

# MEHANIZMI AUTOFAGIJE U INFEKCIJI MIŠJIM CITOMEGALOVIRUSOM

---

Aničić, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:483842>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINA

Josip Aničić

MEHANIZMI AUTOFAGIJE U INFEKCIJI MIŠJIM CITOMEGALOVIRUSOM

Diplomski rad

Rijeka, 2017.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINA

Josip Aničić

MEHANIZMI AUTOFAGIJE U INFEKCIJI MIŠJIM CITOMEGALOVIRUSOM

Diplomski rad

Rijeka, 2017.

Mentor rada: prof. dr. sc. Zlatko Trobonjača, dr. med.

Diplomski rad ocijenjen je dana \_\_\_\_\_ na Medicinskom fakultetu u

Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Ivana Marić
2. prof. dr. sc. Hana Mahmutefendić
3. prof. dr. sc. Hrvoje Jakovac

Rad sadrži **39** stranica, **9** slika, **0** tablica i **32** literaturna navoda.

## **Zahvala**

Prije svega bih htio zahvaliti svojem mentoru, profesoru Zlatku Trobonjači, koji je bio podrška ne samo u izradi ovoga rada, već kroz cijeli studij od samog početka, u svim segmentima studiranja. Bez njegovih ideja i pomoći ovaj rad ne bi ugledao svjetlo dana.

Najveće hvala zaslužuje moja obitelj. Bili su tu uz mene u svakom trenutku. Nebrojeno mnogo puta su stavljali sebe iza mene. Hvala vam, ovaj rad i sve što je vodilo do njega je za vas.

I na kraju, hvala mojim prijateljima, kolegama, nastavnicima i svim djelatnicima Medicinskog fakulteta i šire koji su mi studij činili lakšim, dinamičnijim i potpunim, a Medicinski fakultet i Sveučilište u Rijeci činili drugim domom.

## Sadržaj

Uvod .....	1
1. Autofagija.....	1
1.1. Funkcija i regulacija autofagije .....	1
1.2. Autofagosom .....	3
1.3. Autofagija i virusna infekcija stanice .....	6
2. Mišji citomegalovirus.....	8
2.1. Značajke infekcije mišjim citomegalovirusom u imunokompetentnom i imunokompromitiranom organizmu .....	9
2.2. Odgovor imunskog sustava na infekciju mišjim citomegalovirusom .....	10
2.2.1. Uloga NK stanica .....	10
2.2.2. Uloga T staničnog odgovora .....	11
2.2.3. Uloga interferona i TNF- $\alpha$ .....	12
2.2.4. Mehanizmi modulacije imunosne kontrole domaćina mišjeg citomegalovirusa .....	13
2.3. Eksperimentalne mutante mišjeg citomegalovirusa .....	15
2.4. Očitovanje infekcije mišjim citomegalovirusom na organskim sustavima.....	15
3. Cilj rada .....	16
4. Materijali i metode .....	16
4.1. Opći plan pokusa .....	16
4.2. Miševi.....	17
4.3. Injiciranje $\Delta m157$ mutante MCMV-a .....	18

4.4. Održavanje MCMV-a u staničnoj kulturi.....	18
4.5. Određivanje raširenosti MCMV u organima.....	19
5. Rezultati .....	19
5.1. Proširenost MCMV u organima Atg5 <sup>+/-</sup> u odnosu na C57bl/6 miševe.....	20
5.2. Proširenost MCMV u organima LC3 <sup>+/-</sup> i Atg5 <sup>+/-</sup> u odnosu na C57bl/6 miševe .....	22
6. Rasprava .....	25
7. Zaključak.....	32
8. Sažetak .....	33
9. Summary .....	34
Literatura .....	35
Životopis.....	39

## **Popis skraćenica i akronima**

*ATG*- autophagy-related genes

*AMP*- adenzin monofosfat

*ATP*- adenzin trifosfat

*AMPK*- *AMP*-om aktivirana protein kinaza

*mTORC1*- mechanistic target of rapamycin complex 1

*PI(3)K*- fosfatidilinozitol 3-OH kinaza

*Vps*- vacuolar protein sorting

*Ubl* sustav- sustav proteina sličnih ubikvitinu

*PAS*- phagophore assembly site

*PE*- fosfatidiletanolamin

*Bcl-2*- B-cell lymphoma 2

*HSV-1*- Herpes simplex virus 1

*EBV*- Epstein–Barr virus

*MCMV*- mišji citomegalovirus

*HCMV*- humani citomegalovirus

*TC*- tkivne kulture

*PFU*- plaque-forming unit



SGV- salivary gland virus

TNF-  $\alpha$ - faktor tumorske nekroze alfa

AIDS- acquired immune deficiency syndrome

NK- natural killer

MHC- glavni kompleks tkivne podudarnosti

IFN-  $\gamma$ - interferon gama

ERGIC- Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment

MEF- mišji embrionalni fibroblasti

## Uvod

### 1. Autofagija

Autofagija je mehanizam kojim eukariotske stanice razgrađuju i uklanjaju oštećene i dotrajale stanične organele i proteine. Makroautofagija, mikroautofagija, autofagija posredovana šaperonima ("chaperone – mediated autophagy") te takozvana "piecemeal" nekroza jezgre su osnovne opisane vrste autofagije (1). Značaj mehanizama autofagije u tijeku virusne infekcije, kao i utjecaj samoga virusa na ove mehanizme nisu dovoljno istraženi. Budući da je osnovni cilj ovog diplomskog rada istraživanje učinaka oštećenja mehanizama autofagije na virusnu replikaciju, brojne funkcije i mehanizmi regulacije autofagije u odgovoru stanice na virusnu infekciju detaljno je razrađen u nastavku.

#### 1.1. Funkcija i regulacija autofagije

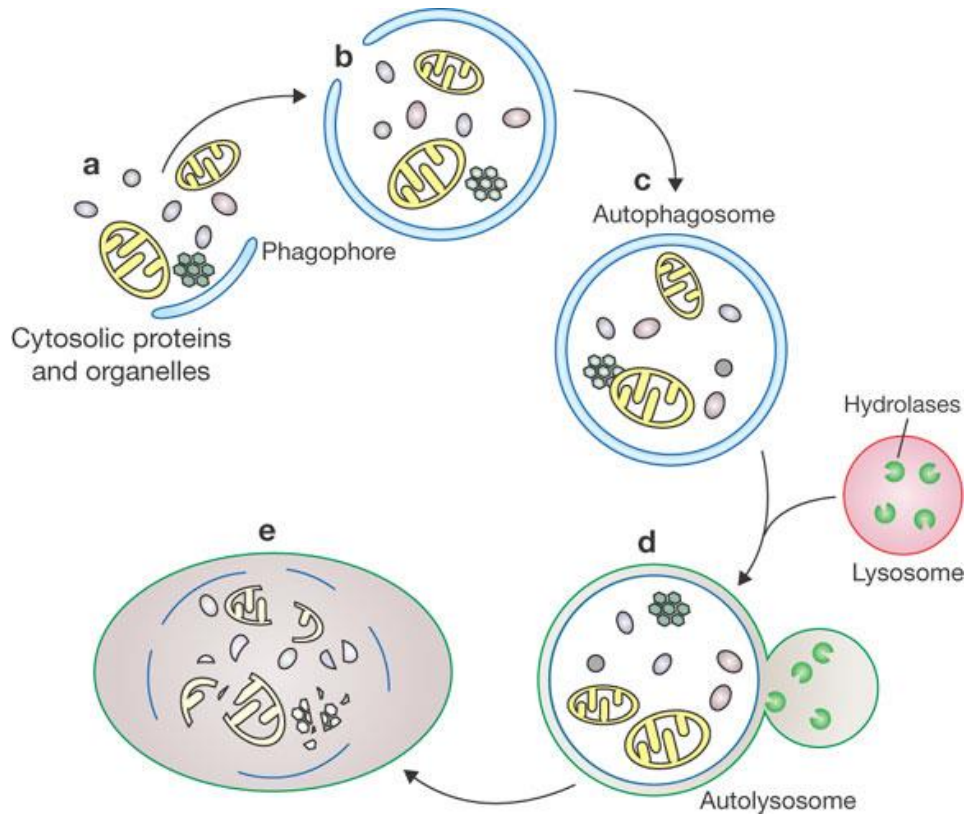
Tradicionalno shvaćanje autofagije definiralo je autofagiju kao mehanizam kojim stanica, pojednostavljeno rečeno, "reciklira" vlastiti sadržaj citoplazme. Međutim, novija istraživanja su pokazala da je neispravno autofagiju smatrati isključivo degradacijom odbačenih staničnih elemenata jer ona ima snažan utjecaj na fiziologiju stanice u cjelini (1). Valja imati na umu da se autofagijom mogu smatrati samo oni procesi koji u konačnici rezultiraju uklanjanjem citoplazmatskih konstituenata tako da se oni transportiraju ili do lizosoma (kada govorimo o stanicama sisavaca) ili do vakuola (kada govorimo o biljnim stanicama, odnosno kvascima) (2). Iako je takvo shvaćanje ispravno, ono ne daje potpunu sliku o procesu autofagije. Različite posttranslacijske modifikacije Atg proteina pokazale su da autofagija može imati značajno različite funkcije koje izravno mijenjaju fiziologiju stanice. To su, primjerice, tumorska supresija, utjecaj na imunost organizma (kako na prirođenu, tako i na stečenu), stanična smrt (nekroza i apoptoza), stanična proliferacija, diferencijacija i brojne druge (2). Upravo ovakav

mehanizam omogućuje stanici da metabolite dobivene autofagijom koristi u sintezi novih proteina ili da ih koristi kao izvor energije za različite stanične procese.

Budući da je ovaj proces, zapravo, proces razgradnje, dugo se smatralo da on nije u potpunosti selektivan. Međutim, otkrića već spomenutih Atg proteina te ostalih proteina na membranama, kako autofagosoma (sekvestrirajući, dvomembranski mjehurić) tako i staničnog materijala razvrstanog za razgradnju (dijelova stanice koje se želi razgraditi mehanizmom autofagije), pokazala su da je autofagija iznimno selektivan proces. Složena interakcija proteina koja nastaje u točno određenim uvjetima, određuje hoće li autofagosomi isključivo razgraditi, primjerice, mitohondrije ili pak invadirajuće patogene prisutne u citoplazmi (2).

Vitalni parametri stanice, poput energetskeg statusa te količine proteina, odnosno aminokiselina potrebnih za njihovu sintezu, kao i faktori rasta potrebni za njen rast i razvoj, ključni su regulatori autofagije. Upravo disbalans tih komponenata izravno će potaknuti, odnosno inhibirati autofagiju. Dominantan mehanizam provjere energetskeg statusa stanice provodi AMPK signalni put kojim se detektiraju izuzetno male promjene u koncentraciji nukleotida adenzina u stanici. Ovaj osjetljivi mehanizam zadužen je za pokretanje kataboličkih procesa koji omogućuju razgradnju staničnih tvorbenih elemenata u svrhu podizanja razine ATP-a, te time i održanje temeljne funkcije stanice, a to je ravnoteža u stvaranju i potrošnji energije ATP-a. Ciljna mjesta djelovanja AMPK su proteini Atg1 (ULK1) te mTORC1. ULK1 je varijanta proteina Atg1 koju nalazimo u sisavaca, a čija je prisutnost u stanici uvjet koji mora biti ispunjen da bi AMPK signalni put mogao utjecati na autofagiju. S druge strane, mTORC1 inhibira pozitivni utjecaj ULK1 na autofagiju, što znači da aktivacija mTORC1 onemogućava autofagiju. U stanjima aktivacije AMPK (nedostatak nutrijenata u stanici, niska koncentracija nukleotida adenzina), AMPK će svojim djelovanjem pokušati podići razinu metabolita stanici aktivacijom autofagije na dva, povezana načina. Kao prvo, AMPK će fosforilacijom proteina mTORC1 izazvati njegovu supresiju, a time posljedično i ukloniti inhibiciju proteina ULK1.

Pored toga, izravnom fosforilacijom samog ULK1, koja pak aktivira ovaj protein, potiče autofagiju (2,3).



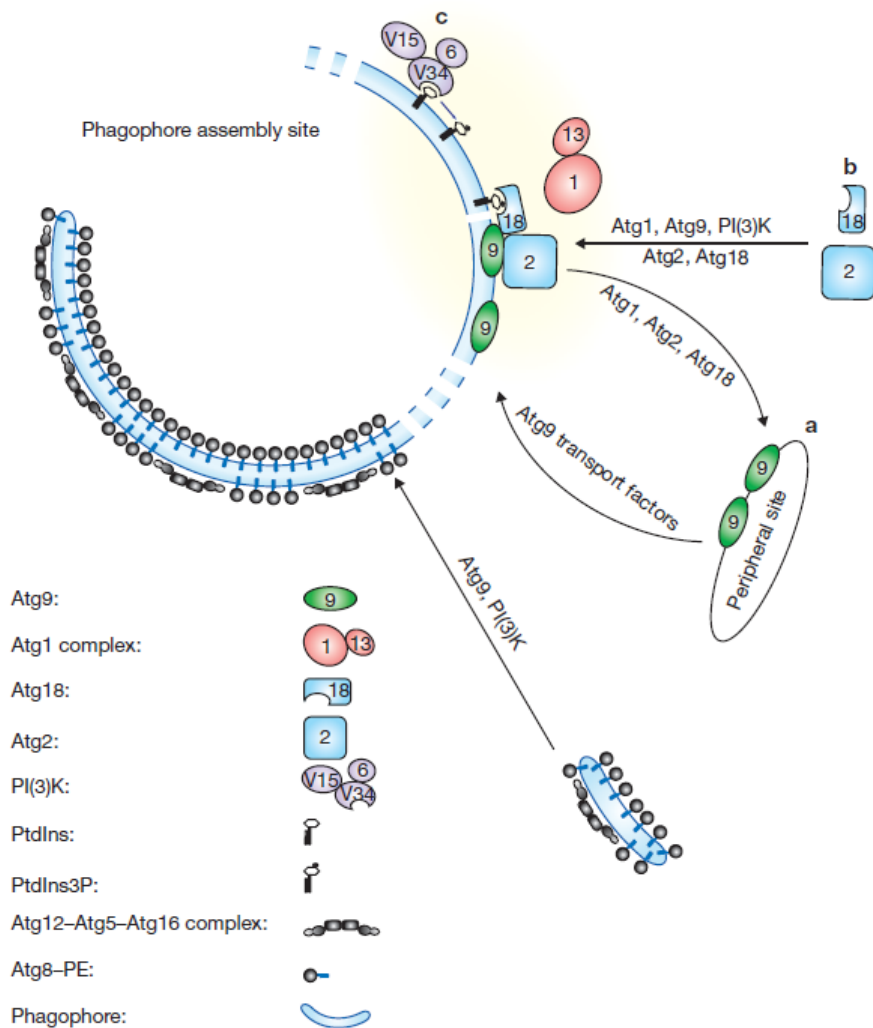
**Slika 1. Autofagija.** Kao jednim od ključnih životnih procesa, mehanizmom autofagije razgrađuju se ostarjele i oštećene stanične organele, pogrešno svijeni citosolni vlastiti proteini te različite strane tvari unešene u stanicu (ksenofagija). Stvoreni (auto)fagosom fuzionira se s lizosomima koji donose enzime za razgradnju obuhvaćenog materijala (1).

## 1.2. Autofagosom

O molekularnim mehanizmima na kojima se temelji autofagija počelo se intenzivnije razmišljati otkrićem *ATG* gena u kvasaca kojih je do danas poznato više od 30 (1). Od proteinskih produkata tih brojnih gena, nekolicina ih je neophodna za formiranje autofagosoma u svim vrstama autofagije, pa su, stoga, nazvani *core autophagy machinery*. Ti ključni proteini

autofagije dijele se u tri osnovne funkcionalne skupine. Prvu skupinu čini Atg9 s vlastitim sustavom ciklina koji obuhvaća Atg1 kinazni kompleks (sačinjavaju ga Atg1 i Atg13), Atg2 i Atg18. Drugu funkcionalnu skupinu sačinjava kompleks PI(3)K, a obuhvaća Vps34, Vps15, Atg6 i Atg14. Posljednju skupinu čini Ubl sustav koji uključuje ubikvitinu slične proteine Atg8 (ekvivalent u sisavaca je LC3 protein) i Atg12, aktivirajući enzim Atg7, zatim dva analoga enzima koji konjugiraju ubikvitin Atg10 i Atg3, proteaza koja modificira Atg8 nazvana Atg4, te Atg5 koji formira molekularni kompleks s Atg12 i Atg16 (1).

Autofagosom se formira iz primarnog mjehurića, nazvanog fagofora, djelovanjem *core machinery* proteina (Slika 2.). Mjesto na kojemu se ta složena interakcija događa u stanici nazvano je PAS (od engl. Phagophore Assembly Site). Autofagni proteini se po fazama funkcijski angažiraju u ovisnosti o stupnju napretka u formiranju autofagosoma. U prvoj fazi, Atg9 protein kruži između perifernih dijelova i samog PAS-a prenoseći materijal za izgradnju membrana u procesu ekspanzije fagofore. Za uspješni prijenos na PAS zaduženi su Atg23 i Atg27, dok su za povratak s PAS-a odgovorni Atg1 kinazni kompleks, Atg18 i Atg2. Važno je napomenuti da lokalizacija Atg2 i Atg18 na PAS-u ovisi o prisutnosti oba proteina, o Atg9 i Atg1 te kompleksu PI(3)K. Uz kompleks PI(3)K sudjeluje i kompleks Atg12-Atg5-Atg16 te Atg8-PE. Funkcija je ovih proteina važna za normalno formiranje autofagosoma (1).



**Slika 2. Phagophore assembly site.** (a) Atg9 kruži između PAS-a i njegovih perifernih dijelova posredstvom drugih Atg proteina (Atg9 transportnih faktora u smjeru PAS-a te Atg1, Atg2 i Atg18 u suprotnom smjeru). (b) Atg2 i Atg 18 utječu jedan na drugog i njihova lokalizacija ovisi o njihovom međudjelovanju. Uz to, Atg9, Atg1, Atg2, Atg18 te PI(3)K utječu na prijenos i vezivanje na PAS. (c) PI(3)K ima svoje specifičnu lokalizaciju na PAS-u. Vrlo bitnu ulogu u formiranju autofagosoma imaju i proteini Atg12-Atg5-Atg16 kompleksa te Atg8-PE čija lokalizacija ovisi o Atg9 te PI(3)K (1).

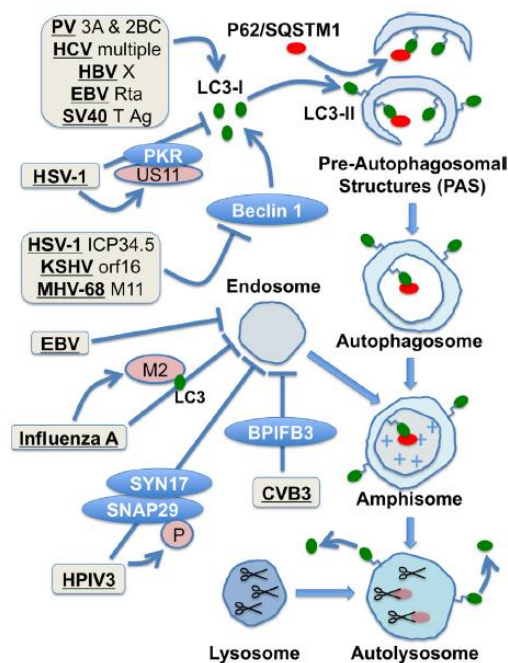
### 1.3. Autofagija i virusna infekcija stanice

Proučavanje brojnih spomenutih mehanizama i funkcija autofagije omogućilo je povezivanje staničnog imunskog odgovora na virusne infekcije i autofagije na genetskoj razini. Prva otkrića bila su vezana uz protein koji djeluje kao inhibitor apoptoze. U kvasaca to je protein kodiran genom *ATG6*, dok je u sisavaca analogni gen *BECN1*. Ovaj gen kodira protein Beclin 1 koji reagira s Bcl-2 i PI(3)K, čime utječe na procese autofagije i programirane stanične smrti (4). Ova su istraživanja dovela do zaključka da je upravo Beclin 1 jedan od važnijih regulatora antivirskog odgovora domaćina (5). Stoga, patogeni mikroorganizmi, a napose virusi, svojim imunosubverzivnim mehanizmima često napadaju ovaj protein. Tako, primjerice, HSV-1 virus proizvodi regulacijski protein ICP34.5 koji blokira Beclin-1 pa virusne mutante kojima je ugašen ovaj protein postaju manje patogene od virusa divljeg tipa što je primijećeno u istraživačkim modelima mišjeg encefalitisa (4, 5). Prema tome, HSV-1 blokadom Beclina 1 i inhibicijom stvaranja autofagosoma stječe prednost u replikaciji (5). Taj primjer govori u prilog tome da autofagija igra važnu ulogu u borbi protiv infekcije stanica virusima.

U normalnim okolnostima, bez inhibicijskog učinka proteina koji vežu Beclin 1, autofagosom se formira tako da se LC3-I oblik proteina LC3 konjugira s fosfotidilaminom u LC3-II oblik (LC3-PA). Takav oblik LC3 je funkcionalan i putuje do PAS-a na kojem omogućava daljnji napredak u procesu stvaranja autofagosoma. Nakon spajanja s endosomima i lizosomima, LC3-II ponovno prelazi u LC3-I oblik, a na njega se veže p62/SQSTM1 koji usmjerava lokalizaciju LC3-1 prema PAS-u (5).

Primjera, kojima se pokazuju specifični mehanizmi različitih virusnih sojeva u inhibiciji autofagije, ima mnogo. Već spomenuti HSV-1 virus, uz protein ICP34.5 koji inhibira Beclin 1, producira i US11 protein koji onemogućava konjugaciju LC3-1. Influenza A te EBV induciraju nastajanje autofagosoma, ali blokiraju fuziju s endosomima te time i sazrijevanje autofagosoma

kao i degradaciju putem autofagije. Virus influenze koristi M2 protein za inhibiciju fuzije endosoma s autofagosomom. Povezanost infekcije citomegalovirusom i autofagije također je dokazana u istraživanjima s HCMV-om. Pokazalo se da infekcija HCMV-om u fibroblastima inhibira autofagiju kroz interakciju TRS1 proteina HCMV-a s Beclin 1 proteinom (5). TRS1 protein inhibira Beclin 1, sličnim mehanizmom koji je opisan u infekciji s HSV-1 virusom, što nije iznenađujuće jer je TRS1 protein funkcionalni homolog ICP34.5 proteina u HSV-1 virusa (6).



**Slika 3. Virusna regulacija puta autofagije.** Interakcija Beclin 1 kompleksa i ostalih signalnih molekula uzrokuju prelazak LC3-I oblika u LC3-II. Takav oblik LC3 je neophodan za formiranje autofagosoma na PAS-u. Autofagosomi se fuzijom spajaju s endosomima koji doprinose kiselosti autofagosoma (sada nazvanog amfisom). Amfisomi se tada spajaju s lizosomima koji sadrže proteaze važne za razgradnju sadržaja mjehurića. LC3-II se pretvara ponovno u LC3-I pod utjecajem lizosomskih proteaza, veže se za protein p62/SQSTM1 koji ga



usmjerava natrag na PAS. Pored toga, na slici je prikazan i mehanizam kontrole autofagije regulacijskim proteinima različitih virusa kao i ciljna mjesta njihovog djelovanja. Protein ICP34.5 HSV-1 virusa, koji odgovara TRS1 proteinu HCMV-a, inhibira stvaranje autofagosoma vezanjem na Beclin 1 (5).

## 2. Mišji citomegalovirus

MCMV pripada porodici citomegalovirusa, podvrsti  $\beta$ -herpesvirusa. Svojim karakteristikama odgovara obitelji herpesvirusa jer pokazuje, jednako kao i ostali virusi ove obitelji, perzistentnu, doživotnu infekciju koja je uvijek prisutna u jednom od dva stanja: latentna faza u kojoj virus ne pokazuje izraženije znakove infekcije i faza produkcije virusa u kojoj su simptomi, odnosno karakteristični znakovi infekcije za ovaj virus izraženi i znače da se virus aktivno replicira u stanicama domaćina (7).

MCMV iskazuje tropizam primarno za krvotvorno (hematopoetsko) tkivo te za tkivo sekretornih žlijezda. Brojna su istraživanja dokazala kako se u slini kronično zaraženih laboratorijskih miševa može dokazati prisutnost virusa te se upravo zato i smatra kako je glavni izvor za širenje virusa među jedinkama slina, a da su putevi ulaska virusa u organizam primarno sluznice s kojima slina dolazi u kontakt (7). Stoga je i dominantni eksperimentalni način unosa virusa u laboratorijske miševe intraperitonealni put koji uzrokuje širenje virusa vrlo slično onome kod unosa virusa *per os*. Prema tome, sluznica probavnog sustava je sigurno ulazno mjesto virusa u organizam. Uz sluznice organa probavnog sustava, kao moguće mjesto ulaska virusa u organizam navodi se i sluznica gornjeg dijela dišnog sustava (7).

Nakon prolaska sluznične barijere, virus se širi krvlju te inficira stanice tkiva za koje ima izraženi tropizam. Kao ciljne stanice bitno je izdvojiti endotelne stanice, miocite, stanice smeđeg masnog tkiva, fibroците te stromalne stanice koštane srži (7).

Razlog zbog kojeg se virusni model sa MCMV-om tako često koristi u istraživanjima na laboratorijskim miševima leži u činjenici da je MCMV uvelike sličan inačici citomegalovirusa u ljudi, HCMV-u (7).

Neovisno o imunobiološkom statusu domaćina, virus ulazi u organizam i započinje svoj replikacijski ciklus. Razina imunokompetencije domaćina određuje fazu u koju će virus ući, pa će svako stanje koje ugrožava imunobiološki status domaćina pridonijeti prijelazu iz faze latencije u fazu aktivne produkcije virusa. Zbog ovakvog složenog odnosa MCMV-a kao nametnika i imunosnog sustava domaćina, bitno je poznavati biološke značajke infekcije MCMV-om, kako u imunokompetentnih, tako i u imunokompromitiranih laboratorijskih miševa, da bi mogli pratiti učinke infekcije na pojedine stanične funkcije, poput autofagije (7).

## **2.1. Značajke infekcije mišjim citomegalovirusom u imunokompetentnom i imunokompromitiranom organizmu**

Intraperitonealni unos MCMV-a virusa iz tkivne kulture (TC) u koncentraciji  $10^5$  PFU u imunokompetentnih laboratorijskih miševa najčešće prolazi bez simptoma infekcije. Međutim, ako se upotrijebi virus koji je dobiven iz žlijezda slinovnica (SGV), tada se razvijaju znakovi infekcije čak i u imunokompetentnog laboratorijskog miša. Naime, smatra se da homogeni derivat slinovnica dobiven iz zaraženih miševa sadrži mnoštvo citokina i hormona koji moduliraju imunosni odgovor domaćina te uzrokuju visoku proliferacijsku aktivnost virusa u jetrenim stanicama te stanicama slezene uz imunosupresivni učinak (8, 9, 10). Histopatološke manifestacije infekcije MCMV-om karakteristične su za učinak koji na jetrene stanice imaju visoke razine cirkulirajućeg TNF- $\alpha$ . Uz sve to, SGV virus uzrokuje stanje slično šoku u kojem dolazi do stvaranja niza citokina (11). Oštećenje slezene te slabljenje imunosnog odgovora značajno utječu na stupanj oštećenja hepatocita. Zanimljivo je napomenuti da SGV virusi

višestrukim kultivacijama i prolascima kroz tkivne kulture, gube virulenciju i postaju gotovo identični originalnim TC virusima (7).

MCMV infekcija u imunokompromitiranih miševa pokazuje znakove oportunističke infekcije. Naime, oslabljeni imunski sustav domaćina ne može adekvatno odgovoriti na prisutnost virusa u organizmu te se razvija klinička slika citomegalovirusne oportunističke bolesti. Sličan slučaj nalazimo, primjerice, u bolesnika oboljelih od AIDS-a u kojih je HCMV infekcija odgovorna za razvoj pneumonitisa, ezofagitisa, encefalitisa i dr., što dovodi do značajnog pogoršanja stanja bolesnika (12). Kao model imunokompromitiranih laboratorijskih miševa koriste se miševi BALB/c soja u kojih infekcija MCMV-om uzrokuje fokalne nekroze korteksa nadbubrežne žlijezde te predisponira razvoj ateroskleroze, te drugih sojeva, primjerice C57bl/6, kojega smo mi koristili u našim pokusima. Oslabljeni imunski odgovor omogućava opsežno širenje virusa i nastanak aplazije koštane srži, retinitisa te brojnih drugih oštećenja (7).

## **2.2. Odgovor imunskog sustava na infekciju mišjim citomegalovirusom**

MCMV na različite načine pokušava izbjeći obrambenim imunskim mehanizmima domaćina. Glavnu ulogu u borbi imunskog sustava protiv MCMV-a ima stanična imunost te interferoni čija je zajednička zadaća kontrola primarne infekcije, uspostavljanje latencije te sprječavanje aktivne virusne replikacije u stanicama domaćina.

### **2.2.1. Uloga NK stanica**

Stanice NK zauzimaju važno mjesto u obrani organizma od MCMV infekcije. Naime, provedene su brojne studije koje pokazuju kako laboratorijski miševi kojima je umanjena aktivnost stanica NK (uklonjen timus, miševi s teškom kombiniranom imunodeficijencijom) razvijaju značajno različiti odgovor na infekciju od divljih tipova miševa (13). Upravo se s tim ciljem u istraživanjima koriste miševi različitih sojeva. BALB/c miševi su prijemčljivi za

MCMV, dok su miševi soja C57bl/6 otporniji na djelovanje MCMV. Genetska podloga takve različite prijemčljivosti leži u NK-staničnom odgovoru, odnosno genu koji je kodiran *Cmv1* lokusom na mišjem šestom kromosomu (14). Novija istraživanja pokazuju važnu regulatorsku ulogu *Ly49h* gena koji djeluje kao medijator *Cmv1* fenotipa (15). *Ly49H* djeluje kao NK aktivacijski stanični receptor čiji je ligand produkt *m157* gena MCMV-a koji je strukturom homologan MHC molekulama razreda I (16). Naizgled, zbunjuje činjenica da MCMV posjeduje produkt gena koji djeluje kao aktivator stanica NK. Međutim, valja znati da se produkt gena *m157* istovremeno veže i za 129/J alelnu formu *Ly49I* koji djeluje kao inhibicijski receptor stanica NK (16).

### **2.2.2. Uloga T staničnog odgovora**

Uz funkcionalne stanice NK koje čine važnu kariku u borbi imunskog sustava protiv MCMV infekcije, imunokompetentni limfociti T su nužni za uspostavljanje faze latencije koja uslijedi kao druga faza, karakteristična za infekciju citomegalovirusima, u koju virusi ulaze iz prve faze aktivne replikacije virusa, takozvane produktivne faze infekcije. Dokazano je da limfociti T izolirani iz drenažnih limfnih čvorova u produktivnoj fazi infekcije te memorijski limfociti T iz faze latencije uvelike utječu na moduliranje imunskog odgovora na infekciju. Bitno je naglasiti da su  $CD8^+$  limfociti T prvenstveno zaduženi za antivirusni učinak u sklopu staničnog imunskog odgovora domaćina.  $CD4^+$  limfociti T nisu neophodni za potenciranje učinka  $CD8^+$  limfocita T. Međutim, novija su istraživanja pokazala da u laboratorijskih miševa u kojih je  $CD8^+$  stanični odgovor utišan (monoklonalnim protutijelima),  $CD4^+$  limfociti T preuzimaju dio antivirusne aktivnosti čime domaćin razvija učinkovit imunski odgovor sličan laboratorijskim miševima u kojima je prisutan učinkovit  $CD8^+$  T stanični odgovor (17).  $CD8^+$  limfociti T predstavljaju glavni zaštitni mehanizam u MCMV infekciji, a za uspješnu virusnu

eliminaciju i prevenciju horizontalnog prijenosa virusa su od iznimnog značaja CD4<sup>+</sup> limfociti T (18).

Koncentracija glavnih aktera staničnog imunskog odgovora ovisi o vrsti infekcije virusom zaraženog domaćina. Ako se radi o infekciji u kojoj se virus u potpunosti eliminira, tada se, po završetku infekcije, uklanjaju svi antigeni virusa te se naglo spušta razina CD8<sup>+</sup> limfocita T koji zadržavaju vrlo niske koncentracije u serumu. Međutim, ako se radi o infekciji koja ima izraženu fazu latencije, tada ta populacija stanica zadržava iznimno visoke serumske koncentracije jer su pod stalnom stimulacijom virusnih antigena. Radi se upravo o populaciji memorijskih T stanica (19). Imajući na umu ulogu memorijskih CD8<sup>+</sup> limfocita T, bitno je znati da novija istraživanja dokazuju povezanost autofagije i razvoja imunskog odgovora memorijskim limfocitima T. Tako je dokazano da laboratorijski miševi kojima nedostaje *ATG7* ne mogu stvoriti CD8<sup>+</sup> T memorijske stanice, kako na infekciju virusom influenza-e, tako i u MCMV virusnoj infekciji (20).

### **2.2.3. Uloga interferona i TNF- $\alpha$**

Najvažniji izvori IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  u infekciji MCMV-om su stanice NK te CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfociti T (7). Upravo ti citokini igraju važnu ulogu u progresiji MCMV infekcije. Njihova uloga varira od zaštitne, u kojoj brane stanice domaćina od virusa, do učešća u razvoju citomegalovirusne bolesti sudjelovanjem u patogenezi same infekcije. U primarnoj infekciji dokazana je povezanost ovih citokina, koji potiču antivirusni odgovor u nezaraženoj stanici uz posljedično smanjenje množenje virusa u produktivnoj fazi infekcije, s produljenjem replikacijskog ciklusa MCMV-a (7).

Funkcija IFN- $\gamma$  važna je i prije infekcije stanice virusom kao i u tijeku same infekcije. On neutralizira aktivnost virusa koji pokušavaju blokirati antigensku prezentaciju (7). Uz ovu

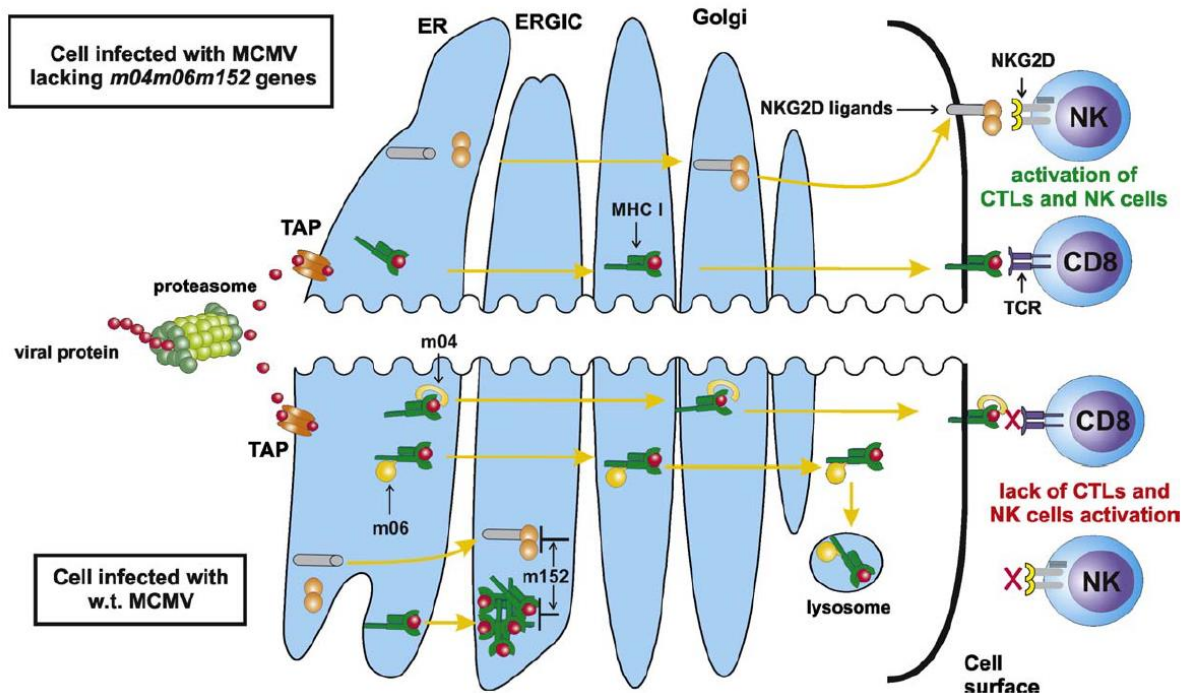
važnu funkciju u ranoj fazi infekcije, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  povećavaju izražaj MHC I molekula u sklopu kojih se virusni epitopi predočavaju CD8<sup>+</sup> limfocitima T. Čini se da MCMV posjeduje mehanizam kojim smanjuje indukciju transkripcije gena posredovanih s IFN- $\gamma$ , čime umanjuje antivirusne učinke IFN- $\gamma$ . Također, neutralizacija učinaka IFN- $\gamma$  smanjuje antivirusni učinak i CD4<sup>+</sup> limfocita T u žlijezdama slinovnicama (7). Učinak TNF- $\alpha$  je najbolje vidljiv u činjenici da deplecijom endogenog TNF- $\alpha$  oslabljujemo antivirusni učinak limfocita T iz subpopulacije CD8<sup>+</sup> (7).

#### **2.2.4. Mehanizmi modulacije imunosne kontrole domaćina mišjeg citomegalovirusa**

Dugotrajne interakcije virusa i domaćina omogućile su virusima razvoj specifičnih mehanizama kojima utječu na imunosni sustav, oslabljuju ga te ga prilagođavaju svojim specifičnim karakteristikama. Upravo zbog toga, MCMV u svom genomu sadrži gene koji kodiraju proteine čija je zadaća izbjeći imunosnu obranu domaćina.

Ključno mjesto u infekciji MCMV-om zauzimaju MHC I molekule u sklopu kojih se antigeni predočavaju CD8<sup>+</sup> limfocitima T. Upravo je iz tog razloga MCMV razvio regulacijske proteine kojima je meta upravo predočavanje antigena putem MHC I molekula. *m152*, *m04* i *m06* su geni koji kodiraju spomenute proteine. Zadaća proteina kodiranog genom *m152* je zadržavanje sklopljenog trimolekularnog MHC I kompleksa u ERGIC-u i time onemogućavanje predočavanja antigena CD8<sup>+</sup> limfocitima T u sklopu MHC I molekule. Pored toga, nishodna (*down*) regulacija specifičnih liganda za NKG2D receptore stanica NK onemogućava njihovu aktivaciju kao i imunosni odgovor posredovan citotoksičnim limfocitima T i stanicama NK koji je usmjeren uništenju zaražene stanice (7). Produkt gena kodiran *m06* genom usmjerava formirane MHC I molekule u put proteolitičke razgradnje u stanici te time dodatno onemogućava antigensku prezentaciju. (21). *m04* gen kodira protein koji djeluje kao antagonist prvih dvaju. Naime, on se veže za sklopljene MHC I molekule u endoplazmatskom

retikulumu te osigurava njihov prijenos do površine stanice (4). Smatra se da taj mehanizam služi inhibiciji NK stanica osiguravajući prisutnost MHC I molekula na površini stanice koje tada služe kao inhibicioni ligandi NK staničnim receptorima (22). Također, dokazano je kako gen *m157* kodira glikoprotein pomoću kojeg MCMV izbjegava Ly49H – ovisnu NK staničnu aktivaciju (16, 23).



**Slika 4. Izbjegavanje aktivacije CD8<sup>+</sup> limfocita T i NK stanica u BALB/c laboratorijskih miševa inficiranih MCMV-om.** Gornji dio slike prikazuje stanicu inficiranu mutantom virusa MCMV koja ne sadrži *m04*, *m05* i *m152* gene te predočavanje virusnih čestica u sklopu MHC I molekula i stresom induciranih NKG2D liganada na površini stanice što uzrokuje aktivaciju CD8<sup>+</sup> limfocita T i NK stanica. Donji dio slike prikazuje divlji tip MCMV-a koji sadrži produkte tih gena. Produkt *m04* gena se veže za MHC I molekule u ER-u i ostaje trajno vezan. *m06* kodira protein koji se također veže za MHC I molekule u ER-u te ih usmjerava u lizosome.

Posljednji protein kojeg kodira *m152* blokira transport MHC I molekula do površine stanice te smanjuje broj NKG2D liganada (7).

### **2.3. Eksperimentalne mutante mišjeg citomegalovirusa**

Mehanizmi kontrole imunskog sustava se primarno proučavaju u *in vitro* uvjetima. Kako bismo mogli istraživati kako virus utječe na domaćina *in vivo*, potrebno je razviti eksperimentalne mutante virusa u kojima je mutiran određeni gen koji je važan u patogenezi infekcije i moduliranju imunskog odgovora domaćina. Stoga je potrebno imati na umu koji su geni uključeni u kodiranje proteina važnih za razvoj infekcije te stanice i molekule koje sudjeluju u specifičnoj obrani domaćina (24).

### **2.4. Očitovanje infekcije mišjim citomegalovirusom na organskim sustavima**

Nakon intraperitonealnog unosa virusa, stanice NK zadužene za odgovor protiv virusa primarno su lokalizirane u krvi, slezeni, jetri i plućima. Limfni sustav prenosi virus administriran u abdominalnu šupljinu te ga dovodi u krv. Tada je prvo mjesto rane infiltracije virusa upravo slezena zbog svoje specifične građe. Za taj učinak važni su makrofagi marginalne zone slezene. Jetra je organ koji je također zahvaćen u ranoj fazi infekcije. Jetreni hepatociti razvijaju intranuklearne citomegalovirusne inkluzije uz perinuklearne citoplazmatske inkluzije zbog čega stanice djeluju iznimno uvećane (citomegalija). Upravo se u marginalnoj zoni u tkivu slezene te u žarištima u jetri može dokazati virusna infekcija. To su i mjesta u kojima se nakupljaju stanice NK koje produciraju IFN- $\gamma$ . Virusna se replikacija u jetri često može vidjeti čak i nakon pada replikacije u slezeni (25). MCMV infekcija u plućima primarno se očituje infekcijom alveolarnih makrofaga te alveolarnih epitelnih stanica tipa 2. Nedostatak alveolarnih makrofaga povisuje titar virusa u plućima u akutnoj fazi infekcije. Da makrofazi nisu isključivo ciljno mjesto djelovanja MCMV-a zorno pokazuje činjenica da je titar virusa u plućima



domaćina inficiranih divljim tipom virusa gotovo jednak titru u plućima domaćina koji je inficiran mutantom kojoj nedostaje promotor aktivnosti makrofaga (m131/m129 kemokinski homolog). U tom je slučaju infekcija posredovana alveolarnim epitelnim stanicama tipa 2 (26).

Titar virusa u slezeni, plućima i jetri uobičajeno se određuje nakon prvog, drugog te trećeg tjedna od primarne infekcije. Najviši titar virusnih čestica doseže se između jedanaestog i četrnaestog dana u slezeni, jetri i plućima, dok se u žlijezda slinovnica on doseže nešto kasnije (27).

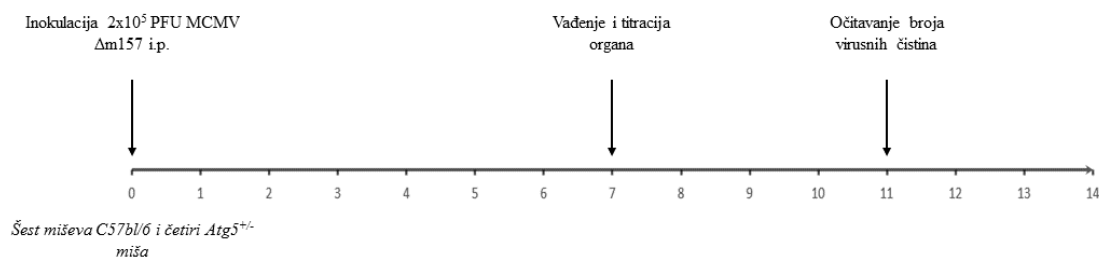
### **3. Cilj rada**

Osnovni cilj rada bio je utvrditi *in vivo* utjecaj nedostatka proteina Atg5 i LC3 koji igraju važnu ulogu u mehanizmu autofagije u heterozigotnim mišjim mutantama na replikaciju MCMV u plućima, jetri te slezeni u odnosu na kontrolnu skupinu divljih tipova laboratorijskih miševa soja C57bl/6.

### **4. Materijali i metode**

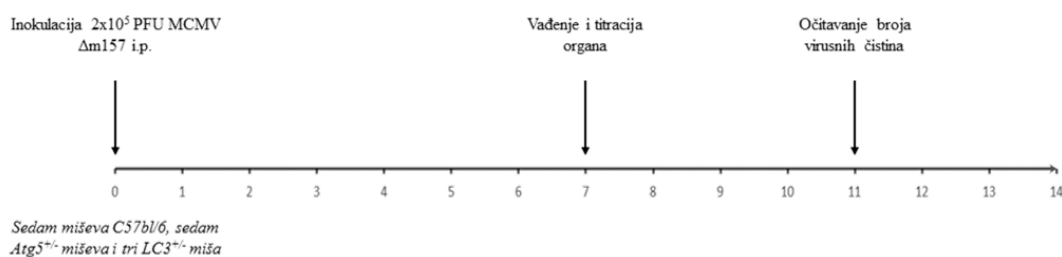
#### **4.1. Opći plan pokusa**

Eksperimentalni dio proveden je kroz dva pokusa. Prvi je pokus (Slika 5.) obuhvaćao manji broj laboratorijskih miševa od drugog pokusa. Nultog smo dana intraperitonealno inokulirali  $2 \times 10^5$  PFU MCMV  $\Delta m157$  u dvije ispitivane skupine miševa. Prva je skupina obuhvaćala šest C57bl/6 miševa, a druga četiri Atg5<sup>+/-</sup> miševa. Sedmog dana od inokulacije žrtvovali smo miševe, pristupili vađenju organa te njihovoj titraciji. Nakon četiri dana pristupili smo brojanju virusnih čistina.



**Slika 5.** Plan prvog pokusa koji prikazuje intraperitonealnu inokulaciju virusa nultog dana u 10 ispitivanih laboratorijskih miševa, vađenje i titraciju organa sedmog dana od inokulacije te očitavanje broja virusnih čistina na MEF-u jedanaestog dana.

Drugi je dio pokusa proširen još jednom skupinom ispitivanih miševa, i to heterozigotima  $LC3^{+/-}$ . Ukupno smo ispitivali 17 miševa od kojih sedam  $C57bl/6$  divljeg tipa, sedam  $Atg5^{+/-}$  miševa te tri  $LC3^{+/-}$  miša. Metodologijom i kronologijom pokus je bio istovjetan prvom (Slika 6.).



**Slika 6.** Plan drugog pokusa je istovjetan prvom uz razliku u broju miševa i u ispitivanim skupinama koje obuhvaćaju  $LC3^{+/-}$  skupinu uz istu dinamiku inokulacije i titracije.

## 4.2. Miševi

U našim pokusima koristili smo miševe divljeg tipa soja  $C57bl/6$  iz uzgojne kolonije Medicinskog fakulteta u Rijeci, te heterozigotne miševe  $Atg5^{+/-}$  i  $LC3^{+/-}$ , napravljene genetskim manipulacijama na bazi  $C57bl/6$  miševa, a koje smo dobili ljubaznošću prof. dr.

sc. Siniše Volarevića. Držali smo ih u standardnim uvjetima bez patogena. Hranjeni su steriliziranim keksima za miševе i pili vodu po volji. Miševi su korišteni u dobi od 6-10 tjedana starosti. Miševi su humano žrtvovani, a organi predviđeni za analizu izvađeni i zamrznuti.

#### **4.3. Injiciranje $\Delta m157$ mutante MCMV-a**

Mutantu  $\Delta m157$  MCMV-a suspendiranu u dozi od  $2 \times 10^5$  PFU u volumenu od 0,5 ml PBS-a injicirali smo intraperitonealno. Ovu mutantu virusa koristili smo da bi izbjegli snažni stanični imunski odgovor stanica NK. Pokus smo ponovili u dva navrata. U prvom pokusu koristili smo šest ženki divljeg tipa C57bl/6 i četiri  $Atg5^{+/-}$  miša, a u drugom pokusu sedam životinja divljeg tipa, sedam  $Atg5^{+/-}$  i tri  $LC3^{+/-}$  miša.

#### **4.4. Održavanje MCMV-a u staničnoj kulturi**

Propagacija MCMV-a u staničnoj kulturi u svrhu umnažanja i produkcije virusa odvija se na Balb/c MEF-u (mišji embrionalni fibroblasti), tako da se MEF inficira sa 0,01 PFU po stanici te inkubira 4-5 dana na  $37^{\circ}\text{C}$  i atmosferi obogaćenoj s 5%  $\text{CO}_2$ . Stanice se nakon toga odvoje od podloge mehaničkim struganjem, pakuje u supernatantu, te centrifugiraju 10 minuta na centrifugalnoj sili od 200g. Supernatant s virusom se zadrži, a talog stanica odbaci. Kako bismo istaložili virus, supernatant se nadalje centrifugira silom od 26000g tijekom 90 minuta pri  $4^{\circ}\text{C}$ . Talog s virusima se resuspendira u 300  $\mu\text{l}$  DMEM medija (Dulbecco's Modified Eagle Medium) obogaćenog s 3% FCS-a (Fetal Calf Serum), te ostavi na ledu 18 sati. Nakon toga, virusni talog se nadsloji na 15% sukrozu otopljen u VSB puferu (Virus Standard Buffer) te ultracentrifugira na 72000g tijekom 90 minuta pri  $4^{\circ}\text{C}$ . Nakon ultracentrifugiranja nadtalog se odbaci, a talog virusa resuspendira u 300  $\mu\text{l}$  PBS-a (Phosphate Buffered Saline) i ostavi preko noći. Drugi dan suspenzija se dobro promiješa, kratko sonificira te razdvoji u alikvote po 25  $\mu\text{l}$ .

Virus se trajno čuva na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a zastupljenost virusnih čestica u suspenziji određuje testom virusnih čistina

#### **4.5. Određivanje raširenosti MCMV u organima**

Da bi odredili intenzitet replikacije MCMV u plućima, slezeni i jetri Atg5<sup>+/-</sup>, LC3<sup>+/-</sup>, kao i u kontrolnih C57bl/6 miševa "divljeg tipa", koristili smo standardnu metodu testa virusnih čistina na Balb/c MEF-u. MEF je stavljen u staničnu kulturu u Petrijevim posudama tijekom tri dana. Drugog dana kulture MEF-a, odnosno dan prije titracije virusa, pripremljene su 48-rupične ploče nasađivanjem  $5 \times 10^4$  stanica MEF-a po rupici u 3% DMEM mediju. Homogenat organa predviđenih za određivanje titra virusa priprema se odmrzavanjem, a zatim pasažom kroz metalnu mrežicu pomoću 2 ml 3% DMEM-a. Isti medij se koristi za razrjeđenja homogenata organa (od 200, 2 000 i 20 000 puta za pluća i slezenu, a 100, 1 000 i 10 000 za jetru). U 48-rupične ploče na čijem se dnu nalazi "tepih" od stanica MEF-a ukloni se supernatant i doda 100  $\mu\text{l}$  suspenzije homogenata organa iz svakog od pripremljenih razrjeđenja. Nakon toga, ploče se inkubiraju 30 minuta na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  i atmosferi obogaćenoj s 5%  $\text{CO}_2$ , centrifugiraju 30 minuta na 800g, te ponovno inkubiraju 30 minuta na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz 5%  $\text{CO}_2$ . Konačno, u svaku se rupicu doda po cca 0,5 ml metil-celuloznog medija, te ostavi inkubirati 3-4 dana na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz 5%  $\text{CO}_2$ . Pomoću invertnog mikroskopa broje se virusne čistine u svakoj rupici. Virusne čistine odgovaraju infektivnim jedinicama virusa (PFU), koje pak koreliraju s brojem virusa, pa se množenjem broja PFU s odgovarajućim razrjeđenjem dobivaju podatci o intenzitetu replikacije virusa u organima.

#### **5. Rezultati**

Podaci su obrađeni u programu GraphPad Prism 3. Prikazani su rezultati izračunatog broja virusnih čistina na temelju očitanoog broja u više različitih razrjeđenja za svakog miša

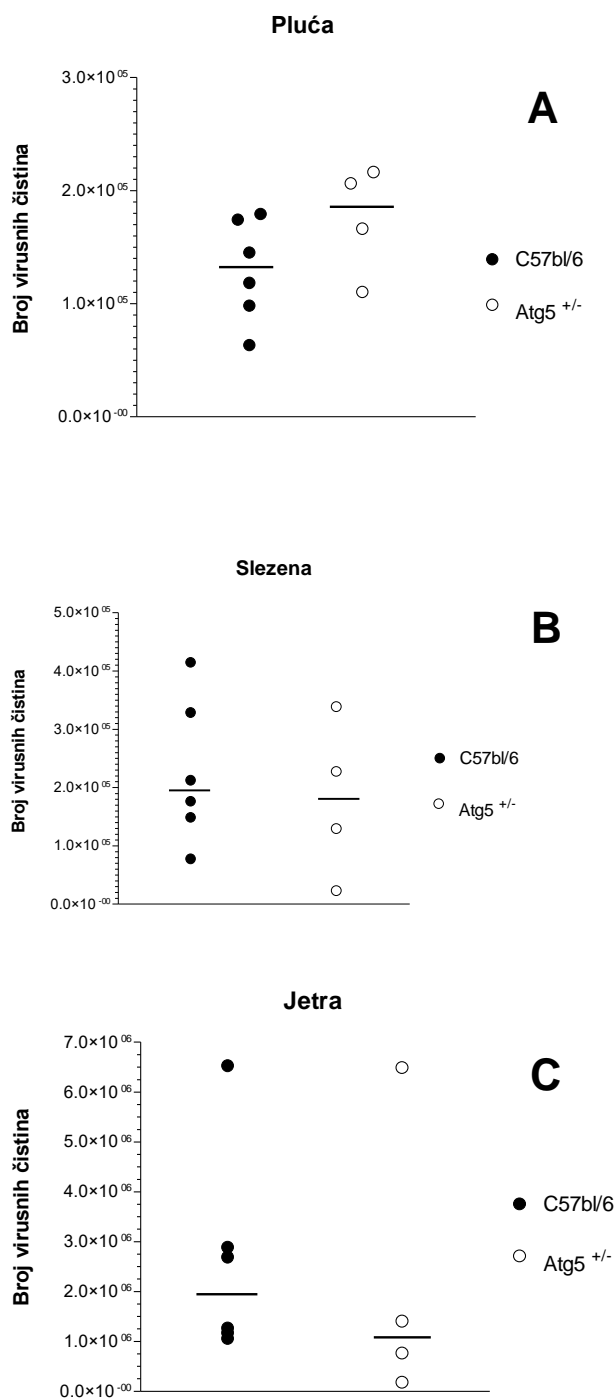
posebno, uz naznačenu vrijednost medijana oko kojega se rezultati grupiraju. Dobivene brojeve čistina razvukli smo u logaritamskoj skali po bazi 10. Proveli smo i analizu statističke značajnosti razlike broja virusnih čistina po organima (pluća, slezena i jetra) između pojedinih ispitnih skupina. Za ovu statističku analizu koristili smo Studentov t-test, a statistički značajnom razlikom smatrala se razlika za koju je izračunati  $p < 0,05$ .

### **5.1. Proširenost MCMV u organima Atg5<sup>+/-</sup> u odnosu na C57bl/6 miševe**

Analizom rezultata nismo pronašli statistički značajnu razliku u broju virusnih čistina divljih tipova miševa (C57bl/6) kao prve ispitivane skupine u odnosu na Atg5<sup>+/-</sup> miševe kao druge skupine. Međutim, rezultati po organima pokazuju određene zanimljivosti.

Pluća miševa kojima nedostaje Atg5 protein pokazale su nešto veće vrijednosti PFU-a (Slika 7A) što je vidljivo iz pojedinačnih vrijednosti broja virusnih čistina, te medijana tih vrijednosti. Divlji tip pokazuje medijan ukupnog broja virusnih čistina od 131 500 što je manje od 186 000 koliko je PFU pronađeno u drugoj Atg5<sup>+/-</sup> ispitivanoj skupini miševa. Razlika je u aritmetičkim sredinama nešto manja između ispitivanih skupina, a iznosi 129 500 za prvu skupinu, odnosno 174 500 za drugu. p vrijednost iznosi 0,1707 te pokazuje da razlika nije statistički značajna.

Broj virusnih čistina u slezeni obiju ispitivanih skupina su gotovo istovjetne uz medijane 194 000 za prvu skupinu miševa te 178 000 za drugu (Slika 7B). Vrlo visoka p vrijednost od 0,5875 govori kako nema razlike između dvije ispitivane skupine.



**Slika 7.** Broj virusnih čistina u plućima, jetri i slezeni C57bl/6 i Atg5<sup>+/-</sup> miševa prvog pokusa. Horizontalne linije prikazuju medijane dobivenih vrijednosti .

Analizom rezultata dobivenih brojanjem virusnih čistina iz lizata jetrenih stanica, dobili smo nešto veću razliku u medijanima (1 972 215 PFU u C57bl/6, odnosno 1 079 826 PFU u

Atg5<sup>+/-</sup> miševa) uz p vrijednost od 0,8094. Aritmetičke sredine su znatno veće od medijana vrijednosti (2 594 000 PFU u prvoj te 2 205 000 PFU u drugoj ispitivanoj skupini) uz prisutna dva podatka koji značajno odudaraju od ostatka (6 520 271 PFU u C57bl/6 miševa i 6 482 618 PFU u Atg5<sup>+/-</sup> miševa) (Slika 7C).

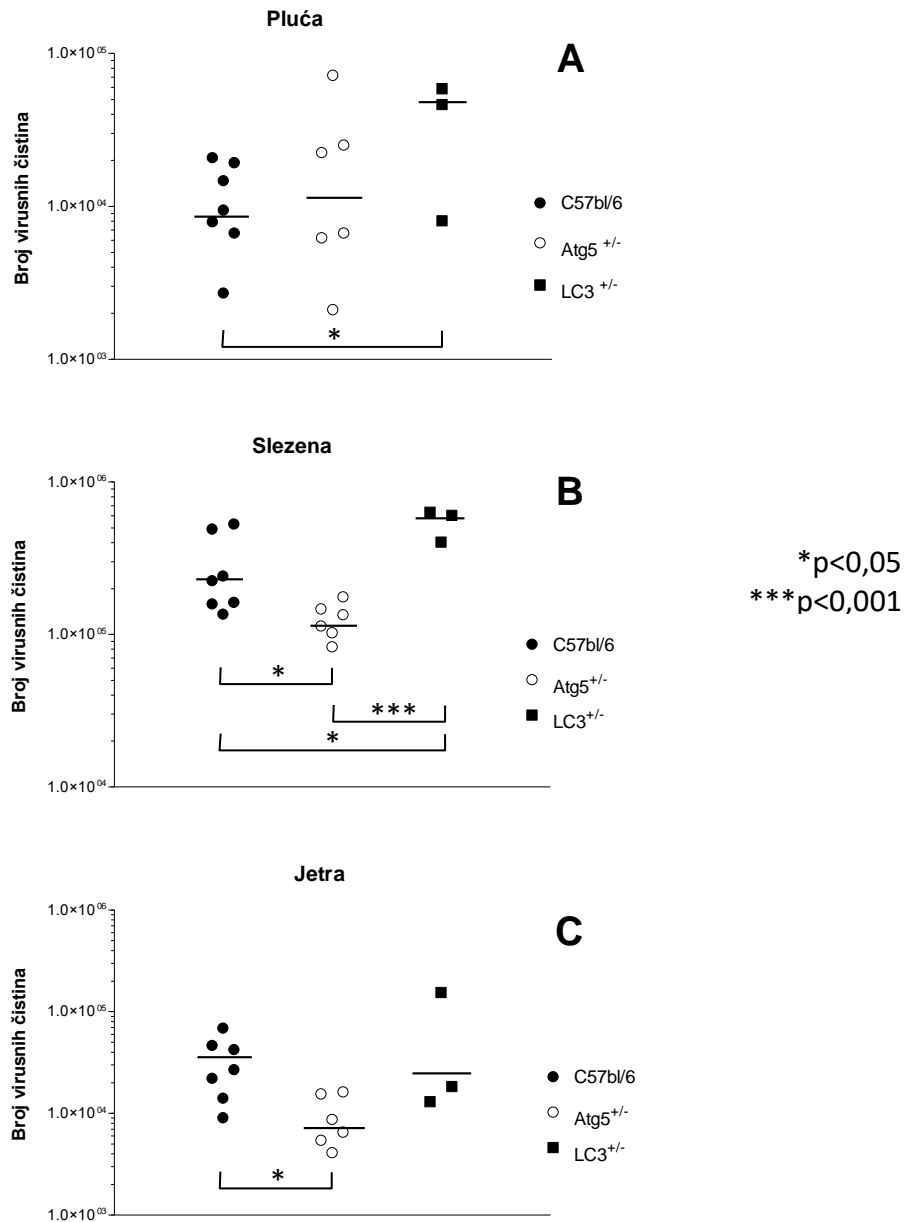
## **5.2. Proširenost MCMV u organima LC3<sup>+/-</sup> i Atg5<sup>+/-</sup> u odnosu na C57bl/6 miševe**

Uključivanjem LC3<sup>+/-</sup> miševa u pokus, dobili smo ukupno tri ispitivane skupine. Prvu skupinu čine C57bl/6 miševi, drugu Atg5<sup>+/-</sup> i treću LC3<sup>+/-</sup> miševi. Dio rezultata pokazuje statistički značajnu razliku u broju virusnih čistina u organima ovih miševa.

U plućima ispitivanih skupina miševa dobivena je statistički značajna razlika između prve i treće skupine uz medijan vrijednosti 9 400 PFU za C57bl/6 miševe (aritmetička sredina 11 600 PFU) te 46 000 PFU za LC3<sup>+/-</sup> miševe (uz aritmetičku sredinu 37 500 PFU) pri čemu je izračunata p vrijednost iznosila 0,0312. Rezultati druge ispitivane skupine Atg5<sup>+/-</sup> miševa uz medijan vrijednosti od 14 500 PFU te aritmetičku sredinu koja je iznosila 22 300 PFU nisu pokazali statistički značajnu razliku prema divljem tipu C57bl/6 miševa. Bitno je istaknuti u usporedbi vrijednosti medijana da treća ispitivana skupina LC3<sup>+/-</sup> miševa znatno odskače, odnosno ima znatno veći medijan u odnosu na ostale dvije skupine (Slika 8A).

Rezultati dobiveni brojanjem virusnih čistina dobivenih MCMV-om iz lizata tkiva slezene pokazali su statistički značajnu razliku u broju PFU između svih ispitivanih skupina. Medijani su iznosili 224 000 PFU za prvu skupinu C57bl/6 miševa, 123 500 PFU za drugu skupinu Atg5<sup>+/-</sup> miševa te 600 000 PFU za treću skupinu LC3<sup>+/-</sup> miševa koja odskače apsolutnom vrijednošću. U skupini Atg5<sup>+/-</sup> miševa u odnosu na kontrolne C57bl/6 miševe divljeg tipa pronašli smo statistički značajno manje virusnih čistina uz p vrijednost od 0,0486, dok smo, pak, u skupini LC3<sup>+/-</sup> miševa pronašli statistički značajno više virusnih čistina u odnosu na kontrolne C57bl/6 miševe uz još manju p vrijednost od 0,0362. Daleko najveću statistički

značajnu razliku uočili smo među skupinama  $Atg5^{+/-}$  i  $LC3^{+/-}$  miševa gdje je  $p < 0.0001$ . Medijani vrijednosti, koji su prikazani grafički (Slika 8B), prikazuju navedene razlike i dobro koreliraju s aritmetičkim sredinama.

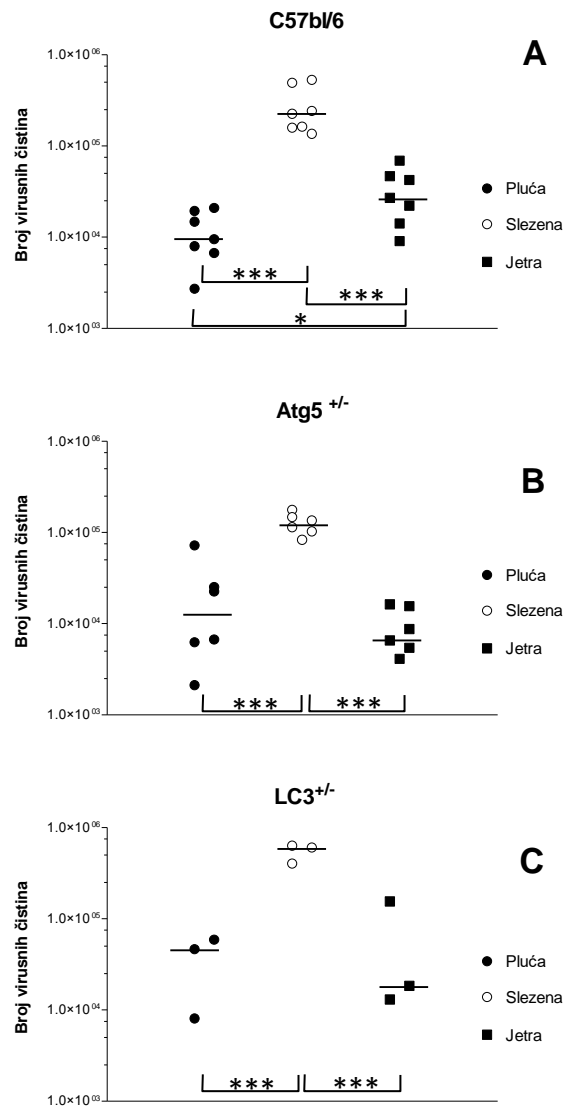


**Slika 8.** Grafički prikaz broja virusnih čistina u plućima, jetri i slezeni C57bl/6,  $Atg5^{+/-}$  i  $LC3^{+/-}$  miševa drugog pokusa. Medijani vrijednosti prikazani su horizontalnim linijama.



U jetrenom tkivu replikacija MCMV u C57bl/6 i Atg5<sup>+/-</sup> miševima bila je statistički značajno različita, s medijanama koji iznose 26 750 PFU te 7 587 PFU pri čemu je  $p=0,0227$  (Slika 8C). Treća ispitivana skupina LC3<sup>+/-</sup> miševa medijanom broja virusnih čistina bila je između ostale dvije skupine (18 250 PFU) i nije pokazivala statistički značajnu razliku u usporedbi sa ostale dvije ispitivane skupine.

Također, analizirali smo broj virusnih čistina po organima unutar ispitnih skupina miševa kako bismo utvrdili u kojem organu se virusi najviše repliciraju. Tako smo u skupini C57bl/6 miševa utvrdili da postoji statistički značajna razlika uspoređujući sva tri organa, slično kao i u ostalim ispitnim skupinama Atg5<sup>+/-</sup> i LC3<sup>+/-</sup> miševa. Međutim, statistički značajna razlika u C57bl/6 miševa između pluća i jetre ( $p=0,026$ ) u ostalim ispitnim skupinama miševa nije prisutna ( $p$  iznosi 0,2573 u Atg5<sup>+/-</sup> miševa, a 0,6451 u LC3<sup>+/-</sup> skupini). Visoku razinu povezanosti pokazuju rezultati analize slezene i jetre u drugoj ispitivanoj skupini gdje je  $p$  vrijednost manja od 0,0001 (Slika 9.).



\*p<0,05  
\*\*\*p<0,001

**Slika 9.** Prikaz analize broja virusnih čistina u tri ispitivane skupine miševa. Horizontalnim linijama su označeni medijani vrijednosti koji pokazuju razlike u broju čistina uzrokovanih MCMV infekcijom. Statistički su značajne sve razlike unutar skupina izuzev odnosa pluća i jetre u B i C.

## 6. Rasprava

Autofagija je izuzetno evolucijski konzervirani mehanizam koji igra bitnu ulogu u više za život ključnih fizioloških procesa uključujući imunitet, preživljavanje stanica, procese diferencijacije, rasta i razvoja kao i stanične homeostaze. Kao citoprotektivni senzor autofagni

procesi uklanjaju sve neprikladne unutarstanične elemente uključujući reaktivne kisikove radikale (ROS), pogrešno svijene ili agregirane proteine, lipide, oštećene organele te invadirajuće mikrobe, uključujući viruse. Niski, bazalni intenzitet procesa autofagije konstitucijski održava staničnu homeostazu kontrolom kvalitete i dinamike prometa unutarstaničnih elemenata. Međutim, ubrzo nakon poticaja, autofagija se značajno intenzivira, pa se citoplazmatske komponente oblažu s *de novo* stvorenim dvomembranskom polumjesečastom tvorbom, nazvanom fagofora. Fagofora se postupno izdužuje sve dok se ne zatvori u vakuolu obloženu dvostrukom membranom nazvanom autofagosom. Proces autofagije se dalje nastavlja spajanjem s lizosomom uz stvaranje vezikule obložene s jednostrukom membranom, nazvane autolizosom, u kojoj se inkapsulirani sadržaji, zajedno s unutarnjom membranom autofagosoma, podvrgavaju razgradnji djelovanjem lizosomske hidrolaze. Na kraju, dobiveni makromolekularni građevni blokovi - aminokiseline, masne kiseline i nukleotidi - izbacuju se u citoplazmu u procesu recikliranja. Iako je molekularna regulacija autofagije trenutno predmet mnogobrojnih istraživanja, njeni mehanizmi još uvijek nisu u potpunosti poznati. Danas je poznato preko 30 autofagnih gena (*ATG*), a u najvećem broju identificirani su u kvascu, dok su odgovarajući humani *ATG* homolozi karakterizirani i u višim eukariotima. Proizvodi gena odgovornih za procese autofagije tvore specifične komplekse koji reguliraju četiri različita stupnja stvaranja autofagosoma a to su: indukcija biogeneze autofagosoma, nukleacija vezikule, elongacija vezikula i fuzija vezikula (28).

Novija otkrića pokazala su da su funkcije autofagije mnogo šire i da ona nadzire i potpomaže niz procesa u organizmu kao što su supresija tumorskog rasta, modulacija imunskog odgovora organizma, proliferacija stanica i druge (2).

Upravo iz tog razloga smo odlučili ispitivati utjecaj autofagije na množenje virusa *in vivo*, odnosno rezultate virusne infekcije u uvjetima oštećenih procesa autofagije. Koristili smo mišji pokusni model, pa smo za eksperimentalne životinje odabrali miševe kojima nedostaju

dva važna proteina za funkciju autofagije, a to su Atg5 i LC3 proteini. Oni su iznimno važni u procesima autofagije pa njihov smanjeni izražaj oštećuje procese autofagije u samom začetku, a to je početak stvaranja autofagosoma. Miševi su bili heterozigoti za gene koji kodiraju ove proteine, tako da je funkcija autofagije u ovom modelu samo oslabljena, a ne u potpunosti odsutna. Razlog zbog kojega nismo koristili miševe s homozigotnom mutacijom ovih gena leži u činjenici da takav, homozigotni oblik ove mutacije, nije spojiv sa životom.

Virus kojeg smo izabrali za infekciju bio je MCMV i to njegova  $\Delta m157$  mutanta. Upravo je za MCMV dokazano da utječe na autofagiju blokadom Beclin 1 proteina (5). Infekciju smo izazivali ovom virusnom mutantom jer je produkt gena *m157* glikoprotein koji inhibira aktivaciju NK stanica (16). Na taj smo način izbjegli eliminaciju virusa posredovanu NK stanicama te smo mogli promatrati razvoj infekcije i njen utjecaj na autofagiju.

Na temelju podataka o dinamici i zakonitostima širenja MCMV-a, inokulirali smo virus intraperitonealno da bismo u što većoj mjeri imitirali prirodnu infekciju. Poznavajući put daljnjeg širenja virusa u organizmu, odlučili smo za analizu određivanja intenziteta replikacije virusa koristiti tkivo pluća, slezene i jetre. U određivanju zastupljenosti MCMV-a u navedenim organima koristili smo test virusnih čistina. Ove čistine određivali smo *in vitro* na stanicama MEF-a, a njihov broj smatrali smo relevantnim podatkom o intenzitetu virusnog umnažanja jer on korelira s brojem virusnih čestica u danom organu.

Promatrajući rezultate pokusa koji se odnose na pluća, primijetili smo da od homogenata pluća LC3<sup>+/-</sup> miševa dobivamo više virusnih čistina u odnosu na divlji tip miševa te u odnosu na Atg5<sup>+/-</sup> miševe. Ta je razlika statistički značajna samo prema divljem tipu miševa. Međutim, usporedbom medijana vrijednosti vidljiv je trend porasta broja virusnih čistina i to tako da su najniže vrijednosti u C57bl/6 miševa, zatim slijede nešto veće vrijednosti u Atg5<sup>+/-</sup> skupini te najviše vrijednosti u posljednjoj skupini LC3<sup>+/-</sup> miševa. Ta činjenica govori u prilog tome da su pluća zasigurno jedan od organa koji je već u ranoj fazi infekcije zaražen virusom i da autofagija

odigrava određenu obrambenu funkciju u tom organu. Nedostatkom Atg5 u eksperimentalnim modelima, dokazano je da alveolarne epitelne stanice tipa 2, koje su uz alveolarne makrofage ciljno mjesto djelovanja MCMV-a, pokazuju razlike u smislu povećane razine glikogena u odnosu na normalne alveolarne stanice tipa 2 u divljim tipovima miševa (30). Time bi se moglo objasniti povećanu replikaciju virusa u Atg5 deficijentnog miša u odnosu na divlji tip jer je poznata smanjena otpornost tih stanica uslijed povećane koncentracije glikogena kao inhibicijskog čimbenika koji smanjuje dopremu kisika do stanica zadebljanjem alveolarno-kapilarne membrane zadužene za funkcijsku izmjenu plinova čime utječe na metabolizam stanice u cjelini. Budući da je funkcija LC3 proteina izražena u svim fazama autofagije, a najizraženija u završnoj fazi, odnosno u spajanju autofagosoma s lizosomima, provedena su istraživanja upravo usmjerena na ispitivanje specifičnosti te faze. Dokazano je da povećani izražaj *LC3* gena u eksperimentalnom modelu sepse u laboratorijskih miševa povećava eliminaciju autofagosoma iz pluća, odnosno njihovo spajanje s lizosomima, i time povećava preživljenje miševa uz blažu ozljedu pluća, a specifična inhibicija fuzije autofagosoma i lizosoma sve te pozitivne učinke poništava (31). Taj podatak objašnjava činjenicu da je upravo u skupini *LC3*<sup>+/-</sup> miševa statistički značajno više virusnih čistina u plućima nego u *C57bl/6* miševa. U navedenom se istraživanju nije koristio MCMV kao virusni model, tako da bi se navedeno objašnjenje trebalo potvrditi specifičnim modelom infekcije MCMV-om uz istu metodologiju i eksperimentalne uvjete kakvi su bili u navedenom istraživanju. Unatoč nepostojanju statistički značajne razlike između Atg5 i LC3 deficijentnih miševa, velika razlika u medijanima vrijednosti, kao i aritmetičkih sredina govori u prilog tome da je utjecaj na autofagiju u ranijim fazama procesa (formiranju autofagosoma) koji posreduje Atg5, znatno manji od izravnog utjecaja na formiranje autolizosoma na što najsnažnije utječe LC3-PE (ATG8-PE), no i dalje pokazuje veću razinu infekcije u odnosu na divlji tip miševa. To znači da učinak ipak postoji te da on pogoduje zadržavanju autofagosoma u plućima zbog

premašenog maksimuma u fazi spajanja autofagosoma i lizosoma, a time i eliminacije tih struktura iz parenhima pluća (31). Takva situacija potencira produljeno zadržavanje virusa u plućima te umanjuje korisne čimbenike koji su dokazani u eksperimentalnom modelu pojačane ekspresije LC3 (31, Slika 7. i 8.).

Prirodni put infekcije MCMV-om nakon ulaska u probavni sustav i njegova prijelaza u krv vodi nas u slezenu gdje virus pokazuje intenzivnu replikaciju. MCMV primarno zahvaća makrofage kojima je slezena iznimno bogata u svojim marginalnim zonama. Pored toga, MCMV pokazuje tropizam i prema brojnim drugim stanicama koje se nalaze u tkivu slezene. Uz makrofage, to su i dendritičke stanice, retikularni fibroblasti, endotelne stanice te stanice hematopoetskog tkiva. Drugi nastup viremije (nakon onoga izazvanog inokulacijom virusa) nastupa tek nakon virusne replikacije u slezeni (32). Iz toga proizlazi da infekcija svih ostalih tkiva, uključujući i pluća i jetru koji su ispitivani ovim pokusom, postaju mjestom infekcije tek nakon što je nastupila druga, sekundarna viremija. To objašnjava činjenicu da je slezena organ koji pokazuje najveći broj virusnih čistina u svim ispitivanim skupinama drugog pokusa (Slika 9.), pogotovo u kontekstu infekcije koja traje tek 7 dana. Također, statistički značajna razlika u broju virusnih čistina pronađena je usporedbom svih skupina drugog pokusa u odnosu na slezenu. To nesporno govori u prilog tome da autofagija, kao unutarstanični faktor, modificira odgovor tkiva slezene na infekciju MCMV-om. O mehanizmima te aktivnosti nema adekvatnih istraživanja, no čini se da bi MCMV u organizmu u kojem je funkcija autofagije oslabljena, mogao koristiti stanice za koje ima tropizam za još intenzivnije vlastito umnažanje i brži prodor u krv u fazu sekundarne viremije. No, s druge strane, osobito u virusa poput citomegalovirusa, koji su se tijekom milijuna godina koevolucije s domaćinom izvrsno prilagodili životnim uvjetima, moguće je da koriste mehanizme autofagije za vlastitu propagaciju, pa bi se statistički značajno smanjena replikacija virusa, kakva je primjećena u jetri i slezeni  $Atg5^{+/-}$  miševa u odnosu na kontrolne miševe, mogla na taj način objasniti. Ipak,

u teškom oštećenju autofagije koja se događa djelomičnim utišavanjem ključnog autofagnog proteina LC3, primijećena je statistički značajno pojačana replikacija virusa u plućima i slezeni u odnosu na kontrolne miševe.

U jetrenom se tkivu primjećuje nešto drugačiji trend u odnosu na ostale organe. Miševi LC3<sup>+/-</sup> pokazuju nižu srednju vrijednost od divljeg tipa virusa, kao i Atg5<sup>+/-</sup> čija je razlika u vrijednostima čak i u razini statističke značajnosti. Uočena razlika predstavlja temelj za daljnja istraživanja koja bi utvrdila postoji li uzročno posljedična povezanost pojačane aktivnosti virusa u slezeni i plućima u odnosu na aktivnost virusa u jetri i transport virusa do tih organa u uvjetima oslabljene autofagije u modelima miševa koji su heterozigoti za Atg5 i LC3 proteine. Također, podatak da postoji statistički značajna razlika u broju virusnih čistina između pluća i jetre u divljeg tipa, dok u Atg5<sup>+/-</sup> i LC3<sup>+/-</sup> miševa nije u rasponu statističke značajnosti, govori u prilog tome da pojačana aktivnost virusa u slezeni, koja se očituje povećanjem broja virusnih čistina, na neki način modulira životni ciklus virusa u njegovom transportu i replikaciji u analiziranim organima.

Analizom broja virusnih čistina po organima utvrdili smo da najveći intenzitet virusne replikacije pokazuje slezena (Slika 9.). Zanimljivo je primijetiti kako su visoke vrijednosti u slezeni praćene srednjim vrijednostima u plućima, odnosno najnižim vrijednostima u jetri kod Atg5<sup>+/-</sup> i LC3<sup>+/-</sup> miševa. U C57bl/6 miševa slezena također pokazuje najveću vrijednost broja PFU, međutim prvi sljedeći organ je u ovom slučaju jetra pa tek onda pluća. I ova činjenica pokazuje da autofagija ima ulogu u propagaciji MCMV infekcije i njenih manifestacija na različitim organima mijenjajući dinamiku infekcije.

Poznato je da se unutar stanica virusi uništavaju procesima autofagije (ksenofagije), pa bi njeno oštećenje moglo voditi u intenziviranje procesa replikacije virusa, a time i u povećanje broja virusnih čistina koje smo zapazili (Slika 8.). Budući da je autofagija jedan od važnijih antivirusnih mehanizama u sklopu imunskog sustava domaćina, neki su virusi uspješno razvili

mehanizme imunskog izbjegavanja interferirajući sa autofagnim procesima. Herpesvirusi, kojima pripada i citomegalovirus, najdalje su otišli u razvoju ovih imunosubverzivnih mehanizama kojim mogu osujetiti staničnu autonomnu obranu i steći prednost u replikaciji. Po tome su herpesvirusi i jedan od najboljih primjera virusa koji su se razvili sa svojim domaćinima, do te mjere da su kadri uspostaviti cjeloživotnu latenciju nakon završetka primarne litičke infekcije. Kao dio njihove strategije za kompromitaciju imunskog nadzora domaćina, sve tri podobitelji herpesvirusa ( $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ - herpesvirusi) kodiraju virusne proteine koji potkopavaju mehanizme autofagije, jer bi ona u suprotnom mogla sudjelovati u sprječavanju virusne replikacije (28).

Budući da je u našem modelu autofagija oslabljena u mjeri koju je teško procijeniti, svakako bi bilo poželjno istraživati intenzitet MCMV replikacije u uvjetima potpunog odsustva autofagnih procesa. Stoga bi prijedlog daljnjih istraživanja, koji proizlaze iz rezultata ovog diplomskog rada, mogao biti ispitivanje replikacije MCMV u uvjetima potpunog onesposobljavanja autofagnih procesa *in vivo* ili *in vitro*.

U ovom diplomskom radu utvrdili smo da autofagni procesi igraju ulogu u replikaciji MCMV. Iako se radi o mišjem virusu, postoji velika homologija prema HCMV, što omogućava da se istraživanja na mišjem modelu preslikaju na čovjeka. Otkriće povezanosti mehanizama autofagije i replikacije herpesvirusa na molekularnoj razini moglo bi voditi razjašnjavanju jedne od najdominantnijih prednosti ovih nametnika u odnosu na imunski sustav, a to je sposobnost uspostave latencije. Budući da procesi autofagije obuhvaćaju i ksenofagiju, njezino terapijsko ciljano usmjeravanje i intenziviranje moglo bi omogućiti liječenje nekih latentnih virusnih infekcija u koje ubrajamo ne samo HCMV infekciju, nego i infekcije s drugim herpes virusima.



## 7. Zaključak

- 1) Heterozigotno utišavanje LC3 proteina dovodi do povećane proizvodnje MCMV virusa u plućima miševa u odnosu na C57bl/6 kontrolnu skupinu miševa
- 2) Heterozigotni nedostatak Atg5 proteina vodi u statistički značajno smanjenje replikacije MCMV u slezeni miševa,  $p < 0,05$
- 3) Nedostatak LC3 proteina u heterozigotnih LC3<sup>+/-</sup> miševa izaziva statistički značajno povećanje replikacije u slezeni miševa u odnosu na C57bl/6 kontrolnu skupinu miševa
- 4) LC3 heterozigotno utišavanje dovodi do statistički značajnog povećanja MCMV replikacije u slezeni miševa u odnosu na Atg5<sup>+/-</sup> miševe,  $p < 0.001$
- 5) Heterozigotni nedostatak Atg5 proteina izaziva statistički značajno manju replikaciju MCMV u jetri u odnosu na C57bl/6 kontrolnu skupinu miševa
- 6) Slezena miševa pokazuje statistički značajno veću replikaciju MCMV u odnosu na jetru i pluća, kako u C57bl/6, tako i u Atg5<sup>+/-</sup> i LC3<sup>+/-</sup> miševa,  $p < 0.001$

## 8. Sažetak

Autofagija je proces koji, pored svoje temeljne funkcije uklanjanja tvari koje stanici nisu potrebne, sudjeluje u nizu životno važnih procesa u organizmu. Upravo zbog toga smo, u eksperimentalnom mišjem modelu, odlučili promatrati kako oslabljena funkcija autofagije utječe na dinamiku i širenje virusne infekcije. Virus koji smo koristili u istraživanju jest mišji citomegalovirus (MCMV) i to njegova  $\Delta m157$  mutanta koji ima svojstvo inhibicije stanica NK. Korišteni su miševi heterozigoti za gene koji kodiraju proteine Atg5 i LC3 za koje je poznato da imaju ključnu ulogu u procesu autofagije, a kao kontrolnu smo skupinu koristili smo C57bl/6 miševe divljeg tipa.

Infekcija miševa provedena je interaperitonealnom inokulacijom  $2 \times 10^5$  PFU MCMV  $\Delta m157$  te žrtvovanjem, vađenjem i titracijom slezene, jetre i pluća sedmog dana od inokulacije. Broj virusa u organima kvantificirali smo metodom određivanja virusnih čistina *in vitro* nakon četverodnevne inkubacije čiji broj korelira s intenzitetom replikacije virusa u organizmu četvrtog dana od dana vađenja organa.

Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u broju PFU u slezeni između sve tri ispitne skupine uz najveći broj virusnih čistina u LC3<sup>+/-</sup> miševa. U plućima i slezeni smo našli statistički značajno veći broj PFU u skupini LC3<sup>+/-</sup> miševa u odnosu kontrolne skupine, dok su jetra i slezena pokazale statistički značajno manji broj PFU u skupini Atg5<sup>+/-</sup> miševa u odnosu na kontrolne miševe.

Zaključno, dobiveni rezultati dokazuju da oštećenje autofagije zbog deficijencije Atg5 i LC3 proteina utječe na intenzitet replikacije MCMV-a, što donosi doprinos poznavanju imunobiologije herpes virusa.

**Ključne riječi:** autofagija, mišji citomegalovirus, Atg5 deficijentni miš, LC3 deficijentni miš

## 9. Summary

Autophagy is a mechanism of intracellular degradation which plays important roles in many physiological processes. This is the reason we performed an experiment in which function of autophagy was decreased. Virus used for the experiment was murine cytomegalovirus (MCMV)  $\Delta$ m157 mutant, which inhibits activation of the natural killer cells. Mice used in the experiment were heterozygous for the mutation of Atg5 and LC3 proteins which play key role in the process of autophagy, with C57bl/6 mice being the control group.

The experiment was performed by intraperitoneal inoculation of  $2 \times 10^5$  PFU MCMV  $\Delta$ m157. Mice were sacrificed and organs (lungs, liver and spleen) were titrated seven days after inoculation. The number of viral particles was quantified by plaque-forming unit (PFU) *in vitro* method. PFUs were counted and were considered to correlate with the intensity of the viral replication in the organism after a four-day incubation period. That was performed on the eleventh day.

Results have shown that the spleen is a major site of viral replication. There is statistically significant difference among all three mouse groups in the spleen tissue with the highest PFU number in mice lacking LC3. Statistically significant higher results were obtained in the lung and spleen tissue of LC3<sup>+/-</sup> mice than in the control group. Atg5<sup>+/-</sup> mice obtained a statistically significant lower number of PFUs when compared to control group of mice.

In conclusion, these results implicate that intensity of viral replication is strongly influenced by depletion of Atg5 or LC3 proteins. That contributes to a better knowledge of the immunobiology of the herpes viruses.

**Key words:** autophagy, murine cytomegalovirus, mice lacking Atg5, mice lacking LC3

## Literatura

- 1) Xie Z, Klionsky D. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*. 2007;9(10):1102-1109.
- 2) Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology*. 2013;15(8):1017-1017.
- 3) Mihaylova M, Shaw R. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature Cell Biology*. 2011;13(9):1016-1023.
- 4) Liang X, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hilbshoosh H et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin1. *Nature*. 1999;402:672–676.
- 5) Jackson W. Viruses and the autophagy pathway. *Virology*. 2015;479-480:450-456.
- 6) Chaumorcel M, Lussignol M, Mouna L, Cavignac Y, Fahie K, Cotte-Laffitte J et al. The Human Cytomegalovirus Protein TRS1 Inhibits Autophagy via Its Interaction with Beclin 1. *Journal of Virology*. 2011;86(5):2571-2584.
- 7) Krmpotic A, Bubic I, Polic B, Lucin P, Jonjic S. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes and Infection*. 2003;5(13):1263-1277.
- 8) Shanley J, Biczak L, Forman S. Acute Murine Cytomegalovirus Infection Induces Lethal Hepatitis. *Journal of Infectious Diseases*. 1993;167(2):264-269.
- 9) Katzenstein D, Yu G, Jordan M. Lethal Infection with Murine Cytomegalovirus after Early Viral Replication in the Spleen. *Journal of Infectious Diseases*. 1983;148(3):406-411.
- 10) Campbell A, Slater J, Futch W. Murine cytomegalovirus-induced suppression of antigen-specific cytotoxic T lymphocyte maturation. *Virology*. 1989;173(1):268-275..
- 11) Trgovcich J, Štimac D, Polić B, Krmpotić A, Pernjak-Pugel E, Tomac J et al. Immune responses and cytokine induction in the development of severe hepatitis during acute infections with murine cytomegalovirus. *Archives of Virology*. 2000;145(12):2601-2618.

- 12) Fields B, Griffin D, Howley P, Knipe D. Fields virology. 1st ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.;2675-2706.
- 13) Welsh R. Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function. *Journal of Experimental Medicine*. 1991;173(5):1053-1063.
- 14) Scalzo A. Cmv-1, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *Journal of Experimental Medicine*. 1990;171(5):1469-1483.
- 15) Daniels K, Devora G, Lai W, O'Donnell C, Bennett M, Welsh R. Murine Cytomegalovirus Is Regulated by a Discrete Subset of Natural Killer Cells Reactive with Monoclonal Antibody to Ly49h. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001;194(1):29-44.
- 16) Arase H. Direct Recognition of Cytomegalovirus by Activating and Inhibitory NK Cell Receptors. *Science*. 2002;296(5571):1323-1326.
- 17) Polic B, Jonjic S, Pavic I, Crnkovic I, Zorica I, Hengel H et al. Lack of MHC class I complex expression has no effect on spread and control of cytomegalovirus infection in vivo. *Journal of General Virology*. 1996;77(2):217-225.
- 18) Podlech J, Reddehase M, Holtappels R, Steffens H, Wirtz N. Reconstitution of CD8 T cells is essential for the prevention of multiple-organ cytomegalovirus histopathology after bone marrow transplantation. *Journal of General Virology*. 1998;79(9):2099-2104.
- 19) M.J. Reddehase, S. Jonjic, F.Weiland,W. Mutter, U.H. Koszinowski, Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adrenalitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors, *J. Virol*. 62 (1988) 1061–1065.
- 20) Puleston D, Zhang H, Powell T, Lipina E, Sims S, Panse I et al. Autophagy is a critical regulator of memory CD8+T cell formation. *eLife*. 2014;3.

- 21) Reusch U, Muranyi W, Lucin P, Burgert H, Hengel H, Koszinowski U. A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *The EMBO Journal*. 1999;18(4):1081-1091.
- 22) Babic M, Pyzik M, Kielczewska A, Krmpotic A, Vidal S, Jonjic S. The MCMV m04 protein plays a key role in prevention of NK cell activation via „missing self“ mechanism. 2009 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society. Zagreb: :Hrvatsko prirodoslovno društvo; 2009.
- 23) Voigt V, Forbes C, Tonkin J, Degli-Esposti M, Smith H, Yokoyama W et al. Murine cytomegalovirus m157 mutation and variation leads to immune evasion of natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(23):13483-13488.
- 24) Jonjic S, Krmpotic A, Arapovic J, Koszinowski U. Dissection of the Antiviral NK Cell Response by MCMV Mutants. *Innate Immunity*. 2008;:127-149.
- 25) Reddehase M. *Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention*. Volume II. 1st ed. Caister Academic Press; 2013.
- 26) Farrell H, Lawler C, Oliveira M, Davis-Poynter N, Stevenson P. Alveolar Macrophages Are a Prominent but Nonessential Target for Murine Cytomegalovirus Infecting the Lungs. *Journal of Virology*. 2015;90(6):2756-2766.
- 27) Brune W, Hengel H, Koszinowski U. A Mouse Model for Cytomegalovirus Infection. *Current Protocols in Immunology*. 2001.
- 28) Hee Jin Kim, Stacy Lee, and Jae U. Jung: When autophagy meets viruses: a double-edged sword with functions in defense and offense. *Semin Immunopathol*. 2010 December ; 32(4): 323–341.)
- 29) 1. Martens S. No ATG8s, no problem? How LC3/GABARAP proteins contribute to autophagy. *The Journal of Cell Biology*. 2016;:jcb.201611116.

- 30) Cheong H, Wu J, Gonzales L, Guttentag S, Thompson C, Lindsten T. Analysis of a lung defect in autophagy-deficient mouse strains. *Autophagy*. 2013;10(1):45-56.
- 31) Lo S, Yuan S, Hsu C, Cheng Y, Chang Y, Hsueh H et al. Lc3 Over-Expression Improves Survival and Attenuates Lung Injury Through Increasing Autophagosomal Clearance in Septic Mice. *Annals of Surgery*. 2013;257(2):352-363.
- 32) Zhang S, Xiang J, Theuns S, Desmarets L, Trus I, Nauwynck H. MCMV exploits the spleen as a transfer hub for systemic dissemination upon oronasal inoculation. *Virus Research*. 2016;217:47-54.

## **Životopis**

Josip Aničić je rođen 22. svibnja 1992. godine u Rijeci. Osnovnu je školu završio u Osnovnoj školi Rikard Katalinić Jeretov Opatija, a opću gimnaziju u Gimnaziji Eugena Kumičića Opatija. 2011. godine upisuje Medicinski fakultet u Rijeci te je tokom studija demonstrator na Zavodu za histologiju i embriologiju, Zavodu za fiziologiju, patofiziologiju i imunologiju i Katedri za internu medicinu Medicinskog fakulteta u Rijeci. Sudjelovao je u programu ljetnih razmjena u CHU Grenoble u Francuskoj te Ohojec Szpital Katowice u Poljskoj na odjelima kardiologije.

Laureatom je Rektorove zahvale te Dekanove nagrade za studentski aktivizam 2016. godine te Rektorovih nagrada za najboljeg studenta Medicinskog fakulteta u Rijeci, za studentski aktivizam i posebnog Rektorovog priznanja za najboljeg studenta Sveučilišta u Rijeci 2017. godine.

Bio je članom niza povjerenstava i radnih tijela Fakulteta i Sveučilišta od kojih se izdvaja članstvo u Dekanskom kolegiju Medicinskog fakulteta u tri uzastopne godine te članstvo u Senatu Sveučilišta u Rijeci. Dužnost predsjednika Studentskog zbora Medicinskog fakulteta u Rijeci je obnašao u dva uzastopna mandata, a od listopada 2014. godine obnaša dužnost predsjednika studentske udruge FOSS MedRi.

Autor je nekoliko znanstvenih radova te poster prezentacija uz niz aktivnih i pasivnih sudjelovanja na simpozijima u Hrvatskoj i inozemstvu.