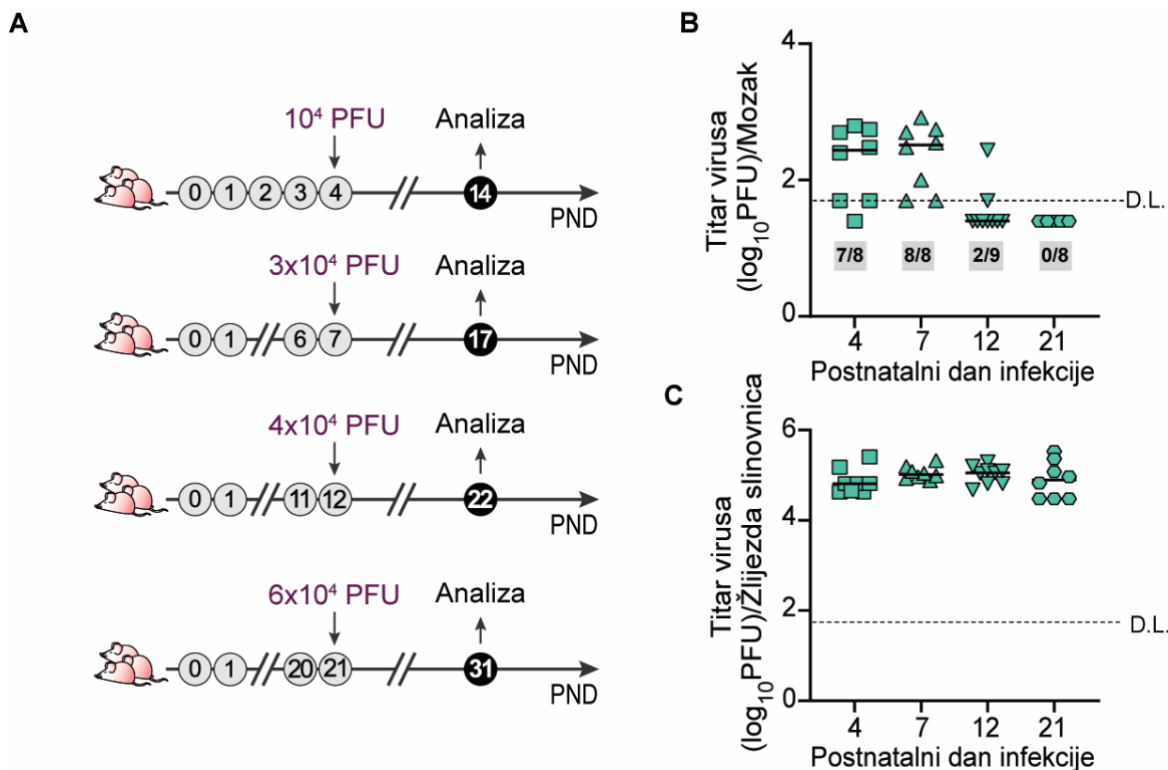
Limfociti T migriraju u mozak i imaju ključnu ulogu u nadzoru infekcije MCMV-om u mozgu [72]. Proveli smo analizu protočne citometrije da odredimo infiltraju li CD8⁺ limfociti T u mozak nakon i.p. infekcije novookočenih i odraslih miševa (**Slika 5A**). Povećanje broja CD8⁺ limfocita T primijećeno je samo u mozgovima miševa inficiranih na PND 1, što sugerira da je virusna infekcija u mozgu potrebna za infiltraciju limfocita T (**Slika 5B**).



Slika 5. Analiza infiltracije CD8⁺ limfocita T u mozak neonatalnih i odraslih miševa uslijed infekcije MCMV-om. A-B) Novookočeni (PND 1) i odrasli (PND 120) miševi soja C57BL/6 inficirani su i.p. MCMV-om. Miševi su žrtvovani 10 dana nakon infekcije, a CD8⁺ limfociti T u mozgu analizirani su protočnom citometrijom (n=7-8). **A)** CD8⁺ limfociti T definirani su kao CD45.2^{hi}CD8⁺ populacija. **B)** Prikazani su brojevi CD8⁺ limfocita T u inficiranim (MCMV) i neinficiranim (Neinf.) miševima.

4.2. Infekcija MCMV-om u mozgu tijekom razvoja

Kako bismo odredili točnu dob miševa u kojoj više ne dolazi do infekcije mozga MCMV-om, inficirali smo miševe na PND 4, 7, 12 i 21. Životinje su izvagane i inficirane i.p. dozom MCMV-a koja je bila prilagođena težini miševa. Deset dana nakon infekcije određen je titar virusa u mozgu (**Slika 6A**). U miševa inficiranih PND 4 ili PND 7 detektirali smo infektivni virus u mozgu (**Slika 6B**). Nasuprot tome, u većini životinja inficiranih PND 12 infektivni virus je bio ispod granice detekcije u mozgu (**Slika 6B**). U miševa inficiranih PND 21 nije bilo infektivnog virusa u mozgu, što sugerira da je infekcija mozga MCMV-om prestaje između PND 12 i 21 (**Slika 6B**). Infektivni virus bio je prisutan u žlijezdama slinovnicama svih testiranih životinja, što ukazuje na uspješnu infekciju miševa različite dobi i širenje virusa (**Slika 6C**).

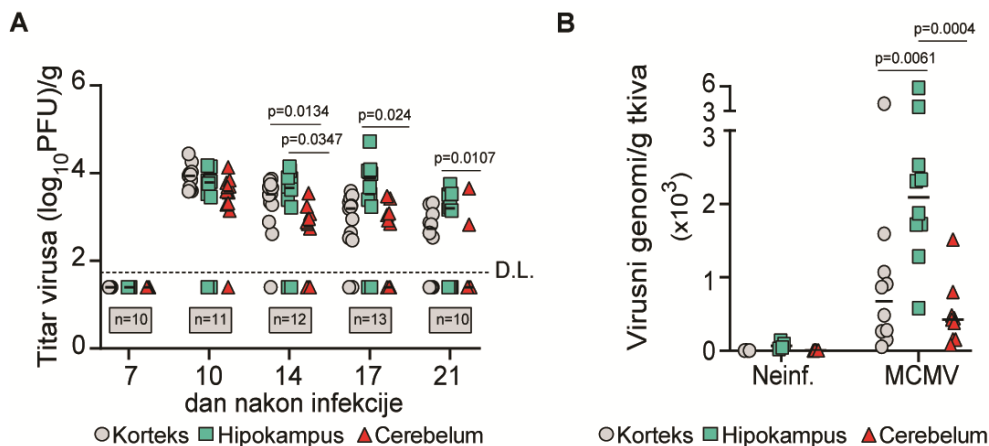


Slika 6. Infekcija MCMV-om u mozgu tijekom razvoja. A) Shematski prikaz pokusa. Navedene su inokulacijske doze MCMV-a prilagođene težini koje su korištene za infekciju miševa različite dobi. Titar virusa u B) mozgu i C) žlijezdama slinovnicama određen je testom virusnih čistina (n=8 miševa/vremenska točka). Prikazani su rezultati za pojedinačne miševe i medijan vrijednosti (linije); isprekidanom linijom označena je granica detekcije virusa (DL).

4.3. Hipokampus je glavna regija produktivne i latentne infekcije MCMV-om u mozgu miševa

U slučaju cHCMV infekcije, HCMV je detektiran u različitim regijama mozga, s najvećim razinama virusa i brojem inficiranih stanica u fetalnom hipokampusu [103]. Kako bismo provjerili događa li se isto u miševima, inficirali smo novookočene miševe soja C57BL/6 virusom WT i prikupili mozgove u više vremenskih točaka koje odgovaraju različitim fazama akutne infekcije MCMV-om u mozgu. Replikacija MCMV-a u mozgu inficiranih novookočenih miševa počinje 7 dni i doseže vrhunac između 10 i 14 dni, nakon čega slijedi razrješenje produktivne infekcije [60,71]. Kako bi se odredila sklonost virusa specifičnim regijama mozga, odvojeni su korteks, hipokampus i cerebelum iz mozga svakog miša i određen je titar virusa po gramu tkiva. Najveći titar virusa 14, 17 i 21 dni bio je u hipokampusu (**Slika 7A**), kao i u fetalnim mozgovima inficiranim HCMV-om [103]. Stanje latencije definira se kao prisustvo virusne DNA, bez

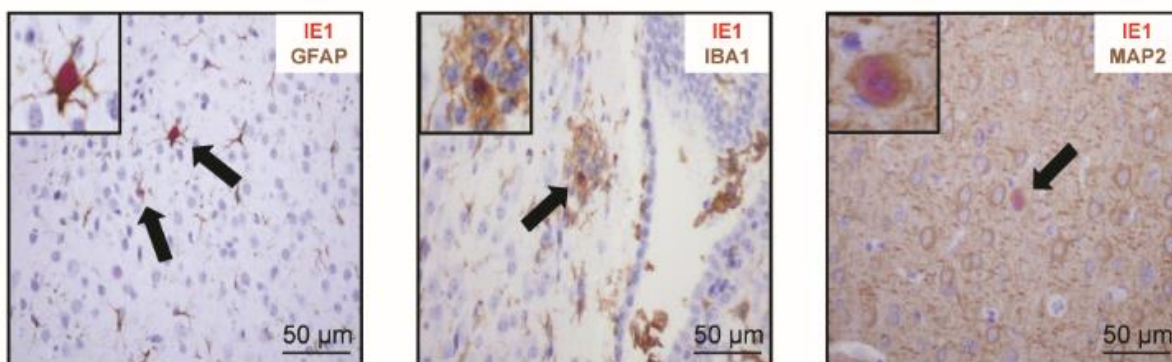
stvaranja infektivnih virusnih čestica [173]. MCMV uspostavlja latentnu infekciju u mozgu miševa između jednog i dva mjeseca nakon infekcije novookočenih miševa [71]. Kako bi odredili postoje li razlike u razinama latentnog virusa između pojedinih regija pomoću metode qPCR kvantificirali smo količinu virusne DNA 180 dni. Genomi MCMV-a detektirani su u svim testiranim regijama mozga, pri čemu su najviše razine virusne DNA detektirane u hipokampusu, zatim u korteksu i najmanje u cerebelumu (**Slika 7B**).



Slika 7. Hipokampus je glavna regija produktivne i latentne infekcije MCMV-om. A-B) Novookočeni miševi soja C57BL/6 inficirani su i.p. s 200 PFU MCMV-a 24-36 h nakon okota. **A)** Titar virusa po gramu tkiva u uzorcima korteksa, hipokampusa i cerebeluma određen je testom virusnih čistina u naznačenim danima nakon infekcije (dni) (n=10-13 miševa/vremenskoj točki). Prikazani su rezultati za pojedinačne miševe (krugovi, kvadrati i trokuti) i medijan vrijednosti (linije); isprekidanom linijom označena je granica detekcije virusa (DL). Statistički značajne razlike određene su dvosmjernim ANOVA testom praćenim Tukey-evim testom višestruke usporedbe; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike. **B)** DNA je izolirana iz naznačenih regija mozga 180 dni. Broj kopija genoma MCMV-a određen je qPCR analizom, te izražen po gramu tkiva (n=10 miševa/vremenskoj točki). Prikazani su rezultati za pojedinačne miševe (krugovi, kvadrati i trokuti) i medijan vrijednosti (linije). Statistički značajne razlike određene su dvosmjernom ANOVA testom praćenim Tukey-evim testom višestruke usporedbe; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

Kako bismo odredili stanični tropizam MCMV-a u SŽS-u, proveli smo dvostruku imunohistokemijsku analizu moždanog tkiva 11 dni, na vrhuncu replikacije virusa. MCMV (IE1-pozitivne stanice, IE1⁺) je inficirao astrocite (GFAP-pozitivne stanice), mikrogliju (IBA-1-pozitivne stanice) i neurone (MAP2-pozitivne stanice) (**Slika 8**). Ovi podaci koreliraju sa staničnim tropizmom HCMV-a u mozgu, koji isto inficira sva tri stanična tipa [95]. Zaključno,

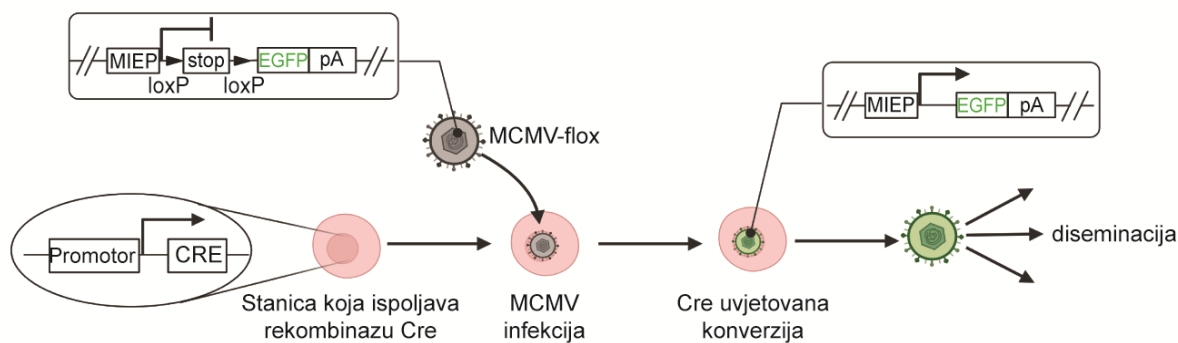
MCMV posjeduje širok stanični tropizam u SŽS-u, s posebnom sklonošću infekcije i uspostavljanja latencije u hipokampusu.



Slika 8. Tropizam MCMV-a u mozgu. Novookoćeni miševi soja C57BL/6 inficirani su i.p. s 200 PFU MCMV-a 24-36 h nakon okota. 11 dana nakon infekcije miševi su žrtvovani, prikupljeni su mozgovci te su procesuirani u parafinske blokove. Na rezovima tkiva provedeno je dvostruko imunohistokemijsko bojanje. Za vizualizaciju rezidentnih stanica SŽS-a korištena su protutijela GFAP (marker astrocita), IBA1 (marker mikroglije) ili MAP2 (marker neurona , citoplazme svih stanica obojene smeđe), a za vizualizaciju infekcije MCMV-om protutijelo IE1 (crveno jezgreno bojanje). Prikazane su reprezentativne slike (40x povećanje, umetak 100x povećanje). Strelice pokazuju na stanice inficirane MCMV-om.

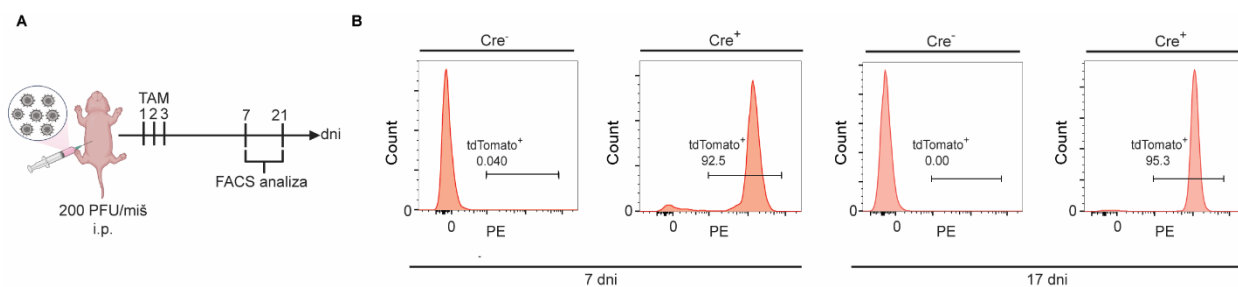
4.4. Neuron su glavni izvor infektivnog virusa tijekom kasne faze akutne infekcije

Kako bismo odredili proizvode li inficirane stanice SŽS-a infektivni virus, koristili smo rekombinantni virus MCMV-flox koji kodira za fluorescentni reporterski protein EGFP čije se ispoljavanje može potaknuti djelovanjem rekombinaze Cre [163]. Inficiranjem transgeničnih mišjih sojeva koji ispoljavaju rekombinazu Cre pod kontrolom promotora specifičnog za tip stanica SŽS-a, virus se podvrgava rekombinaciji posredovanoj Cre, te dolazi do uklanjanja floksirane stop sekvence ugrađene između promotora MIEP HCMV-a i sekvence koja kodira za reporterski protein EGFP. Nakon infekcije stanica koje ispoljavaju rekombinazu Cre, virus se dalje diseminira kao EGFP-pozitivan (EGFP⁺) virus (**Slika 9**). S druge strane, ako virus inficira stanicu kojoj nedostaje ispoljavanje rekombinaze Cre neće doći do konverzije.



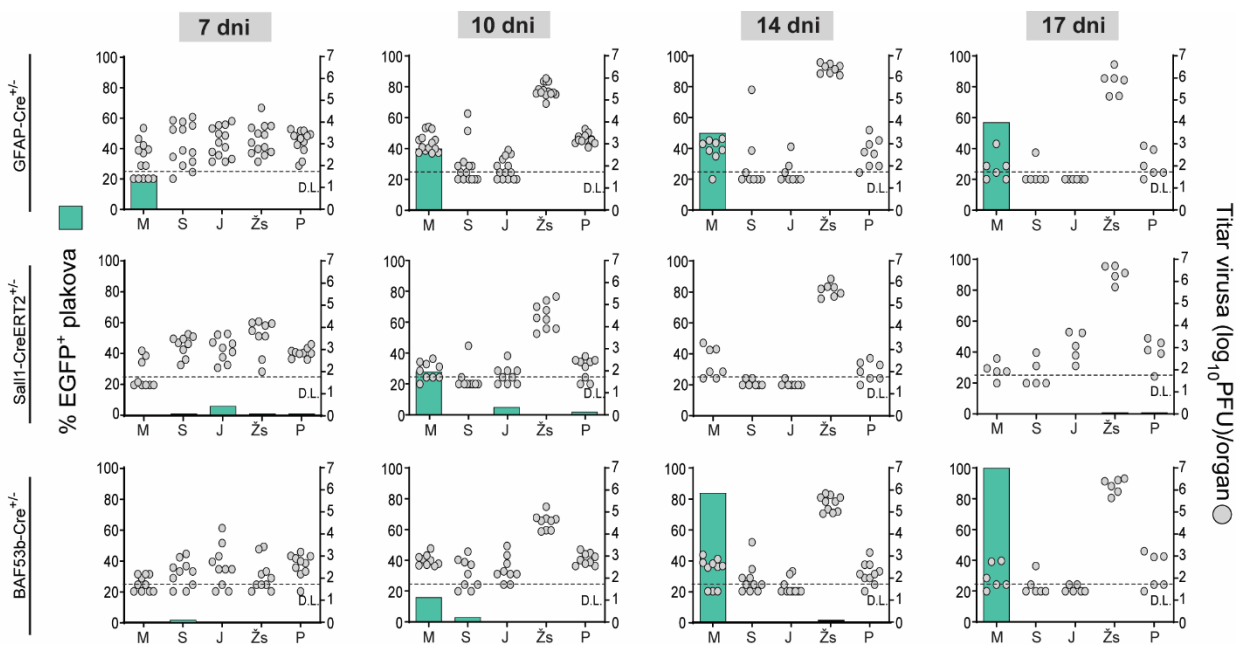
Slika 9. Rekombinantni virus MCMV-flox. Prikazan je primjer infekcije stanice koja ispoljava rekombinazu Cre. Kada virus inficira stanicu koja ispoljava rekombinazu Cre pod promotorom specifičnim za stanicu, proći će konverziju posredovanu rekombinazom Cre što će omogućiti ekspresiju reporterskog proteina EGFP kroz daljnju diseminaciju.

Novookočene miševe koji ispoljavaju rekombinazu Cre specifično u astrocitima (miševi GFAP-Cre^{+/-}), mikrogliji (miševi Sall1-CreERT2^{+/-}), neuronima (miševi BAF53b-Cre^{+/-}), kao i njihove odgovarajuće Cre-negativne kontrole iz legla inficirali smo i.p. virusom MCMV-flox. Rekombinaza Cre u transgeničnom soju Sall1-CreERT2^{+/-} nije konstitutivno ispoljena, već se njeno ispoljavanje potiče tretmanom s TAM-om, antagonistom estrogenskih receptora [174]. U tu svrhu, miševi soja Sall1-CreERT2^{+/-} tretirani su s TAM-om i.g. tri uzastopna dana unutar prvog postnatalnog tjedna sukladno literaturi [165]. Učinkovitost rekombinacije nakon tretmana TAM-om odredili smo križanjem miševa soja Sall1-Cre^{+/-}ERT2 s reporterskim miševima soja Rosa26-loxP-tdTomato (R26^{tdTomato}) koji ispoljavaju reporterski protein tdTomato nakon rekombinacije posredovane rekombinazom Cre [175]. Analizom protočnom citometrijom 7 i 21 dni potvrdili smo da preko 90% analizirane mikroglije ispoljava reporterski protein tdTomato u miševima soja Sall1-CreERT2^{+/-} križanim sa miševima soja R26^{tdTomato} što ukazuje na visoku učinkovitost rekombinacije (**Slika 10A i B**). Istovremeno, u kontrolnih miševa soja R26^{tdTomato} mikroglija nije ispoljavala protein tdTomato, što ukazuje na visoku specifičnost eksperimentalnog sustava.



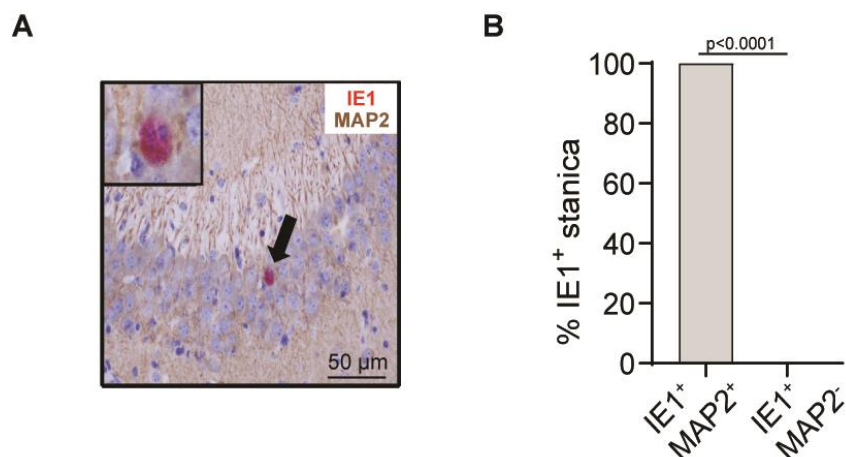
Slika 10. Ispitivanje učinkovitosti rekombinacije inducirane TAM-om u miševa soja Sall1-Cre^{+/+}/ERT2 x R26tdTomato^{+/+}. **A)** Shematski prikaz pokusa (FACS – protočna citometrija). **B)** Novookoćeni miševi soja Sall1-Cre^{+/+}/ERT2 x R26tdTomato^{+/+} inficirani su i.p. s 200 PFU MCMV-a 24-36 h nakon okota. Miševi su tretirani s 50 µg/dan TAM i.g. 2., 3. i 4. postnatalni dan. Miševi su žrtvovani 7. i 21. dan nakon infekcije (dni) , prikupljeni su mozgovima te je ispoljavanje reporterskog proteina tdTomato analizirano protočnom citometrijom. Prikazani su reprezentativni histogrami ispoljavanja reporterskog proteina tdTomato u mikrogliji (CD45.2^{int}CD11b⁺) miševa soja Sall1-CreERT2^{+/+} x R26tdTomato^{+/+} (Cre⁺) i kontrolnih (Cre⁻) miševa iz legla.

Mozak i periferni organi prikupljeni su 7, 10, 14 i 17 dni. Broj obilježenih i neobilježenih infektivnih virusa u homogenatima organa transgeničnih i kontrolnih miševa određen je testom virusnih čistina i konfokalnom mikroskopijom (**Slika 11**). Nakon infekcije transgeničnih miševa GFAP-Cre^{+/+} konverzija reporterskog virusa događa se već od 7 dni, što ukazuje da su astrociti ključni tip stanica mozga koje proizvode infektivni virus. Nadalje, manje od 60% virusa koji se replicira u mozgu potječe iz astrocita u bilo kojem trenutku analize, što sugerira da virus može ući u mozak bez inficiranja astrocita koji čine BBB (**Slika 11**). Za razliku od astrocita, mikroglije nisu inficirane 7 dni. Virus porijeklom iz mikroglije detektiran je 10 dni, ali ne i u drugim testiranim vremenskim točkama što sugerira da se virus iz mikroglije ne širi lako na druge stanice SŽS-a (**Slika 11**). Nakon infekcije miševa BAF53b-Cre^{+/+} nije bilo proizvodnje infektivnog virusa iz neurona 7 dni, dok je 10 dni manje od 20% infektivnog virusa potjecalo iz neurona, što pokazuje da zreli neuroni nisu prve mete tijekom akutne faze infekcije MCMV-om u mozgu. Međutim, u kasnijim vremenskim točkama akutne infekcije neuroni su postali glavna vrsta stanica koja proizvodi infektivni virus (**Slika 11**).



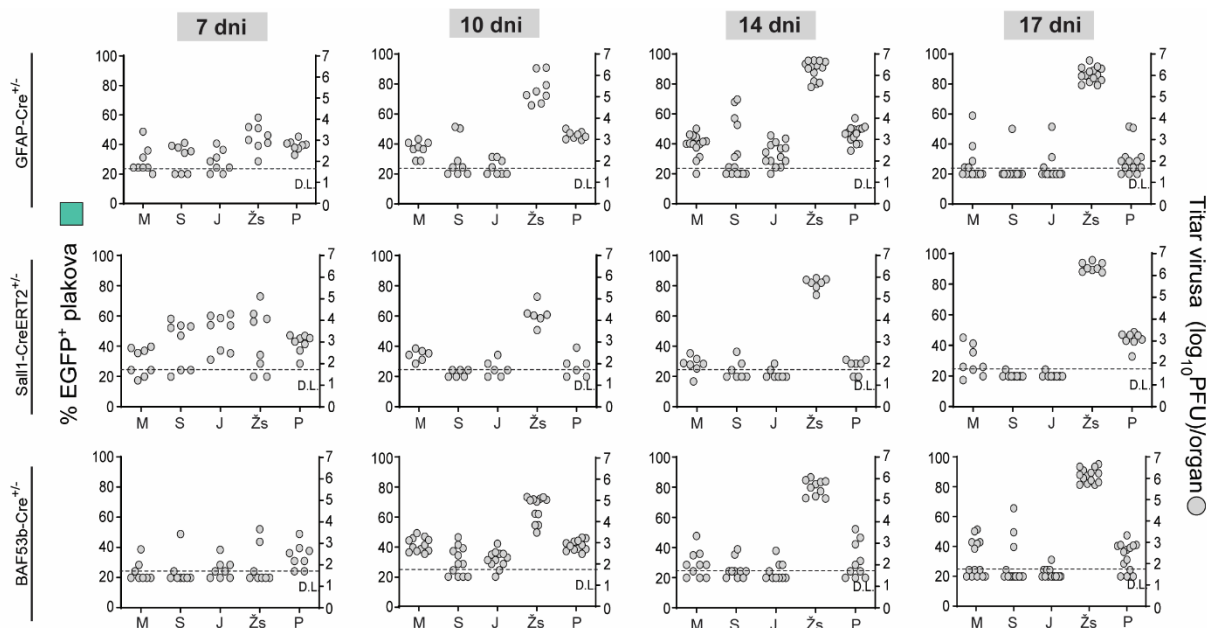
Slika 11. Doprinos astrocita, mikroglije i neurona u proizvodnji infektivnog MCMV-a u mozgu. Novookoćeni transgenični miševi soja GFAP-Cre^{+/-}, Sall1CreERT2^{+/-} i BAF53b-Cre^{+/-} inficirani su i.p. s 1500 PFU virusa MCMV-flox 24-36 h nakon okota. Miševi Sall1CreERT2^{+/-} su tretirani s 50 µg/dan TAM i.g na 2., 3. i 4. dan nakon okota. Miševi su žrtvovani 7, 10, 14 i 17 dan nakon infekcije (dni), a organi su prikupljeni. Titar virusa u mozgu (M), slezeni (S), jetri (J), žlijezdama slinovnicama (Žs) i plućima (P) određen je testom virusnih čistina u navedenim dni. Prikazani su rezultati za pojedinačne miševe (krugovi); Prikazane su srednje vrijednosti postotka EGFP⁺ plakova po organu (stupci); isprekidanom linijom označena je granica detekcije virusa (DL).

Prethodne rezultate validirali smo histološkom kvantifikacijom stanica inficiranih MCMV-om u mozgu miševa soja C57BL/6 inficiranih WT MCMV-om. Stanice inficirane MCMV-om bile su isključivo MAP2 pozitivni (MAP2⁺) neuroni 17 dni (**Slika 12A i B**), čime je osigurana neovisna potvrda dijela podataka dobivenih korištenjem reporterskog sustava (**Slika 11**). Nismo primijetili EGFP⁺ plakove u perifernim organima transgeničnih miševa GFAP-Cre^{+/-} i BAF53b-Cre^{+/-}, što sugerira da se virus ne širi iz mozga natrag u periferiju. U perifernim organima miševa Sall1CreERT2^{+/-} uočili smo EGFP⁺ plakove, što je u skladu s činjenicom da je protein Sall1 ispoljen u nekoliko populacija perifernih makrofaga [176], što vjerojatno dovodi do konverzije reporterskog virusa.



Slika 12. Histološka validacija reporterskog sustava. A-B) Novookoćeni miševi soja C57BL/6 inficirani su i.p. s 200 PFU MCMV-a 24-36 h nakon okota. 17 dana nakon infekcije miševi su žrtvovani, prikupljeni su mozgovi te su procesuirani u parafinske blokove. Na rezovima tkiva provedeno je dvostruko imunohistokemijsko bojanje. Za detekciju neurona korišteno je protutijelo MAP2 (citoplazma obojena smeđe), a za vizualizaciju infekcije MCMV-om protutijelo IE1 (crveno jezgreno bojanje). **A)** Prikazana je reprezentativna slika neurona inficiranog MCMV-om u hipokampusu (40x povećanje, umetak 100x povećanje). Strelica pokazuje na stanicu inficiranu MCMV-om. **B)** Prikazana je kvantifikacija IE1 protein-pozitivnih (IE1⁺) MAP2⁺ neurona (n=3 miša, 10 rezova tkiva/mišu). Statistički značajne razlike određene su jednosmjernim ANOVA testom praćenim Tukey-evim testom višestruke usporedbe. ;p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

Nakon infekcije Cre-negativnih kontrolnih miševa dobivenih iz istog legla kao i miševi prikazani u **Slici 11**, nismo uočili EGFP⁺ plakove, što ukazuje na visoku specifičnost reporterskog sustava s obzirom na to da nije došlo do konverzije virusa MCMV-flox u odsutnosti rekombinaze Cre (**Slika 13**).



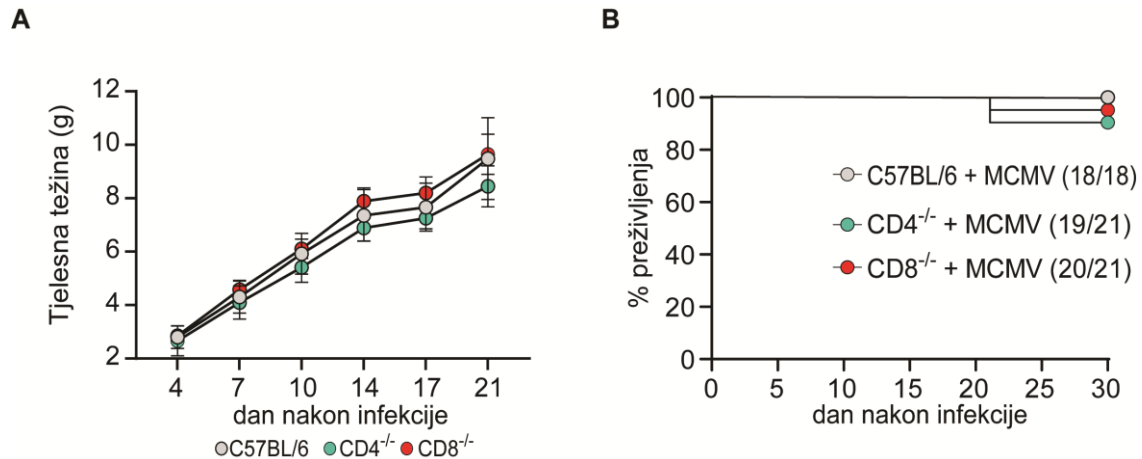
Slika 13. Kontrola spontane rekombinacije virusa MCMV-flox. Novookočeni miševi soja C57BL/6 inficirani su i.p. s 1500 PFU MCMV-flox 24-36 h nakon okota. Miševi su žrtvovani 7, 10, 14 i 17 dana nakon infekcije (dni), a organi su prikupljeni. Titar virusa u mozgu (M), slezeni (S), jetri (J), žlijezdama slinovnicama (Žs) i plućima (P) određen je testom virusnih čistina u navedenim dni. Prikazani su rezultati za pojedinačne miševe (krugovi); Prikazane su srednje vrijednosti postotka EGFP⁺ plakova po organu (stupci); isprekidanom linijom označena je granica detekcije virusa (DL).

Zaključno, ovi rezultati pokazuju da je astrociti, mikroglije i neuroni u mozgu produktivno inficirani MCMV-om, te da su neuroni dominantan izvor MCMV-a tijekom kasne faze akutne infekcije.

4.5. CD4⁺ limfociti T su potrebni za razrješenje produktivne infekcije u kortikalnim i hipokampalnim neuronima

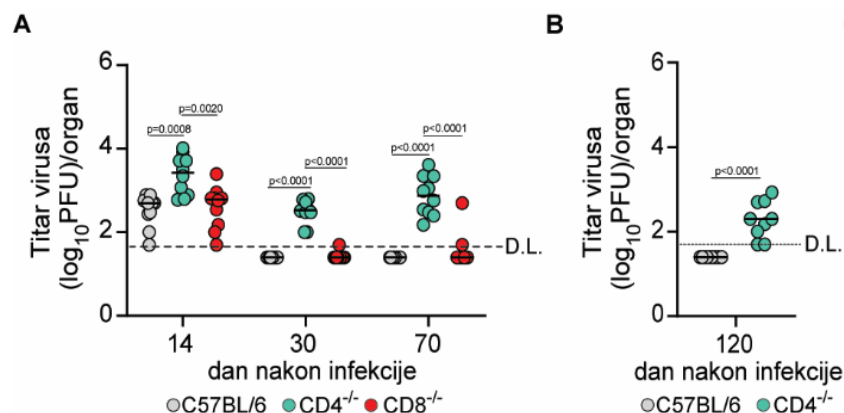
Tijekom akutne infekcije MCMV-om, CD8⁺ i CD4⁺ limfociti T infiltriraju u mozak i doprinose nadzoru virusne infekcije [72,131]. Budući da limfociti T infiltriraju u mozak oko 10 dni [72], naši rezultati sugeriraju da je nadzor infekcije u neuronima posredovan limfocitima T odgođen u usporedbi s drugim vrstama stanica mozga (**Slika 11**). Kako bismo odredili koja populacija limfocita T je uključena u razrješenje produktivne infekcije u neuronima, inficirali smo MCMV-om novookočene miševe soja C57BL/6, i CD4⁻ (CD4^{-/-}) i CD8-deficijentne (CD8^{-/-}) miševe. Mozak i periferni organi prikupljeni su u tri vremenske točke koje predstavljaju akutnu fazu (14 dni), kraj akutne faze (30 dni) i latentnu fazu (70 dni) infekcije. Nakon infekcije novookočenih

miševa MCMV-om, nismo primijetili značajne razlike u tjelesnoj težini i preživljenju kod miševa kojima nedostaju $CD4^+$ ili $CD8^+$ limfociti T u usporedbi s kontrolnim miševima soja C57BL/6 (Slika 14).



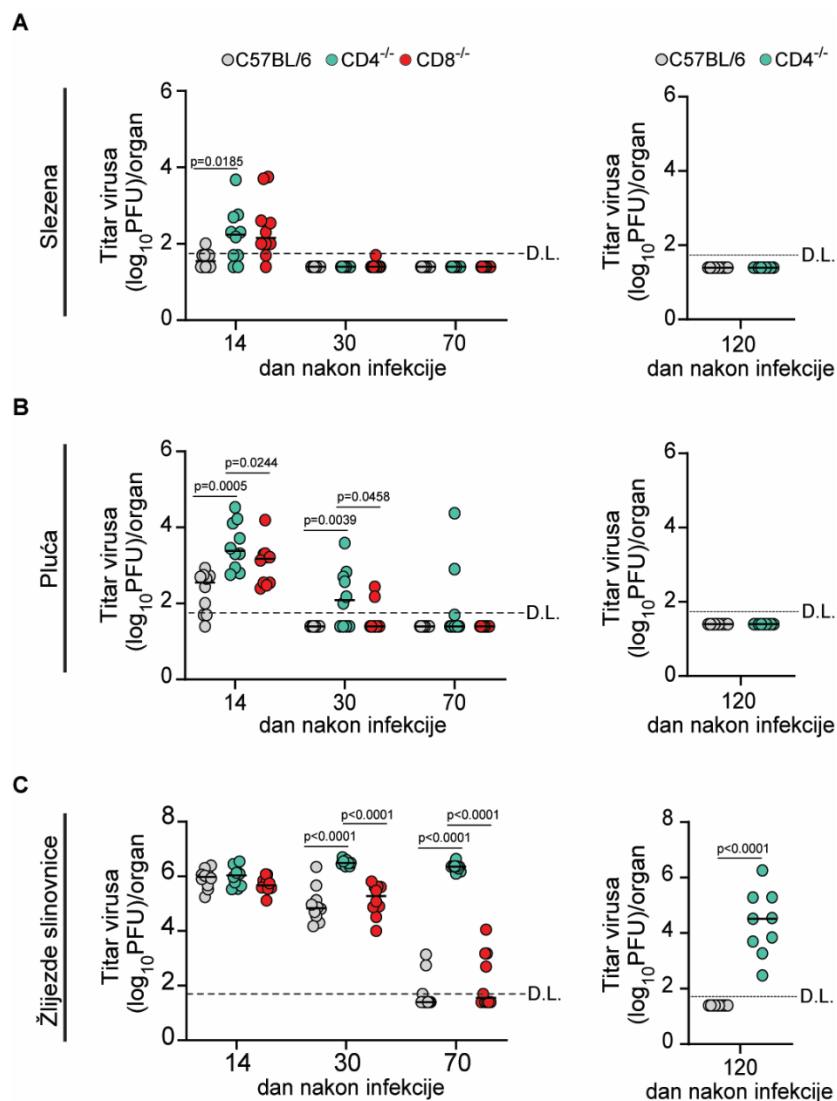
Slika 14. Nadzor infekcije MCMV-om u novookoćenim CD4- i CD8-deficijentnim miševima. A-B) Novookoćeni miševi soja C57BL/6, i CD4- ($CD4^{-/-}$) i CD8-deficijentni ($CD8^{-/-}$) miševi inficirani su i.p. s 200 PFU MCMV-a 24-36 h nakon okota. **A)** Težina i **B)** preživljenje miševa zabilježeni su svakih 3-4 dana.

Miševi bez $CD4^+$ limfocita T imali značajno viši titar virusa počevši od 14 dni, te nisu mogli razrješiti produktivnu infekciju u mozgu (Slika 15A). Nadalje, detektirali smo infektivni virus čak 120 dni u mozgovima miševa $CD4^{-/-}$ (Slika 15B). Nasuprot tome, miševi $CD8^{-/-}$ nadzirali su infekciju MCMV-om u mozgu slično kao i kontrolni miševi soja C57BL/6 (Slika 15A), što sugerira da $CD8^+$ limfociti T nisu esencijalni za razrješenje produktivne infekcije MCMV-om u mozgu.



Slika 15. CD4⁺ limfociti T su potrebni za razrješenje produktivne infekcije MCMV-om u mozgu. A-B) Novookoćeni miševi soja C57BL/6, i CD4^{-/-} (CD4^{-/-}) i CD8-deficijentni (CD8^{-/-}) miševi inficirani su i.p. s 200 PFU MCMV-a 24-36 h nakon okota. Miševi su žrtvovani **A)** 14, 30, 70 i **B)** 120 dan nakon infekcije, a organi su prikupljeni. Titar virusa u mozgu određen je testom virusnih čistina u navedenim dni. Prikazani su rezultati za pojedinačne miševe (krugovi) i medijan vrijednosti (linije); isprekidanom linijom označena je granica detekcije virusa (DL). Statistički značajne razlike određene su jednosmjernim ANOVA testom praćenim Tukey-evim testom višestruke usporedbe; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

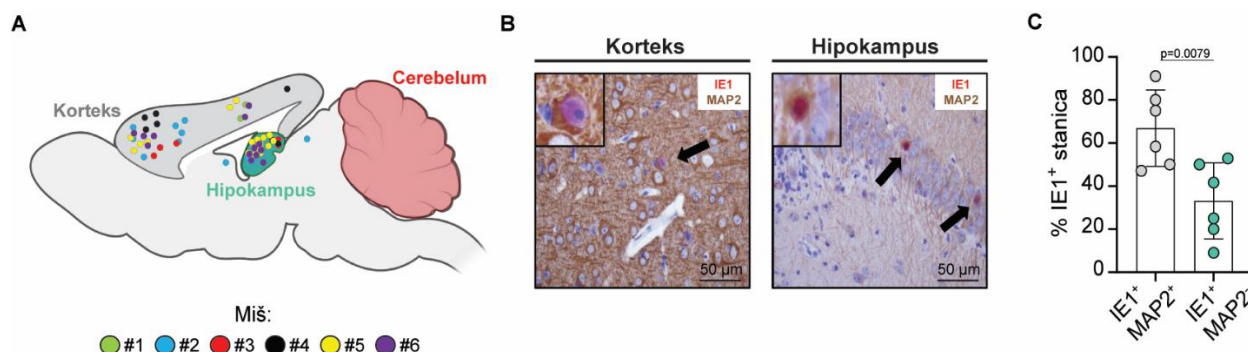
U skladu s opažanjima u odraslih miševa inficiranih MCMV-om [177], CD4⁺ limfociti T nisu bili bitni za razrješenje produktivne infekcije u perifernim organima, uključujući slezenu i pluća, s iznimkom žlijezda slinovnica gdje je razrješenje produktivne infekcije zahtijevalo CD4⁺ limfocite T (**Slika 16A-C**).



Slika 16. Uloga limfocita T u nadzoru produktivne infekcije MCMV-om u perifernim organima. A-B) Novookočeni miševi soja C57BL/6, i CD4^{-/-} (CD4^{-/-}) i CD8-deficijentni (CD8^{-/-}) miševi inficirani su i.p. s 200 PFU MCMV-a 24-36 h nakon okota. Miševi su žrtvovani 14, 30, 70 i 120 dan nakon infekcije, a **A)** slezena, **B)** pluća i **C)** žlijezde slinovnice su prikupljene. Titar virusa u organima određen je testom virusnih čistina u navedenim dni. Prikazani su rezultati za pojedinačne miševe (krugovi) i medijan vrijednosti (linije); isprekidanom linijom označena je granica detekcije virusa (DL). Statistički značajne razlike određene su jednosmjernim ANOVA testom praćenim Tukey-evim testom višestruke usporedbe; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

Kako bi utvrdili jesu li CD4⁺ limfociti T ključni u nadzoru infekcije MCMV-om u neuronima, mozgovi miševa CD4^{-/-} prikupljeni su 37 dni. Virusni protein IE1 dominantno je detektiran u korteksu i hipokampusu (**Slika 17A**), pri čemu su neuroni bili najčešće inficirana vrsta stanica

(Slika 17B i C). Stoga, naši rezultati ukazuju da su $CD4^+$ limfociti T bitni za nadzor infekcije MCMV-om u neuronima.

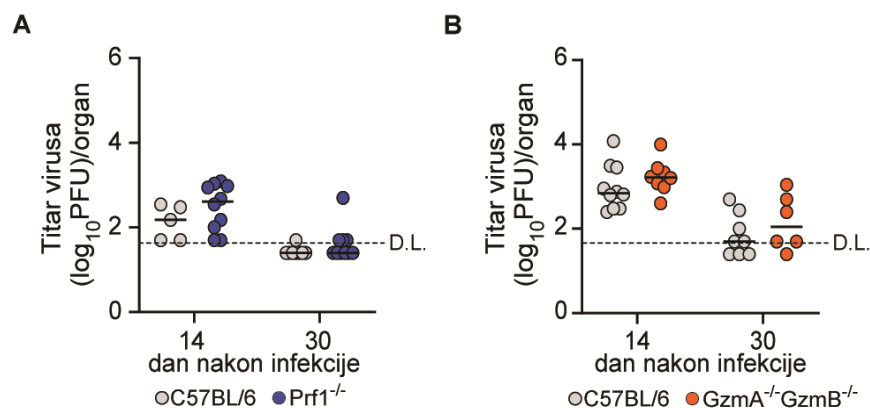


Slika 17. Imunohistokemijska analiza infekcije MCMV-om u mozgu miševa $CD4^{-/-}$. Novookoćeni miševi soja $CD4^{-/-}$ inficirani su i.p. s 200 PFU MCMV-a 24-36 h nakon okota. Miševi su žrtvovani 37 dana nakon infekcije, prikupljeni su mozgovi te su procesuirani u parafinske blokove. Na tkivnim rezovima provedeno je dvostruko imunohistokemijsko bojanje ($n=6$ miševa, 10 rezova tkiva/mišu). Za detekciju neurona korišteno je protutijelo MAP2 (citoplazma obojena smeđe), a za vizualizaciju infekcije MCMV-om protutijelo IE1 (crveno jezgreno bojanje). **A)** Prikazana je topografija $IE1^+$ stanica u mozgu $CD4^{-/-}$ miševa. **B)** Prikazana je reprezentativna slika neurona inficiranih MCMV-om u korteksu i hipokampusu (40x povećanje, umetak 100x povećanje). **C)** Prikazana je kvantifikacija $IE1^+$ $MAP2^+$ neurona ($n=6$ miševa, 10 rezova tkiva/mišu). Statistički značajne razlike određene su jednosmjernim ANOVA testom praćenim Tukey-evim testom višestruke usporedbe; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

Zaključno, ovi rezultati pokazuju da su $CD4^+$ limfociti T, a ne $CD8^+$ limfociti T, ključni za razrješenje produktivne infekcije MCMV-om i uspostavu latencije u mozgu.

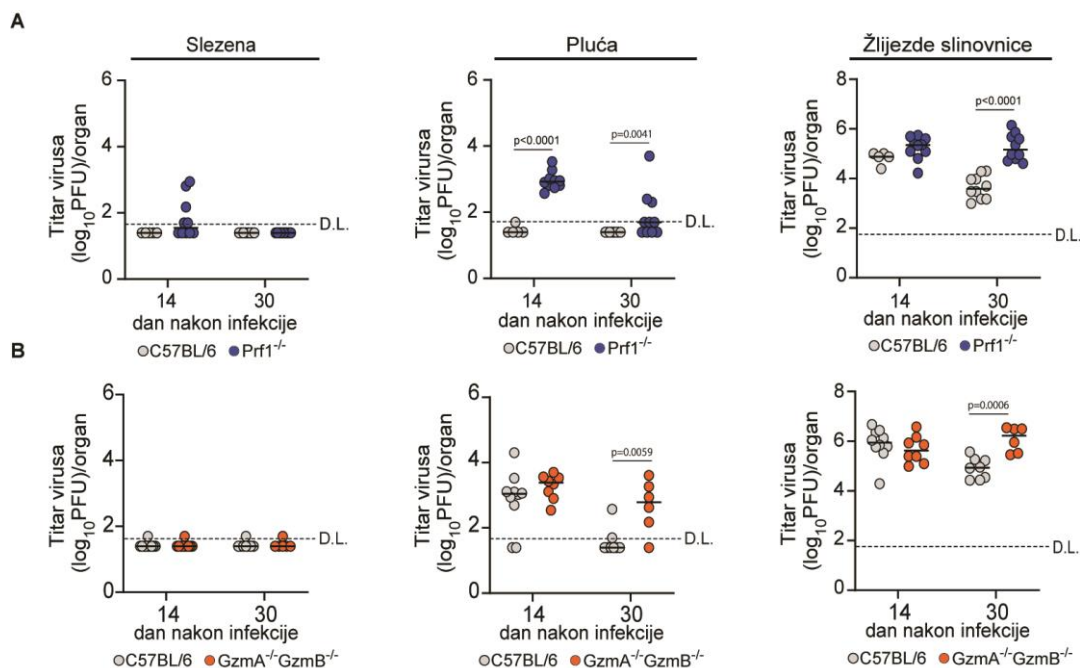
4.6. Razrješenje produktivne infekcije neurona MCMV-om posredovano je citokinima IFN- γ i IL-12

$CD4^+$ limfociti T posjeduju brojne antivirusne mehanizme, od antivirusnog odgovora posredovanog preko drugih stanica, do izravne supresije replikacije virusa u inficiranim stanicama. [178]. Kako bismo odredili mehanizam nadzora infekcije MCMV-om posredovan $CD4^+$ limfocitima T u mozgu, inficirali smo miševe kojima nedostaju ključni elementi efektorskih funkcija limfocita T. Uloga citotoksičnih mehanizama određena je inficiranjem novookoćenih miševa kojima nedostaju citolitički proteini perforin ($Prf1^{-/-}$) ili granzimi A i B ($Gzma^{-/-}Gzmb^{-/-}$). U usporedbi s kontrolnim miševima soja C57BL/6, nisu primijećene značajne razlike u titru virusa u mozgu miševa $Prf1^{-/-}$ ili $Gzma^{-/-}Gzmb^{-/-}$, što sugerira da necitolitički mehanizam nadzire infekciju MCMV-om u neuronima (Slika 18A i B).



Slika 18. Citolitički proteini nisu potrebni su za razrješenje produktivne infekcije MCMV-om u mozgu. A-B) Novookočeni miševi soja C57BL/6, **A)** Prf1^{-/-} i **B)** Gzma^{-/-}Gzmb^{-/-} inficirani su i.p. s 200 PFU MCMV-a 24-36 h nakon okota. Miševi su žrtvovani 14, 30, i 70 dana nakon infekcije, a organi su prikupljeni. Titar virusa u mozgu određen je testom virusnih čistina. Prikazani su rezultati za pojedinačne miševе (krugovi) i medijan vrijednosti (linije); isprekidanom linijom označena je granica detekcije virusa (DL). Statistički značajne razlike određene su jednosmjernim ANOVA testom praćenim Tukey-evim testom višestruke usporedbe; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

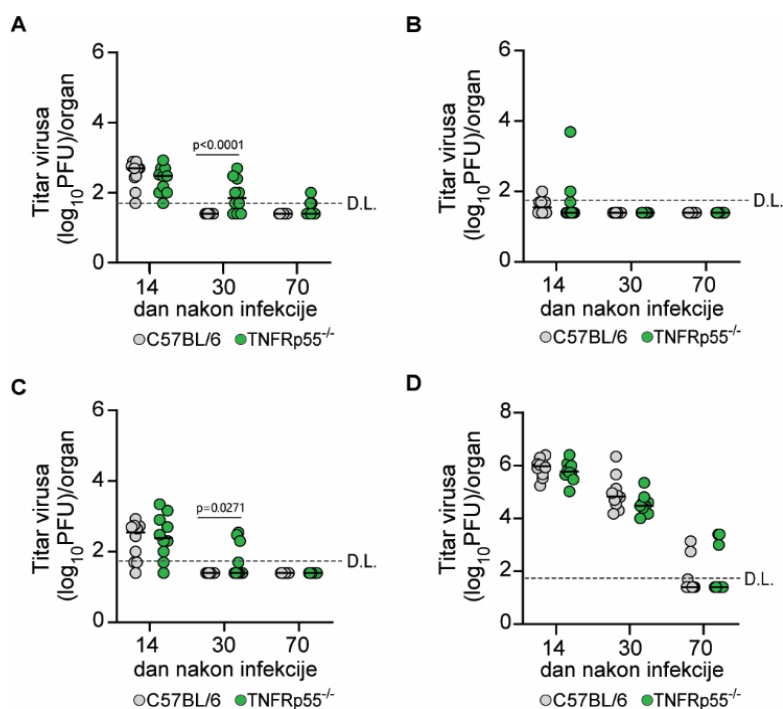
Sukladno očekivanjima, citolitički proteini perforin i granzimi A i B bili su potrebni za nadzor MCMV-a u plućima i žlijezdama slinovnicama 14 i 30 dni (**Slika 19A i B**) [179,180].



Slika 19. Citolitički proteini potrebni su za nadzor produktivne infekcije MCMV-om u perifernim organima.

A-B) Novookočeni miševi soja C57BL/6, i miševi **A)** Prf1^{-/-} i **B)** Gzma^{-/-}Gzmb^{-/-} inficirani su i.p. s 200 PFU MCMV-a 24-36 h nakon okota. Miševi su žrtvovani 14 i 30 dana nakon infekcije a organi su prikupljeni. Titar virusa u slezeni, plućima i žlijezdama slinovnicama određen je testom virusnih čistina. Prikazani su rezultati za pojedinačne miševe (krugovi) i medijan vrijednosti (linije); isprekidanom linijom označena je granica detekcije virusa (DL). Statistički značajne razlike određene su jednosmjernim ANOVA testom praćenim Tukey-evim testom višestruke usporedbe; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

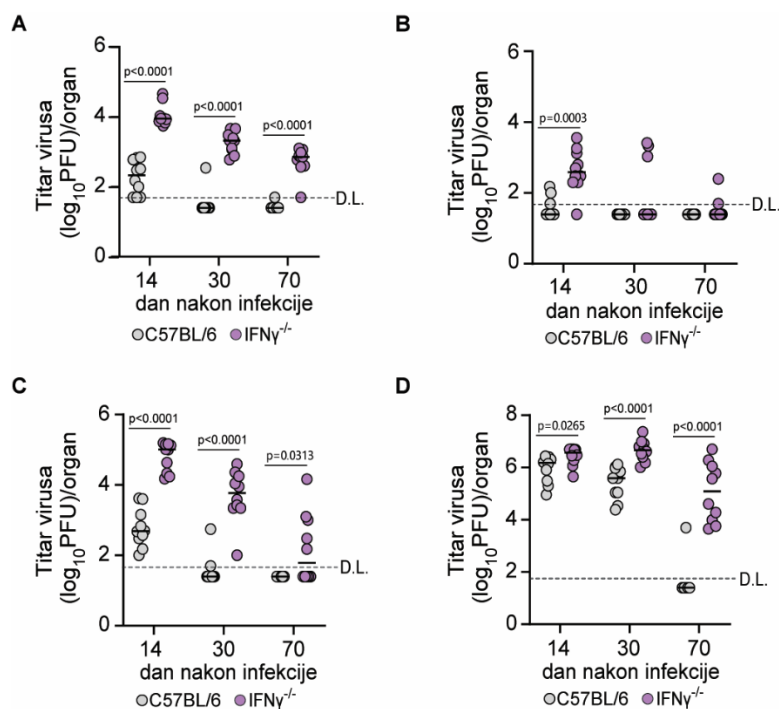
Nadalje, ispitali smo ulogu efektorskih citokina TNF- α i IFN- γ u nadzoru infekcije MCMV-om u mozgu. Inficirali smo novokoćene miševe kojim nedostaje receptor faktora nekroze tumora p55 (engl. *Tumor Necrosis Factor Receptor p55*, TNFRp55) (TNFRp55^{-/-}) ili citokin IFN- γ (IFN- γ ^{-/-}). Miševi TNFRp55^{-/-} imali su skroman, ali značajno povećan titar virusa u mozgu u usporedbi s kontrolnim miševima soja C57BL/6 30 dni, te je većina životinja razrješila produktivnu infekciju u mozgu do 70 dni (**Slika 20A**). Isti je fenotip primijećen u plućima, gdje su miševi TNFRp55^{-/-} razrješili infekciju MCMV-om s odgođenom kinetikom u usporedbi s kontrolnim miševima soja C57BL/6, dok nije primijećena razlika u nadzoru infekcije MCMV-om u slezeni i žlijezdama slinovnicama (**Slika 20B-D**).



Slika 20. Uloga citokina TNF- α u razrješenju produktivne infekcije MCMV-om u mozgu i perifernim organima.

A-D) Novookočeni miševi soja C57BL/6 i TNFRp55^{-/-} inficirani su i.p. s 200 PFU MCMV-a 24-36 h nakon okota. Miševi su žrtvovani 14, 30, i 70 dana nakon infekcije, a organi su prikupljeni. Titar virusa u **A)** mozgu, **B)** slezeni, **C)** plućima i **D)** žlijezdama slinovnicama određen je testom virusnih čistina. Prikazani su rezultati za pojedinačne miševe (krugovi) i medijan vrijednosti (linije); isprekidanom linijom označena je granica detekcije virusa (DL). Statistički značajne razlike određene su jednosmjernim ANOVA testom praćenim Tukey-evim testom višestruke usporedbe; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

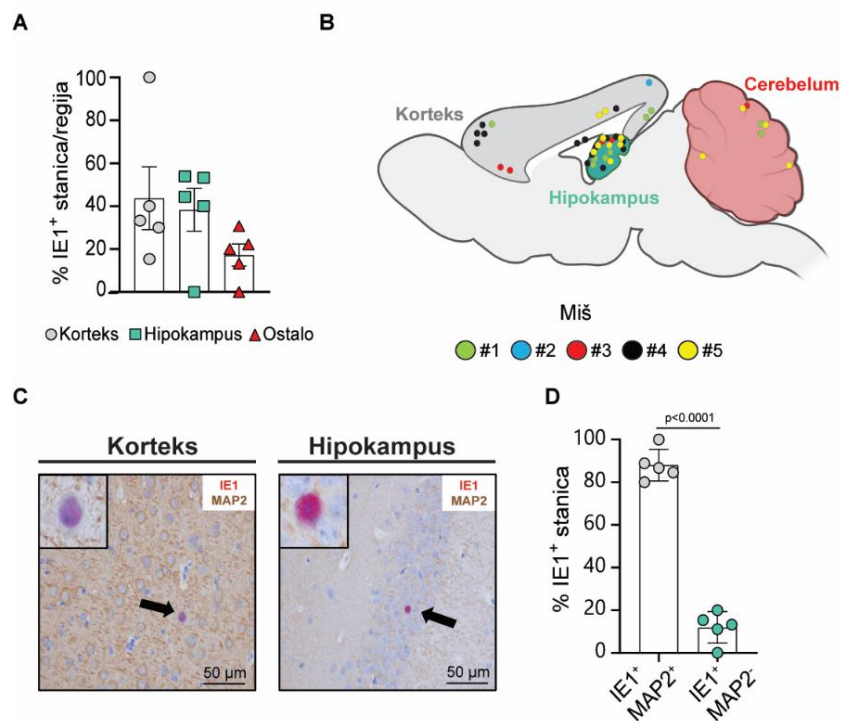
Nasuprot tome, miševi IFN- γ ^{-/-} imali su značajno veći titar virusa u odnosu na kontrolne miševe, za gotovo dva reda veličine, i nisu mogli razriješiti infekciju u mozgu čak ni 70 dni (**Slika 21A**). Sličan fenotip primijećen je u žlijezdama slinovnicama (**Slika 21 B-D**), za koje je ranije opisano da zahtijevaju citokin IFN- γ za nadzor produktivne infekcije [181].



Slika 21. Uloga citokina IFN- γ u razrješenju produktivne infekcije MCMV-om u mozgu i perifernim organima.

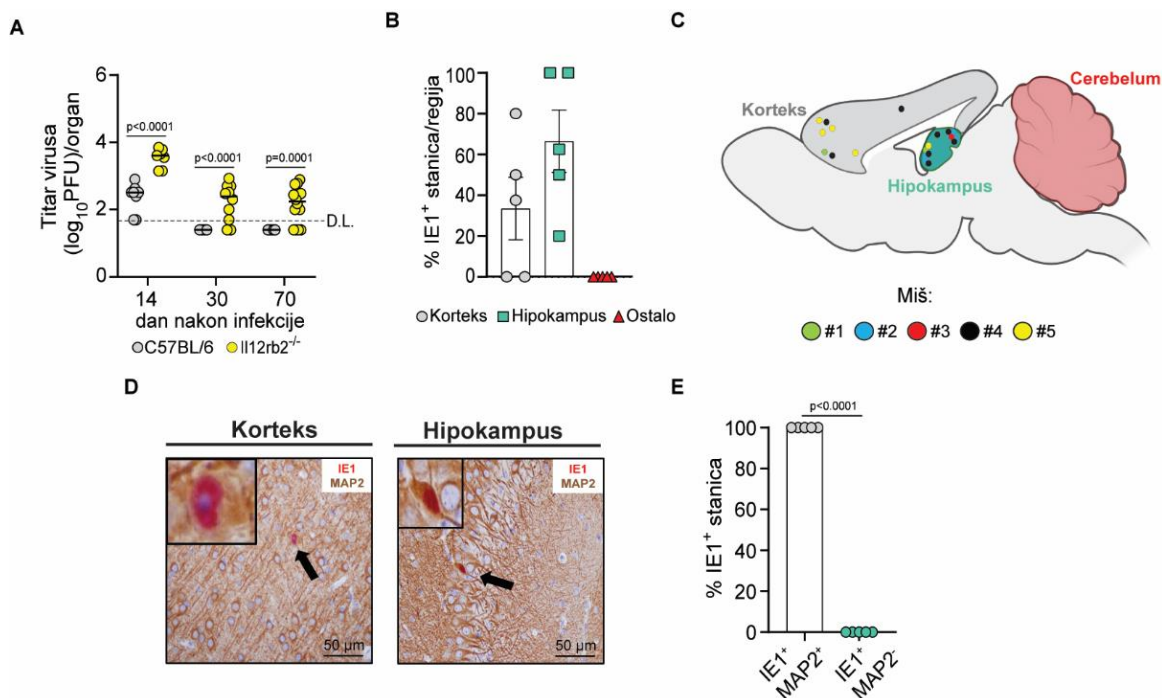
A-D) Novookočeni miševi soja C57BL/6 i IFN- γ ^{-/-} inficirani su i.p. s 200 PFU MCMV-a 24-36 h nakon okota. Miševi su žrtvovani 14, 30, i 70 dana nakon infekcije, a organi su prikupljeni. Titar virusa u **A)** mozgu, **B)** slezeni, **C)** plućima i **D)** žlijezdama slinovnicama određen je testom virusnih čistina. Prikazani su rezultati za pojedinačne miševe (krugovi) i medijan vrijednosti (linije); isprekidanom linijom označena je granica detekcije virusa (DL). Statistički značajne razlike određene su jednosmjernim ANOVA testom praćenim Tukey-evim testom višestruke usporedbe; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

Kako bi utvrdili je li citokin IFN- γ ključan u nadzoru infekcije neurona MCMV-om, proveli smo imunohistokemijsku analizu 37 dni. U miševa koji nemaju citokin IFN- γ uočen je isti obrazac infekcije stanica MCMV-om kakav je primijećen kod životinja s nedostatkom CD4⁺ limfocita T (**Slike 22 i 17**). Stanice inficirane MCMV-om pretežno su pronađene u korteksu i hipokampusu (**Slika 22A i B**), a MAP2⁺ neuroni bili su glavna populacija stanica inficirana MCMV-om u mozgovima miševa IFN- γ ^{-/-} (**Slika 22C i D**).



Slika 22. Imunohistokemijska analiza infekcije MCMV-om u mozgu miševa $IFN-\gamma^{-/-}$. A-D) Novookočeni miševi soja $IFN-\gamma^{-/-}$ inficirani su i.p. s 200 PFU MCMV-a 24-36 h nakon okota. Miševi su žrtvovani 37 dana nakon infekcije, prikupljeni su mozgovi, te su procesuirani u parafinske blokove. Na tkivnim rezovima provedeno je dvostruko imunohistokemijsko bojanje (n=5 miševa, 10 rezova tkiva/mišu). Za detekciju neurona korišteno je protutijelo MAP2 (citoplazma obojena smeđe), a za vizualizaciju infekcije MCMV-om protutijelo IE1 (crveno jezgreno bojanje). **A)** Lokalizacija IE1⁺ stanica u korteksu, hipokampusu i ostatku (ostalo) mišjeg mozga. **B)** Prikazana je topografija IE1⁺ stanica u mozgu $IFN-\gamma^{-/-}$ miševa. **C)** Prikazana je reprezentativna slika neurona inficiranih MCMV-om u korteksu i hipokampusu (40x povećanje, umetak 100x povećanje). **D)** Prikazana je kvantifikacija IE1⁺ MAP2⁺ neurona. (n=5 miša, 10 rezova tkiva/mišu). Isprekidanom linijom označena je granica detekcije virusa (DL). Statistički značajne razlike određene su jednosmjernim ANOVA testom praćenim Tukey-evim testom višestruke usporedbe; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

Proupalni citokin interleukin-12 (IL-12) važan je za diferencijaciju pomoćničkih limfocita T_H1 i proizvodnju citokina $IFN-\gamma$ [182]. Stoga smo inficirali novookočene miševe kojima nedostaje podjedinica beta 2 receptora IL-12 ($IL12rb2^{-/-}$). Kao i miševi $IFN-\gamma^{-/-}$, miševi $IL12rb2^{-/-}$ nisu mogli razriješiti infekciju MCMV-om u mozgu (**Slika 23A**). Stanice inficirane MCMV-om pronađene su pretežno u mišjem korteksu i hipokampusu (**Slika 23B i C**), te su bile isključivo MAP2⁺ neuroni (**Slika 23D i E**).



Slika 23. Uloga citokina IL-12 u razrješavanju produktivne infekcije MCMV-om u mozgu i perifernim organima.

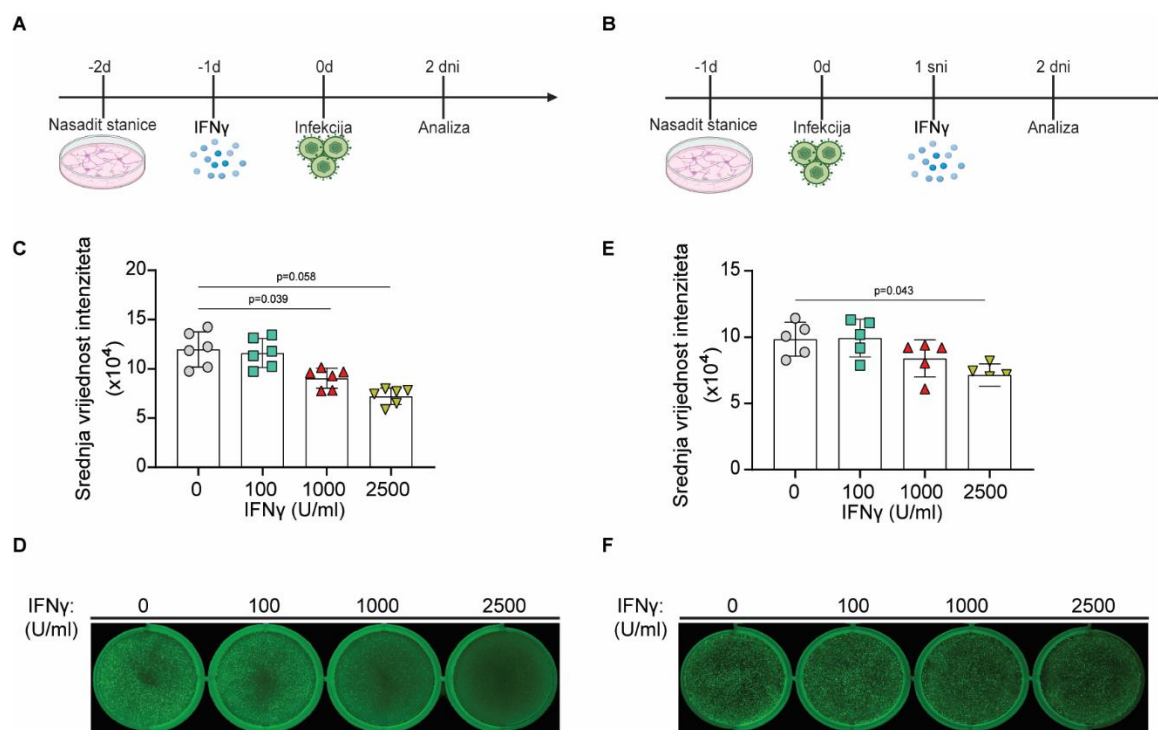
A-E) Novookoćeni miševi soja C57BL/6 i Il12rb2^{-/-} inficirani su i.p. s 200 PFU MCMV-a 24-36 h nakon okota. **A)** Miševi su žrtvovani 14, 30, i 70 dana nakon infekcije (dni), a organi su prikupljeni. Titar virusa u mozgu određen je testom virusnih čistina u navedenim dni. Prikazani su rezultati za pojedinačne miševе (krugovi) i medijan vrijednosti (linije); isprekidanom linijom označena je granica detekcije virusa (DL). **B-E)** Miševi su žrtvovani 37 dana nakon infekcije, prikupljeni su mozgovi, te su procesuirani u parafinske blokove. Na tkivnim rezovima provedeno je dvostruko imunohistokemijsko bojanje (n=5 miševa, 10 rezova tkiva/mišu). Za detekciju neurona korišteno je protutijelo MAP2 (citoplazma obojena smeđe), a za vizualizaciju infekcije MCMV-om protutijelo IE1 (crveno jezgreno bojanje). **B)** Lokalizacija IE1⁺ stanica u korteksu, hipokampusu i ostatku (ostalo) mišjeg mozga. **C)** Prikazana je topografija IE1⁺ stanica u mozgu Il12rb2^{-/-} miševa. **D)** Prikazana je reprezentativna slika neurona inficiranih MCMV-om u korteksu i hipokampusu (40x povećanje, umetak 100x povećanje). **E)** Prikazana je kvantifikacija IE1⁺ MAP2⁺ neurona (n=5 miševa, 10 rezova tkiva/mišu). Statistički značajne razlike određene su dvosmjernom ANOVA testom praćenim Tukey-evim testom višestruke usporedbe; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

Zaključno, ovi rezultati pokazuju ključnu ulogu citokina IFN-γ i IL-12, ali ne i citotoksičnosti posredovane perforinom i granzimom, u nadzoru produktivne infekcije MCMV-om u neuronima.

4.7. Citokin IFN-γ inhibira infekciju ljudskih neurona HCMV-om

Sljedeći cilj bio je istražiti može li IFN-γ djelovati na infekciju ljudskih neurona HCMV-om. Prvo smo koristili imortaliziranu staničnu liniju humanog neuroblastoma SH-SY5Y [161], koju smo inficirali HCMV-om. Stanice SH-SY5Y su tretirane različitim dozama rekombinantnog

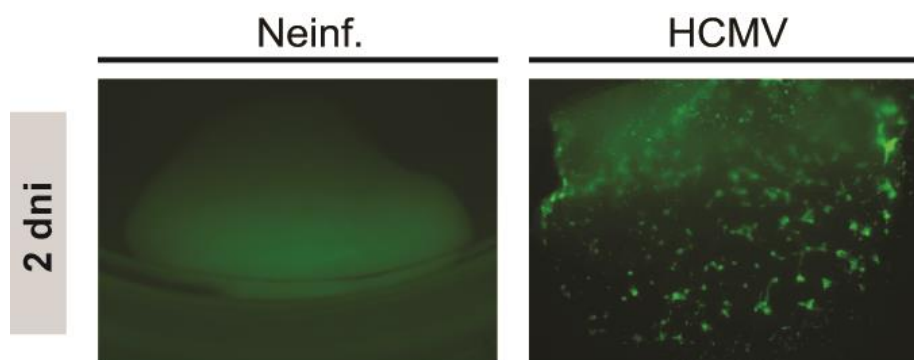
IFN- γ prije (**Slika 24A**) ili nakon (**Slika 24B**) infekcije HCMV-om. Kako bismo pratili učinak tretmana na infekciju neurone koristili smo rekombinantni HCMV koji ispoljava reporterski protein EGFP. Učinkovitost infekcije HCMV-om mjerena je intenzitetom ekspresije reporterskog proteina EGFP 2 dni. Tretman višim dozama rekombinantnog citokina IFN- γ prije (**Slika 24C i D**) ili nakon (**Slika 24E i F**) infekcije HCMV-om značajno je smanjio infekciju SH-SY5Y stanica.



Slika 24. Uloga citokina IFN- γ u nadzoru infekcije HCMV-om u staničnoj liniji neurona SH-SY5Y. A) Eksperimentalna shema za tretman stanica SH-SY5Y rekombinantnim citokinom IFN- γ jedan dan (d) prije infekcije HCMV-om. **B)** Eksperimentalna shema za tretman stanica SH-SY5Y rekombinantnim citokinom IFN- γ jedan sat nakon infekcije (sni) HCMV-om. **C)** Intenzitet ispoljavavanja reporterskog proteina EGFP 2 dana nakon infekcije (dni) u stanicama SH-SY5Y tretiranih s rekombinantnim citokinom IFN- γ prije infekcije HCMV-om. **D)** Reprezentativna slika skeniranih jažica s nasađenim stanicama SH-SY5Y 2 dni. **E)** Intenzitet ispoljavavanja reporterskog proteina EGFP 2 dni u stanicama SH-SY5Y tretiranih s rekombinantnim citokinom IFN- γ nakon infekcije HCMV-om. **F)** Reprezentativna slika skeniranih jažica s nasađenim stanicama SH-SY5Y 2 dni. Podaci su spojeni iz dva neovisna eksperimenta, s tri tehnička ponavljanja u svakom eksperimentu. Korišten je Studentov t-test za nezavisne uzorke; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

U sljedećem koraku upotrijebili smo *ex vivo* model organotipske kulture tkiva ljudskog fetalnog mozga koji je nedavno korišten kao model za izučavanje infekcije fetalnog mozga

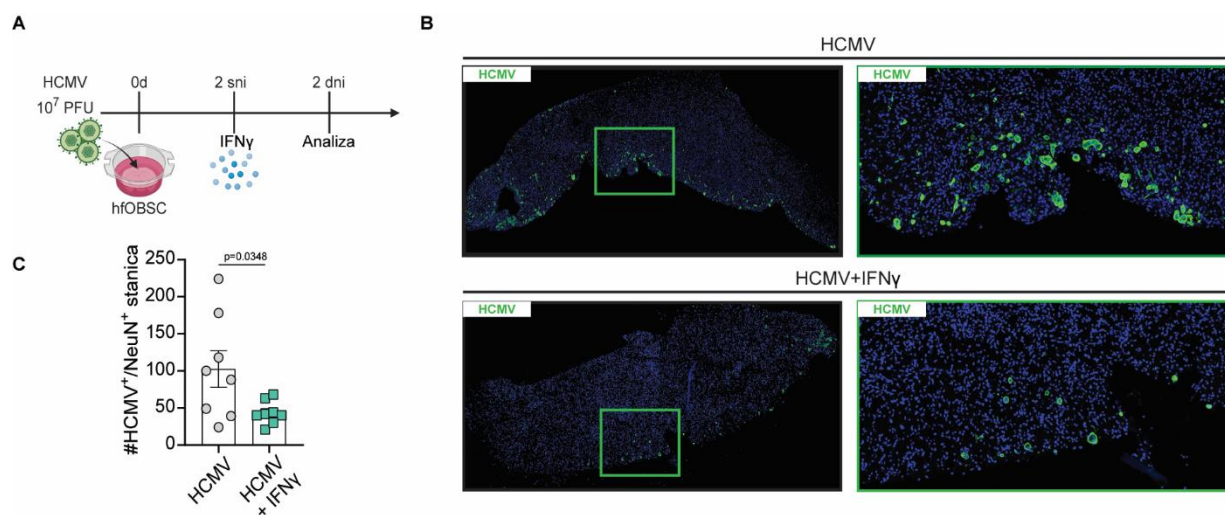
virusom HSV-1 [167]. Prvo smo inficirali hfOBSC HCMV-om koji ispoljava reporterski protein EGFP i pokazali da HCMV učinkovito inficira hfOBSC (**Slika 25**).



Slika 25. Infekcija hfOBSC-a s HCMV-om. Organotipska kultura fetalnog mozga (hfOBSC) je inficirana s 10^7 PFU virusa KL7-EGFP HCMV. Ispoljavanje reporterskog proteina EGFP u hfOBSC-a praćena je fluorescentnim mikroskopskom 2 dana nakon infekcije (dni). Prikazana je reprezentativna slika.

Nadalje, kako bismo istražili zaštitnu ulogu citokina IFN- γ u infekciji neurona fetalnog mozga, tretirali smo hfOBSC s rekombinantnim citokinom IFN- γ nakon infekcije HCMV-om (**Slika 26A**). Pokazali smo da je tretman rekombinantnim citokinom IFN- γ značajno smanjio broj NeuN⁺ neurona inficiranih HCMV-om (**Slika 26B i C**).

Zaključno, ovi podaci pokazuju da citokin IFN- γ štiti ljudske neurone od infekcije HCMV-om.

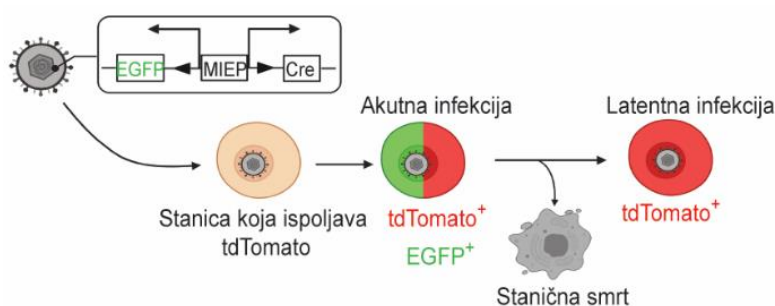


Slika 26. Citokin IFN- γ inhibira infekciju ljudskih neurona HCMV-om u tkivu fetalnog mozga. A) Eksperimentalna shema za tretman organotipskih kultura fetalnog mozga (hfOBSC) rekombinantnim citokinom IFN- γ nakon infekcije HCMV-om. Organotipske kulture su inficirane s 10^7 PFU virusa KL7-EGFP HCMV. Dva sata nakon infekcije (sni) tkiva su tretirana s 1000 U/ml rekombinantnog citokina IFN- γ (HCMV + IFN- γ). Rezovi tkiva su

pripremljeni 2 dana nakon infekcije (dni) i analizirani konfokalnom mikroskopijom. **B)** Reprezentativne slike rezova tkiva inficiranih HCMV-om bez ili sa tretmana rekombinantnim citokinom IFN- γ . **C)** Kvantificiran je broj HCMV⁺ NeuN⁺ stanica. Horizontalne linije pokazuju standardnu pogrešku srednje vrijednosti (n=2 donora, 4 rezova tkiva/uvjetu/donoru). Korišten je dvostrani Studentov t-test za nezavisne uzorke; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

4.8. Neuronu su mjesta latencije i reaktivacije MCMV-a

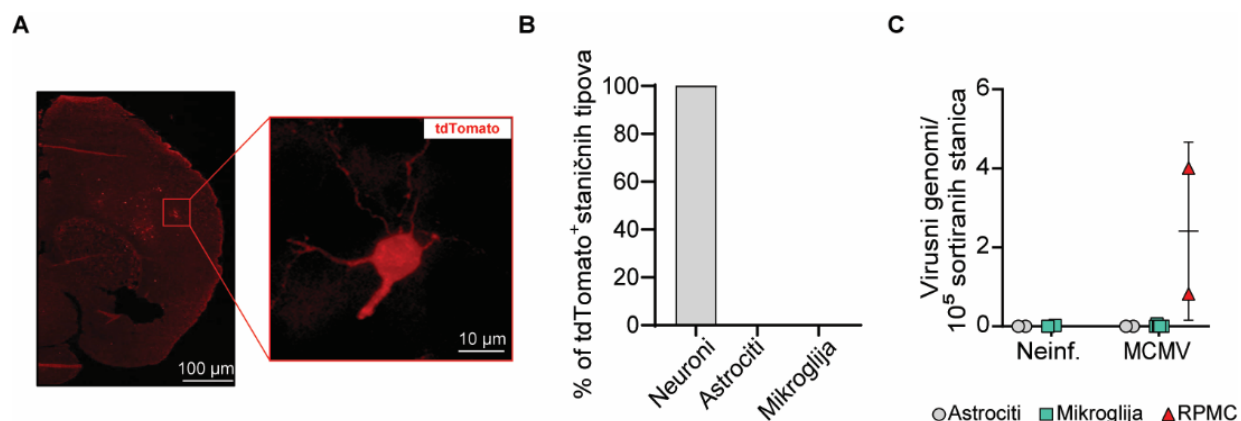
Nakon razrješenja produktivne infekcije MCMV-om, virus uspostavlja doživotnu latenciju u mišjem mozgu [71]. Međutim, nije poznato u kojim stanicama se nalazi latentni virus i u kojim stanicama reaktivira u mozgu. Kako bismo odredili koje su vrste stanica potencijalno inficirane MCMV-om u mozgu tijekom latencije koristili smo rekombinantni reporterski virus MCMV-GFP_Cre. Ovaj virus kodira reporterski protein EGFP i rekombinazu Cre pod nadzorom MIEP-a (**Slika 27**). Virusom MCMV-GFP_Cre inficirali smo mišve R26^{tdTomato} koji omogućuju ispoljavanje fluorescentnog reporterskog proteina tdTomato u bilo kojoj stanici nakon djelovanja rekombinaze Cre. Nakon infekcije miševa R26^{tdTomato} ispoljavanje rekombinaze Cre u inficiranim stanicama dovodi do uklanjanja dva uzastopna ponovljena loxP mjesta što rezultira izbacivanjem transkripcijske stop sekvence između njih i ispoljavanjem reporterskoga proteina tdTomato. Stanice koje prežive akutnu infekciju MCMV-om konstitutivno ispoljavaju reporterski protein tdTomato, što sugerira da su te stanice potencijalno latentno inficirane MCMV-om.



Slika 27. Rekombinantni virus MCMV-GFP_Cre. Virus MCMV-GFP_Cre istodobno ispoljava reporterski protein EGFP i rekombinazu Cre pod nadzorom neposrednog ranog promotora MIEP-a. Prikazan je primjer infekcije stanice koja ispoljava reporterski protein tdTomato nakon djelovanja rekombinaze Cre. Za vrijeme akutne faze infekcije, inficirana stanica će simultano ispoljavati reporterske proteine EGFP i tdTomato. Stanice koje prežive akutnu infekciju MCMV-om konstitutivno ispoljavaju reporterski protein tdTomato

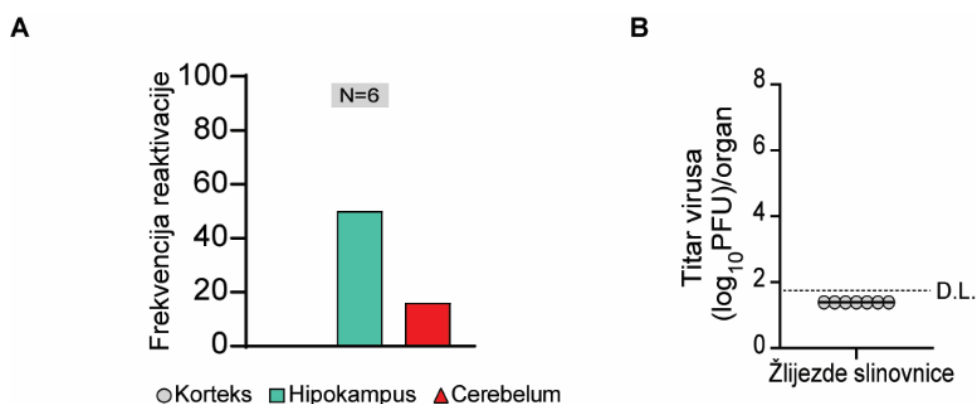
Kako bismo odredili u kojim stanicama se potencijalno nalazi latentni MCMV, inficirali smo novookočene mišve R26^{tdTomato} virusom MCMV-GFP_Cre i analizirali ispoljavanje reporterskog

proteina tdTomato u mozgu latentno inficiranih miševa konfokalnom mikroskopijom. 3D „z-stack“ analize konfokalnom mikroskopijom su pokazale da populacija koja ispoljava reporterski protein tdTomato morfološki odgovara neuronima (**Slika 28A**). Imunohistološkom analizom ispoljavanja reporterskoga proteina tdTomato i stanično specifičnih markera potvrdili smo da se reporterski protein tdTomato ispoljava isključivo u neuronima, ali ne u astrocitima ili mikroglijiji (**Slika 28B**), što ukazuje da MCMV potencijalno uspostavlja latentnu infekciju u neuronima. Budući da mikroskopskom analizom nismo identificirali astrocite ili mikroglijiju koji ispoljavaju reporeterski protein tdTomato sortirali smo astrocite i mikroglijiju i proveli analizu prisutnosti genoma MCMV-a pomoću qPCR-a. Kao pozitivnu kontrolu, sortirali smo mezenhimalne stanice crvene pulpe iz slezene (engl. *Red pulp mesenchymal cells*, RPMC), za koje prethodno utvrđeno da nose latentni MCMV [168]. U sortiranim astrocitima i mikroglijiji nismo mogli detektirati genome MCMV-a, što potvrđuje zaključak dobiven histološkom analizom koja je pokazala da astroцитi i mikroglijija ne sadrže latentni MCMV (**Slika 28C**).



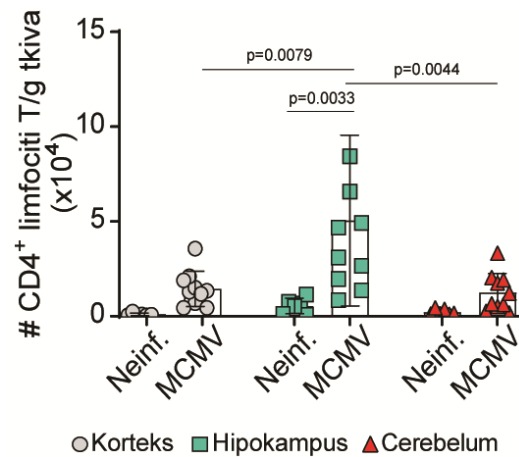
Slika 28. Neuronima su mjesta latentne infekcije MCMV-om. A-B) Novookoćeni miševi R26^{tdTomato} inficirani su s 1000 PFU MCMV-GFP-Cre i.p. 24-36 h nakon okota. **A)** Miševi su žrtvovani 45 dana nakon infekcije (dni), prikupljeni su mozgovi te je na smrznutim rezovima tkiva provedena analiza konfokalnom mikroskopijom. Prikazan je reprezentativni presjek mozga (uvelanje 10x) koji sadrži tdTomato-pozitivne stanice (lijevo) i reprezentativna 63x uvelana tdTomato-pozitivna stanica (desno). **B)** Kvantifikacija tipova stanica koji ispoljavaju reporterski protein tdTomato 45 dni (n=5 miševa, 5 rezova tkiva/mišu). **C)** Novookoćeni miševi soja C57BL/6 inficirani su s 200 PFU MCMV-a i.p. 24-36 h nakon okota. Mikroglijija, astroцити i mezenhimalne stanice crvene pulpe iz slezene (RPMC) sortirani su protočnom citometrijom 90 dni. DNA je izolirana iz sortiranih stanica i provedena je analiza qPCR-om kako bi se odredio broj kopija genoma MCMV-a po 10⁵ sortiranih stanica; Neinf. – Neinficirani miševi. Svaki uzorak predstavlja 4-5 grupiranih miševa (n=2-6, N=3). Horizontalne linije označavaju srednje vrijednosti s standardnim devijacijama.

U prethodnim rezultatima pokazali smo da je hipokampus dominantno mjesto latencije MCMV-a u mozgu. Kako bismo testirali reaktivaciju MCMV-a u hipokampusu i drugim regijama mozga izolirali smo različite regije mozga iz latentno inficiranih miševa i uzgajali ih kao *ex vivo* eksplantate u periodu od 6 tjedana. U skladu s raznim latentnih virusnih genoma (**Slika 7B**), hipokampus je bio glavno mjesto reaktivacije MCMV-a u tkivnim eksplantantima (**Slika 29A**). Kako bismo isključili mogućnost da nije bilo aktivne replikacije virusa u miševa iz kojih smo prikupili mozgove prikupili smo i žlijezde slinovnice te pomoću testa virusnih čistina potvrdili da nije prisutan infektivni virus (**Slika 29B**).



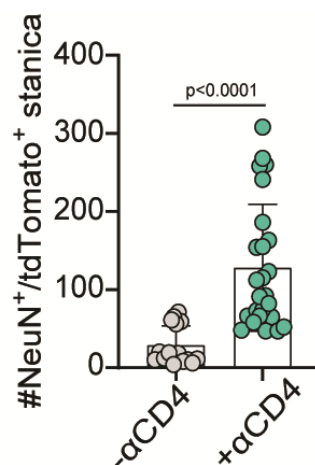
Slika 29. Reaktivacija MCMV-a *ex vivo* iz tkivnih eksplantata. A-B) Novookočeni miševi soja C57BL/6 inficirani su s 200 PFU MCMV-a i.p. 24-36 h nakon okota. **A)** Miševi su žrtvovani 180 dana nakon infekcije (dni), prikupljeni su mozgovi, regije mozga izolirane i uzgajane *ex vivo* 6 tjedana. Testom reaktivacije MCMV-a određena je učestalost reaktivacije u naznačenim regijama mozga (n=6 miševa). **B)** Titar virusa u žlijezdama slinovnicama određen je testom virusnih čistina 180 dni. Prikazani su rezultati za pojedinačne miševe (krugovi) i vrijednosti medijana (linije); isprekidanom linijom označena je granica detekcije virusa (DL).

Pokazali smo da su CD4⁺ limfociti T ključni za nadzor produktivne infekcije MCMV-om u mozgu (**Slika 15**). Kako bismo analizirali distribuciju CD4⁺ limfocita T u latentno inficiranim regijama mozga, proveli smo analizu protočnom citometrijom. Među analiziranim regijama, hipokampus je sadržavao najveću frekvenciju CD4⁺ limfocita T po gramu tkiva (**Slika 30**), što je u korelaciji s brojem latentnih genoma (**Slika 7**) i potencijalom reaktivacije virusa (**Slika 29**).



Slika 30. CD4⁺ limfociti T su prisutni u hipokampusu latentno inficiranih životinja. Novookočeni miševi soja C57BL/6 inficirani su s 200 PFU MCMV-a i.p. 24-36 h nakon okota. Broj CD4⁺ limfocita T po gramu tkiva određen je protočnom citometrijom 180 dana nakon infekcije (n=6-10). Prikazani su rezultati za pojedinačne miševe (kružići, kvadrati i trokuti) i medijan vrijednosti (linije). Statistički značajne razlike određene su jednosmjernim ANOVA testom praćenim Tukey-evim testom višestruke usporedbe; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

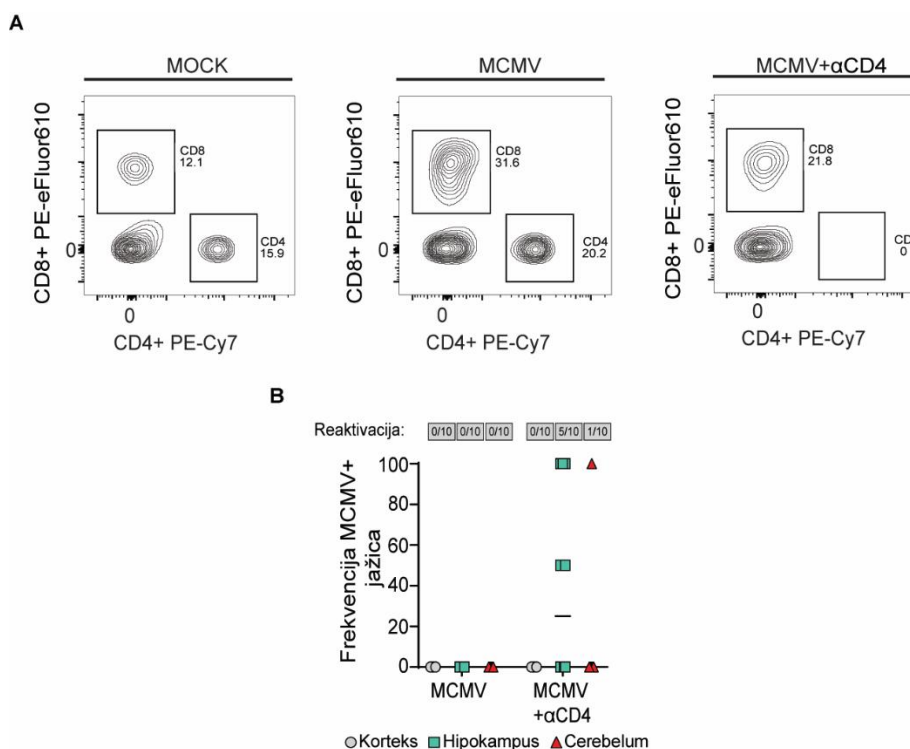
Kako bismo ispitali ulogu CD4⁺ limfocita T u nadzoru latentne infekcije MCMV-om u neuronima, uklonili smo CD4⁺ limfocite T miševima R26^{tdTomato} koji su latentno inficirani virusom MCMV-GFP_Cre. Histološke analize pokazale su da je smanjenje broja CD4⁺ limfocita T rezultiralo značajnim povećanjem broja neurona koji ispoljavaju reporterski protein tdTomato, što ukazuje na reaktivaciju i daljnje širenje virusa među neuronima uslijed gubitka imunološkog nadzora posredovanog CD4⁺ limfocitima T (Slika 31).



Slika 31. Reaktivacija i širenje MCMV-a uslijed gubitka imunološke nadzor u mozgu. Novookočeni R26^{tdTomato} miševi inficirani su s 1000 PFU MCMV-GFP-Cre i.p. 24-36 h nakon okota. Jednoj grupi miševa uklonjeni su CD4⁺ limfociti T počevši 90. dan nakon infekcije kroz period od mjesec dana. Po završenom uklanjanju, miševi su žrtvovani

i prikupljeni su mozgovi te je na smrznutim rezovima tkiva provedena analiza konfokalnom mikroskopijom. Prikazana je kvantifikacija stanica koje istovremeno ispoljavaju marker neurona NeuN i reporterskog proteina tdTomato (n=3-5 miševa, 5 rezova tkiva/mišu). Korišten je dvostrani Studentov t-test za nezavisne uzorke; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

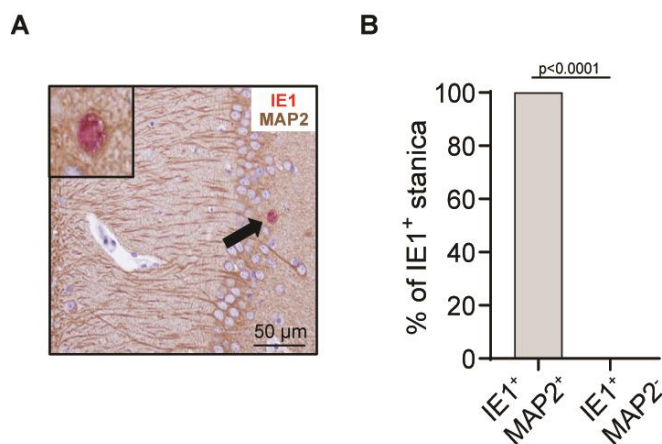
Nadalje, kako bismo odredili učinkovitost reaktivacije MCMV-a iz specifičnih regija mozga uslijed gubitka imunološkog nadzora u latenciji uklonili smo CD4⁺ limfocite T u miševa soja C57BL/6 latentno inficiranih divljim tipom virusa MCMV-a, te izolirali regije mozga i odredili broj infektivnih virusnih čestica. Učinkovitost uklanjanja CD4⁺ limfocita T u mozgu potvrđena je protočnom citometrijom (**Slika 32A**). U kontrolnoj skupini miševa kojima nismo uklonili CD4⁺ limfocite T nismo detektirali reaktivaciju virusa. Među miševima kojima su uklonjeni CD4⁺ limfociti T najveća frekvencija reaktivacije MCMV-a primijećena je u hipokampusu, što sugerira da je hipokampus primarno mjesto reaktivacije MCMV-a uslijed gubitka imunološkog nadzora posredovanog CD4⁺ limfocitima T (**Slika 32B**).



Slika 32. Hipokampus je glavno mjesto reaktivacije MCMV-a uslijed gubitka imunološkog nadzora. A-B) Novookočeni miševi soja C57BL/6 inficirani su s 200 PFU MCMV-a i.p. 24-36 h nakon okota. Jednoj grupi miševa uklonjeni su CD4⁺ limfociti T počevši 90. dan nakon infekcije kroz period od mjesec dana. **A)** Učinkovitost uklanjanja CD4⁺ limfocita T u mozgu analizirana je protočnom citometrijom. Prikazani su reprezentativni histogrami. **B)** Regije mozga su odvojene i određena je učestalost reaktivacije u naznačenim regijama mozga. Prikazani su rezultati za

pojedinačne miševe (krugovi, kvadrati i trokuti). Broj miševa u kojima je detektiran reaktivirani virus naveden je iznad grafa.

Kako bi potvrdili da dolazi do reaktivacije virusa u neuronima prilikom narušavanja imunološkog nadzora, miševima soja C57BL/6 uklonili smo $CD4^{+}$ limfocite T kroz period od mjesec dana te smo proveli histološku analizu. Do reaktivacije virusa došlo je specifično u neuronima nakon narušavanja imunološkog nadzora posredovanog $CD4^{+}$ limfocitima T, te nismo opazili prisutnost virusnog antigena IE1 u drugim stanicama mozga (**Slika 33A i B**).



Slika 33. Reaktivacija MCMV-a u neuronima uslijed gubitka imunološkog nadzora. A-B) Novookočeni miševi soja C57BL/6 inficirani su i.p. s 200 PFU MCMV-a 24-36 h nakon okota. Miševima su uklonjeni $CD4^{+}$ limfociti T počevši 90. dan nakon infekcije kroz period od mjesec dana. Na rezovima tkiva provedeno je dvostruko imunohistokemijsko bojanje ($n=5$ miševa, 10 rezova tkiva/mišu). Za detekciju neurona korišteno je protutijelo MAP2 (citoplazma obojena smeđe), a za vizualizaciju infekcije MCMV-om protutijelo IE1 (crveno jezgreno bojanje). **A)** Prikazana je reprezentativna slika neurona inficiranog MCMV-om u hipokampusu (40x povećanje, umetak 100x povećanje). **B)** Prikazana je kvantifikacija IE1⁺ MAP2⁺ neurona ($n=6$ miševa, 10 rezova tkiva/mišu). Statistički značajne razlike određene su jednosmjernim ANOVA testom praćenim Tukey-evim testom višestruke usporedbe; p vrijednosti ukazuju na značajne razlike.

Ovi rezultati ukazuju da su neuroni mjesta latencije MCMV-a u mozgu i da je imunološki nadzor posredovan $CD4^{+}$ limfocitima T potreban za sprječavanje reaktivacije.

5. DISKUSIJA

Prirođena infekcija HCMV-om je najučestalija prirođena infekcija u razvijenom svijetu [31]. Nema odobrenog cjepiva protiv HCMV-a, dok se postojeći antivirusni lijekovi rijetko koriste u liječenju prirođene infekcije tijekom trudnoće zbog toksičnosti [81]. Stoga je nužno provoditi istraživanja s ciljem boljeg razumijevanja patogeneze ove bolesti. U ovom smo radu istražili diseminaciju MCMV-a, imunološke mehanizme koji razrješuju produktivnu i nadziru latentnu infekciju, te stanična mjesta latencije MCMV-a u mozgu u eksperimentalnom mišjem modelu cHCMV infekcije.

U inficiranih fetusa najveće razine HCMV-a nađene su u hipokampusu [103]. Najviše razine virusa u hipokampusu su zabilježene i u modelu prirođene GPCMV infekcije [183]. Naši rezultati također pokazuju kako je hipokampus glavna meta infekcije MCMV-om u mozgu. Međutim, iz kojeg razloga CMV-i preferencijalno inficiraju hipokampus trenutno nije jasno. Prethodno je pokazano da postoje značajne varijacije u osjetljivosti regija mozga na različite neurotropne viruse [184]. Preferencijalna infekcija hipokampusa je također zabilježena kod infekcija s drugim neurotrofnim virusima, uključujući DNA (npr. drugi herpesvirusi) i RNA (npr. flavivirus) viruse [185–187]. Pretpostavlja se da je osjetljivost hipokampusa na infekciju virusom HSV-1 povezana s ispoljavanjem virusnih receptora, niskim razinama protuvirusnih citokina i prisustvom neurogenih niša u dentatnom girusu hipokampusa [188]. Nadalje, populacije neurona razlikuju se između različitih regija mozga, što može utjecati na njihovu podložnost na virusne infekcije [189–191]. Također, mikroglija se značajno razlikuje između pojedinih regija mozga, što bi moglo imati važnu ulogu u protuvirusnom odgovoru [192]. Na kraju, krvno-moždana barijera hipokampusa osjetljivija je na oštećenja u odnosu na ostale regije mozga, što potencijalno omogućuje učinkovitiju infiltraciju virusa [193].

Kao i HCMV [80], MCMV ima širok stanični tropizam u mozgu. Praćenjem diseminacije MCMV-a u akutno inficiranom mozgu pokazali smo kako su astrociti inicijalne mete infekcije i značajan izvor infektivnog virusa. Astrociti su česte mete neurotrofnih virusa, uključujući infekciju HCMV-om, zbog svog anatomskeg položaja i morfoloških svojstva koja podržavaju produktivnu virusnu infekciju [95,194]. Mikroglija je također inficirana MCMV-om. Međutim pokazali smo kako se virus iz mikroglije ne širi efikasno na druge stanice, što ukazuje na učinkovit mehanizam zadržavanja virusa od strane mikroglije. Naše opažanje je u skladu sa podacima o

infekcijama drugih tkivno-rezidentnih makrofaga, koji su često inficirani CMV-om, ali nisu glavni proizvođači virusa [195,196]. Primjerice, MCMV inficira makrofage supkapsularnih sinusa u limfnim čvorovima, koji ograničavaju širenje virusa i time štite druge stanice od infekcije [195], pri čemu ključnu ulogu imaju interferoni tipa I (IFN I) [197]. Točan mehanizam kojim mikroglija sprječava širenje virusa trenutno nije jasan, međutim, i u ovom slučaju IFN I bi mogli imati ključnu ulogu, s obzirom da mikroglija ispoljava receptor za IFN I te može producirati IFN I [198]. U kasnijim vremenskim točkama akutne infekcije MCMV-om, neuroni postaju glavni izvor infektivnog virusa, što ukazuje na sporiji imunološki nadzor virusa u neuronima. Iako se dugo smatralo da su neuroni imunološki inertne stanice, istraživanja posljednjih godina ukazuju da neuroni zapravo posjeduju mnoštvo imunoloških funkcija kao što je produkcija kemokina koji novače zaštitne leukocyte u SŽS, proizvode IFN I i ispoljavaju molekule MHC-I [199–202]. Povećana osjetljivost neurona na virusne infekcije pripisuje se, između ostalog, niskom bazalnom ispoljavanju molekula MHC-I i visokim ispoljavanjem liganda programirane stanične smrti 1 (engl. *Programmed death-ligand 1*, PD-L1) koji može prigušiti odgovor limfocita T [203,204], te niskim bazalnim razinama transkripcijskog faktora STAT1/2 koje slabe odgovor neurona na IFN I i IFN- γ [205,206].

U većini virusnih infekcija SŽS-a, CD8⁺ limfociti T pokazali su se ključnima za nadzor virusa [171]. Naši rezultati pokazuju da su CD4⁺ limfociti T potrebni za razrješenje produktivne infekcije MCMV-om u mozgu. CD8⁺ limfociti T imaju ključnu ulogu u zaštiti od MCMV-a u većini perifernih organa osim u žlijezdama slinovnicama, gdje virus nadziru CD4⁺ limfociti T [177]. Osim toga, u odraslih miševa kojima su uklonjeni CD8⁺ limfociti T, CD4⁺ limfociti T pružaju kompenzacijsku zaštitu od infekcije MCMV-om [207]. U slučajevima cHCMV infekcije, histopatološkim analizama je pokazano da limfociti T infiltriraju u inficirani fetalni mozak [123,208]. U jednom istraživanju je pokazano da postoji korelacija između broja CD8⁺ limfocita T u mozgu sa težinom bolesti [208]. Nasuprot tome, slučajevi cHCMV-a sa težim posljedicama pri rođenju imaju znatno niži broj CD4⁺ limfocita T [209]. Za razliku od inficiranih odraslih osoba, dojenčad s cHCMV-om ima dugotrajno oslabljen odgovor CD4⁺ limfocita T, dok odgovor CD8⁺ limfocita T nije promijenjen, što ukazuje na važnost imunološkog odgovora posredovanog CD4⁺ limfocitima T na infekciju HCMV-om u ranoj fazi života [210,211]. Iako su točni mehanizmi oslabljenog odgovora posredovanog limfocitima T nepoznati, pojačan izražaj inhibicijskih receptora kao što je PrP mogu utjecati na neonatalni odgovor limfocita T tijekom infekcije

MCMV-om [158]. U odraslih bolesnika inficiranih istovremeno virusom humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*, HIV) i HCMV-om, infekcije mozga HCMV-om česte su kada je broj CD4⁺ limfocita T izrazito nizak [212,213]. Zaštitna uloga CD4⁺ limfocita T opažena je i u drugim animalnim modelima prirođene infekcije CMV-om, rezus makakima inficiranim RhCMV-om i zamorcima inficiranim GPCMV-om [214,215]. Dakle, važnost CD4⁺ limfocita T u prirođenoj infekciji CMV-om kod ljudi, primata i drugih glodavaca u skladu je s našim rezultatima dobivenim u mišjem modelu prirođene infekcije.

Pokazali smo da razrješenje produktivne infekcije MCMV-om u neuronima nije posredovano citolitičkim mehanizmima. Ovo nije iznenađujuće obzirom na to da citolitički mehanizmi mogu uzrokovati smrt neurona, stanica koje nemaju sposobnost samoobnavljanja [216]. Osim toga, virusi mogu spriječiti smrt inficiranih neurona ispoljavanjem proteina koji blokiraju aktivnost citolitičkih mehanizama [217]. Međutim, necitolitički mehanizmi sporije uklanjaju infekciju iz neurona [185]. Nasuprot tome, citolitički mehanizmi važniji su za uklanjanje virusnih infekcija iz gljiva stanica [185]. Pokazali smo da je efektorski citokin IFN- γ , a ne TNF- α , ključan u nadzoru akutne infekcije MCMV-om i uspostavljanju latencije virusa u neuronima. Sukladno tome, u inficiranom mozgu CD4⁺ limfociti T ispoljavaju stanične biljege tkivno-rezidentnih memorijskih limfocita T i poprimaju fenotip T_H1, odnosno ispoljavaju biljege CD11a, T-bet i CXCR3 [131]. Prethodna istraživanja pokazala su da je citokin IFN- γ također ključan u nadzoru drugih neurotropnih infekcija [218–222]. Tijekom infekcije virusom HSV-1, CD8⁺ limfociti T nadziru latenciju HSV-1 u trigeminalnim ganglijima tako što blokiraju reaktivaciju virusa lučenjem citokina IFN- γ [223]. CD4⁺ limfociti T nisu izravno uključeni u nadzor latencije HSV-1 u trigeminalnim ganglijima, već sudjeluju u ranoj aktivaciji CD8⁺ limfocita T kako bi se stvorila učinkovita lokalna populacija efektorskih CD8⁺ limfocita T [224]. Slično je uočeno tijekom neurotropne infekcije sojem JHM virusa mišjeg hepatitisa (engl. *JHM strain of mouse hepatitis virus*, JHMOV), pri čemu su CD4⁺ limfociti T bili potrebni za učinkovit protuvirusni odgovor CD8⁺ limfocita T u mozgu [225]. Međutim naši su rezultati pokazali da CD8⁺ limfociti T nisu bitni za nadzor infekcije MCMV-om u mozgu. To otkriće nalikuje mehanizmu nadzora infekcije MCMV-om u žlijezdama slinovnicama, gdje se razrješenje produktivne infekcije ne oslanja na CD8⁺ T-stanice, već je striktno vezano uz CD4⁺ limfocite T i citokin IFN- γ [226].

Kako bismo potvrdili važnost fenotipa T_H1 , pokazali smo da životinje kojima nedostaje receptor citokina IL-12 ne mogu nadzirati infekciju MCMV-om u neuronima. Dobro je poznato da citokin IL-12 pojačava proizvodnju citokina IFN- γ od strane limfocita T [227]. Kod infekcije virusom ospica (engl. *Measles virus*, MV), citokin IL-12 stimulira leukocite da razriješe virusnu infekciju u mozgu mehanizmom posredovanim citokinom IFN- γ [227]. U infekciji mozga JHNV-om nedostatak citokina IL-12 ne utječe na izravni nadzor virusa, već samo prigušuje imunološki odgovor posredovan $CD4^+$ i $CD8^+$ limfocitima T specifičnim za virus, koji ispoljavaju citokin IFN- γ [228]. Nadalje, neonatalne dendritične stanice izolirane iz pupkovine i inficirane *in vitro* HCMV-om proizvode niže razine citokina IL-12 u usporedbi s inficiranim odraslim dendritičnim stanicama, što potencijalno utječe na kvalitetu imunološkog odgovora limfocita T na infekcije HCMV-om u ranom životu [229]. Slično tome, monociti dojenčadi imunizirani protiv virusa ospica pokazuju znatno niže razine proizvodnje citokina IL-12 nakon stimulacije s antigenom u usporedbi s odraslima, što posljedično utječe na smanjenu proizvodnju citokina IFN- γ od strane limfocita T [230]. Ove studije sugeriraju da stanice koje proizvode citokin IL-12 u ranom životu imaju smanjenu sposobnost poticanja imunološkog odgovora u usporedbi s odraslima, što rezultira ograničenim adaptivnim imunološkim odgovorom i povećanom osjetljivošću na virusne infekcije u ranom životu.

Noviji modeli kortikalnih organoida koristili su se za izučavanje patogeneze HCMV-a [48–51]. Humane stanične linije i 3D kortikalni organoidi razvijeni iz humanih matičnih stanica ne oponašaju potpuno složenost ljudskog mozga, pogotovo jer im nedostaju relevantni tipovi imunoloških stanica kao što je mikroglija. Stoga, kako bismo povezali naše rezultate s prirođenom infekcijom HCMV-om, koristili smo se modelom organotipske kulture tkiva ljudskog fetalnog mozga [167]. Naši rezultati na modelu hfOBSC-a pokazali su da tretman rekombinantnim citokinom IFN- γ štiti ljudske neurone od infekcije HCMV-om, čime smo potvrdili da je IFN- γ ključan za nadzor infekcije ne samo u mišjim, već i u ljudskim neuronima.

Stanje latencije definira se kao prisutnost virusnih genoma bez proizvodnje novih infektivnih viriona [231]. Dok je ispoljavanje virusnih gena općenito utišano tijekom latencije, uočeno je da dolazi do stohastičkog ispoljavanja gena CMV-a tijekom latencije [14,232]. Herpesvirusi se mogu replicirati i uspostaviti latenciju u različitim tipovima stanica [233]. HCMV uspostavlja latenciju u hematopoetskim matičnim stanicama, mijeloidnim progenitorima i

monocitima, dok su monociti, endotelne stanice i fibroblasti mjesta latencije MCMV-a [125,168]. Važno je napomenuti da je pokazano da se genom HCMV-a može detektirati u više od 10 % mozgova zdravih odraslih osoba, što je više od očekivanog na temelju prevalencije cHCMV infekcije [234,235]. Za reaktivaciju HSV-1 u mozgu miša dovoljni su stresni događaji ili povišena tjelesna temperatura [130]. Za reaktivaciju MCMV-a u SŽS-u potrebno je uklanjanje CD4⁺ limfocita T [131]. Rezultati istraživanja u sklopu ovoga rada pokazuju da su neuroni glavno mjesto latencije MCMV-a u mozgu miša, iz kojeg se virus može reaktivirati nakon gubitka imunološkog nadzora posredovanog CD4⁺ limfocitima T. HCMV može inficirati neurone i neuralne matične i prekursorske stanice [80]. Zanimljivo je da HCMV uspostavlja neproduktivnu infekciju u neuralnim matičnim stanicama *in vitro*, iz kojih se virus reaktivira nakon potpune diferencijacije u zrele neurone [126], što je u skladu s našim podacima o sposobnosti CMV-a da se reaktivira u neuronima. Točan mehanizam kojim CD4⁺ limfociti T nadziru i sprječavaju reaktivaciju MCMV-a ostaje nepoznat. Neuroni ne ispoljavaju molekule MHC-II, što ih sprječava da izravno aktiviraju CD4⁺ limfocite T na antigen-specifičan način [236]. Stoga, CD4⁺ limfociti T bi mogli nadzirati reaktivaciju MCMV-a u neuronima preko posredničkih stanica, kao što je mikroglija koja ispoljava molekule MHC-II i može prezentirati antigene CD4⁺ limfocitima T [171]. U primjeru infekcije virusom vezikularnog stomatitisa (engl. *Vesicular stomatitis virus*, VSV) neinficirana mikroglija prezentira antigene stečene iz susjednih inficiranih neurona CD8⁺ limfocitima T kako bi se osigurao nadzor VSV-a u neuronima [237]. Moguće je da takav mehanizam doprinosi i nadzoru infekcije MCMV-om u neuronima. Također, izravna interakcija između CD4⁺ limfocita T i neurona neovisana o TCR-u [238], bi također mogla predstavljati jedan od potencijalnih mehanizma.

Iako animalni modeli nude vrijedne uvide u patogenezu virusnih infekcija, oni također imaju brojna ograničenja. CMV-i i njihovi domaćini evoluirali su zajedno, što je dovelo do razvoja jedinstvenih virusnih gena i stroge specifičnosti za vrstu, ali i do nekih razlika u patogenezi [47]. Međutim, nedostatak neinvazivnih tehnika za izravno izučavanje patogeneze HCMV-a u ljudskom mozgu u razvoju predstavlja znatnu prepreku, koja zahtijeva oslanjanje na životinjske modele. Stoga smo u ovome radu koristili dobro karakterizirani mišji model prirodene CMV infekcije koji oponaša brojne aspekte patofiziologije prirodene infekcije HCMV-om. Naši rezultati pokazuju da infekcija neonatalnih miševa MCMV-om blisko oponaša infekciju HCMV-om kod ljudi, budući da oba virusa imaju podjednak stanični tropizam i sklonost inficiranju hipokampusa. Unatoč

ograničenim dokazima koji ukazuju na prisutnost HCMV-a u mozgovima odraslih osoba, potrebna su daljnja istraživanja potencijalne latencije HCMV-a u ljudskim neuronima kako bi se potvrdila podudarnost naših rezultata sa infekcijom HCMV-om. Primjerice, postmortem analize mozgova pojedinaca sa poviješću prirodene infekcije HCMV-om mogla bi pružiti ključne uvide u mehanizme latencije HCMV-a u ljudskom mozgu.

HCMV ostaje značajan klinički problem s obzirom na to da ne postoji odobreno cjepivo protiv HCMV-a, te je farmakoterapija tijekom trudnoće ograničena zbog toksičnosti i teratogenosti antivirusnih terapija [38]. Nove studije povezuju HCMV s pogoršanjem kognitivnog i neuropsihijatrijskog zdravlja, te je HCMV prisutan u multiformnim glioblastomima [43,133]. Ovo istraživanje pruža nove uvide u interakcije između virusa i domaćina uključene u nadzor infekcije CMV-om u mozgu, te sugerira da bi iskorištavanje imunološkog odgovora posredovanog CD4⁺ limfocitima T moglo biti korisno u sprječavanju neuroloških komplikacija povezanih s CMV-om.

6. ZAKLJUČCI

- Hipokampus je glavna regija produktivne i latentne infekcije MCMV-om
- MCMV inficira astrocite, mikrogliju i neurone u mozgu novookočenih miševa
- Astrociti, mikroglija i neuroni imaju sposobnost proizvodnje infektivnog MCMV-a
- Astrociti i mikroglija su izvor infektivnog virusa u ranoj fazi infekcije, dok su neuroni izvor infektivnog virusa u kasnoj fazi infekcije
- $CD4^+$ limfociti T, a ne $CD8^+$ limfociti T, su esencijalni za razrješenje produktivne infekcije i uspostavljanje latencije MCMV-a u neuronima korteksa i hipokampusa
- Razrješenje produktivne infekcije MCMV-om u mozgu posredovano je efektorskim citokinom IFN- γ
- IFN- γ sprečava infekciju humanih neurona HCMV-om
- MCMV je latentan u neuronima, te se može reaktivirati uslijed gubitka $CD4^+$ limfocita T

7. LITERATURA

1. Fowler, K.; Mucha, J.; Neumann, M.; Lewandowski, W.; Kaczanowska, M.; Grys, M.; Schmidt, E.; Natenshon, A.; Talarico, C.; Buck, P. O.; Diaz-Decaro, J. A Systematic Literature Review of the Global Seroprevalence of Cytomegalovirus: Possible Implications for Treatment, Screening, and Vaccine Development. *BMC Public Health* **2022**, *22*, 1659.
2. Murphy, E.; Shenk, T. E. Human Cytomegalovirus Genome. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg 2008, pp 1–19.
3. Stinski, M. F. Sequence of Protein Synthesis in Cells Infected by Human Cytomegalovirus: Early and Late Virus-Induced Polypeptides. *J. Virol.* **1978**, *26*, 686–701.
4. Griffiths, P.; Baraniak, I.; Reeves, M. The Pathogenesis of Human Cytomegalovirus. *J. Pathol.* **2015**, *235*, 288–297.
5. Gandhi, M. K.; Khanna, R. Human Cytomegalovirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Treatments. *Lancet Infect. Dis.* **2004**, *4*, 725–738.
6. Boppana, S. B.; Britt, W. J. Synopsis of Clinical Aspects of Human Cytomegalovirus Disease. In *Cytomegaloviruses From Molecular Pathogenesis to Intervention*; Norfolk: Caister Academic Press, 2013; pp 1–26.
7. Boeckh, M.; Geballe, A. P. Cytomegalovirus: Pathogen, Paradigm, and Puzzle. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 1673–1680.
8. Sinzger, C.; Digel, M.; Jahn, G. Cytomegalovirus Cell Tropism. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2008**, *325*, 63–83.
9. Jackson, J. W.; Sparer, T. There Is Always Another Way! Cytomegalovirus' Multifaceted Dissemination Schemes. *Viruses* **2018**, *10*.
10. Nguyen, C. C.; Kamil, J. P. Pathogen at the Gates: Human Cytomegalovirus Entry and Cell Tropism. *Viruses* **2018**, *10*.
11. Connolly, S. A.; Jardetzky, T. S.; Longnecker, R. The Structural Basis of Herpesvirus

- Entry. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 110–121.
12. Zhou, M.; Lanchy, J.-M.; Ryckman, B. J. Human Cytomegalovirus GH/GL/GO Promotes the Fusion Step of Entry into All Cell Types, Whereas GH/GL/UL128-131 Broadens Virus Tropism through a Distinct Mechanism. *J. Virol.* **2015**, *89*, 8999–9009.
 13. Goodrum, F. Human Cytomegalovirus Latency: Approaching the Gordian Knot. *Annu. Rev. Virol.* **2016**, *3*, 333–357.
 14. Schwartz, M.; Stern-Ginossar, N. Rethinking Human Cytomegalovirus Latency Reservoir. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2023**, *1524*, 30–36.
 15. Dupont, L.; Reeves, M. B. Cytomegalovirus Latency and Reactivation: Recent Insights into an Age Old Problem Introduction: The Opportunistic Pathogen. *Rev. Med. Virol.* **2017**, *26*, 75–89.
 16. Forte, E.; Zhang, Z.; Thorp, E. B.; Hummel, M. Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*.
 17. Collins-McMillen, D.; Buehler, J.; Peppenelli, M.; Goodrum, F. Molecular Determinants and the Regulation of Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation. *Viruses* **2018**, *10*, 1–27.
 18. Bloom, D. C.; Giordani, N. V.; Kwiatkowski, D. L. Epigenetic Regulation of Latent HSV-1 Gene Expression. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **2010**, *1799*, 246–256.
 19. Umbach, J. L.; Kramer, M. F.; Jurak, I.; Karnowski, H. W.; Coen, D. M.; Cullen, B. R. MicroRNAs Expressed by Herpes Simplex Virus 1 during Latent Infection Regulate Viral MRNAs. *Nature* **2008**, *454*, 780–783.
 20. Shnayder, M.; Nachshon, A.; Krishna, B.; Poole, E.; Boshkov, A.; Binyamin, A.; Maza, I.; Sinclair, J.; Schwartz, M.; Stern-Ginossar, N. Defining the Transcriptional Landscape during Cytomegalovirus Latency with Single-Cell RNA Sequencing. *MBio* **2018**, *9*.
 21. Cheng, S.; Caviness, K.; Buehler, J.; Smithey, M.; Nikolich-Žugich, J.; Goodrum, F. Transcriptome-Wide Characterization of Human Cytomegalovirus in Natural Infection

- and Experimental Latency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, E10586–E10595.
22. Capendale, P. E.; Wolthers, K. C.; Pajkrt, D. What Is a Neurotropic Virus: Discrepancies in Terminology between Clinical and Basic Science. *Med* **2023**, *4*, 660–663.
 23. Swanson, P. A.; McGavern, D. B. Viral Diseases of the Central Nervous System. *Curr. Opin. Virol.* **2015**, *11*, 44–54.
 24. Al-Haddad, B. J. S.; Oler, E.; Armistead, B.; Elsayed, N. A.; Weinberger, D. R.; Bernier, R.; Burd, I.; Kapur, R.; Jacobsson, B.; Wang, C.; Mysorekar, I.; Rajagopal, L.; Adams Waldorf, K. M. The Fetal Origins of Mental Illness. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2019**, *221*, 549–562.
 25. Matteoli, M.; Pozzi, D.; Fossati, M.; Menna, E. Immune Synaptopathies: How Maternal Immune Activation Impacts Synaptic Function during Development. *EMBO J.* **2023**, *42*, e113796.
 26. Piacentini, R.; De Chiara, G.; Li Puma, D. D.; Ripoli, C.; Marcocci, M. E.; Garaci, E.; Palamara, A. T.; Grassi, C. HSV-1 and Alzheimer’s Disease: More than a Hypothesis. *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*, 97.
 27. Soldan, S. S.; Lieberman, P. M. Epstein-Barr Virus and Multiple Sclerosis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2023**, *21*, 51–64.
 28. Schleiss, M. R. Cytomegalovirus Vaccine Development and Target Population Congenital HCMV Infection : A Major Public Health Problem The Problem of Congenital HCMV Infection Is Unquestionably the Major Driving. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2008**, *325*, 361–382.
 29. Cannon, M. J.; Grosse, S. D.; Fowler, K. B. The Epidemiology and Public Health Impact of Congenital Cytomegalovirus Infection. In *Cytomegaloviruses From Molecular Pathogenesis to Intervention*; Norfolk: Caister Academic Press, 2013; pp 26–43.
 30. Adler, S. P.; Nigro, G. Clinical Cytomegalovirus Research: Congenital Infection. In *Cytomegaloviruses From Molecular Pathogenesis to Intervention*; Norfolk: Caister Academic Press, 2013; pp 55–73.

31. Cannon, M. J. Congenital Cytomegalovirus (CMV) Epidemiology and Awareness. *J. Clin. Virol.* **2009**, *46*, 6–10.
32. Cannon, M. J.; Davis, K. F. Washing Our Hands of the Congenital Cytomegalovirus Disease Epidemic. *BMC Public Health* **2005**, *5*, 70.
33. Cannon, M. J.; Hyde, T. B.; Schmid, D. S. Review of Cytomegalovirus Shedding in Bodily Fluids and Relevance to Congenital Cytomegalovirus Infection. *Rev. Med. Virol.* **2011**, *21*, 240–255.
34. Pereira, L.; Tabata, T.; Petitt, M.; Fang-Hoover, J. Cytomegalovirus Replication in the Developing Human Placenta. In *Cytomegaloviruses From Molecular Pathogenesis to Intervention*; Norfolk: Caister Academic Press, 2013; pp 74–87.
35. Gabrielli, L.; Bonasoni, M. P.; Santini, D.; Piccirilli, G.; Chiereghin, A.; Petrisli, E.; Dolcetti, R.; Guerra, B.; Piccioli, M.; Lanari, M.; Landini, M. P.; Lazzarotto, T. Congenital Cytomegalovirus Infection: Patterns of Fetal Brain Damage. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 1–9.
36. Britt, W. J. Maternal Immunity and the Natural History of Congenital Human Cytomegalovirus Infection. *Viruses* **2018**, *10*, 405.
37. Semmes, E. C.; Miller, I. G.; Wimberly, C. E.; Phan, C. T.; Jenks, J. A.; Harnois, M. J.; Berendam, S. J.; Webster, H.; Hurst, J. H.; Kurtzberg, J.; Fouda, G. G.; Walsh, K. M.; Permar, S. R. Maternal Fc-Mediated Non-Neutralizing Antibody Responses Correlate with Protection against Congenital Human Cytomegalovirus Infection. *J. Clin. Invest.* **2022**, *132*.
38. Leruez-Ville, M.; Foulon, I.; Pass, R.; Ville, Y. Cytomegalovirus Infection during Pregnancy: State of the Science. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2020**, *223*, 330–349.
39. Zavattoni, M.; Rustico, M.; Tassis, B.; Lombardi, G.; Furione, M.; Piralla, A.; Baldanti, F. Risk of Congenital Disease in 46 Infected Fetuses According to Gestational Age of Primary Human Cytomegalovirus Infection in the Mother. *J. Med. Virol.* **2016**, *88*, 120–126.
40. Rechavi, E.; Somech, R. Maturation of the Immune System in the Fetus and the

- Implications for Congenital CMV. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2019**, *60*, 35–41.
41. Boppana, S. B.; Fowler, K. B.; Pass, R. F.; Rivera, L. B.; Bradford, R. D.; Lakeman, F. D.; Britt, W. J. Congenital Cytomegalovirus Infection: Association between Virus Burden in Infancy and Hearing Loss. *J. Pediatr.* **2005**, *146*, 817–823.
 42. Britt, W. Manifestations of Human Cytomegalovirus Infection: Proposed Mechanisms of Acute and Chronic Disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2008**, *325*, 417–470.
 43. Gale, S. D.; Farrer, T. J.; Erbstoesser, R.; MacLean, S.; Hedges, D. W. Human Cytomegalovirus Infection and Neurocognitive and Neuropsychiatric Health. *Pathog. (Basel, Switzerland)* **2024**, *13*.
 44. Krause, P. R.; Bialek, S. R.; Boppana, S. B.; Griffiths, P. D.; Laughlin, C. A.; Ljungman, P.; Mocarski, E. S.; Pass, R. F.; Read, J. S.; Schleiss, M. R.; Plotkin, S. A. Priorities for CMV Vaccine Development. *Vaccine* **2013**, *32*, 4–10.
 45. Nigro, G.; Adler, S. P.; La Torre, R.; Best, A. M. Passive Immunization during Pregnancy for Congenital Cytomegalovirus Infection. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 1350–1362.
 46. Revello, M. G.; Lazzarotto, T.; Guerra, B.; Spinillo, A.; Ferrazzi, E.; Kustermann, A.; Guaschino, S.; Vergani, P.; Todros, T.; Frusca, T.; Arossa, A.; Furione, M.; Rognoni, V.; Rizzo, N.; Gabrielli, L.; Klersy, C.; Gerna, G. A Randomized Trial of Hyperimmune Globulin to Prevent Congenital Cytomegalovirus. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 1316–1326.
 47. Reddehase, M.; Lemmermann, N. Mouse Model of Cytomegalovirus Disease and Immunotherapy in the Immunocompromised Host: Predictions for Medical Translation That Survived the “Test of Time.” *Viruses* **2018**, *10*, 693.
 48. Egilmezer, E.; Hamilton, S. T.; Foster, C. S. P.; Marschall, M.; Rawlinson, W. D. Human Cytomegalovirus (CMV) Dysregulates Neurodevelopmental Pathways in Cerebral Organoids. *Commun. Biol.* **2024**, *7*, 340.
 49. Sison, S. L.; O’Brien, B. S.; Johnson, A. J.; Seminary, E. R.; Terhune, S. S.; Ebert, A. D. Human Cytomegalovirus Disruption of Calcium Signaling in Neural Progenitor Cells and Organoids. *J. Virol.* **2019**, 93.

50. O'Brien, B. S.; Mokry, R. L.; Schumacher, M. L.; Pulakanti, K.; Rao, S.; Terhune, S. S.; Ebert, A. D. Downregulation of Neurodevelopmental Gene Expression in iPSC-Derived Cerebral Organoids upon Infection by Human Cytomegalovirus. *iScience* **2022**, 25, 104098.
51. Sun, G.; Chiuppesi, F.; Chen, X.; Wang, C.; Tian, E.; Nguyen, J.; Kha, M.; Trinh, D.; Zhang, H.; Marchetto, M. C.; Song, H.; Ming, G.-L.; Gage, F. H.; Diamond, D. J.; Wussow, F.; Shi, Y. Modeling Human Cytomegalovirus-Induced Microcephaly in Human iPSC-Derived Brain Organoids. *Cell reports. Med.* **2020**, 1, 100002.
52. Andrews, M. G.; Kriegstein, A. R. Challenges of Organoid Research. *Annu. Rev. Neurosci.* **2022**, 45, 23–39.
53. Brizić, I.; Lisnić, B.; Krstanović, F.; Brune, W.; Hengel, H.; Jonjić, S. Mouse Models for Cytomegalovirus Infections in Newborns and Adults. *Curr. Protoc.* **2022**, 2, 1–23.
54. Schleiss, M. R.; McVoy, M. A. Guinea Pig Cytomegalovirus: A Model for the Prevention and Treatment of Maternal–Fetal Cytomegalovirus Transmission. *Future Virol.* **2010**, 5, 207–217.
55. Yue, Y.; Barry, P. A. Rhesus Cytomegalovirus. In *Advances in Virus Research*; Academic Press, 2008; Vol. 72, pp 207–226.
56. Powers, C.; Früh, K. Rhesus CMV: An Emerging Animal Model for Human CMV. *Med. Microbiol. Immunol.* **2008**, 197, 109–115.
57. Griffith, B. P.; Lucia, H. L.; Hsiung, G. D. Brain and Visceral Involvement during Congenital Cytomegalovirus Infection of Guinea Pigs. *Pediatr. Res.* **1982**, 16, 455–459.
58. Schleiss, M. R.; Lacayo, J. C.; Belkaid, Y.; McGregor, A.; Stroup, G.; Rayner, J.; Alterson, K.; Chulay, J. D.; Smith, J. F. Preconceptual Administration of an Alphavirus Replicon UL83 (Pp65 Homolog) Vaccine Induces Humoral and Cellular Immunity and Improves Pregnancy Outcome in the Guinea Pig Model of Congenital Cytomegalovirus Infection. *J. Infect. Dis.* **2007**, 195, 789–798.
59. Loh, H. S.; Mohd-Lila, M. A.; Abdul-Rahman, S. O.; Kiew, L. J. Pathogenesis and Vertical Transmission of a Transplacental Rat Cytomegalovirus. *Virol. J.* **2006**, 3, 42.

60. Koontz, T.; Bralic, M.; Tomac, J.; Pernjak-Pugel, E.; Bantug, G.; Jonjic, S.; Britt, W. J. Altered Development of the Brain after Focal Herpesvirus Infection of the Central Nervous System. *J. Exp. Med.* **2008**, *205*, 423–435.
61. Kosugi, I.; Kawasaki, H.; Arai, Y.; Tsutsui, Y. Innate Immune Responses to Cytomegalovirus Infection in the Developing Mouse Brain and Their Evasion by Virus-Infected Neurons. *Am. J. Pathol.* **2002**, *161*, 919–928.
62. Wu, C. A.; Paveglio, S. A.; Lingenheld, E. G.; Zhu, L.; Lefrancois, L.; Puddington, L. Transmission of Murine Cytomegalovirus in Breast Milk: A Model of Natural Infection in Neonates. *J. Virol.* **2011**, *85*, 5115–5124.
63. Ishiwata, M.; Baba, S.; Kawashima, M.; Kosugi, I.; Kawasaki, H.; Kaneta, M.; Tsuchida, T.; Kozuma, S.; Tsutsui, Y. Differential Expression of the Immediate-Early 2 and 3 Proteins in Developing Mouse Brains Infected with Murine Cytomegalovirus. *Arch. Virol.* **2006**, *151*, 2181–2196.
64. Li, L.; Kosugi, I.; Han, G. P.; Kawasaki, H.; Arai, Y.; Takeshita, T.; Tsutsui, Y. Induction of Cytomegalovirus-Infected Labyrinthitis in Newborn Mice by Lipopolysaccharide: A Model for Hearing Loss in Congenital CMV Infection. *Lab. Investig.* **2008**, *88*, 722–730.
65. Britt, W. J., Cekinović, D. & Jonjić, S. Murine Model of Neonatal Cytomegalovirus Infection. In *Cytomegaloviruses From Molecular Pathogenesis to Intervention*; Norfolk: Caister Academic Press, 2013; pp 119–141.
66. Zhou, Y.-P.; Mei, M.-J.; Wang, X.-Z.; Huang, S.-N.; Chen, L.; Zhang, M.; Li, X.-Y.; Qin, H.-B.; Dong, X.; Cheng, S.; Wen, L.; Yang, B.; An, X.-F.; He, A.-D.; Zhang, B.; Zeng, W.-B.; Li, X.-J.; Lu, Y.; Li, H.-C.; Li, H.; Zou, W.-G.; Redwood, A. J.; Rayner, S.; Cheng, H.; McVoy, M. A.; Tang, Q.; Britt, W. J.; Zhou, X.; Jiang, X.; Luo, M.-H. A Congenital CMV Infection Model for Follow-up Studies of Neurodevelopmental Disorders, Neuroimaging Abnormalities, and Treatment. *JCI insight* **2022**, *7*.
67. Clancy, B.; Kersh, B.; Hyde, J.; Darlington, R. B.; Anand, K. J. S.; Finlay, B. L. Web-Based Method for Translating Neurodevelopment from Laboratory Species to Humans. *Neuroinformatics* **2007**, *5*, 79–94.

68. Treuting, P. M.; Dintzis, S. M. Nervous System. In *Comparative Anatomy and Histology*; Academic Press, 2012.
69. Reuter, J. D.; Gomez, D. L.; Wilson, J. H.; van den Pol, A. N. Systemic Immune Deficiency Necessary for Cytomegalovirus Invasion of the Mature Brain. *J. Virol.* **2004**, *78*, 1473–1487.
70. Cekinović, Đ.; Golemac, M.; Pugel, E. P.; Tomac, J.; Čičin-Šain, L.; Slavuljica, I.; Bradford, R.; Misch, S.; Winkler, T. H.; Mach, M.; Britt, W. J.; Jonjić, S. Passive Immunization Reduces Murine Cytomegalovirus-Induced Brain Pathology in Newborn Mice. *J. Virol.* **2008**, *82*, 12172–12180.
71. Brizić, I.; Šušak, B.; Arapović, M.; Huszthy, P. C.; Hiršl, L.; Kveštak, D.; Juranić Lisnić, V.; Golemac, M.; Pernjak Pugel, E.; Tomac, J.; Oxenius, A.; Britt, W. J.; Arapović, J.; Krmpotić, A.; Jonjić, S. Brain-Resident Memory CD8⁺ T Cells Induced by Congenital CMV Infection Prevent Brain Pathology and Virus Reactivation. *Eur. J. Immunol.* **2018**, *48*, 950–964.
72. Bantug, G. R. B.; Cekinovic, D.; Bradford, R.; Koontz, T.; Jonjic, S.; Britt, W. J. CD8 + T Lymphocytes Control Murine Cytomegalovirus Replication in the Central Nervous System of Newborn Animals . *J. Immunol.* **2008**, *181*, 2111–2123.
73. Ornaghi, S.; Hsieh, L. S.; Bordey, A.; Vergani, P.; Paidas, M. J.; Van Den Pol, A. N. Valnoctamide Inhibits Cytomegalovirus Infection in Developing Brain and Attenuates Neurobehavioral Dysfunctions and Brain Abnormalities. *J. Neurosci.* **2017**, *37*, 6877–6893.
74. Sung, C. Y. W.; Seleme, M. C.; Payne, S.; Jonjic, S.; Hirose, K.; Britt, W. Virus-Induced Cochlear Inflammation in Newborn Mice Alters Auditory Function. *JCI Insight* **2019**, *4*.
75. Bradford, R. D.; Yoo, Y. G.; Golemac, M.; Pugel, E. P.; Jonjic, S.; Britt, W. J. Murine CMV-Induced Hearing Loss Is Associated with Inner Ear Inflammation and Loss of Spiral Ganglia Neurons. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*.
76. McCord, J. L.; Han, J. Y. S.; Staudt, R. E.; Philp, N. J.; Snyder, C. M. Immune Responses Drive Chorioretinitis and Retinal Pathology after Neonatal CMV Infection. *Sci. Adv.*

2024, 10.

77. Fitzgerald, N. A.; Papadimitriou, J. M.; Shellam, G. R. Cytomegalovirus-Induced Pneumonitis and Myocarditis in Newborn Mice - A Model for Perinatal Human Cytomegalovirus Infection. *Arch. Virol.* **1990**, *115*, 75–88.
78. Shellam, G. R.; Flexman, J. P. Genetically Determined Resistance to Murine Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus in Newborn Mice. *J. Virol.* **1986**, *58*, 152–156.
79. Kveštak, D.; Juranić Lisnić, V.; Lisnić, B.; Tomac, J.; Golemac, M.; Brizić, I.; Indenbirken, D.; Cokarić Brdovčak, M.; Bernardini, G.; Krstanović, F.; Rožmanić, C.; Grundhoff, A.; Krmpotić, A.; Britt, W. J.; Jonjić, S. NK/ILC1 Cells Mediate Neuroinflammation and Brain Pathology Following Congenital CMV Infection. *J. Exp. Med.* **2021**, *218*.
80. Cheeran, M. C. J.; Lokensgard, J. R.; Schleiss, M. R. Neuropathogenesis of Congenital Cytomegalovirus Infection: Disease Mechanisms and Prospects for Intervention. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22*, 99–126.
81. Krstanović, F.; Britt, W. J.; Jonjić, S.; Brizić, I. Cytomegalovirus Infection and Inflammation in Developing Brain. *Viruses* **2021**, *13*, 1078.
82. Bellini, M. J.; Suk, K.; Steardo, L.; Carvalho, F.; Gomes, A.; Matias, I.; Morgado, J. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2019**.
83. Giovannoni, F.; Quintana, F. J. The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. *Trends Immunol.* **2020**, *41*, 805–819.
84. Sofroniew, M. V.; Vinters, H. V. Astrocytes: Biology and Pathology. *Acta Neuropathol.* **2010**, *119*, 7–35.
85. Lokensgard, J. R.; Cheeran, M. C. J.; Gekker, G.; Hu, S.; Chao, C. C.; Peterson, P. K. Human Cytomegalovirus Replication and of Apoptosis in Astrocytes. *J. Hum. Virol.* **1999**, *2*, 91–101.

86. Ho, W. S. C.; van den Pol, A. N. Bystander Attenuation of Neuronal and Astrocyte Intercellular Communication by Murine Cytomegalovirus Infection of Glia. *J. Virol.* **2007**, *81*, 7286–7292.
87. Lecointe, D.; Héry, C.; Janabi, N.; Dussaix, E.; Tardieu, M. Differences in Kinetics of Human Cytomegalovirus Cell-Free Viral Release after in Vitro Infection of Human Microglial Cells, Astrocytes and Monocyte-Derived Macrophages. *J. Neurovirol.* **1999**, *5*, 308–313.
88. Van Den Pol, A. N.; Mocarski, E.; Saederup, N.; Vieira, J.; Meier, T. J. Cytomegalovirus Cell Tropism, Replication, and Gene Transfer in Brain. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 10948–10965.
89. Cheeran, M. C.-J.; Hu, S.; Gekker, G.; Lokensgard, J. R. Decreased Cytomegalovirus Expression Following Proinflammatory Cytokine Treatment of Primary Human Astrocytes. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 926–933.
90. Miron, V. E.; Priller, J. Investigating Microglia in Health and Disease: Challenges and Opportunities. *Trends Immunol.* **2020**, *41*, 785–793.
91. Réu, P.; Khosravi, A.; Bernard, S.; Mold, J. E.; Salehpour, M.; Alkass, K.; Perl, S.; Tisdale, J.; Possnert, G.; Druid, H.; Frisén, J. The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 779–784.
92. Chhatbar, C.; Prinz, M. The Roles of Microglia in Viral Encephalitis: From Sensome to Therapeutic Targeting. *Cell. Mol. Immunol.* **2021**, *18*, 250–258.
93. Pulliam, L. Cytomegalovirus Preferentially Infects a Monocyte Derived Macrophage/Microglial Cell in Human Brain Cultures: Neuropathology Differs between Strains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1991**, *50*, 432–440.
94. Cheeran, M. C. J.; Hu, S.; Yager, S. L.; Gekker, G.; Peterson, P. K.; Lokensgard, J. R. Cytomegalovirus Induces Cytokine and Chemokine Production Differentially in Microglia and Astrocytes: Antiviral Implications. *J. Neurovirol.* **2001**, *7*, 135–147.
95. Teissier, N.; Fallet-Bianco, C.; Delezoide, A. L.; Laquerrière, A.; Marcorelles, P.; Khung-Savatovsky, S.; Nardelli, J.; Cipriani, S.; Csaba, Z.; Picone, O.; Golden, J. A.; Van Den

- Abbeele, T.; Gressens, P.; Adle-Biasette, H. Cytomegalovirus-Induced Brain Malformations in Fetuses. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2014**, *73*, 143–158.
96. Cloarec, R.; Bauer, S.; Luche, H.; Buhler, E.; Pallesi-Pocachard, E.; Salmi, M.; Courtens, S.; Massacrier, A.; Grenot, P.; Teissier, N.; Watrin, F.; Schaller, F.; Adle-Biasette, H.; Gressens, P.; Malissen, M.; Stamminger, T.; Streblow, D. N.; Bruneau, N.; Szepetowski, P. Cytomegalovirus Infection of the Rat Developing Brain in Utero Prominently Targets Immune Cells and Promotes Early Microglial Activation. *PLoS One* **2016**, *11*, 1–20.
 97. Schut, R. L.; Gekker, G.; Hu, S.; Chao, C. C.; Pomeroy, C.; Jordan, M. C.; Peterson, P. K. Cytomegalovirus Replication in Murine Microglial Cell Cultures: Suppression of Permissive Infection by Interferon- γ . *J. Infect. Dis.* **1994**, *169*, 1092–1096.
 98. Kučić, N.; Rački, V.; Jurdana, K.; Marcelić, M.; Grabušić, K. Immunometabolic Phenotype of BV-2 Microglia Cells upon Murine Cytomegalovirus Infection. *J. Neurovirol.* **2019**, *25*, 496–507.
 99. Holt, C. E.; Martin, K. C.; Schuman, E. M. Local Translation in Neurons: Visualization and Function. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2019**, *26*, 557–566.
 100. Steward, M. M.; Sridhar, A.; Meyer, J. S. Neural Regeneration. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2013**, *367*, 163–191.
 101. Koyuncu, O. O.; Hogue, I. B.; Enquist, L. W. Virus Infections in the Nervous System. *Cell Host Microbe* **2013**, *13*, 379–393.
 102. DeBiasi, R. L.; Kleinschmidt-DeMasters, B. K.; Richardson-Burns, S.; Tyler, K. L. Central Nervous System Apoptosis in Human Herpes Simplex Virus and Cytomegalovirus Encephalitis. *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 1547–1557.
 103. Piccirilli, G.; Gabrielli, L.; Bonasoni, M. P.; Chiereghin, A.; Turello, G.; Borgatti, E. C.; Simonazzi, G.; Felici, S.; Leone, M.; Salfi, N. C. M.; Santini, D.; Lazzarotto, T. Fetal Brain Damage in Human Fetuses with Congenital Cytomegalovirus Infection: Histological Features and Viral Tropism. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2023**, *43*, 1385–1399.
 104. Luo, M. H.; Schwartz, P. H.; Fortunato, E. A. Neonatal Neural Progenitor Cells and Their Neuronal and Glial Cell Derivatives Are Fully Permissive for Human Cytomegalovirus

- Infection. *J. Virol.* **2008**, 82, 9994–10007.
105. Cheeran, M. C. J.; Hu, S.; Ni, H. T.; Sheng, W.; Palmquist, J. M.; Peterson, P. K.; Lokensgard, J. R. Neural Precursor Cell Susceptibility to Human Cytomegalovirus Diverges along Glial or Neuronal Differentiation Pathways. *J. Neurosci. Res.* **2005**, 82, 839–850.
 106. Poland, S. D.; Bambrick, L. L.; Dekaban, G. A.; Rice, G. P. A. The Extent of Human Cytomegalovirus Replication in Primary Neurons Is Dependent on Host Cell Differentiation. *J. Infect. Dis.* **1994**, 170, 1267–1271.
 107. van den Pol, A. N.; Reuter, J. D.; Santarelli, J. G. Enhanced Cytomegalovirus Infection of Developing Brain Independent of the Adaptive Immune System. *J. Virol.* **2002**, 76, 8842–8854.
 108. Arai, Y.; Ishiwata, M.; Baba, S.; Kawasaki, H.; Kosugi, I.; Li, R. Y.; Tsuchida, T.; Miura, K.; Tsutsui, Y. Neuron-Specific Activation of Murine Cytomegalovirus Early Gene E1 Promoter in Transgenic Mice. *Am. J. Pathol.* **2003**, 163, 643–652.
 109. Wheeler, D. G.; Cooper, E. Depolarization Strongly Induces Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Promoter/Enhancer Activity in Neurons. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 31978–31985.
 110. Tian, L.; Rauvala, H.; Gahmberg, C. G. Neuronal Regulation of Immune Responses in the Central Nervous System. *Trends Immunol.* **2009**, 30, 91–99.
 111. Ladrán, I.; Tran, N.; Topol, A.; Brennand, K. J. Neural Stem and Progenitor Cells in Health and Disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2013**, 5, 701–715.
 112. Martínez-Cerdeño, V.; Noctor, S. C. Neural Progenitor Cell Terminology. *Front. Neuroanat.* **2018**, 12.
 113. Adle-Biassette, H.; Teissier, N. Cytomegalovirus Infections of the CNS. In *Infections of the Central Nervous System: Pathology and Genetics*; John Wiley & Sons Ltd, 2020; Vol. 1, pp 65–76.
 114. Odeberg, J.; Wolmer, N.; Falci, S.; Westgren, M.; Sundtröm, E.; Seiger, Å.; Söderberg-

- Nauc  r, C. Late Human Cytomegalovirus (HCMV) Proteins Inhibit Differentiation of Human Neural Precursor Cells into Astrocytes. *J. Neurosci. Res.* **2007**, *85*, 583–593.
115. Odeberg, J.; Wolmer, N.; Falci, S.; Westgren, M.; Seiger,  .; S  derberg-Nauc  r, C. Human Cytomegalovirus Inhibits Neuronal Differentiation and Induces Apoptosis in Human Neural Precursor Cells. *J. Virol.* **2006**, *80*, 8929–8939.
 116. Kosugi, I.; Shinmura, Y.; Kawasaki, H.; Arai, Y.; Li, R. Y.; Baba, S.; Tsutsui, Y. Cytomegalovirus Infection of the Central Nervous System Stem Cells from Mouse Embryo: A Model for Developmental Brain Disorders Induced by Cytomegalovirus. *Lab. Investig.* **2000**, *80*, 1373–1383.
 117. Cheeran, M. C. J.; Jiang, Z.; Hu, S.; Ni, H.; Palmquist, J. M.; Lokensgard, J. R. Cytomegalovirus Infection and Interferon-  Modulate Major Histocompatibility Complex Class I Expression on Neural Stem Cells. *J. Neurovirol.* **2008**, *14*, 437–447.
 118. Mutnal, M. B.; Cheeran, M. C. J.; Hu, S.; Lokensgard, J. R. Murine Cytomegalovirus Infection of Neural Stem Cells Alters Neurogenesis in the Developing Brain. *PLoS One* **2011**, *6*.
 119. Kawasaki, H.; Kosugi, I.; Arai, Y.; Tsutsui, Y. The Amount of Immature Glial Cells in Organotypic Brain Slices Determines the Susceptibility to Murine Cytomegalovirus Infection. *Lab. Investig.* **2002**, *82*, 1347–1358.
 120. Michalski, J.-P.; Kothary, R. Oligodendrocytes in a Nutshell. *Front. Cell. Neurosci.* **2015**, *9*, 340.
 121. Spiller, O. B.; Borysiewicz, L. K.; Morgan, B. P. Development of a Model for Cytomegalovirus Infection of Oligodendrocytes. *J. Gen. Virol.* **1997**, *78*, 3349–3356.
 122. Del Bigio, M. R. Ependymal Cells: Biology and Pathology. *Acta Neuropathol.* **2010**, *119*, 55–73.
 123. Gabrielli, L.; Bonasoni, M. P.; Lazzarotto, T.; Lega, S.; Santini, D.; Foschini, M. P.; Guerra, B.; Baccolini, F.; Piccirilli, G.; Chiereghin, A.; Petrisli, E.; Gardini, G.; Lanari, M.; Landini, M. P. Histological Findings in Foetuses Congenitally Infected by Cytomegalovirus. *J. Clin. Virol.* **2009**, *46*.

124. Abdi, K.; Lai, C. H.; Paez-Gonzalez, P.; Lay, M.; Pyun, J.; Kuo, C. T. Uncovering Inherent Cellular Plasticity of Multiciliated Ependyma Leading to Ventricular Wall Transformation and Hydrocephalus. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–16.
125. Cohen, J. I. Herpesvirus Latency. *J. Clin. Invest.* **2020**, *130*, 3361–3369.
126. Belzile, J.-P.; Stark, T. J.; Yeo, G. W.; Spector, D. H. Human Cytomegalovirus Infection of Human Embryonic Stem Cell-Derived Primitive Neural Stem Cells Is Restricted at Several Steps but Leads to the Persistence of Viral DNA. *J. Virol.* **2014**, *88*, 4021–4039.
127. Keller, M. J.; Wheeler, D. G.; Cooper, E.; Meier, J. L. Role of the Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Promoter's 19-Base-Pair-Repeat Cyclic AMP-Response Element in Acutely Infected Cells. *J. Virol.* **2003**, *77*, 6666–6675.
128. Keller, M. J.; Wu, A. W.; Andrews, J. I.; McGonagill, P. W.; Tibesar, E. E.; Meier, J. L. Reversal of Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Enhancer/Promoter Silencing in Quiescently Infected Cells via the Cyclic AMP Signaling Pathway. *J. Virol.* **2007**, *81*, 6669–6681.
129. Tsutsui, Y.; Kawasaki, H.; Kosugi, I. Reactivation of Latent Cytomegalovirus Infection in Mouse Brain Cells Detected after Transfer to Brain Slice Cultures. *J. Virol.* **2002**, *76*, 7247–7254.
130. De Chiara, G.; Piacentini, R.; Fabiani, M.; Mastrodonato, A.; Marcocci, M. E.; Limongi, D.; Napoletani, G.; Protto, V.; Coluccio, P.; Celestino, I.; Li Puma, D. D.; Grassi, C.; Palamara, A. T. Recurrent Herpes Simplex Virus-1 Infection Induces Hallmarks of Neurodegeneration and Cognitive Deficits in Mice. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, 1–30.
131. Brizić, I.; Hiršl, L.; Šustić, M.; Golemac, M.; Britt, W. J.; Krmpotić, A.; Jonjić, S. 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.* **2019**, *208*, 487–494.
132. Harrison, M. A. A.; Morris, S. L.; Rudman, G. A.; Rittenhouse, D. J.; Monk, C. H.; Sakamuri, S. S. V. P.; Mehedi Hasan, M.; Shamima Khatun, M.; Wang, H.; Garfinkel, L. P.; Norton, E. B.; Kim, S.; Kolls, J. K.; Jazwinski, S. M.; Mostany, R.; Katakam, Prasad V, G.; Engler-Chiurazzi, E. B.; Zvezdaryk, K. J. Intermittent Cytomegalovirus Infection

- Alters Neurobiological Metabolism and Induces Cognitive Deficits in Mice. *Brain. Behav. Immun.* **2024**, *117*, 36–50.
133. Guyon, J.; Haidar Ahmad, S.; El Baba, R.; Le Quang, M.; Bikfalvi, A.; Daubon, T.; Herbein, G. Generation of Glioblastoma in Mice Engrafted with Human Cytomegalovirus-Infected Astrocytes. *Cancer Gene Ther.* **2024**.
 134. Krenzlin, H.; Behera, P.; Lorenz, V.; Passaro, C.; Zdioruk, M.; Nowicki, M. O.; Grauwet, K.; Zhang, H.; Skubal, M.; Ito, H.; Zane, R.; Gutknecht, M.; Griessl, M. B.; Ricklefs, F.; Ding, L.; Peled, S.; Rooj, A.; David James, C.; Cobbs, C. S.; Cook, C. H.; Antonio Chiocca, E.; Lawler, S. E. Cytomegalovirus Promotes Murine Glioblastoma Growth via Pericyte Recruitment and Angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **2019**, *129*, 1671–1683.
 135. Joseph, G. P.; McDermott, R.; Baryshnikova, M. A.; Cobbs, C. S.; Ulasov, I. V. Cytomegalovirus as an Oncomodulatory Agent in the Progression of Glioma. *Cancer Lett.* **2017**, *384*, 79–85.
 136. Slavuljica, I.; Kveštak, D.; Csaba Huszthy, P.; Kosmac, K.; Britt, W. J.; Jonjić, S. Immunobiology of Congenital Cytomegalovirus Infection of the Central Nervous System - The Murine Cytomegalovirus Model. *Cell. Mol. Immunol.* **2015**, *12*, 180–191.
 137. Butts, T.; Green, M. J.; Wingate, R. J. T. Development of the Cerebellum: Simple Steps to Make a “Little Brain”. *Development* **2014**, *141*, 4031–4041.
 138. Penisson, M.; Ladewig, J.; Belvindrah, R.; Francis, F. Genes and Mechanisms Involved in the Generation and Amplification of Basal Radial Glial Cells. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*.
 139. Wu, C. C.; Jiang, X.; Wang, X. Z.; Liu, X. J.; Li, X. J.; Yang, B.; Ye, H. Q.; Harwardt, T.; Jiang, M.; Xia, H. M.; Wang, W.; Britt, W. J.; Paulus, C.; Nevels, M.; Luo, M. H. Human Cytomegalovirus Immediate-Early 1 Protein Causes Loss of SOX2 from Neural Progenitor Cells by Trapping Unphosphorylated STAT3 in the Nucleus. *bioRxiv* **2018**, 92, 1–18.
 140. Liu, X. J.; Yang, B.; Huang, S. N.; Wu, C. C.; Li, X. J.; Cheng, S.; Jiang, X.; Hu, F.; Ming, Y. Z.; Nevels, M.; Britt, W. J.; Rayner, S.; Tang, Q.; Zeng, W. B.; Zhao, F.; Luo,

- M. H. Human Cytomegalovirus IE1 Downregulates Hes1 in Neural Progenitor Cells as a Potential E3 Ubiquitin Ligase. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, 1–28.
141. Niu, D.; Zhang, X.; Zhang, S.; Fan, T.; Zhou, X.; Wang, H.; Zhang, X.; Nan, F.; Jiang, S.; Liu, F.; Wang, Y.; Wang, B. Human Cytomegalovirus IE2 Disrupts Neural Progenitor Development and Induces Microcephaly in Transgenic Mouse. *Mol. Neurobiol.* **2023**, *60*, 3883–3897.
 142. Wang, X.-Z.; Wen, L.; Zhou, Y.-P.; Huang, S.-N.; Yang, B.; Cheng, S.; Zeng, W.-B.; Mei, M.-J.; Sun, J.-Y.; Jiang, X.; Cheng, H.; Luo, M.-H. Human Cytomegalovirus PUL97 Upregulates SOCS3 Expression via Transcription Factor RFX7 in Neural Progenitor Cells. *PLOS Pathog.* **2023**, *19*, e1011166.
 143. Seleme, M. C.; Kosmac, K.; Jonjic, S.; Britt, W. J. 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.* **2017**, *91*, 1–22.
 144. Kosmac, K.; Bantug, G. R.; Pugel, E. P.; Cekinovic, D.; Jonjic, S.; Britt, W. J. Glucocorticoid Treatment of MCMV Infected Newborn Mice Attenuates CNS Inflammation and Limits Deficits in Cerebellar Development. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*.
 145. Sung, C. Y. W.; Li, M.; Jonjic, S.; Sanchez, V.; Britt, W. J. Cytomegalovirus Infection Lengthens the Cell Cycle of Granule Cell Precursors during Postnatal Cerebellar Development. *JCI Insight* **2024**, *9*.
 146. Wang, L.; Liu, Y. Signaling Pathways in Cerebellar Granule Cells Development. *Am. J. Stem Cells* **2019**, *8*, 1–6.
 147. Carter, A. R.; Chen, C.; Schwartz, P. M.; Segal, R. A. Brain-Derived Neurotrophic Factor Modulates Cerebellar Plasticity and Synaptic Ultrastructure. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 1316–1327.
 148. van den Pol, A. N.; Robek, M. D.; Ghosh, P. K.; Ozduman, K.; Bandi, P.; Whim, M. D.; Wollmann, G. Cytomegalovirus Induces Interferon-Stimulated Gene Expression and Is Attenuated by Interferon in the Developing Brain. *J. Virol.* **2007**, *81*, 332–348.

149. Weissman, T. A.; Riquelme, P. A.; Ivic, L.; Flint, A. C.; Kriegstein, A. R. Calcium Waves Propagate through Radial Glial Cells and Modulate Proliferation in the Developing Neocortex. *Neuron* **2004**, *43*, 647–661.
150. van Tilborg, E.; de Theije, C. G. M.; van Hal, M.; Wagenaar, N.; de Vries, L. S.; Benders, M. J.; Rowitch, D. H.; Nijboer, C. H. Origin and Dynamics of Oligodendrocytes in the Developing Brain: Implications for Perinatal White Matter Injury. *Glia* **2018**, *66*, 221–238.
151. Sochocka, M.; Diniz, B. S.; Leszek, J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 8071–8089.
152. Garay, P. Novel Roles for Immune Molecules in Neural Development: Implications for Neurodevelopmental Disorders. *Front. Synaptic Neurosci.* **2010**, *2*.
153. Brizić, I.; Hiršl, L.; Britt, W. J.; Krmpotić, A.; Jonjić, S. Immune Responses to Congenital Cytomegalovirus Infection. *Microbes Infect.* **2018**, *20*, 543–551.
154. Sofroniew, M. V. Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. *Trends Immunol.* **2020**, *41*, 758–770.
155. Rožmanić, C.; Lisnić, B.; Pribanić Matešić, M.; Mihalić, A.; Hiršl, L.; Park, E.; Lesac Brizić, A.; Indenbirken, D.; Viduka, I.; Šantić, M.; Adler, B.; Yokoyama, W. M.; Krmpotić, A.; Juranić Lisnić, V.; Jonjić, S.; Brizić, I. Perinatal Murine Cytomegalovirus Infection Reshapes the Transcriptional Profile and Functionality of NK Cells. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 6412.
156. Podlech, J.; Holtappels, R.; Wirtz, N.; Steffens, H. P.; Reddehase, M. J. Reconstitution of CD8 T Cells Is Essential for the Prevention of Multiple-Organ Cytomegalovirus Histopathology after Bone Marrow Transplantation. *J. Gen. Virol.* **1998**, *79*, 2099–2104.
157. Hilt, Z. T.; Charles, W.; Cheng, K. E.; Tabillas, C.; Steinhilber, M.; Wesnak, S. P.; Smith, N. L.; Schaffer, C. B.; Rudd, B. D. Cutting Edge: CCR9 Promotes CD8⁺ T Cell Recruitment to the Brain during Congenital Cytomegalovirus Infection. *J. Immunol.* **2022**, *209*, 2281–2286.
158. Karner, D.; Kvestak, D.; Kucan Brlic, P.; Cokaric Brdovcak, M.; Lisnic, B.; Brizic, I.;

- Juranic Lisnic, V.; Golemac, M.; Tomac, J.; Krmpotic, A.; Karkeni, E.; Libri, V.; Mella, S.; Legname, G.; Altmeppen, H. C.; Hasan, M.; Jonjic, S.; Lenac Rovis, T. Prion Protein Alters Viral Control and Enhances Pathology after Perinatal Cytomegalovirus Infection. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 7754.
159. Fowler, K. B.; Stagno, S.; Pass, R. F. Maternal Immunity and Prevention of Congenital Cytomegalovirus Infection. *J. Am. Med. Assoc.* **2003**, *289*, 1008–1011.
 160. Hiršl, L.; Brizić, I.; Jenuš, T.; Lisnić, V. J.; Reichel, J. J.; Jurković, S.; Krmpotić, A.; Jonjić, S. Murine CMV Expressing the High Affinity NKG2D Ligand MULT-1: A Model for the Development of Cytomegalovirus-Based Vaccines. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1.
 161. Kovalevich, J.; Langford, D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *1078*, 9–21.
 162. Jordan, S.; Krause, J.; Prager, A.; Mitrovic, M.; Jonjic, S.; Koszinowski, U. H.; Adler, B. Virus Progeny of Murine Cytomegalovirus Bacterial Artificial Chromosome PSM3fr Show Reduced Growth in Salivary Glands Due to a Fixed Mutation of MCK-2. *J. Virol.* **2011**, *85*, 10346–10353.
 163. Sacher, T.; Podlech, J.; Mohr, C. A.; Jordan, S.; Ruzsics, Z.; Reddehase, M. J.; Koszinowski, U. H. The Major Virus-Producing Cell Type during Murine Cytomegalovirus Infection, the Hepatocyte, Is Not the Source of Virus Dissemination in the Host. *Cell Host Microbe* **2008**, *3*, 263–272.
 164. Sampaio, K. L.; Weyell, A.; Subramanian, N.; Wu, Z.; Sinzger, C. A TB40/E-Derived Human Cytomegalovirus Genome with an Intact US-Gene Region and a Self-Excisable BAC Cassette for Immunological Research. *Biotechniques* **2017**, *63*, 205–214.
 165. Pitulescu, M. E.; Schmidt, I.; Benedito, R.; Adams, R. H. Inducible Gene Targeting in the Neonatal Vasculature and Analysis of Retinal Angiogenesis in Mice. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1518–1534.
 166. Bonavita, C. M.; White, T. M.; Francis, J.; Farrell, H. E.; Davis-Poynter, N. J.; Cardin, R. D. The Viral G-Protein-Coupled Receptor Homologs M33 and US28 Promote Cardiac Dysfunction during Murine Cytomegalovirus Infection. *Viruses* **2023**, *15*.

167. Rashidi, A. S.; Tran, D. N.; Peelen, C. R.; van Gent, M.; Ouwendijk, W. J. D.; Verjans, G. M. G. M. Herpes Simplex Virus Infection Induces Necroptosis of Neurons and Astrocytes in Human Fetal Organotypic Brain Slice Cultures. *J. Neuroinflammation* **2024**, *21*, 38.
168. Sitnik, K. M.; Krstanović, F.; Gödecke, N.; Rand, U.; Kubsch, T.; Maaß, H.; Kim, Y.; Brizić, I.; Čičin-Šain, L. Fibroblasts Are a Site of Murine Cytomegalovirus Lytic Replication and Stat1-Dependent Latent Persistence in Vivo. *Nat. Commun.* **2023**, *14*.
169. Simon, C. O.; Seckert, C. K.; Dreis, D.; Reddehase, M. J.; Grzimek, N. K. A. Role for Tumor Necrosis Factor Alpha in Murine Cytomegalovirus Transcriptional Reactivation in Latently Infected Lungs. *J. Virol.* **2005**, *79*, 326–340.
170. Krmpotic, A.; Bubic, I.; Polic, B.; Lucin, P.; Jonjic, S. Pathogenesis of Murine Cytomegalovirus Infection. *Microbes Infect.* **2003**, *5*, 1263–1277.
171. Pavlou, A.; Mulenge, F.; Gern, O. L.; Busker, L. M.; Greimel, E.; Walzl, I.; Kalinke, U. Orchestration of Antiviral Responses within the Infected Central Nervous System. *Cell. Mol. Immunol.* **2024**.
172. Borst, K.; Dumas, A. A.; Prinz, M. Microglia: Immune and Non-Immune Functions. *Immunity* **2021**, *54*, 2194–2208.
173. Reddehase, M. J.; Lemmermann, N. A. W. Cellular Reservoirs of Latent Cytomegaloviruses. *Med. Microbiol. Immunol.* **2019**, *208*, 391–403.
174. Álvarez-Aznar, A.; Martínez-Corral, I.; Daubel, N.; Betsholtz, C.; Mäkinen, T.; Gaengel, K. Tamoxifen-Independent Recombination of Reporter Genes Limits Lineage Tracing and Mosaic Analysis Using CreERT2 Lines. *Transgenic Res.* **2020**, *29*, 53–68.
175. Madisen, L.; Zwingman, T. A.; Sunkin, S. M.; Oh, S. W.; Zariwala, H. A.; Gu, H.; Ng, L. L.; Palmiter, R. D.; Hawrylycz, M. J.; Jones, A. R.; Lein, E. S.; Zeng, H. A Robust and High-Throughput Cre Reporting and Characterization System for the Whole Mouse Brain. *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 133–140.
176. Chappell-Maor, L.; Kolesnikov, M.; Kim, J.; Shemer, A.; Haimon, Z.; Grozovski, J.; Boura-Halfon, S.; Masuda, T.; Prinz, M.; Jung, S. Comparative Analysis of CreER Transgenic Mice for the Study of Brain Macrophages: A Case Study. *Eur. J. Immunol.*

- 2020, 50, 353–362.
177. Jonjić, S.; Mutter, W.; Weiland, F.; Reddehase, M. J.; Koszinowski, U. H. Site-Restricted Persistent Cytomegalovirus Infection after Selective Long-Term Depletion of CD4⁺ T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* **1989**, *169*, 1199–1212.
 178. Swain, S. L.; McKinstry, K. K.; Strutt, T. M. Expanding Roles for CD4⁺ T Cells in Immunity to Viruses. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12*, 136–148.
 179. Riera, L.; Gariglio, M.; Valente, G.; Müllbacher, A.; Museteanu, C.; Landolfo, S.; Simon, M. M. Murine Cytomegalovirus Replication in Salivary Glands Is Controlled by Both Perforin and Granzymes during Acute Infection. *Eur. J. Immunol.* **2000**, *30*, 1350–1355.
 180. Lueder, Y.; Heller, K.; Ritter, C.; Keyser, K. A.; Wagner, K.; Liu, X.; Messerle, M.; Stahl, F. R.; Halle, S.; Förster, R. Control of Primary Mouse Cytomegalovirus Infection in Lung Nodular Inflammatory Foci by Cooperation of Interferon-Gamma Expressing CD4 and CD8 T Cells. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007252.
 181. Zangger, N.; Oderbolz, J.; Oxenius, A. CD4 T Cell-Mediated Immune Control of Cytomegalovirus Infection in Murine Salivary Glands. *Pathogens* **2021**, *10*, 1531.
 182. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the Regulation of Innate Resistance and Adaptive Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 133–146.
 183. Fernández-Alarcón, C.; Meyer, L. E.; McVoy, M. A.; Lokensgard, J. R.; Hu, S.; Benneyworth, M. A.; Anderholm, K. M.; Janus, B. C.; Schleiss, M. R. Impairment in Neurocognitive Function Following Experimental Neonatal Guinea Pig Cytomegalovirus Infection. *Pediatr. Res.* **2021**, *89*, 838–845.
 184. Fernández-Alarcón, C.; Meyer, L. E.; McVoy, M. A.; Lokensgard, J. R.; Hu, S.; Benneyworth, M. A.; Anderholm, K. M.; Janus, B. C.; Schleiss, M. R. Impairment in Neurocognitive Function Following Experimental Neonatal Guinea Pig Cytomegalovirus Infection. *Pediatr. Res.* **2021**, *89*, 838–845.
 185. Miller, K. D.; Schnell, M. J.; Rall, G. F. Keeping It in Check: Chronic Viral Infection and Antiviral Immunity in the Brain. *Nat. Rev. Neurosci.* **2016**, *17*, 766–776.

186. Figueiredo, C. P.; Barros-Aragão, F. G. Q.; Neris, R. L. S.; Frost, P. S.; Soares, C.; Souza, I. N. O.; Zeidler, J. D.; Zamberlan, D. C.; de Sousa, V. L.; Souza, A. S.; Guimarães, A. L. A.; Bellio, M.; Marcondes de Souza, J.; Alves-Leon, S. V.; Neves, G. A.; Paula-Neto, H. A.; Castro, N. G.; De Felice, F. G.; Assunção-Miranda, I.; Clarke, J. R.; Da Poian, A. T.; Ferreira, S. T. Zika Virus Replicates in Adult Human Brain Tissue and Impairs Synapses and Memory in Mice. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3890.
187. Li Puma, D. D.; Piacentini, R.; Leone, L.; Gironi, K.; Marcocci, M. E.; De Chiara, G.; Palamara, A. T.; Grassi, C. Herpes Simplex Virus Type-1 Infection Impairs Adult Hippocampal Neurogenesis via Amyloid- β Protein Accumulation. *Stem Cells* **2019**, *37*, 1467–1480.
188. Yong, S. J.; Yong, M. H.; Teoh, S. L.; Soga, T.; Parhar, I.; Chew, J.; Lim, W. L. The Hippocampal Vulnerability to Herpes Simplex Virus Type I Infection: Relevance to Alzheimer's Disease and Memory Impairment. *Front. Cell. Neurosci.* **2021**, *15*, 695738.
189. Zerboni, L.; Arvin, A. Neuronal Subtype and Satellite Cell Tropism Are Determinants of Varicella-Zoster Virus Virulence in Human Dorsal Root Ganglia Xenografts In Vivo. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1004989.
190. Cho, H.; Prohl, S. C.; Szretter, K. J.; Katze, M. G.; Gale, M.; Diamond, M. S. Differential Innate Immune Response Programs in Neuronal Subtypes Determine Susceptibility to Infection in the Brain by Positive-Stranded RNA Viruses. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 458–464.
191. Jehmlich, U.; Ritzer, J.; Grosche, J.; Härtig, W.; Liebert, U. G. Experimental Measles Encephalitis in Lewis Rats: Dissemination of Infected Neuronal Cell Subtypes. *J. Neurovirol.* **2013**, *19*, 461–470.
192. Tan, Y.-L.; Yuan, Y.; Tian, L. Microglial Regional Heterogeneity and Its Role in the Brain. *Mol. Psychiatry* **2020**, *25*, 351–367.
193. Davidson, T. L.; Stevenson, R. J. Vulnerability of the Hippocampus to Insults: Links to Blood-Brain Barrier Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*.
194. Potokar, M.; Zorec, R.; Jorgačevski, J. Astrocytes Are a Key Target for Neurotropic Viral Infection. *Cells* **2023**, *12*, 2307.

195. Farrell, H. E.; Davis-Poynter, N.; Bruce, K.; Lawler, C.; Dolken, L.; Mach, M.; Stevenson, P. G. Lymph Node Macrophages Restrict Murine Cytomegalovirus Dissemination. *J. Virol.* **2015**, *89*, 7147–7158.
196. Li, Q.; Barres, B. A. Microglia and Macrophages in Brain Homeostasis and Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 225–242.
197. Tegtmeyer, P.-K.; Spanier, J.; Borst, K.; Becker, J.; Riedl, A.; Hirche, C.; Ghita, L.; Skerra, J.; Baumann, K.; Lienenklaus, S.; Doering, M.; Ruzsics, Z.; Kalinke, U. STING Induces Early IFN- β in the Liver and Constrains Myeloid Cell-Mediated Dissemination of Murine Cytomegalovirus. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2830.
198. Escoubas, C. C.; Dorman, L. C.; Nguyen, P. T.; Lagares-Linares, C.; Nakajo, H.; Anderson, S. R.; Barron, J. J.; Wade, S. D.; Cuevas, B.; Vainchtein, I. D.; Silva, N. J.; Guajardo, R.; Xiao, Y.; Lidsky, P. V.; Wang, E. Y.; Rivera, B. M.; Taloma, S. E.; Kim, D. K.; Kaminskaya, E.; Nakao-Inoue, H.; Schwer, B.; Arnold, T. D.; Molofsky, A. B.; Condello, C.; Andino, R.; Nowakowski, T. J.; Molofsky, A. V. Type-I-Interferon-Responsive Microglia Shape Cortical Development and Behavior. *Cell* **2024**, *187*, 1936-1954.e24.
199. Ghita, L.; Spanier, J.; Chhatbar, C.; Mulenge, F.; Pavlou, A.; Larsen, P. K.; Walzl, I.; Lueder, Y.; Kohls, M.; Jung, K.; Best, S. M.; Förster, R.; Stangel, M.; Schreiner, D.; Kalinke, U. MyD88 Signaling by Neurons Induces Chemokines That Recruit Protective Leukocytes to the Virus-Infected CNS. *Sci. Immunol.* **2021**, *6*.
200. Klein, R. S.; Lin, E.; Zhang, B.; Luster, A. D.; Tollett, J.; Samuel, M. A.; Engle, M.; Diamond, M. S. Neuronal CXCL10 Directs CD8⁺ T-Cell Recruitment and Control of West Nile Virus Encephalitis. *J. Virol.* **2005**, *79*, 11457–11466.
201. Delhay, S.; Paul, S.; Blakqori, G.; Minet, M.; Weber, F.; Staeheli, P.; Michiels, T. Neurons Produce Type I Interferon during Viral Encephalitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 7835–7840.
202. Chevalier, G.; Suberbielle, E.; Monnet, C.; Duplan, V.; Martin-Blondel, G.; Farrugia, F.; Le Masson, G.; Liblau, R.; Gonzalez-Dunia, D. Neurons Are MHC Class I-Dependent

- Targets for CD8 T Cells upon Neurotropic Viral Infection. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002393.
203. Joly, E.; Mucke, L.; Oldstone, M. B. Viral Persistence in Neurons Explained by Lack of Major Histocompatibility Class I Expression. *Science* **1991**, *253*, 1283–1285.
 204. Jeon, S.; St Leger, A. J.; Cherpes, T. L.; Sheridan, B. S.; Hendricks, R. L. PD-L1/B7-H1 Regulates the Survival but Not the Function of CD8⁺ T Cells in Herpes Simplex Virus Type 1 Latently Infected Trigeminal Ganglia. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 6277–6286.
 205. Rose, R. W.; Vorobyeva, A. G.; Skipworth, J. D.; Nicolas, E.; Rall, G. F. Altered Levels of STAT1 and STAT3 Influence the Neuronal Response to Interferon Gamma. *J. Neuroimmunol.* **2007**, *192*, 145–156.
 206. Cavanaugh, S. E.; Holmgren, A. M.; Rall, G. F. Homeostatic Interferon Expression in Neurons Is Sufficient for Early Control of Viral Infection. *J. Neuroimmunol.* **2015**, *279*, 11–19.
 207. Jonjić, S.; Pavić, I.; Lucin, P.; Rukavina, D.; Koszinowski, U. H. Efficacious Control of Cytomegalovirus Infection after Long-Term Depletion of CD8⁺ T Lymphocytes. *J. Virol.* **1990**, *64*, 5457–5464.
 208. Sellier, Y.; Marliot, F.; Bessières, B.; Stirnemann, J.; Encha-Razavi, F.; Guilleminot, T.; Haicheur, N.; Pages, F.; Ville, Y.; Leruez-Ville, M. Adaptive and Innate Immune Cells in Fetal Human Cytomegalovirus-Infected Brains. *Microorganisms* **2020**, *8*.
 209. Soriano-Ramos, M.; Pedrero-Tomé, R.; Giménez Quiles, E.; Albert Vicent, E.; Baquero-Artigao, F.; Rodríguez-Molino, P.; Del Rosal, T.; Noguera-Julian, A.; Fortuny, C.; Ríos-Barnés, M.; Saavedra-Lozano, J.; Dueñas, E.; Sánchez Mateos, M.; Castells Vilella, L.; de la Serna, M.; Frick, M. A.; de Vergas, J.; Núñez Enamorado, N.; Moral-Pumarega, M. T.; Folgueira, M. D.; Navarro, D.; Blázquez-Gamero, D.; CYTRIC Study Group. T-Cell Immune Responses in Newborns and Long-Term Sequelae in Congenital Cytomegalovirus Infection (CYTRIC Study). *J. Pediatr.* **2024**, 114084.
 210. Lidehäll, A. K.; Engman, M.-L.; Sund, F.; Malm, G.; Lewensohn-Fuchs, I.; Ewald, U.; Tötterman, T. H.; Karltorp, E.; Korsgren, O.; Eriksson, B.-M. Cytomegalovirus-Specific

- CD4 and CD8 T Cell Responses in Infants and Children. *Scand. J. Immunol.* **2013**, *77*, 135–143.
211. Tu, W.; Chen, S.; Sharp, M.; Dekker, C.; Manganello, A. M.; Tongson, E. C.; Maecker, H. T.; Holmes, T. H.; Wang, Z.; Kemble, G.; Adler, S.; Arvin, A.; Lewis, D. B. Persistent and Selective Deficiency of CD4⁺ T Cell Immunity to Cytomegalovirus in Immunocompetent Young Children. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 3260–3267.
 212. Bowen, L. N.; Smith, B.; Reich, D.; Quezado, M.; Nath, A. HIV-Associated Opportunistic CNS Infections: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment. *Nat. Rev. Neurol.* **2016**, *12*, 662–674.
 213. Nelson, J. A.; Reynolds-Kohler, C.; Oldstone, M. B.; Wiley, C. A. HIV and HCMV Coinfect Brain Cells in Patients with AIDS. *Virology* **1988**, *165*, 286–290.
 214. Bialas, K. M.; Tanaka, T.; Tran, D.; Varner, V.; De La Rosa, E. C.; Chiuppesi, F.; Wussow, F.; Kattenhorn, L.; Macri, S.; Kunz, E. L.; Estroff, J. A.; Kirchherr, J.; Yue, Y.; Fan, Q.; Lauck, M.; O'Connor, D. H.; Hall, A. H. S.; Xavier, A.; Diamond, D. J.; Barry, P. A.; Kaur, A.; Permar, S. R. Maternal CD4⁺ T Cells Protect against Severe Congenital Cytomegalovirus Disease in a Novel Nonhuman Primate Model of Placental Cytomegalovirus Transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 13645–13650.
 215. Rollman, T. B.; Berkebile, Z. W.; Hicks, D. M.; Hatfield, J. S.; Chauhan, P.; Pravetoni, M.; Schleiss, M. R.; Milligan, G. N.; Morgan, T. K.; Bierle, C. J. CD4⁺ but Not CD8⁺ T Cells Are Required for Protection against Severe Guinea Pig Cytomegalovirus Infections. *PLoS Pathog.* **2024**, *20*, e1012515.
 216. Griffin, D. E. Immune Responses to RNA-Virus Infections of the CNS. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 493–502.
 217. Jiang, X.; Chentoufi, A. A.; Hsiang, C.; Carpenter, D.; Osorio, N.; BenMohamed, L.; Fraser, N. W.; Jones, C.; Wechsler, S. L. The Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Associated Transcript Can Protect Neuron-Derived C1300 and Neuro2A Cells from Granzyme B-Induced Apoptosis and CD8 T-Cell Killing. *J. Virol.* **2011**, *85*, 2325–2332.
 218. Shrestha, B.; Wang, T.; Samuel, M. A.; Whitby, K.; Craft, J.; Fikrig, E.; Diamond, M. S.

- Gamma Interferon Plays a Crucial Early Antiviral Role in Protection against West Nile Virus Infection. *J. Virol.* **2006**, *80*, 5338–5348.
219. Patterson, C. E.; Lawrence, D. M. P.; Echols, L. A.; Rall, G. F. Immune-Mediated Protection from Measles Virus-Induced Central Nervous System Disease Is Noncytolytic and Gamma Interferon Dependent. *J. Virol.* **2002**, *76*, 4497–4506.
 220. Rodriguez, M.; Zocklein, L. J.; Howe, C. L.; Pavelko, K. D.; Gamez, J. D.; Nakane, S.; Papke, L. M. Gamma Interferon Is Critical for Neuronal Viral Clearance and Protection in a Susceptible Mouse Strain Following Early Intracranial Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus Infection. *J. Virol.* **2003**, *77*, 12252–12265.
 221. Binder, G. K.; Griffin, D. E. Interferon-Gamma-Mediated Site-Specific Clearance of Alphavirus from CNS Neurons. *Science* **2001**, *293*, 303–306.
 222. Parra, B.; Hinton, D. R.; Marten, N. W.; Bergmann, C. C.; Lin, M. T.; Yang, C. S.; Stohlman, S. A. IFN-Gamma Is Required for Viral Clearance from Central Nervous System Oligodendroglia. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 1641–1647.
 223. St. Leger, A. J.; Hendricks, R. L. CD8⁺ T Cells Patrol HSV-1-Infected Trigeminal Ganglia and Prevent Viral Reactivation. *J. Neurovirol.* **2011**, *17*, 528–534.
 224. Frank, G. M.; Lepisto, A. J.; Freeman, M. L.; Sheridan, B. S.; Cherpes, T. L.; Hendricks, R. L. Early CD4(+) T Cell Help Prevents Partial CD8(+) T Cell Exhaustion and Promotes Maintenance of Herpes Simplex Virus 1 Latency. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 277–286.
 225. Phares, T. W.; Stohlman, S. A.; Hwang, M.; Min, B.; Hinton, D. R.; Bergmann, C. C. CD4 T Cells Promote CD8 T Cell Immunity at the Priming and Effector Site during Viral Encephalitis. *J. Virol.* **2012**, *86*, 2416–2427.
 226. Xie, W.; Bruce, K.; Stevenson, P. G.; Farrell, H. E. Indirect CD4⁺ T Cell Protection against Persistent MCMV Infection by NK Cells Requires IFN γ . *J. Gen. Virol.* **2024**, *105*.
 227. Stubblefield Park, S. R.; Widness, M.; Levine, A. D.; Patterson, C. E. T Cell-, Interleukin-12-, and Gamma Interferon-Driven Viral Clearance in Measles Virus-Infected Brain Tissue. *J. Virol.* **2011**, *85*, 3664–3676.

228. Kapil, P.; Atkinson, R.; Ramakrishna, C.; Cua, D. J.; Bergmann, C. C.; Stohlman, S. A. Interleukin-12 (IL-12), but Not IL-23, Deficiency Ameliorates Viral Encephalitis without Affecting Viral Control. *J. Virol.* **2009**, *83*, 5978–5986.
229. Renneson, J.; Dutta, B.; Goriely, S.; Danis, B.; Lecomte, S.; Laes, J.-F.; Tabi, Z.; Goldman, M.; Marchant, A. IL-12 and Type I IFN Response of Neonatal Myeloid DC to Human CMV Infection. *Eur. J. Immunol.* **2009**, *39*, 2789–2799.
230. Gans, H. A.; Maldonado, Y.; Yasukawa, L. L.; Beeler, J.; Audet, S.; Rinki, M. M.; DeHovitz, R.; Arvin, A. M. IL-12, IFN-Gamma, and T Cell Proliferation to Measles in Immunized Infants. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 5569–5575.
231. Kurz, S.; Steffens, H. P.; Mayer, A.; Harris, J. R.; Reddehase, M. J. Latency versus Persistence or Intermittent Recurrences: Evidence for a Latent State of Murine Cytomegalovirus in the Lungs. *J. Virol.* **1997**, *71*, 2980–2987.
232. Griessl, M.; Renzaho, A.; Freitag, K.; Seckert, C. K.; Reddehase, M. J.; Lemmermann, N. A. W. Stochastic Episodes of Latent Cytomegalovirus Transcription Drive CD8 T-Cell “Memory Inflation” and Avoid Immune Evasion. *Front. Immunol.* **2021**, *12*.
233. Grinde, B. Herpesviruses: Latency and Reactivation - Viral Strategies and Host Response. *J. Oral Microbiol.* **2013**, *5*, 22766.
234. Becroft, D. M. Prenatal Cytomegalovirus Infection: Epidemiology, Pathology and Pathogenesis. *Perspect. Pediatr. Pathol.* **1981**, *6*, 203–241.
235. Ribalta, T.; Martinez, J. A.; Jares, P.; Muntané, J.; Miquel, R.; Claramonte, X.; Cardesa, A. Presence of Occult Cytomegalovirus Infection in the Brain after Orthotopic Liver Transplantation. *Virchows Arch.* **2002**, *440*, 166–171.
236. Liblau, R. S.; Gonzalez-Dunia, D.; Wiendl, H.; Zipp, F. Neurons as Targets for T Cells in the Nervous System. *Trends Neurosci.* **2013**, *36*, 315–324.
237. Moseman, E. A.; Blanchard, A. C.; Nayak, D.; McGavern, D. B. T Cell Engagement of Cross-Presenting Microglia Protects the Brain from a Nasal Virus Infection. *Sci. Immunol.* **2020**, *5*, 1–14.

238. Siffrin, V.; Radbruch, H.; Glumm, R.; Niesner, R.; Paterka, M.; Herz, J.; Leuenberger, T.; Lehmann, S. M.; Luenstedt, S.; Rinnenthal, J. L.; Laube, G.; Luche, H.; Lehnardt, S.; Fehling, H.-J.; Griesbeck, O.; Zipp, F. In Vivo Imaging of Partially Reversible Th17 Cell-Induced Neuronal Dysfunction in the Course of Encephalomyelitis. *Immunity* **2010**, *33*, 424–436.

ILUSTRACIJE

POPIS SLIKA

Slika 1. Infekcija CMV-om u mozgu.

Slika 2. Imunološki odgovor na infekciju CMV-om u mozgu.

Slika 3. Infekcija MCMV-om u mozgu ovisna o dobi.

Slika 4. Aktivacija mikroglije u mozgu neonatalnih i odraslih miševa na infekciju MCMV-om.

Slika 5. Analiza infiltracije CD8⁺ limfocita T u mozak neonatalnih i odraslih miševa uslijed infekcije MCMV-om.

Slika 6. Infekcija MCMV-om u mozgu tijekom razvoja.

Slika 7. Hipokampus je glavna regija produktivne i latentne infekcije MCMV-om.

Slika 8. Tropizam MCMV-a u mozgu.

Slika 9. Rekombinantni virus MCMV-flox.

Slika 10. Ispitivanje učinkovitosti rekombinacije inducirane TAM-om u miševa soja Sall1-Cre^{+/-}/ERT2 x R26^{tdTomato^{+/-}}.

Slika 11. Doprinos astrocita, mikroglije i neurona u proizvodnji infektivnog MCMV-a u mozgu.

Slika 12. Histološka validacija reporterskog sustava.

Slika 13. Kontrola spontane rekombinacije virusa MCMV-flox.

Slika 14. Nadzor infekcije MCMV-om u novookočenim CD4- i CD8-deficijentnim miševima.

Slika 15. CD4⁺ limfociti T su potrebni za razrješenje produktivne infekcije MCMV-om u mozgu.

Slika 16. Uloga limfocita T u nadzoru produktivne infekcije MCMV-om u perifernim organima.

Slika 17. Imunohistokemijska analiza infekcije MCMV-om u mozgu miševa CD4^{-/-}.

Slika 18. Citolitički proteini nisu potrebni su za razrješenje produktivne infekcije MCMV-om u mozgu.

Slika 19. Citolitički proteini potrebni su za nadzor produktivne infekcije MCMV-om u perifernim organima.

Slika 20. Uloga citokina TNF- α u razrješenje produktivne infekcije MCMV-om u mozgu i perifernim organima.

Slika 21. Uloga citokina IFN- γ u razrješenje produktivne infekcije MCMV-om u mozgu i perifernim organima.

Slika 22. Imunohistokemijska analiza infekcije MCMV-om u mozgu miševa IFN- γ ^{-/-}.

Slika 23. Uloga citokina IL-12 u razrješenju produktivne infekcije MCMV-om u mozgu i perifernim organima.

Slika 24. Uloga citokina IFN- γ u nadzoru infekcije HCMV-om u stanicama neurona SH-SY5Y.

Slika 25. Infekcija hfOBSC-a s HCMV-om.

Slika 26. Citokin IFN- γ inhibira infekciju ljudskih neurona HCMV-om u tkivu fetalnog mozga.

Slika 27. Rekombinantni virus MCMV-GFP_Cre.

Slika 28. Neuronu su mjesta latentne infekcije MCMV-om.

Slika 29. Reaktivacija MCMV-a iz *ex vivo* tkivnih eksplantata.

Slika 30. CD4⁺ limfociti T su prisutni u hipokampusu latentno inficiranih životinja.

Slika 31. Reaktivacija i širenje MCMV-a uslijed gubitka imunološke nadzor u mozgu.

Slika 32. Hipokampus je glavno mjesto reaktivacije MCMV-a uslijed gubitka imunološkog nadzora.

Slika 33. Reaktivacija MCMV-a u neuronima uslijed gubitka imunološkog nadzora.

POPIS TABLICA

Tablica 2. Popis korištenih mišjih sojeva

Tablica 2. Popis korištenih virusa

Tablica 3. Korišteni mediji, otopine i puferi

Tablica 4. Korištena primarna protutijela u imunohistokemiji i protočnoj citometriji

Tablica 5. Popis protutijela korištenih za uklanjanje skupina stanica

Tablica 6. Popis sekundarnih protutijela korištenih u imunohistokemiji

Tablica 7. Slijed nukleotida početnica korištenih za određivanje genotipa miševa.

Tablica 8. Slijed nukleotida početnica koje su korištene za detekcija virusnog gena *gB* i mišjeg gena *Pthrp*.

Tablica 9. Korišteni reagensi u imunohistokemijskim metodama

Tablica 10. Tablica ostalih kemikalija i rekombinantnih proteina

Tablica 11. Uvjeti i program reakcije korištene za dokazivanje alela *GFAP77.6-Cre*

Tablica 12. Uvjeti i program reakcije korištene za dokazivanje alela *Sall1-Cre*

Tablica 13. Uvjeti i program reakcije korištene za dokazivanje alela *BAF53b-Cre*

Tablica 14. Program reakcije korištene za kvantifikaciju broja virusnih genoma

POPIS POKRATA

aCSF - Umjetni cerebrospinalni likvor (engl. *Artificial cerebrospinal fluid*)

AD - Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*)

ADCP - Stanična fagocitoza ovisna o antitijelima (engl. *antibody-dependent cellular phagocytosis*)

AIDS - Sindromom stečene imunodeficijencije (engl. *acquired immune deficiency syndrome*)

BAC - Bakterijski umjetni kromosom (engl. *bacterial artificial chromosome*)

BBB - Krvno-moždana barijera (engl. *blood-brain barrier*)

BDNF - Moždani neurotrofni čimbenik (engl. *Brain-derived neurotrophic factor*)

Ca²⁺ - Kalcij

cAMP - Ciklički adenzin-monofosfat (engl. *Cyclic adenosine monophosphate*)

CCL2, CCL5, CCL21 - CC-kemokinski ligand 2/5/21 (engl. *C-C Motif Chemokine Ligand 2/5/21*)

CCR9 - C-C kemokinski receptor tipa 9 (engl. *C-C chemokine receptor type 9*)

cHCMV - prirođeni HCMV (engl. *Congenital HCMV*)

CMV - Citomegalovirus (engl. *cytomegalovirus*)

CSF - Cerebrospinalni likvor (engl. *cerebrospinal fluid*)

CXCL10 - CXC-kemokinski ligand 10 (engl. *C-X-C motif chemokine ligand 10*)

CXCR3 - CXC-kemokinski receptor 3 (engl. *C-X-C Motif Chemokine Receptor 3*)

DMEM - Dulbeccov modificirani minimalni esencijalni medij (engl. *Dulbecco's modified Eagle medium*)

E - rani geni (engl. *early genes*)

EBV - Epstein-Barr virus

EGFP - Pojačani zeleni fluorescentni protein (engl. *Enhanced green fluorescent protein*)

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

GFAP - Glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. *Glial fibrillary acidic protein*)

GNP – Prekursorke stanice granularnih neurona (engl. *granule neuron precursor cells*)

GPCMV - CMV zamorca (engl. *guinea pig CMV*)

HCMV - Humani citomegalovirus (engl. *Human cytomegalovirus*)

Hes1 - Transkripcijski faktor dlakavi i pojačivač split-1 (engl. *hairy and enhancer of split-1*)

hfOBSC - Organotipska kultura tkiva ljudskog fetalnog mozga (engl. *Human fetal organotypic brain slice cultures*)

HHV-5 - Humani herpesvirus 5 (engl. *Human herpesvirus 5*)

HIV - Virus humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*)

HOG - Stanična linija ljudskog oligodendroglioma (engl. *Human Oligodendroglioma Cell Line*)

HRP - Hrenova peroksidaza (engl. *Horseradish peroxidase*)

i.c.- Intrakranijalno (engl. *Intracranial*)

i.g.- Intragastrično (engl. *Intragastric*)

i.n.- Intranazalno

i.p.- Intraperitonealno

i.v.- Intravenozno

IE - Neposredno rani geni (engl. *immediate early genes*)

IE1 - Neposredni rani protein 1 (engl. *Immediate early protein 1*)

IFIT1 - Protein induciran interferonom s ponavljanjem tetratrikoptida 1 (engl. *Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 1*)

IFN-β - Interferon beta

IFN-γ - Interferon gama

IGL - Unutarnji zrnati sloj (engl. *internal granular layer*)

IL- Interleukin

ILC - Urođene limfoidne stanice (engl. *innate lymphoid cells*)

iPSC - Inducirane pluripotentne matične stanice (engl. *induced pluripotent stem cells*)

IRF-1/7 - Interferonski regulatorni faktor 1/7 (engl. *Interferon regulatory factor 1/7*)

JHMOV - Soj J virusa mišjeg hepatitisa (engl. *JHM strain of mouse hepatitis virus*)

L - Kasni geni (engl. *late genes*)

MCMV - Mišji citomegalovirus (engl. *mouse cytomegalovirus*)

MEF - Mišji embrionalni fibroblasti (engl. *mouse embryonic fibroblast*)

MHC - Glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. *Major histocompatibility complex*)

MIEP - Neposredni rani promotor (engl. *major immediate-early promoter*)

ML - Molekularni sloj (engl. *molecular layer*)

MS - Multipla skleroza (engl. *Multiple sclerosis*)

MV - Virus ospice (engl. *Measles virus*)

NSPC - Neuralne matične i prekursorske stanice (engl. *Neural stem precursor cells*)

NT3 - Neurotrofin-3 (engl. *Neurotrophin 3*)

PBS - Puferirana fiziološka otopina (engl. *phosphate-buffered saline*)

PCR - Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PD1 - Protein programirane stanične smrti 1 (engl. *Programmed cell death protein 1*)

PD-L1 - Ligand programirane stanične smrti 1 (engl. *Programmed death-ligand 1*)

PFU - Infektivne virusne čestice (engl. *plaque forming units*)

PND - Postnatalni dan

PrP - Stanični prionski protein (engl. *cellular prion protein*)

PRR - Receptori za prepoznavanje uzoraka (engl. *pattern recognition receptors*)

PŽS - Periferni živčani sustav

qPCR - Kvantitativni PCR (engl. *Quantitative PCR*)

RCMV - CMV štakora (engl. *Rat CMV*)

RhCMV - Rezuz makak CMV (engl. *Rhesus CMV*)

RPMC - Mezenhimalne stanice crvene pulpe (engl. *Red pulp mesenchymal cells*)

SHH - Signalna put Sonic hedgehog (engl. *Sonic hedgehog pathway*)

SNHL - Sensorineuralni gubitak sluha (engl. *sensorineural hearing loss*)

SOCS3 - Supresor signalizacije citokina 3 (engl. *suppressor of cytokine signaling 3*)

Stanice NK - Prirodnoubilačke stanice (engl. *Natural killer cells*)

STAT1 - Transduktor signala i aktivator transkripcije 1 (engl. *Signal transducer and activator of transcription 1*)

SVZ - Subventrikularna zona (engl. *subventricular zones*)

SŽŠ - Središnji živčani sustav

T-bet - T-box protein u limfocitima T (engl. *T-box protein in T cells*)

TCR - receptor limfocita T (engl. *T-cell receptor*)

T_H1 - pomoćnički limfociti T1 (engl. *T helper 1 cells*)

TLR - Toll-u slični receptori (engl. *Toll-like receptors*)

TNFRp55 - receptora faktora nekroze tumora p55 (engl. *Tumor Necrosis Factor Receptor p55*)

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

T_{RM} - Tkivno-rezidentni memorijski limfociti T (engl. *tissue-resident memory phenotype*)

UPW - Ultra čiste vode (engl. *ultra pure water*)

USP18 - Ubikvitin specifična peptidaza 18 (engl. *Ubiquitin specific peptidase 18*)

VSV - Virus vezikularnog stomatitisa (engl. *Vesicular stomatitis virus*)

VZV- Varicella zoster virus

ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI

IME I PREZIME: Fran Krstanović

DATUM ROĐENJA: 09.10.1994.

ADRESA: Ivana Dežmana 8, 51000, Rijeka

ELEKTRONIČKA POŠTA: fran.krstanovic@uniri.hr

TELEFON: + 385 51 554-916

ŠKOLOVANJE

2017.-2019. Ljubljana, Slovenija

Magistar biokemije, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Sveučilište u Ljubljani, Slovenija

2013.-2017. Ljubljana, Slovenija

Sveučilišni prvostupnik biokemije, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Sveučilište u Ljubljani, Slovenija

RADNO ISKUSTVO

Rujan 2020. - sada

Doktorand u suradničkom zvanju i na radnom mjestu asistenta na projektu

Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Centar za proteomiku

Siječanj 2020. - kolovoz 2020.

Viši stručni suradnik u sustavu znanosti i visokom obrazovanju

Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Centar za proteomiku

USAVRŠAVANJA

1. 6.2024. - 7.2024. Cardiff, Wales.

Division of Infection & Immunity, School of Medicine, Cardiff University

2. 10.2023. - 12.2023. Rotterdam, Nizozemska

Department Viroscience, Erasmus MC

3. 5.2023. - 6.2023. Braunschweig, Njemačka

Helmholtz Centre for Infection Research / Technical University of Braunschweig

4. 1.2022. - 3.2022., Rotterdam, Nizozemska

Department Viroscience, Erasmus MC

SUDJELOVANJE NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

1. Simpozij CROSCIENCE2024, Rijeka, Hrvatska (2024., poster prezentacija)

2. 17th Mini-Herpesvirus Workshop, Braunschweig, Njemačka (2024., poster i usmena prezentacija)

3. "Science and Us" 2nd Biomedicine and healthcare congress for PhD students, Rijeka, Hrvatska (2024., poster prezentacija)

4. Godišnji skup Hrvatskog imunološkog društva, Brijuni, Hrvatska (2023., poster prezentacija)

5. 7th Rijeka forum on neurodegenerative diseases, Rijeka, Hrvatska (2023., poster prezentacija)

6. FENS Winter School on "Neuro-immune interactions in health and disease", Obergurgl, Austrija (2023., poster prezentacija)

7. Godišnji skup Hrvatskog imunološkog društva, Sv.Martin, Hrvatska (2022., poster prezentacija)

8. Cell Symposia: The Neuro-Immune Axis, Lisabon, Portugal (2022., poster prezentacija)

9. Joint ICGB ALS Society of Canada Symposium on Inflammation & Proteinopathy in ALS/FTD Spectrum Disorder, Rijeka, Hrvatska (2022., poster prezentacija)

10. First 5 years of the CerVirVac: Symposium, Rijeka, Hrvatska (2022., poster i usmena prezentacija)

11. Godišnji skup Hrvatskog imunološkog društva, Trogir, Hrvatska (2021., poster i usmena prezentacija)

12. 4th Slovenian Toxicology Congress, Ljubljana, Slovenija (2019., poster prezentacija)

PUBLIKACIJE

1. Krstanović, F.; Mihalić, A.; Šakota, L.; Lisnić, B.; Jonjić, S.; Brizić, I. Susceptibility of Mouse Brain to MCMV Infection and Neuroinflammation During Ontogeny. *Pathogens* 2024, 13, 1108. <https://doi.org/10.3390/pathogens13121108>

2. Maaß, H., Ynga-Durand, M., Milošević, M. *et al.* Serum cytokine dysregulation signatures associated with COVID-19 outcomes in high mortality intensive care unit cohorts across pandemic waves and variants. *Sci Rep* **14**, 13605 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-64384-y>

3. Binder, L. B., Rosa, P. B., de Sousa, B. M., Chagas, L. S., Dubljević, O., Martineau, F. S., Mottarlini, F., Castany, S., Morton, L., Krstanović, F., Tassinari, I. D., Choconta, J. L., Pereira-Santos, A. R., Weinhard, L., Pallegar, P. N., Vahsen, B. F., Lepiarz-Raba, I., Compagnion, A.-C., & Lorente-Picón, M. (2024). Neuro-immune interactions in health and disease: Insights from FENS-Hertie 2022 Winter School. *European Journal of Neuroscience*, 59(8), 1977–1992. <https://doi.org/10.1111/ejn.16262>

4. Sitnik, K.M., Krstanović, F., Gödecke, N. *et al.* Fibroblasts are a site of murine cytomegalovirus lytic replication and Stat1-dependent latent persistence in vivo. *Nat Commun* 14, 3087 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38449-x>

5. Brizić, I., Lisnić, B., Krstanović, F., Brune, W., Hengel, H., & Jonjić, S. (2022). Mouse models for cytomegalovirus infections in newborns and adults. *Current Protocols*, 2, e537. doi: 10.1002/cpz1.537

6. Brlić, P.K.; Pavletić, M.; Lerga, M.; Krstanović, F.; Matešić, M.P.; Miklić, K.; Malić, S.; Mikša, L.; Pajcur, M.; Peruč, D.; *et al.* SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Antibody Response in Vaccinated Croatian Healthcare Workers and Infected Hospitalized Patients: A Single Center Cohort Study. *Viruses* 2022, 14, 1966. <https://doi.org/10.3390/v14091966>

7. Ynga-Durand, M.; Maaß, H.; Milošević, M.; Krstanović, F.; Pribanić Matešić, M.; Jonjić, S.; Protić, A.; Brizić, I.; Šustić, A.; Čičin-Šain, L. SARS-CoV-2 Viral Load in the Pulmonary

Compartment of Critically Ill COVID-19 Patients Correlates with Viral Serum Load and Fatal Outcomes. *Viruses* 2022, 14, 1292. <https://doi.org/10.3390/v14061292>

8. Dobovišek, L., Novak, M., Krstanović, F., Borštnar, S., Lah Turnšek, T., Debeljak, N. Effect of combining CBD with standard breast cancer therapeutics. *Advances in Cancer Biology – Metastasis*. 2022. doi: 10.1016/j.adcanc.2022.100038

9. Schubert, M., Bertoglio, F., Steinke, S. et al. Human serum from SARS-CoV-2-vaccinated and COVID-19 patients shows reduced binding to the RBD of SARS-CoV-2 Omicron variant. *BMC Med* 20, 102 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02312-5>

10. Kveštak D, Juranić Lisnić V, Lisnić B, Tomac J, Golemac M, Brizić I, Indenbirken D, Cokarić Brdovčak M, Bernardini G, Krstanović F, Rožmanić C, Grundhoff A, Krmpotić A, Britt WJ, Jonjić S: NK/ILC1 cells mediate neuroinflammation and brain pathology following congenital CMV infection. *Journal of Experimental Medicine*, 218(5):e20201503. doi: 10.1084/jem.20201503. 2021

11. Krstanović F, Britt WJ, Jonjić S, Brizić I: Cytomegalovirus Infection and Inflammation in Developing Brain. *Viruses*, 13(6):1078. doi: 10.3390/v13061078. 2021

12. Dobovišek, L.; Krstanović, F.; Borštnar, S.; Debeljak, N. Cannabinoids and Hormone Receptor-Positive Breast Cancer Treatment. *Cancers* 2020, 12, 525. <https://doi.org/10.3390/cancers12030525>

STIPENDIJE

2021. -Short-term fellowships EFIS and Immunology Letters (IL)

2024. -Erasmus+ Staff Training Mobility

2024. -Fond PROMETEJ, Zaklada Sveučilišta u Rijeci

2024. -Taith Inward Mobility grant, Sveučilište u Cardiffu

NAGRADE

2023.- Državne nagrade za znanost za popularizaciju i promidžbu znanosti iz područja Biomedicine i zdravstva.

2023. -Zahvalnica Rektorice Sveučilišta u Rijeci

2023. -Nagrada za 1.mjesto Bright Spark award- Godišnji skup Hrvatskog imunološkog društva, Brijuni, Hrvatska

2021.-Zahvalnica Rektorice Sveučilišta u Rijeci

2021. -Nagrada za 2. mjesto najbolje poster prezentacije znanstvenog rada - Godišnji skup Hrvatskog imunološkog društva, Trogir, Hrvatska

ČLANSTVA

2020. -danas

Hrvatsko imunološko društvo