SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Andrea Mihalić

KARAKTERIZACIJA MIKROGLIJA I ASTROCITA U MOZGU TIJEKOM LATENTNE CITOMEGALOVIRUSNE INFEKCIJE

Doktorski rad

Rijeka, 2026.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Andrea Mihalić

KARAKTERIZACIJA MIKROGLIJA I ASTROCITA U MOZGU TIJEKOM LATENTNE CITOMEGALOVIRUSNE INFEKCIJE

Doktorski rad

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

Rijeka, 2026.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE

Andrea Mihalić

CHARACTERIZATION OF MICROGLIA AND ASTROCYTES IN THE BRAIN DURING LATENT CYTOMEGALOVIRUS INFECTION

Doctoral Thesis

Rijeka, 2026

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

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

1. Izv.prof.dr.sc. Vanda Juranić Lisnić
2. Izv.prof.dr.sc. Irena Slavuljica, dr.med.
3. Prof. dr. sc. Goran Tešović, dr.med.

Rad ima x listova.

UDK:_____

Doktorski 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 poslijediplomskog doktorskog studija „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Rad je izrađen u sklopu projekata: „Biologija citomegalovirusne infekcije u mozgu tijekom razvoja i u latenciji” (PZS-2019-02-7879– voditelj Ilija Brizić) Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) i Europskog socijalnog fonda, HRZZ projekta „Latencija citomegalovirusa u središnjem živčanom sustavu“ (IP-2022-10-3371– voditelj Ilija Brizić), te sredstvima u okviru projekta „Jačanje kapaciteta CerVirVac-a za istraživanje virusne imunologije i vakcinologije“ (KK.01.1.1.01.0006) i sredstvima iz projekta „Znanstveni centar izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva (CerVirVac)“ (PK.1.1.10.0006).

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Prirođena infekcija humanim citomegalovirusom (HCMV) je najčešća prirođena infekcija koja može rezultirati oštećenjima središnjeg živčanog sustava (SŽS). Uloga glija-stanica u imunološkom odgovoru i nadzoru latentnog CMV-a u mozgu je nedovoljno istražena, stoga je cilj ovog rada odrediti ulogu mikroglije i astrocita tijekom latentne faze infekcije CMV-om.

Materijali i metode: U sklopu istraživanja koristili smo mišji model prirođene infekcije CMV-om, u kojem su novookoćeni miševi inficirani mišjim citomegalovirusom (MCMV). Koristili smo divlji soj MCMV-a, divlji soj miševa, te transgenične sojeve miševa. Za uklanjanje populacije mikroglije upotrijebili smo inhibitor PLX5622. Protuvirusni lijek ganciklovir smo koristili za protuvirusni tretman. Osim mišjeg modela, koristili smo tkiva mozgova inficiranih fetusa HCMV-om te organotipske kulture mozga. Koristili smo metode protočne citometrije, testa virusnih čistina, kvantitativnog PCR-a, konfokalne mikroskopije, RNA sekvencioniranja, elektrofiziološka mjerenja, te testa prostornog pamćenja za glodavce Barnesov labirint.

Rezultati: Naši rezultati ukazuju da je mikroglija kronično aktivirana tijekom latencije MCMV-a u mozgu, posebice u hipokampusu, te karakterizirana snažnim izražajm proupalnih gena. Interferon gama (IFN-γ), kojeg kontinuirano proizvode tkivno-rezidentni memorijski (T_{RM}) CD8 limfociti T, je jedan od čimbenika koji održava kroničnu aktivaciju mikroglije. Protuvirusni tretman može spriječiti trajnu aktivaciju mikroglije ukoliko se primjeni rano tijekom akutne infekcije. Nadalje, pokazali smo da je aktivirana mikroglija ključna za nadzor latentne infekcije u mozgu. Međutim, kronično aktivirana mikroglija dovodi do smanjenja sinaptičke povezanosti neurona u regiji CA1 hipokampusa, što rezultira poremećajem u kognitivnim sposobnostima miševa.

Zaključak: Latentna infekcija MCMV-om u mozgu dovodi do kronične aktivacije mikroglije, koja posreduje nadzoru virusa te imunopatologiju. Ova otkrića otvaraju nova pitanja o ulozi herpesvirusa u kroničnoj upali u mozgu, koja potencijalno može biti ciljana u terapeutske svrhe.

Ključne riječi: mikroglija, astrociti, citomegalovirus, prirođena infekcija, latencija, sinapse

SUMMARY

Objectives: Congenital infection with human cytomegalovirus (HCMV) is the most common congenital infection and can result in severe damage to the central nervous system (CNS). The role of glial cells in the immune response and in the surveillance of latent CMV infection in the brain remains poorly understood. Therefore, the aim of this study was to determine the roles of microglia and astrocytes during CMV latency.

Materials and Methods: We employed a murine model of congenital CMV infection, in which newborn mice were infected with murine cytomegalovirus (MCMV). We used wild-type MCMV, wild-type mice, and transgenic mouse strains, CSF1R inhibitor PLX5622 for microglial depletion and antiviral drug ganciclovir for antiviral treatment. In addition to the murine model, we analyzed brain tissue from HCMV-infected human fetuses and organotypic brain slice cultures. We used flow cytometry, plaque assay, quantitative PCR (qPCR), confocal microscopy, RNA sequencing, electrophysiological recordings, and Barnes maze test for assessing spatial memory in rodents.

Results: Our findings demonstrate that microglia are chronically activated during latent MCMV infection in the brain, particularly within the hippocampus, and are characterized by robust expression of pro-inflammatory genes. Interferon-gamma (IFN-γ), continuously produced by tissue-resident memory (T_{RM}) CD8 T cells, sustains chronic activation. Antiviral treatment can prevent persistent microglial activation when administered early during the acute phase of infection. Furthermore, we showed that activated microglia are essential for the surveillance of latent viral infection in the brain, however at the same time reduce synaptic connectivity of neurons in the CA1 region of the hippocampus, leading to impaired cognitive function in mice during latency.

Conclusions: Latent MCMV infection in the brain induces chronic microglial activation, which mediates both viral surveillance and immunopathology. These findings raise important questions regarding the contribution of herpesviruses to chronic neuroinflammation and suggest potential therapeutic targets for preventing or modulating virus-associated neurological damage.

Keywords: microglia, astrocytes, cytomegalovirus, congenital infection, latency, synapses

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1

1.1. Uloga mikroglije i astrocita u virusnim infekcijama SŽS-a 1

1.1.1. Virusne infekcije SŽS-a 1

1.1.2. Hipokampus 2

1.1.3. Uloga mikroglije u nadzoru neurotropnih infekcija u SŽS-u 3

1.1.4. Uloga astrocita u nadzoru neurotropnih infekcija u SŽS-u 5

1.1.5. Perzistentne virusne infekcije i neurodegeneracija 8

1.2. Citomegalovirus (CMV) 10

1.2.1. Prirođena infekcija HCMV-om 11

1.2.2. Mišji model prirođene infekcije CMV-om 13

1.2.3. Imunološki odgovor u mozgu tijekom prirođene infekcije MCMV-om 13

1.2.4. Latencija citomegalovirusa 16

1.2.5. Neurološke i psihijatrijske posljedice infekcije HCMV-om 16

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 18

3. MATERIJALI I METODE 19

3.1. Materijali 19

3.1.1. Laboratorijske životinje 19

3.1.2. Stanične linije 20

3.1.3. Virusi 20

3.1.4. Humani uzorci 21

3.1.5. Mediji, otopine i reagensi 21

3.1.6. Početnice 24

3.1.7. Protutijela i reagensi 25

3.1.8. Citokini i reagensi za stimulaciju 29

3.1.9. Reagensi za protočnu citometriju i imunofluorescenciju 29

3.2. Metode 31

3.2.1. Proizvodnja virusa 31

3.2.2. Križanje mišjih sojeva 31

3.2.3. Sakupljanje tkiva mišjeg repa u svrhu određivanja genotipa 33

3.2.4. Izolacija DNA iz mišjeg repa u svrhu određivanja genotipa 33

3.2.5. Određivanje genotipa miševa metodom PCR-a 33

3.2.6. Gel-elektroforeza 35

3.2.7. Infekcija miševa 35

3.2.8. Uklanjanje populacije mikroglije 35
3.2.9. Neutralizacija IFN-γ i blokiranje receptora za IFN-γ 36
3.2.10. Protuvirusni tretman miševa 36
3.2.11. Određivanje titra virusa u organima 36
3.2.12. Izolacija stanica iz organa 37
3.2.13. Određivanje broja stanica 38
3.2.14. Analiza stanica metodom protočne citometrije 39
3.2.15. Analiza proizvodnje IFN-γ metodom protočne citometrije 39
3.2.16. Konfokalna mikroskopija 40
3.2.17. Snimanje pojedinačnih stanica i analiza mikroglije 41
3.2.18. Organotipske kulture ljudskog fetalnog mozga 42
3.2.19. Golgi-Cox bojanje 42
3.2.20. Analiza podataka dobivenih Golgi-Cox bojenjem 42
3.2.21. Intrakranijalna infekcija 43
3.2.22. Luminex® analiza citokina u mozgu 43
3.2.23. Izolacija DNA i RNA iz mozgova 43
3.2.24. Reverzna transkripcija 44
3.2.25. Kvantitativni PCR (qPCR) 44
3.2.26. Priprema uzoraka i biblioteke za sekvencioniranje RNA na razini pojedinačnih stanica (engl. *Single-cell RNA sequencing*) 46
3.2.27. Priprema uzorka, kontrola kvalitete izolirane RNA i sekvencioniranje cjelokupne RNA 46
3.2.28. Analiza podataka dobivenih sekvencioniranjem RNA na razini pojedinačne stanice 47
3.2.29. Elektrofiziologija 48
3.2.30. Barnesov labirint 49
3.2.31. Statističke analize 49

4. REZULTATI 50

4.1. Pojačano izražavanje MHC-II molekula obilježje je aktivirane mikroglije tijekom akutne infekcije CMV-om u mozgu 50
4.2. Latentna infekcija MCMV-om mijenja upalni obrazac u mozgu 52
4.3. Perinatalna infekcija MCMV-om u SŽS-u uzrokuje dugotrajnu aktivaciju mikroglije 54
4.4. Latentna infekcija MCMV-om uzrokuje trajnu promjenu transkripcijskog profila mikroglije u mozgu 57
4.5. Analiza transkriptoma mikroglije i astrocita u latenciji na razini pojedinačnih stanica 60
4.6. Rani protuvirusni tretman smanjuje upalu u mozgu i aktivaciju mikroglije 62

4.7. Kontinuirana signalizacija posredovana citokinom IFN-γ tijekom latentne infekcije MCMV-om ključna je za održavanje izražaja molekula MHC-II na mikrogliji 65
4.8. Tkivno-rezidentni memorijski CD8 limfociti T su glavni izvor IFN-γ tijekom latencije MCMV-a u mozgu 67
4.9. Dugotrajno aktivirana mikroglija ima ulogu u nadzoru latentnog virusa u mozgu 69
4.10. Dugotrajno aktivirana mikroglija uzrokuje gubitak sinapsi u hipokampusu tijekom latencije MCMV-a 72
4.11. Dugotrajno aktivirana mikroglija posreduje gubitak sinaptičke plastičnosti neurona u hipokampusu 74
4.12. Dugotrajno aktivirana mikroglija uzrokuje poremećaj u kognitivnim sposobnostima inficiranih miševa 76
5. RASPRAVA 79
6. ZAKLJUČCI 87
7. LITERATURA 89
8. ILUSTRACIJE 108
8.1. POPIS SLIKA 108
8.2. POPIS TABLICA 110
8.3. POPIS POKRATA 111
9. ŽIVOTOPIS 117

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Uloga mikroglije i astrocita u virusnim infekcijama SŽS-a

Središnji živčani sustav (SŽS) čini mozak i leđna moždina, koji su okruženi zaštitnim anatomskim i fiziološkim barijerama, uključujući moždane ovojnice (meninge), krvno-moždanu barijeru, krvno-meningealnu barijeru te barijeru krv-cerebrospinalna tekućina [1,2]. Mozak je građen od neurona i glija-stanica [3]. Neuroni su specijalizirane stanice SŽS-a koje sudjeluju u primanju, obrađivanju te prijenosu informacija [4]. Neuroni se sastoje od dendrita, koji primaju signale od drugih neurona, te aksona, koji provode živčani signal. Komunikacija između neurona u SŽS-u se odvija putem sinapsi, specijaliziranih spojeva koji najčešće nastaju između završetaka aksona presinaptičkog neurona i dendritičkih spina, odnosno sitnih izdanaka na dendritima postsinaptičkog neurona [4,5]. Glija-stanice obuhvaćaju različite potporne stanične populacije, uključujući astrocite, oligodendrocite i mikrogliju. Dugi niz godina se smatralo da je mozak imunološki privilegirano mjesto, kako bi se očuvao integritet tkiva s ograničenom sposobnošću regeneracije [1]. Međutim, istraživanja pokazuju da različita patološka stanja, poput virusnih infekcija, autoimunih upala i neurodegeneracije, mogu potaknuti jak imunološki odgovor u parenhimu SŽS-a. S druge strane, poznato je da i u fiziološkim uvjetima moždane ovojnice sadrže raznolike populacije imunoloških stanica koje nisu prisutne u parenhimu mozga [1]. Također, unutar ventrikula u mozgu se nalazi i koroidni splet (engl. *choroid plexus*) koji je izrazito imunološki aktivno mjesto, sadrži različite populacije stanica i krvno-cerebrospinalnu barijeru [6].

1.1.1. Virusne infekcije SŽS-a

Neurotropni virusi mogu preći krvno-moždanu barijeru i inficirati SŽS, te uzrokovati upalu u mozgu (encefalitis), upalu moždanih ovojnica (meningitis) i leđne moždine (mijelitis) [7]. Primjeri neurotropnih virusa su flavivirusi (Virus Zapadnog Nila, Japanski encefalitis, Zika virus), arbovirusi (Virus krpeljnog encefalitisa) te herpesvirusi (herpes simpleks virusi tipa 1 (engl. HSV-1, *Herpes simplex virus type 1*), citomegalovirus (engl. CMV, *cytomegalovirus*)) [7]. Mnogi virusi koji se ne smatraju klasičnim neurotropnim virusima, kao što je virus influence [5], SARS-CoV-2 [8], virus humane imunodeficijencije (engl. HIV, *human immunodeficiency virus*) [9] i hepatitis C [10], također mogu uzrokovati infekciju SŽS-a. Nadalje, pojedini virusi perzistiraju u

SŽS-u dugo nakon razrješenja akutne infekcije [7]. Perzistencija virusa je praćena kroničnom upalom u mozgu, koja se povezuje sa nastankom trajnih oštećenja u SŽS-u, uključujući motoričke deficite, kognitivne poremećaje te poremećaje u ponašanju [7]. Istraživanja su također pokazala povezanost virusnih infekcija i kronične upale u mozgu sa razvojem neurodegenerativnih bolesti [11–13].

1.1.2. Hipokampus

Hipokampus je struktura mozga koja se nalazi duboko u sljepoočnom režnju [14], te je važan za procese učenja i pamćenja, formiranja dugoročne memorije te regulacije različitih emocija, poput straha, anksioznosti i stresa [15]. Hipokampus sadrži „trisinaptičku petlju“ koja predstavlja ključni put prijenosa neuralnih informacija, čine ju dentatni girus (engl. DG, *dentate gyrus*), te regije Amonovog roga (engl. CA, *Cornu Ammonis*) CA1, CA2 i CA3 [14,16]. Ulazni neuralni signali dolaze do DG regije hipokampusa iz moždane kore (engl. *cortex*), potom prelaze u regiju CA3, te se završno prenose u regiju CA1, iz koje ponovno ulaze u moždanu koru [14]. Karakteristika hipokampusa je izrazita plastičnost neurona što uključuje razne modifikacije morfologije i broja dendritičkih spina, te stvaranja ili uklanjanja sinapsi [15]. Međutim, izrazito visok stupanj plastičnosti neurona u hipokampusu dovodi do povećane osjetljivosti hipokampusa na patološka stanja, uključujući kroničnu upalu i stres, neurodegeneraciju i starenje, što upućuje da ključna intrinzična svojstva neurona u hipokampusu istodobno mogu povećati njihovu podložnost oštećenjima koja nastaju tijekom odgovora i adaptacije na različita patološka stanja SŽS-a. Pokazano je kako je regija CA1 sa najvećom plastičnosti neurona, stoga je i najviše pogođena tijekom patoloških stanja [15,17]. Tijekom kronične upale u mozgu, razni upalni mehanizmi i proupalni citokini mogu dodatno pojačati osjetljivost neurona u hipokampusu, naročito u regiji CA1 [17]. Regija CA1 hipokampusa sadrži piramidalne neurone, za kojih je također pokazano da su izrazito podložni infekcijama u ranoj fazi života što uvelike mijenja njihova elektrofiziološka svojstva [18]. Iako virusne infekcije zahvaćaju različite regije mozga [7], mnogi neurotropni virusi imaju izražen tropizam za hipokampus, uključujući infekcije HSV-1-om [19], Zika virusom [20], virusom Zapadnog Nila [21], virusom influence [22] te CMV-om [23–25].

1.1.3. Uloga mikroglije u nadzoru neurotropnih infekcija u SŽS-u

Mikroglija je populacija rezidentnih imunoloških stanica prisutna u moždanom parenhimu [26]. Sudjeluje u brojnim procesima važnim za razvoj mozga i održavanje homeostaze u SŽS-u, te čini približno 10–15 % ukupne stanične populacije mozga [27–29]. Mikroglija se od ostalih stanica SŽS-a razlikuje po podrijetlu [27,30]. U miševa se razvija iz eritromijeloidnih prekursorskih stanica žumanjčane vreće tijekom ranog embrionalnog razvoja te kolonizira moždani parenhim između embrionalnih dana 8.5-9.5. Za razliku od mikroglije, neuroni, astrociti i oligodendrociti potječu iz neuralnih matičnih prekursorskih stanica [31]. Funkcija i fenotip mikroglije se razlikuju ovisno o razvojnoj fazi mozga, regiji mozga u kojoj se nalaze i patološkom stanju, što ukazuje na izrazitu heterogenost ove stanične populacije [30]. Mikroglija dijeli određene fenotipske karakteristike s makrofagima i izražava mijeloidne markere, te također obavlja funkciju fagocitiranja [30]. Međutim, zbog svojeg različitog razvojnog podrijetla, jedinstvenog homeostatskog fenotipa i stroge regulacije signalima iz mikrookoliša SŽS-a, mikroglija se razlikuje od ostalih tkivno-rezidentnih makrofaga [32].

Mikroglija pokazuje veliku heterogenost aktivacijskih i funkcionalnih profila tijekom različitih patoloških stanja u SŽS-u [30,33], pri čemu je odgovor mikroglije usko vezan za pojedino patološko stanje [33,34]. Brojna istraživanja odredila su transkriptom mikroglije u pojedinim patološkim stanjima SŽS-a [30,32,35–37], te pokazala da mikroglija može poprimiti različite molekularne profile, koje se razlikuju između pojedinih patoloških stanja i između različitih regija mozga, te ukazale da ovisno o kontekstu mikroglija može imati zaštitnu ili patološku ulogu [38]. Uslijed patoloških stanja SŽS-a dolazi do aktivacije mikroglije [30], koja potom može dovesti do promjena u njezinim funkcionalnim svojstvima, uključujući modulaciju fagocitne aktivnosti te sintezu i otpuštanje različitih proupalnih čimbenika. Kao primarni izvor proupalnih citokina, mikroglija sudjeluje u upali u mozgu te regulira odgovor različitih imunoloških stanica [32], naročito tijekom virusnih infekcija SŽS-a [39]. Mikroglija također sudjeluje u uklanjanju viška sinapsi, procesu zvanom sinaptičko obrezivanje (engl. *synaptic pruning*), koje se odvija tijekom ranog razvoja SŽS-a i u odrasloj dobi [40]. Mikroglija proizvodi nekoliko čimbenika, kao što su inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (engl. IGF1, *insulin-like growth factor 1*), moždani neurotrofni čimbenik (engl. BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*), te čimbenik rasta živaca (engl. NGF, *nerve growth factor*), kojima oblikuje mreže neurona [30].

Mikroglija sadrži receptore za prepoznavanje obrazaca (engl. PRRs, *pattern recognition receptors*), uključujući Toll-u slične receptore (engl. TLR, *Toll-like receptor*) [30], kojima prepoznaje razne patogene (**Slika 1.**). Aktivirana mikroglija ispoljava klasične markere aktivacije, kao što su molekule glavnog kompleksa histokompatibilnosti (engl. MHC, *Major histocompatibility complex*) i kostimulacijske molekule CD80 i CD86 [27,38], te proizvode razne proupalne citokine, kao što je čimbenik nekroze tumora (engl. TNF-α, *tumor necrosis factor*), interferone tipa I (engl. IFN-I, *type I interferons*), kemokine CXCL9 i CXCL10 (engl. *C-X-C motif chemokine ligand 9 and 10*), te CC-kemokinski ligand 5 (engl. CCL5, *C-C Motif Chemokine Ligand 5*). Osim toga, aktivirana mikroglija proizvodi reaktivne kisikove vrste (engl. ROS, *reactive oxygen species*) i dušikov oksid (engl. NO, *nitric oxide*) čime doprinosi uklanjanju patogena uslijed infekcije [29,33]. Važna uloga mikroglije u nadzoru infekcije u mozgu je pokazana kod akutnih infekcija sa nekoliko virusa [41–46]. Primjerice, uklanjanje mikroglije uslijed infekcije virusom vezikularnog stomatitisa (engl. VSV, *vesicular stomatitis virus*) [41], virusom Dengue [45], neurotropnim koronavirusom [47], te flavivirusima [44] je dovelo do značajnog mortaliteta miševa i bržeg širenja virusa u mozgu. Međutim, mehanizmi putem kojih mikroglija doprinosi nadzoru virusnih infekcije još uvijek nisu potpuno razjašnjeni.

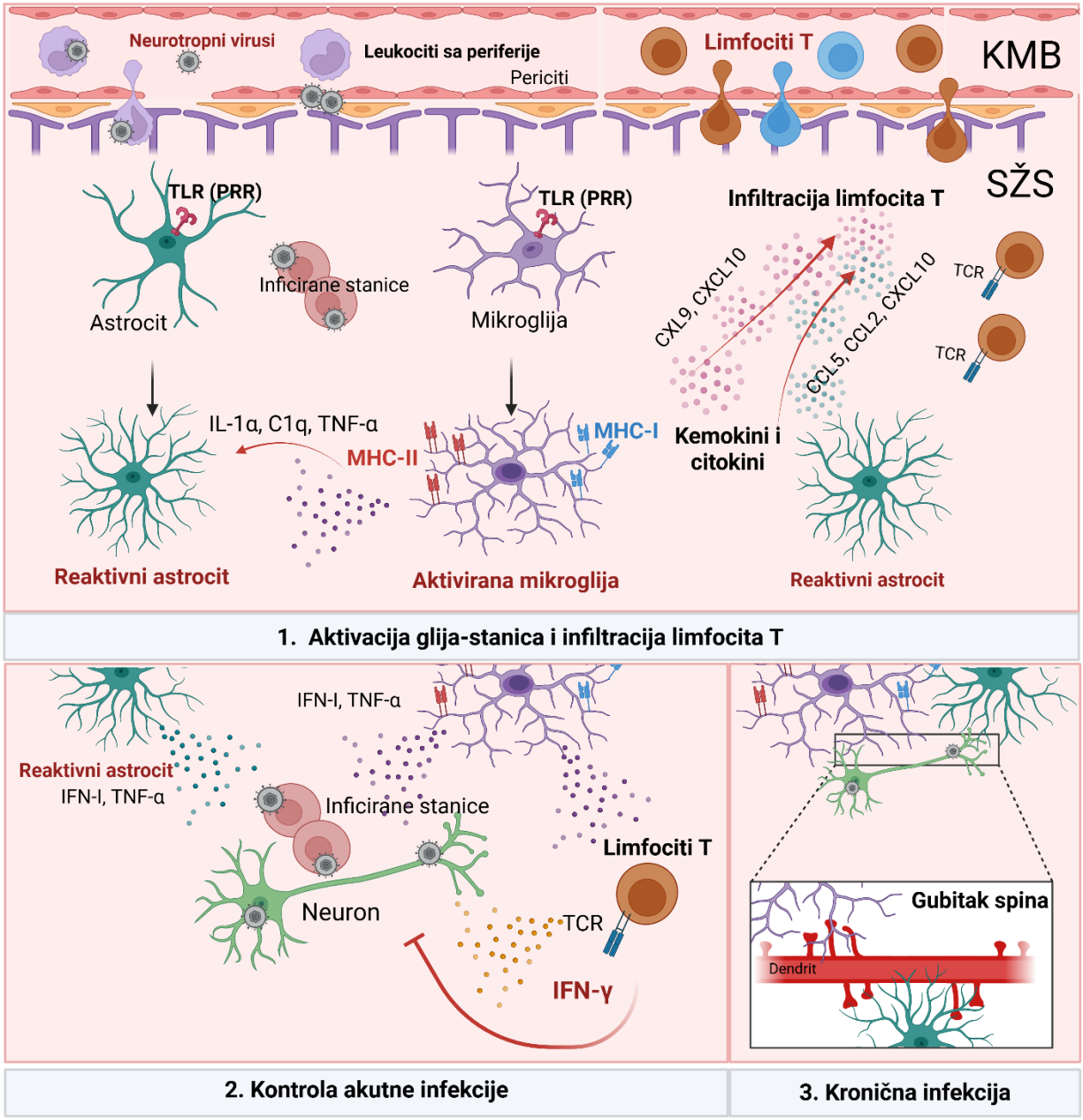
Unatoč razrješenju produktivne infekcije, virusne infekcije mozga često su praćene kroničnom upalom. To uključuje dugotrajnu aktivaciju mikroglije koja može posredovati oštećenja živčanog tkiva prekomjernom proizvodnjom proupalnih medijatora [29]. Kod infekcije flavivirusima, CD8 limfociti T koji perzistiraju u mozgu nakon razrješenja akutne infekcije proizvode IFN-γ koji aktivira mikrogliju, što posreduje gubitku sinapsi u hipokampusu i dovodi do kognitivnih poremećaja miševa [20]. Tijekom infekcije virusom Zapadnog Nila aktivirana mikroglija proizvodi komponentu komplementa C3, čime se potiče pojačano uklanjanje sinapsi u hipokampusu [21,40]. Posljedično dolazi do promjena u prostornoj memoriji i sposobnosti pamćenja kod miševa. U skladu s tim istraživanjima, kod pacijenata inficiranih virusom Zapadnog Nila su zabilježeni dugoročni poremećaji u kognitivnim sposobnostima, čak i godinu dana nakon pojave simptoma [48]. Infekcija miševa sa neurotropnim virusom influence dovodi do kronične upale u mozgu koja rezultira pojačanom aktivacijom mikroglije i uklanjanjem postsinaptičkih veza u regiji CA1 hipokampusa [49,50].

1.1.4. Uloga astrocita u nadzoru neurotropnih infekcija u SŽS-u

Astrociti su glija stanice koje se razvijaju iz neuralnih matičnih i prekursorskih stanica (engl. NSPC, *neural stem precursor cell*) [51]. Astrociti su najzastupljenija stanična populacija u mozgu, te osim potporne uloge, sudjeluju u drugim procesima važnima za razvoj mozga, imunološkom odgovoru i formiranju sinapsi [52,53]. Obzirom da su lokalizirani uz krvno-moždanu barijeru, astrociti sudjeluju u regulaciji protoka krvi, reguliraju propusnost barijere i transport iona [54]. Astrociti su uključeni u sintezu glikogena i metabolizmu neurona, njihovom razvoju i plastičnosti, te prijenosu neurotransmitera [51]. Astrociti su također heterogena stanična populacija, što se vidi na razini pojedinih regija mozga [55]. Naime, analiza subpopulacija astrocita iz moždane kore i hipokampusa odraslih miševa je pokazala raznolikost transkripcijskih profila astrocita, što odražava prisutnost morfološki i fiziološki različitih populacija astrocita u odraslom SŽS.

Iako su se dugo smatrali samo potpornim stanicama i imunološki neaktivnim stanicama SŽS-a, astrociti se mogu aktivirati u patološkim stanjima, kao što su akutne virusne infekcije SŽS-a [51] (**Slika 1.**). Obzirom na njihovu lokalizaciju, astrociti su među prvim stanicama SŽS-a izloženi infekcijama [56], te su time neizostavan dio urođene imunosti SŽS-a. Upala u mozgu može dovesti do narušavanja homeostaze astrocita i posljedično gubitka integriteta krvno-moždane barijere [3]. Astrociti također ispoljavaju PRR receptore, uključujući TLR-ove, kojima pokreću imunološki odgovor [51]. Mogu istodobno proizvoditi i odgovarati na širok raspon citokina, te kemokina i čimbenika rasta [51]. Astrociti luče interleukine 1 (IL-1), IL-6 i IL-10, interferone alfa i beta (IFN-α, IFN-β), TNF-α, kemokine poput CCL5/RANTES (engl. RANTES, *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*), monocitnog kemotaktičkog proteina-1/CCL2 (engl. MCP-1, *Monocyte chemoattractant protein-1*) i CXCL10, te čimbenike koji stimuliraju stvaranje kolonija GM-CSF (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), M-CSF (engl. *macrophage colony-stimulating factor*) i G-CSF (engl. *granulocyte colony-stimulating factor*) [57–59]. Tijekom akutnih infekcija u SŽS-u astrociti su glavni izvor IFN-I (naročito IFN-β), kojima ograničavaju širenje virusa [60,61] i reguliraju aktivaciju mikroglije [41]. Osim uloge u posredovanju imunološkog odgovora, signalizacija posredovana IFN-I na astrocitima je uključena u regulaciju sinaptičke plastičnosti u hipokampusu i formiranju pamćenja [62]. S druge strane, astrociti doprinose razrješenju upale i popravku ozlijeđenog tkiva [63]. Pokazano je kako signalizacija posredovana receptorom za IFN-γ (IFNGR) na

astrocitima pokazuje zaštitne učinke i smanjenje kronične upale u mišjem modelu eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (engl. EAE, *experimental autoimmune encephalomyelitis*) [64]. Upala u mozgu dovodi do promjene fenotipa astrocita u takozvane „reaktivne“ astrocite [65,66]. Reaktivnost astrocita je praćena povećanjem markera glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (engl. GFAP, *Glial fibrillary acidic protein*) [66]. Reaktivni astrociti pojačano proizvode proupalne čimbenike kojima utječu na tijek upale u SŽS-u [63], te pojačavaju proupalni odgovor mikroglije i pridonose proizvodnji neurotoksičnih čimbenika [30]. Osim kod akutnih infekcija, pokazano je kako perzistentni neurotropni virusi pokazuju tropizam prema astrocitima [57]. Primjerice, humani fetalni astrociti podržavaju kroničnu infekciju Zika virusom, te mogu proizvoditi virus i do mjesec dana [67]. Isto tako, astrociti služe kao dugotrajni izvor virusa Japanskog encefalitisa (engl. JEV, *Japanese encephalitis virus*) [68]. Reaktivni astrociti su zabilježeni dugo nakon razrješenja akutne infekcije virusom Zapadnog Nila [69] i infekcije Zika virusom u mozgu [70]. Također, uslijed infekcije neurotropnim virusom influence tipa A (IAV) astrociti su povećani gustoćom i pojačano ispoljavaju marker GFAP [49]. Tijekom kronične infekcije limfocitnim koriomeningitisom (engl. LCMV, *Lymphocytic choriomeningitis*) astrociti potaknuti djelovanjem IFN-I proizvode CXCL10, čime doprinose infiltraciji CD8 limfocita T i utječu na intenzitet upale u mozgu [71].



Slika 1. Uloga mikroglije i astrocita u virusnim infekcijama SŽS-a. Shematski prikaz širenja virusne infekcije u središnji živčani sustav (SŽS), aktivacije glija-stanica i imunološkog odgovora te mogućih zaštitnih i štetnih posljedica. **1.)** Nakon ulaska virusa u SŽS i infekcije stanica moždanog parenhima, virusni produkti su prepoznati od strane glija-stanica putem receptora za prepoznavanje uzoraka (engl. PRR, *pattern recognition receptors*), uključujući TLR-ove (engl. *Toll-like receptors*). Time se potiče aktivacija glija-stanica i drugih stanica imunološkog sustava. Aktivirana mikroglija povećava izražaj molekula MHC-II te otpušta različite proupalne citokine i kemokine, uključujući TNF-α, IFN-I, CXCL9, CXCL10 i CCL5. Oslobađanje proupalnih kemokina pridonosi stvaranju upalnog mikrookoliša i privlačenju imunoloških stanica, kao što su limfociti T, prema mjestu infekcije. **2.)** Infiltracija limfocita T iz krvno-moždane barijere (KMB) u parenhim mozga (SŽS) ograničava virusnu replikaciju i suzbija akutnu infekciju, no može dodatno aktivirati mikrogliju lučenjem IFN-γ. IFN-γ, zajedno s TNF-α, djeluje na inficirane stanice i pridonosi antivirusnom odgovoru. Istodobno, infekcija potiče reaktivnost astrocita,

koji mogu sudjelovati u regulaciji lokalnog upalnog odgovora i nadzoru infekcije, putem proizvodnje interferona tipa I, naročito interferona beta (IFN-β). **3.)** Uz zaštitni protuvirusni odgovor, kronična infekcija i posljedična aktivacija glija-stanica u mozgu može izazvati promjene u funkciji mikroglije i astrocita, obzirom da aktivirana mikroglija i reaktivni astrociti mogu sudjelovati u prekomjernom uklanjanju sinapsi tijekom kroničnih upala. Iako su procesi aktivacije značajno korisni tijekom akutne infekcije za nadzor neurotropnih virusa, u slučajevima dugotrajne aktivacije mogu pridonijeti poremećaju homeostaze sinapsi i oštećenju neuronskih mreža.

1.1.5. Perzistentne virusne infekcije i neurodegeneracija

Brojna istraživanja su ukazala na povezanost između virusnih infekcija i nastanka ili progresije neurodegenerativnih bolesti, kao što su Alzheimerova bolest (engl. AD, *Alzheimer disease*), Parkinsonova bolest (engl. PD, *Parkinson's disease*), amiotrofična lateralna skleroza (engl. ALS, *amyotrophic lateral sclerosis*) te multipla skleroza [11]. Mehanizmi razvoja patologije posredovane virusnom infekcijom tijekom neurodegeneracije još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, međutim poznato je da kronična upala ima ključnu ulogu u posredovanju tih patoloških procesa, naročito uslijed perzistentnih virusnih infekcija SŽS-a [7,72,73].

Infekcija humanim citomegalovirusom (engl. HCMV, *Human cytomegalovirus*) je povezana s razvojem umjerene do teške demencije, uključujući AD [74]. Osim HCMV-a, infekcija drugim herpesvirusom, HSV-1-om, također se povezuje s nastankom AD [12,75]. Tako je primjerice u jednoj studiji koja je analizirala post-mortem uzorke mozga pacijenata oboljelih od AD pokazano kako više od 90% amiloid-beta (Aβ) plakova sadržava DNA HSV-1-a [76], te je seropozitivnost na HSV-1 povezana sa povećanim rizikom od razvoja AD [75,77]. Također, prisutnost latentnog HSV-1-a u mozgu i pacijenata koji nose rizični alel APOE-ε4 (engl. *apolipoprotein E*) predstavlja visok rizik za razvoj AD [77]. Osim AD, pokazana je veća prevalencija virusne DNA HSV-1-a i varicella-zostera (engl. VZV, *varicella-zoster virus*) u bolesnika s Parkinsonovom bolešću, pri čemu je količina virusa značajno povezana sa težinom bolesti i povišenim razinama interleukina-6 (IL-6), što ukazuje na sistemsku upalu [78]. Brojne studije su pokazale kako infekcija Epstein Barr-ovim virusom (EBV) pridonosi razvoju i progresiji multiple skleroze (MS) [13]. Rizik od razvoja MS je drastično manji u osoba koje nisu zaražene EBV-om, dok se rizik povećava više od 30 puta nakon infekcije EBV-om [79]. Osim herpesvirusa, kronična infekcija SŽS-a sa virusom influence je također povezana sa razvojem AD [22,80]. U mišjem modelu AD periferna infekcija miševa virusom influence dovela je do izražene upale u SŽS-u, ubrzane

progresije neurodegeneracije i težih kognitivnih oštećenja [22]. Dodatno, infekcija WT miševa virusom influence dovodi do agregacije alfa-sinukleina (engl. *alpha-synuclein*) i gubitka dopaminergičnih neurona u crnoj tvari, čime se infekcija virusom influence povezuje sa razvojem Parkinsonove bolesti [80].

Obilježje kronične upale u SŽS-u je dugotrajna aktivacija mikroglije [81], koja posreduje patološkom gubitku sinapsi i razvoju kognitivnih poremećaja [82,83], tijekom neurodegeneracije [84], traumatske ozlijede mozga (engl. TBI, *traumatic brain injury*) [85], post-traumatskog poremećaja stresa (engl. PTSD, *post-traumatic stress disorder*) [86] te starenja [82]. Aktivirana mikroglija je pronađena uz Aβ plakove u pacijenata oboljelih od Alzheimerove bolesti te u crnoj tvari (engl. *substantia nigra*) pacijenata oboljelih od Parkinsonove bolesti [81,87]. U mišjem modelu Alzheimerove bolesti, periferna infekcija miševa virusom influence uzrokuje kroničnu upalu SŽS-a i kroničnu aktivaciju mikroglije u hipokampusu [22]. Aktivirana mikroglija posreduje gubitku sinapsi u CA1 regiji hipokampusa što rezultira progresijom neurodegeneracije, povećanom nakupljanju Aβ plakova i poremećaju u kognitivnim sposobnostima inficiranih miševa sa Alzheimerom. Osim navedenog, infekcija miševa sa drugim sojem virusa influence također dovodi do aktivirane mikroglije, koja perzistira u SŽS-u dugo nakon infekcije [80]. Također, uklanjanjem populacije aktivirane mikroglije u mišjem modelu Alzheimerove bolesti se smanjuje upala u mozgu, što dovodi do smanjenog gubitka sinapsi i poboljšanja u kognitivnim sposobnostima pokusnih miševa [88,89], bez utjecaja na količinu amiloidnih plakova. Osim navedenih neurodegenerativnih stanja, zanimljivo je kako sam proces starenja također praćen kroničnom upalom u SŽS-u, koja posreduje gubitku sinapsi u hipokampusu [90]. Tijekom starenja je mikroglija aktivirana te ispoljava proupalne gene [82,91–93]. Navedena istraživanja ukazuju na negativnu ulogu kronično aktivirane mikroglije u sinaptičkoj povezanosti neurona tijekom starenja i raznih patologija u SŽS-u, naročito uslijed virusnih infekcija i neurodegeneracije.

1.2. Citomegalovirus (CMV)

Herpesvirusi su DNA virusi specifični za vrstu, koji se dijele na potporodice α, β i γ [94]. Postoji 8 herpesvirusa koji inficiraju ljude (engl. HHV, *Human herpes virus*): herpes simpleks virusi tipa 1 i 2 (engl. HSV-1/HSV-2, *Herpes simplex virus type 1 and 2*), Varičela zoster virus (engl. VZV, *Varicella zoster virus*), Epstein-Barr virus (EBV), humani citomegalovirus (engl. HCMV, *Human cytomegalovirus*), humani herpesvirus 6A i 6B (HHV-6A/HHV-6B), HHV-7 i HHV-8 (KSHV, Kaposijev sarkom-povezani herpesvirus) [95]. HCMV pripada β-herpesvirusima (engl. *Betaherpesvirinae*), poznat je još i kao humani herpesvirus 5 (engl. HHV-5, *Human herpes virus* 5) [96]. Jedno od karakterističnih obilježja HCMV-a, kao i ostalih herpesvirusa, je uspostava cjeloživotne latencije iz koje se mogu reaktivirati [97]. HCMV-om je zaražena većina odraslih pojedinaca diljem svijeta, sa postocima seroprevalencije od 40 do >90% [96]. Seroprevalencija HCMV-a ovisi o socio-ekonomskom statusu i etničkim faktorima, i veća je u žena [96]. Iako je široko zastupljen u populaciji, zaraza HCMV-om je u većini slučaja asimptomatska i dobro nadzirana od strane imunološkog sustava. Međutim, u imunokompromitiranih pojedinaca, kao što su pacijenti zaraženi humanim virusom imunodeficijencije ili prilikom transplantacije organa, te uslijed prirođene infekcije, HCMV može uzrokovati morbiditete i mortalitet. U njih zaraza HCMV-om dovodi do širokog spektra kliničkih posljedica, među kojima su najučestaliji upala jetre (hepatitis), mrežnice oka (retinitis), tankog i debelog crijeva (enterokolitis) i pluća (pneumonitis), no također neurološke posljedice koje su najčešće u slučaju prirođene infekcije HCMV-om [98]. Osim toga, infekcija HCMV-om je povezana i sa razvojem drugih bolesti, poput ateroskleroze, kao i sa ubrzanim starenjem imunološkog sustava (imunosenescencijom) i povećanim rizikom od prijevremene smrtnosti [98]. Također, HCMV je detektiran u uzorcima glioblastoma, međutim utječe li na razvoj ove bolesti nije jasno [99].

HCMV se može prenijeti kontaktom sa zaraženim tjelesnim tekućinama, slinom, urinom, i seksualnim putem [100]. Također se može prenijeti preko transplantiranih organa i transfuzijom krvi [101], te se može prenijeti sa majke na plod transplacentarno, ili prilikom poroda i dojenja na novorođenče [96,102,103]. Osim primarne infekcije HCMV-om, može doći do reinfekcije ili reaktivacije latentnog virusa [96]. Tijekom primarne infekcije HCMV-om virus se širi perifernom krvlju do različitih organa [104,105]. HCMV ima širok stanični tropizam, kojeg omogućuju interakcije između

virusnih glikoproteinskih kompleksa i površinskih receptora na stanicama domaćina, što osigurava učinkovitu diseminaciju HCMV-a i infekciju različitih tipova stanica i tkiva [104]. HCMV prvo inficira epitelne stanice dišnog i probavnog sustava, te se infekcija širi na jetru, slezenu i pluća pomoću mijeloidnih stanica. Potom se širi na žlijezde slinovnice, dojke i bubrege koje su bitne za horizontalni prijenos virusa preko zaraženih tjelesnih tekućina [106]. Prilikom prirođene infekcije, HCMV uspješno inficira stanice decidue, primjerice endotelne stanice, i stanice trofoblasta. HCMV inficira različite periferne organe, te se u slobodnom obliku ili putem inficiranih stanica širi naposlijetku do mozga [107].

S obzirom da HCMV predstavlja značajan klinički problem, već desetljećima se intenzivno radi na razvoju cjepiva protiv HCMV-a [108]. Među cjepivima protiv HCMV-a koja su dospjela do kliničkih ispitivanja su podjedinična cjepiva (engl. *subunit vaccines*), koja koriste proteine, DNA ili RNA virusa kao izvore imunogena, te cjepiva temeljena na cijelom virusu, koja sadrže živi, oslabljeni virus (engl. *live attenuated*) [109]. Također je razvijeno mRNA cjepivo koje kodira glikoprotein B (gB) i pentamerni kompleks HCMV-a, koje nije prošlo fazu III kliničkog ispitivanja [110–112]. Međutim do sada ni jedno cjepivo nije odobreno zbog nedovoljne učinkovitosti. Smatra se da je jedan od glavnih razloga neuspjeha cjepiva činjenica da se radi o herpesvirusu koji je kroz milijune godina ko-evoluirao sa domaćinom, te razvio brojne mehanizme izbjegavanja gotovo svih mehanizama imunološkog odgovora od strane domaćina [113,114]. Postoje i protuvirusni lijekovi koji su trenutačno odobreni za liječenje ili profilaksu infekcije HCMV-om, kao što su ganciklovir (GCV) i njegov oralni predlijek valganciklovir (VGCV), cidofovir (CDV), foskarnet (FOS) te najnovije uvedeni letermovir (LTV) [115]. Međutim, kod upotrebe nekih protuvirusnih lijekova se javlja visoka toksičnost, slaba oralna bioraspoloživost i pojava rezistencije [116].

1.2.1. Prirođena infekcija HCMV-om

Prirođena infekcija HCMV-om (engl. cHCMV, *congenital HCMV*) zahvaća 0.67% novorođenčadi diljem svijeta, te najučestalija prirođena infekcija u razvijenim državama i glavni virusni uzročnik neuroloških poremećaja, intelektualnih poteškoća i gubitka sluha [117]. Primarna infekcija HCMV-om, reaktivacija virusa iz latencije te reinfekcija majke tijekom trudnoće može dovesti do prijenosa virusa na fetus [118]. Većina novorođenčadi sa cHCMV infekcijom su bez simptoma pri rođenju, dok otprilike

10% djece razvija simptome. Simptomatska infekcija HCMV-om klinički se očituje kao hepatosplenomegalija, trombocitopenija, mikrocefalija i senzorineuralni gubitak sluha (engl. SNHL, *Sensorineural hearing loss*). Međutim, i 5-15% djece rođene bez simptoma mogu razviti bolest kasnije, najčešće gubitak sluha [98]. Mehanizam kojim infekcija dovodi do SNHL-a nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da bi moglo biti povezano sa oštećenjem matičnih stanica ili strukture unutarnjeg uha, uključujući Cortijev organ [119]. Zašto su neke od infekcija simptomatske a neke asimptomatske još uvijek nije potpuno jasno. Također, mehanizam prijenosa virusa na fetus nije u potpunosti razjašnjen, no zahtjeva infekciju placente [107]. Poznato je da majčinska imunost na virus značajno smanjuje razine intrauterinog prijenosa [120], no ne spriječava u potpunosti prijenos virusa na fetus [121]. Smatra se da su infekcije novim sojem HCMV-a tijekom trudnoće u seropozitivnih žena dovode do prijenosa virusa i razvoja simptomatske bolesti u novorođenčadi [122]. Novorođenčad se može inficirati i prilikom poroda i dojenja, jer se virus može nalaziti u majčinom mlijeku [103]. Korelacija visokog virusnog titra u urinu i perifernoj krvi nakon rođenja su dobri indikatori većeg rizika razvoja neuroloških posljedica [123,124]. Također, razvoj teških neuroloških posljedica se povezuje sa infekcijama koje su se dogodile prilikom prvog trimestra trudnoće i primarne infekcije [125,126]. Unatoč tome što je prirođena infekcija HCMV-om najčešća prirođena infekcija u ljudi, ne postoji učinkovita terapija ili cjepivo [127]. Dijagnostika virusa je ograničena i ne pridonosi ranijem sprječavanju infekcije [123,124], a mogućnosti primjene protuvirusnih lijekova u trudnoći su vrlo ograničene zbog toksičnosti [125]. Međutim, dio studija je pokazao da terapija inficirane novorođenčadi ganciklovirom može umanjiti posljedice infekcije HCMV-om u SŽS-u kao i oštećenje sluha [128]. Razvoj novih protuvirusnih lijekova je trenutno u procesu [125]. Također, testirano je liječenje trudnih žena sa potvrđenom infekcijom HCMV-om hiperimunoglobulinom, međutim bez snažnih dokaza o značajnoj učinkovitosti [129]. Stoga su bolje razumijevanje patogeneze infekcije HCMV-om te otkrivanje novih terapijskih meta ključni za razvoj novih terapijskih pristupa.

Prirođena infekcija HCMV-om u SŽS-u uzrokuje patološke promjene tkiva u raznim regijama mozga, kao što je hipokampus, olfaktorni bulbus i unutarnje uho [96,118]. Infekcija je praćena upalnim odgovorom, kojeg karakterizira infiltracija imunoloških stanica i aktivacija mikroglije [130]. Smatra se da direktni citopatski učinak na NSPC i upalni odgovor imaju glavnu ulogu u nastaku oštećenja u SŽS-u. Kako bi

se odredili mehanizmi nastanka oštećenja živčanog tkiva tijekom infekcije koriste se različiti eksperimentalni modeli, uključujući i životinjske modele.

1.2.2. Mišji model prirođene infekcije CMV-om

Različiti životinjski modeli su razvijeni za proučavanje patogeneze infekcije CMV-om [131,132], od kojih je najčešće korišten i najbolje karakteriziran model infekcije miševa mišjim citomegalovirusom (MCMV) [133]. MCMV je genetski srodan HCMV-u te pokazuje brojne sličnosti u biologiji i patogenezi [131]. Za razliku od HCMV-a, MCMV ne prolazi kroz posteljicu i ne uzrokuje infekciju fetusa. Stoga se za istraživanje prirođene infekcije u miševima koriste različiti pristupi, uključujući infekciju novookoćenih miševa intraperitonealno (i.p.) MCMV-om [134]. Za razliku od novookoćenih miševa, u odraslih miševa nakon infekcije MCMV-om virus ne inficira SŽS-u [135].

Intraperitonealna infekcija MCMV-om dobro oponaša prirodni tijek prirođene infekcije HCMV-om, uključujući širenje virusa iz periferije u SŽS, široki stanični tropizam, razvoj imunološkog odgovora i patoloških oštećenja mozga [133]. Najčešće se koriste miševi sojeva BALB/c i C57BL/6 [131], u kojih je kinetika replikacije virusa i razvoj patologije u mozgu vrlo slična [135,136]. SŽS novookoćenih miševa razvojno odgovara SŽS-u humanog fetusa u razdoblju od 12. do 15. gestacijskog tjedna, periodu kada najčešće dolazi do infekcije HCMV-om [137,138]. Prirođena infekcija HCMV-om dovodi do infiltracije stanica NK (engl. *natural killer cells*), monocita/makrofaga i limfocita T u SŽS [139], što se i događa i u mišjem modelu infekcije. Infekcija novookoćenih miševa MCMV-om dovodi i do neurorazvojnih poremećaja, uključujući promjene u morfologiji malog mozga, kao što je zadebljanje vanjskog zrnatog sloja (engl. EGL, *external granular layer*), smanjenje unutarnjeg zrnatog sloja (engl. IGL, *inner granular layer*) i molekularnog sloja (engl. ML, *molecular layer*) [140], te gubitka sluha [141]. To upućuje da mišji model odražava određene značajke patogeneze infekcije HCMV-om u SŽS-u, te predstavlja vrijedan životinjski model za proučavanje infekcije CMV-om u mozgu [133,142].

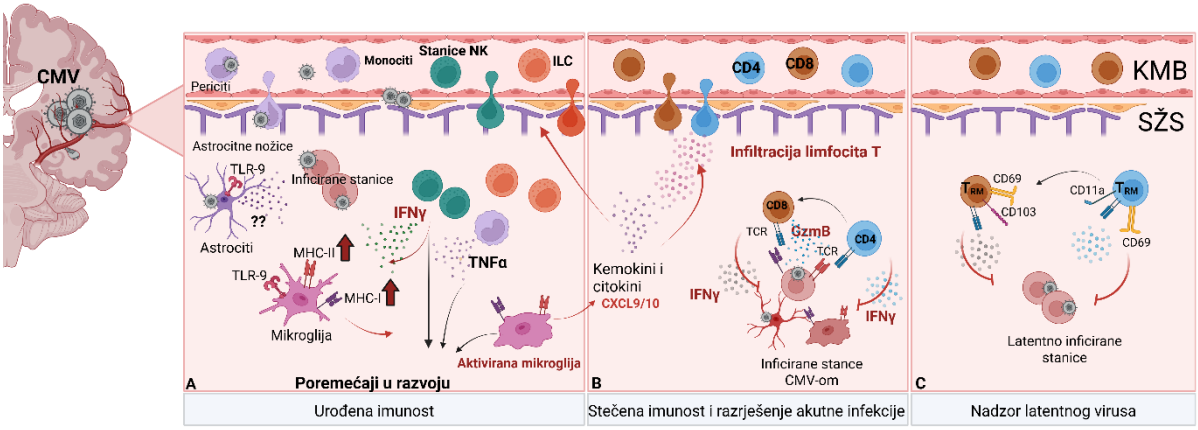
1.2.3. Imunološki odgovor u mozgu tijekom prirođene infekcije MCMV-om

Tijekom infekcije MCMV-om u mozgu dolazi do aktivacije mehanizama urođene i stečene imunosti [137,143] (**Slika 2.**). Uslijed infekcije novookoćenih miševa MCMV-om virus se umnaža na periferiji, te potom dospijeva u mozak unutar 7 dana nakon

infekcije (d.n.i.) [137]. Pretpostavlja se da virus prelazi krvno-moždanu barijeru preko posredničkih inficiranih stanica ili u obliku slobodnih virusnih čestica [144]. Nakon ulaska u mozak, virus najprije dolazi u kontakt sa astrocitima, nakon čega se širi na druge stanice SŽS-a (**Slika 2.A**) [137,145]. Infekcija stanica u SŽS-u aktivira PRR receptore, među kojima važnu ulogu u prepoznavanju CMV-a ima receptor TLR9. TLR9 prepoznaje virusnu DNA te se nalazi u različitim stanicama, uključujući astrocite i mikrogliju, pri čemu njegova aktivacija potiče proizvodnju IFN-I i izražaj interferonom stimuliranih gena. Infekcija u mozgu aktivira mikrogliju koja pojačano ispoljava molekule glavnog kompleksa histokompatibilnosti (engl. MHC, *Major histocompatibility complex*), te luči proupalne faktore kao što su kemokini CXCL9 i CXCL10 [146]. Aktivacija mikroglije i lučenje proupalnih kemokina tijekom akutne infekcije potiču infiltraciju urođenih limfoidnih stanica (engl. ILCs, *innate lymphoid cells*) i stanica NK u mozak, koje luče interferon gama (IFN-γ). Međutim, u kasnijim fazama akutne infekcije dolazi do infiltracije limfocita T (**Slika 2.B**), sa najvećom brojnošću oko 12 d.n.i., posredovano aktiviranom mikroglijom i proizvodnjom kemokina CXCL9/10 [137]. CD8 limfociti T čine najveći udio limfocita T, te citotoksičnim mehanizmima posredovanim perforinom, granzimom B, i IFN-γ, doprinose razrješenju akutne infekcije CMV-om u mozgu (**Slika 2.B**) [137]. Uz CD8 limfocite T, CD4 limfociti T i IFN-γ ključni su za razrješenje produktivne infekcije u neuronima [23]. Produktivna infekcija u mozgu se razrješuje do 30.-tog d.n.i., te virus ulazi u stanje latencije [136,146]. Međutim, imunološki sustav se ne vraća u homeostazu već ostaje trajno promijenjen. To se očituje zadržavanjem limfocita T u moždanom parenhimu kao tkivno-rezidentnih memorijskih limfocita T (engl. T_{RM}, *Tissue-resident memory cells*), koji nadziru latentni/reaktivirajući virus (**Slika 2.C**) [136]. CD8 limfociti T_{RM} ispoljavaju biljege CD69 i CD103, dok CD4 limfociti T_{RM} ispoljavaju biljege CD11a i CD69 [147]. CD4 limfociti T_{RM} održavaju CD8 limfocite T_{RM} [147], te njihovo uklanjanje dovodi do reaktivacije MCMV-a u mozgu [136].

Različiti imunološki mehanizmi sudjeluju u nadzoru infekcije MCMV-om u mozgu, no mogu i pridonijeti nastanku patoloških promjena [137,145]. Tretman glukokortikoidima novookoćenih miševa inficiranih MCMV-om dovodi do ublažavanja upalnog odgovora i patoloških promjena u malom mozgu, uz minimalan utjecaj na replikaciju virusa [148]. Monociti i stanice NK koje infiltriraju u mozak ne pridonose nadzor infekcije ali posreduju razvoju patologije. Ove stanice proizvode proupalne

citokine TNF-α i IFN-γ, koji predstavljaju važne komponente imunološkog odgovora povezane s nastankom neuroloških promjena u inficiranom mozgu tijekom razvoja [149]. Stanice NK i IFN-γ ove negativne učinke posreduju na način da aktiviraju mikrogliju, te utječu na zaustavljanje migracije neurona u malom mozgu [146]. Blokiranjem TNF-α ili IFN-γ dolazi do smanjenja upale u mozgu i sprečavanja nastanka neuropatoloških promjena u malom mozgu [146,149]. Do sada nije istraženo utječe li kronična prisutnost virusa u mozgu nakon razrješenja akutne infekcije na nastanak patoloških promjena.



Slika 2. Imunološki odgovor na prirođenu infekciju MCMV-om u mozgu. (A) Urođeni imunološki odgovor. MCMV prelazi krvno-moždanu barijeru (KMB) u slobodnom obliku ili preko posredničkih inficiranih mononuklearnih stanica. MCMV može inficirati različite rezidentne stanice u središnjem živčanom sustavu (SŽS), pri čemu se astrociti navode kao glavna populacija inficiranih stanica. Infekcija dovodi do proizvodnje različitih proupalnih citokina i kemokina koji potiču aktivaciju mikroglije i infiltraciju perifernih imunoloških stanica u SŽS. Monociti, makrofagi, stanice NK i urođene limfoidne stanice (ILCs) su prve populacije stanica koje infiltriraju inficirani SŽS. Monociti i stanice NK proizvode TNF-α odnosno IFN-γ, te potiču aktivaciju mikroglije. **(B)** Stečeni imunološki odgovor i nadzor produktivne infekcije. Aktivirana mikroglija ispoljava molekule MHC-I i MHC-II te proizvodi kemokine, uglavnom CXCL9 i CXCL10, čime se potiče infiltracija limfocita T u SŽS. CD4 i CD8 limfociti T prepoznaju inficirane stanice te nadziru infekciju proizvodnjom IFN-γ i granzima B (GzmB). **(C)** Nadzor latentnog virusa. Nakon razrješenja produktivne infekcije virus uspostavlja latenciju. Limfociti T su zadržani u parenhimu mozga kao tkivno-rezidentni memorijski limfociti T (T_{RM}) koje izražavaju biljege CD69 i CD103 (CD8 T_{RM}), kao i CD69 i CD11a (CD4 T_{RM}), te su ključni za nadzor latentnog i reaktivirajućeg virusa u mozgu. Preuzeto i prevedeno iz [107].

1.2.4. Latencija citomegalovirusa

CMV, kao i ostali herpesvirusi, uspostavlja cjeloživotnu latenciju, fazu neproduktivne infekcije obilježenu sa ograničenim izražajm virusnih gena [150]. Poznato je kako se latentna infekcija HCMV-om uspostavlja u hematopoetskim progenitorskim stanicama (engl. HPCs, *Hematopoietic progenitor cells*), te je za reaktivaciju latentnog virusa potrebna njihova diferencijacija u mijeloidne stanice i izloženost upalnim čimbenicima, kao što su proupalni citokini [97]. Međutim uspostavlja li HCMV latenciju u drugim stanicama, naročito u tkivima, i dalje je nepoznato. Primjenom mišjeg modela, latentna infekcija MCMV-om dokazana je u slezeni, bubrezima, žlijezdama slinovnicama i plućima [151–153], te su kao stanična mjesta latencije identificirani monociti, endotelne stanice i fibroblasti. Nekoliko istraživanja ukazuju na prisutnost latentnog virusnog genoma u mozgu. U kulturi primitivnih neuralnih matičnih stanica, prisutnost genoma HCMV-a zabilježena je i do mjesec dana nakon infekcije, što upućuje na mogućnost da su NSPC mjesto latencije virusa [154]. Studija u kojoj su korišteni NSPC-ovi dobiveni iz autopsije fetalnog tkiva je pokazala kako diferencirani neuroni mogu predstavljati mjesto perzistencije HCMV-a [155]. MCMV se može reaktivirati u kultiviranim tkivima mozgova 6 mjeseci nakon perinatalne infekcije [156]. Nadalje, uslijed slabljenja imunološkog nadzora posredovanog limfocitima T dolazi do reaktivacije MCMV-a u mozgu [136]. Hipokampus je regija mozga s najvećim brojem kopija latentnog virusnog genoma, pri čemu su neuroni identificirani kao mjesto latencije MCMV-a [157]. Međutim, posljedice latentne infekcije u neuronima nisu poznate.

1.2.5. Neurološke i psihijatrijske posljedice infekcije HCMV-om

Sve je više dokaza o povezanosti infekcije HCMV-om s kognitivnim, psihijatrijskim i neurološkim poremećajima, iako postoje oprečni rezultati u studijama [158]. Osim što su istraživanja ukazala na moguću povezanost HCMV-a s Alzheimerovom bolešću i demencijom, infekcija HCMV-om se povezuje sa poremećajem u depresiji, bipolarnim poremećajem te anksioznim poremećajima.

U djece koja su zaražena HCMV-om tijekom ranog postnatalnog razdoblja su zabilježene narušene kognitivne sposobnosti tijekom adolescencije [159]. Time se dodatno naglašava povezanost infekcije HCMV-om tijekom ranog životnog razdoblja sa nastankom kognitivnih deficita, koji se održavaju tijekom života. U starijih osoba

inficiranih HCMV-om pokazana je povezanost viših razina protutijela na HCMV-a i progresije kognitivnog propadanja tijekom period od četverogodišnjeg praćenja [160], te povezanost HCMV-a i rizika za razvoj Alzheimerove bolesti i brže progresije pada u kognitivnim sposobnostima [161]. Nadalje, utvrđena je povezanost HCMV seropozitivnosti i nastanka bipolarnih i depresivnih poremećaja. U bolesnika sa dijagnosticiranim bipolarnim poremećajem i HCMV-om je zabilježen smanjen volumen mozga, uključujući hipokampusa [162]. Također, u bolesnika sa depresivnim poremećajem i HCMV-om su zabilježeni smanjeni volumeni i narušeni integriteti bijele i sive tvari, što može doprinjeti razvoju patologije i depresije [163,164]. Infekcija HCMV-om je povezana i sa shizofrenijom, psihotičnim poremećajem. Primjerice, jedna studija je pokazala povezanost povećane razine HCMV-a i progresije simptoma shizofrenije te kognitivnih oštećenja [165]. Osim toga, pacijenti sa shizofrenijom i višom razinom HCMV protutijela su imaju smanjeni volumen desnog hipokampusa, koji se povezuje sa nastanko kognitivnih deficita [166]. Povezanost HCMV-a i utjecaja na kognitivne funkcije ispitivana je i u starijih osoba s drugim bolestima osim neuroloških bolesti, primjerice pacijentima oboljelima od tumora [167]. U navedenoj studiji nisu povezali seropozitivnost na HCMV sa kognitivnom funkcijom, ali su osobe seropozitivne na HCMV sa visokim stupnjem upale imale lošiju kognitivnu funkciju, što upućuje na mogućnost da interakcija između infekcije HCMV-om i imunološkog sustava može utjecati na kognitivne sposobnosti i razvoju patologije.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Prirođena infekcija HCMV-om se može očitovati teškim i dugotrajnim oštećenjima u središnjem živčanom sustavu (SŽS), stoga otkrivanje tkivno-specifičnih imunoloških odgovora i patoloških posljedica uzrokovanih infekcijom u mozgu postaju važno polje istraživanja. Mikroglija i astrociti su glija-stanice koje mogu biti inficirane uslijed prirođene infekcije humanim (HCMV) i mišjim (MCMV) citomegalovirusom, međutim točni mehanizmi imunološkog nadzora latentnog virusa od strane glija-stanica su i dalje nepoznati. Istraživanja usmjerena na razumijevanje nadzora latentnog virusa te patologije uzrokovane uslijed kronične upale u mozgu su potrebna za razvoj boljih tretmana i smanjenja teških posljedica prirođene infekcije u SŽS-u, te potencijalnom razvoju cjepiva, koje i dalje ne postoji za HCMV. Stoga je cilj ovog rada je odrediti ulogu glija-stanica u nadzoru latentne virusne infekcije korištenjem mišjeg modela infekcije MCMV-om.

Specifični ciljevi doktorskog rada:

- Odrediti morfološke karakteristike mikroglije i astrocita tijekom latencije MCMV-a u mozgu
- Odrediti transkripcijske promjene u mikrogliji i astrocitima uzrokovane latentnom infekcijom
- Karakterizirati MCMV-specifične subpopulacije mikroglija i astrocita metodama protočne citometrije i konfokalne mikroskopije
- Odrediti jesu li mikroglije i astrociti mjesta MCMV latencije
- Ispitati učinak protuvirusne terapije na upalu u mozgu
- Odrediti ulogu mikroglije u imunološkom nadzoru latentnog/reaktivirajućeg virusa
- Odrediti ulogu mikroglije u posredovanju imunopatologije tijekom latencije MCMV-a u mozgu
- Odrediti funkcionalne posljedice latentne infekcije i imunopatologije posredovane mikroglijom u latentno inficiranih miševa MCMV-om

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Laboratorijske životinje

U sklopu ovog istraživanja su se za pokuse koristili miševi uzgajani na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, u Centru za uzgoj i inženjering laboratorijskih miševa (Center for Engineering and laboratory mice breeding, LAMRI). Miševi su uzgajani u uvjetima bez prisutnosti specifičnih patogena (engl. SPF, *Specific Pathogen Free*). Tijekom pokusa su držani u individualnim kavezima sa ventilacijom (engl. IVC, *Individually ventilated cages*) u pokusnom vivariju Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. Uvjeti unutar vivarija gdje su uzgajani miševi su sljedeći: prosječna temperatura zraka od 23°C, vlažnost od 55%, režim od 12 sati svjetlosti i 12 sati mraka. Miševi su imali stalno dostupnu hranu i vodu tijekom uzgoja. Korištenje životinja u pokusu provedeno je u skladu s važećim Zakonom o zaštiti životinja (NN br. 102/17, 32/19 i 78/24) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN br. 48/2026), uz poštivanje važećih bioetičkih načela i standarda za provođenje pokusa na eksperimentalnim životinjama. Prilikom pokusa je stavljen naglasak na 3R pristup koji podrazumijeva: zamjenu korištenja životinja u pokusima drugim metodama gdje god je to moguće (engl. *Replacement*), smanjenje broja životinja korištenih u pokusu (engl. *Reduction*) i oplemenjivanje postupaka prema životinjama (engl. *Refinement*), u skladu s Direktivom 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. Svi pokusi su odobreni od strane Povjerenstva za dobrobit životinja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Ministarstva poljoprivrede i Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane, te Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci (UP/I-322-01/19-01/58, UP/I-322-01/21-01/51, UP/I-322-01/23-01/33) u sklopu projekta „Biologija citomegalovirusne infekcije u mozgu tijekom razvoja i u latenciji“ (PZS-2019-02-7879). Popis korištenih mišjih sojeva u istraživanju se nalazi u Tablici 1. U pokusima su se koristili miševi oba spola, različitih starosti.

Tablica 1. Popis korištenih mišjih sojeva u istraživanju.

Soj miševa	Opis soja	Izvor
BALB/c	divlji tip	The Jackson Laboratory #000651
C57BL/6	divlji tip	The Jackson Laboratory #000664
129/SvJ	divlji tip	The Jackson Laboratory #000691
Ifngr1$^{-/-}$	miševi koji nemaju receptor za IFN-γ	The Jackson Laboratory #002702
Ifngr1$^{fl/fl}$ (IFN-γR floxed)	miševi kojima je gen za IFN-γ receptor omeđen flox sekvencama	The Jackson Laboratory #025394
Sall1Cre^{ERT2}	miševi koji imaju inducibilnu rekombinazu Cre pod aktivnošću Sall1 promotora	Ryuichi Nishinakamura, Kumamoto University

3.1.2. Stanične linije

Za propagaciju i određivanje titra virusa su korištene primarne stanične linije mišjih embrionalnih fibroblasta (engl. MEF, *mouse embryonic fibroblast*), kultivirane iz soja miševa divljeg tipa. Stanice su uzgajane u mediju DMEM sa 3% fetalnog telećeg seruma (engl. FCS, *Fetal Calf Serum*), na uvjetima od 37°C i 5% CO_2. Otopina tripsina/EDTA se koristila za podizanje stanica sa površine prilikom nasađivanja stanica za daljnje pokuse.

3.1.3. Virusi

U pokusima je korišten genom divljeg tipa virusa MCMV-a (pSM3fr-MCK-2fl), dobiven iz umjetnog bakterijskog kromosoma (engl. BAC, *bacterial artificial chromosome*) [168]. Virusi za novookoćene miševe su razrijeđeni od virusnog stock-a, alikvotirani u volumenu od 25 µl te je virusni titar određen prije upotrebe na MEF-u, koristeći

prethodno opisan test virusnih čistina [136]. Za pokuse provođene na humanim organotipskim rezovima mozgova (engl. HfOBSC, *human fetal organotypic brain slice cultures*) korišten je virus RV-TB40-BAC$_{KL7}$-SE-EGFP (KL7-EGFP), BAC klon HCMV-a soja TB40/E, dar od Christiana Sinzgera [169].

3.1.4. Humani uzorci

Tkivo ljudskog fetalnog mozga je dobiveno od strane HIS-Mouse Facility Academic Medical Center (AMC; Amsterdam, Nizozemska) iz legalno prekinutih trudnoća u drugom tromjesečju (17-20 tjedana), uz informirani pristanak za korištenja tkiva u istraživanju te dobivena odobrenja Odbora za medicinsku etiku AMC-a (MEC: 03/038) i Erasmus MC-a (MEC-2017-009). Dobivena tkiva su iz anonimnih izvora te se ne mogu se povezati s donorom, osim poznatih informacija za istraživače o spolu i gestacijskoj dobi. Svi fetalni mozgovi su po uzimanju fiksirani tjedan dana u otopini cink-formalina. Više informacija o humanim uzorcima se nalazi u Tablici 2.

Tablica 2. Informacije o humanim uzorcima mozgova fetalnog tkiva korištenih u sklopu ovog rada.

Uzorak	Tip infekcije	Gestacijski tjedan infekcije	Broj kopija virusnog genoma u amnionskoj tekućini (br. kopija /mL)	Ishod
A25	Primarna infekcija	3	184.200	Prekid trudnoće
A29		5	998.960	
BR4		4	3.640.760	
B39		7	1.343.070	

3.1.5. Mediji, otopine i reagensi

U Tablici 3. se nalazi popis i sastav korištenih medija, otopina i reagensa za određivanje titra virusa, uzgoja hfOBSC-a, te pripremu stanica za protočnu citometriju.

Tablica 3. Mediji, otopine i reagensi korišteni u sklopu izrade doktorskog rada.

Uzgoj stanica i rad u kulturi, te izolacija stanica za analizu protočnom citometrijom	
Otopina	Sastav

Medij DMEM - Dulbeccov modificirani minimalni esencijalni medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle medium*)	Medij DMEM (Pan Biotech), 3-10% fetalni teleći serum (engl. FCS, *Fetal Calf Serum*, Pan Biotech), 10 mM HEPES (pH 7.2), 2 mM L-glutamin, 10 U/ml Penicilin, 0.1 g/L Streptomicin
Medij RPMI (engl. *Roswell Park Memorial Institute Medium*)	Medij RPMI (Pan Biotech), 3-10% fetalni teleći serum (FCS, Pan Biotech), 10 mM HEPES-a (pH 7.2), 2 mM L-glutamin, 10 U/ml Penicilin, 0.1 g/L Streptomicin
Metil-celulozni medij	DMEM, 10% FCS, 2.2% metil-celuloza (#M0512, Sigma-Aldrich)
Pufer za lizu eritrocita (10x)	2.7 mM kalijev klorid, 140 mM amonijev klorid, 0.7 mM kalcijev klorid, 1.5 mM kalijev dihidrogenfosfat, 6.5 mM natrijev hidrogenfosfat, H_2O
10x fosfatima puferirana fiziološka otopina (engl. PBS, *Phosphate-Buffered Saline*)	140 mM natrijev klorid, 2.7 mM kalijev klorid, 6.5 mM natrijev hidrogenfosfat-2-hidrat, 1.5 mM kalijev dihidrogenfosfat, 0.7 mM kalcijev klorid, 0.7 mM magnezijev klorid-6-hidrat
Izotonični Percoll (GE Healthcare)	Percoll (#GE17-0891-09, Cytiva), 10x PBS
Medij za protočnu citometriju (FACS medij)	PBS, 1% goveđi serumski albumin (engl. BSA, *bovine serum albumin*), 0.1% natrijev azid, 1 mM etilendiamintetraoctena kiselina (engl. EDTA, *ethylenediaminetetraacetic acid*), kućna proizvodnja
Uzgoj organotipske kulture ljudskog fetalnog mozga (hfOBSC-a)	
Otopina	Sastav
medij za oporavak hfOBSC-a	Neurobazalni medij (#21103049, Gibco)/DMEM/F-12 (#12634010, Gibco) (70:30 v/v), Pen/Strep (#PS-B, Capricorn scientific), FCS (20%) (#F75242, Sigma)
medij za uzgoj hfOBSC-a	70:30 v/v Neurobazalni medij (#21103049, Gibco)/DMEM/F-12 (#12634010, Gibco), 2% B27

	(#17504044, Gibco), 1% N2 (#17502048, Gibco), 1% glutaMAX (#35050061, Gibco), primocin (#ant-pm-05, InvivoGen, 1:500), humani transformirajući faktor rasta-beta 2 (engl. TGF-β2, transforming growth factor-beta, 2 2 ng/mL, ProspecBio, #CYT-441), kolesterol (1.5 µg/mL, #C3045, Sigma Aldrich), humani rekombinatni faktor stimulacije kolonija makrofaga (engl. m-CSF, macrophage colony-stimulating factor, 100 ng/mL, #300-25, Peprotech), moždani neurotrofni čimbenik (engl. BDNF, brain-derived neurotrophic factor, 50 µg/mL, #450-02, Peprotech), Neurotrofin-3 (engl. NT-3, Neurotrophin 3, 10 ng/mL, #450-03, Peprotech), bazični faktor rasta fibroblasta 2 (engl. FGF2, basic fibroblast growth factor 2, 10 ng/mL, #233-FB, R&D Systems), epidermalni faktor rasta (engl. EGF, epidermal growth factor, 10 ng/mL, #236-EG, R&D Systems)
Rad sa humanim uzorcima	
Otopina	Sastav
otopina cink-formalina za fiksaciju tkiva	22.5 g NaCl, 7.5 g ZnSO4, 10% formalin, destilirana voda

U Tablici 4. nalazi se popis i sastav otopina, te reagensa potrebnih za izolaciju DNA iz tkiva.

Tablica 4. Otopine i reagensi potrebni za izolaciju DNA iz tkiva (repova)

Otopina/Reagens	**Sastav**
Otopina za lizu tkiva (repova)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,2% SDS
Proteinaza K (400 µg/mL)	Sigma Aldrich, #P6556-100MG
Izopropanol	Ru-Ve, #740378

70% etanol	kućna proizvodnja

U Tablici 5. nalazi se popis i sastav pufera, te reagensa za agaroznu gel elektroforezu.

Tablica 5. Puferi i reagensi za agaroznu gel elektroforezu.

Otopina/Reagens	**Sastav**
50x Tris-acetatni pufer (TAE)	57.1 mL glacijalna octena kiselina, 242 g Tris baza, 100 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0), dopuniti do 1L destiliranom vodom
Agarozni gel	1.5% agaroza, 1x TAE pufer
2-Log DNA Ladder	New England Biolabs, #N3232
Etidijev bromid	Carl ROTH, #2218.1

U Tablici 6. nalazi se popis reagensa potrebnih za lančanu reakciju polimerazom i kvantitativni PCR.

Tablica 6. Reagensi potrebni za lančanu reakciju polimerazom i kvantitativni PCR.

Reagens	**Proizvođač**
Quick-Load Taq 2X Master Mix	New England BioLabs, #M0482L
Takyon™ Low ROX Probe 2X MasterMix UNG	Eurogentec, #UF-LPMU-C0701
Fast Plus EvaGreen qPCR master mix	Biotium, #31020

3.1.6. Početnice

U Tablici 7. nalazi se popis početnica koje su korištene za određivanje genotipa miševa.

Tablica 7. Slijed nukleotida početnica koje su korištene za određivanje genotipa miševa.

Soj miševa	Slijed nukleotida početnica
Ifngr1$^{fl/fl}$	5-TTG TTT GAT CCA TTC TTT AAA TTG-3 5-GCT TCT TTG AAG GGC TGG A-3
Sall1Cre	5-AGCTAAAGCTGCCAGAGTGC-3 5-CAACTTGCGATTGCCATAAA-3 5-GCGTTGGCTACCCGTGATAT-3

U Tablici 8. se nalazi popis početnica koje su korištene za reakciju kvantitativnog PCR-a i detekciju virusnog genoma MCMV-a.

Tablica 8. Slijed nukleotida početnica i probe koje su korištene za kvantitativni PCR.

Detekcija	Slijed nukleotida početnica i probe
M86 početnice	5-GGTCGTGGGCAGCTGGTT-3 5-CCTACAGCACGGCGGAGAA-3
M86 proba	5-TCGGCCGTGTCCACCAGTTTGATCT-3 (FAM)
Gapdh	Mm05724508_g1 (FAM)
gB početnice	5-GCAGTCTAGTCGCTTTCTGC-3 5-AAGGCGTGGACTAGCGATAA-3
Pthrp početnice	5-GGTATCTGCCCTCATCGTCTG-3 5-CGTTTCTTCCTCCACCATCTG-3
pDrive_gB_PTHrP_Tdy plazmid	Plazmid korišten za izradu standardne krivulje prilikom kvanitifikacije broja kopija *gB* genoma MCMV-a u odnosu na broj stanica (*Pthrp*) [170].
Ifng	Mm01168134_m1

3.1.7. Protutijela i reagensi

U Tablici 9. nalazi se popis protutijela korištenih u metodama protočne citometrije i imunofluorescencije.

Tablica 9. Popis protutijela korištenih u metodama protočne citometrije i imunofluorescencije.

Protutijela korištena u metodi protočne citometrije				
Ciljani antigen	Domaćin	Specifičnost	Klon	Proizvođač
CD45.2	štakor	miš	104	Thermo Fisher Scientific, #14-0454-82
CD11b	štakor	miš	M1/70	Thermo Fisher Scientific, #14-0112-82
MHC-II	štakor	miš	M5/114.15.2	Thermo Fisher Scientific, #61-5321-82
H-2D^{d}	miš	miš	34-5-8S	Thermo Fisher Scientific, #MA5-18003
MHC-I (H-2Db)	miš	miš	28-14-8	Thermo Fisher Scientific, #11-5999-82
MHC-I (H-2Kb)	mš	miš	AF6-88-5.5.3	Thermo Fisher Scientific, #17-5958-82
CD3e	armenijski hrčak	miš	145-2C11	Thermo Fisher Scientific, #16-0031-82
CD8a	štakor	miš	53-6.7	Thermo Fisher Scientific, #14-0081-82
CD4	štakor	miš	RM4-5	Thermo Fisher Scientific, #14-0042-82

CD19	štakor	miš	eBio1D3	Thermo Fisher Scientific, #14-0193-82
CD69	armenijski hrčak	miš	H1.2F3	Thermo Fisher Scientific, #14-0691-82
CD103	armenijski hrčak	miš	2E7	Thermo Fisher Scientific, #14-1031-82
F4/80	štakor	miš	BM8	Thermo Fisher Scientific, #14-4801-82
O1	miš	miš	O1	Thermo Fisher Scientific, #14-6506-82
ACSA-2	štakor	miš	IH3-18A3	Miltenyi Biotec, #130-123-284
IFN-γ	štakor	miš	XMG1.2	Thermo Fisher Scientific, #12-7311-82
m38 tetramer		miš	SSPPMFRV (H2-K(b))	National Institutes of Health tetramer core facility (NIH)
CD16/CD32	štakor	miš	93	Thermo Fisher Scientific, #14-0161-82
Fiksirajuća boja za detekciju živih stanica (engl. FVD, *fixabile viability dye*)	-	-	-	Thermo Fisher Scientific, #65-0865-14
Protutijela korištena u metodi imunofluorescencije				
Ciljani antigen	Domaćin	Specifičnost	Klon	Proizvođač
IBA-1	zec	miš	-	FUJIFILM Wako, #019-19741
IBA-1	zec	miš	-	SynapticSystems, #AB_10641962

MHC-II (I-A/I-E)	štakor	miš	M5/114.15.2	Invitrogen, #14-5321-82
CD107a (LAMP-1)	štakor	miš	1D4B	BDPharmingen™, #AB_2134499
Homer-1	pilić	miš	-	SynapticSystems, #AB_2631222
HLA-DR	zec	čovjek	TAL 1B5	Abcam, #ab20181
HLA-DR/DQ/DP	miš	čovjek	klon CR3/43	DAKO, #M0775
GFP	koza	-	-	Abcam, #ab6662
vizualizacija jezgara 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	-	-	-	Biolegend, #422801
Sekundarna protutijela				
Alexa Fluor 488	štakor	miš	-	#4416 Cell Signaling
Alexa Fluor 555	zec	miš	-	#4413 Cell Signaling
Cy™3 AffiniPure IgG (H + L)	kozji	zec	-	#AB_2338006 Jackson Immuno Research
Cy™5 AffiniPure IgG (H + L)	kozji	štakor	-	# AB_2338264 Jackson Immuno Research
Alexa Fluor 488 AffiniPure IgY (IgG) (H + L)	magarac	kokoš	-	#AB_2340375 Jackson Immuno Research
AF555 IgG	zec	magarac	-	#A-31572 Invitrogen
AF647 IgG	kozji	miš	-	#A-21235 Invitrogen

U Tablici 10. nalazi se popis blokirajućeg protutijela korištenih za neutralizaciju, inhibitora za uklanjanje populacije mikroglije, te protuvirusnog lijeka korištenog za protuvirusni tretman.

Tablica 10. Popis blokirajućeg protutijela, inhibitora i protuvirusnog lijeka.

Popis citokina, inhibitora i protuvirusnog lijeka			
IFN-γ	Blokirajuće protutijelo	Domaćin: štakor Specifičnost: miš Klon: XMG1.2	IchorBio, # ICH1141
PLX5622	Inhibitor	Miješanje u hrani	Adooq Bioscience, #A18888
Ganciklovir	Protuvirusni lijek	Miješanje u PBS-u	Cymevene

3.1.8. Citokini i reagensi za stimulaciju

U Tablici 11. nalazi se popis citokina i reagensa korištenih za stimulaciju stanica.

Tablica 11. Citokini i reagensi za stimulaciju

Reagens	**Proizvođač**
rekombinantni humani IFN-γ	Peprotech, #300-02
Brefeldin A (1000x)	Invitrogen, #00-4506-51
Cell Stimulation Cocktail (500X)	Invitrogen, #00-4970-93 PMA (engl. Phorbol 12-myristate 13-acetate), Ionomicin

3.1.9. Reagensi za protočnu citometriju i imunofluorescenciju

U Tablici 12. nalazi se popis kompleta reagensa za protočnu citometriju i imunofluorescenciju.

Tablica 12. Reagensi za protočnu citometriju i imunofluorescenciju korišteni u izradi doktorskog rada.

Naziv reagensa	**Opis**
eBioscience™ Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (Invitrogen)	Komplet reagensa za unutarstanično bojanje stanica za detekciju na protočnom citometru; #88-8824-00

Adult Brain Dissociation Kit (Miltenyi Biotec)	Komplet reagensa za učinkovitu izolaciju astrocita iz mozgova odraslih životinja; #130-107-677
Myelin Removal Beads II (Miltenyi Biotec)	Reagens za učinkovito uklanjanje mijelina iz uzorka odraslih mozgova pomoću obilježavanja mijelina magnetnim kuglicama i odvajanja magnetom; #130-096-433
FD Rapid GolgiStain™ Kit	FD Neurotechnologies, #PK401; reagens za bojanje i analizu dendritičkih spina
4% Paraformaldehid (PFA)	Biognost, #F4-1L; reagens za fiksaciju stanica
„Microslide SuperFrost“ predmetna stakalca	VWR, #631-0446
1-3% BSA (engl. *Bovine serum albumine*)	Roth, #8076.1
„OCT“ medij za smrzavanje	Sakura, #4583
ProLong™ medij za uklapanje	Thermo Fisher Scientific, #P36930

3.2. Metode

3.2.1. Proizvodnja virusa

Virus MCMV-a, korišten u svim pokusima, je proizveden infekcijom stanične linije MEF-a, u multiplicitetu infekcije (MOI) od 0,01. Inficirane stanice su inkubirane u odgovarajućim uvjetima (37 °C, 5% CO_2) kroz period od 5-6 dana. Zatim je sakupljen supernatant i proizveden virus na način kako je to prethodno opisano [133]. Potom je virus resuspendiran u odgovarajućem volumenu PBS-a, te razdijeljen u alikvote od 25 µl i do uporabe je pohranjen na –80°C. Virusi za novookoćene miševe su pripremljeni razrjeđivanjem virusnog stock-a i određivanjem titra virusa pomoću testa virusnih čistina.

3.2.2. Križanje mišjih sojeva

U svrhu dobivanja transgeničnih *Sall1Cre*^{ERT2}*Ifngr1*$^{fl/fl}$ miševa, miševe smo križali prema priloženoj shemi u Tablici 13. U svakoj sljedećoj generaciji smo nastavili križanje miševa sa odgovarajućim genotipom, dok smo miševe neodgovarajućeg genotipa usmrtili na human i odobren način. Genotip miševa smo odredili izolacijom DNA iz repova te metodom lančane reakcije polimerazom (engl. PCR, *Polymerase Chain Reaction*).

Tablica 13. Križanja miševa provedena u svrhu dobivanja *Sall1Cre*^{ERT2}*Ifngr1*$^{fl/fl}$ miševa.

KRIŽANJE 1		
Roditelji	Ifngr1$^{fl/fl}$	Sall1Cre$^{ERT2+/-}$
Potomci 1. generacija	Sall1Cre$^{ERT2+/-}$ Ifngr1$^{fl/+}$	

KRIŽANJE 2	**ŽENKA**	**MUŽJAK**
Roditelji	Sall1Cre$^{ERT2+/-}$ Ifngr1$^{fl/+}$	Ifngr1$^{fl/fl}$
Potomci 2. generacija	Sall1Cre$^{ERT2+/-}$ Ifngr1$^{fl/+}$ Sall1Cre$^{ERT2+/-}$ Ifngr1$^{fl/fl}$	

	Sall1Cre$^{ERT2-/-}$ Ifngr1$^{fl/+}$ Sall1Cre$^{ERT2-/-}$ Ifngr1$^{fl/fl}$

ili

KRIŽANJE 2	**ŽENKA**	**MUŽJAK**
Roditelji	Ifngr1$^{fl/fl}$	Sall1Cre$^{ERT2+/-}$ Ifngr1$^{fl/+}$
Potomci 2. generacija	Sall1Cre$^{ERT2+/-}$ Ifngr1$^{fl/+}$ Sall1Cre$^{ERT2+/-}$ Ifngr1$^{fl/fl}$ Sall1Cre$^{ERT2-/-}$ Ifngr1$^{fl/+}$ Sall1Cre$^{ERT2-/-}$ Ifngr1$^{fl/fl}$	

KRIŽANJE 3	**ŽENKA**	**MUŽJAK**
Roditelji	Ifngr1$^{fl/fl}$	Sall1Cre$^{ERT2+/-}$ Ifngr1$^{fl/fl}$
Potomci 3. generacija	Sall1Cre$^{ERT2+/-}$ Ifngr1$^{fl/fl}$ Sall1Cre$^{ERT2-/-}$ Ifngr1$^{fl/fl}$	

ili

KRIŽANJE 3	**ŽENKA**	**MUŽJAK**
Roditelji	Sall1Cre$^{ERT2+/-}$ Ifngr1$^{fl/fl}$	Ifngr1$^{fl/fl}$
Potomci 3. generacija	Sall1Cre$^{ERT2+/-}$ Ifngr1$^{fl/fl}$ Sall1Cre$^{ERT2-/-}$ Ifngr1$^{fl/fl}$	

Genotip životinja odredili smo metodom PCR-a na način da smo izolirali DNA iz repa, kao što je opisano niže u tekstu.

3.2.3. Sakupljanje tkiva mišjeg repa u svrhu određivanja genotipa

Kako bi se odredio genotip miševa, komadić tkiva od vrha repa je sakupljen od miševa tijekom križanja. Miševima starosti 14-21 dana je odrezan vrh repa (do duljine od 3 mm) u eppendorf tubice od 1.5 mL, pomoću kirurških škarica. Između svake životinje škare su oprane i dezinficirane 70%-nim etanolom. Kako bi se znalo kojoj životinji pripada koji uzorak, miševe smo označili metodom bušenja uši. Životinje u pokusu smo genotipizirali uzimanjem komadića repa nakon usmrćivanja.

3.2.4. Izolacija DNA iz mišjeg repa u svrhu određivanja genotipa

U eppendorf tubice sa uzorkom odrezanog tkiva mišjeg repa duljine do 3 mm je dodano 0.5 mL otopine za lizu tkiva (repova) u koju je dodana proteinaza K (400 µg/mL), kako bi se tkivo razgradilo. Uzorci repova su inkubirani 1-3 sata ili preko noći u termomikseru na 56°C, te centrifugirani 5 minuta na 12000 rpm kako bi se istaložili svi nerazgrađeni dijelovi tkiva. Nakon centrifuge, supernatant je prebačen u nove, prethodno obilježene 1.5 mL eppendorf tubice. DNA iz mišjih repova je precipitirana dodavanjem 400 µL izopropanola uz lagano mućkanje, prilikom čega se pojavio bijeli oblačić precipitirane DNA. Uzorci su potom centrifugirani 5 minuta na 12000 rpm, te je nakon micanja supernatanta na talog DNA dodano 600 µL 70% EtOH. Uzorci su ponovno centrifugirani 5 minuta na 12000 rpm, te je maknut etanol. Nakon sušenja etanola na sobnoj temperaturi, izolirana DNA je otopljena u 150 µL vode te pohranjena na +4°C do analize PCR-om.

3.2.5. Određivanje genotipa miševa metodom PCR-a

Genotip miševa dobiven križanjem je određen metodom PCR prema programima u Tablici 14. Korištene početnice i slijed nukleotida je naveden u Tablici 7.

Tablica 14. Uvjeti reakcije i program, korišteni za dokazivanje Sall1Cre alela.

Dokazivanje **Sall1Cre** alela	
Uvjeti reakcije:	Program reakcije:
0,1–1 µg DNA 1X Quick-Load Taq 2X Master Mix 0.2 µM početnica 1	Denaturacija 95˚C 1 min _____

0.2 µM početnica 2 0.2 µM početnica 3 Voda	35 ciklusa: Ekstenzija	95 ˚C 20 sec 48 ˚C 45 sec 68 ˚C 30 sec 68 ˚C 5 min
Ukupni volumen reakcijske smjese: 25 µL.		
Veličina očekivanog fragmenta: 350 pb. Veličina wt fragmenta: 288 pb.		

Tablica 15. Uvjeti i program reakcije korištene za dokazivanje Ifngr1$^{fl/fl}$ alela.

Dokazivanje **Ifngr1$^{fl/fl}$** alela		
Uvjeti reakcije:	**Program reakcije:**	
0,1–1 µg DNA 1X Quick-Load Taq 2X Master Mix 0.2 µM početnica 1 0.2 µM početnica 2 0.2 µM početnica 3 Voda	Denaturacija 34 ciklusa Ekstenzija	95˚C 2 min 95 ˚C 20 sec 49 ˚C 30 sec 68 ˚C 30 sec 68 ˚C 5 min
Ukupni volumen reakcijske smjese: 25 µL.		
Veličina očekivanog fragmenta: 360 pb.		

Veličina wt fragmenta: 310 pb.

3.2.6. Gel-elektroforeza

Nakon PCR reakcije se gel-elektroforeza uzorka odvija na agaroznom gelu, kako bi se omogućilo određivanje veličine fragmenata DNA u uzorcima. Napravljen je 1.5% agarozni gel otapanjem 1.5 g agaroze u 100 mL TAE pufera grijanjem u mikrovalnoj pećnici, nakon čega je smjesa ohlađena na ~ 45°C te izlivena u kalupe za gel. U još tekući gel su uronjeni češljići kojima se formiraju jažice u gelu. Uzorci se nakon PCR reakcije direktno nanose na ohlađeni i stvrdnuti gel pomoću pipete u količini od 6 µL. Na gel se obavezno nanosi marker veličine poznatih fragmenata pomoću kojeg se određuje veličina fragmenta DNA u uzorcima. Rezultat elektroforeze je analiziran i vizualiziran pomoću UV transiluminatora (Cleaver Scientific, UK).

3.2.7. Infekcija miševa

Novookoćeni miševi su inficirani intraperitonealnom inokulacijom virusa u dozi od 200-400 PFU po mišu, ovisno o soju. Odgovarajuća količina virusa pripremljena je u volumenu od 50 µl medija DMEM [133]. Novookoćeni BALB/c miševi inficirani su sa 400 PFU MCMV-a na dan okota, dok su C57BL/6, 129/SvJ, Ifngr1$^{-/-}$, *Ifngr1*$^{fl/fl}$ i *Sall1Cre*^{ERT2}*Ifngr1*$^{fl/fl}$ miševi inficirani na prvi postnatalni dan s dozom od 200 PFU MCMV-a. Odrasli miševi su inficirani intraperitonealno sa 2x10^{5} PFU virusa u konačnom volumenu od 500 µL DMEM-a, dok se prilikom intrakranijalne infekcije miševe inficiralo virusom u dozi od 2x10^{5} PFU po mišu u volumenu od 2 µL čistog DMEM medija.

3.2.8. Uklanjanje populacije mikroglije

Uklanjanje mikroglije se provodilo korištenjem PLX5622 spoja, koji je inhibitor za Receptor 1 čimbenika stimulacije kolonija (engl. CSFR1, *Colony-stimulating factor 1 receptor*). Inhibitor PLX5622 (#A18888, Adooq Bioscience) je formuliran u AIN-76A hrani (ssniff Spezialdiäten GmbH), u krajnjoj koncentraciji od 1200 mg/kg [171]. Miševi su hranjeni prehranom obogaćenom PLX5622 inhibitorom u periodu od 2 do 4 tjedna tijekom latentne faze infekcije. Kontrolni miševi su hranjeni sa čistom AIN-76A hranom bez inhibitora kroz isti period.

3.2.9. Neutralizacija IFN-γ i blokiranje receptora za IFN-γ

Za neutralizaciju interferona gama (IFN-γ) se koristilo neutralizacijsko protutijelo (klon XMG1.2, #ICH1141-25MG, ichorbio) u krajnjoj koncentraciji od 250 µg. Neutralizacijsko protutijelo za IFN-γ se injektiralo u odrasle miševe dva puta tjedno u krajnjem volumenu od 500 µl PBS-a. Za specifično uklanjanje receptora za IFN-γ na mikrogliji, Tamoksifen (#T5648, Sigma-Aldrich) je otopljen u kukuruznom ulju (#C8267, Sigma-Aldrich) u krajnjoj koncentraciji od 10 mg/ml. Novookoćeni miševi su tretirani intragastrično pomoću 30G igle (BD Microlance, #304000) u 50 µl kukuruznog ulja, u dozi od 50 µg [172], kroz vremenski period od 2-5 postnatalnog dana. Odrasli miševi su tretirani tamoksifenom putem oralne gavaže (intragastrično) u dozi od 2 mg dnevno u 500 µl kukuruznog ulja, kroz vremenski period od tri uzastopna dana tijekom latentne faze infekcije [173]. Tamoksifen je prilikom priprave zaštićen od svjetlosti pomoću aluminijske folije, te se za svaki dan injektiranja svježe priprema i miješa sa kukuruznim uljem na 50°C, u periodu od 1 sata.

3.2.10. Protuvirusni tretman miševa

Protuvirusni lijek ganciklovir (Cymevene) je pripremljen kao otopina od 50 mg/ml, otapanjem liofiliziranog praha u deioniziranoj vodi prije tretiranja miševa. Miševi su tretirani ganciklovirom svaki dan kroz određeni period (2 tjedna za novookoćene miševe, te mjesec dana za odrasle miševe), putem intraperitonealne administracije u krajnjoj koncentraciji od 60 mg/kg. Imuni serum dobiven od životinja inficiranih divljim tipom MCMV-a je korišten za tretiranje novookoćenih miševa 1. i 7. dan nakon perinatalne infekcije. PBS je injektiran intraperitonealno svaki dan kontrolnoj grupi.

3.2.11. Određivanje titra virusa u organima

Organi inficiranih miševa MCMV-om su prikupljeni prilikom žrtvovanja i pohranjeni u eppendorf tubice od 1.5 mL sa 1 mL kompletnog DMEM medija s dodatkom 3% FCS-a (3% DMEM), i zamrznuti na –20°C. Nakon odmrzavanja tkivo je homogenizirano u kugličnom homogenizatoru, te je titar virusa u homogenatu organa određen testom virusnih čistina prema prethodno uhodanom protokolu [131]. Homogenati su dodatno razrijeđeni 100, 1000, 10000 i 100000 puta u 3% DMEM-u. Ploče sa 48 jažica (engl. *48-well plate*) su prethodno nasađene MEF-om. Višak medija je uklonjen vakuum pumpom te je na stanice nanešeno 100 µL odgovarajućeg razrjeđenja homogenata organa u duplikatu. Ploče su inkubirane 30 min na 37°C uz 5% CO_2, te nakon

inkubacije centrifugirane 30 min na 2100 rpm. Potom su ponovno inkubirane 30 min na 37°C uz 5% CO_2. Naposlijetku je u svaku rupicu dodano 500 µL metil-celuloznog medija. Nakon 5 dana inkubacije na 37°C uz 5% CO_2 su prebrojane su virusne čistine u svakoj jažici invertnim mikroskopom. Virusni titar u organima je određen prema broju čistina u odgovarajućim razrijeđenjima homogenata organa, sa razinom detekcije 100 PFU po organu. Virusni titar u tkivu je određen kao PFU (engl. *plaque forming unit*) prema gramu tkiva ili po organu. Dodatno smo prilagodili test virusnih čistina za određivanje titra virusa u cjelokupnom uzorku mozga, prilagođeno prema prethodno opisanom protokolu [174]. Tkivo mozga se prikupilo u eppendorf tubice od 1.5 mL u 1 mL 3%-tnog DMEM medija. Zatim se kugličnim homogenizatorom organ homogenizirao te su se uzorci centrifugirali 1 minutu kako bi se svo tkivo spustilo na dno eppendorf tubice. Potom se sakupio sav supernatant iznad taloga homogeniziranog tkiva i prenesao u prethodno pripremljene tube sa 5 mL 3% DMEM medija. Svi uzorci su dobro promiješani pomoću vorteksa te je po 200 µl suspenzije preneseno na ploče od 24 jažica (engl. 24-well plate), prethodno nasađene sa MEF-om. Ploče su inkubirane 30 min na 37°C uz 5% CO_2, te potom centrifugirane 30 min na 2100 rpm. Nadalje, ploče su ponovno inkubirane i nakon pola sata je nadodano 400 µl 3% DMEM medija u svaku jažicu. Nakon 5 dana, supernatanti su prikupljeni sa ploče od 24 jažica i preneseni na nove ploče od 48 jažica, prethodno nasađene sa MEF-om. Nakon 5 dana su se zabilježile jažice u kojima su bile detektirane virusne čistine (plakovi), te se odredio broj plak-pozitivnih jažica po životinji.

3.2.12. Izolacija stanica iz organa

U *ex vivo* analizama korištene su stanice dobivene iz mozga, jetre i slezene neinficiranih i inficiranih životinja u različitim vremenskim točkama nakon infekcije. Stanice iz mozga, jetre i slezene pripremljene su prema standardnim protokolima izolacije [131,175]. Ukratko, mozak, jetra i slezena su uslijed vađenja homogenizirani pomoću tučka i staničnog sita (engl. *cell strainer*), uz ispiranje tkiva sa sita pomoću 10 mL medija RPMI s dodatkom 3% FCS-a (3% RPMI). Uzorci su centrifugirani 5 min na 1500 rpm, kako bi se prikupio sav talog stanica iz homogenata. Za izolaciju limfocita iz slezene, talog stanica je resuspendiran u 5 mL pufera za lizu eritrocita te inkubiran 5 min na ledu. Liziranje eritrocita je zaustavljeno dodavanjem 10 mL medija 3% RPMI medija. Uzorci slezena su centrifugirani 5 min na 1500 rpm, te je talog resuspendiran u 10 mL 3% RPMI medija, uz ponovno prosijanje kroz stanično sito. Za izolaciju

limfocita iz mozgova, talog stanica je resuspendiran u 5 mL 30% Percolla (#GE17-0891-09, Cytiva), te je stanična suspenzija naslojena na 5 mL 70%-tnog Percolla. Nakon naslojavanja, uzorci su centrifugirani 25 minuta na 1800 rpm bez kočnice (deakceleracija 0-2), kako ne bi došlo do miješanja faza prilikom zaustavljanja centrifuge. Po završetku centrifuge, sakupljeno je otprilike 3 ml stanica u međufazi, odnosno limfocitnog prstena. Po sakupljanju limfocitnog prstena, Percoll je ispran korištenjem 3% RPMI medija uz centrifugiranje na 1500 rpm, 5 minuta. Za izolaciju limfocita iz jetre, talog stanica je nakon homogenizacije resuspendiran u 5 mL 40% Percolla, te naslojen na 5 mL 80%-tnog Percolla. Prilikom razdvajanja faza sa stanicama iz jetre, ponovno su prikupljene stanice u međufazi (otprilike 3 mL). Dodatno, stanice su lizirane sa puferom za lizu eritrocita, tako što su inkubirane sa 5 mL pufera za lizu, 5 min na ledu. Reakcija liziranja je ponovno zaustavljena dodatkom 3% RPMI medija, stanice su centrifugirane i ponovno resuspendirane u 3% RPMI mediju. Ukoliko su se stanice koristile za pokuse određivanja funkcije limfocita i proizvodnje citokina, stanice su resuspendirane u mediju RPMI s dodatkom 10% FCS-a (10% RPMI), dok su za fenotipsku analizu u metodi protočne citometrije stanice resuspendirane u FACS mediju (engl. FACS, *Fluorescence-activated cell sorting*). Astrociti su izolirani drugačijim pristupom i korištenjem komercijalnih kitova prema protokolima proizvođača i prema prethodno opisanoj literaturi [176]. Korišten je kit za izolaciju i disocijaciju iz tkiva mozgova odraslih životinja (engl. *Adult Brain Dissociation Kit* (#130-107-677, Miltenyi Biotec)) koji se provodi uz enzimsku digestiju pomoću uređaja gentleMACS™ Octo Dissociator with Heaters (Miltenyi Biotec, #130-096-427). Nakon disocijacije tkiva i uklanjanja eritrocita, dodatno je uklonjen mijelin pomoću magnetnih kuglica (#130-096-433, Myelin Removal Beads, Miltenyi Biotec). Nakon svih postupaka i izolacije stanica iz pojedinih organa se odredio broj stanica u konačnom volumenu za daljnju analizu.

3.2.13. Određivanje broja stanica

Broj stanica u uzorku je određen korištenjem Neubauerove komorice, pomoću tripanskog modrila. Suspenzija tripana i stanica je stavljena u komoricu ispod pokrovnog stakalca, te su se brojale samo žive stanice. Žive stanice su raspoznate od mrtvih tako što se ne boje tripanskim modrilom, za razliku od mrtvih stanica. Ukupan broj stanica je određen množenjem srednje vrijednosti broja stanica po svakom

izbrojenom kvadrantu komorice s korektivnim faktorom 10 000, faktorom razrjeđenja 9 i ukupnim volumenom uzorka.

3.2.14. Analiza stanica metodom protočne citometrije

Nakon izolacije stanica iz pojedinih tkiva, stanice su raspoređene u ploče s 96 rupica s okruglim dnom (engl. *96-well plate*). Najprije se spriječilo nespecifično vezanje protutijela na Fc receptore, tako što su stanice inkubirane s blokirajućim antitijelom anti-mišje CD16/CD32 monoklonsko protutijelo (klon 93) #14-0161-82 (razrjeđenje 1:50), Thermo Fisher). Nakon dodatka kombinacije željenih protutijela (Tablica 9.) pripremljenih u FACS mediju prema određenom razrjeđenju, stanice su inkubirane 20 minuta na ledu. Za bojanje virus-specifičnih stanica, koristio se M38 tetramer (SSPPMFRV, H2-K(b)) BV421 # 65758 (razrjeđenje 1:400), sintetiziran od strane Nacionalnog instituta zdravlja (engl. *National Institutes of Health tetramer core facility*). Obojane stanice su isprane FACS medijem, te resuspendirane u 150 µL istog medija i analizirane na protočnom citometru. Sva analiza pojedinih populacija imunosnih stanica iz neinficiranih i inficiranih životinja MCMV-om *ex vivo*, te njihova sposobnost lučenja citokina i provjera učinkovitosti uklanjanja mikroglije je određena metodom protočne citometrije (protočni citometar FACS AriaIIu, BD Bioscience, San Jose, CA). Podaci su analizirani korištenjem FlowJo_v10 (Tree Star) aplikacije.

3.2.15. Analiza proizvodnje IFN-γ metodom protočne citometrije

Kako bi odredili koje stanice u mozgu luče IFN-γ tijekom latencije, sakupljeni su uzorci tkiva mozgova te su izolirane mononuklearne stanice kao što je prethodno opisano. Za unutarstanično bojanje citokina, stanice su inkubirane 5 sati u 10% RPMI mediju sa forbol-12-miristat-13-acetatom (PMA, 50 ng/mL) i Ionomycinom (500 ng/mL), te brefeldinom. Nakon toga, stanice su obojane površinski kao što je prethodno opisano, te fiksirane inkubacijom u otopini za fiksaciju stanica za unutarstanično bojanje, 30 minuta na sobnoj temperaturi. Stanice su potom isprane i obojane protutijelom za detekciju IFN-γ u otopini za unutarstanično bojanje. Nakon inkubacije od 20 minuta na ledu, stanice su isprane, resuspendirane u 150 µL FACS medija te analizirane u metodi protočne citometrije.

3.2.16. Konfokalna mikroskopija

Kako bi se analiziralo izražaj molekula MHC-II u inficiranim mozgovima, miševi su podvrgnuti transkardijalnoj perfuziji fiziološkom otopinom (kratko ispiranje), nakon čega je slijedila fiksacija tkiva 4% paraformaldehidom (PFA) i inkubacija u 4% PFA, 24 sata na +4°C. Nakon prekonoćne fiksacije, mozgovi su pohranjeni u PBS-u na +4°C. Upotrebom vibratoma (VT1200, Leica Microsystems), mozgovi su izrezani koronalno u serijske rezove debljine od 50 µm, sakupljene u hladnom PBS-u. Slobodno plutajući rezovi su blokirani i permeabilizirani inkubacijom u 0,01 M PBS (pH 7,4) sa 10% normalnim kozjim serumom (#X0907, Dako) i 0,2% Triton X-100 (# T8532, Sigma), na sobnoj temperaturi, 45 minuta. Potom je slijedila inkubacija sa primarnim protutijelima: anti-Iba1 (#019-19741, razrjeđenje 1:500, FUJIFILM Wako) i MHC-II (I-A/I-E) (#14-5321-82, razrjeđenje 1:250, Invitrogen) preko noći. Nakon primarnih protutijela, slijedila je inkubacija sa odgovarajućim sekundarnim protutijelima; anti-štakor Alexa Fluor 488 (#4416, razrjeđenje 1:250, Cell Signaling) i anti-zec Alexa Fluor 555 (#4413, razrjeđenje 1:250, Cell Signaling).

Za morfološku analizu pojedinačnih stanica mikroglije, smrznuti mozgovi su izrezane na rezove debljine 20 µm, pomoću Leica 2800E Frigocut kriostatskog mikrotoma. Rezovi su inkubirani 1 sat u otopini za blokiranje, koja sadrži 0,3% Triton X-100, 5% kozjeg seruma, 5% magarećeg seruma i 5% goveđeg serumskog albumina (BSA) na sobnoj temperaturi (RT) na mješalici, nakon čega je uslijedila inkubacija sa određenim primarnim protutijelima, preko noći na +4°C u otopini za blokiranje. Korištena su sljedeća protutijela: poliklonsko zečje anti-IBA1 (1:1000, Synaptic Systems—RRID: AB_10641962), štakorskoi anti-mišje CD107a (LAMP-1; 1:500, BD Pharmingen™-RRID: AB_2134499) i poliklonsko anti-pileće homer-1 protutijelo (1 :500, Synaptic Systems—RRID: AB_2631222). Sljedeći dan su rezovi inkubirani sa sekundarnim antitijelima uključujući Cy™3 AffiniPure kozji anti-zečji IgG (H + L) (1:500, Jackson Immuno Research - RRID: AB_2338006), Cy™5 AffiniPure kozji anti-štakorski IgG (H + L) (1:500, Jackson Immuno Research - RRID: AB_2338264) i Alexa Fluor® 488 AffiniPure magareći anti-kokošji IgY (IgG) (H + L) (1:500, Jackson Immuno Research - RRID: AB_2340375), u 0,05% Triton X-100 i PBS 1X, dva sata na sobnoj temperaturi na mješalici, u mraku. Nakon toga, rezovi su inkubirani s 4', 6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI) (1:1000, Sigma-Aldrich) 5 minuta. Konačno, rezovi su montirani na stakalce u mediju za montiranje fluorogela (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA).

Kako bi se detektirao humani HLA-DR (MHC-II) na mikrogliji u humanim uzorcima tkiva mozgova, fetalno moždano tkivo je fiksirano u cinkovom formalinu kroz period od jednog tjedna, te je potom uklopljeno u parafin. Otkrivanje antigena je provedeno u citratnom puferu (pH 6,0). MHC-II je detektiran pomoću anti-HLA-DR protutijela (#ab20181, razrjeđenje 1:250, Abcam). Svi rezovi su kontrastirani sa DAPI-jem (razrjeđenje 1:1000, #422801, Biolegend) i uklopljeni u medij za uklapanjeProLong (#P36934, Invitrogen). Slike su dobivene laserskim skenirajućim konfokalnim mikroskopom Leica DMi8 (Leica Microsystems).

3.2.17. Snimanje pojedinačnih stanica i analiza mikroglije

Pojedinačne stanice mikroglije su snimljene iz trostruko obojenih sekcija (IBA-1 mikroglija/LAMP-1 membrana lizosoma/Homer-1 postsinaptički protein), korištenjem konfokalnog laserskog skenirajućeg mikroskopa (cLSM, Olympus). Z-skupovi stanica mikroglije su snimljeni u razmacima od 0,35 µm sa 40x UPLFLN uljnim objektivom (N.A. 1,30), i 6x povećanjem. Konačna veličina piksela je bila 0,103 µm × 0,103 µm. Za svaku životinju prikupljeni su Z-skupovi od tri nasumično odabrane pojedinačne stanice mikroglije u CA1 regiji hipokampusa. Analiza se provela u IMARIS programu, gdje je površina stanica mikroglije modelirana je pomoću IBA-1 signala (detalji površine: 0,2 µm). Zatim su unutar konstruirane površine mikroglije zabilježeni pozitivni LAMP-1 signali kako bi se modelirala površina LAMP-1 vezikula (detalji površine: 0,2 µm). Homer-1 točke u LAMP-1 vezikulama unutar stanica mikroglije su označene funkcijom točke (promjer točke: 0,5 µm). Osim toga, struktura mikroglije je izrađena bilježenjem signala IBA-1 na površini stanice. Alat "Add New Cell" korišten je za modeliranje stanične some (širina filtra: 1 µm, promjer sfere: 0,8 µm), a "Filament Analysis" korišten je za pristup složenosti i razgranatosti mikroglije (najveći promjer: 5 µm, najtanji promjer: 0,3 µm, promjer područja sfere: 15 µm). Parametri koji su mjereni i bilježeni tijekom analize su: volumen IBA-1 izražen u μm^3, volumen LAMP-1 u IBA-1-pozitivnim točkama u μm^3, broj Homer-1 točaka u LAMP-1-pozitivnim regijama, te broj točaka grananja i veličina soma mikroglije u μm^3.

3.2.18. Organotipske kulture ljudskog fetalnog mozga

Organotipske kulture ljudskog fetalnog mozga (engl. hfOBSCs, *Human fetal organotypic brain slice cultures*) pripremljene su kako je prethodno opisano [177]. HfOBSC su inficirani sa 10^6 PFU virusa HCMV RV-TB40-BAC_{KL7}-SE-EGFP. Nakon 1 h inkubacije na 37 °C, kulture se ispiru PBS-om i drže u mediju za kulturu stanica 48 h nakon infekcije, na 37 °C u CO_2 inkubatoru. Dodatno, jedna skupina je tretirana sa 1000 U/ml rekombinantnog humanog IFN-γ (#300-02, Peprotech) tijekom 48 sati. HfOBSC su fiksirani u PBS-u koji je sadržavao 4% paraformaldehid, te su umetnuti u parafin za histološke analize. Za imunofluorescentno bojenje, rezovi su tretirani sa TrueBlack (#23007, Biotium) kako bi se smanjila autofluorescencija. Korištena su sljedeća primarna protutijela: FITC kozje anti-GFP (#ab6662, razrjeđenje 1:250, Abcam), zečje anti-Iba1 (#019-19741, razrjeđenje 1:500, FUJIFILM Wako) i mišje anti-HLA-DR/DQ/DP (#M0775, razrjeđenje 1:250, klon CR3/43, DAKO). Nekonjugirana primarna protutijela obilježena su odgovarajućim sekundarnim protutijelima: magarećim anti-zečjim IgG konjugiranim AF555 (#A-31572, razrjeđenje 1:250, Invitrogen) i kozjim anti-mišjim IgG konjugiranim AF647 (#A-21235, razrjeđenje 1:250, Invitrogen). Jezgre su obojene otopinom Hoechst 33342 (#62249, Thermo Scientific). Slike su snimljene konfokalnim mikroskopom Leica Stellaris 5 Low Incidence Angle.

3.2.19. Golgi-Cox bojanje

Kako bi se ispitala morfologija hipokampalnih neurona, provedeno je Golgi-Cox bojenje korištenjem komercijalnog FD Rapid GolgiStain™ kita (FD Rapid GolgiStain™ Kit, #PK401), prema uputama od proizvođača. Desna hemisfera mozgova je inkubirana u mješavini otopine Golgi-Cox (prethodno pripremljene miješanjem otopine A i B u omjeru 50:50, prema uputama proizvođača). Prije rezanja, hemisfere su uklopljene u 2% agar. Koronalni presjeci hemisfera debljine od 200 µm izrezani su Leica Vibratomom (VT 1000S) i postavljeni na stakalca obložena želatinom. U sljedećim koracima, rezovi su obrađeni za razvoj signala u skladu s protokolom proizvođača kompleta. Na kraju, rezovi su montirani sa Permountom (Thermo Fisher Scientific). Za daljnju analizu, rezovi se suše na zraku 2 tjedna.

3.2.20. Analiza podataka dobivenih Golgi-Cox bojenjem

Nakon Golgi-Cox bojanja, rezovi mozgova su analizirani pomoću mikroskopa ZEISS opremljenog sa Apotome modulom i objektivom ×63 (N.A. 1.4, ulje). Z-skupovi u

razmacima od 0,3 μm dobiveni su bilježenjem sekundarnih apikalnih dendrita CA1 piramidalnog neurona. Najmanje 8 dendrita duljine veće od 60-70 μm, sa najmanje 40-50 μm od stanične some, je snimljeno po regiji i životinji. Gustoća dendritičkih spina je snimljena po μm dendrita, te analizirana ručno korištenjem softvera Fiji (BioVoxxel).

3.2.21. Intrakranijalna infekcija

Intrakranijalna infekcija je provedena injektiranjem odraslih miševa sa $2x10^5$ PFU MCMV-a u 2 μL čistog DMEM medija. Prilikom intrakranijalne infekcije, miševi su uspavani prema standardnim procedurama prije stereotaksijskog zahvata. Zatim se pomoću stereotaksijskog uređaja miš pozicionira i virus se injektira u fronatlni desni režanj na dubini od 2.5 mm. Intrakranijalno ubrizgavanje virusa je provedeno pomoću Angle stereotaksijskog instrumenta za male životinje (Leica Biosystems) kako je prethodno opisano [136].

3.2.22. Luminex® analiza citokina u mozgu

Za određivanje razine citokina i kemokina u latentno inficiranim mozgovima, miševi su perfundirani sa 20 mL hladnog PBS-a te su mozgovi sakupljeni u krioepruvete (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster). Mozgovi su potom izvagani i brzo zamrznuti u tekućem dušiku, te pohranjeni na -80 °C za daljnju obradu. Zamrznuti mozgovi su homogenizirani korištenjem Procartaplex™ pufera (Thermo Scientific). Koncentracija tkivnih proteina analizirana je pomoću ProcartaPlex™ Mouse Immune Monitoring Panel 48-Plex, prema uputama proizvođača (EPX480-20834-901, Thermo Scientific). Koncentracija citokina je mjerena instrumentom Bio-Plex200™ (Bio-Rad). Koncentracije su određene pomoću standardnih krivulja i softvera proizvođača (Luminex Manager Software).

3.2.23. Izolacija DNA i RNA iz mozgova

Izolacija DNA i RNA iz mozgova je izolirana pomoću kita za istovremenu izolaciju DNA/RNA (NucleoSpin TriPrep kit (Macherey-Nagel, #740966.250)), prema uputama proizvođača. Najprije je prikupljeno tkivo mozgova lizirano pomoću dodatka 350 μL RP1 pufera i 3.5 μL β-merkaptoetanola, po uzorku. Zatim se lizat filtrira kroz membranu pomoću centrifugiranja na 11 000 x g/1 minuta. Potom se u filtrirani lizat nadoda 350 μL 70%-tnog etanola i dobro resuspendira. Nakon ponovne centrifuge od 11 000 x g/30 sekundi, kolona se ispire sa 2x 500 μL pufera za DNA ispiranje. Zatim se kolona ostavi da se osuši na sobnoj temperaturi 3 minute. DNA se potom eluira dodatkom 100

µL čiste vode, inkubiranjem od 1 minute na sobnoj temperaturi te centrifugiranjem od 11 000 x g/1 minuta. Na kolonici je ostala vezana RNA, koja se potom digestira od ostatka DNA na koloni, dodatkom 5 µL rDNAze i 95 µL pufera za rDNAzu po uzorku, te inkubacijom od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Potom se RNA sa kolonice ispire sa više ponavljanja centrifugiranja na 11 000 x g dodatkom od 200 µL, 600 µL i 250 µL pufera za ispiranje RNA. Nakon tri kruga ispiranja, na kolonicu je dodano 30 µL čiste vode te su uzorci inkubirani 1 minutu na sobnoj temperaturi. Naposlijetku, RNA je eluirana centrifugiranjem od 11 000 x g/1 minutu. Uzorci DNA su pohranjeni na -20°C te RNA na -80°C do daljnjih analiza. Koncentracija DNA/RNA je provjerena na nanofotometrijskom uređaju (IMPLEN).

3.2.24. Reverzna transkripcija

iScript Reverse Transcription Supermix (BIO-RAD, # 1708840) je korišten za dobivanje komplementarne DNA (cDNA). Izoliranom uzorku RNA je dodano 4 µL reakcijske smjese za reverznu transkripciju, te je cDNA dobivena korištenjem programa prikazanog u Tablici 16.

Tablica 16. Program reakcije za sintezu cDNA.

Program reakcije:
1. 25°C 5 min 2. 46°C 20 min 3. 95°C 1 min

3.2.25. Kvantitativni PCR (qPCR)

Kvantitativni PCR (qPCR) je proveden za detekciju genoma mišjeg CMV-a (MCMV). Za detekciju M86 regije korištene su sekvence početnica i probe prikazane u Tablici 8. Proba korištena za detekciju M86 regije je korištena u koncentraciji od 250 nM. Za reakcijsku smjesu se koristio Takyon Master Mix (Eurogentec), te je od svakog uzorka uzeto 5 µl za reakciju qPCR-a. Relativni izražaj M86 gena je normaliziran putem kvantifikacije izražaja gena za *Gapdh* (FAM, Mm05724508_g1). Program reakcije je prikazan u Tablici 17. Svi uzorci su nanešeni kao tehnički duplikati na ploču sa 96 jažica (engl. 96-well plate) za qPCR reakciju.

Tablica 17. Program reakcije za detekciju virusnog genoma M86.

Program reakcije:		
1. 50°C	2 min	
2. 95°C	3 min	
3. 50x	- 95°C	30 s
4. 56°C	40 s	

Detekcija virusnog gena *gB* i mišjeg gena *Pthrp* (Tablica 18.) je također određena u tehničkim duplikatima, gdje je za qPCR reakciju uzeto 5 µl uzorka, u koncentraciji od 200-250 ng DNA. Kako bi se odredio broj kopija virusnog genoma MCMV-a, napravljena je standardna krivulja za oba gena u serijskim razrjeđenjima od 10^1-10^6 kopija po reakciji, koristeći pDrive_gB_PTHrP_Tdy plasmid. Za reakcijsku smjesu se koristio Fast Plus EvaGreen qPCR master mix (Biotium). Program reakcije i korištene sekvence početnica navedene su u Tablici 8. Za obje qPCR reakcije je korišten 7500 Fast Real Time PCR uređaj (Applied Biosystems).

Tablica 18. Program reakcije za detekciju virusnog genoma gB.

Program reakcije:	
1. 95°C	2 min
2. 95°C	10 s, 50x
3. 56°C	20 s
4. 72°C	30 s

3.2.26. Priprema uzoraka i biblioteke za sekvencioniranje RNA na razini pojedinačnih stanica (engl. *Single-cell RNA sequencing*)

Kako bi se analizirale detaljne transkripcijske promjene u mikrogliji i astrocitima uzrokovane infekcijom, provedeno je sekvenciranje RNA na razini pojedinačnih stanica (engl. *Single-cell RNA sequencing*). Populacije glija-stanica su izdvojene staničnim sortiranjem pomoću protočnog citometra nakon izolacije stanica iz mozgova, gdje je mikroglija izolirana pomoću standardnog protokola za izolaciju mononuklearnih stanica iz cijelog mozga pomoću odvajanja na gradijentu gustoće [175], dok su astrociti izolirani pomoću prethodno opisanih protokola [178]. Sortirane stanice iz mozgova pet životinja su spojene u jedan uzorak po skupini (inficirana i neinficirana skupina), za obje stanične populacije. Mikroglija ($CD45.2^{int}CD11b^{+}$) i astrociti ($CD45.2^{-}CD11b^{-}O1^{-}ACSA\text{-}2^{+}$) su razvrstani staničnim sortom u sterilni RPMI medij koji sadrži 10% FBS-a, pomoću mlaznice od 100 µm na FACSAria III sorteru (BD Bioscience). Nakon podešavanja gustoće stanica od 1000 stanica/µL, sortirane stanice su podijeljene u Gel Bead-In-EMulsions (GEMs) pomoću Chromium Controller-a (10x Genomics), prema uputama proizvođača. Nakon toga je izvršena reverzna transkripcija, amplifikacija cDNA i konstrukcija knjižnice korištenjem Chromium Single Cell 3′ GEM, Library & Gel Bead Kit v3 (10x Genomics) prema uputama proizvođača. Knjižnice su sekvencionirane na NovaSeq 6000 sekvenceru (Illumina) upotrebom NovaSeq 6000 S1 Reagens Kit (100 ciklusa, 28_8_0_89 bp) s dubinom od 50 000 očitanja po stanici.

3.2.27. Priprema uzorka, kontrola kvalitete izolirane RNA i sekvencioniranje cjelokupne RNA

Mononuklearne stanice su izolirane iz cijelog mozga neinficiranih i inficiranih miševa MCMV-om, 16 mjeseci nakon infekcije, kao što je prethodno opisano [175]. Nakon izolacije, mononuklearne stanice obilježene su anti-CD45 i anti-CD11b protutijelima, a mikroglija, definirana kao $CD45^{int}CD11b^{+}$ populacija, je odvojena korištenjem FACS sortera stanica na Aria IIu, korištenjem mlaznice od 100 µm. Prije stvaranja biblioteke, RNA je podvrgnuta razgradnji genomske DNA, koristeći se enzimom DNaz-om I (Thermo Fisher Scientific). Knjižnice za RNA sekvencioniranje generirane su pomoću kompleta SMARTSeq v4 Ultra Low Input RNA (Clontech Laboratories) kita prema preporukama proizvođača. Konačne biblioteke su generirane korištenjem Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina). Koncentracije konačnih biblioteka izmjerene su Qubit 2.0 Fluorometrom (Thermo Fisher Scientific), a distribucija duljine fragmenata

analizirana je DNA High Sensitivity Chipom na Agilent 2100 Bioanalyzer-u (Agilent Technologies). Svi uzorci su normalizirani na 2 nM i skupljeni u ekvimolarnim koncentracijama, a zbir knjižnice je sekvenciran na NextSeq500 (Illumina). Sveukupna kvaliteta obrezanih sekvenci procijenjena je FastQC v0.12.1 (Andrews, 2010.). Gdje je primjenjivo, podaci o kvaliteti iz pojedinačnih analiza agregirani su pomoću MultiQC v1.24 (Ewels et al., 2016.). Analiza podataka, koja se odnosi na analizu diferencijalno ispoljenih gena, provedena je kako je prethodno opisano [179], uz manje izmjene vezane uz dostupnost novijih verzija sekvenci mišjeg genoma i transkriptoma, kao i ažuriranih verzija operativnih sustava, računalnih okruženja, knjižnica i paketa korištenih u analizi.

3.2.28. Analiza podataka dobivenih sekvencioniranjem RNA na razini pojedinačne stanice

Demultipleksirane FASTQ datoteke povezane s uzorkom obrađene su korištenjem programa 10x Genomics Cell Ranger v8.0 [180–182], kako bi se stvorila zasebna neobrađena i filtrirana značajka - matrica brojanja koda za svaki uzorak. Početno pozivanje stanica i eliminacija pozadinskog tehničkog šuma iz dobivenih matrica neobrađenih podataka provedeno je korištenjem dubokog generativnog modela implementiranog u programskom paketu CellBender v0.3.0 [183]. Filtrirane matrice brojanja koje je proizveo Cellbender zatim su korištene kao početni unos podataka brojanja za konstrukciju AnnData objekata [184], koristeći Scanpy v1.10.2 softver [185]. U početnom koraku predfiltriranja, stanice koje ispoljavaju manje od 250 gena i geni ispoljeni u manje od pet stanica uklonjeni su iz AnnData objekata prije nizvodne obrade. Zatim su duplicirane stanice u prethodno filtriranim skupovima podataka identificirane pomoću modela neuronske mreže Solo [184] koji je implementiran u knjižnici scvi-tools [186,187], a stanice s rezultatom dupliciranja vjerojatnosti većim od 0,6 označene su kao duple stanice. Nakon identifikacije i uklanjanja dubleta, izračunato je pet srednjih apsolutnih odstupanja (5xMAD) vrijednosti za složenost, broj otkrivenih gena i postotak broja ribosoma za svaku stanicu unutar skupa podataka mikroglije i astrocita. U svakom skupu podataka, stanice s više od 5% broja mitohondrija ili one koje premašuju gornju graničnu vrijednost 5×MAD za postotak broja ribosoma i stanice s vrijednostima složenosti ispod donje granice 5×MAD smatrane su izvanrednim vrijednostima. Osim ovih općih kriterija, stanice koje sadrže manje od donje 5×MAD granice detektiranih gena ili stanice koje imaju više od 0,02%

transkripata S100a8 označene su kao odstupajuće vrijednosti u skupovima podataka mikroglije, dok su stanice koje sadrže manje od 250 detektiranih gena tretirane kao odstupanja unutar skupova podataka o astrocitima. Označavanje preostalih tipova stanica unutar skupova podataka mikroglije i astrocita pomoću odrađeno je pomoću CellTypist v1.6.3 [188], a samo stanice koje imaju veću od 50% vjerojatnosti očekivani tip stanice (mikroglija ili astrocit) označeni su kao mete u svojim odgovarajućim skupovima podataka. Za svaki skup podataka, gore navedeni postupci kontrole kvalitete rezultirali su identifikacijom kodova označenih kao duplikati, odstupanja ili uljezi, a svaka takva stanica uklonjena je iz skupa podataka kao dio postupka filtriranja na razini stanice. Nakon filtriranja na razini stanice, mitohondrijski, ribosomski i geni izraženi u manje od 15 stanica također su uklonjeni iz matrica brojanja kao dio postupka filtriranja na razini gena, osim šest gena od interesa (*H2-Aa*, *Cd74*, *C3*, *Cxcl9*, *Ccl5* i *Ccl2*) u skupu podataka o astrocitima. Nakon integracije podataka, te projekcije za vizualizaciju subpopulacija (engl. UMAP plot), identifikacija subpopulacija je provedena pomoću Seurata v5.0.1 [189]. Prilagođene R funkcije, su temeljene na rezultatu Seuratovih funkcija DimPlot i FeaturePlot i funkcionalnosti dostupnih u paketu tidyverse [190], te su korištene za vizualizaciju pripadnosti subpopulaciji i razini izražaja gena za pojedinačne stanice u UMAP dijagramima raspršenosti. Sirovi podaci sekvenciranja dobiveni u ovom istraživanju pohranjeni su u bazi podataka NCBI Sequence Read Archive (SRA) pod pristupnim brojem projekta BioProject PRJNA1531803.

3.2.29. Elektrofiziologija

Mozgovi miševa su po žrtvovanju brzo uklonjeni i uronjeni u hladnu umjetnu cerebrospinalnu tekućinu (engl. ACSF, *artificial cerebrospinal fluid*) koja je zasićena karbogenom (95 % O_2 / 5 % CO_2). ACSF se sastoji od (u mM): 124 NaCl, 4,9 KCl, 1,2 KH_2PO_4, 2,0 $MgSO_4$, 2,0 $CaCl_2$, 24,6 $NaHCO_3$ i 10 D-glukoze, podešen na pH 7,4. Akutni hipokampalni rezovi (debljine 400 µm) pripremljeni su ručnim rezačem tkiva, a potom su prebačeni u komoru za snimanje, gdje su održavani na 32 °C i perfundirani ACSF-om zasićenim karbogenom konstantnom brzinom od 0,5 ml/min najmanje 2 sata prije elektrofizioloških mjerenja. Ekscitacijski postsinaptički potencijali (engl. fEPSP, *field excitatory postsynaptic potential*) bilježeni su u akutnim hipokampalnim rezovima. Sinaptički odgovor je izazvan stimulacijom između CA3 i CA1 pomoću elektroda od nehrđajućeg čelika (5 MΩ, AM Systems). fEPSP je analiziran kao početni nagib

koristeći registracijsku elektrodu (5 MΩ, AM Systems) postavljenu u apikalni dendritski sloj CA1. Signali su pojačani diferencijalnim pojačalom i digitalizirani putem analogno-digitalnog pretvarača (Cambridge Electronic Design). Pokus je proveden bez prethodnog znanja o pokusnim skupinama. Prikupljanje podataka i naknadne analize provedeni su korištenjem IntraCell softvera (verzija 1.5, LIN, Magdeburg, 2000).

3.2.30. Barnesov labirint

Barnesov labirint je test korišten za procjenu prostorne memorije i učenja miševa. Miševi su testirani tijekom četiri uzastopna dana u Barnesovom labirintu, pri čemu su svakoga dana provedena dva pokušaja, kako je prethodno opisano [21]. Na početku svakog pokušaja mišu je pokazana rupa za skrivanje u koju se može sakriti (engl. *escape hole*). Potom je miš postavljen u središte arene Barnesova labirinta i pokriven kutijom tijekom 10 sekundi. Nakon uklanjanja kutije mišu je bilo omogućeno u dva pokušaja po 3 minute za istraživanje arene i pronalaženje rupe za skrivanje. Ako miš nije pronašao rupu za skrivanje unutar predviđenog vremena, nježno je usmjeren prema rupi u kojoj je ostavljen 60 sekundi prije povratka u kavez. Barnesov labirint je nakon svakog miša očišćen sa 10 %-tnim etanolom, kako bi se uklonili svi mirisni tragovi i fekalna onečišćenja. Parametri koji su se bilježili tijekom testiranja su primarna latencija (vrijeme potrebno za pronalaženje rupe za skrivanje) te ukupan broj pogrešaka prije pronalaska rupe za skrivanje, koji su dobiveni kao srednja vrijednost oba pokušaja. Miševi koji se nisu udaljili od središta labirinta bili su isključeni iz analize. Pokus nije bio proveden uz zaslijepljivanje, bile su poznate pokusne skupine. Svi pokusi su snimani pomoću softvera ANY-maze 7.4.

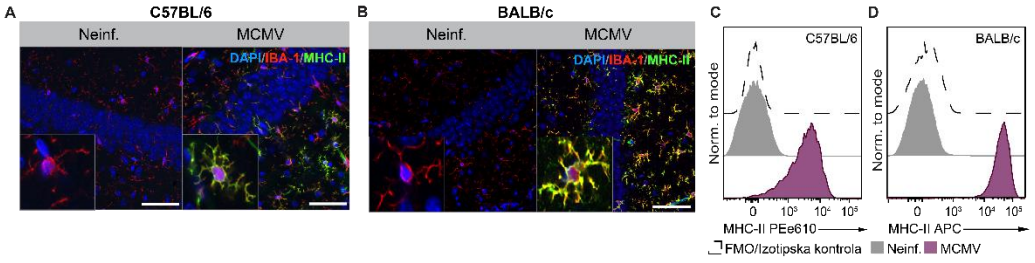
3.2.31. Statističke analize

Svi podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM ili medijan vrijednosti. Normalizirane vrijednosti su izračunate u odnosu na neinficirane kontrole. Statistička značajnost određena je ili dvostranim nesparenim Studentovim t-testom, Mann-Whitneyjevim U testom ili dvosmjernim ANOVA testom, ovisno o broju životinja po grupi i distribuciji podataka, korištenjem GraphPad Prism 8. Vrijednost $p<0,05$ smatrana je statistički značajnom, te su p vrijednosti su točno naznačene na svakoj slici.

4. REZULTATI

4.1. Pojačano izražavanje MHC-II molekula obilježje je aktivirane mikroglije tijekom akutne infekcije CMV-om u mozgu

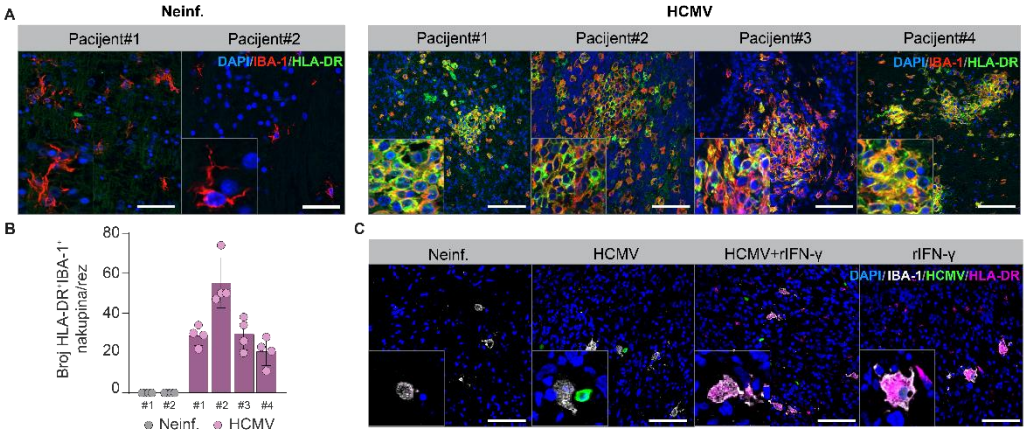
Infekcija novookoćenih miševa MCMV-om dovodi do infekcije i upalnog odgovora u mozgu, što uključuje i aktivaciju mikroglije [146,148,175]. Aktivirana mikroglija na svojoj površini pojačano ispoljava molekule MHC-I, MHC-II i kostimulatorne molekule CD80 i CD86 [146]. Kako bismo proširili prethodna istraživanja, inficirali smo intraperitonealno (i.p.) novookoćene miševe divljeg soja (engl. WT, wild type) C57BL/6 (**Slika 3.A**) i BALB/c (**Slika 3.B**), te sakupili mozgove 13 dana nakon infekcije (d.n.i.), kada je vrhunac replikacije MCMV-a u mozgu [136,146]. Metodom konfokalne mikroskopije smo potvrdili kolokalizaciju markera za mikrogliju IBA-1 (engl. *Ionized calcium-binding adaptor molecule 1*) i markera za molekule MHC-II nakon infekcije MCMV-om u oba soja miševa, što ukazuje da mikroglija ispoljava molekule MHC-II uslijed akutne infekcije MCMV-om (**Slika 3.A, B**). Površinski izražaj molekula MHC-II na mikrogliji u miševa soja C57BL/6 (**Slika 3.C**) i BALB/c (**Slika 3.D**) je dodatno je potvrđeno metodom protočne citometrije.



Slika 3. Akutna infekcija MCMV-om uzrokuje aktivaciju mikroglije i izražaj MHC-II molekula. Novookoćeni miševi soja C57BL/6 (**A, C**) i BALB/c (**B, D**) su inficirani MCMV-om intraperitonealno. **(A, B)** Određeno je izražaj molekula MHC-II na mikrogliji (IBA-1+) 13 dana nakon infekcije (d.n.i.) metodom konfokalne mikroskopije. **(C, D)** Reprezentativni histogrami analize protočnom citometrijom koji pokazuju izražaj molekula MHC-II na mikrogliji 13 d.n.i. Mjerila za A i B su 25 μm. DAPI (jezgra), IBA-1 (mikroglija), MHC-II.

Kako bismo naše rezultate iz mišjeg modela povezali sa prirođenom infekcijom HCMV-om u ljudi, analizirali smo tkiva mozga fetusa inficiranih HCMV-om i analizirali izražaj molekula HLA-DR (MHC-II) na mikrogliji. Uočili smo da u mozgovima inficiranim HCMV-om mikroglija također ispoljava molekule HLA-DR (**Slika 4.A, B**), što nije bio slučaj u neinficiranim kontrolnim tkivima. Ovi rezultati su dodatno potvrđeni

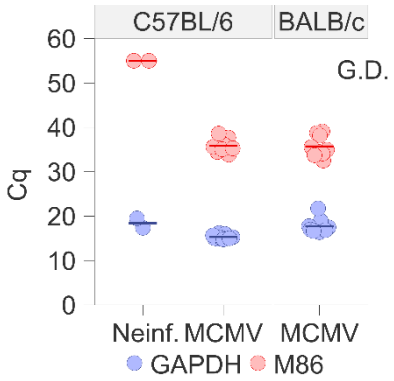
kvantifikacijom broja nakupina HLA-DR^{+}IBA1^{+} stanica (**Slika 4.B**). Prethodno je pokazano da je IFN-γ ključan za ranu aktivaciju mikroglije i izražaj MHC-II tijekom akutne faze infekcije MCMV-om [146]. Kako bismo ispitali je li na isti način regulirano izražaj molekula HLA-DR na mikrogliji tijekom infekcije fetalnog mozga HCMV-om, koristili smo nedavno razvijenu platformu za organotipsku kulturu ljudskog fetalnog mozga (engl. hfOBSC, *human fetal organotypic brain slice culture*) [177]. Naši rezultati su pokazali da infekcija hfOBSC-a HCMV-om ne dovodi do izražaja molekula HLA-DR na mikrogliji (**Slika 4.C**). Međutim, u korištenim organotipskim kulturama se ne nalaze stanice koje luče IFN-γ. Stoga smo dio hfOBSC-a tretirali rekombinantnim IFN-γ, što je rezultiralo izražajm molekula HLA-DR (**Slika 4.C**). Ovaj rezultat ukazuje da je IFN-γ ključan za izražaj molekula MHC-II na mikrogliji, a što je u skladu sa rezultatima dobivenim primjenom mišjeg modela prirođene infekcije [146].



Slika 4. Prirođena infekcija HCMV-om dovodi do IFN-γ-ovisnog izražaja HLA-DR (MHC-II) na mikrogliji. (A) Izražaj molekula HLA-DR na mikrogliji u kontrolnim, neinficiranih tkivima mozga i inficiranih mozgova HCMV-om. Prikazana je reprezentativna slika HLA-DR+ mikroglije za svakog pojedinog pacijenta. n=2 (neinficirani), n=4 (HCMV). **(B)** Kvantifikacija HLA-DR^{+}IBA-1^{+} nakupina u neinficiranim i inficiranim tkivima. Pobrojane su nakupine na 4 reza po svakom pacijentu. **(C)** Kulture organotipskih rezova mozgova fetusa bile su neinficirane (Neinf.), inficirane HCMV-om (HCMV), inficirane HCMV-om i tretirane rekombinantnim IFN-γ (HCMV + rIFN-γ) ili tretirane rekombinantnim IFN-γ (rIFN-γ). Prikazano je izražaj HLA-DR na mikrogliji (IBA-1^{+}) 48 sati nakon infekcije određeno metodom konfokalne mikroskopije. Mjerila za A=25 μm; C=75 μm. DAPI (jezgra), IBA-1 (mikroglija), HLA-DR (MHC-II).

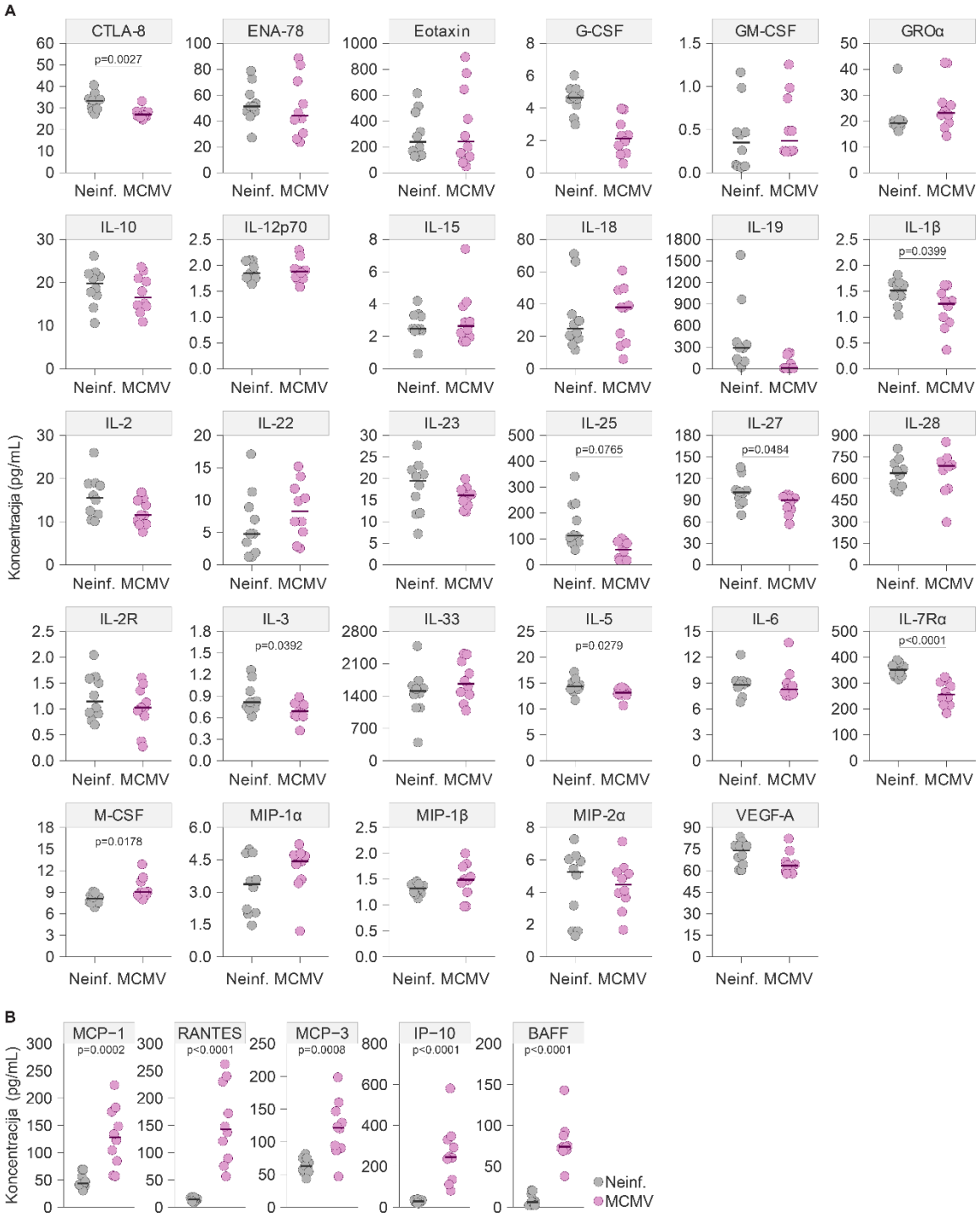
4.2. Latentna infekcija MCMV-om mijenja upalni obrazac u mozgu

Obilježje infekcije citomegalovirusima je uspostava stanja latencije [97]. Produktivna infekcija MCMV-om u mozgu se u potpunosti razrješuje u periodu od 3. do 4. tjedna, međutim MCMV uspostavlja latenciju iz koje se može reaktivirati [23,136]. Kako bi odredili količinu latentnih genoma MCMV-a u mozgu perinatalno inficiranih miševa sojeva C57BL/6 i BALB/c, 3 mjeseca nakon infekcije (m.n.i.) proveli smo analizu kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. qPCR, *quantitative polymerase chain reaction*) (**Slika 5.**). Naši rezultati pokazali su podjednake razine latentnog virusa u oba soja miševa.



Slika 5. Latentna infekcija MCMV-om u mozgu perinatalno inficiranih miševa. Novookoćeni miševi sojeva C57BL/6 i BALB/c su inficirani MCMV-om intraperitonealno. Primjenom qPCR metode određen je broj kvantifikacijskih ciklusa za detekciju gena MCMV-a M86 u mozgu miševa 3 mjeseca nakon infekcije. Prikazane su vrijednosti kvantifikacijskih ciklusa (engl. Cq, *quantification cycle*). Prikazane su vrijednosti za pojedinačne miševe. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. n=2-10 miševa/grupi. G.D. – granica detekcije.

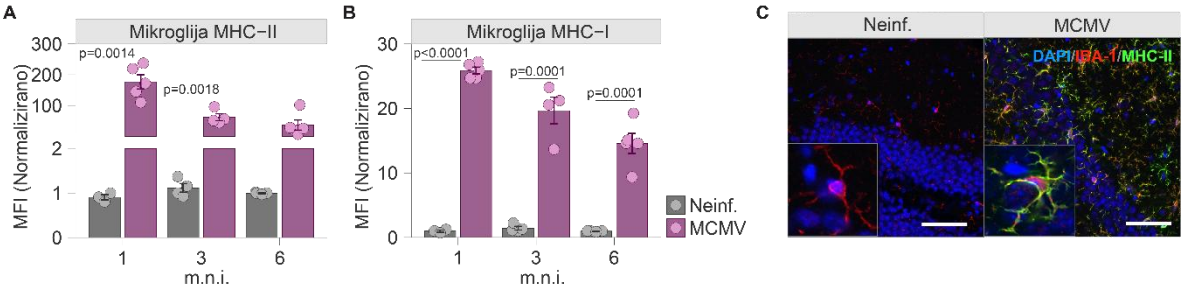
Kako bi odredili mijenja li latentna infekcija MCMV-om imunološki okoliš u mozgu, proveli smo analizu razine 48 citokina, kemokina i faktora rasta. Većina analiziranih citokina, kemokina i faktora rasta je bila jednako ili slično ispoljena u kontrolnim i latentno inficiranim mozgovima (**Slika 6.A**), dok su ostali bili ispod granice detekcije. Međutim, razine proupalnih citokina MCP-1, RANTES-a, MCP-3, IP-10 (engl. *Interferon gamma-induced protein 10*) i čimbenika preživljenja limfocita B (engl. BAFF, *B-cell activating factor*) su bile povećane u mozgovima miševa latentno inficiranih MCMV-om (**Slika 6.B**), što ukazuje na dugotrajni proupalni okoliš u mozgu tijekom latencije MCMV-a.



Slika 6. Razine citokina i kemokina u mozgovima latentno inficiranim MCMV-om. **(A, B)** Novookoćeni miševi soja BALB/c inficirani su MCMV-om intraperitonealno. Koncentracija proteina u lizatima mozgova miševa BALB/c je određena 6 mjeseci nakon infekcije Luminex metodom. Prikazani su rezultati za pojedine citokine, kemokine i faktore rasta kod kojih nije bilo promjena **(A)** i kod kojih je bilo promjena **(B)** tijekom latencije. Prikazane su vrijednosti za pojedinačne miševe. Naznačena statistička značajnost je određena Mann-Whitney testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike.

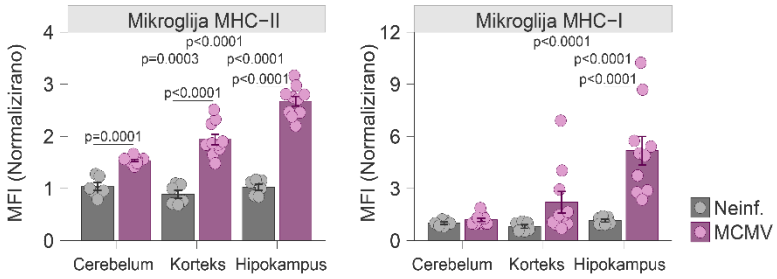
4.3. Perinatalna infekcija MCMV-om u SŽS-u uzrokuje dugotrajnu aktivaciju mikroglije

Budući da je tijekom latencije MCMV-a u mozgu prisutan trajni proupalni okoliš, nadalje smo karakterizirali fenotip mikroglije. U tu svrhu, inficirali smo novookoćene miševe soja BALB/c i analizirali izražaj molekula MHC 1, 3 i 6 mjeseci nakon perinatalne infekcije (**Slika 7.A**). Mikroglija inficiranih miševa ispoljava visoke razine molekula MHC-I i II u svim analiziranim vremenskim točkama (**Slika 7.A**), a molekule MHC-II su kolokalizirane sa IBA-1, markerom za mikrogliju (**Slika 7.C**). Navedeni rezultati ukazuju na dugotrajnu aktivaciju mikroglije tijekom latencije MCMV-a u mozgu.



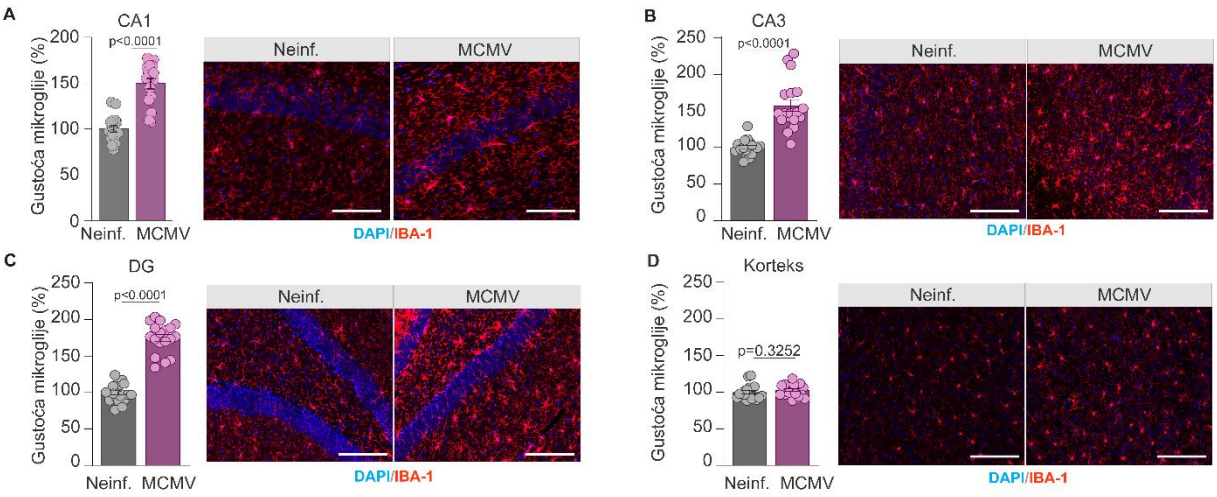
Slika 7. Dugotrajna aktivacija mikroglije i izražaj molekula MHC tijekom latencije MCMV-a u mozgu. (A-B) Novookoćeni miševi soja BALB/c su inficirani MCMV-om intraperitonealno. Izražaj molekula MHC u različitim vremenskim točkama je određeno metodom protočne citometrije. Prikazane su normalizirane razine izražaja molekula MHC-II i MHC-I na mikrogliji u naznačenim vremenima nakon infekcije. n=3-5 miševa po skupini. Prikazane su vrijednosti za pojedinačne miševe. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena neparnim dvostrukim Studentovim testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike. **(C)** Novookoćeni miševi soja BALB/c su inficirani MCMV-om intraperitonealno. Prikazano je izražaj MHC-II na mikrogliji (IBA-1$^+$) 3 mjeseca nakon infekcije, određeno metodom konfokalne mikroskopije. Mjerilo 50 μm. DAPI (jezgra), IBA-1 (mikroglija), MHC-II.

Mikroglija je izrazito heterogena stanična populacija, te se fenotip mikroglije često razlikuje u pojedinim regijama mozga [191]. Kako bi utvrdili postoje li razlike u aktivacijskom fenotipu mikroglije između različitih regija mozga, izolirali smo mikrogliju iz hipokampusa, moždane kore (korteksa) i malog mozga (cerebeluma), te analizirali izražaj molekula MHC-I i MHC-II 4 m.n.i. (**Slika 8.**). Najviše razine molekula MHC-I i MHC-II na mikrogliji detektirane su u hipokampusu (**Slika 8.**), što ukazuje na najjači aktivacijski fenotip mikroglije u ovoj regiji, gdje se također nalazi najviše latentnog MCMV-a [157].



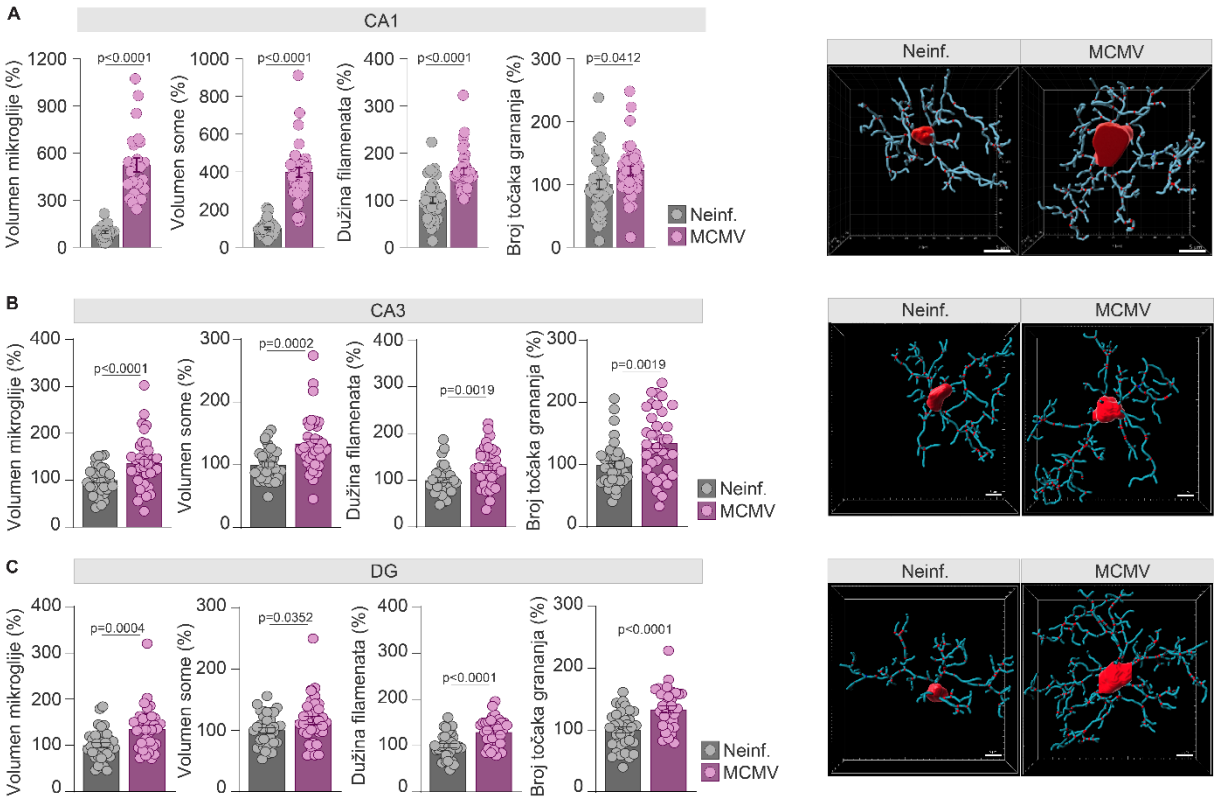
Slika 8. Mikroglija ispoljava najviše razine MHC molekula u hipokampusu tijekom latencije MCMV-a. Novookoćeni miševi soja C57BL/6 su inficirani MCMV-om intraperitonealno. Prikazane su normalizirane vrijednosti izražaja MHC-I (Db) i MHC-II na mikrogliji, određene metodom protočne citometrije, u različitim regijama mozga 4 mjeseca nakon infekcije. n=6-10 miševa po skupini. Prikazane su vrijednosti za pojedinačne miševe. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena dvosmjernim ANOVA testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike.

Patološka stanja u SŽS-u su često praćena povećanjem broja mikroglije [30]. Kako bi ispitali povećava li se gustoća mikroglije zbog latencije MCMV-a u mozgu, odredili smo gustoću mikroglije različitim regijama hipokampusa i korteksu (**Slika 9**.). Povećana gustoća mikroglije je zabilježena u svim regijama hipokampusa (**Slika 9.A-C**), no ne u korteksu (**Slika 9.D**).



Slika 9. Povećana gustoća mikroglije u hipokampusu tijekom latencije MCMV-a. Novookoćeni miševi soja C57BL/6 su inficirani MCMV-om intraperitonealno. Prikazana je kvantifikacija gustoće mikroglije 5 mjeseci nakon infekcije, uz reprezentativne slike određene metodom konfokalne mikroskopije u **(A)** CA1, **(B)** CA3, **(C)** DG i **(D)** korteksu. n=5-6 miševa po skupini. Broj područja od interesa (engl. ROI, *region of interest*) = 4–5 po mišu, a broj nasumično odabranih mikroglija=9 po mišu, dobivenih iz 3 različita presjeka. Za svaku grupu je analizirano 18 vidnih polja. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena neparnim dvostranim Studentovim testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike. Mjerilo 50 μm.

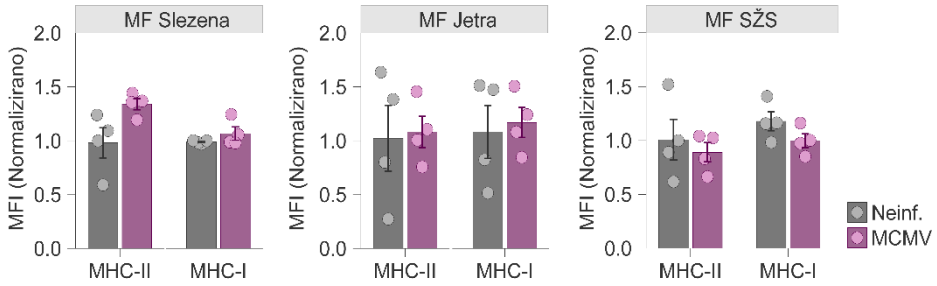
Nadalje smo ispitali morfologiju mikroglije tijekom latencije u različitim regijama hipokampusa, obzirom da smo u hipokampusu zabilježili najveći stupanj aktivacije mikroglije tijekom latencije MCMV-a. Kako bi odredili morfologiju mikroglije tijekom latencije, mjerili smo parametre koji nam daju informacije o aktiviranosti stanice prema morfološkim karakeristikama, uključujući određivanje volumena stanice i tijela (some), duljine filamenata te broja točaka grananja metodom konfokalne mikroskopije (**Slika 10.**). Najveći stupanj aktivacijske morfologije mikroglije je zabilježen u regiji CA1 hipokampusa (**Slika 10.A**) u odnosu na regije hipokampusa CA3 i DG (**Slika 10.B, C**), što se očituje sa najvećim povećanjem volumena cijele stanice i tijela (soma), duljine filamenata te broja točaka grananja.



Slika 10. Mikroglija u regiji CA1 hipokampusa pokazuje razgranatu morfologiju tijekom latencije MCMV-a u mozgu. Novookoćeni miševi soja C57BL/6 su inficirani MCMV-om intraperitonealno. Prikazana je kvantifikacija morfoloških parametara i reprezentativna 3D rekonstrukcija mikroglijalne stanice 5 mjeseci nakon infekcije, gdje se jasno očituje soma (crvena), filamenati (plava) i točke grananja (male crvene točkice u filamentima) u regiji **(A)** CA1, **(B)** CA3 i **(C)** DG hipokampusa neinficiranih i inficiranih miševa, određenih metodom konfokalne mikroskopije. n=5-6 miševa po skupini. Broj područja od interesa (engl. ROI, *region of interest*) = 4–5 po mišu, a broj nasumično odabranih mikroglija=9 po mišu, dobivenih iz 3 različita presjeka. Za svaku grupu je analizirano 18 vidnih polja. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena neparnim

dvostranim Studentovim testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike. Mjerilo 5 μm.

Obzirom da mikroglija dijeli karakteristike sa makrofagima, nadalje smo ispitali je li aktivacija mikroglije tijekom latencije specifično obilježje samo za mikrogliju, ili latencija može mijenjati aktivacijsko stanje rezidentnih makrofaga pojedinih tkiva. U tu svrhu, analizirali smo izražaj molekula MHC na makrofagima slezene, makrofagima jetre te makrofagima SŽS-a metodom protočne citometrije. Nismo uočili statistički značajnu razliku u izražaju molekula MHC-I i MHC-II u analiziranim tkivnim makrofagima tijekom latencije MCMV-a (**Slika 11.**). Naši rezultati ukazuju kako je dugotrajna aktivacija mikroglije specifično obilježje za mikrogliju, no ne tkivno-rezidentne makrofage tijekom latencije MCMV-a.

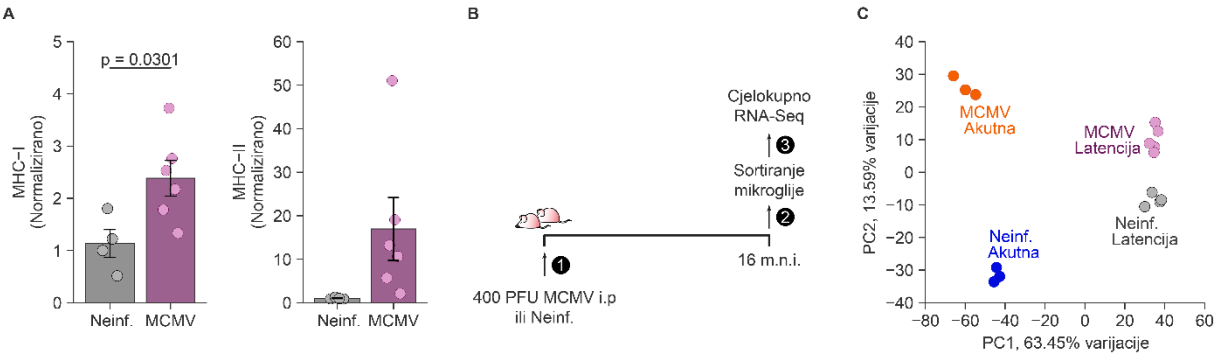


Slika 11. Dugotrajna aktivacija je specifično obilježje mikroglije tijekom latencije MCMV-a. Novookoćeni miševi soja BALB/c su inficirani MCMV-om intraperitonealno. Prikazane su normalizirane vrijednosti izražaja MHC-II i MHC-I molekula 6 mjeseci nakon infekcije na makrofagima crvene pulpe slezene ($F4/80^{+}CD11b^{-}$), Kupfferovim stanicama jetre ($F4/80^{+}CD11b^{+}$) i makrofagima u SŽS-u ($CD45.2^{hi}CD11b^{+}$), određene metodom protočne citometrije. n=4 miševa po skupini. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena neparnim dvostranim Studentovim testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike. MF – makrofagi.

4.4. Latentna infekcija MCMV-om uzrokuje trajnu promjenu transkripcijskog profila mikroglije u mozgu

Naši rezultati ukazuju da je mikroglija tijekom latencije MCMV-a dugotrajno aktivirana u mozgu. Kako bi ispitali zadržava li se izražaj MHC molekula na mikrogliji kroz cijeli životni vijek miševa, analizirali smo izražaj MHC-I i II na mikrogliji 16 m.n.i. (**Slika 12.A**). Naši rezultati ukazuju na kontinuirano povišeno izražaj MHC-II na mikrogliji u vremenskoj točki kada se miševi obično smatraju starima. Kako bi dobili širi uvid o utjecaju latentne infekcije na mikrogliju ispitali smo promjene u mikrogliji na razini transkriptoma, tako što smo proveli dvije različite metode sekvencioniranja.

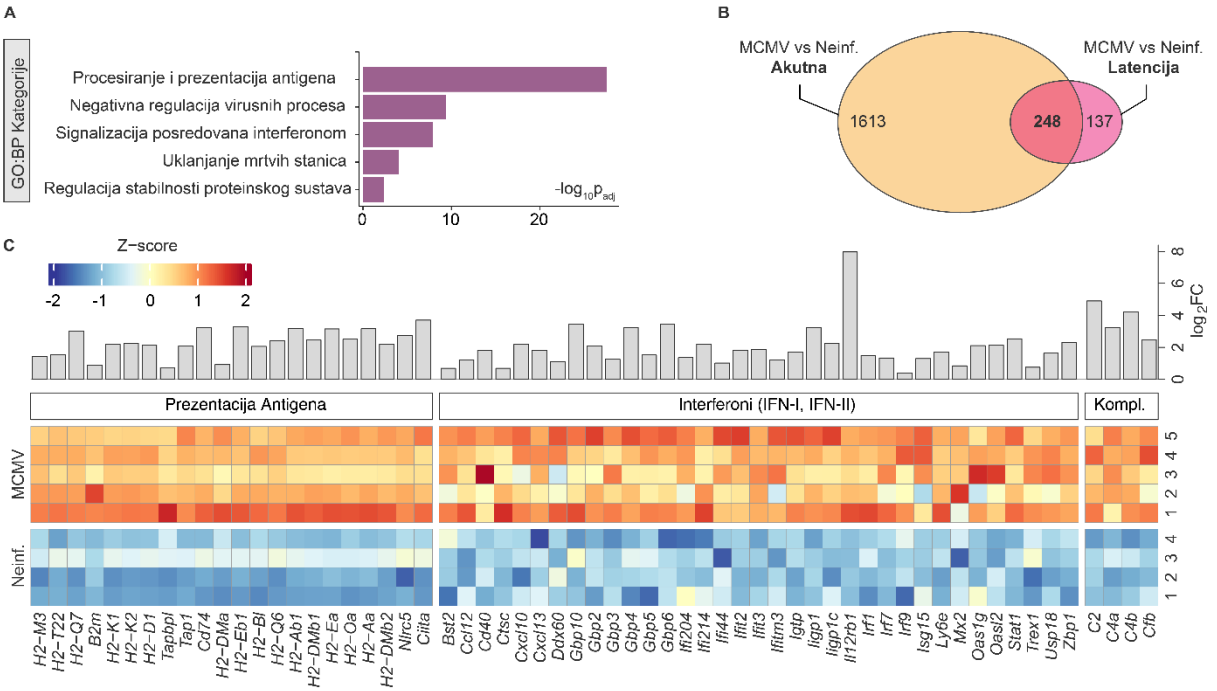
Najprije smo staničnim sortiranjem izdvojili populaciju mikroglije iz miševa inficiranih MCMV-om 16 m.n.i. i kontrolnih miševa, za analizu sekvencioniranja transkriptoma iz ukupne populacije stanica (engl. *bulk-sequencing*) (**Slika 12.B**). Nadalje, kako bismo razjasnili transkripcijske razlike mikroglije između akutne i latentne infekcije, usporedili smo prethodno objavljene rezultate analize transkriptoma mikroglije iz akutne faze infekcije (8 d.n.i.) [146], sa transkriptomom mikroglije u latenciji (16 m.n.i.). Pojedinačni uzorci iz istih pokusnih skupina su grupirani zajedno u dijagramu PCA dobivenim analizom glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*), što ukazuje na nisku varijabilnost unutar skupina (**Slika 12.C**). U skladu sa prethodnom analizom, akutna infekcija MCMV-om u mozgu je snažno preoblikovala transkriptom mikroglije (**Slika 12.C**). Iako u manjoj mjeri, transkriptom mikroglije je također bio značajno preoblikovan u mozgu latentno inficiranom MCMV-om (**Slika 12.C**).



Slika 12. Mikroglija je transkripcijski promijenjena tijekom latencije MCMV-a u mozgu. (A-C) Novookoćeni miševi soja BALB/c su inficirani MCMV-om intraperitonealno. **(A)** Prikazane su normalizirane vrijednosti izražaja molekula MHC-I i MHC-II na mikrogliji 16 mjeseci nakon infekcije, određene metodom protočne citometrije. n=4-5 miševa. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena neparnim dvostranim Studentovim testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike. **(B)** Prikazana je eksperimentalna shema pokusa. Mozgovi su prikupljeni 16 m.n.i., te je mikroglija sortirana kao populacija CD45.2^{int}CD11b^{+} stanica metodom protočne citometrije. **(C)** Prikazan je grafički prikaz glavnih komponenti (PCA), koji pokazuje jasno odvajanje svih eksperimentalnih skupina i nisku varijabilnost unutar istih, za uzorke mikroglije iz akutnih i latentno inficiranih mozgova MCMV-om.

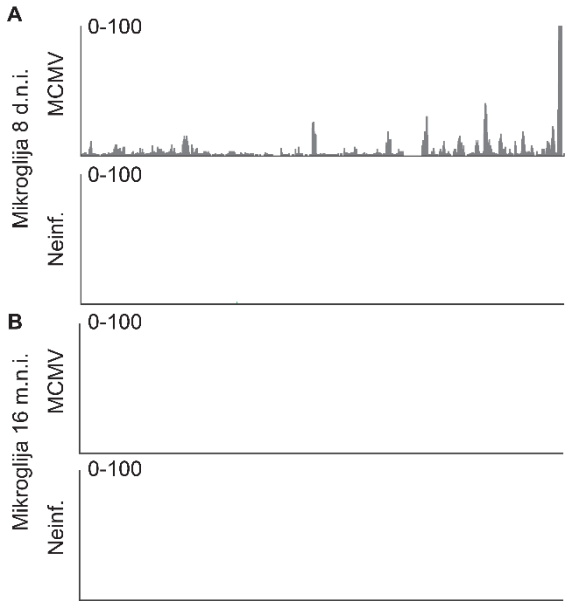
Analizom transkriptoma mikroglije u latenciji smo dobili diferencijalno ispoljene gene (engl. DE, *differentially expressed genes*), te smo proveli analizu zastupljenosti gena u biološkim procesima (engl. GO-ORA, *Gene Ontology Over-Representation Analysis*), koja je pokazala da mikroglija u latenciji im pojačana protuvirusna svojstva (**Slika 13.A**). Najviše DE gena je bilo zastupljeno u kategorijama bioloških procesa

povezanih sa obradom i prezentacijom antigena, negativnom regulacijom virusnih procesa, te signalnim putevima posredovanim interferonima (**Slika 13.A**). Zatim smo usporedili DE gene dobivene analizom mikroglije iz akutne i latentne infekcije. Analizom smo identificirali 1613 DE gena mikroglije koji su jedinstveni za akutnu infekciju, 137 DE gena jedinstvenih za latenciju, te 248 DE gena koji su zajednički, odnosno zastupljeni u mikrogliji iz obje faze infekcije (**Slika 13.B**). Važno je napomenuti da je većina od 248 zajedničkih DE gena povezana sa protuvirusnim odgovorom, uključujući gene koji kodiraju za molekule MHC i njihovi transkripcijski aktivatori, gene koji su povezani sa tip I i II interferonima, te gene koji kodiraju za komponente komplementa (**Slika 13.C**). Navedeni rezultati analize transkriptoma ukazuju na dugotrajno proupalno stanje mikroglije tijekom latencije MCMV-a u mozgu.



Slika 13. Snažan protuvirusni fenotip mikroglije tijekom latencije MCMV-a u mozgu. (A) Prikazane su odabrane kategorije bioloških procesa (GO:BP) za diferencijalno ispoljene gene mikroglije iz mozgova inficiranih MCMV-om u odnosu na neinficirane. **(B)** Vennov dijagram prikazuje broj gena čije je izražaj značajno promijenjeno kao odgovor na akutnu (1613) ili latentnu (137) infekciju MCMV-om. Izražaj zajedničkih gena za obje faze infekcije (248) je ostalo dugotrajno promijenjeno. **(C)** Razina izražaja odabranih zajedničkih gena, koji su povezani sa sljedećim kategorijama: prezentacijom antigena, signalizacijom posredovanom interferonima tipa I/II i komplement („Kompl.“). Svaki redak na toplinskoj mapi odgovara pojedinačnom biološkom uzorku. n=4 (Neinf.), n=5 (MCMV).

Kako bi ispitali jesu li promjene u aktivacijskom fenotipu mikroglije uzrokovane zbog latencije virusa u mikrogliji, nadalje smo ispitali je li mikroglija mjesto latencije MCMV-a u mozgu. Koristeći se istom bazom podataka dobivenom analizom sekvencioniranja transkriptoma iz ukupne populacije stanica mikroglije, ispitali smo postoje li očitanja gena za MCMV u transkriptomu mikroglije tijekom akutne faze infekcije (8 dana nakon infekcije, **Slika 14.A**), te u latenciji (16 mjeseci nakon infekcije, **Slika 14B.**). Transkripti gena MCMV-a su zabilježeni samo u mikrogliji iz akutno inficiranih miševa (**Slika 14.A**), međutim nisu zabilježeni u kontrolnim, neinficiranim miševima, te miševima inficiranim u latenciji. Ovime se potvrđuje kako mikroglija nije mjesto latencije MCMV-a u mozgu, te latencija/reaktivacija virusa u mikrogliji ne uzrokuje dugotrajnu aktivaciju mikroglije. Ovi rezultati su u skladu s našim nedavnim radom koji je pokazao da je virus latentan u neuronima [23].



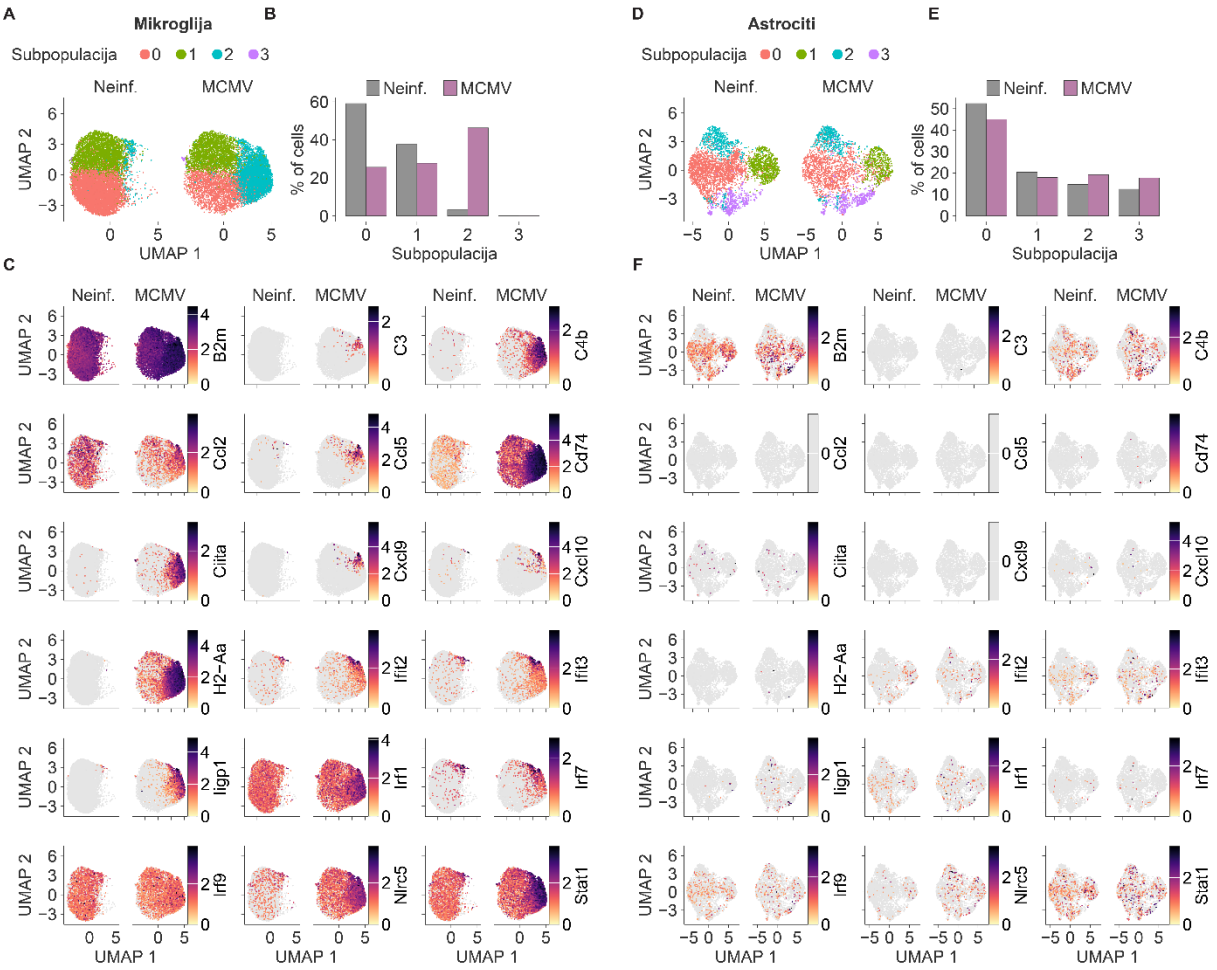
Slika 14. Mikroglija nije mjesto latencije MCMV-a u mozgu. Novookoćeni miševi soja BALB/c su inficirani MCMV-om intraperitonealno ili su ostavljeni kao kontrola bez infekcije (Neinf.). Miševi su žrtvovani **(A)** 8 dana nakon infekcije, te **(B)** 16 mjeseci nakon infekcije, i stanice mikroglije su izdvojene kao populacija CD45.2^{int}CD11b^{+}. Potom je izolirana je ukupna RNA, nakon čega je provedeno RNA-sekvenciranje (engl. *bulk RNA-seq*). Prikazana su očitanja mapirana na gene MCMV-a u mikrogliji.

4.5. Analiza transkriptoma mikroglije i astrocita u latenciji na razini pojedinačnih stanica

Kako bi istražili promjene u mikrogliji na razini pojedinačnih stanica tijekom latencije MCMV-a u mozgu, proveli smo analizu transkriptoma na razini pojedinačnih

stanica (engl. scRNAseq, *single-cell RNA sequencing*). scRNAseq metoda omogućuje dublji uvid u transkripcijske promjene pojedinih subpopulacija [35,192,193]. Analizom transkriptoma pojedinačnih stanica definirali smo ukupno četiri različitih subpopulacija mikroglije: subpopulacije 0, 1, 2, 3 (**Slika 15.A**) [193]. Homeostatsku mikrogliju čine primarno populacije 0 i 1, dok su ostale populacije prisutne u vrlo malim brojevima. Latencija MCMV-a uzrokuje primjetnu preraspodjelu stanica mikroglije iz subpopulacije 0 i 1 u subpopulaciju 2, koja je dominantna u latentno inficiranim mozgovima (**Slika 15.A, B**). Navedeno opažanje sugerira da latencija MCMV-om transkripcijski mijenja značajan udio stanica homeostatske mikroglije. Nadalje smo ispitali koji geni su najviše ispoljeni unutar subpopulacije mikroglije 2, povezane sa latencijom MCMV-a. Stanice mikroglije iz latentno inficiranih mozgova MCMV-om ispoljavaju visoke razine gena koji kodiraju za molekule MHC (npr. *β2m*, *H2-Aa* , *Cd74*) i njihove transkripcijske aktivatore (npr. *Ciita*, *Nlrc5*), gene uključene u signalizaciju posredovanu IFN-I i IFN-II (npr. *Stat1*, *Irf1*, *Irf7*, *Irf9*, *Ifit2*, *Ifit3*, *Iigp1*), i gene koji kodiraju za proupalne kemokine (npr. *Cxl9*, *Cxcl10*, *Ccl5*) (**Slika 15.C**). Osim toga, uočili smo da je izražaj pojedinih gena bilo ograničeno isključivo na subpopulaciju 2, dok je za druge gene najveća razina izražaja zabilježena upravo u toj subpopulaciji. Zaključno, latencija MCMV-om uzrokuje snažan pomak prema aktiviranoj i proupalnoj mikrogliji, međutim ne podjednako u svim stanicama.

Kako bi istražili utječe li latentna infekcija MCMV-om na astrocite u istoj ili sličnoj mjeri kao što utječe na mikrogliju, proveli smo scRNAseq analizu stanica astrocita, koji su 2.5 m.n.i. izdvojeni staničnim sortiranjem kao CD45.2$^-$CD11b$^-$O1$^-$ACSA-2$^+$ stanice. Identificirali smo četiri subpopulacije astrocita iz kontrolnih i miševa inficiranih u latenciji: subpopulacije 0, 1, 2 i 3 (**Slika 15.D**). Međutim, nije bilo drastičnih razlika u subpopulacijama astrocita u kontrolnim i mozgovima latentno inficiranim MCMV-om (**Slika 15.D, E**). Također, subpopulacije astrocita nisu pojačano ispoljavale proupalne citokine i kemokine (**Slika 15.F**), što je također u suprotnosti od analize transkriptoma mikroglije tijekom latencije MCMV-a (**Slika 15.C**). Zaključno, naši rezultati pokazuju da se mikroglija tijekom latencije MCMV-a u mozgu transkripcijski mijenja i poprima proupalna svojstva, dok astrociti zadržavaju homeostatska obilježja.

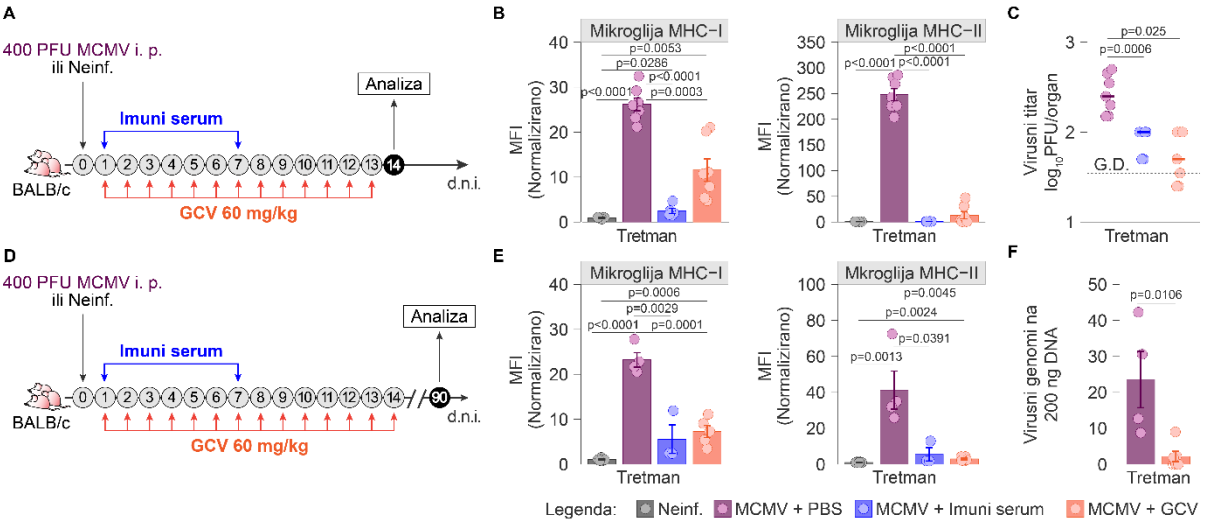


Slika 15. Latencija MCMV-om dovodi do razvoja proupalne subpopulacije mikroglije, dok astrociti zadržavaju homeostatska obilježja. Novookoćeni miševi soja C57BL/6 su inficirani MCMV-om ili su neinficirani (Neinf.). Mozgovi su prikupljeni 2.5 mjeseca nakon infekcije (m.n.i.) za analizu transkriptoma pojedinačnih stanica. **(A-C)** Mikroglija je izdvojena staničnim sortiranjem kao populacija $CD45.2^{int}CD11b^{+}$, **(D-E)** dok su astrociti izdvojeni kao populacija.$CD45.2^{-}CD11b^{-}O1^{-}ACSA\text{-}2^{+}$ **(A)** UMAP prikazi (engl. *Uniform Manifold Approximation and Projection*) identificiranih subpopulacija mikroglije u uzorcima Neinf. i MCMV tijekom latencije u mozgu. **(B)** Udio stanica mikroglije u pojedinim identificiranim subpopulacijama s obzirom na uzorak. **(C)** UMAP prikazi izražaja odabranih proupalnih gena unutar pojedinih subpopulacija mikroglije. **(D)** UMAP prikazi identificiranih subpopulacija astrocita u uzorcima Neinf. i MCMV tijekom latencije u mozgu. **(E)** Udio astrocita u pojedinim identificiranim subpopulacijama s obzirom na uzorak. **(F)** UMAP prikazi izražaja odabranih proupalnih gena unutar pojedinih subpopulacija astrocita. Svaka točka na UMAP prikazu predstavlja pojedinačnu stanicu, dok boja označava log-normaliziranu razinu izražaja pojedinog gena. n=4-5 miševa po skupini.

4.6. Rani protuvirusni tretman smanjuje upalu u mozgu i aktivaciju mikroglije

Protuvirusni lijekovi, poput ganciklovira (GCV), se koriste za liječenje infekcije HCMV-om u ljudi [194]. Nadalje, pasivna imunizacija štiti od infekcije MCMV-om u miševa, tako što smanjuje količinu virusa u mozgu i patologiju izazvanu infekcijom

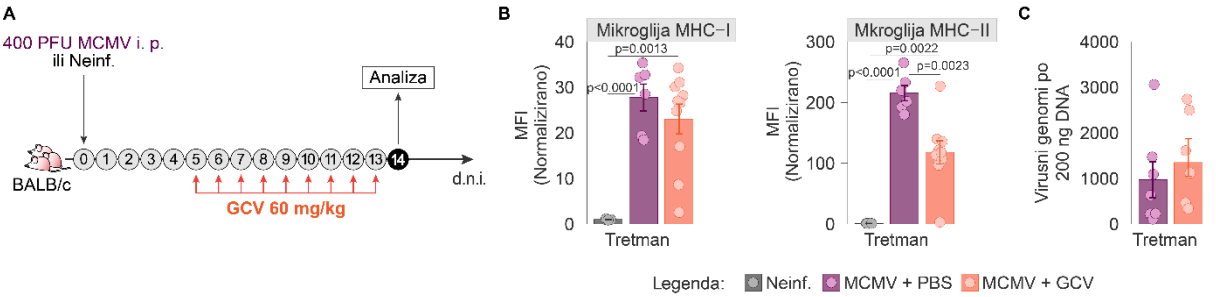
[195]. Naši rezultati analize transkriptoma ukazuju na trajni proupalni okoliš u mozgu te prisustvo proupalne i aktivirane subpopulacije mikroglije tijekom latencije MCMV-a. Kako bi ispitali utječu li protuvirusne terapije na smanjanje upale u mozgu i aktivacijsko stanje mikroglije, inficirali smo novookoćene miševe soja BALB/c te ih tretirali GCV-om ili imunim serumom u različitim vremenskim točkama nakon infekcije. Najprije smo novookoćene miševe tretirali imunološkim serumom 1. i 7. d.n.i., te GCV-om svakodnevno do 14.-tog d.n.i. (**Slika 16.A**), što predstavlja rani tretman i protuvirusnu intervenciju tijekom akutne infekcije. Uočili smo kako oba tretmana, i imunim serumom i GCV-om, smanjuju izražaj molekula MHC-I i II na mikrogliji (**Slika 16.B**) i količinu virusa u mozgu (**Slika 16.C**). Kako bi odredili dugoročni značaj ranog protuvirusnog tretmana, dio miševa koji su tretirani imunim serumom i GCV-om smo pustili da dosegnu fazu latencije. Protuvirusno liječenje u ranoj fazi nakon infekcije je bilo dugoročno učinkovito, obzirom da smo uočili manje razine molekula MHC-I i II na mikrogliji kao i smanjene razine latentnog virusa u mozgu miševa starih 90 dana (**Slika 16.D-F**).



Slika 16. Rani protuvirusni tretman smanjuje količinu virusa i upalu u mozgu, čak i tijekom latencije. (A, D) Novookoćeni miševi soja BALB/c su inficirani MCMV-om ili neinficirani. Skupine miševa inficirane MCMV-om su tretirane imunološkim serumom 1. i 7. dan nakon infekcije (d.n.i), ili su svakodnevno tretirane sa 60 mg/kg ganciklovira (GCV) počevši od 1 d.n.i. **(A-C)** Mozgovi su prikupljeni za analizu 14 d.n.i. **(B)** Prikazane su normalizirane vrijednosti izražaja molekula MHC-I i MHC-II na mikrogliji 14 d.n.i., određene metodom protočne citometrije. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena neparnim dvostranim Studentovim testom. **(C)** Prikazan je titar virusa u mozgu 14 d.n.i., određen metodom virusnih čistina. Rezultati su prikazani kao medijani. n=4-7 miševa. Naznačena statistička značajnost je određena Mann-

Whitneyjevim testom. **(D-F)** Mozgovi su prikupljeni za analizu 90 d.n.i. **(E)** Prikazane su normalizirane vrijednosti izražaja molekula MHC-I i MHC-II na mikrogliji 90 d.n.i., određene metodom protočne citometrije. **(F)** Prikazan je broj genoma MCMV-a na 200 ng izolirane DNA u mozgu 90 d.n.i., određen metodom kvantitativnog PCR-a. n=3-6 miševa po grupi. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena neparnim dvostranim Studentovim testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike.

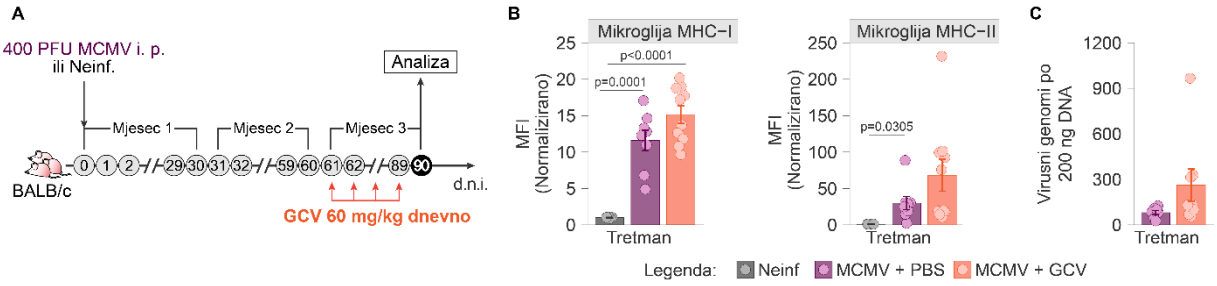
S obzirom da se liječenje protuvirusnim lijekovima započinje obično tek nakon uspostavljanja infekcije, u sljedećem pokusu smo antivirusnim lijekom započeli tretirati novookoćene miševe inficirane MCMV-om 5 dana nakon infekcije, odnosno u razdoblju kada MCMV infiltrira u mozak (**Slika 17.A**). Ovakav tretman nije doprinio smanjenju upale u mozgu i aktivacije mikroglije, već je samo djelomično spriječio izražaj molekula MHC-II, no ne i MHC-I, na mikrogliji (**Slika 17.B**). Također, nismo vidjeli učinak na količinu virusnih genoma u mozgu (**Slika 17.C**). Navedeni rezultati ukazuju da započinjanje tretmana antivirusnim lijekom nakon što se uspostavi infekcija u mozgu ne utječe značajno na upalne procese, odnosne ukazuje na važnost ranog protuvirusnog tretmana za smanjenje upale u mozgu tijekom infekcije MCMV-om.



Slika 17. Odgoda ranog protuvirusnog tretmana tijekom perinatalnog razdoblja djelomično utječe na upalu u mozgu. (A) Novookoćeni miševi soja BALB/c su intraperitonealno inficirani MCMV-om ili su neinficirani. Skupine inficiranih miševa MCMV-om su svakodnevno tretirane sa 60 mg/kg GCV, počevši od 5 dana nakon infekcije (d.n.i.). **(B)** Prikazane su normalizirane vrijednosti izražaja molekula MHC-I i MHC-II na mikrogliji, određene metodom protočne citometrije. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. **(C)** Prikazan je broj genoma MCMV-a na 200 ng DNA u mozgu 14 d.n.i., određen metodom kvantitativnog PCR-a. n=4-10 miševa po grupi. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena neparnim dvostranim Studentovim testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike.

Konačno, ispitali smo može li se protuvirusna terapija koristiti za ublažavanje upale u mozgu tijekom latentne faze infekcije MCMV-a. U tu svrhu, inficirali smo novookoćene miševe soja BALB/c, te započeli tretman GCV-om 2 mjeseca n.i. (**Slika**

18.A). Svakodnevni protuvirusni tretman tijekom perioda od mjesec dana nije značajno utjecao na razine izražaja molekula MHC-I i II na mikrogliji, niti na količinu razine latentnog virusna u mozgu (**Slika 18.B-C**). Navedeni rezultati ukazuju na važnost pravovremenog djelovanja na virusnu replikaciju nakon prirođene infekcije za smanjenje upale u mozgu.

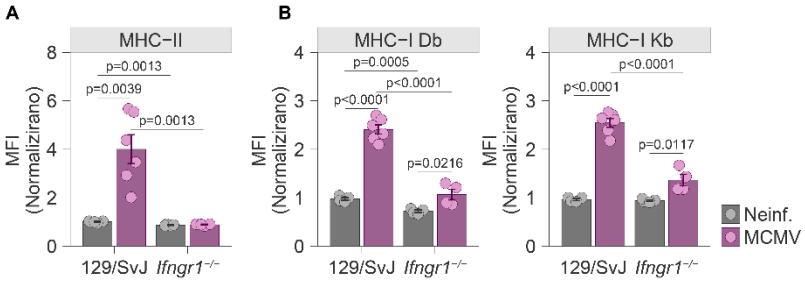


Slika 18. Protuvirusni tretman započet tijekom latencije MCMV-a nema učinkovitosti na smanjenje upale u mozgu. (A) Perinatalno inficirani miševi MCMV-om su tretirani svakodnevno sa 60 mg/kg GCV-a, počevši od 2 mjeseca nakon infekcije (m.n.i.). Mozgovi su prikupljeni za analizu mjesec dana nakon započetog tretmana. **(B)** Prikazane su normalizirane vrijednosti izražaja molekula MHC-I i MHC-II na mikrogliji, određene metodom protočne citometrije. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. **(C)** Prikazan je broj genoma MCMV-a na 200 ng DNA u mozgu 3 m.n.i., određen metodom kvantitativnog PCR-a. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. n=4-10 miševa po grupi. Korišten je neparni dvostrani Studentov test. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike.

4.7. Kontinuirana signalizacija posredovana citokinom IFN-γ tijekom latentne infekcije MCMV-om ključna je za održavanje izražaja molekula MHC-II na mikrogliji

IFN-γ je važan za ranu aktivaciju mikroglije tijekom akutne faze infekcije MCMV-om i izražaj molekula MHC-II [146], što smo potvrdili i za infekciju HCMV-om korištenjem organotipskih kultura fetalnog tkiva mozga (**Slika 4.C**). Kako bi ispitali važnost IFN-γ za dugotrajnu aktivaciju mikroglije i izražaj molekula MHC-II tijekom latencije MCMV-a inficirali smo novookoćene miševe kojima nedostaje receptor za IFN-γ (*Ifngr1*$^{-/-}$) i kontrolne miševe. Zatim smo metodom protočne citometrije analizirali izražaj molekula MHC-II na mikrogliji tijekom latentne faze infekcije MCMV-om. Za razliku od mikroglije izolirane iz kontrolnih miševa, izražaj molekula MHC-II na mikrogliji izoliranoj iz miševa soja *Ifngr1*$^{-/-}$ nije bio povišen tijekom latentne faze infekcije

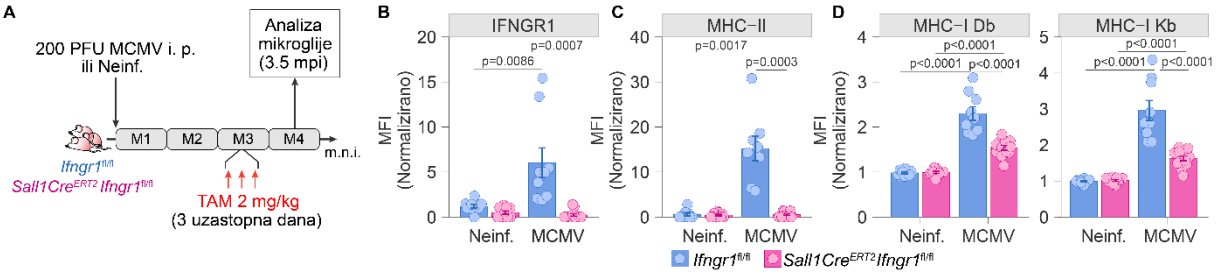
MCMV-om u mozgu (**Slika 19.A**). Izražaj molekula MHC-I na mikrogliji u inficiranih *Ifngr1*$^{-/-}$ miševa je također bilo niži nego u kontrolnih miševa (**Slika 19.B**).



Slika 19. *Ifngr1* je potreban za izražaj molekula MHC-II na mikrogliji tijekom infekcije MCMV-om. Novookoćeni miševi su intraperitonealno inficirani MCMV-om ili su neinficirani. Prikazane su razine izražaja molekula **(A)** MHC-II i **(B)** MHC-I na mikrogliji kod miševa sojeva 129/SvJ i *Ifngr1*$^{-/-}$ 2.5 mjeseci nakon infekcije, određeni metodom protočne citometrije. n=4-6 miševa po grupi. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena neparnim dvostranim Studentovim testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike.

Zatim smo ispitali ovisili li izražaj molekula MHC-II na mikrogliji tijekom latentne faze infekcije o stalnoj signalizaciji posredovanoj citokinom IFN-γ ili je rezultat epigenetskog utiskivanja [196]. U tu svrhu koristili smo transgenični soj miševa sa inducibilnim kondicionalnim izražajem rekombinaze Cre pod kontrolom *Sall1Cre*^{ERT2} promotora (*Sall1Cre*^{ERT2}), koji omogućuje izražaj rekombinaze Cre u mikrogliji, ali ne u drugim stanicama u mozgu. Soj miševa *Sall1Cre*^{ERT2} križali smo sa miševima koji imaju sekvencu gena za IFN-γ receptor označenu za izrezivanje putem rekombinaze Cre (*Ifngr1*$^{fl/fl}$). Takav sustav nam omogućuje uklanjanje receptora za IFN-γ (IFNGR1) na mikrogliji (*Sall1Cre*^{ERT2}*Ifngr1*$^{fl/fl}$) u točno određenoj vremenskoj točki, tako što miševe tretiramo tamoksifenom koji potiče djelovanje rekombinaze Cre i izrezivanje gena za IFN-γ. Novookoćene miševe sojeva *Sall1Cre*^{ERT2}*Ifngr1*$^{fl/fl}$ (Cre^{+}) i kontrolne *Ifngr1*$^{fl/fl}$ (Cre^{-}) smo inficirali MCMV-om, te započeli tretman tamoksifenom kada su miševi dosegnuli fazu latencije (**Slika 20.A**). Mjesec dana nakon tretmana tamoksifenom smo uočili drastično smanjenje izražaja IFNGR1 na mikrogliji čime smo potvrdili učinkovitost tretmana tamoksifenom (**Slika 20.B**). Izostanak izražaja IFNGR1 na mikrogliji tijekom latencije je bio praćen gubitkom izražaja molekula MHC-II na mikrogliji (**Slika 20.C**) i djelomičnim smanjenjem izražaja molekula MHC-I (**Slika 20.D**) u miševa *Sall1Cre*^{ERT2}*Ifngr1*$^{fl/fl}$, ali ne i kontrolnih miševa *Ifngr1*$^{fl/fl}$. Ovim rezultatima smo potvrdili hipotezu kako je kontinuirana signalizacija posredovana citokinom IFN-γ

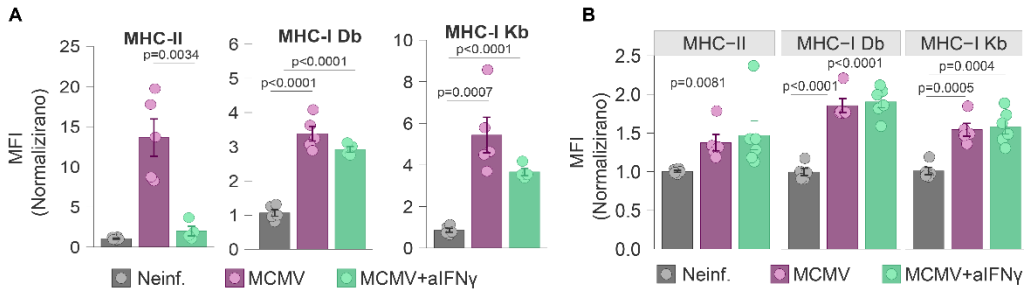
na mikrogliji tijekom latencije MCMV-om u mozgu ključna za održavanje aktiviranog stanja mikroglije i izražaj molekula MHC-II.



Slika 20. Kontinuirana signalizacija posredovana citokinom IFN-γ na mikrogliji je ključna za održavanje izražaja MHC-II tijekom latencije MCMV-a u mozgu. (A) Novookoćeni miševi sojeva *Sall1Cre*^{ERT2}*Ifngr1*$^{fl/fl}$ i *Ifngr1*$^{fl/fl}$ su inficirani MCMV-om. 2.5 mjeseca nakon infekcije (m.n.i.), miševi su tretirani tamoksifenom (TAM). Mozgovi su prikupljeni za analizu 3.5 m.n.i. Prikazane su normalizirane razine izražaja **(B)** IFNGR1, **(C)** MHC-II i MHC-I na mikrogliji 3.5 m.n.i., određene metodom protočne citometrije. n=9-12 miševa po grupi. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena neparnim dvostranim Studentovim testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike.

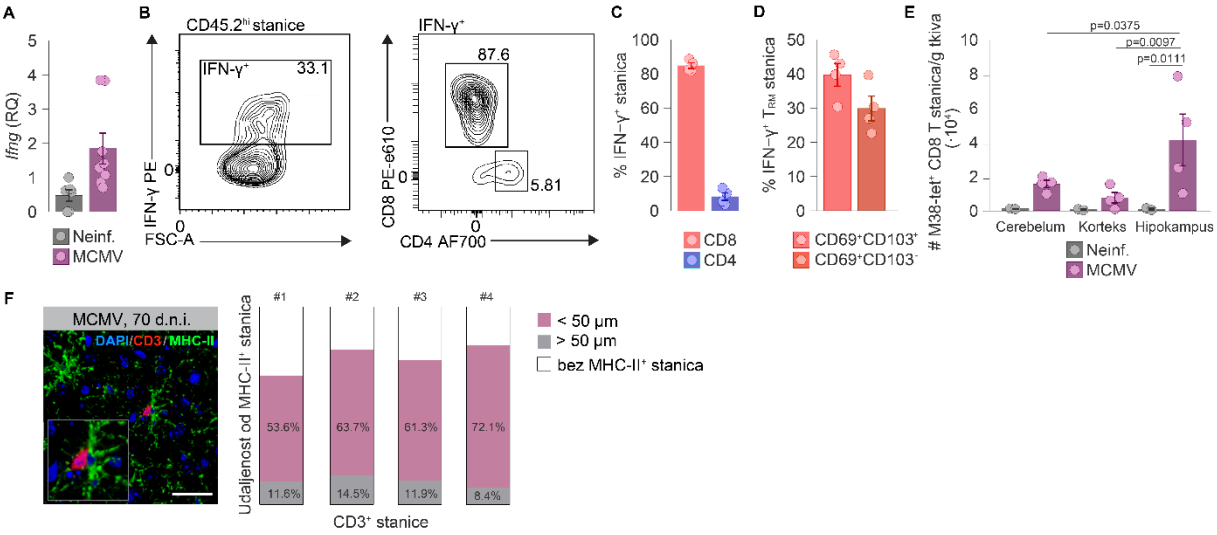
4.8. Tkivno-rezidentni memorijski CD8 limfociti T su glavni izvor IFN-γ tijekom latencije MCMV-a u mozgu

Citokin IFN-γ mogu proizvoditi limfociti u parenhimu mozga ili na periferiji [197]. Stoga smo najprije ispitali uzrokuje li sistemski IFN-γ, koji krvlju dolazi do mozga, aktivaciju mikroglije u mozgu. U tu svrhu, perinatalno inficirane miševe soja C57BL/6 u latenciji smo tretirali sa monoklonskim protutijelima koja blokiraju citokin IFN-γ, te ispitali razine izražaja molekula MHC na mikrogliji. Obzirom da protutijela ne mogu prijeći krvno-moždanu barijeru, ovim pristupom smo blokirali citokin IFN-γ sa periferije. Kako bi potvrdili uspješnu blokadu citokina IFN-γ na periferiji, inficirali smo odrasle miševe soja C57BL/6 MCMV-om i blokirali IFN-γ na periferiji tijekom akutne infekcije odraslih miševa, te analizirali razine izražaja molekula MHC na peritonealnim makrofagima. Blokiranjem citokina IFN-γ značajno je smanjen izražaj molekula MHC-II na peritonealnim makrofagima (**Slika 21.A**), što je potvrdilo da monklonska protutijela uspješno blokiraju IFN-γ. Zatim smo blokirali periferni IFN-γ u miševa sa latentnom infekcijom. U ovim miševima nije bilo utjecaja na izražaj molekula MHC-II na mikrogliji u mozgu (**Slika 21.B**). Ovi rezultati ukazuju da citokin IFN-γ proizveden lokalno u mozgu, a ne sa periferije, održava izražaj molekula MHC-II na mikrogliji.



Slika 21. IFN-γ proizveden u mozgu održava dugotrajnu aktivaciju mikroglije i izražaj MHC-II tijekom latencije MCMV-a. IFN-γ je blokiran u miševima soja C57BL/6 korištenjem blokirajućih monoklonskih protutijela u periodu od 2 tjedna. Prikazane su normalizirane vrijednosti izražaja MHC-I i MHC-II na peritonealnim makrofagima uslijed **(A)** akutne infekcije odraslih miševa i **(B)** na mikrogliji u mozgu tijekom latencije MCMV-a, određene metodom protočne citometrije. n=5-6 miševa po grupi. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena neparnim dvostranim Studentovim testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike.

Zatim smo ispitali količine transkripata za IFN-γ u mozgu latentno inficiranom MCMV-om. Broj transkripata za IFN-γ je bio povećan tijekom latencije MCMV-a u mozgu (**Slika 22.A**). Tijekom akutne faze infekcije MCMV-om u mozgu, stanice NK su glavni izvor IFN-γ i posreduju izražaj molekula MHC-II na mikrogliji [146]. Kako bi odredili koje su stanice glavni izvor IFN-γ tijekom latencije u mozgu, izolirali smo stanice iz mozgova, te ih stimulirali sa forbol miristat acetatom (PMA)/Ionomicinom, kako bi potaknuli lučenje IFN-γ. Uočili smo kako najviše IFN-γ u mozgu tijekom latencije MCMV-a luče CD8 limfociti T, dok su druge vrste stanica u manjoj mjeri proizvodile IFN-γ (**Slika 22.B, C**). Nadalje, analizirali smo fenotip stanica te pokazali da velika većina CD8 limfocita T koji proizvode IFN-γ izražavaju markere CD69 ili CD69 i CD103, odnosno imaju fenotip tkivno-rezidentnih memorijski (T_{RM}) stanica (**Slika 22.D**). Osim toga, značajan broj CD8 limfocita T u mozgu je specifičan za virusni antigen M38, te su najbrojniji u hipokampusu tijekom latencije MCMV-a u mozgu (**Slika 22.E**), regiji mozga sa najvećim razinama latentnog MCMV-a [23] i najvećim stupnjem aktivacije mikroglije. Naposljetku smo analizirali nalaze li se limfociti T u blizini MHC-II$^+$ stanica. Imunohistokemijskim bojanjem markera CD3 za limfocite T smo pokazali kako se više od 50 % limfocita T nalazilo u neposrednoj blizini (u radijusu ≤ 50 μm) MHC-II$^+$ stanica (**Slika 22.F**). Zaključno, ovi rezultati pokazuju da su virus-specifični CD8 limfociti T_{RM} glavni izvor IFN-γ u mozgovima latentno inficiranim MCMV-om.

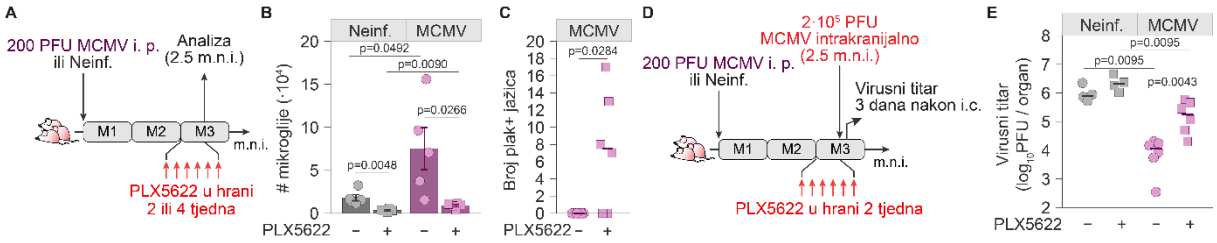


Slika 22. Virus-specifični CD8 limfociti T_{RM} su glavni izvor citokina IFN-γ u latentno inficiranim mozgovima. (A) Novookoćeni miševi soja C57BL/6 su inficirani MCMV-om ili ostavljeni neinficirani. Prikazane su razine transkripata za *Ifng* u mozgu 2.5 mjeseca nakon infekcije (m.n.i.), određene metodom kvantitativnog PCR-a. n=6-8 miševa po grupi. RQ, relativna kvantifikacija. **(B)** Mononuklearne stanice su izolirane iz mozgova miševa latentno inficiranih MCMV-om i stimulirane s PMA/ionomicinom. Prikazani su reprezentativni dijagrami lučenja citokina IFN-γ od strane $CD45.2^{hi}$, te CD8 i CD4 limfocita T, određeni metodom protočne citometrije. n=8 miševa po grupi. Prikazana je kvantifikacija postotka **(C)** IFN-$γ^+$ CD8 i CD4 limfocita T, te **(D)** IFN-$γ^+$ CD8 T_{RM} stanica. n=8 miševa. **(E)** Prikazan je ukupni broj M38-tetramer$^+$ CD8 limfocita T po gramu tkiva za svaku naznačenu regiju mozga 4 m.n.i., određen metodom protočne citometrije. n=2-4 miševa po grupi. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena neparnim dvostranim Studentovim testom. **(F)** Novookoćeni miševi soja BALB/c su inficirani MCMV-om ili ostavljeni neinficirani. Prikazana je reprezentativna slika kolokalizacije markera $CD3^+$ za limfocite T i stanice koja izražava MHC-II, 70 dana nakon infekcije. Stupčasti grafovi prikazuju relativnu kvantifikaciju udaljenosti između markera $CD3^+$ za limfocite T i stanica koje izražavaju MHC-II: (bez MHC-II$^+$ stanica) – nema stanica koje izražavaju MHC-II u vidnom polju (engl. FOV, *field of view*); (< 50 µm) – $CD3^+$ limfocit T se nalazi na udaljenosti manjoj od 50 µm od stanica koje izražavaju MHC-II; (> 50 µm) – $CD3^+$ limfocit T se nalazi na udaljenosti većoj od 50 µm od stanica koje izražavaju MHC-II. n = 4 miša, 3 reza po mišu, 30 vidnih polja po rezu. Povećanje 40x. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike.

4.9. Dugotrajno aktivirana mikroglija ima ulogu u nadzoru latentnog virusa u mozgu

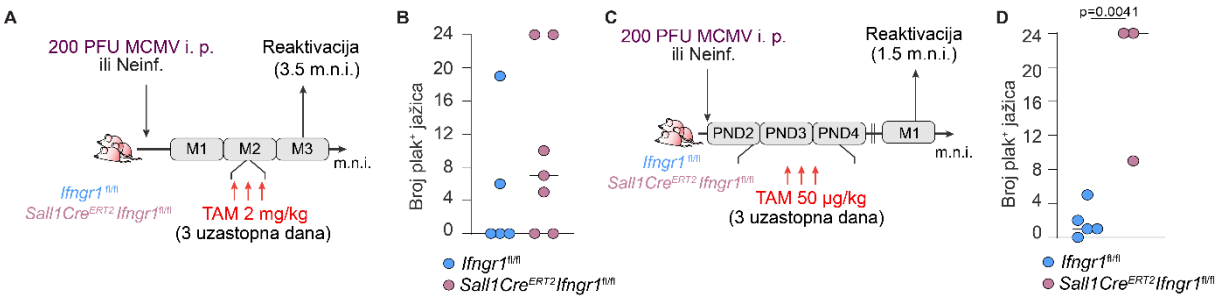
Novija istraživanja ukazuju da se urođene imunološke stanice mogu adaptirati na različita patološka stanja i jače i učinkovitije odgovarati na sekundarne podražaje [198]. S obzirom da naše istraživanje pokazuje prisutnost kronično aktivirane mikroglije, postavlja se pitanje uloge takve mikroglije u nadzoru latentne infekcije. Kako

bi odredili ulogu mikroglije tijekom latencije MCMV-a u mozgu, upotrijebili smo pristup u kojem smo uklonili populaciju mikroglije koristeći spoj PLX5622, koji je inhibitor za receptor 1 čimbenika stimulacije kolonija (engl. CSF1R, *colony-stimulating factor 1 receptor*), receptor važan za preživljavanje i održavanje mikroglije [199]. Novookoćene miševe soja C57BL/6 inficirali smo MCMV-om, te smo ih nakon uspostavljanja latencije stavili na prehranu koja sadrži inhibitor PLX5622 (u daljnjem tekstu PLX) ili na kontrolnu hranu bez inhibitora (**Slika 23.A**). U mozgovima kontrolnih i inficiranih miševa koji su tijekom latencije hranjeni PLX-om je došlo do značajnog smanjenja broja mikroglije (**Slika 23.B**), čime je potvrđena učinkovitost ovog tretmana. Po uklanjanju mikroglije došlo je do reaktivacije virusa u mozgu (**Slika 23.C**), što ukazuje na važnost mikroglije u nadzoru virusne reaktivacije tijekom latencije. Kako bismo dodatno potvrdili važnost mikroglije u nadzoru latentnog virusa i produktivne infekcije, proveli smo intrakranijalnu infekciju latentno inficiranih i kontrolnih miševa sa virusom MCMV-a (**Slika 23.D**), uz depleciju mikroglije PLX-om. Nakon 3 dana smo analizirali količinu virusa u mozgu uslijed intrakranijalne infekcije MCMV-om. Kontrolni, prethodno neinficiranih miševi, su imali značajan porast virusnog titra u mozgu uslijed intrakranijalne infekcije MCMV-om (**Slika 23.E**). Dodatno, uklanjanje populacije mikroglije u kontrolnih miševa nije značajno utjecalo na titar virusa u mozgu 3 dana nakon intrakranijalnog izazova (**Slika 23.E**), što ukazuje da mikroglija koja nije prethodno aktivirana ne doprinosi značajno nadzoru MCMV-a. Međutim, uslijed intrakranijalne infekcije miševa latentno inficiranih MCMV-om uočili smo značajno bolji nadzor infekcije u mozgu i značajno niži titar virusa (**Slika 23.E**). Dodatno smo pokazali ulogu dugotrajno aktivirane mikroglije u nadzoru MCMV-a, obzirom da uklanjanjem populacije mikroglije kod miševa inficiranih u latenciji je zabilježen veća količina virusa u mozgu uslijed intrakranijalne infekcije (**Slika 23.E**). Naši rezultati pokazuju da je kronično aktivirana mikroglija ključna u nadzoru latentnog i reaktivirajućeg MCMV-a u mozgu.



Slika 23. Dugotrajno aktivirana mikroglija ima ključnu ulogu u nadzoru latentnog i reaktivirajućeg virusa. (A) Eksperimentalna shema za B-C. Novookoćeni miševi soja C57BL/6 su inficirani MCMV-om ili neinficirani. Skupine neinficiranih i latentno inficiranih miševa su stavljene na prehranu koja sadrži inhibitor PLX5622, počevši od 2.5 mjeseca nakon infekcije (m.n.i.). **(B)** Prikazani su apsolutni brojevi mikroglije u mozgu, određeni metodom protočne citometrije, nakon 2 tjedna na prehrani koja sadrži inhibitor PLX5622 ili kontrolnom hranom. n=5 miševa po skupini. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena dvosmjernim ANOVA testom. **(C)** Prikazan je broj jažica u kojima su stanice inficirane MCMV-om nakon 4 tjedna prehrane formulirane s PLX5622 inhibitorom, određen testom virusnih čistina. n=6 miševa po skupini. Rezultati su prikazani kao medijani. Naznačena statistička značajnost je određena Mann-Whitneyjevim test. **(D)** Miševi latentno inficirani MCMV-om ili kontrolni miševi su hranjeni kontrolnom ili prehranom koja sadrži inhibitor PLX5622 tijekom razdoblja od 2 tjedna, te su potom inficirani intrakranijalno sa $2x10^5$ PFU MCMV-a. **(E)** Prikazan je titar virusa u mozgu 3 dana nakon intrakranijalne infekcije, određen testom virusnih čistina. n=3-6 miševa po grupi. Rezultati su prikazani kao medijani. Naznačena statistička značajnost je određena Mann-Whitneyjevim testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike.

Tijekom latencije MCMV-a u mozgu dugotrajna aktivacija mikroglije ovisi o citokinu IFN-γ. Stoga smo ispitali ulogu signalizacije putem IFNGR1 na mikrogliji u nadzoru infekcije MCMV-om u mozgu. Miševima soja *Sall1Cre*^{ERT2}*Ifngr1*$^{fl/fl}$ smo uklonili IFNGR1 na mikrogliji tijekom faze latencije (**Slika 24.A**), te smo uočili povećane razine infektivnog virusa u mozgu (**Slika 24.B**). Kako bi ispitali značaj signalizacije citokina IFN-γ u mikrogliji za uspostavu latencije, novookoćenim i inficiranim miševima soja *Sall1Cre*^{ERT2}*Ifngr1*$^{fl/fl}$ smo uklonili IFNGR1 u ranom postnatalnom periodu (2-4 dan nakon okota) (**Slika 24.C**), te analizirali razine infektivnog virusa u mozgu 1.5 m.n.i. Nedostatak signalizacije posredovane citokinom IFN-γ na mikrogliji rezultirao je značajno većim razinama infektivnog virusa u ovim miševima u odnosu na kontrolne miševe (**Slika 24.D**). Navedeni rezultati ukazuju na značaj IFN-γ signalizacije na mikrogliji za učinkovitu uspostavu latencije i nadzor latentnog virusa u mozgu.

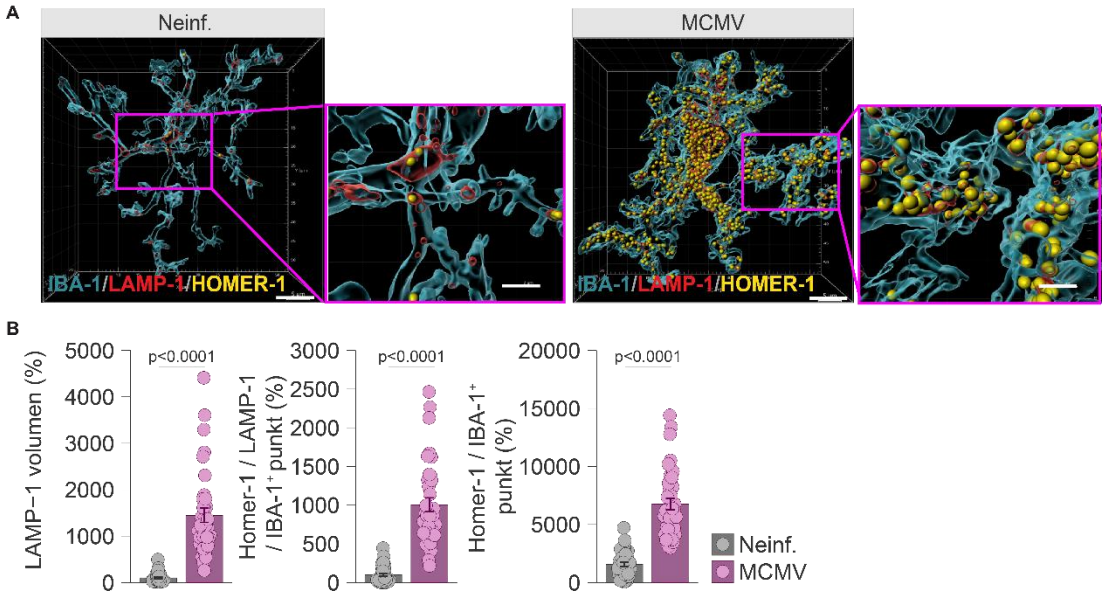


Slika 24. Signalizacija posredovana citokinom IFN-γ na mikrogliji je važna za nadzor latentnog virusa u mozgu. (A-D) Novookoćeni miševi sojeva *Sall1Cre*^{ERT2}*Ifngr1*$^{fl/fl}$ i *Ifngr1*$^{fl/fl}$ su inficirani MCMV-om. **(A)** Miševi su tretirani intragastrično (i.g.) tamoksifenom (TAM) 2.5 mjeseca nakon infekcije (m.n.i.)

tri uzastopna dana. **(B)** Prikazan je broj jažica u kojima su stanice inficirane MCMV-om, određen testom virusnih čistina. **(C)** TAM je primijenjen i.g. tijekom 2-4 postnatalnog dana (PND). **(D)** Prikazan je broj jažica u kojima su stanice inficirane MCMV-om, određen testom virusnih čistina. n=3-7 miševa po grupi. Rezultati su prikazani kao medijani. Naznačena statistička značajnost je određena Mann-Whitneyjevim testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike.

4.10. Dugotrajno aktivirana mikroglija uzrokuje gubitak sinapsi u hipokampusu tijekom latencije MCMV-a

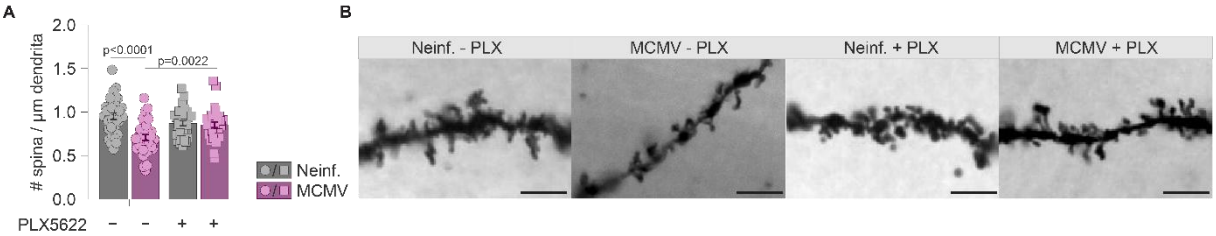
Mikroglija ima sposobnost fagocitoze te može ukloniti patogene, stanične ostatke i sinaptičke veze između neurona. U patološkim stanjima u SŽS-u mikroglija često fagocitira prekomjerno i na izmijenjen način [34,50]. Stoga smo ispitali fagocitoznu aktivnost dugotrajno aktivirane mikroglije tijekom latencije MCMV-a u mozgu. Najprije smo odredili fagocitira li mikroglija neurone, što se određuje u volumetrijskim promjenama lizosoma, odnosno određivanja ukupnog volumena lizosoma u mikrogliji koji je proporcionalan fagocitnoj aktivnosti [50]. Volumen lizosoma smo pratili imunohistokemijskim bojanjem za marker LAMP-1 (engl. *lysosome-associated membrane protein 1*), dok smo fagocitozu sinapsi pratili bojanjem markera za postsinaptičke strukture Homer-1 (engl. *Homer scaffold protein 1*). Usredotočili smo se na analizu regije CA1 hipokampusa, za koju smo prethodno pokazali da ima najveći stupanj aktivacije mikroglije. Homer-1 je jedan od regulatornih proteina u postsinaptičkim završecima neurona koji regulira morfogenezu dendritičkih spina [200]. 3D analiza stanica mikroglije miševa inficiranih MCMV-om je pokazala da mikroglija ima povećan volumen lizosoma (LAMP-1+/IBA-1+), te su lizosomi mikroglije pojačano ispunjeni postsinaptičkim završecima (Homer-1+/LAMP-1+/IBA-1+) (**Slika 25.A, B**). Navedeni rezultati ukazuju da mikroglija prekomjerno fagocitira sinaptičke završetake u regiji CA1 hipokampusa tijekom latencije MCMV-a u mozgu .



Slika 25. Dugotrajno aktivirana mikroglija povećano fagocitira sinaptičke završetake u regiji CA1 hipokampusa tijekom latencije MCMV-a. Novookoćeni miševi soja C57BL/6 su inficirani MCMV-om ili neinficirani. Mozgovi su sakupljeni 3 mjeseca nakon infekcije (m.n.i.), te je analizirana regija CA1 hipokampusa. **(A)** Prikazana je reprezentativna 3D rekonstrukcija morfologije mikroglije iz neinficiranih i miševa inficiranih MCMV-om, sa uvećanim presjekom (mjerilo 2 μm). IBA-1 - mikroglija, LAMP-1 – lizosomi, Homer-1 - postsinaptički završeci. **(B)** Prikazana je kvantifikacija fagocitne morfologije mikroglije u regiji CA1 hipokampusa 3 m.n.i., određena metodom konfokalne mikroskopije. n=5 miševa po grupi. Prikazani su % volumena markera LAMP-1, % punktova markera Homer-1/LAMP-1/IBA-1, te % punktova markera Homer-1/IBA-1. Broj područja od interesa (engl. ROI, *region of interest*) = 4–5 po mišu, a broj nasumično odabranih mikroglija=9 po mišu, dobivenih iz 3 različita presjeka. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena neparnim dvostranim Studentovim testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike.

Prekomjerna fagocitoza sinaptičkih završetaka može dovesti do gubitka dendritičkih spina hipokampusu. Dendritičke spine su izbočine na dendritima na kojima se nalazi većina podražajnih sinapsi u hipokampusu, te promjene u njihovoj gustoći daju uvid u promjene u povezanosti neurona u hipokampusu [49,50,201]. Kako bi istražili odražava li se povećana fagocitoza postsinaptičkih završetaka neurona tijekom latencije MCMV-a u mozgu na gubitak sinapsi u hipokampusu, analizirali smo gustoću dendritičkih spina na neuronima, kao morfološki pokazatelj sinaptičke povezanosti u hipokampusu. Dendritičke spine izbrojene su na dendritima piramidalnih neurona u regiji CA1 hipokampusa. Analiza je pokazala značajno smanjenje gustoće spina kod miševa latentno inficiranih MCMV-om u odnosu na neinficirane kontrolne životinje (**Slika 26.A, B**). U eksperiment smo uključili i grupe životinja kojima smo uklonili populaciju mikroglije, kako bi odredili je li gubitak sinapsi posredovan mikroglijom.

Uklanjanjem mikroglije tijekom latencije MCMV-a u mozgu broj dendritičnih spina se normalizirao na razine opažene u kontrolnih, neinficiranih miševa (**Slika 26.A, B**). Ovim rezultatom smo potvrdili da aktivirana mikroglija dovodi do gubitka sinapsi u mozgu latentno inficiranom MCMV-om.

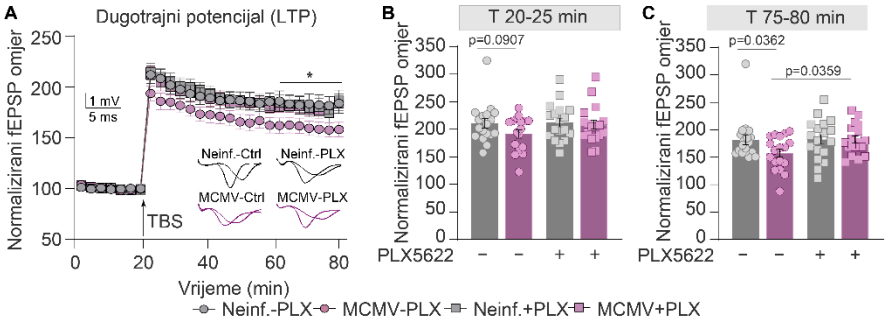


Slika 26. Aktivirana mikroglija pridonosi gubitku dendritičkih spina u regiji CA1 hipokampusa tijekom latencije MCMV-a. Novookoćeni miševi soja C57BL/6 su inficirani MCMV-om ili neinficirani. 2.5 mjeseci nakon infekcije (m.n.i.), skupina neinficiranih i miševa latentno inficiranih MCMV-om je stavljena je na kontrolnu ili prehranu koja sadrži inhibitor PLX5622-om. **(A)** Prikazan je broj dendritičkih spina na neuronima u regiji CA1 hipokampusa, određen mikroskopijom. n=5-6 miševa po grupi. Broj nasumično odabranih dendrita=8 po mišu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena dvosmjernim ANOVA testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike. **(B)** Prikazane su reprezentativne slike dendritičkih ogranaka neurona u regiji CA1 hipokampusa dobivene Golgi-Cox bojanjem, s jasno vidljivim dendritičkim spinama u svim pokusnim skupinama. Mjerilo 2 µm.

4.11. Dugotrajno aktivirana mikroglija posreduje gubitak sinaptičke plastičnosti neurona u hipokampusu

Gubitak sinapsi u hipokampusu može narušiti komunikaciju i povezanost između neurona te utjecati na njihovu sinaptičku plastičnost. [202]. Sinaptička plastičnost je svojstvo mijenjanja sinapsi u svrhu učinkovitog prijenosa signala između neurona, te nastaje kao odgovor na aktivnost neurona. Radi se o ključnom mehanizamu koji sudjeluje u procesima učenja i stvaranja dugotrajnog pamćenja. Stoga smo ispitali dovodi li gubitak sinapsi posredovan aktiviranom mikroglijom do promjene u elektrofiziološkim svojstvima neurona u regiji CA1 hipokampusa tijekom latencije MCMV-a. Za elektrofiziološko mjerenje su pripremljeni svježi rezovi hipokampusa iz odraslih neinficiranih i latentno inficiranih miševa MCMV-om. Takvim mjerenjima se procijenjuje sinaptička plastičnost, odnosno učinkovitost prijenosa signala pomoću analize podražajnog postsinaptičkog potencijala polja (engl. fEPSP, *field excitatory postsynaptic potential*), kao mjerila učinkovitosti prijenosa signala. Za ispitivanje sinaptičke plastičnosti je odabran jedan od najopsežnije karakteriziranih

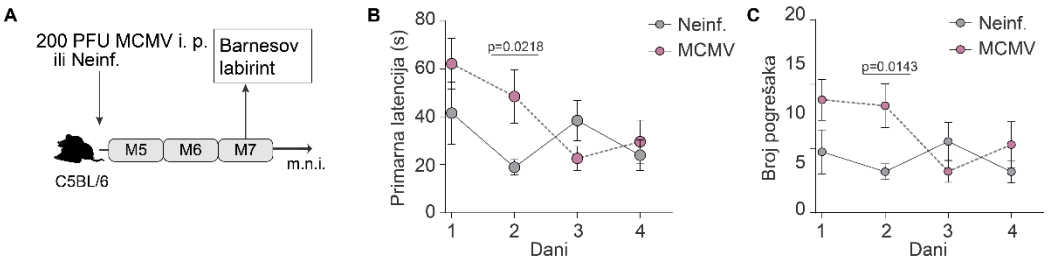
sinaptičkih puteva u SŽS-u, Schafferov kolateralni-CA1 put, koji povezuje neurone hipokampusa regije CA3 sa neuronima u regiji CA1 [49,203]. Kako bi ispitali mogućnost formiranja dugoročnog pamćenja potaknuli smo dugotrajnu potencijaciju (engl. LTP, *long-term potentiation*), odnosno kratkotrajni snažni podražaj sinaptičkog puta i pratili fEPSP u različitim vremenskim točkama nakon induciranja podržaja (**Slika 27.A-C**). Tijekom indukcijske faze (prvih 20-25 minuta snimanja) (**Slika 27.B**) nije bilo razlike u fEPSP između ispitanih grupa, međutim tijekom zadnje faze održavanja LTP-a (zadnjih 5 minuta snimanja), uočeno je značajno smanjenje fEPSP potencijala u hipokampusu miševa inficiranih MCMV-om. Pad u fEPSP-u pokazuje na oslabljenu sposobnost sinapsi da dugotrajno zadrže povećanu učinkovitost prijenosa, što ukazuje kako latencija MCMV-om narušava sinaptičku plastičnost u hipokampusu latentno inficiranih miševa (**Slika 27.C**). Kako bismo ispitali je li uočeni poremećaj u sinaptičkoj plastičnosti neurona u hipokampusu povezan sa kronično aktiviranom mikroglijom, u pokus smo uključili i grupe kojima je uklonjena mikroglija. Zabilježeni pad u LTP-u se u potpunosti izgubio kod latentno inficiranih miševa MCMV-om sa uklonjenom populacijom mikroglije (**Slika 27.C**), što ukazuje da kronično aktivirana mikroglija ne utječe samo na broj sinapsi, već posreduje funkcionalne promjene u sinapsama, odnosno umanjuje sinaptičku plastičnost neurona u regiji CA1 hipokampusa.



Slika 27. Dugotrajno aktivirana mikroglija pridonosi promjenama sinaptičke plastičnosti neurona u regiji CA1 hipokampusa tijekom latencije MCMV-a. (A-C) Novookoćeni miševi soja C57BL/6 su inficirani MCMV-om ili neinficirani. Nakon 2.5 mjeseca skupina neinficiranih i miševa latentno inficiranih MCMV-om je stavljena na kontrolnu ili prehranu koja sadrži inhibitor PLX5622. **(A)** Prikazana je dugotrajna potencijacija (LTP) kao normalizacija nagiba ekscitacijskog postsinaptičkog potencijala polja (fEPSP) u svakoj vremenskoj točki izmjerenoj za svaku pokusnu skupinu 3 m.n.i., određena metodom elektrofiziološkog mjerenja. **(B)** Prikazane su vrijednosti normaliziranog fEPSP u početnoj fazi snimanja (20-25 min), te u **(C)** u završnoj fazi snimanja (75-80 min). n=6 miševa po grupi. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena dvosmjernim ANOVA testom.

4.12. Dugotrajno aktivirana mikroglija uzrokuje poremećaj u kognitivnim sposobnostima inficiranih miševa

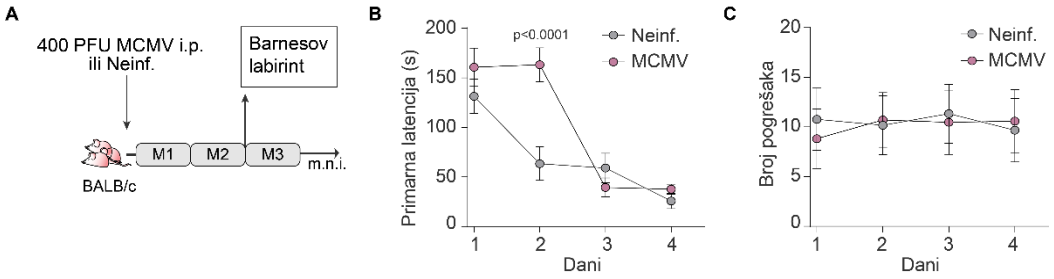
Regija CA1 hipokampusa je važna za procese učenja i formiranja pamćenja [203]. Obzirom na naše rezultate koji pokazuju da latencija MCMV-om dovodi do gubitka sinapsi i smanjene sinaptičke plastičnosti neurona u regiji CA1 hipokampusa, ispitali smo utječu li navedene promjene u hipokampusu na kognitivne sposobnosti miševa. U tu svrhu, testirali smo latentno inficirane miševe MCMV-om i kontrolne miševe u Barnesovom labirintu, testu za procjenu prostornog učenja i memorije, funkcije koje su usko vezane za hipokampus. Najprije smo miševe naučili gdje se nalazi rupa u koju se mogu sakriti (engl. *Escape hole*). Zatim smo napravili testiranje kroz 4 uzastopna dana, gdje smo pratili koliko je miševima potrebno vremena da lociraju rupu za skrivanje. Vrijeme potrebno za pronalazak rupe za skrivanje smo iskazali parametrom primarne latencije (u sekundama). Osim toga, testom smo bilježili koliko je puta miš zavirio u krive rupe (engl. „*fake holes*“), prije nego li je locirao pravu rupu za skrivanje, te smo tu vrijednost izrazili kao broj pogrešaka. Testiranje miševa soja C57BL/6 (**Slika 28.A**) u Barnesovom labirintu 7.5 mjeseci nakon infekcije je pokazalo blago oštećenje prostornog učenja u latetno inficiranih miševa (**Slika 28.B**). Naime, 1. i 2. dan testiranja miševima inficiranih MCMV-om u latenciji treba puno više vremena za lociranje rupe za skrivanje u odnosu na neinficirane miševe, naročito 2. dan testiranja (**Slika 28.B**). Također latentno inficirani miševi su imali veći broj pogrešaka u testu u odnosu na kontrolne miševe (**Slika 28.C**), naročito drugog dana testiranja. Naposlijetku, do kraja testiranja obje su skupine su naučile jednako brzo pronaći rupu za skrivanje.



Slika 28. Latentno inficirani miševi soja C57BL/6 pokazuju blagi deficit u kognitivnim sposobnostima. (A) Novookoćeni miševi soja C57BL/6 su neinficirani ili inficirani MCMV-om. Nakon 7.5 mjeseci miševi su testirani u areni Barnesovog labirinta. **(B)** Prikazane su vrijednosti primarne

latencije u sekundama i **(C)** ukupan broj pogrešaka (#) prije pronalaska rupe za skrivanje. n=11 miševa po grupi. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena dvosmjernim ANOVA testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike.

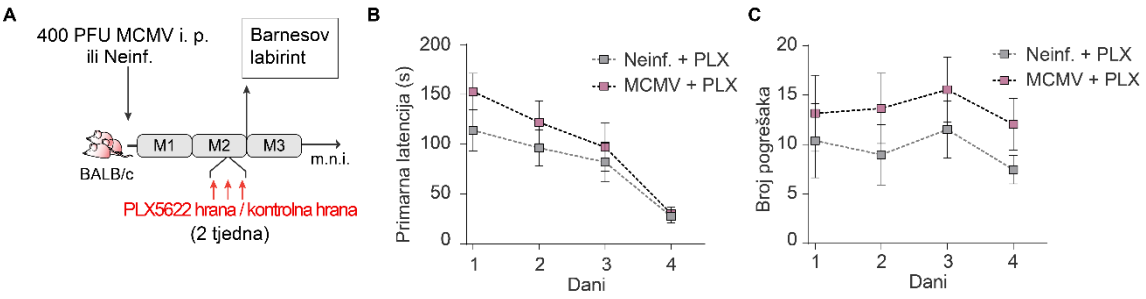
Sličan poremećaj pamćenja je uočen i kod miševa soja BALB/c testiranih u Barnesovom labirintu 3 m.n.i. (**Slika 29.A**). Naime, 1. i 2. dan testiranja latentno inficiranim miševima MCMV-om treba puno više vremena za lociranje rupe za skrivanje u odnosu na neinficirane miševe, također 2. dan testiranja (**Slika 29.B**). Međutim, i kontrolni i inficirani miševi u latenciji su imali približno sličan broj pogrešaka u testu (**Slika 29.C**). Naposlijetku, do kraja testiranja obje su skupine su naučile jednako brzo pronaći rupu za skrivanje. Sporiji pronalazak rupe za skrivanje tijekom drugog dana testiranja je također uočen i kod ovog soja miševa inficiranog MCMV-om (**Slika 29.B**), što potvrđuje da latetno inficirani miševi MCMV-om imaju blage kognitivne deficite.



Slika 29. Latentno inficirani miševi soja BALB/c pokazuju blagi deficit u kognitivnim sposobnostima. (A) Novookoćeni miševi soja BALB/c su neinficirani ili inficirani MCMV-om. 3 mjeseca nakon infekcije, miševi su testirani u areni Barnesovog labirinta. **(B)** Prikazane su vrijednosti primarne latencije u sekundama i **(C)** ukupan broj pogrešaka (#) prije pronalaska rupe za skrivanje. n=9-12 miševa po grupi. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena dvosmjernim ANOVA testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike.

Budući da smo pokazali da su promjene u hipokampusu uzrokovane latentnom infekcijom povezane s kroničnom aktivacijom mikroglije, ispitali smo utječe li dugotrajna aktivacija mikroglije na kognitivne sposobnosti miševa tijekom latencije MCMV-a. U tu svrhu smo miševima soja BALB/c inficiranim u latenciji i kontrolnim miševima uklonili mikrogliju inhibitorom PLX5622 (**Slika 30.A**). Uklanjanje mikroglije tijekom latencije je dovelo do poboljšanja prostornog učenja miševa inficiranih MCMV-om i njihovog bržeg pronalaska rupe za skrivanje (**Slika 30.B**), te sličnog obrasca u broju pogrešaka prije pronalaska rupe za skrivanje (**Slika 30.C**). Razlika između inficiranih miševa u latenciji i kontrolnih miševa nestaje nakon uklanjanja mikroglije, što

potvrđuje kako dugotrajno aktivirana mikroglija tijekom latencije MCMV-a u mozgu posreduje blagom poremećaju u pamćenju miševa.



Slika 30. Uklanjanje mikroglije tijekom latencije MCMV-a dovodi do poboljšanja kognitivnih sposobnosti miševa. (A) Novookoćeni miševi soja BALB/c su neinficirani ili inficirani MCMV-om. 3 mjeseca nakon infekcije, miševi su stavljeni na kontrolnu ili prehranu obogaćenu PLX5622 inhibitorom te testirani u areni Barnesovog labirinta. **(B)** Prikazane su vrijednosti primarne latencije u sekundama i **(C)** ukupan broj pogrešaka (#) prije pronalaska rupe za skrivanje. n=11-12 miševa po grupi. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. Naznačena statistička značajnost je određena dvosmjernim ANOVA testom. Prikazane su p vrijednosti koje ukazuju na značajne razlike.

5. RASPRAVA

Virusne infekcije u SŽS-u su praćene snažnim upalnim procesima koji pridonose učinkovitom nadzoru i ograničavanju virusne replikacije [204]. Mikroglija i astrociti sudjeluju u imunološkom nadzoru virusnih infekcija u SŽS-u, no njihova pretjerana ili dugotrajna aktivacija može dovesti do patoloških promjena [38,39,63]. Međutim, uloga glija-stanica u nadzoru kroničnih i perzistentnih virusnih infekcija i nastanku patoloških promjena u takvim infekcijama je slabo istražena.

HCMV je široko rasprostranjen β-herpesvirus koji inficira većinu svjetske populacije i perzistira doživotno u domaćinu [205]. Prirođena infekcija HCMV-om je najčešća prirođena virusna infekcija [205,206], koja može dovesti do nastanka teških i dugotrajnih posljedica u SŽS-u, uključujući poremećaje u razvoju, intelektualne poteškoće i senzorineuralni gubitak sluha [96,206,207]. Nakon razrješenja produktivne infekcije, HCMV ostaje latentan u domaćinu tijekom cijelog života [97]. Obzirom da su citomegalovirusi specifični za vrstu, u ovom radu smo koristili mišji model infekcije novookoćenih miševa MCMV-om [133] kako bi istražili posljedice latentne faze infekcije u ljudskom mozgu, te ulogu glija-stanica u odgovoru na latentni virus. Mišji model učinkovito oponaša mnoge ključne značajke imunološkog odgovora i patologije u mozgu koji su zabilježeni uslijed infekcije sa HCMV-om [208].

Tijekom prirođene infekcije HCMV-om u SŽS-u dolazi do infekcije različitih vrsta stanica u mozgu, uključujući astrocite i mikrogliju, te patoloških promjena [139]. Nadalje, infekcija je praćena snažnim upalnim odgovorom, kojeg karakterizira infiltracija imunoloških stanica u parenhim mozga i aktivacija mikroglije [139]. MCMV također ima širok tropizam u mozgu i inficira astrocite i mikrogliju, te je infekcija praćena jakim upalnim odgovorom koji uzrokuje nastanak patoloških oštećenja u mozgu [23,130,135,148]. Jedna od glavnih karakteristika upalnog odgovora u mozgu miševa inficiranih MCMV-om je aktivacija mikroglije koja izražava marker aktivacije MHC-II [146]. Ovdje smo pokazali i da tijekom prirođene infekcije u ljudi dolazi do aktivacije mikroglije koja izražava molekule HLA-DR (MHC-II). Nadalje, aktivacija mikroglije tijekom akutne faze infekcije MCMV-om je posredovana citokinom IFN-γ, proizvedenim od strane infiltriranih stanica NK [146]. Korištenjem organotipskih kultura ljudskog mozga fetusa (hfOBSC-a) potvrdili smo da je mehanizam aktivacije mikroglije uslijed infekcije HCMV-om također posredovan IFN-γ. Ovi rezultati ukazuju da mišji model prirođene infekcije MCMV-om dijeli mehanizme aktivacije mikroglije sa

prirođenom infekcijom HCMV-om, odnosno predstavlja dobar životinjski model za istraživanje uloge mikroglije u patogenezi prirođene infekcije CMV-om.

Uspostavom latentne infekcije MCMV-om homeostaza imunoloških stanica u mozgu se trajno mijenja obzirom da se MCMV-specifični limfociti T_{RM}, koji inače nisu prisutni u mozgu, zadržavaju u tkivu [136]. Unatoč razrješenju akutne infekcije MCMV-om u mozgu, mikroglija je dugotrajno aktivirana, čak i 16 mjeseci nakon infekcije, vremenskom razdoblju kada se miševi smatraju starima. Aktivacije mikroglije tijekom latencije MCMV-a je praćena i morfološkim karakteristikama prekomjerne razgranatosti (engl. „*hyper-ramified*“). Prethodne studije su takvo obilježje morfologije mikroglije povezale sa akutnim i kroničnim odgovorom na stres, te je takva mikroglija uključena u modifikacije sinapsi [209]. Iako mikroglija i tkivni makrofagi dijele mnoge karakteristike, uključujući izražaj molekula MHC i sposobnost fagocitoze [38,191], u našem istraživanju smo pokazali kako je dugotrajna aktivacija specifično obilježje vezano uz mikrogliju, no ne i druge tkivne makrofage tijekom latencije. U ovom radu nismo razjasnili što je uzrok ovih razlika u obrascima aktivacije. Međutim, jedno od objašnjenja bi mogla biti sama lokalizacija stanica. Mikroglija se nalazi u parenhimu mozga, koji je u odnosu na druga tkiva manje izložen čimbenicima iz okoliša tijekom homeostatskih uvjeta [210]. Nadalje, dok drugi makrofagi konstitutivno ispoljavaju bazalne razine molekula MHC [211], mikroglija ih ne ispoljava tijekom homeostatskih uvjeta. Stoga je jedno od mogućih objašnjenja promjene u fenotipu mikroglije da kolonizacija mozga MCMV-om dovodi do povišenja bazalne razine aktivacije koja je već prisutna u drugim tkivnim makrofagima koji su izloženi okolišnim čimbenicima.

Stanice urođene imunosti se mogu prilagoditi različitim patološkim stanjima, što se povezuje sa sposobnošću pojačane reakcije i odgovora na sekundarne podražaje [198,212]. Pojačan odgovor na sekundarne podražaje mogu imati stanice koje posjeduju svojstvo imunosti (engl. *trained immunity*) ili predaktivacije (engl. *priming*). Smatra se da je trenirana imunost posljedica epigenetskih promjena, sa transkripcijskim i aktivacijskim profilom koji se nakon određenog podražaja vraća na homeostatske razine [198]. Međutim pojam „*priming*-a“, odnosno predaktivacije imunoloških stanica, rezultira trajnim transkripcijskim promjenama sa pojačanim aktivacijskim statusom [198], koji se ne vraća na homeostatske razine nakon razrješenja podražaja. U ovom radu smo pokazali kako je mikroglija dugotrajno aktivirana tijekom latentne infekcije MCMV-om te se nakon razrješenja akutne infekcije

ne vraća u homeostatsko stanje, što se vidi i na razini transkriptoma. Analizom transkriptoma na razini pojedinačnih stanica smo detektirali prisutnost specifične subpopulacije mikroglije (subpopulacija 2) potaknute latencijom MCMV-om, te je glavna karakteristika ove subpopulacije pojačan izražaj proupalnih gena uključenih u protuvirusni odgovor, ponajviše gena povezanih sa odgovorom na IFN-I i IFN-II, te izražaj ili regulaciju molekula MHC-I i II, što sugerira da mikroglija ima ključnu ulogu u nadzoru virusa. Poznato je da IFN-I i IFN-II mogu oblikovati fenotip i funkciju mikroglije u različitim patološkim stanjima, kao što su upala u mozgu i neurodegeneracija [35,213,214]. Međutim, tek treba utvrditi u kojoj mjeri te promjene posredovane interferonima odražavaju promjene koje u mikrogliji izaziva infekcija CMV-om. Valja istaknuti da su se promjene na razini transkriptoma uglavnom ograničavale na specifičnu subpopulaciju mikroglije (subpopulacija 2), što upućuje da je za glavne funkcionalne posljedice latentne infekcije odgovorna upravo navedena subpopulacija mikroglije, nastala kao posljedica latentne infekcije MCMV-om.

Naši rezultati pokazuju kako je „*priming*“ mikroglije tijekom latencije MCMV-a ključan u nadzoru latentnog virusa u mozgu, obzirom da uklanjanje mikroglije tijekom latencije dovodi do reaktivacije MCMV-a u mozgu. Dodatno, latentno inficirani miševi MCMV-om poboljšano nadziru infekciju usred intrakranijalne infekcije u odnosu na inficirane miševe sa uklonjenom populacijom mikroglije, čime se pokazuje važnost dugotrajno aktivirane mikroglije u nadzoru virusa u mozgu. Sukladno tome, pokazali smo kako mikroglija koja nije predaktivirana u kontrolnih neinficiranih miševa, tijekom intrakranijalne infekcije ne doprinosi nadzoru virusa u mozgu. Naši rezultati su u suprotnosti studijama infekcije sa nekoliko drugih virusa gdje je pokazano kako mikroglija pridonosi akutnom nadzoru virusa, primjerice kod infekcije flavivirusima, HSV-1-om i neurotropnim virusom influence [8,22,45]. Jedno od mogućih objašnjenja za opažane rezultate je vrijeme analize nakon intrakranijalne infekcije, obzirom da smo analizirali količinu virusa u mozgu 3 dana nakon infekcije. Većina prethodnih studija analizirala je količinu virusa u nešto kasnijim vremenskim točkama nakon infekcije, dopuštajući razvoj odgovora posredovanog putem limfocita T, koji je također oblikovan odgovorom mikroglije, što se pokazalo ključnim u ograničavanju virusnih infekcija [204].

Visoke razine proupalnih kemokina i citokina (MCP-1, RANTES i IP-10) su detektirane tijekom latencije MCMV-a, što upućuje na proupalni okoliš u mozgu.

Analiza transkriptoma mikroglije tijekom latencije MCMV-a je pokazala visoke razine gena koji kodiraju za navedene kemokine i citokine, stoga možemo zaključiti kako je mikroglija glavni izvor proupalnih citokina i kemokina tijekom latencije MCMV-a u mozgu. Navedeni kemokini su važni za infiltraciju limfocita T i stanica NK u mozak uslijed virusnih infekcija [135,215–217], što upućuje na važnost mikroglije u oblikovanju imunološkog odgovora, infiltraciji te održavanju limfocita T_{RM} u mozgu tijekom latencije MCMV-a. Astrociti su također aktivno uključeni u imunološki odgovor [53,218,219], te mnoga patološka stanja u mozgu dovode do promjena u njihovom transkripcijskom profilu i prelasku u reaktivni fenotip [66]. Tijekom akutne infekcije MCMV-om, astrociti su inficirani i aktivirani [23]. Međutim, za razliku od mikroglije koja je dugotrajno aktivirana tijekom latencije MCMV-a, analiza transkriptoma astrocita nije pokazala značajne promjene u transkripcijskom profilu. Naime, nismo uočili specifične populacije astrocita vezane uz latentnu infekciju niti pojačan izražaj proupalnih gena, kao što smo uočili kod mikroglije tijekom latencije MCMV-a. Također, analizom transkriptoma nismo detektirali fenotip reaktivnih astrocita tijekom latencije MCMV-a u mozgu. Za prijelaz astrocita u reaktivno stanje često su potrebni signali koje proizvodi mikroglija [65]. Analiza transkriptoma mikroglije ne pokazuje povećani broj transkripata koji kodiraju IL-1α, TNF-α i C1q u mikrogliji, čiji se izražaj povezuje sa pojavom reaktivnih astrocita. Navedeni rezultati sugeriraju da tijekom latencije MCMV-a postoji specifična regulacija upalnog odgovora različitih tipova glija-stanica, pri čemu je upala povezana sa latentnom infekcijom dovoljna da kronično aktivira mikrogliju, no ne i astrocite. Na koji način latentna infekcija utječe na druge populacije stanica u mozgu, poput oligodendrocita i makrofaga SŽS-a, predstavlja važan smjer za buduća istraživanja.

U ovome radu smo pokazali kako dugotrajni izražaj molekula MHC-II ovisi o kontinuiranom signaliziranju preko IFNGR1 na mikrogliji tijekom latencije MCMV-a, te je signalizacija putem citokina IFN-γ na mikrogliji ključna za nadzor latentnog virusa. Poznato je da tijekom infekcije MCMV-a u mozgu virus-specifični CD8 i CD4 limfociti T mogu proizvoditi IFN-γ [147]. Naši rezultati pokazuju da dugotrajna aktivacija i „*priming*“ mikroglije ovisi o kontinuiranom lučenju lokalnog citokina IFN-γ od strane virus-specifičnih CD8 limfocita T_{RM} u mozgu. Međutim, IFN-γ također epigenetski reprogramira mikrogliju nakon rane imunološke aktivacije [196]. Obzirom na rezultate navedene studije i naše rezultate dobivene tijekom latencije MCMV-a, vjerojatno su potrebna oba mehanizma kako bi se osigurala dugotrajna aktivacija mikroglije tijekom

latencije MCMV-a u mozgu. Osim IFN-γ, naša analiza transkriptoma pokazuje izrazito visoke razine izražaja gena stimuliranih sa IFN-I, što sugerira da IFN-I također doprinosi aktivaciji mikroglije. Međutim, koja je važnost IFN-I u regulaciji aktivacije mikroglije u ranoj fazi infekcije te latenciji zahtjeva daljnja istraživanja.

Protuvirusni lijekovi, kao što su aciklovir (ACV) i ganciklovir (GCV), se koriste za liječenje HCMV-a i drugih herpesvirusnih infekcija [194]. U mišjem modelu prirođene infekcije MCMV-om, antitijela specifična za MCMV ograničavaju upalu i replikaciju virusa u mozgu novookoćenih miševa [195], dok tretman novookoćenih miševa uklanjajućim protutijelima za IFN-γ ili TNF-α [146,149], te glukokortikoidima [148] smanjuje upalu i patologiju u mozgu bez utjecaja na replikaciju virusa. Pokazali smo kako su rana intervencija i protuvirusno liječenje GCV-om tijekom akutne faze infekcije MCMV-om učinkovito smanjili upalu i količinu virusa u mozgu. Osim toga, zaštitni učinak ranog protuvirusnog liječenja na aktivaciju mikroglije i količinu virusa u mozgu se održao čak i tijekom latencije, dodatno naglašavajući važnost ranog protuvirusnog tretmana. Međutim, ukoliko je protuvirusno liječenje započelo sa odgodom od samo 5 dana nakon infekcije kada je virus već došao do mozga ili tijekom faze latencije, aktivacija mikroglije i razine virusa u mozgu se nisu promijenili, čime se dodatno potvrđuje važnost rane dijagnostike i terapije usmjerene na CMV.

Aktivacija mikroglije tijekom latencije MCMV-a varira ovisno o regijama mozga, pri čemu je najizraženija aktivacija mikroglije i akumulacija limfocita T u hipokampusu. Uočena regionalna specifičnost je u skladu sa dobro poznatom osjetljivošću hipokampusa na širok raspon fizioloških i patoloških podražaja, uključujući kronični stres, starenje i infekcije [19]. Nekoliko neurotropnih virusa pokazuje preferencijalni tropizam za hipokampus, uključujući HCMV [24,25]. Također, najviše razine genoma MCMV-a su detektirane u hipokampusu tijekom latentne faze infekcije MCMV-om [23], što sugerira da povećane razine virusa mogu doprinijeti povećanom broju i pojačanoj aktivaciji mikroglije u ovoj regiji mozga. Ovo tumačenje dodatno podupire naš rezultat koji pokazuje kako je farmakološko smanjenje replikacije virusa povezano sa istodobnim smanjenjem aktivacije mikroglije. Dodatno, MCMV uspostavlja latenciju u neuronima [23], što ukazuje da aktivacija mikroglije u hipokampusu tijekom latencije vjerojatno odražava odgovor na inficirane neurone ili signale proizvedene iz neurona. Iako mehanizmi koji stoje iza osjetljivosti neurona hipokampusa na infekciju MCMV-

om ostaju nejasni, specifična svojstva neurona u hipokampusu i signali iz lokalnog mikrookoliša mogu pridonijeti podložnosti hipokampusa za perzistenciju MCMV-a.

Analiza transkriptoma hipokampusa tijekom latencije MCMV-a je pokazala smanjen izražaj nekoliko ključnih regulatora aktivnosti neurona i sinaptičke plastičnosti. Sukladno tome, primijetili smo smanjenje gustoće dendritičnih spina u regiji CA1 hipokampusa tijekom latencije MCMV-a. Uklanjanje mikroglije tijekom latencije je dovelo do sprječavanja gubitka dendritičkih spina, što ukazuje na to da su posljedice latentne infekcije posredovane aktiviranom mikroglijom potencijalno reverzibilne. Također, tijekom akutne infekcije MCMV-om u mozgu smo primijetili povećanu fagocitozu sinaptičkih završetaka od strane mikroglije, no nismo uočili značajne razlike u gustoći dendritičnih spina između akutno inficiranih i kontrolnih mozgova. Iako neočekivano, ovo otkriće vjerojatno odražava pojačanu sinaptičku plastičnost hipokampusa tijekom ranog postnatalnog razdoblja [220]. Stoga možemo zaključiti da je produljena aktivacija mikroglije tijekom latencije potrebna za gubitak sinapsi u hipokampusu.

Aktivacija mikroglije i upalni odgovor posredovan mikroglijom su često povezani sa kognitivnim deficitima zbog pretjeranog sinaptičkog uklanjanja i poremećaja u preoblikovanju neuronskih krugova, koji se javljaju tijekom normalnog starenja, neurodegenerativnih bolesti i drugih neuroloških poremećaja, te infekcija SŽS-a [83,221–223]. U ovoj studiji smo uočili deficit prostornog učenja kod latentno inficiranih miševa MCMV-om. Fenotip je uočen i kod mišjih sojeva koji su rezistentni (C57BL/6) i kod osjetljivi (BALB/c) na infekciju MCMV-om, što ukazuje na njegovu neovisnost o genetskoj pozadini domaćina. Deficit u pamćenju latentno inficiranih miševa je povezan sa smanjenjem gustoće dendritičnih spina i narušenim elektrofiziološkim svojstvima neurona u regiji hipokampusa CA1, poznatoj kao posebno osjetljivoj na upalne podražaje [224,225]. Nasuprot tome, gustoća dendritičnih spina u neuronima iz regija CA3 i DG hipokampusa je ostala uglavnom nepromijenjena, što može djelomično kompenzirati funkcionalne deficite u regiji CA1 i pomoći u očuvanju ukupne funkcije hipokampusa, što potencijalno objašnjava relativno blagi uočeni fenotip ponašanja.

Mikroglija može doprinijeti uklanjanju sinapsi različitim molekularnim putevima, pri čemu se među najvažnijima ističu kaskada komplementa, te signalizacija putem receptora MerTK-a (engl. *Mer tyrosine kinase*) i TREM2-a (engl. *triggering receptor*

expressed on myeloid cells 2), uključeni u obilježavanje, prepoznavanje te uklanjanje sinaptičkih struktura [226–228]. Naše transkriptomske analize mikroglije tijekom latencije MCMV-a su pokazale pojačan izražaj više gena povezanih sa komplementom, dok MerTK i TREM2 nisu značajno promijenjeni. U skladu s tim rezultatima, pokazano je da infekcija SŽS-a virusom Zapadnog Nila može potaknuti gubitak sinapsi posredovan mikroglijom putem aktivacije komplementa [21]. Štoviše, pokazalo se da kognitivna oštećenja posredovana mikroglijom nakon infekcije virusom Zika ovise o signalizaciji citokina IFN-γ [20]. Konačno, IFN-γ i IFN-I mogu pojačati izražaj komponenti komplementa poput C3 i C4 [229,230], pružajući potencijalnu mehanističku vezu između gubitka sinapsi u latentno inficiranim mozgovima i aktivacije komplementa. Analize transkriptoma mikroglije kod upalnih stanja u mozgu, neurodegenerativnih bolesti i tijekom starenja su pokazale sličan aktivacijski fenotip mikroglije i pojačan izražaj istih proupalnih gena [231–233]. Primjerice, tijekom starenja je mikrogliju aktivira citokin IFN-γ u bijeloj tvari mozga, te je lokalizirana u neposrednoj blizini CD8 limfocita T i pridonosi gubitku oligodendrocita [231], što dodatno podupire povezanost aktivacije mikroglije posredovane citokinom IFN-γ sa proupalnim promjenama u različitim patološkim i fiziološkim stanjima mozga. Daljnja istraživanja ovih puteva bit će od iznimne važnosti za definiranje mehanizama koji sinaptičkog uklanjanja tijekom latentne infekcije MCMV-om, kao i za određivanje funkcionalnog doprinosa drugih pojačano izraženih gena identificiranih u populaciji mikroglije povezanoj sa latentnom infekcijom.

Većina dojenčadi sa klinički vidljivim simptomima prirođene infekcije HCMV-om će razviti neurološke posljedice. Međutim, čak i dojenčad sa asimptomatskom infekcijom može razviti neurološke poremećaje u kasnijoj fazi života [137,234]. Do danas ne postoji odobreno cjepivo protiv HCMV-a, upotreba antivirusnih terapija ograničena je zbog toksičnosti, te intervencijske terapije ne mogu u potpunosti spriječiti neželjene ishode bolesti povezanih sa infekcijom HCMV-om, posebice ishode prirođene infekcije [109,235]. Osim toga, postojeće terapije ne mogu u potpunosti spriječiti štetne ishode povezane s infekcijom, uključujući neurološke posljedice i oštećenja SŽS-a. Stoga, razvoj učinkovitijih terapijskih pristupa zahtijeva bolje razumijevanje mehanizama interakcije virusa i domaćina, kao i uloge pojedinih staničnih populacija u zaštiti od infekcije nasuprot razvoju imunopatoloških posljedica. Iako je do danas razvijeno nekoliko životinjskih modela za istraživanje patogeneze infekcije CMV-om, opsežna literatura koja karakterizira mišji razvoj SŽS-a, uključujući

značajno postnatalno sazrijevanje mišjeg mozga, snažno podupire translacijsku relevantnost ovog modela za razumijevanje bolesti SŽS-a nakon virusne infekcije tijekom razvoja. Iako se nalazi iz životinjskih modela ne mogu izravno prenesti na ljude, rezultati iz ovih sustava, uključujući i rezultate otkrivene u ovome radu, mogu informirati i usmjeriti buduća istraživanja na ljudskim tkivima i kliničkim uzorcima.

U ovome radu smo pokazali da latentna infekcija CMV-om u mozgu potiče dugotrajnu aktivaciju mikroglije, što poboljšava nadzor kronične infekcije u mozgu. Istovremeno, dugotrajno aktivirana mikroglija dovodi do patoloških oštećenja u SŽS-u. Smanjena sinaptička povezanost uzrokovana dugotrajnom aktivacijom mikroglije se može popraviti uklanjanjem mikroglije, što otvara nove terapijske mogućnosti. Procjenjuje se da 0,67% ljudske dojenčadi je rođeno s HCMV-om [117], no učestalost latentne infekcije HCMV-om u SŽS-u u ljudskoj populaciji još uvijek nije poznata. Ipak, DNA HCMV-a je zabilježena u ljudskom mozgu znatno češće nego što bi se moglo očekivati na temelju učestalosti prirođene infekcije [236]. Razine aktivirane mikroglije zabilježene su većoj mjeri u mozgovima pacijenata sa dijagnosticiranim neurološkim poremećajem koji su također pozitivni na HCMV, čime se upućuje na mogućnost doprinosa upale u mozgu uslijed reaktivacije CMV-a u razvoju pojedinih neuroloških poremećaja [237]. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi utvrdila posljedice latentne infekcije CMV-om u mozgu te mogu li CMV i mikroglija biti važne terapijske mete s ciljem poboljšanja zdravlja mozga.

6. ZAKLJUČCI

U doktorskoj disertaciji pod temom istraživanja karakterizacije glija-stanica u mozgu tijekom latentne infekcije citomegalovirusom, zaključili smo sljedeće:

- Pojačan izražaj molekula MHC-II na mikrogliji je marker aktivacije mikroglije tijekom akutne faze i latencije CMV-om.
- Mikroglija je dugotrajno aktivirana te izražava visoke razine molekula MHC-II tijekom latencije MCMV-a, najviše u hipokampusu.
- Mikroglija poprima prekomjerno razgranati fenotip u regiji hipokampusa CA1 u latentno inficiranih miševa.
- Dugotrajna aktivacija je specifično svojstvo mikroglije, no ne i drugih tkivnih makrofaga tijekom latencije.
- Mikroglija je transkripcijski promijenjena tijekom latencije, sa povećanim izražajm proupalnih gena uključenih u protuvirusni odgovor.
- Astrociti nisu pokazali reaktivni transkripcijski profil tijekom latencije MCMV-om u provedenoj analizi.
- Pojačano izraženi geni u mikrogliji tijekom latencije su geni koji kodiraju molekule MHC, interferone tipa I i II, te sustav komplementa.
- Protuvirusna terapija u novookoćenih inficiranih miševa koja je započela tijekom rane faze infekcije MCMV-a ima pozitivan učinak na aktivaciju mikroglije, upalu u mozgu i količinu virusa, te se učinak rane protuvirusne terapije održava i tijekom latencije.
- Protuvirusna terapija nakon infiltracije virusa u mozak ili terapija započeta tijekom latencije nema značajan učinak na upalu u mozgu i količinu virusa.
- Kontinuirana signalizacija putem receptora za IFN-γ na mikrogliji održava dugotrajnu aktivaciju mikroglije i izražaj molekula MHC-II tijekom latencije MCMV-a.
- IFN-γ se tijekom latencije proizvodi lokalno u mozgu, od strane virus-specifičnih, tkivno-rezidentnih CD8 limfocita T.
- Dugotrajno aktivirana mikroglija tijekom latencije je nužna za pojačan nadzor latentnog/reaktivirajućeg virusa u mozgu putem IFN-γ signalizacije.
- Kronična aktivacija mikroglije uzrokuje gubitak sinapsi u regiji CA1 hipokampusa.

- Dugotrajno aktivirana mikroglija tijekom latencije MCMV-a pridonosi smanjenju sinaptičke plastičnosti neurona u regiji CA1 hipokampusa.
- Dugotrajno aktivirana mikroglija uzrokuje blage poremećaje u pamćenju latentno inficiranih miševa MCMV-om.
- Modulacija aktivacije mikroglije je potencijalna meta za ublažavanje posljedica prirođene infekcije HCMV-om u SŽS-u.

7. LITERATURA

1. Alves de Lima K, Rustenhoven J, Kipnis J. Meningeal Immunity and Its Function in Maintenance of the Central Nervous System in Health and Disease. Annu Rev Immunol. 2020 Apr 26;38:597–620. doi:10.1146/annurev-immunol-102319-103410 PubMed PMID: 32340575.

2. Croese T, Castellani G, Schwartz M. Immune cell compartmentalization for brain surveillance and protection. Nat Immunol. 2021 Sep;22(9):1083–92. doi:10.1038/s41590-021-00994-2 PubMed PMID: 34429552.

3. Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. Science. 2018 Oct 12;362(6411):181–5. doi:10.1126/science.aat0473 PubMed PMID: 30309945; PubMed Central PMCID: PMC6292669.

4. Holt CE, Martin KC, Schuman EM. Local translation in neurons: visualization and function. Nat Struct Mol Biol. 2019 Jul;26(7):557–66. doi:10.1038/s41594-019-0263-5

5. Hosseini S, Wilk E, Michaelsen-Preusse K, Gerhauser I, Baumgärtner W, Geffers R, et al. Long-Term Neuroinflammation Induced by Influenza A Virus Infection and the Impact on Hippocampal Neuron Morphology and Function. J Neurosci. 2018 Mar 21;38(12):12. doi:10.1523/JNEUROSCI.1740-17.2018 PubMed PMID: 29487124; PubMed Central PMCID: PMC6596076.

6. Ampie L, McGavern DB. Immunological defense of CNS barriers against infections. Immunity. 2022 May 10;55(5):781–99. doi:10.1016/j.immuni.2022.04.012 PubMed PMID: 35545028; PubMed Central PMCID: PMC9087878.

7. Kelly R, Reinert LS, Paludan SR. Sequelae of viral CNS infections including outcomes, mechanisms, and knowledge gaps. Npj Viruses. 2025 Nov 16;3(1):79. doi:10.1038/s44298-025-00160-7

8. Matschke J, Lütgehetmann M, Hagel C, Sperhake JP, Schröder AS, Edler C, et al. Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. Lancet Neurol. 2020 Nov;19(11):919–29. doi:10.1016/S1474-4422(20)30308-2 PubMed PMID: 33031735; PubMed Central PMCID: PMC7535629.

9. Heaton RK, Clifford DB, Franklin DR, Woods SP, Ake C, Vaida F, et al. HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study. Neurology. 2010 Dec 7;75(23):2087–96. doi:10.1212/WNL.0b013e318200d727 PubMed PMID: 21135382; PubMed Central PMCID: PMC2995535.

10. Senzolo M, Schiff S, D'Aloiso CM, Crivellin C, Cholongitas E, Burra P, et al. Neuropsychological alterations in hepatitis C infection: the role of inflammation. World J Gastroenterol. 2011 Aug 7;17(29):3369–74. doi:10.3748/wjg.v17.i29.3369 PubMed PMID: 21876628; PubMed Central PMCID: PMC3160562.

11. Leblanc P, Vorberg IM. Viruses in neurodegenerative diseases: More than just suspects in crimes. PLoS Pathog. 2022 Aug;18(8):e1010670. doi:10.1371/journal.ppat.1010670 PubMed PMID: 35925897; PubMed Central PMCID: PMC9352104.

12. Itzhaki RF. Overwhelming Evidence for a Major Role for Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV1) in Alzheimer's Disease (AD); Underwhelming Evidence against. Vaccines. 2021 Jun 21;9(6):679.

doi:10.3390/vaccines9060679 PubMed PMID: 34205498; PubMed Central PMCID: PMC8234998.

13. Bjornevik K, Münz C, Cohen JI, Ascherio A. Epstein-Barr virus as a leading cause of multiple sclerosis: mechanisms and implications. Nat Rev Neurol. 2023 Mar;19(3):160–71. doi:10.1038/s41582-023-00775-5 PubMed PMID: 36759741.

14. Knierim JJ. The hippocampus. Curr Biol. 2015 Dec 7;25(23):R1116–21. doi:10.1016/j.cub.2015.10.049

15. Bartsch T, Wulff P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. Neuroscience. 2015 Nov 19;309:1–16. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.07.084 PubMed PMID: 26241337.

16. Knezović V. Histološka, magnetskorezonancijska i transkriptomska analiza reorganizacijskih procesa u ljudskom hipokampusu tijekom razvitka [doctoral thesis] [Internet]. Sveučilište u Zagrebu, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2020 [cited 2026 Aug 24]. Available from: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:636087

17. Bartsch T, Döhring J, Reuter S, Finke C, Rohr A, Brauer H, et al. Selective neuronal vulnerability of human hippocampal CA1 neurons: lesion evolution, temporal course, and pattern of hippocampal damage in diffusion-weighted MR imaging. J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab. 2015 Nov;35(11):1836–45. doi:10.1038/jcbfm.2015.137 PubMed PMID: 26082014; PubMed Central PMCID: PMC4635239.

18. Gomez CD, Read J, Acharjee S, Pittman QJ. Early Life Inflammation Increases CA1 Pyramidal Neuron Excitability in a Sex and Age Dependent Manner through a Chloride Homeostasis Disruption. J Neurosci. 2019 Sep 11;39(37):7244–59. doi:10.1523/JNEUROSCI.2973-18.2019 PubMed PMID: 31308096; PubMed Central PMCID: PMC6759023.

19. Yong SJ, Yong MH, Teoh SL, Soga T, Parhar I, Chew J, et al. The Hippocampal Vulnerability to Herpes Simplex Virus Type I Infection: Relevance to Alzheimer's Disease and Memory Impairment. Front Cell Neurosci. 2021 Aug 13;15. doi:10.3389/fncel.2021.695738

20. Garber C, Soung A, Vollmer LL, Kanmogne M, Last A, Brown J, et al. T cells promote microglia-mediated synaptic elimination and cognitive dysfunction during recovery from neuropathogenic flaviviruses. Nat Neurosci. 2019 Aug;22(8):1276–88. doi:10.1038/s41593-019-0427-y PubMed PMID: 31235930; PubMed Central PMCID: PMC6822175.

21. Vasek MJ, Garber C, Dorsey D, Durrant DM, Bollman B, Soung A, et al. A complement-microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment. Nature. 2016 Jun 23;534(7608):538–43. doi:10.1038/nature18283 PubMed PMID: 27337340; PubMed Central PMCID: PMC5452615.

22. Hosseini S, Michaelsen-Preusse K, Schughart K, Korte M. Long-Term Consequence of Non-neurotropic H3N2 Influenza A Virus Infection for the Progression of Alzheimer's Disease Symptoms. Front Cell Neurosci. 2021;15:643650. doi:10.3389/fncel.2021.643650 PubMed PMID: 33994946; PubMed Central PMCID: PMC8113629.

23. Krstanović F, Mihalić A, Rashidi AS, Sitnik KM, Ruzsics Z, Čičin-Šain L, et al. Neuron-restricted cytomegalovirus latency in the central nervous system regulated by CD4+ T-cells and IFN-γ. J Neuroinflammation. 2025 Mar 29;22(1):95. doi:10.1186/s12974-025-03422-6

24. Piccirilli G, Gabrielli L, Bonasoni MP, Chiereghin A, Turello G, Borgatti EC, et al. Fetal Brain Damage in Human Fetuses with Congenital Cytomegalovirus Infection: Histological Features and Viral Tropism. Cell Mol Neurobiol. 2023;43(3):3. doi:10.1007/s10571-022-01258-9 PubMed PMID: 35933637; PubMed Central PMCID: PMC10006254.

25. Natsume T, Inaba Y, Osawa Y, Fukuyama T. High Incidence of Hippocampal Abnormalities in Pediatric Patients with Congenital Cytomegalovirus Infection. Neuropediatrics. 2022 Aug;53(4):239–45. doi:10.1055/a-1754-1142 PubMed PMID: 35098496; PubMed Central PMCID: PMC9444318.

26. Goldmann T, Wieghofer P, Jordão MJC, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K, et al. Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. Nat Immunol. 2016 Jul;17(7):797–805. doi:10.1038/ni.3423 PubMed PMID: 27135602; PubMed Central PMCID: PMC4968048.

27. Prinz M, Jung S, Priller J. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. Cell. 2019 Oct 3;179(2):292–311. doi:10.1016/j.cell.2019.08.053

28. Santambrogio L, Belyanskaya SL, Fischer FR, Cipriani B, Brosnan CF, Ricciardi-Castagnoli P, et al. Developmental plasticity of CNS microglia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 May 22;98(11):6295–300. doi:10.1073/pnas.111152498 PubMed PMID: 11371643; PubMed Central PMCID: PMC33462.

29. Muzio L, Viotti A, Martino G. Microglia in Neuroinflammation and Neurodegeneration: From Understanding to Therapy. Front Neurosci. 2021 Sep 24;15:742065. doi:10.3389/fnins.2021.742065 PubMed PMID: 34630027; PubMed Central PMCID: PMC8497816.

30. Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. Nat Rev Immunol. 2011 Nov;11(11):775–87. doi:10.1038/nri3086

31. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. Annu Rev Neurosci. 2009;32:149–84. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135600 PubMed PMID: 19555289; PubMed Central PMCID: PMC3086722.

32. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. Annu Rev Immunol. 2017 Apr 26;35:441–68. doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052358 PubMed PMID: 28226226; PubMed Central PMCID: PMC8167938.

33. Miron VE, Priller J. Investigating Microglia in Health and Disease: Challenges and Opportunities. Trends Immunol. 2020 Sep;41(9):785–93. doi:10.1016/j.it.2020.07.002 PubMed PMID: 32736967.

34. Boche D, Perry VH, Nicoll J a. R. Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. Neuropathol Appl Neurobiol. 2013;39(1):3–18. doi:10.1111/nan.12011

35. Ajami B, Samusik N, Wieghofer P, Ho PP, Crotti A, Bjornson Z, et al. Single cell mass cytometry reveals distinct populations of brain myeloid cells in mouse models of neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. Nat Neurosci. 2018 Apr;21(4):4. doi:10.1038/s41593-018-0100-x PubMed PMID: 29507414; PubMed Central PMCID: PMC8629134.

36. Barko K, Shelton M, Xue X, Afriyie-Agyemang Y, Puig S, Freyberg Z, et al. Brain region- and sex-specific transcriptional profiles of microglia. Front Psychiatry. 2022 Aug 24;13. doi:10.3389/fpsyt.2022.945548

37. Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, et al. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. Brain Res Brain Res Rev. 2005 Apr;48(2):2. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.12.009 PubMed PMID: 15850658.

38. Waltl I, Kalinke U. Beneficial and detrimental functions of microglia during viral encephalitis. Trends Neurosci. 2022 Feb 1;45(2):2. doi:10.1016/j.tins.2021.11.004

39. Chen Z, Zhong D, Li G. The role of microglia in viral encephalitis: a review. J Neuroinflammation. 2019 Apr 9;16:76. doi:10.1186/s12974-019-1443-2 PubMed PMID: 30967139; PubMed Central PMCID: PMC6454758.

40. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. Science. 2011 Sep 9;333(6048):1456–8. doi:10.1126/science.1202529 PubMed PMID: 21778362.

41. Chhatbar C, Detje CN, Grabski E, Borst K, Spanier J, Ghita L, et al. Type I Interferon Receptor Signaling of Neurons and Astrocytes Regulates Microglia Activation during Viral Encephalitis. Cell Rep. 2018 Oct 2;25(1):118-129.e4. doi:10.1016/j.celrep.2018.09.003 PubMed PMID: 30282022; PubMed Central PMCID: PMC7103936.

42. Katzilieris-Petras G, Lai X, Rashidi AS, Verjans GMGM, Reinert LS, Paludan SR. Microglia Activate Early Antiviral Responses upon Herpes Simplex Virus 1 Entry into the Brain to Counteract Development of Encephalitis-Like Disease in Mice. J Virol. 2022 Mar 23;96(6):e0131121. doi:10.1128/JVI.01311-21 PubMed PMID: 35045263; PubMed Central PMCID: PMC8941881.

43. Moseman EA, Blanchard AC, Nayak D, McGavern DB. T cell engagement of cross-presenting microglia protects the brain from a nasal virus infection. Sci Immunol. 2020 Jun 5;5(48):eabb1817. doi:10.1126/sciimmunol.abb1817 PubMed PMID: 32503876; PubMed Central PMCID: PMC7416530.

44. Seitz S, Clarke P, Tyler KL. Pharmacologic Depletion of Microglia Increases Viral Load in the Brain and Enhances Mortality in Murine Models of Flavivirus-Induced Encephalitis. J Virol. 2018 Aug 15;92(16):e00525-18. doi:10.1128/JVI.00525-18 PubMed PMID: 29899084; PubMed Central PMCID: PMC6069207.

45. Tsai TT, Chen CL, Lin YS, Chang CP, Tsai CC, Cheng YL, et al. Microglia retard dengue virus-induced acute viral encephalitis. Sci Rep. 2016 Jun 9;6:27670. doi:10.1038/srep27670 PubMed PMID: 27279150; PubMed Central PMCID: PMC4899773.

46. Waltl I, Käufer C, Gerhauser I, Chhatbar C, Ghita L, Kalinke U, et al. Microglia have a protective role in viral encephalitis-induced seizure development and hippocampal damage. Brain Behav Immun. 2018 Nov 1;74:186–204. doi:10.1016/j.bbi.2018.09.006

47. Sariol A, Mackin S, Allred MG, Ma C, Zhou Y, Zhang Q, et al. Microglia depletion exacerbates demyelination and impairs remyelination in a neurotropic coronavirus infection. Proc Natl Acad Sci. 2020 Sep 29;117(39):39. doi:10.1073/pnas.2007814117

48. Sadek JR, Pergam SA, Harrington JA, Echevarria LA, Davis LE, Goade D, et al. Persistent neuropsychological impairment associated with West Nile virus infection. J Clin Exp

Neuropsychol. 2010 Jan;32(1):81–7. doi:10.1080/13803390902881918 PubMed PMID: 19513920.

49. Hosseini S, Wilk E, Michaelsen-Preusse K, Gerhauser I, Baumgärtner W, Geffers R, et al. Long-Term Neuroinflammation Induced by Influenza A Virus Infection and the Impact on Hippocampal Neuron Morphology and Function. J Neurosci. 2018 Mar 21;38(12):3060–80. doi:10.1523/JNEUROSCI.1740-17.2018 PubMed PMID: 29487124; PubMed Central PMCID: PMC6596076.

50. Demuth L, Ohm M, Michaelsen-Preusse K, Schulze K, Riese P, Guzmán CA, et al. Influenza vaccine is able to prevent neuroinflammation triggered by H7N7 IAV infection. Front Pharmacol. 2023 Mar 29;14. doi:10.3389/fphar.2023.1142639

51. Sofroniew MV. Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. Trends Immunol. 2020 Sep;41(9):758–70. doi:10.1016/j.it.2020.07.004 PubMed PMID: 32819810; PubMed Central PMCID: PMC7484257.

52. Freeman MR. Specification and Morphogenesis of Astrocytes. Science. 2010 Nov 5;330(6005):774–8. doi:10.1126/science.1190928 PubMed PMID: 21051628; PubMed Central PMCID: PMC5201129.

53. Matias I, Morgado J, Gomes FCA. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. Front Aging Neurosci. 2019 Mar 19;11. doi:10.3389/fnagi.2019.00059

54. Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. Physiol Rev. 2018 Jan 1;98(1):239–389. doi:10.1152/physrev.00042.2016 PubMed PMID: 29351512; PubMed Central PMCID: PMC6050349.

55. Batiuk MY, Martirosyan A, Wahis J, de Vin F, Marneffe C, Kusserow C, et al. Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. Nat Commun. 2020 Mar 5;11:1220. doi:10.1038/s41467-019-14198-8 PubMed PMID: 32139688; PubMed Central PMCID: PMC7058027.

56. Giovannoni F, Quintana FJ. The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. Trends Immunol. 2020 Sep;41(9):805–19. doi:10.1016/j.it.2020.07.007 PubMed PMID: 32800705; PubMed Central PMCID: PMC8284746.

57. Jorgačevski J, Potokar M. Immune Functions of Astrocytes in Viral Neuroinfections. Int J Mol Sci. 2023 Jan;24(4):3514. doi:10.3390/ijms24043514

58. Guo AX, Fisher TM, Comandante-Lou N, De Jager PL, Liddelow SA. Innate immune signaling and functions in astrocytes. Nat Immunol. 2026 Jul;27(7):1364–74. doi:10.1038/s41590-026-02561-z

59. Fisher TM, Liddelow SA. Emerging roles of astrocytes as immune effectors in the central nervous system. Trends Immunol. 2024 Oct 1;Special issue: Neuroimmunology – II45(10):824–36. doi:10.1016/j.it.2024.08.008

60. Detje CN, Lienenklaus S, Chhatbar C, Spanier J, Prajeeth CK, Soldner C, et al. Upon intranasal vesicular stomatitis virus infection, astrocytes in the olfactory bulb are important interferon Beta producers that protect from lethal encephalitis. J Virol. 2015 Mar;89(5):2731–8. doi:10.1128/JVI.02044-14 PubMed PMID: 25540366; PubMed Central PMCID: PMC4325722.

61. Pfefferkorn C, Kallfass C, Lienenklaus S, Spanier J, Kalinke U, Rieder M, et al. Abortively Infected Astrocytes Appear To Represent the Main Source of Interferon Beta in the Virus-Infected Brain. J Virol. 2016 Feb 15;90(4):2031–8. doi:10.1128/JVI.02979-15 PubMed PMID: 26656686; PubMed Central PMCID: PMC4733997.

62. Hosseini S, Michaelsen-Preusse K, Grigoryan G, Chhatbar C, Kalinke U, Korte M. Type I Interferon Receptor Signaling in Astrocytes Regulates Hippocampal Synaptic Plasticity and Cognitive Function of the Healthy CNS. Cell Rep. 2020 May 19;31(7):107666. doi:10.1016/j.celrep.2020.107666 PubMed PMID: 32433975.

63. Colombo E, Farina C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. Trends Immunol. 2016 Sep 1;37(9):608–20. doi:10.1016/j.it.2016.06.006 PubMed PMID: 27443914.

64. Smith BC, Tinkey RA, Brock OD, Mariam A, Habean ML, Dutta R, et al. Astrocyte interferon-gamma signaling dampens inflammation during chronic central nervous system autoimmunity via PD-L1. J Neuroinflammation. 2023 Oct 12;20(1):1. doi:10.1186/s12974-023-02917-4

65. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature. 2017 Jan;541(7638):7638. doi:10.1038/nature21029

66. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. Nat Neurosci. 2021 Mar;24(3):312–25. doi:10.1038/s41593-020-00783-4 PubMed PMID: 33589835; PubMed Central PMCID: PMC8007081.

67. Limonta D, Jovel J, Kumar A, Airo AM, Hou S, Saito L, et al. Human Fetal Astrocytes Infected with Zika Virus Exhibit Delayed Apoptosis and Resistance to Interferon: Implications for Persistence. Viruses. 2018 Nov 17;10(11):646. doi:10.3390/v10110646 PubMed PMID: 30453621; PubMed Central PMCID: PMC6266559.

68. He W, Zhao Z, Anees A, Li Y, Ashraf U, Chen Z, et al. p21-Activated Kinase 4 Signaling Promotes Japanese Encephalitis Virus-Mediated Inflammation in Astrocytes. Front Cell Infect Microbiol. 2017 Jun 21;7:271. doi:10.3389/fcimb.2017.00271 PubMed PMID: 28680855; PubMed Central PMCID: PMC5478680.

69. Garber C, Vasek MJ, Vollmer LL, Sun T, Jiang X, Klein RS. Astrocytes decrease adult neurogenesis during virus-induced memory dysfunction via IL-1. Nat Immunol. 2018 Feb;19(2):151–61. doi:10.1038/s41590-017-0021-y PubMed PMID: 29292385; PubMed Central PMCID: PMC5786497.

70. Ireland DDC, Manangeeswaran M, Lewkowicz AP, Engel K, Clark SM, Laniyan A, et al. Long-term persistence of infectious Zika virus: Inflammation and behavioral sequela in mice. PLoS Pathog. 2020 Dec 10;16(12):e1008689. doi:10.1371/journal.ppat.1008689 PubMed PMID: 33301527; PubMed Central PMCID: PMC7728251.

71. Christensen JE, Simonsen S, Fenger C, Sørensen MR, Moos T, Christensen JP, et al. Fulminant lymphocytic choriomeningitis virus-induced inflammation of the CNS involves a cytokine-chemokine-cytokine-chemokine cascade. J Immunol Baltim Md 1950. 2009 Jan 15;182(2):1079–87. doi:10.4049/jimmunol.182.2.1079 PubMed PMID: 19124751.

72. Shouman S, Hesham N, Salem TZ. Viruses and neurodegeneration: a growing concern. J Transl Med. 2025 Jan 12;23:46. doi:10.1186/s12967-024-06025-6 PubMed PMID: 39800721; PubMed Central PMCID: PMC11727702.

73. Zhang W, Xiao D, Mao Q, Xia H. Role of neuroinflammation in neurodegeneration development. Signal Transduct Target Ther. 2023 Jul 12;8(1):267. doi:10.1038/s41392-023-01486-5

74. Lee KH, Kwon DE, Do Han K, La Y, Han SH. Association between cytomegalovirus end-organ diseases and moderate-to-severe dementia: a population-based cohort study. BMC Neurol. 2020 May 28;20:216. doi:10.1186/s12883-020-01776-3 PubMed PMID: 32466754; PubMed Central PMCID: PMC7254693.

75. Wozniak MA, Shipley SJ, Combrinck M, Wilcock GK, Itzhaki RF. Productive herpes simplex virus in brain of elderly normal subjects and Alzheimer's disease patients. J Med Virol. 2005 Feb;75(2):300–6. doi:10.1002/jmv.20271 PubMed PMID: 15602731.

76. Wozniak MA, Mee AP, Itzhaki RF. Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. J Pathol. 2009 Jan;217(1):131–8. doi:10.1002/path.2449 PubMed PMID: 18973185.

77. Itzhaki RF, Lin WR, Shang D, Wilcock GK, Faragher B, Jamieson GA. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. Lancet. 1997 Jan 25;349(9047):241–4. doi:10.1016/S0140-6736(96)10149-5 PubMed PMID: 9014911.

78. Madani S, Amini K, Habibi SAH, Shahhosseiny MH, Mohammadian T. The relationship between herpesviruses and Parkinson's disease: prevalence, viral load, and clinical implications. Acta Virol. 2026 Mar 4;70:14499. doi:10.3389/av.2026.14499

79. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. Science. 2022 Jan 21;375(6578):296–301. doi:10.1126/science.abj8222 PubMed PMID: 35025605.

80. Jang H, Boltz D, Sturm-Ramirez K, Shepherd KR, Jiao Y, Webster R, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus can enter the central nervous system and induce neuroinflammation and neurodegeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 18;106(33):14063–8. doi:10.1073/pnas.0900096106 PubMed PMID: 19667183; PubMed Central PMCID: PMC2729020.

81. Gao C, Jiang J, Tan Y, Chen S. Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets. Signal Transduct Target Ther. 2023 Sep 22;8(1):359. doi:10.1038/s41392-023-01588-0

82. Liu K, Fan D, Wu HP, Hu XY, He QL, Wu XM, et al. Senescent Microglia Mediate Neuroinflammation-Induced Cognitive Dysfunction by Selective Elimination of Excitatory Synapses in the Hippocampal CA1. Aging Cell. 2025 Sep;24(9):e70167. doi:10.1111/acel.70167 PubMed PMID: 40624910; PubMed Central PMCID: PMC12419858.

83. Cornell J, Salinas S, Huang HY, Zhou M. Microglia regulation of synaptic plasticity and learning and memory. Neural Regen Res. 2021 Aug 30;17(4):4. doi:10.4103/1673-5374.322423 PubMed PMID: 34472455; PubMed Central PMCID: PMC8530121.

84. Maziz MNH, Chakravarthi S, Aung T, Htoo PM, Shwe WH, Gupalo S, et al. Microglia-Mediated Neuroinflammation Through Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Causes Cognitive Dysfunction. Int J Mol Sci. 2025 Jul 25;26(15). doi:10.3390/ijms26157212

85. Krukowski K, Chou A, Feng X, Tiret B, Paladini MS, Riparip LK, et al. Traumatic Brain Injury in Aged Mice Induces Chronic Microglia Activation, Synapse Loss, and Complement-Dependent Memory Deficits. Int J Mol Sci. 2018 Nov 26;19(12):3753. doi:10.3390/ijms19123753 PubMed PMID: 30486287; PubMed Central PMCID: PMC6321529.

86. Li S, Liao Y, Dong Y, Li X, Li J, Cheng Y, et al. Microglial deletion and inhibition alleviate behavior of post-traumatic stress disorder in mice. J Neuroinflammation. 2021 Jan 5;18:7. doi:10.1186/s12974-020-02069-9 PubMed PMID: 33402212; PubMed Central PMCID: PMC7786489.

87. McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. Neurology. 1988 Aug;38(8):1285–91. doi:10.1212/wnl.38.8.1285 PubMed PMID: 3399080.

88. Dagher NN, Najafi AR, Kayala KMN, Elmore MRP, White TE, Medeiros R, et al. Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice. J Neuroinflammation. 2015 Aug 1;12:139. doi:10.1186/s12974-015-0366-9 PubMed PMID: 26232154; PubMed Central PMCID: PMC4522109.

89. Spangenberg EE, Lee RJ, Najafi AR, Rice RA, Elmore MRP, Blurton-Jones M, et al. Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid-β pathology. Brain J Neurol. 2016 Apr;139(Pt 4):1265–81. doi:10.1093/brain/aww016 PubMed PMID: 26921617; PubMed Central PMCID: PMC5006229.

90. Elmore MRP, Hohsfield LA, Kramár EA, Soreq L, Lee RJ, Pham ST, et al. Replacement of microglia in the aged brain reverses cognitive, synaptic, and neuronal deficits in mice. Aging Cell. 2018 Dec;17(6):e12832. doi:10.1111/acel.12832 PubMed PMID: 30276955; PubMed Central PMCID: PMC6260908.

91. Li X, Li Y, Jin Y, Zhang Y, Wu J, Xu Z, et al. Transcriptional and epigenetic decoding of the microglial aging process. Nat Aging. 2023 Oct;3(10):10. doi:10.1038/s43587-023-00479-x

92. Niraula A, Sheridan JF, Godbout JP. Microglia Priming with Aging and Stress. Neuropsychopharmacology. 2017 Jan;42(1):1. doi:10.1038/npp.2016.185

93. Sierra A, Gottfried-Blackmore AC, McEwen BS, Bulloch K. Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. Glia. 2007 Mar;55(4):4. doi:10.1002/glia.20468 PubMed PMID: 17203473.

94. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis [Internet]. Cambridge: Cambridge University Press; 2007 [cited 2024 Apr 26]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47376/ PubMed PMID: 21348071.

95. Gilden DH, Mahalingam R, Cohrs RJ, Tyler KL. Herpesvirus infections of the nervous system. Nat Clin Pract Neurol. 2007 Feb;3(2):82–94. doi:10.1038/ncpneuro0401 PubMed PMID: 17279082.

96. Adle-Biassette H, Teissier N. Cytomegalovirus Infections of the CNS. In: Infections of the Central Nervous System. John Wiley & Sons, Ltd; 2020. p. 65–76. doi:10.1002/9781119467748.ch7

97. Goodrum F. HUMAN CYTOMEGALOVIRUS LATENCY: Approaching the Gordian Knot. Annu Rev Virol. 2016 Sep 29;3(1):333–57. doi:10.1146/annurev-virology-110615-042422 PubMed PMID: 27501258; PubMed Central PMCID: PMC5514425.

98. Griffiths PD. Burden of disease associated with human cytomegalovirus and prospects for elimination by universal immunisation. Lancet Infect Dis. 2012 Oct;12(10):790–8. doi:10.1016/S1473-3099(12)70197-4 PubMed PMID: 23017365.

99. Peredo-Harvey I, Rahbar A, Söderberg-Nauclér C. Presence of the Human Cytomegalovirus in Glioblastomas—A Systematic Review. Cancers. 2021 Oct 9;13(20):5051. doi:10.3390/cancers13205051 PubMed PMID: 34680198; PubMed Central PMCID: PMC8533734.

100. Staras SAS, Flanders WD, Dollard SC, Pass RF, McGowan JE, Cannon MJ. Influence of sexual activity on cytomegalovirus seroprevalence in the United States, 1988-1994. Sex Transm Dis. 2008 May;35(5):472–9. doi:10.1097/OLQ.0b013e3181644b70 PubMed PMID: 18354346.

101. Griffiths P, Reeves M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. Nat Rev Microbiol. 2021 Dec;19(12):759–73. doi:10.1038/s41579-021-00582-z PubMed PMID: 34168328; PubMed Central PMCID: PMC8223196.

102. Boppana SB, Ross SA, Fowler KB. Congenital Cytomegalovirus Infection: Clinical Outcome. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2013 Dec 15;57(Suppl 4):S178–81. doi:10.1093/cid/cit629 PubMed PMID: 24257422; PubMed Central PMCID: PMC4471438.

103. AZENKOT T, ZANIELLO B, GREEN ML, SELKE S, HUANG M li, MAGARET A, et al. Cytomegalovirus shedding from breastmilk and mucosal sites in healthy post-partum women: a pilot study. J Med Virol. 2019 May;91(5):894–8. doi:10.1002/jmv.25386 PubMed PMID: 30578684; PubMed Central PMCID: PMC6402967.

104. Sinzger C, Digel M, Jahn G. Cytomegalovirus cell tropism. Curr Top Microbiol Immunol. 2008;325:63–83. doi:10.1007/978-3-540-77349-8_4 PubMed PMID: 18637500.

105. Smith MS, Bentz GL, Alexander JS, Yurochko AD. Human Cytomegalovirus Induces Monocyte Differentiation and Migration as a Strategy for Dissemination and Persistence. J Virol. 2004 May;78(9):4444–53. doi:10.1128/jvi.78.9.4444-4453.2004

106. Jackson JW, Sparer T. There Is Always Another Way! Cytomegalovirus' Multifaceted Dissemination Schemes. Viruses. 2018 Jul 20;10(7):7. doi:10.3390/v10070383 PubMed PMID: 30037007; PubMed Central PMCID: PMC6071125.

107. Mihalić A, Železnjak J, Lisnić B, Jonjić S, Juranić Lisnić V, Brizić I. Immune surveillance of cytomegalovirus in tissues. Cell Mol Immunol. 2024 Sep;21(9):959–81. doi:10.1038/s41423-024-01186-2 PubMed PMID: 39134803; PubMed Central PMCID: PMC11364667.

108. Schleiss MR. Cytomegalovirus Vaccine Development. Curr Top Microbiol Immunol. 2008;325:361–82. doi:10.1007/978-3-540-77349-8_20 PubMed PMID: 18637516; PubMed Central PMCID: PMC2831992.

109. Permar SR, Schleiss MR, Plotkin SA. A vaccine against cytomegalovirus: how close are we? J Clin Invest. 135(1):e182317. doi:10.1172/JCI182317 PubMed PMID: 39744948; PubMed Central PMCID: PMC11684802.

110. Hu X, Karthigeyan KP, Herbek S, Valencia SM, Jenks JA, Webster H, et al. Human Cytomegalovirus mRNA-1647 Vaccine Candidate Elicits Potent and Broad Neutralization and Higher Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Responses Than the gB/MF59 Vaccine. J Infect Dis. 2024 Aug 16;230(2):455–66. doi:10.1093/infdis/jiad593 PubMed PMID: 38324766; PubMed Central PMCID: PMC11326847.

111. John S, Yuzhakov O, Woods A, Deterling J, Hassett K, Shaw CA, et al. Multi-antigenic human cytomegalovirus mRNA vaccines that elicit potent humoral and cell-mediated immunity. Vaccine. 2018 Mar 14;36(12):1689–99. doi:10.1016/j.vaccine.2018.01.029 PubMed PMID: 29456015.

112. English S, Khan-Qureshi A, Douglas AD. Progress and prospects for herpesvirus vaccination using gB antigens. Front Immunol. 17:1827628. doi:10.3389/fimmu.2026.1827628 PubMed PMID: 42292461; PubMed Central PMCID: PMC13260650.

113. Brinkmann MM, Dağ F, Hengel H, Messerle M, Kalinke U, Čičin-Šain L. Cytomegalovirus immune evasion of myeloid lineage cells. Med Microbiol Immunol (Berl). 2015 Jun;204(3):367–82. doi:10.1007/s00430-015-0403-4 PubMed PMID: 25776081.

114. Angulo G, Zeleznjak J, Martínez-Vicente P, Puñet-Ortiz J, Hengel H, Messerle M, et al. Cytomegalovirus restricts ICOSL expression on antigen-presenting cells disabling T cell co-stimulation and contributing to immune evasion. eLife. 2021 Jan 18;10:e59350. doi:10.7554/eLife.59350 PubMed PMID: 33459589; PubMed Central PMCID: PMC7840182.

115. Britt WJ, Prichard MN. New therapies for human cytomegalovirus infections. Antiviral Res. 2018 Nov;159:153–74. doi:10.1016/j.antiviral.2018.09.003 PubMed PMID: 30227153.

116. Gugliesi F, Coscia A, Griffante G, Galitska G, Pasquero S, Albano C, et al. Where do we Stand after Decades of Studying Human Cytomegalovirus? Microorganisms. 2020 May 8;8(5):5. doi:10.3390/microorganisms8050685 PubMed PMID: 32397070; PubMed Central PMCID: PMC7284540.

117. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. Rev Med Virol. 2007;17(4):253–76. doi:10.1002/rmv.535 PubMed PMID: 17579921.

118. Teissier N, Fallet-Bianco C, Delezoide AL, Laquerrière A, Marcorelles P, Khung-Savatovsky S, et al. Cytomegalovirus-induced brain malformations in fetuses. J Neuropathol Exp Neurol. 2014 Feb;73(2):143–58. doi:10.1097/NEN.0000000000000038 PubMed PMID: 24423639.

119. Singh G, Gaidhane A. A Review of Sensorineural Hearing Loss in Congenital Cytomegalovirus Infection. Cureus. 2022 Oct;14(10):e30703. doi:10.7759/cureus.30703 PubMed PMID: 36439580; PubMed Central PMCID: PMC9693817.

120. Britt WJ. Maternal Immunity and the Natural History of Congenital Human Cytomegalovirus Infection. Viruses. 2018 Aug 3;10(8):405. doi:10.3390/v10080405 PubMed PMID: 30081449; PubMed Central PMCID: PMC6116058.

121. Britt WJ. Congenital Human Cytomegalovirus Infection and the Enigma of Maternal Immunity. J Virol. 2017 Aug 1;91(15):e02392-16. doi:10.1128/JVI.02392-16 PubMed PMID: 28490582; PubMed Central PMCID: PMC5512250.

122. Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. N Engl J Med. 2001 May 3;344(18):1366–71. doi:10.1056/NEJM200105033441804 PubMed PMID: 11333993.

123. Cannon MJ, Hyde TB, Schmid DS. Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection. Rev Med Virol. 2011 Jul;21(4):240–55. doi:10.1002/rmv.695 PubMed PMID: 21674676; PubMed Central PMCID: PMC4494736.

124. Boppana SB, Fowler KB, Pass RF, Rivera LB, Bradford RD, Lakeman FD, et al. Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. J Pediatr. 2005 Jun;146(6):817–23. doi:10.1016/j.jpeds.2005.01.059 PubMed PMID: 15973325.

125. Leruez-Ville M, Foulon I, Pass R, Ville Y. Cytomegalovirus infection during pregnancy: state of the science. Am J Obstet Gynecol. 2020 Sep;223(3):330–49. doi:10.1016/j.ajog.2020.02.018 PubMed PMID: 32105678.

126. Zavattoni M, Rustico M, Tassis B, Lombardi G, Furione M, Piralla A, et al. Risk of congenital disease in 46 infected fetuses according to gestational age of primary human cytomegalovirus infection in the mother. J Med Virol. 2016 Jan;88(1):120–6. doi:10.1002/jmv.24313 PubMed PMID: 26118464.

127. Krause PR, Bialek SR, Boppana SB, Griffiths PD, Laughlin CA, Ljungman P, et al. Priorities for CMV vaccine development. Vaccine. 2013 Dec 17;32(1):4–10. doi:10.1016/j.vaccine.2013.09.042 PubMed PMID: 24129123; PubMed Central PMCID: PMC4623576.

128. Kimberlin DW, Lin CY, Sánchez PJ, Demmler GJ, Dankner W, Shelton M, et al. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. J Pediatr. 2003 Jul;143(1):16–25. doi:10.1016/s0022-3476(03)00192-6 PubMed PMID: 12915819.

129. Revello MG, Lazzarotto T, Guerra B, Spinillo A, Ferrazzi E, Kustermann A, et al. A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus. N Engl J Med. 2014 Apr 3;370(14):1316–26. doi:10.1056/NEJMoa1310214 PubMed PMID: 24693891.

130. Teissier N, Fallet-Bianco C, Delezoide AL, Laquerrière A, Marcorelles P, Khung-Savatovsky S, et al. Cytomegalovirus-induced brain malformations in fetuses. J Neuropathol Exp Neurol. 2014 Feb;73(2):2. doi:10.1097/NEN.0000000000000038 PubMed PMID: 24423639.

131. Reddehase MJ, Podlech J, Grzimek NKA. Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol. 2002 Aug;25 Suppl 2:S23-36. doi:10.1016/s1386-6532(02)00087-2 PubMed PMID: 12361754.

132. Powers C, Früh K. Rhesus CMV: an emerging animal model for human CMV. Med Microbiol Immunol (Berl). 2008 Jun;197(2):109–15. doi:10.1007/s00430-007-0073-y PubMed PMID: 18193454; PubMed Central PMCID: PMC2746484.

133. Brizić I, Lisnić B, Krstanović F, Brune W, Hengel H, Jonjić S. Mouse Models for Cytomegalovirus Infections in Newborns and Adults. Curr Protoc. 2022 Sep;2(9):e537. doi:10.1002/cpz1.537 PubMed PMID: 36083111.

134. Britt William, Cekinović Đurđic, Jonjić Stipan. Murine Model of Neonatal Cytomegalovirus Infection. In: Cytomegaloviruses : from molecular pathogenesis to intervention. Caister

Academic Press. [Internet]. 2013 [cited 2026 Aug 24]. Available from: https://www.caister.com/hsp/abstracts/cmv2v2/ii.6.html

135. Kveštak D, Juranić Lisnić V, Lisnić B, Tomac J, Golemac M, Brizić I, et al. NK/ILC1 cells mediate neuroinflammation and brain pathology following congenital CMV infection. J Exp Med. 2021 Feb 25;218(5):5. doi:10.1084/jem.20201503 PubMed PMID: 33630019; PubMed Central PMCID: PMC7918636.

136. Brizić I, Sušak B, Arapović M, Huszthy PC, Hiršl L, Kveštak D, et al. Brain-resident memory CD8+ T cells induced by congenital CMV infection prevent brain pathology and virus reactivation. Eur J Immunol. 2018 Jun;48(6):950–64. doi:10.1002/eji.201847526 PubMed PMID: 29500823; PubMed Central PMCID: PMC6422351.

137. Brizić I, Hiršl L, Britt WJ, Krmpotić A, Jonjić S. Immune responses to congenital cytomegalovirus infection. Microbes Infect. 2018;20(9–10):543–51. doi:10.1016/j.micinf.2017.12.010 PubMed PMID: 29287989; PubMed Central PMCID: PMC6019571.

138. Clancy B, Kersh B, Hyde J, Darlington RB, Anand KJS, Finlay BL. Web-based method for translating neurodevelopment from laboratory species to humans. Neuroinformatics. 2007;5(1):79–94. doi:10.1385/ni:5:1:79 PubMed PMID: 17426354.

139. Sellier Y, Marliot F, Bessières B, Stirnemann J, Encha-Razavi F, Guilleminot T, et al. Adaptive and Innate Immune Cells in Fetal Human Cytomegalovirus-Infected Brains. Microorganisms. 2020 Jan 25;8(2):2. doi:10.3390/microorganisms8020176 PubMed PMID: 31991822; PubMed Central PMCID: PMC7074756.

140. Koontz T, Bralic M, Tomac J, Pernjak-Pugel E, Bantug G, Jonjic S, et al. Altered development of the brain after focal herpesvirus infection of the central nervous system. J Exp Med. 2008 Feb 18;205(2):423–35. doi:10.1084/jem.20071489 PubMed PMID: 18268036; PubMed Central PMCID: PMC2271002.

141. Sung CYW, Seleme MC, Payne S, Jonjic S, Hirose K, Britt W. Virus-induced cochlear inflammation in newborn mice alters auditory function. JCI Insight. 2019 Sep 5;4(17). doi:10.1172/jci.insight.128878 PubMed PMID: 0.

142. Fisher MA, Lloyd ML. A Review of Murine Cytomegalovirus as a Model for Human Cytomegalovirus Disease—Do Mice Lie? Int J Mol Sci. 2020 Dec 28;22(1):1. doi:10.3390/ijms22010214 PubMed PMID: 33379272; PubMed Central PMCID: PMC7795257.

143. Berry R, Watson GM, Jonjic S, Degli-Esposti MA, Rossjohn J. Modulation of innate and adaptive immunity by cytomegaloviruses. Nat Rev Immunol. 2020 Feb;20(2):113–27. doi:10.1038/s41577-019-0225-5 PubMed PMID: 31666730.

144. Krstanović F, Britt WJ, Jonjić S, Brizić I. Cytomegalovirus Infection and Inflammation in Developing Brain. Viruses. 2021 Jun 4;13(6):1078. doi:10.3390/v13061078 PubMed PMID: 34200083; PubMed Central PMCID: PMC8227981.

145. Slavuljica I, Kveštak D, Huszthy PC, Kosmac K, Britt WJ, Jonjić S. Immunobiology of congenital cytomegalovirus infection of the central nervous system—the murine cytomegalovirus model. Cell Mol Immunol. 2015 Mar;12(2):180–91. doi:10.1038/cmi.2014.51 PubMed PMID: 25042632; PubMed Central PMCID: PMC4654296.

146. Kveštak D, Juranić Lisnić V, Lisnić B, Tomac J, Golemac M, Brizić I, et al. NK/ILC1 cells mediate neuroinflammation and brain pathology following congenital CMV infection. J Exp Med. 2021 Feb 25;218(5):e20201503. doi:10.1084/jem.20201503 PubMed PMID: 33630019; PubMed Central PMCID: PMC7918636.

147. Brizić I, Hiršl L, Šustić M, Golemac M, Britt WJ, Krmpotić A, et al. CD4 T cells are required for maintenance of CD8 TRM cells and virus control in the brain of MCMV-infected newborn mice. Med Microbiol Immunol (Berl). 2019 Aug;208(3–4):487–94. doi:10.1007/s00430-019-00601-0 PubMed PMID: 30923899; PubMed Central PMCID: PMC6640853.

148. Kosmac K, Bantug GR, Pugel EP, Cekinovic D, Jonjic S, Britt WJ. Glucocortiocoid Treatment of MCMV Infected Newborn Mice Attenuates CNS Inflammation and Limits Deficits in Cerebellar Development. PLoS Pathog. 2013 Mar 7;9(3):e1003200. doi:10.1371/journal.ppat.1003200 PubMed PMID: 23505367; PubMed Central PMCID: PMC3591306.

149. Seleme MC, Kosmac K, Jonjic S, Britt WJ. Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Recruitment of Inflammatory Mononuclear Cells Leads to Inflammation and Altered Brain Development in Murine Cytomegalovirus-Infected Newborn Mice. J Virol. 2017 Mar 29;91(8):e01983-16. doi:10.1128/JVI.01983-16 PubMed PMID: 28122986; PubMed Central PMCID: PMC5375689.

150. Schwartz M, Stern-Ginossar N. Rethinking human cytomegalovirus latency reservoir. Ann N Y Acad Sci. 2023;1524(1):30–6. doi:10.1111/nyas.14994

151. Pollock JL, Virgin HW. Latency, without persistence, of murine cytomegalovirus in the spleen and kidney. J Virol. 1995 Mar;69(3):1762–8. doi:10.1128/JVI.69.3.1762-1768.1995 PubMed PMID: 7853515; PubMed Central PMCID: PMC188782.

152. Sitnik KM, Krstanović F, Gödecke N, Rand U, Kubsch T, Maaß H, et al. Fibroblasts are a site of murine cytomegalovirus lytic replication and Stat1-dependent latent persistence in vivo. Nat Commun. 2023 May 29;14(1):1. doi:10.1038/s41467-023-38449-x

153. Balthesen M, Messerle M, Reddehase MJ. Lungs are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. J Virol. 1993 Sep;67(9):5360–6. doi:10.1128/JVI.67.9.5360-5366.1993 PubMed PMID: 8394453; PubMed Central PMCID: PMC237936.

154. Belzile JP, Stark TJ, Yeo GW, Spector DH. 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 Apr;88(8):4021–39. doi:10.1128/JVI.03492-13 PubMed PMID: 24453373; PubMed Central PMCID: PMC3993748.

155. Luo MH, Schwartz PH, Fortunato EA. Neonatal neural progenitor cells and their neuronal and glial cell derivatives are fully permissive for human cytomegalovirus infection. J Virol. 2008 Oct;82(20):9994–10007. doi:10.1128/JVI.00943-08 PubMed PMID: 18684829; PubMed Central PMCID: PMC2566273.

156. 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 Jul;76(14):7247–54. doi:10.1128/JVI.76.14.7247-7254.2002 PubMed PMID: 12072524; PubMed Central PMCID: PMC136329.

157. Brizić I, Krstanović F, Mihalić A, Rashidi A, Sitnik K, Ruzsics Z, et al. Neuron-restricted cytomegalovirus latency in the central nervous system regulated by CD4+ T cells and IFN-γ

[Internet]. 2024 [cited 2024 Sep 24]. Available from: https://www.researchsquare.com/article/rs-4944489/v1 doi:10.21203/rs.3.rs-4944489/v1

158. Gale SD, Farrer TJ, Erbstoesser R, MacLean S, Hedges DW. Human Cytomegalovirus Infection and Neurocognitive and Neuropsychiatric Health. Pathogens. 2024 May 16;13(5):417. doi:10.3390/pathogens13050417 PubMed PMID: 38787269; PubMed Central PMCID: PMC11123947.

159. Brecht KF, Goelz R, Bevot A, Krägeloh-Mann I, Wilke M, Lidzba K. Postnatal human cytomegalovirus infection in preterm infants has long-term neuropsychological sequelae. J Pediatr. 2015 Apr;166(4):834-839.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2014.11.002 PubMed PMID: 25466679.

160. Aiello AE, Haan M, Blythe L, Moore K, Gonzalez JM, Jagust W. The influence of latent viral infection on rate of cognitive decline over 4 years. J Am Geriatr Soc. 2006 Jul;54(7):1046–54. doi:10.1111/j.1532-5415.2006.00796.x PubMed PMID: 16866674.

161. Barnes LL, Capuano AW, Aiello AE, Turner AD, Yolken RH, Torrey EF, et al. Cytomegalovirus infection and risk of Alzheimer disease in older black and white individuals. J Infect Dis. 2015 Jan 15;211(2):230–7. doi:10.1093/infdis/jiu437 PubMed PMID: 25108028; PubMed Central PMCID: PMC4326304.

162. Zheng H, Savitz J. Effect of Cytomegalovirus Infection on the Central Nervous System: Implications for Psychiatric Disorders. Curr Top Behav Neurosci. 2023;61:215–41. doi:10.1007/7854_2022_361 PubMed PMID: 35505056.

163. Zheng H, Bergamino M, Ford BN, Kuplicki R, Yeh FC, Bodurka J, et al. Replicable association between human cytomegalovirus infection and reduced white matter fractional anisotropy in major depressive disorder. Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol. 2021 Apr;46(5):928–38. doi:10.1038/s41386-021-00971-1 PubMed PMID: 33500556; PubMed Central PMCID: PMC8115597.

164. Zheng H, Ford BN, Kuplicki R, Burrows K, Hunt PW, Bodurka J, et al. Association between cytomegalovirus infection, reduced gray matter volume, and resting-state functional hypoconnectivity in major depressive disorder: a replication and extension. Transl Psychiatry. 2021 Sep 7;11(1):464. doi:10.1038/s41398-021-01558-6 PubMed PMID: 34493708; PubMed Central PMCID: PMC8423754.

165. Shirts BH, Prasad KM, Pogue-Geile MF, Dickerson F, Yolken RH, Nimgaonkar VL. Antibodies to cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus 1 associated with cognitive function in schizophrenia. Schizophr Res. 2008 Dec;106(2–3):268–74. doi:10.1016/j.schres.2008.07.017 PubMed PMID: 18801645; PubMed Central PMCID: PMC2615667.

166. Houenou J, d'Albis MA, Daban C, Hamdani N, Delavest M, Lepine JP, et al. Cytomegalovirus seropositivity and serointensity are associated with hippocampal volume and verbal memory in schizophrenia and bipolar disorder. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2014 Jan 3;48:142–8. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.09.003 PubMed PMID: 24083998.

167. Vivek S, Nelson HH, Prizment AE, Faul J, Crimmins EM, Thyagarajan B. Cross sectional association between cytomegalovirus seropositivity, inflammation and cognitive impairment in elderly cancer survivors. Cancer Causes Control CCC. 2022 Jan;33(1):81–90. doi:10.1007/s10552-021-01504-3 PubMed PMID: 34637066; PubMed Central PMCID: PMC8840815.

168. Jordan S, Krause J, Prager A, Mitrovic M, Jonjic S, Koszinowski UH, et al. 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 Oct;85(19):10346–53. doi:10.1128/JVI.00545-11 PubMed PMID: 21813614; PubMed Central PMCID: PMC3196435.

169. Sampaio KL, 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 Nov;63(5):205–14. doi:10.2144/000114606

170. Simon CO, Seckert CK, Dreis D, Reddehase MJ, Grzimek NKA. Role for Tumor Necrosis Factor Alpha in Murine Cytomegalovirus Transcriptional Reactivation in Latently Infected Lungs. J Virol. 2005 Jan;79(1):326–40. doi:10.1128/JVI.79.1.326-340.2005 PubMed PMID: 15596827; PubMed Central PMCID: PMC538715.

171. Vichaya EG, Malik S, Sominsky L, Ford BG, Spencer SJ, Dantzer R. Microglia depletion fails to abrogate inflammation-induced sickness in mice and rats. J Neuroinflammation. 2020 May 31;17(1):172. doi:10.1186/s12974-020-01832-2 PubMed PMID: 32475344; PubMed Central PMCID: PMC7262755.

172. Pitulescu ME, Schmidt I, Benedito R, Adams RH. Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. Nat Protoc. 2010 Sep;5(9):9. doi:10.1038/nprot.2010.113 PubMed PMID: 20725067.

173. Jahn HM, Kasakow CV, Helfer A, Michely J, Verkhratsky A, Maurer HH, et al. Refined protocols of tamoxifen injection for inducible DNA recombination in mouse astroglia. Sci Rep. 2018 Apr 12;8(1):1. doi:10.1038/s41598-018-24085-9

174. Polić B, Hengel H, Krmpotić A, Trgovcich J, Pavić I, Luccaronin P, et al. Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. J Exp Med. 1998 Sep 21;188(6):1047–54. doi:10.1084/jem.188.6.1047 PubMed PMID: 9743523; PubMed Central PMCID: PMC2212537.

175. Bantug GRB, Cekinovic D, Bradford R, Koontz T, Jonjic S, Britt WJ. CD8+ T-LYMPHOCYTES CONTROL MCMV REPLICATION IN THE CNS OF NEWBORN ANIMALS. J Immunol Baltim Md 1950. 2008 Aug 1;181(3):2111–23. PubMed PMID: 18641350; PubMed Central PMCID: PMC4161464.

176. Batiuk MY, de Vin F, Duqué SI, Li C, Saito T, Saido T, et al. An immunoaffinity-based method for isolating ultrapure adult astrocytes based on ATP1B2 targeting by the ACSA-2 antibody. J Biol Chem. 2017 May 26;292(21):8874–91. doi:10.1074/jbc.M116.765313

177. Rashidi AS, Tran DN, Peelen CR, van Gent M, Ouwendijk WJD, Verjans GMGM. Herpes simplex virus infection induces necroptosis of neurons and astrocytes in human fetal organotypic brain slice cultures. J Neuroinflammation. 2024 Feb 1;21(1):38. doi:10.1186/s12974-024-03027-5 PubMed PMID: 38302975; PubMed Central PMCID: PMC10832279.

178. Holt LM, Stoyanof ST, Olsen ML. Magnetic Cell Sorting for In Vivo and In Vitro Astrocyte, Neuron, and Microglia Analysis. Curr Protoc Neurosci. 2019 Jun;88(1):e71. doi:10.1002/cpns.71 PubMed PMID: 31216394; PubMed Central PMCID: PMC6653683.

179. Rožmanić C, Lisnić B, Pribanić Matešić M, Mihalić A, Hiršl L, Park E, et al. Perinatal murine cytomegalovirus infection reshapes the transcriptional profile and functionality of NK cells. Nat Commun. 2023 Oct 12;14(1):1. doi:10.1038/s41467-023-42182-w

180. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics. 2013 Jan;29(1):15. doi:10.1093/bioinformatics/bts635 PubMed PMID: 23104886.

181. Dobin A, Gingeras TR. Mapping RNA-seq Reads with STAR. Curr Protoc Bioinforma Ed Board Andreas Baxevanis Al. 2015 Sep 3;51:11.14.1-11.14.19. doi:10.1002/0471250953.bi1114s51 PubMed PMID: 26334920; PubMed Central PMCID: PMC4631051.

182. Zheng GXY, Terry JM, Belgrader P, Ryvkin P, Bent ZW, Wilson R, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. Nat Commun. 2017 Jan 16;8:14049. doi:10.1038/ncomms14049 PubMed PMID: 28091601; PubMed Central PMCID: PMC5241818.

183. Fleming SJ, Chaffin MD, Arduini A, Akkad AD, Banks E, Marioni JC, et al. Unsupervised removal of systematic background noise from droplet-based single-cell experiments using CellBender. Nat Methods. 2023 Sep;20(9):1323–35. doi:10.1038/s41592-023-01943-7 PubMed PMID: 37550580.

184. Bernstein NJ, Fong NL, Lam I, Roy MA, Hendrickson DG, Kelley DR. Solo: Doublet Identification in Single-Cell RNA-Seq via Semi-Supervised Deep Learning. Cell Syst. 2020 Jul 22;11(1):95-101.e5. doi:10.1016/j.cels.2020.05.010

185. Wolf FA, Angerer P, Theis FJ. SCANPY: large-scale single-cell gene expression data analysis. Genome Biol. 2018 Feb 6;19:15. doi:10.1186/s13059-017-1382-0 PubMed PMID: 29409532; PubMed Central PMCID: PMC5802054.

186. Gayoso A, Lopez R, Xing G, Boyeau P, Valiollah Pour Amiri V, Hong J, et al. A Python library for probabilistic analysis of single-cell omics data. Nat Biotechnol. 2022 Feb;40(2):163–6. doi:10.1038/s41587-021-01206-w

187. Virshup I, Bredikhin D, Heumos L, Palla G, Sturm G, Gayoso A, et al. The scverse project provides a computational ecosystem for single-cell omics data analysis. Nat Biotechnol. 2023 May;41(5):604–6. doi:10.1038/s41587-023-01733-8

188. Domínguez Conde C, Xu C, Jarvis L, Rainbow D, Wells S, Gomes T, et al. Cross-tissue immune cell analysis reveals tissue-specific features in humans. Science. 2022 May 13;376(6594):eabl5197. doi:10.1126/science.abl5197 PubMed PMID: 35549406; PubMed Central PMCID: PMC7612735.

189. Hao Y, Stuart T, Kowalski M, Choudhary S, Hoffman P, Hartman A, et al. Dictionary learning for integrative, multimodal, and massively scalable single-cell analysis. Nat Biotechnol. 2024 Feb;42(2):293. doi:10.1038/s41587-023-01767-y PubMed PMID: 37231261.

190. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan LD, François R, et al. Welcome to the Tidyverse. J Open Source Softw. 2019 Nov 21;4(43):1686. doi:10.21105/joss.01686

191. Tan YL, Yuan Y, Tian L. Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. Mol Psychiatry. 2020 Feb;25(2):2. doi:10.1038/s41380-019-0609-8

192. Ximerakis M, Lipnick SL, Innes BT, Simmons SK, Adiconis X, Dionne D, et al. Single-cell transcriptomic profiling of the aging mouse brain. Nat Neurosci. 2019 Oct;22(10):1696–708. doi:10.1038/s41593-019-0491-3 PubMed PMID: 31551601.

193. Hammond TR, Dufort C, Dissing-Olesen L, Giera S, Young A, Wysoker A, et al. Single cell RNA sequencing of microglia throughout the mouse lifespan and in the injured brain reveals

complex cell-state changes. Immunity. 2019 Jan 15;50(1):253-271.e6. doi:10.1016/j.immuni.2018.11.004 PubMed PMID: 30471926; PubMed Central PMCID: PMC6655561.

194. D F, Rc H. Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections. Drugs. 1990 Apr;39(4). doi:10.2165/00003495-199039040-00008 PubMed PMID: 2161731.

195. Cekinović Đ, Golemac M, Pugel EP, Tomac J, Čičin-Šain L, Slavuljica I, et al. Passive Immunization Reduces Murine Cytomegalovirus-Induced Brain Pathology in Newborn Mice. J Virol. 2008 Dec;82(24):12172–80. doi:10.1128/JVI.01214-08 PubMed PMID: 18842707; PubMed Central PMCID: PMC2593357.

196. Schwabenland M, Mossad O, Sievert A, Peres AG, Ringel E, Baasch S, et al. Neonatal immune challenge poses a sex-specific risk for epigenetic microglial reprogramming and behavioral impairment. Nat Commun. 2023 May 11;14(1):1. doi:10.1038/s41467-023-38373-0

197. Ivashkiv LB. IFNγ: signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. Nat Rev Immunol. 2018 Sep;18(9):545–58. doi:10.1038/s41577-018-0029-z PubMed PMID: 29921905; PubMed Central PMCID: PMC6340644.

198. Divangahi M, Aaby P, Khader SA, Barreiro LB, Bekkering S, Chavakis T, et al. Trained immunity, tolerance, priming and differentiation: distinct immunological processes. Nat Immunol. 2021 Jan;22(1):2–6. doi:10.1038/s41590-020-00845-6

199. Xu Z, Rao Y, Huang Y, Zhou T, Feng R, Xiong S, et al. Efficient Strategies for Microglia Replacement in the Central Nervous System. Cell Rep. 2020 Aug 11;32(6):108041. doi:10.1016/j.celrep.2020.108041

200. Tao-Cheng JH, Thein S, Yang Y, Reese TS, Gallant PE. Homer is concentrated at the postsynaptic density and does not redistribute after acute synaptic stimulation. Neuroscience. 2014 Apr 25;266:80–90. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.01.066 PubMed PMID: 24530450; PubMed Central PMCID: PMC3998121.

201. Gabele L, Bochow I, Rieke N, Sieben C, Michaelsen-Preusse K, Hosseini S, et al. H7N7 Viral Infection Elicits Pronounced, Sex-Specific Neuroinflammatory Responses in vitro. Front Cell Neurosci. 2024 Jul 18;18. doi:10.3389/fncel.2024.1444876

202. Pozo K, Goda Y. Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. Neuron. 2010 May 13;66(3):337–51. doi:10.1016/j.neuron.2010.04.028 PubMed PMID: 20471348; PubMed Central PMCID: PMC3021747.

203. Korte M, Schmitz D. Cellular and System Biology of Memory: Timing, Molecules, and Beyond. Physiol Rev. 2016 Apr;96(2):647–93. doi:10.1152/physrev.00010.2015 PubMed PMID: 26960344.

204. Waltl I, Kalinke U. Beneficial and detrimental functions of microglia during viral encephalitis. Trends Neurosci. 2022 Feb 1;45(2):158–70. doi:10.1016/j.tins.2021.11.004

205. Fowler K, Mucha J, Neumann M, Lewandowski W, Kaczanowska M, Grys M, et al. A systematic literature review of the global seroprevalence of cytomegalovirus: possible implications for treatment, screening, and vaccine development. BMC Public Health. 2022 Sep 1;22(1):1659.

doi:10.1186/s12889-022-13971-7 PubMed PMID: 36050659; PubMed Central PMCID: PMC9435408.

206. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Moura Britto RM, de Lima Isaac M, de Carvalho e Oliveira PF, Boppana S, et al. Birth Prevalence and Natural History of Congenital Cytomegalovirus (CMV) Infection in a Highly Seroimmune Population. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2009 Aug 15;49(4):522–8. doi:10.1086/600882 PubMed PMID: 19583520; PubMed Central PMCID: PMC2778219.

207. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The "Silent" Global Burden of Congenital Cytomegalovirus. Clin Microbiol Rev. 2013 Jan;26(1):86–102. doi:10.1128/CMR.00062-12 PubMed PMID: 23297260; PubMed Central PMCID: PMC3553672.

208. Lisnić B, Tomac J, Cekinović D, Jonjić S, Juranić Lisnić V. Rodent Models of Congenital Cytomegalovirus Infection. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2021;2244:365–401. doi:10.1007/978-1-0716-1111-1_18 PubMed PMID: 33555596.

209. Vidal-Itriago A, Radford RAW, Aramideh JA, Maurel C, Scherer NM, Don EK, et al. Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS. Front Immunol. 2022 Oct 19;13:997786. doi:10.3389/fimmu.2022.997786 PubMed PMID: 36341385; PubMed Central PMCID: PMC9627549.

210. Louveau A, Harris TH, Kipnis J. Revisiting the concept of CNS immune privilege. Trends Immunol. 2015 Oct;36(10):569–77. doi:10.1016/j.it.2015.08.006 PubMed PMID: 26431936; PubMed Central PMCID: PMC4593064.

211. Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger JM. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. Nat Rev Immunol. 2005 Oct;5(10):793–806. doi:10.1038/nri1708

212. Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. Nat Rev Immunol. 2020 Jun;20(6):6. doi:10.1038/s41577-020-0285-6

213. Chhatbar C, Detje CN, Grabski E, Borst K, Spanier J, Ghita L, et al. Type I Interferon Receptor Signaling of Neurons and Astrocytes Regulates Microglia Activation during Viral Encephalitis. Cell Rep. 2018 Oct 2;25(1):1. doi:10.1016/j.celrep.2018.09.003 PubMed PMID: 30282022; PubMed Central PMCID: PMC7103936.

214. Frigerio CS, Wolfs L, Fattorelli N, Thrupp N, Voytyuk I, Schmidt I, et al. The Major Risk Factors for Alzheimer's Disease: Age, Sex, and Genes Modulate the Microglia Response to Aβ Plaques. Cell Rep. 2019 Apr 23;27(4):1293-1306.e6. doi:10.1016/j.celrep.2019.03.099 PubMed PMID: 31018141; PubMed Central PMCID: PMC7340153.

215. Hosking MP, Lane TE. The Role of Chemokines during Viral Infection of the CNS. PLoS Pathog. 2010 Jul 29;6(7):7. doi:10.1371/journal.ppat.1000937 PubMed PMID: 20686655; PubMed Central PMCID: PMC2912390.

216. Thapa M, Welner RS, Pelayo R, Carr DJJ. CXCL9 and CXCL10 expression are critical for control of genital herpes simplex virus type 2 infection through mobilization of HSV-specific CTL and NK cells to the nervous system. J Immunol Baltim Md 1950. 2008 Jan 15;180(2):2. PubMed PMID: 18178850; PubMed Central PMCID: PMC2185792.

217. Trifilo MJ, Montalto-Morrison C, Stiles LN, Hurst KR, Hardison JL, Manning JE, et al. CXC Chemokine Ligand 10 Controls Viral Infection in the Central Nervous System: Evidence for a Role in Innate Immune Response through Recruitment and Activation of Natural Killer Cells. J Virol. 2004 Jan;78(2):2. doi:10.1128/JVI.78.2.585-594.2004 PubMed PMID: 14694090; PubMed Central PMCID: PMC368822.

218. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. Nat Neurosci. 2021 Mar;24(3):312–25. doi:10.1038/s41593-020-00783-4

219. Soung A, Klein RS. Viral Encephalitis and Neurologic Diseases: Focus on Astrocytes. Trends Mol Med. 2018 Nov;24(11):950–62. doi:10.1016/j.molmed.2018.09.001 PubMed PMID: 30314877; PubMed Central PMCID: PMC6546292.

220. Cizeron M, Qiu Z, Koniaris B, Gokhale R, Komiyama NH, Fransén E, et al. A brainwide atlas of synapses across the mouse life span. Science. 2020 Jul 17;369(6501):270–5. doi:10.1126/science.aba3163 PubMed PMID: 32527927; PubMed Central PMCID: PMC7115813.

221. Yang G, Xu X, Gao W, Wang X, Zhao Y, Xu Y. Microglia-orchestrated neuroinflammation and synaptic remodeling: roles of pro-inflammatory cytokines and receptors in neurodegeneration. Front Cell Neurosci. 19:1700692. doi:10.3389/fncel.2025.1700692 PubMed PMID: 41292555; PubMed Central PMCID: PMC12641016.

222. Whitelaw BS. Microglia-mediated synaptic elimination in neuronal development and disease. J Neurophysiol. 2018 Jan 1;119(1):1–4. doi:10.1152/jn.00021.2017 PubMed PMID: 28835520; PubMed Central PMCID: PMC5866459.

223. Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, et al. Complement and Microglia Mediate Early Synapse Loss in Alzheimer Mouse Models. Science. 2016 May 6;352(6286):6286. doi:10.1126/science.aad8373 PubMed PMID: 27033548; PubMed Central PMCID: PMC5094372.

224. Song Q, Fan C, Wang P, Li Y, Yang M, Yu SY. Hippocampal CA1 βCaMKII mediates neuroinflammatory responses via COX-2/PGE2 signaling pathways in depression. J Neuroinflammation. 2018 Dec 8;15:338. doi:10.1186/s12974-018-1377-0 PubMed PMID: 30526621; PubMed Central PMCID: PMC6286788.

225. Lana D, Ugolini F, Giovannini MG. An Overview on the Differential Interplay Among Neurons-Astrocytes-Microglia in CA1 and CA3 Hippocampus in Hypoxia/Ischemia. Front Cell Neurosci. 2020;14:585833. doi:10.3389/fncel.2020.585833 PubMed PMID: 33262692; PubMed Central PMCID: PMC7686560.

226. Huo A, Wang J, Li Q, Li M, Qi Y, Yin Q, et al. Molecular mechanisms underlying microglial sensing and phagocytosis in synaptic pruning. Neural Regen Res. 2023 Sep 22;19(6):1284–90. doi:10.4103/1673-5374.385854 PubMed PMID: 37905877; PubMed Central PMCID: PMC11467947.

227. Eyo U, Molofsky AV. Defining microglial-synapse interactions. Science. 2023 Sep 15;381(6663):1155–6. doi:10.1126/science.adh7906 PubMed PMID: 37708287.

228. Pereira-Iglesias M, Maldonado-Teixido J, Melero A, Piriz J, Galea E, Ransohoff RM, et al. Microglia as hunters or gatherers of brain synapses. Nat Neurosci. 2025 Jan;28(1):15–23. doi:10.1038/s41593-024-01818-w

229. Chakrabarty P, Ceballos-Diaz C, Beccard A, Janus C, Dickson D, Golde TE, et al. IFN-γ Promotes Complement Expression and Attenuates Amyloid Plaque Deposition in Amyloid β Precursor Protein Transgenic Mice. J Immunol. 2010 May 1;184(9):9. doi:10.4049/jimmunol.0903382

230. Roy ER, Wang B, Wan YW, Chiu G, Cole A, Yin Z, et al. Type I interferon response drives neuroinflammation and synapse loss in Alzheimer disease. J Clin Invest. 2020 Apr 1;130(4):1912–30. doi:10.1172/JCI133737 PubMed PMID: 31917687; PubMed Central PMCID: PMC7108898.

231. Kaya T, Mattugini N, Liu L, Ji H, Cantuti-Castelvetri L, Wu J, et al. CD8+ T cells induce interferon-responsive oligodendrocytes and microglia in white matter aging. Nat Neurosci. 2022 Nov;25(11):11. doi:10.1038/s41593-022-01183-6

232. Deczkowska A, Matcovitch-Natan O, Tsitsou-Kampeli A, Ben-Hamo S, Dvir-Szternfeld R, Spinrad A, et al. Mef2C restrains microglial inflammatory response and is lost in brain ageing in an IFN-I-dependent manner. Nat Commun. 2017 Sep 28;8(1):717. doi:10.1038/s41467-017-00769-0 PubMed PMID: 28959042; PubMed Central PMCID: PMC5620041.

233. Wendimu MY, Hooks SB. Microglia Phenotypes in Aging and Neurodegenerative Diseases. Cells. 2022 Jun 30;11(13):13. doi:10.3390/cells11132091 PubMed PMID: 35805174; PubMed Central PMCID: PMC9266143.

234. Cheeran MCJ, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of Congenital Cytomegalovirus Infection: Disease Mechanisms and Prospects for Intervention. Clin Microbiol Rev. 2009 Jan;22(1):99–126. doi:10.1128/CMR.00023-08 PubMed PMID: 19136436; PubMed Central PMCID: PMC2620634.

235. Griffiths P, Reeves M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. Nat Rev Microbiol. 2021 Dec;19(12):12. doi:10.1038/s41579-021-00582-z PubMed PMID: 34168328; PubMed Central PMCID: PMC8223196.

236. Ribalta T, Martinez AJ, Jares P, Muntané J, Miquel R, Claramonte X, et al. Presence of occult cytomegalovirus infection in the brain after orthotopic liver transplantation. An autopsy study of 83 cases. Virchows Arch Int J Pathol. 2002 Feb;440(2):166–71. doi:10.1007/s004280100497 PubMed PMID: 11964047.

237. Zheng H, Webster MJ, Weickert CS, Beasley CL, Paulus MP, Yolken RH, et al. Cytomegalovirus antibodies are associated with mood disorders, suicide, markers of neuroinflammation, and microglia activation in postmortem brain samples. Mol Psychiatry. 2023 Jun 30;1–11. doi:10.1038/s41380-023-02162-4

8. ILUSTRACIJE

8.1. POPIS SLIKA

Slika 1. Uloga mikroglije i astrocita u virusnim infekcijama SŽS-a.

Slika 2. Imunološki odgovor na prirođenu infekciju MCMV-om u mozgu.

Slika 3. Akutna infekcija MCMV-om uzrokuje aktivaciju mikroglije i izražaj MHC-II molekula.

Slika 4. Prirođena infekcija HCMV-om dovodi do izražaja HLA-DR (MHC-II) na mikrogliji, ovisno o IFN-γ.

Slika 5. Latentna infekcija MCMV-om u mozgu perinatalno inficiranih miševa.

Slika 6. Analiza citokina i kemokina u mozgovima latentno inficiranim MCMV-om.

Slika 7. Dugotrajna aktivacija mikroglije i izražaj molekula MHC tijekom latencije MCMV-a u mozgu.

Slika 8. Mikroglija ispoljava najviše razine MHC molekula u hipokampusu tijekom latencije MCMV-a.

Slika 9. Povećana gustoća mikroglije u hipokampusu tijekom latencije MCMV-a.

Slika 10. Mikroglija u CA1 regiji hipokampusa pokazuje razgranatu morfologiju tijekom latencije MCMV-a u mozgu.

Slika 11. Dugotrajna aktivacija je specifično obilježje mikroglije tijekom latencije MCMV-a.

Slika 12. Mikroglija je transkripcijski promijenjena tijekom latencije MCMV-a u mozgu.

Slika 13. Snažan protuvirusni fenotip mikroglije tijekom latencije MCMV-a u mozgu.

Slika 14. Mikroglije nisu mjesto latencije MCMV-a u mozgu.

Slika 15. Latencija MCMV-om dovodi do razvoja proupalne subpopulacije mikroglije, dok astrociti zadržavaju homeostatska obilježja.

Slika 16. Rani protuvirusni tretman smanjuje količinu virusa i upalu u mozgu, čak i tijekom latencije.

Slika 17. Odgoda ranog protuvirusnog tretmana tijekom perinatalnog razdoblja djelomično utječe na upalu u mozgu.

Slika 18. Protuvirusni tretman započet tijekom latencije MCMV-a nema učinkovitosti na smanjenje upale u mozgu.

Slika 19. Ifngr1 je potreban za izražaj molekula MHC-II na mikrogliji tijekom infekcije MCMV-om.

Slika 20. Kontinuirana signalizacija posredovana citokinom IFN-γ na mikrogliji je ključna za održavanje izražaja MHC-II tijekom latencije MCMV-a u mozgu.

Slika 21. IFN-γ proizveden u mozgu održava dugotrajnu aktivaciju mikroglije i izražaj MHC-II tijekom latencije MCMV-a.

Slika 22. Virus-specifični CD8 limfociti TRM su glavni izvor citokina IFN-γ u latentno inficiranim mozgovima.

Slika 23. Dugotrajno aktivirana mikroglija ima ključnu ulogu u nadzoru latentnog i reaktivirajućeg virusa.

Slika 24. Signalizacija posredovana citokinom IFN-γ na mikrogliji je važna za nadzor latentnog virusa u mozgu.

Slika 25. Dugotrajno aktivirana mikroglija povećano fagocitira sinaptičke završetake u regiji CA1 hipokampusa tijekom latencije MCMV-a.

Slika 26. Aktivirana mikroglija pridonosi gubitku dendritičkih spina u regiji CA1 hipokampusa tijekom latencije MCMV-a.

Slika 27. Dugotrajno aktivirana mikroglija pridonosi promjenama sinaptičke plastičnosti neurona u regiji CA1 hipokampusa tijekom latencije MCMV-a.

Slika 28. Latentno inficirani miševi soja C57BL/6 pokazuju blagi deficit u kognitivnim sposobnostima.

Slika 29. Latentno inficirani miševi soja BALB/c pokazuju blagi deficit u kognitivnim sposobnostima.

Slika 30. Uklanjanje mikroglije tijekom latencije MCMV-a dovodi do poboljšanja kognitivnih sposobnosti miševa.

8.2. POPIS TABLICA

Tablica 2. Popis korištenih mišjih sojeva

Tablica 2. Informacije o humanim uzorcima fetalnog tkiva korišteni u sklopu ovog rada

Tablica 3. Mediji, otopine i reagensi korišteni u sklopu izrade doktorskog rada

Tablica 4. Otopine i reagensi potrebni za izolaciju DNA iz tkiva (repova)

Tablica 5. Puferi i reagensi za agaroznu gel elektroforezu

Tablica 6. Reagensi potrebni za lančanu reakciju polimerazom i kvantitativni PCR

Tablica 7. Slijed nukleotida početnica koje su korištene za određivanje genotipa miševa

Tablica 8. Slijed nukleotida početnica i probe koje su korištene za kvantitativni PCR

Tablica 9. Popis protutijela korištenih u protočnoj citometriji i imunofluorescenciji

Tablica 10. Popis blokirajućeg protutijela, inhibitora i protuvirusnog lijeka.

Tablica 3. Citokini i reagensi za stimulaciju

Tablica 4. Reagensi za protočnu citometriju i imunofluorescenciju korišteni u izradi doktorskog rada.

Tablica 13. Križanja miševa određenih genotipa, provedena u svrhu dobivanja Sall1Cre^{ERT2}Ifngr1$^{fl/fl}$ miševa

Tablica 14. Uvjeti reakcije i program, korišteni za dokazivanje Sall1Cre alela

Tablica 15. Uvjeti i program reakcije korištene za dokazivanje Ifngr1$^{fl/fl}$ alela

Tablica 16. Program reakcije za sintezu cDNA.

Tablica 17. Program reakcije za detekciju virusnog genoma M86

Tablica 18. Program reakcije za detekciju virusnog genoma gB

8.3. POPIS POKRATA

ACSF – umjetna cerebrospinalna tekućina (engl. *artificial cerebrospinal fluid*)

ACV – aciklovir (engl. *acyclovir*)

ACSA-2 - površinski antigen astrocita 2 (engl. *Astrocyte Cell Surface Antigen-2*)

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

ANOVA – analiza varijance (engl. *Analysis of Variance*)

ALS - amiotrofična lateralna skleroza (engl. *amyotrophic lateral sclerosis*)

APOE-ε4 – apolipoprotein E (engl. *apolipoprotein E*)

BAC – bakterijski umjetni kromosom (engl. *bacterial artificial chromosome*)

BAFF - čimbenik preživljenja limfocita B (engl. *B-cell activating factor*)

BDNF - neurotropni faktor koji potiče iz mozga (engl. *brain-derived neurotrophic factor*)

BSA - goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*)

CA – Ammonov rog (engl. *Cornu Ammonis*)

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

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

CMV - Citomegalovirus (engl. *cytomegalovirus*)

CSF1 – čimbenik stimulacije kolonija 1 (engl. *Colony-stimulating factor 1*)

CXCL9/10 - CXC-kemokinski ligand 9/10 (engl. *C-X-C motif chemokine ligand 9/10*)

Cq – kvantifikacijski ciklusi (engl. *quantification cycle*)

DAPI - 4′,6-diamidino-2-fenilindol (engl. *4′,6-diamidino-2-phenylindole*)

DE – diferencijalno ispoljeni (engl. *differentialy expressed*)

DG - dentatni girus (engl. *dentate gyrus*)

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

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic Acid*)

EAE - eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (engl. *experimental autoimmune encephalomyelitis*)

EBV - Epstein-Barr virus

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

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

FACS - fluorescencijom aktivirano sortiranje stanica (engl. *fluorescence-activated cell sorting*)

fEPSP - Ekscitacijski postsinaptički potencijali (engl. *field excitatory postsynaptic potential*)

FCS - fetalni teleći serum (engl. *Fetal Calf Serum*)

FOV – vidno polje (engl. *field of view*)

gB – glikoprotein B (engl. *glycoprotein B*)

GCV – ganciklovir (engl. *ganciclovir*)

G-CSF - granulocitni čimbenik koji stimulira stvaranje kolonija (engl. *granulocyte colony-stimulating factor*)

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

GM-CSF – granulocitni makrofagni čimbenik koji stimulira stvaranje kolonija (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

GNP - granularni neuronski prekursori (engl. *granule neuron precursor cells*)

GO-ORA - analiza prekomjerne zastupljenosti gena prema genskoj ontologiji (engl. *Gene Ontology Over-Representation Analysis*)

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

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

HHV - humani herpesvirus (engl. *Human herpes virus*)

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

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

HLA-DR - humani leukocitni antigen DR (engl*. Human Leukocyte Antigen–DR*)

HPC - hematopoetske progenitorske stanicame (engl. *Hematopoietic progenitor cells*)

HSV-1 - herpes simpleks virus 1 (engl. *Herpes simplex virus 1*)

IAV – virus Influenca tip A (engl. *Influenza virus A*)

IBA-1 - adaptorska molekula 1 koja veže ionizirani kalcij (engl. *Ionized calcium-binding adaptor molecule 1*)

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

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

i.p.- Intraperitonealno (engl. *intraperitoneal*)

IP-10 – interferonom gama potaknuti protein 10 (engl. *Interferon gamma-induced protein 10*)

i.v.- Intravenozno (engl. *intravenous*)

IFN-I – interferoni tipa I (engl. *type I interferons*)

IFN-II – interferoni tipa II (engl. *type II interferons*)

IFN-β – interferon beta (engl. *interferon beta*)

IFNGR1 - receptor za IFN-γ (engl. *interferon gamma receptor 1)*

IFN-γ - interferon gama (engl. interferon gamma)

IGF1 - inzulin-slični faktor rasta (engl. IGF1, *insulin-like growth factor 1*)

IGL - unutarnji zrnati sloj (engl. IGL, *inner granular layer*)

IL- Interleukin

JEV - virus Japanskog encefalitisa (engl. *Japanese encephalitis virus*)

LAMP-1 – lizosomalni membranski protein 1 (engl. *lysosome-associated membrane protein 1*)

LAT - transkripti povezani sa latencijom (engl. *latency-associated transcripts*)

LCMV - limfocitni koriomeningitis (engl. Lymphocytic choriomeningitis)

LTP - dugotrajna potencijacija (engl. *long-term potentiation*)

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

MCK-2 - kemokin-nalik protein MCK-2 (engl. *MCMV-encoded chemokine 2*)

M-CSF – makrofagni čimbenik koji stimulira stvaranje kolonija (engl. *macrophage colony-stimulating factor*)

MCP-1 - monocitni kemotaktički protein-1 (engl. *Monocyte Chemoattractant Protein 1*)

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

MerTK - Mer tirozin-kinaza (engl. *Mer tyrosine kinase*)

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

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

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

NGF - faktor rasta živaca (engl. *nerve growth factor*)

NO - dušikov oksid (engl. *nitric oxide*)

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

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

PCA - analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*)

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

PD – Parkinsonova bolest (engl. *Parkinson's disease*)

PFA – paraformaldehid (engl. *paraformaldehyde*)

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

PMA – forbol miristat acetat (engl. *phorbol myristate acetate*)

PND - postnatalni dan (engl. *postnatal day*)

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

PTSD - post-traumatski poremećaj stresa (engl. *post-traumatic stress disorder*)

RANTES – reguliran nakon aktivacije, eksprimiran i izlučen u normalnim T-stanicama (engl. *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*)

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *Ribonucleic Acid*)

ROS - reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen species*)

RPMI - engl*. Roswell Park Memorial Institute Medium*)

qPCR - kvantitativni PCR (engl. *quantitative PCR*)

qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *quantitative polymerase chain reaction*)

scRNAseq – sekvencioniranje na razini pojedinačnih stanica (engl. *single-cell RNA sequencing*)

SEM - standardna pogreška srednje vrijednosti (engl. *Standard Error of the Mean*)

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

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

SPF - uvjeti bez prisutnosti specifičnih patogena (engl. *Specific Pathogen Free*)

STING - stimulator gena interferona (engl. *stimulator of interferon genes*)

SŽS - središnji živčani sustav (engl. *central nervous system*)

TAE - Tris-acetatni pufer (engl. *Tris-Acetate-EDTA*)

TAM – tamoksifen (engl*. tamoxifen*)

TBI – traumatska ozlijeda mozga (engl. *traumatic brain injury*)

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

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

TREM2 - aktivirajući receptor 2 na mijeloidnim stanicama (engl. *triggering receptor expressed on myeloid cells 2)*

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

UMAP - uniformna aproksimacija i projekcija mnogostrukosti (engl. *Uniform Manifold Approximation and Projection*)

VZV- Varičela zoster virus (engl. *Varicella zoster virus*)

VSV - virus vezikularnog stomatitisa (engl. *vesicular stomatitis virus*)

WNV – virus Zapadnog Nila (engl. *West Nile virus*)

WT – divlji soj (engl. *wild type*)

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

IME I PREZIME: Andrea Mihalić

DATUM ROĐENJA: 05.10.1995.

ADRESA: Kvarnerska 3, 51523 Baška, Otok Krk

ELEKTRONIČKA POŠTA: andrea.mihalic@uniri.hr; andreamihalic1@gmail.com

TELEFON: + 385 51 554-263

ŠKOLOVANJE

2019. *mag. biotech. in med*., Magistra biotehnologije u medicini – „Razvoj monoklonskih protutijela i upotreba transfeciranih staničnih linija za proučavanje biologije staničnog prionskog proteina prpc (prion protein cellular)“ (Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Rijeka; diplomski studij „Biotehnologija u medicini“)

2017. *univ. bacc. biotech. et pharm. inv*, Sveučilišna prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova - „Novi interakcijski partneri: PI3P i protein kinaza A“ (Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Rijeka; preddiplomski studij 2014.-2017. „Biotehnologija i istraživanje lijekova“

RADNO ISKUSTVO

2019. - sad – Centar za proteomiku, Medicinski fakultet u Rijeci, Sveučilište u Rijeci; radno mjesto: asistent doktorant na projektu

USAVRŠAVANJA

- 2020. i 2021. Boravak u vanjskim institucijama u svrhu znanstvenog usavršavanja (Helmholtz Centar za infektivne bolesti, Braunschweig), sveukupno provedeno 2 mjeseca

SUDJELOVANJE NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

1. EMBO virtual Workshop: Microglia 2021 (28.-29.10.2021.); Poster prezentacija

2. Internacionalni simpozij „Immune control and its evasion by CMV and other DNA viruses“, 1st joint international symposium, Dubrovnik (Cavtat), 22.-24.06.2022.; Poster prezentacija

3. Simpozij „Cell Symposia: The Neuro Immune Axis“; Lisbon, Portugal (11.-13.09.2022.); Poster prezentacija

4. Godišnji skup Hrvatskog Imunološkog društva (HID), Sv. Martin na Muri 06.10.2022. - 08.10.2022.; Usmena prezentacija

5. Europski virološki kongres 8th European Congress of Virology, Gdansk, Poland, 04.05.2023. - 07.05.2023**.;** Usmena prezentacija

6. “Science and Us”, the 2nd Biomedicine and Health PhD Students Congress Faculty of Medicine University of Rijeka, Croatia (16. - 18.5.2024.); Usmena prezentacija

7. Godišnji skup Hrvatskog Imunološkog društva (HID), Hotel Panonija, Sisak (11.-13.10.2024.); Poster prezentacija

8. 49th Annual International Herpesvirus Workshop (IHW); Berlin, Njemačka (26.-30.07.2025.); Poster prezentacija

PUBLIKACIJE

1. Rožmanić, C., Lisnić, B., Pribanić Matešić, M. *et al.* Perinatal murine cytomegalovirus infection reshapes the transcriptional profile and functionality of NK cells. *Nat Commun* **14**, 6412 (2023).

2. Kveštak, D., Mihalić, A., Jonjić, S. & Brizić, I. Innate lymphoid cells in neuroinflammation. *Front. Cell. Neurosci.* **18**, (2024).

3. Mihalić, A., Železnjak, J., Lisnić, B. *et al.* Immune surveillance of cytomegalovirus in tissues. *Cell Mol Immunol* **21**, 959–981 (2024).

4. Krstanović, F., Mihalić, A., Šakota, L., Lisnić, B., Jonjić, S., & Brizić, I. (2024). Susceptibility of Mouse Brain to MCMV Infection and Neuroinflammation During Ontogeny. Pathogens, 13(12), 1108.

5. Krstanović, F., Mihalić, A., Rashidi, A.S. *et al.* Neuron-restricted cytomegalovirus latency in the central nervous system regulated by CD4+ T-cells and IFN-γ. J Neuroinflammation 22, 95 (2025).

6. Mihalić A., Lisnić B., Kveštak D. *et al*. Chronically activated microglia restrict the reactivation of latent viral infection at the expense of neuronal synaptic connectivity. Nat Neuroscience (2026).

NAGRADE

2024. Zahvalnica Rektorice Sveučilišta u Rijeci

2024. Nagrada za 1. mjesto najbolje poster prezentacije znanstvenog rada - Godišnji skup Hrvatskog imunološkog društva, Sisak, Hrvatska (HID)

2025. „Need-based“ award, nagrada za pokriće sudjelovanja na kongresu „49th Annual International Herpesvirus Workshop“ (Berlin, Njemačka)

ČLANSTVA

2020. – danas Hrvatsko imunološko društvo (HID)

2025. – Hrvatsko društvo za neuroznanost