

# UTJECAJ INHIBITORA PROTEINA BCL-2 OBITELJI NA STVARANJE MEMORIJSKIH CD8 LIMFOCITA T

---

**Majnarić, Dora**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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:184:707942>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-06**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dora Majnarić

**UTJECAJ INHIBITORA PROTEINA BCL-2 OBITELJI NA  
STVARANJE MEMORIJSKIH CD8 LIMFOCITA T**

Diplomski rad

RIJEKA, 2021.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dora Majnarić

**UTJECAJ INHIBITORA PROTEINA BCL-2 OBITELJI NA  
STVARANJE MEMORIJSKIH CD8 LIMFOCITA T**

Diplomski rad

RIJEKA, 2021.

Mentor rada: Izv.prof.dr.sc. Felix M. Wensveen

Komentor: dr.sc. Inga Kavazović, poslijedoktorand na Zavodu za histologiju i embriologiju

Diplomski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_, u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima \_\_\_\_\_ stranica, \_\_\_\_\_ slika, \_\_\_\_\_ tablica, \_\_\_\_\_ literaturnih navoda.

## *Zahvala*

*Zahvaljujem svom mentoru izv.prof.dr.sc. Felixu Wensveen i komentoru dr.sc. Ingi Kavazović na svim korisnim savjetima, pruženoj pomoći, velikom razumijevanju i uloženom trudu prilikom izrade ovog diplomskog rada. Hvala Vam što ste imali strpljenja za sva moja pitanja.*

*Veliku zahvalnost dugujem svojim prijateljima i kolegama koji su mi provedeno vrijeme na fakultetu uljepšali. Hvala Vam na svakom studentskom danu koje nikada neću zaboraviti.*

*Posebno se želim zahvaliti svojim roditeljima, Zvezdani i Željku na pružanju bezuvjetne podrške, potpore i motivacije tijekom cijelog studiranja i svojoj sestri Ivani na svim korisnim savjetima i pomoći. Hvala Vam što ste uvijek tu.*

*Filipe, hvala ti što su uvijek uz mene.*

## SAŽETAK

Imunost posredovana CD8 limfocitima T ima presudnu ulogu u zaštiti našeg tijela od infekcija uzrokovanih unutarstaničnih patogenima. Nakon uklanjanja uzročnika infekcije, većina antigen-specifičnih CD8 limfocita T odumire apoptozom, ostavljajući za sobom malu populaciju dugovječnih memorijskih stanica. Još uvijek nisu razjašnjeni mehanizmi koji reguliraju diferencijaciju CD8 limfocita T. Nedavna istraživanja ukazala su na važnost intenziteta signala na T-stanični receptor i ispoljavanja proteina BCL-2 obitelji u procesu diferencijacije u memorijske stanice. Ovim istraživanjem utvrđen je utjecaj specifičnih inhibitora proteina BCL-2 obitelji na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T *in vitro*. Najprije je uspostavljen i validiran *in vitro* model korištenjem čiste populacije CD8 limfocita T dobivene pomoću magnetske separacije stanica iz slezene transgeničnih OT-1 miševa. Stanice su stimulirane s peptidima različitog afiniteta za T-stanični receptor, SIINFEKL (N4) i SIIQFEKL (Q4) te s inhibitorom BAI1 (inhibitor BAX molekule) i ABT-199 (inhibitor BCL-2 molekule). Fenotipske i funkcionalne karakteristike te postotak preživljenja stanica su praćene pomoću protočne citometrije koristeći specifična protutijela. CD8 limfociti T stimulirani s peptidom visokog afiniteta (N4) bolje poprimaju efektorski fenotip (ispoljavaju više razine CD25, CD69 i CD44), dok stanice stimulirane s peptidom nižeg afiniteta (Q4) brže poprimaju memorijski fenotip (ispoljavaju više razine CD127, CCR7 i CD62L). Inhibicija molekule BAX, odnosno inkubacija stanica s BAI1 inhibitorom nije imala utjecaj na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T, bez obzira jesu li stanice stimulirane N4 ili Q4 peptidom. Inhibicija molekule BCL-2 (inhibitor ABT-199) je rezultirala smanjenim preživljenjem stanica nižeg afiniteta (Q4) u prvim danima nakon stimulacije pri većim koncentracijama inhibitora u odnosu na stanice višeg afiniteta (N4).

**Ključne riječi:** CD8 limfociti T, afinitet vezanja, imunološka memorija, inhibitori

## SUMMARY

Immunity mediated by CD8 T cells plays a crucial role in protecting our body from infections caused by intracellular pathogens. After removal of the infectious agent, most antigen-specific CD8 T cells die by apoptosis, leaving behind a small population of long-lived memory cells. The mechanisms that regulate CD8 T cell differentiation have not yet been elucidated. Recent studies indicate the importance of T-cell receptor signal intensity and BCL-2 protein family expression in the process of differentiation into memory cells. Here, we determined the effect of specific BCL-2 protein family inhibitors on the formation of memory CD8 T cells *in vitro*. First, an *in vitro* model was established and validated using a pure population of CD8 T lymphocytes obtained by magnetic separation of splenocytes from OT-1 mice. Cells were stimulated with peptides of different affinity for the T-cell receptor, SIINFEKL (N4) and SIIQFEKL (Q4) and with inhibitors - BAI1 (inhibitor of BAX) and ABT-199 (inhibitor of BCL-2). Phenotypic and functional characteristics and cell survival were analysed by flow cytometry. CD8 T cells stimulated with high affinity peptide (N4) acquire effector phenotype (higher levels of CD25, CD69 and CD44) faster than cells stimulated with lower affinity peptide (Q4) which express higher levels of memory markers (CD127, CD62L and CCR7). Inhibition of the BAX molecule or incubation of cells with a BAI1 inhibitor had no effect on the formation of memory CD8 T cells, regardless of the affinity. Inhibition of the BCL-2 molecule (ABT-199 inhibitor) resulted in reduced survival of lower affinity cells (Q4) in the first days after stimulation at higher concentrations of inhibitors relative to higher affinity cells (N4 stimulated).

**Key words:** CD8 T cells, affinity, immunological memory, inhibitors

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Imunološki sustav .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Prirođeni i stečeni imunološki sustav .....	2
<b>1.2. Diferencijacija CD8 limfocita T .....</b>	<b>5</b>
1.2.1. Početna aktivacija CD8 limfocita T .....	6
1.2.2. Diferencijacija u efektorske CD8 limfocite T .....	7
1.2.3. Kontrakcija CD8 limfocita T i stvaranje imunološke memorije .....	7
<b>1.3. Uloga intenziteta signala na diferencijaciju CD8 limfocita T .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4. Apoptoza .....</b>	<b>11</b>
<b>1.5. Inhibitori .....</b>	<b>16</b>
<b>2. CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Materijali.....</b>	<b>19</b>
3.1.1. Laboratorijske životinje .....	19
3.1.2. Mediji za uzgoj stanica .....	19
3.1.3. Ostali puferi i mediji.....	20
3.1.4. Peptidi .....	20
3.1.5. Inhibitori .....	20
3.1.6. Monoklonska protutijela.....	21
3.1.7. Ostali reagensi .....	22
<b>3.2. Metode .....</b>	<b>22</b>
3.2.1. Izolacija limfocita iz slezene .....	22
3.2.2. Dobivanje čiste populacije CD8 limfocita T magnetskom separacijom .....	22
3.2.3. Određivanje broja stanica .....	23
3.2.4. <i>In vitro</i> model za formiranje memorijskih CD8 limfocita T .....	23
3.2.5. Fenotipska analiza protočnom citometrijom .....	23



<b>4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1. Uspostavljanje <i>in vitro</i> modela za stvaranje memorijskih CD8 limfocita T .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2. Rezultati funkcionalne analize memorijskih CD8 limfocita T u <i>in vitro</i> modelu .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3. Fenotipska analiza CD8 limfocita T stimuliranih <i>in vitro</i> s peptidima visokog (N4) ili niskog (Q4) afiniteta za T-stanični receptor .....</b>	<b>28</b>
<b>4.4. Utjecaj inhibitora BAI1 na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T <i>in vitro</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>4.5. Utjecaja inhibitora ABT-199 na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T <i>in vitro</i> ...</b>	<b>32</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>35</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>39</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>40</b>
<b>POPIS SLIKA I GRAFOVA .....</b>	<b>47</b>
<b>POPIS KORIŠTENIH SKRAĆENICA .....</b>	<b>48</b>
<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>50</b>

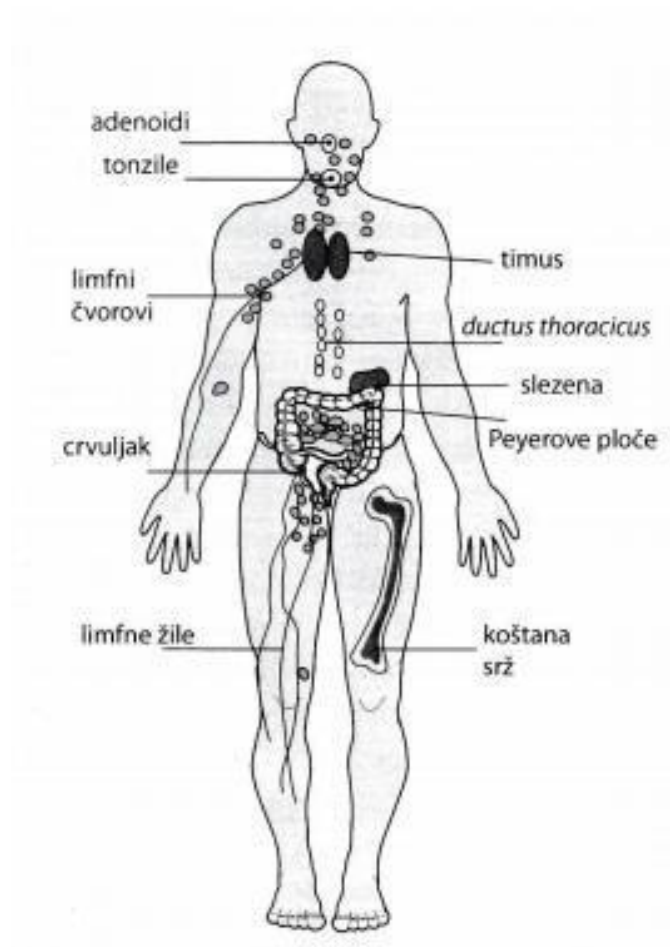
# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA

## 1.1. Imunološki sustav

Imunološki sustav je skup organa i tkiva s mnogo različitih, visoko specijaliziranih stanica s glavnim ciljem zaštite našeg organizma od napada stranih patogena i tumora. Organe i tkiva imunološkog sustava možemo podijeliti na primarne i sekundarne. U primarne spadaju timus i koštana srž, dok periferne organe čine slezena, limfni čvorovi i limfno tkivo pridruženo sluznicama dišnog, probavnog i spolno – mokraćnog sustava (MALT, engl. *mucosal-associated lymphoid tissue*). Stanice imunološkog sustava su limfociti, fagociti te predočne stanice. Usklađena reakcija spomenutih stanica i molekula koje one produciraju prilikom susreta s patogenima čini imunološki odgovor (1).

Glavna i najvažnija fiziološka funkcija imunološkog sustava je prevencija ili iskorjenjivanje određene infekcije. Zapaženo je da su osobe s oštećenim imunološkim odgovorom osjetljive na teške upale, čime im se značajno smanjuje kvaliteta života. S druge strane, cijepljenje funkcionira po principu poticanja imunološkog odgovora na mikroorganizme, a smatra se jednom od najučinkovitijih metoda za zaštitu od infekcija. Ukoliko dođe do prekida programa cijepljenja, može doći i do ponovnog pojavljivanja zaraznih bolesti na tim područjima, dok su u ostalim dijelovima svijeta te bolesti uglavnom iskorijenjene. Osim zaštite od mikroorganizama, imunološki sustav sprječava rast nekih tumora, dok se ostali oblici mogu liječiti poticanjem imunoloških odgovora na nastale tumorske stanice. Također, imunološki sustav igra važnu ulogu u procesu uklanjanja mrtvih stanica te pokretanju mehanizama za popravak tkiva. U slučaju poremećenog imunološkog odgovora dolazi do pojave različitih zaraznih bolesti koje posljedično utječu na visoki morbiditet i mortalitet (1).

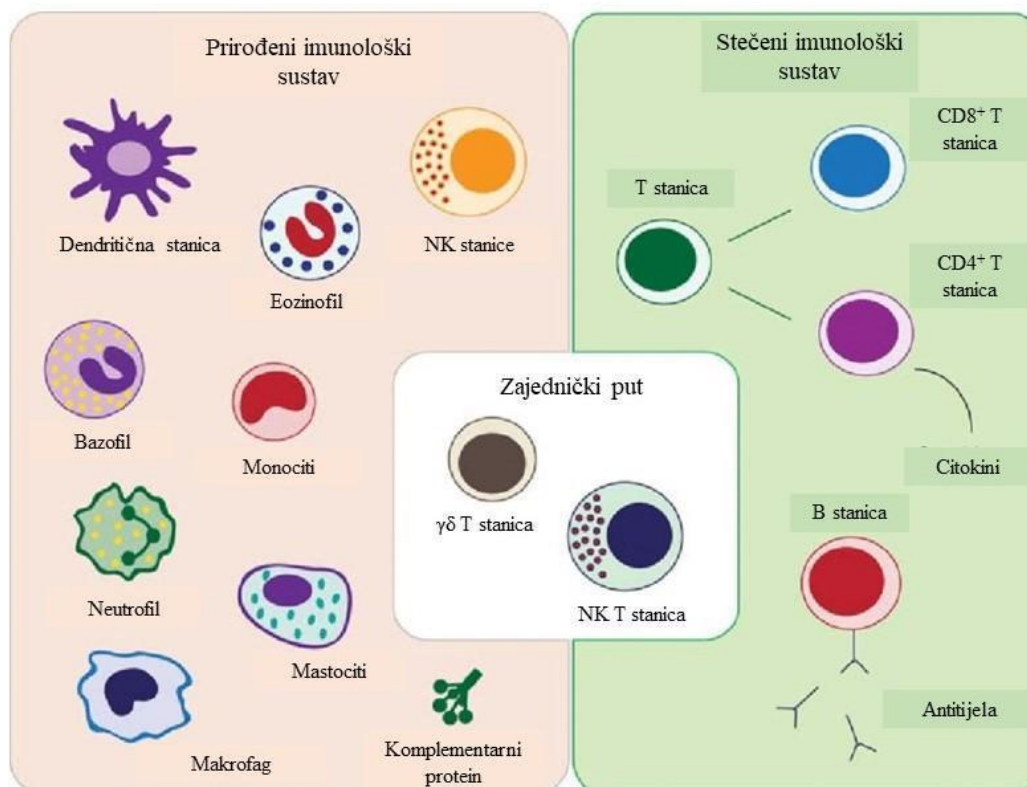
Imunološki sustav može se podijeliti na dva glavna dijela: prirođeni i stečeni imunološki sustav. Oba imaju odvojenu funkciju, ali u velikoj mjeri međusobno djeluju.



**Slika 1.** Tkiva i organi imunološkog sustava (2)

### 1.1.1. Prirođeni i stečeni imunološki sustav

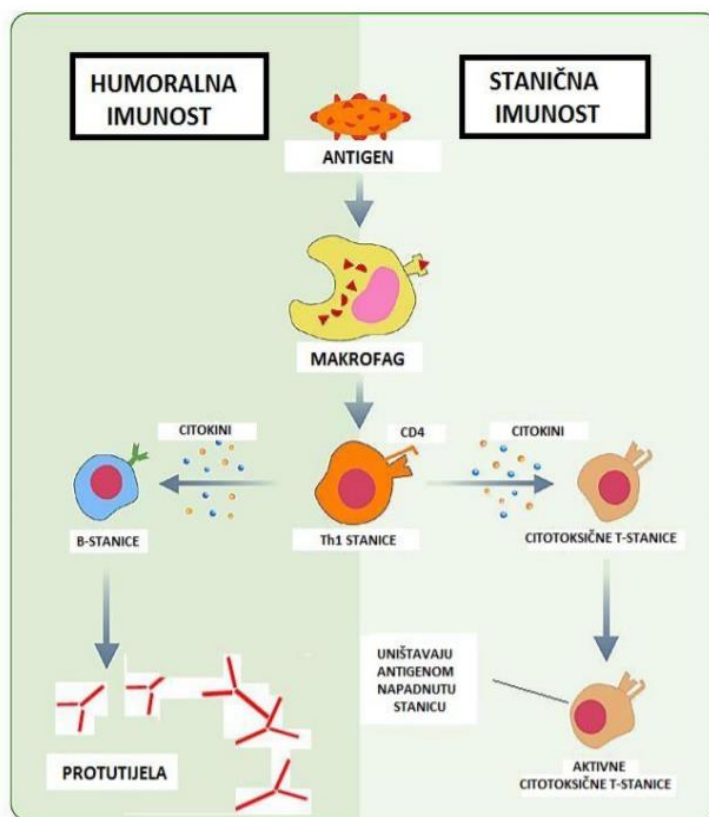
Glavni mehanizmi obrane našeg organizma od stranih tvari (antigena) su: prirođena imunost koja sudjeluje u ranim fazama zaštite od infekcije te stečena imunost, kojoj treba duže vremena da se razvije te koja pruža više specijaliziranu obranu od infekcija.



**Slika 2.** Razlike i sličnosti prirodnog i stečenog imunološkog sustava (3)

Kao što mu samo ime govori, prirodni imunološki sustav prisutan je i potpuno funkcionalan od rođenja te predstavlja prvi korak u kontroli i obrani od infekcija. Osim toga, zadužen je i za aktivaciju specijaliziranih stanica, u slučaju da njegov odgovor nije dovoljan da ukloni opasnost. Važna funkcija prirodne imunosti je i uklanjanje mrtvih stanica i pokretanje procesa zacjeljivanja tkiva nakon oštećenja. Prirodni imunološki sustav sastoji se od mnogo različitih stanica, koje imaju visoko specijalizirane funkcije, od kojih je svaka uključena u sprječavanje različitih opasnosti. Prepoznavanje patogena prvenstveno se događa vezanjem određenog skupa receptora na uobičajene molekularne obrasce povezane s patogenima (PAMP – engl. *pathogen-associated molecular patterns*) ili molekularnim obrascima oštećenja patogenima (DAMP – engl. *damage-associated molecular patterns*). Glavna razlika između prirodnog i stečenog imunološkog odgovora je ta što prirodni nema sposobnost pamćenja te će pristupiti svakom patogenu kao da se svaki put, po prvi put susreću. Zbog smanjene mogućnosti "učenja", stanice prirodne imunosti su slabije opremljene za ciljanje patogena ili tumora koji su stekli značajke koje štite ili skrivaju PAMP-ove kako bi izbjegli prepoznavanje od strane imunološkog sustava (4).

Postoje dvije vrste stečene imunosti, a to su humoralna i stanična imunost. S obzirom na prethodnu tvrdnju, dijelimo i stanice stečene imunosti na dvije glavne vrste: limfocite B (sazrijevaju u koštanoj srži) i štite nas od izvanstaničnih mikroorganizama i limfocite T (sazrijevaju u timusu) koji nas štite od unutarstaničnih mikroorganizama. Zdrava osoba ima  $0,5 - 1 \times 10^{12}$  limfocita. Kada govorimo o morfologiji, svi su limfociti slični te ih je teško razlikovati po njihovom izgledu. Međutim, limfociti su heterogeni po porijeklu, ulogama i fenotipu te su predodređeni za pokretanje složenih bioloških odgovora. Osim toga, limfociti su različiti prema proteinima koji se nalaze na površini stanica koji se s lakoćom mogu utvrditi koristeći monoklonska protutijela (1).



**Slika 3.** Razlike između humoralne i stanične imunosti (5)

Limfociti B su ključni za humoralnu imunost. Spomenute stanice eliminiraju patogene i toksine stvaranjem topljivih receptora koji se nazivaju protutijela. Limfociti T su odgovorni za eliminaciju zaraženih stanica na temelju mehanizma specifičnog prepoznavanja antigena. T-stanični receptor (engl. TCR – *T cell receptor*) prepoznaje antigen koji je predodređen u sklopu molekula glavnoga kompleksa tkivne podudarnosti, MHC (engl. *Major histocompatibility*

*complex*). MHC molekule se nalaze na površinama specijaliziranih stanica koje se nazivaju antigen-prezentirajuće stanice. Postoje dvije podgrupe limfocita T - CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfociti T. CD4<sup>+</sup> limfociti T nazivaju se i "pomagačkim" T stanicama, zato što pomažu limfocitima B da luče protutijela te fagocitima prilikom uništavanja mikroorganizama. Osim toga imaju važnu ulogu i u aktiviranju CD8<sup>+</sup> limfocita T koje se nazivaju i citotoksičnim limfocitima T jer su uključene u ubijanje zaraženih stanica putem niza citotoksičnih molekula. Kao što je prethodno spomenuto, limfociti B i T imaju prednost nad stanicama prirođenog imunološkog sustava jer njihovo prepoznavanje nije ograničeno na određeni skup PAMP-ova. Sposobnost prepoznavanja velikog broja različitih molekula putem B- i T- staničnog receptora (BCR ili TCR) leži u činjenici da svaka stanica izražava svoj jedinstveni receptor. To se postiže homolognom rekombinacijom genskih elemenata koji čine BCR ili TCR, što se u svakoj stanici, odnosno klonu događa drugačije (1). TCR kompleks sastoji se od promjenjivog  $\alpha$  i  $\beta$  lanca, dok su na membrani postavljeni konstantni  $\gamma$ ,  $\delta$  i  $\epsilon$  lanci, a unutarstanično se nalazi  $\zeta$  lanac.  $\alpha$  i  $\beta$  lanac se sastoji od tri regije: varijabilne (V), vezne (J) i konstante (C) dok  $\beta$  lanac ima i dodatnu regiju raznolikost (D) za daljnje povećanje potencijalne raznolikosti klonova. To se postiže nasumičnim dodavanjem i/ili uklanjanjem nukleotida na mjestima rekombinacije, što konačno rezultira receptorskim repertoarom s potencijalnom raznolikošću od približno  $10^{18}$  kombinacija (6). Prije susreta s antigenom, svaki klon limfocita prisutan je u jednoj ili samo nekoliko kopija. Stoga se repertoar naivnih limfocita T sastoji od milijuna različitih klonova, od kojih je svaki jedinstven na temelju svog TCR-a. Mnogi klonovi nikada ne susretnu svoj antigen i zauvijek ostaju u 'naivnom' stanju, dok klonovi limfocita koji prepoznaju srodni antigen pokreću strogo regulirani proces aktivacije. Aktivirani klonovi brzo proliferiraju i stvaraju vojsku od milijuna efektorskih stanica nužnih za borbu protiv infekcije. Nakon uklanjanja patogena, većina aktiviranih stanica umire apoptozom (programiranom staničnom smrću), ostavljajući za sobom mali dio memorijskih stanica. Nakon ponovnog susreta s antigenom, ove memorijske stanice imaju sposobnost bržeg i učinkovitijeg reagiranja od naivnih stanica i sprječavanja širenja infekcije i prije pojave kliničkih simptoma, pružajući tako organizmu dugotrajnu zaštitu (7).

## 1.2. Diferencijacija CD8 limfocita T

Imunost posredovana CD8 limfocitima T ima presudnu ulogu u zaštiti našeg tijela od infekcija uzrokovanih unutarstaničnih mikroorganizama poput virusa, ali i protiv tumora kao i prilikom ponovne infekcije istim patogenom s glavnom zadaćom izravnog ciljanja i ubijanja zaraženih stanica. Kako bi se učinkovito prepoznao velik broj potencijalnih agensa koji

napadaju tijelo, repertoar naivnih CD8 limfocita T sastoji se od mnogo različitih klonova. Svaki je klon jedinstven na temelju svog antigenskog receptora i sposobnosti vezanja stranih peptida (antigena) koji su predočeni u sklopu MHC molekule klase I (MHC I). Kako bi se spriječila pretjerana upotreba dostupnih hranjivih tvari nužnih za preživljenje tih stanica, svaki klon je prisutan u malom broju kopija (8, 9, 10, 11).

### 1.2.1. Početna aktivacija CD8 limfocita T

Kako imunološki sustav pronade i izabere klon CD8 limfocita T koji je specifičan za antigen? Odgovor na ovo pitanje leži u stalnoj recirkulaciji CD8 limfocita T kroz sekundarne limfne organe (SLO) i njihovoj sposobnosti ulaska u limfne čvorove. Ovaj je postupak ključan za prepoznavanje stranih tvari i aktivaciju imunološkog sustava. Prethodna istraživanja su pokazala da je potrebno približno 10–20 sati da naivni CD8 limfociti T krvnom cirkulacijom uđu u SLO u potrazi za svojim srodnim antigenom i da se vrate nazad u cirkulaciju. Molekula CD62L, i CCR7 reguliraju ulazak naivnih CD8 limfocita T stanica. Osim toga, molekula CCR7 je odgovorna i za migraciju dendritičnih stanica (stanice koje prezentiraju antigen; engl. *antigen presenting cells*, APC) kroz limfne žile u limfne čvorove. U slučaju da naivni CD8 limfociti T prepoznaju srodni antigen u limfnom čvoru, dolazi do supresije razine signalnog receptora nazvanog sfingozin 1-fosfatni receptor 1 (S1PR1). Ligand za S1PR1 je lipidni kemoatraktant sfingozin 1-fosfat (S1P) koji je uključen u izlazak naivnih CD8 limfocita T iz limfnih čvorova. Posljedično, nakon susreta s antigenom, ispoljavanje S1PR1 se smanjuje nekoliko dana čim se se omogućuje zadržavanje antigen-aktiviranih CD8 limfocita T u limfnim čvorovima te proces klonalne ekspanzije i diferencijacije u efektorske CD8 limfocite T. Kada stanice steknu efektorski fenotip i diferenciraju se u citotoksične limfocite, ispoljavanje molekula CCR7, CD62L i CD69 se smanjuje, dok se razina S1PR1 povećava, što dovodi do izlaska iz SLO-a i migracije u periferno tkivo na mjestima upale. Početna aktivacija (engl. *priming*) CD8 limfocita T stanica započinje tek nakon susreta s antigenom koji je predočen u sklopu MHC I molekule koju prezentiraju zrele dendritične stanice. Dendritične stanice, također migriraju na isto 'specijalizirano' područje limfnih čvorova (subkapsularno sinusno područje) te proizvode kemokine XCL1, CCL3, CCL4 i CCL17 koji privlače naivne CD8 limfocite T tijekom početne aktivacije u limfnim čvorovima (1, 12, 13, 14).

### 1.2.2. Diferencijacija u efektorske CD8 limfocite T

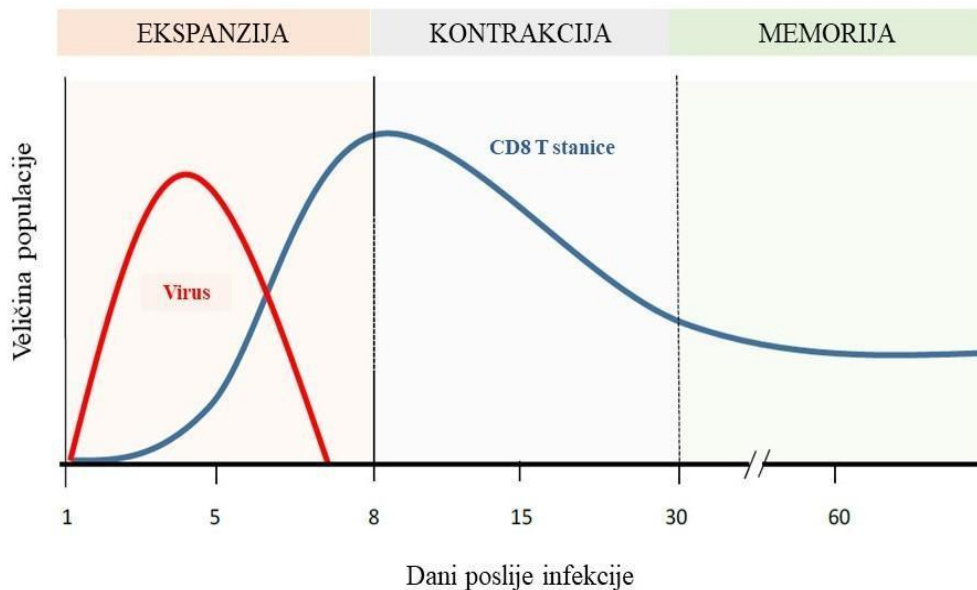
Za učinkovitu aktivaciju i diferencijaciju CD8 limfocita T u efektorske i memorijske stanice potrebna su tri odvojena signala: i) prepoznavanje antigena pomoću TCR-a, ii) kostimulacija, i iii) izlučivanje citokina (15). Najvažniji parovi kostimulacijskih receptora i liganda tijekom aktivacije limfocita T su 4-1BB-4-1BBL, CD27-CD70, CD28-CD80/CD86, CD40-CD40L i OX40-OX40L (16-19). Kostimulacija zajedno sa signalima, koje pružaju proupalni citokini (IFN tipa I, IFN $\gamma$ , interleukini - IL-2, IL-12, IL-27 i IL-33) proizvedeni tijekom infekcije, rezultiraju brзом proliferacijom antigena specifičnih CD8 limfocita T (7). Najistraženiji kostimulatorni put je CD28-CD80/CD86 zbog njegove ključne uloge u ekspanziji i preživljavanju antigen-specifičnih CD8 limfocita T stanica nakon infekcije *L. monocytogenes* (20), virusom vezikularnog stomatitisa (VSV) (21) i virusom gripe (22). Tijekom aktivacije CD8 limfocita T, signaliziranje stanica putem CD28 kostimulacijske molekule dovodi do povećane proizvodnje IL-2 citokina (23). IL-2 ima posebnu ulogu u ovom procesu. Djeluje kao autokrini faktor rasta, što znači da ga proizvode CD8 limfociti T koje prepoznaju antigen, ali također da te stanice preferencijalno reagiraju na njega. Stoga samo klonovi specifični za antigen imaju prednost u proliferaciji što posljedično dovodi do njihove diferencijacije u citotoksične (efektorske) stanice čiji je glavni cilj iskorjenjivanje infekcije. To se postiže masivnom klonalnom ekspanzijom koja doseže i više od 20 dioba stanica, što predstavlja umnažanje i do 50 000 puta od jedne naivne stanice (24). Štoviše, ove stanice su opremljene i specifičnim granulama koje sadrže granzim A, granzim B i perforin koji se oslobađaju egzocitozom uzrokujući antigen-specifičnu lizu zaraženih stanica (18).

### 1.2.3. Kontrakcija CD8 limfocita T i stvaranje imunološke memorije

Tijekom akutne infekcije, odgovor CD8 limfocita T se može podijeliti u tri faze: klonske ekspanzija, kontrakcija i stvaranje imunološke memorije (**Slika 4.**). Nakon uklanjanja infekcije, CD8 limfociti T ulaze u fazu kontrakcije, što rezultira apoptozom većina antigen-specifičnih CD8 limfocita T. Otprilike 90% - 95% efektorskih stanica odumire apoptozom, ostavljajući za sobom malu populaciju dugovječnih memorijskih stanica (25). Te stanice imaju potencijal samoobnavljanja i održavaju se na antigen-neovisni način. Međutim, preživljavanje i homeostatska proliferacija memorijskih stanica uvelike ovise o citokinima, posebno o IL-7 i IL-15 (26). I naivni i memorijski CD8 limfociti T izražavaju visoku razinu receptora za IL-7, što ukazuje da spomenuti receptor daje signale za preživljavanje za obje podskupine ovih stanica (27). Nakon ponovne infekcije, odnosno ponovnog susreta sa srodnim antigenom, ove



stanice pokazuju pojačani efektorski kapacitet, odmah započnu s proliferacijom i naseljavanjem perifernih mjesta infekcije, pružajući tako cjeloživotnu zaštitu (11).



**Slika 4.** Kinetika odgovora CD8 T stanica nakon stanične infekcije

Međutim, još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni signali i temeljni mehanizmi koji određuju odluke o sudbini CD8 limfocita T – (apoptoza ili preživljavanje i diferencijacija u citotoksične limfocite i/ili dugovječne memorijske stanice). Prethodna otkrića sugeriraju da se stvaranje i razvoj različitih populacija CD8 limfocita T programira rano tijekom početne aktivacije kao odgovor na infekciju (28). Te se heterogene populacije memorijskih CD8 limfocita T razlikuju po fenotipskim i funkcionalnim svojstvima, kao i po zaštitnoj sposobnosti (7). Inicijalna otkrića sugeriraju upotrebu ekspresije CD127 (alfa lanac receptora IL-7) kao markera za identifikaciju memorijskih prekursora (engl. *memory precursor effector cells* - MPEC) i kratkotrajnih efektorskih stanica (engl. *short-lived effector cells* - SLEC). Glavna razlika između ove dvije podvrste je sposobnost MPEC-a da se diferenciraju u dugovječne memorijske stanice za razliku od SLEC-ova (27). Naknadna istraživanja pokazala su važnost ispoljavanja molekule KLRG1 kao dodatnog biljega za određivanje razlika između SLEC(CD127<sup>-</sup>KLRG1<sup>+</sup>) i MPEC (CD127<sup>+</sup> KLRG1<sup>-</sup>) stanica (29).

### 1.3. Uloga intenziteta signala na diferencijaciju CD8 limfocita T

Različiti putevi diferencijacije CD8 limfocita T i naknadna heterogenost ovise o intenzitetu signala s kojima se susreću ove stanice tijekom početnog procesa aktivacije (engl. *priming*). Kumulativni signal sastoji se od različitih čimbenika, uključujući afinitet TCR za antigen predočen u sklopu MHC molekule, trajanje te interakcije, količinu prezentiranog antigena i broj kostimulacijskih molekula (30-33). Ti čimbenici nisu hijerarhijski jednaki, jer afinitet antigena za TCR regulira sposobnost pojedinih klonova CD8 limfocita T da pristupe potrebnim hranjivim tvarima, kostimulacijskim molekulama i citokinima (30).

Početne studije bavile su se istraživanjem diferencijacije CD8 limfocita T u efektorske i memorijske stanice jedino nakon stimulacije sa signalima visoke ukupne snage tj. afiniteta (34). Njihovi zaključci su se temeljili na eksperimentima u kojima su istraživani jedino CD8 limfociti T visokog afiniteta za antigen. Kao odgovor na stimulaciju s imuno-dominantnim epitopima, stanice visokog afiniteta značajno bolje proliferiraju i stoga doprinose nastanku memorije, dok stanice nižeg afiniteta dovode do stvaranja značajno manjeg broja memorijskih stanica koje pružaju i slabiji odgovor prilikom ponovnog susreta s istim antigenom (35). Ovo je zapažanje pokrenulo važno pitanje: koji mehanizmi sprečavaju klonove s nižim afinitetom za antigen da koriste ograničene vitalne resurse potrebne za aktivaciju i proliferaciju? Iako je utvrđeno da stanice s niskim afinitetom tvore sve podskupine antigen-specifičnih stanica, snažnije interakcije TCR i liganda jače koreliraju s efektorskim odgovorom CD8 limfocita T.

U početku su se razlike u proliferaciji temeljile na afinitetu prema antigenu i bili su primarni razlog odabira klonova visokog afiniteta u efektorski repertoar. *In vitro* i *in vivo* eksperimenti potvrdili su veću stopu proliferacije stanica s visokim afinitetom za antigen u usporedbi s niskim afinitetom, pokazujući da je snažna stimulacija ključna za jaču ekspanziju CD8 limfocita T (35-37). Povećanje kumulativne snage signala, korištenjem citokina IL-12 ili održavanjem konstantnih razina prezentacije antigena dovodi do stvaranja efektorskih stanica s većom stopom proliferacije. S druge strane, smanjenje ukupnog intenziteta signala primjenom antibiotika kod bakterijskih infekcija promoviralo je stvaranje memorijskih CD8 limfocita T stanica, istovremeno ograničavajući veličinu ekspanzije ovih stanica (37, 38).

Uz proliferativnu prednost stanica visokog afiniteta za antigen, pokazano je da aktivirani efektorski CD8 limfociti T prolaze kroz negativnu selekciju klonova niskog afiniteta za antigen koja se temelji na smanjenom kapacitetu tih stanica da pristupe potrebnim nutrijentima i ostalim ograničenim resursima potrebnim za preživljavanje i diferencijaciju (39). Nakon aktivacije, T stanice induciraju ekspresiju IL-2 receptora na način koji je ovisan o afinitetu za antigen (40).

IL-2 potiče preživljavanje stanica pokretanjem signalne kaskade preko PI3K kinaze i održavanjem razina Mcl-1 - proteina za preživljavanje. Efektorske stanice s visokim afinitetom za antigen imaju prednost u preživljavanju u odnosu na stanice s niskim afinitetom za antigen te je to temeljeno na njihovoj sposobnosti da pristupe IL-2. Ovaj mehanizam sužava klonalnu raznolikost, jer samo visoko specifični klonovi (klonovi visokog afiniteta za antigen) imaju mogućnost diferencijacije te mogu stvoriti gotovo monoklonski repertoar efektorskih CD8 limfocita T (39, 40). Životinje kojima nedostaje Noxa, pro-apoptotski antagonist molekule Mcl-1, imaju smanjenu sposobnost te su stoga pokazale i smanjenu ovisnost o citokinu IL-2. Stoga, kod tih životinja nalazimo povećani broj klonova niskog afiniteta za antigen u efektorskom repertoaru što posljedično rezultira smanjenim antivirusnim potencijalom (40).

Tijekom aktivacije, CD8 limfociti T također integriraju i podražaje kostimulacijskih molekula i citokina, što objašnjava njihov veliki doprinos u ukupnom intenzitetu signala i klonskoj selekciji temeljenoj na afinitetu prema antigenu. Kostimulacija putem molekule CD28 bitna je za pravilan odgovor CD8 limfocita T, posebice u slučaju slabih TCR-pMHC interakcija. Suprotno tome, visoke doze antigena i produljena stimulacija mogu nadoknaditi nedostatak kostimulacije putem CD28 u *in vivo* modelima (41, 42). Kostimulacija putem molekule CD27 potiče proizvodnju IL-2 u aktiviranim T stanicama (43). Iz tog razloga, životinje s nedostatkom CD27 imaju smanjen pristup IL-2, što rezultira manje klonalno raznolikim efektorskim odgovorom povišenog ukupnog afiniteta za antigen (44). Slično tome, citokini utječu na odluke o sudbini i klonalnoj selekciji. CD8 limfociti T aktivirane u prisutnosti visoke razine IL-2 ili IL-12 pokazuju povećane stope proliferacije i superiorne efektorske funkcije (34, 36, 38, 45-47).

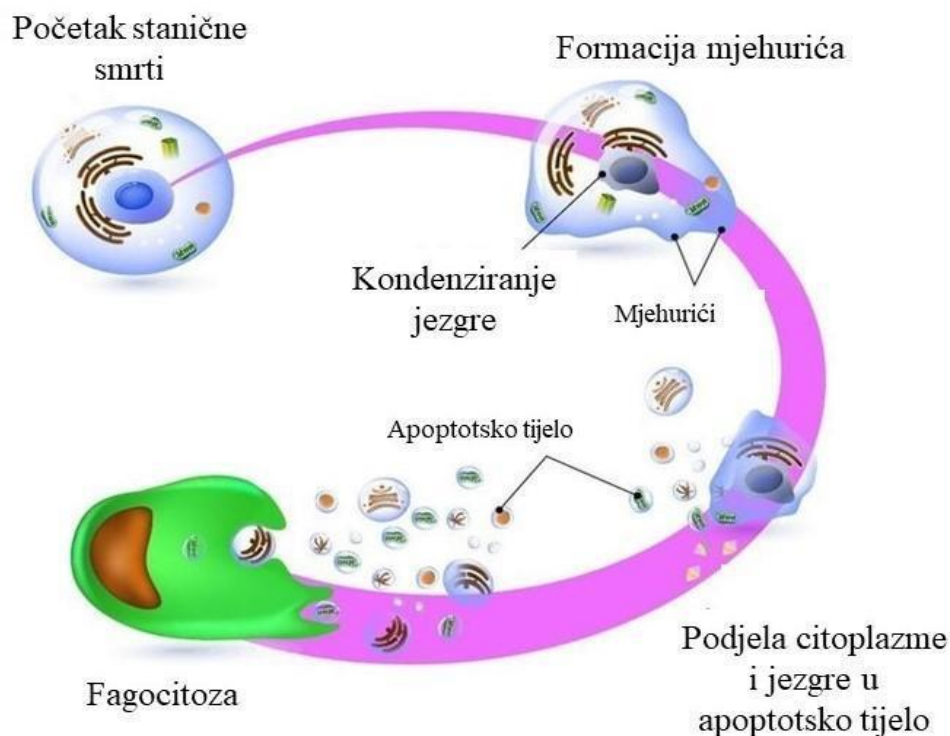
Zadaća CD8 T-stanične memorije je zaštita našeg organizma od ponovnog susreta s istim patogenom koji je izazvao primarnu infekciju. Međutim, zbog selektivnog pritiska na patogen, najčešće ponovnu infekciju izaziva isti, ali mutirani patogen, kako bi izbjegao prepoznavanje od strane imunskog sustava. Za razliku od efektorskog odgovora, CD8 T-stanična memorija bi se trebala sastojati od većeg broja klonova što bi omogućilo prepoznavanje više različitih antigenskih varijanti. U nedavnoj publikaciji pokazano je da je raznolikost klonova zaista mnogo veća u memorijskoj fazi u odnosu na primarni efektorski odgovor CD8 limfocita T. Osim toga, smanjena raznolikosti memorijskih klonova CD8 limfocita T rezultira smanjenom sposobnošću prepoznavanja mutiranih patogena. (48). Stoga raznolikosti CD8 T-stanične memorije mora balansirati s mogućnošću učinkovitog odgovora protiv infekcija. Činjenica da cjepiva protiv brzo mutirajućih virusa, poput gripe, najčešće pružaju sezonsku zaštitu te se stoga svake godine iznova provodi cijepljenje protiv gripe,

ukazuje da patogeni mogu izbjeći prepoznavanje od strane imunološke memorije. Međutim, postoji određeni raspon raznolikosti T-stanične memorije koji se može iskoristiti za poboljšanje cjepiva. U spomenutoj publikaciji otkriven je mehanizam koji regulira stvaranje imunološke memorije posredovane CD8 limfocitima T. Stanice nižeg afiniteta za antigen imaju prednost u dugoročnom preživljavanju zbog povećane razine ispoljavanja BCL-2 molekule dok stanice višeg afiniteta za antigen su bolje u proliferaciji (48). Ukratko, jačina signaliranja putem TCR modulira diferencijaciju CD8 limfocita T i klonalnu selekciju..

#### **1.4. Apoptoza**

Pojam apoptoza prvi su put upotrijebili Kerr, Wyllie i Currie u sada već klasičnom radu 1972. godine da bi opisali morfološki različit oblik stanične smrti, iako su određene komponente koncepta apoptoze izričito opisani prije mnogo godina (49). Naše razumijevanje mehanizama koji su uključeni u proces apoptoze u stanicama sisavaca proisteklo je iz istraživanja programirane stanične smrti koja se događa tijekom razvoja nematode *Caenorhabditis elegans* (50). Otada je apoptoza prepoznata i prihvaćena kao prepoznatljiv i važan način "programirane" stanične smrti, koji uključuje genetski uvjetovano uklanjanje stanica. Međutim, važno je napomenuti da su opisani i drugi oblici programirane stanične smrti (51).

Apoptoza se normalno javlja tijekom razvoja i starenja te kao homeostatski mehanizam za održavanje staničnih populacija u tkivima. Apoptoza se također javlja kao obrambeni mehanizam, poput imunoloških reakcija ili kada su stanice oštećene bolestima ili štetnim sredstvima (52). Iako postoji širok spektar podražaja i stanja, fizioloških i patoloških, koji mogu potaknuti apoptozu, neće sve stanice nužno umrijeti kao odgovor na isti podražaj. Zračenje ili lijekovi koji se koriste za kemoterapiju raka rezultiraju oštećenjem DNA u nekim stanicama, što može dovesti do apoptotske smrti putem koji ovisi o molekuli p53. Neki hormoni, poput kortikosteroida, mogu dovesti do apoptotske smrti u nekim stanicama (npr. Timociti), iako druge stanice nisu pogođene ili čak stimulirane.



**Slika 5.** Apoptoza (53)

Neke stanice ekspimiraju Fas ili TNF (engl. *Tumor necrosis factor*) receptore koji mogu dovesti do apoptoze vezanjem liganda i umrežavanjem proteina. Druge stanice imaju zadani put smrti koji mora biti blokiran čimbenikom preživljavanja kao što je hormon ili faktor rasta. Tu je i pitanje razlikovanja apoptoze od nekroze, dva procesa koja se mogu odvijati neovisno, uzastopno, kao i istodobno (54,55). U nekim slučajevima vrsta podražaja i/ili stupanj podražaja određuje umiru li stanice apoptozom ili nekrozom. U malim dozama, razni štetni podražaji poput topline, zračenja, hipoksije i citotoksičnih lijekova protiv raka mogu inducirati apoptozu, ali ti isti podražaji mogu rezultirati nekrozom kod većih doza. Konačno, apoptoza je koordinirani i često energetski ovisan proces koji uključuje aktivaciju skupine cisteinskih proteaza nazvanih „kaspaze“ i složenu kaskadu događaja koji povezuju inicijacijske podražaje s konačnom smrću stanice.

Na molekularnoj razini apoptozu karakterizira aktiviranje skupine proteaza, poznatih kao kaspaze. Kaspaze cijepaju svoj cilj na visoko reguliran način na dobro definiranim mjestima prepoznavanja (56). Funkcionalno, s izuzetkom kaspaze 14, kaspaze se mogu podijeliti u tri različite skupine: inicijatorske kaspaze, efektorske kaspaze i upalne kaspaze. Od njih su prve

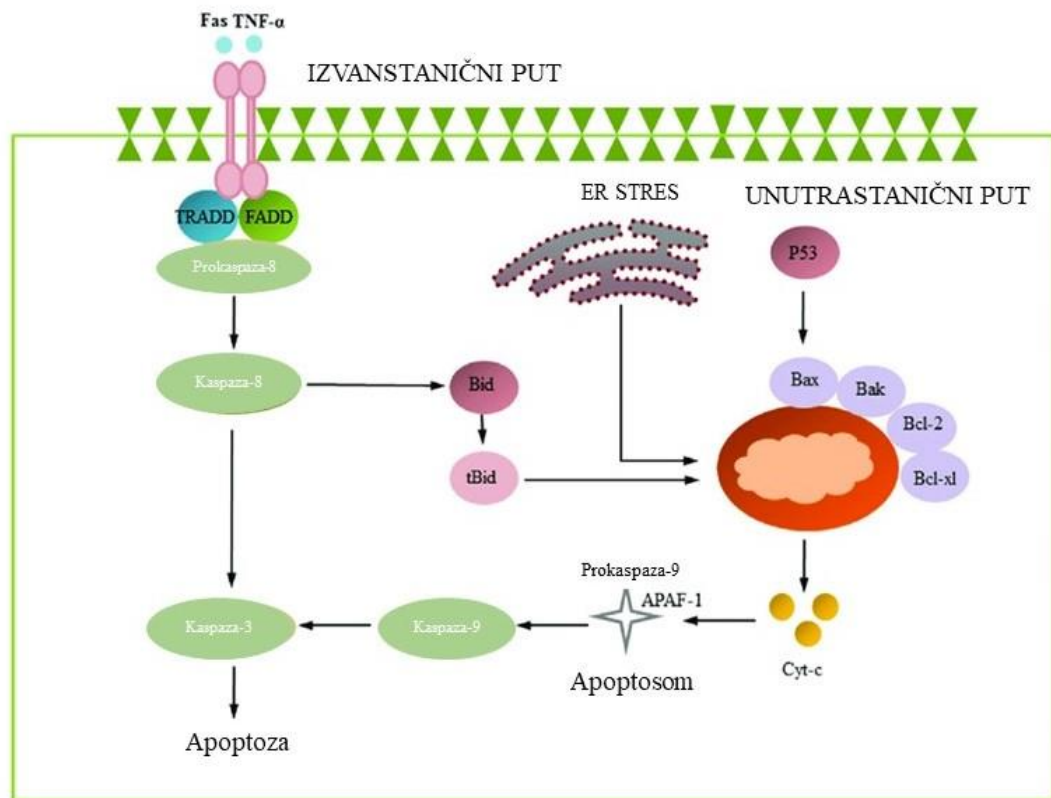
dvije skupine primarno uključene u indukciju apoptoze, iako su zabilježene i druge funkcije (57).

Svim je kaspazama zajedničko da su prisutne u gotovo svakom tipu stanice u neaktivnom obliku i za njihovo aktiviranje zahtijevaju post-translacijske modifikacije. Inicijatorske kaspaze, poput kaspaze-8 i -9, trebaju se multimerizirati i proći proteolitičko (samo) cijepanje kako bi se omogućilo njihovo aktiviranje i pokretanje apoptoze. Jednom aktivni, inicijatorske kaspaze cijepaju efektorske kaspaze kao što su kaspaza 3 i 7, aktivirajući ih tako izlažući njihovu proteolitičku domenu. Učinkovite kaspaze iniciraju aktivaciju niza DNAza, RNAza i proteaza koje uredno razgrađuju stanični materijal. Uz to, kaspaze cijepaju anti-apoptotične proteine, kao i sebe same, stvarajući tako samopojačavajuće i povratne petlje karakteristične za "točku bez povratka" u odluci sudbine stanice.

Pokretanje aktivnosti kaspaze posreduju dva različita signalna puta: izvanstanični i unutarstanični putevi stanične smrti (**slika 6.**). Put izvanstanične stanice izvodi se "receptorima smrti" kao što su FAS i TRAIL receptori. Nakon vezanja 'smrtnog liganda', ove molekule superfamilije TNF omogućuju stvaranje unutarstaničnih signalnih kompleksa, što u konačnici može dovesti do aktivacije kaspaze-8. Stoga se molekule FAS, TRAIL i TNF općenito cijene kao induktori stanične smrti. No, o prisutnosti pravih unutarstaničnih komponenata ovisi hoće li te molekule funkcionirati kao induktori smrti ili kao posrednici signala za preživljavanje, jer se također izvještava da molekule poput TNF-a i FASL-a potiču preživljavanje tumorskih stanica (58, 59).

Kao što mu samo ime govori, unutarstanični put stanične smrti posreduje u odgovorima na apoptotičke podražaje koji dolaze iz stanice, poput oštećenja DNA, citotoksičnog stresa i nedostatka signalizacije za preživljavanje kao rezultat nedostatka citokina. Put unutarstanične smrti djeluje kontrolom integriteta vanjske membrane mitohondrija. Skupina molekula koja je primarno odgovorna za spomenuti proces je obitelj BCL-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) pro- i anti-apoptotičnih proteina (60). Molekule BCL-2 mogu se podijeliti u tri različite skupine, na temelju strukturne homologije i funkcije. Prva skupina su anti-apoptotični proteini koji potiču preživljavanje te uključuju BCL-2, BCL-XL, BCLw, Mcl-1 i A1 / Bfl-1. Ovi proteini dijele četiri domene homologije BCL-2 i primarno su odgovorni za antagonizaciju pro-apoptotičnih molekula s BH3 domenom. Ova još uvijek rastuća skupina molekula uključuje Bim, Bid, Puma, Noxa, Bik, Harakiri i Bmf i dijeli samo jednu homolognu domenu BCL-2 (BH3) s ostalim članovima BCL-2 obitelji. Međutim, upravo je ta BH3 domena primarno odgovorna za njihovu pro-apoptotsku funkciju, jer su BH3 peptidi sami sposobni inducirati staničnu smrt u modelima stanične kulture (61). Nakon što dođe do signala smrti, pro-apoptotični proteini poput Bim i

Bid koji sadrže samo BH3 domenu, mogu se premjestiti na vanjsku membranu mitohondrija gdje se uglavnom nalaze anti-apoptotični članovi BCL-2 obitelji. Takva vrsta premještanja narušava ravnotežu pro- i anti-apoptotičnih proteina, što dovodi do stvaranja pora na membrani mitohondrija i ispuštanja pro-apoptotičnih molekula iz unutar membranskog prostora mitohondrija (62).

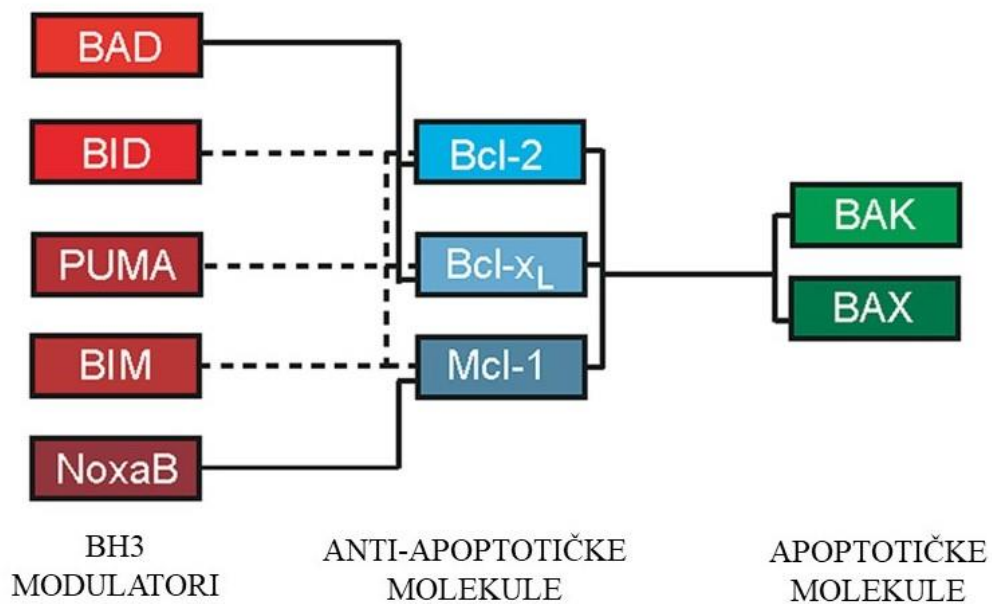


**Slika 6.** Signalni putevi apoptoze

Kao odgovor na apoptotičke podražaje, aktivnost molekula s BH3 domenom (pro-apoptotičkih molekula) prevlada nad djelovanjem molekula sličnih BCL-2, što dovodi do aktivacije treće skupine molekula u ovoj obitelji BCL-2 proteina, a to su BAX i BAK. Te molekule, koje imaju tri domene homologije BCL-2, oligomeriziraju se aktivacijom u vanjskoj membrani mitohondrija, stvarajući tako pore dovoljno velike da proteini mogu proći. Kada se to dogodi, oslobađaju se molekule poput OMI i AIF, koje mogu izravno potaknuti razgradnju proteina i DNA. Uz to se oslobađa i citokrom C. Budući da je ova molekula normalno uključena u respiratorni ciklus stanice tijekom oksidativne fosforilacije, potencijal unutarnje membrane mitohondrija brzo se gubi, što rezultira neuspjehom u stvaranju ATP-a. Ali, nakon što se citokrom C oslobodi u citoplazmi, ova molekula hetero-oligomerizira s proteinima APAF1 i

kaspazom-9, koji su oba prisutni u citoplazmi. Ovaj proteinski kompleks nazvan apoptosom cijepa efektorske kaspaze, inicirajući tako staničnu smrt.

Jasno je da ravnoteža između tri skupine molekula BCL-2 određuje preživljavanje stanice. Stoga se ta ravnoteža naziva i "apoptostat", jer razina ekspresije ovih molekula određuje osjetljivost stanica na određene apoptotske podražaje. Jasno je da postoji hijerarhijska struktura unutar ove skupine molekula. Neke molekule samo s jednom homolognom BH3 domenom, poput Bim, Puma i (t) Bid, vežu se s različitim afinitetima (61) na anti-apoptotičke molekule te prekomjerno ispoljavanje tih molekula u staničnim linijama brzo dovodi do stanične smrti. Druge molekule, poput Noxa, Bmf, Bik i Harakiri, vežu samo nekoliko BCL-2 proteina, a prekomjerna ekspresija tih molekula ne dovodi do stanične smrti, već senzibilizira stanice na apoptotičke podražaje (63).



**Slika 7.** Anti- i pro-apoptotične molekule



## 1.5. Inhibitori

Inhibitor je sredstvo koje usporava ili ometa kemijsko djelovanje, odnosno tvar koja smanjuje ili suzbija aktivnost druge tvari (poput enzima).

Inhibicija, u enzimologiji, pojava u kojoj spoj, koji se naziva inhibitor, u većini slučajeva sličan strukturama supstanci (supstratu) na koju enzim djeluje stvarajući produkt, stupa u interakciju s enzimom tako da rezultirajući kompleks ne može proći uobičajenu reakciju ili ne može stvoriti uobičajeni produkt. Inhibitor može funkcionirati, kombiniranjem s enzimom na mjestu na kojem se supstrat obično kombinira (kompetitivna inhibicija) ili na nekom drugom mjestu (nekonkurentna inhibicija). U drugome slučaju, inhibitor ne sprječava vezanje supstrata na enzim, ali dovoljno mijenja oblik mjesta na kojem se javlja katalitička aktivnost kako bi ga spriječio (64, 65).

S obzirom da se u diplomskom radu istražuje utjecaj inhibitora BCL-2 obitelji na stvaranje memorijskih CD8 T limfocita, u ovom ću odlomku ukratko opisati BCL-2 obitelj inhibitora.

Gen BCL-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) prvi je put otkriven u folikularnom B-staničnom limfomu kao gen koji je povezan s lokusom teškog lanca imunoglobulina na prijelaznim točkama translokacije t (14; 18) (66); rezultat ove translokacije je pojačana transkripcija proteina BCL-2. U normalnim stanicama ovaj se gen nalazi na segmentu kromosoma 18q21.3. Utvrđeno je da protein BCL-2 inhibira staničnu smrt. Ovo je otkriće predstavljalo revoluciju u pristupu patologiji raka, jer je dovelo do spoznaje da geneza tumora može biti posljedica ne samo neograničene proliferacije, već i oštećene apoptoze. Treba primijetiti da se prekomjerna ekspresija onkoproteina BCL-2 nalazi i u drugim hematopoetskim malignim bolestima i tumorima, neovisno o t (14; 18) kromosomskoj translokaciji.

U prethodnoj sekciji 1.4. spomenuta su dva različita puta koja vode do apoptoze. Prvi, koji se naziva unutarnji put stanične smrti, izaziva se unutarstaničnim stresovima poput zračenja, povlačenja faktora rasta, nedostatka citokina, citotoksičnih lijekova i reguliran je proteinima BCL-2 obitelji (67, 68). Napredovanje tim putem dovodi do oslobađanja citokroma C iz oštećenog mitohondrija, koji se zatim veže na molekulu adaptera APAF1 i neaktivnu kaspazu "inicijatora", prokaspazu 9, u multiproteinskom kompleksu nazvanom apoptosom. To dovodi do aktivacije kaspaze 9, koja zatim pokreće kaskadu aktivacije kaspaza (kaspaze 3 i 7) što rezultira morfološkim i biokemijskim promjenama povezanim s apoptozom. Drugi put smrti stanice je vanjski put koji funkcionira neovisno o mitohondrijima. Ovaj put aktiviraju receptori smrti CD95 (Apo-1 ili Fas)/TRAIL/faktor nekroze tumora (TNF) receptori 1 na staničnoj

površini koji se nalaze na plazmatskoj membrani i izravno aktivira kaspazu regrutiranjem "inicijator" kaspaze-8 unutar signalnog kompleksa koji izaziva smrt (69).

Defekti u apoptozi mogu potaknuti tumorigenezu i oslabiti reakcije malignih B stanica na kemoterapeutike. Članovi obitelji proteina B-staničnog limfoma 2 (BCL-2) ključni su regulatori unutarnjeg, mitohondrijskog apoptotskog puta. Prekomjerno izražavanje anti-apoptotičnih proteina obitelji BCL-2 povezano je s rezistencijom na liječenje i lošom prognozom. Stoga je inhibicija proteina obitelji BCL-2 racionalna terapijska opcija za maligne bolesti koje ovise o antiapoptotičkim proteinima obitelji BCL-2. Venetoclax (ABT-199, GDC-0199) visoko je selektivni inhibitor BCL-2 koji predstavlja prvo odobreno sredstvo ove klase i trenutno se široko koristi u liječenju kronične limfocitne leukemije (CLL), kao i akutne mijeloične leukemije (AML) (70, 71).

Osim spomenutog venetoclaxa (ABT-199) u diplomskom radu koristio se i BAI1 inhibitor, stoga ću u ovom odlomku opisati njegovo djelovanje.

BAI1 (engl. *brain-specific angiogenesis inhibitor 1*) član je takozvane adhezijske obitelji 7-transmembranskih receptora (72). Naziv mu potječe iz početnog zapažanja da je izvanstanični fragment receptora inhibirao neovaskularizaciju u eksperimentalnom modelu tumora mozga (73). U novije vrijeme otkriveno je da se BAI1 eksprimira na makrofazima, gdje djeluje kao receptor za uklanjanje apoptotičnih stanica (74). Ključna značajka BAI1 je prisutnost pet izvanstaničnih ponavljanja trombospondina tipa 1 (TSR) koji se vežu za površinski izloženi fosfatidilserin na apoptotskim stanicama (74). BAI1, je selektivni i alosterički inhibitor BAX-a, regulatora apoptoze. BAI1 se izravno veže na BAX i alosterički inhibira njegovu aktivaciju (75). Za razliku od članova obitelji BCL-2, aktivacija i vezanje članova obitelji BAX na membranu mitohondrija inducira oslobađanje citokroma C i indukciju apoptotske stanične smrti. BCL-2 sprječava apoptozu odvajanjem molekula samo s BH3, sprječavajući ih tako da aktiviraju BAX i BAK. Nakon aktivacije, BAX i BAK stvaraju pore u vanjskoj membrani mitohondrija i započinju aktivaciju kaspaze (71). Stanice kojima nedostaju BAX i BAK ne mogu inducirati apoptozu putem smrti mitohondrijskih stanica (76). Primjena BAI1 tijekom aktivacije CD8 limfocita T trebala bi stoga promicati preživljavanje više aktiviranih klonova (klonova visokog afiniteta za antigen) i time povećati opseg memorijskog repertoara CD8 limfocita T.

## 2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Imunost posredovana CD8 limfocitima T pruža nam zaštitu od brojnih patogena i tumora. Naivni repertoar limfocita T sastoji se od milijuna različitih klonova koji se međusobno razlikuju po specifičnosti svojih T-staničnih receptora (TCR). Prilikom infekcije, samo neki od klonova postaju dugovječne memorijske stanice. Seleksijski proces odabira memorijskih klonova reguliran je ravnotežom između specifičnosti i raznolikosti kako bi se osigurao učinkovit sekundarni odgovor te mogućnost prepoznavanja istih, ali i mutiranih antigena. Još uvijek nisu razjašnjeni mehanizmi koji reguliraju diferencijaciju CD8 limfocita T. Nekoliko je istraživanja ukazalo na važnost kumulativnog intenziteta signala na T-stanični receptor i ispoljavanja proteina BCL-2 obitelji u procesu diferencijacije u memorijske CD8 limfocite T.

U ovom diplomskom radu istražen je utjecaj specifičnih inhibitora proteina BCL-2 obitelji na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T *in vitro*. Prvo je uspostavljen model za stvaranje memorijskih CD8 limfocita T *in vitro* te su testirane fenotipske i funkcionalne karakteristike tih stanica. Zatim je ispitan utjecaj inhibitora BAI1 (inhibitor BAX molekule) i ABT-199 (inhibitor BCL-2 molekule) na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T u validiranom *in vitro* modelu nakon stimulacije s peptidima različitog afiniteta za TCR.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Laboratorijske životinje

Svi pokusi na životinjama izvedeni su u skladu s hrvatskim etičkim propisima o životinjama „Pravilnik o zaštiti životinja koji se koriste u znanstvene svrhe“, NN 55/2013, koji je u skladu s Direktivom 2010/63/EU Europskog parlamenta i Europsko vijeće i „Zakon o zaštiti životinja“ (NN 135/06, 37/13 i 102/17). Svi pokusi na životinjama izvedeni su nakon odobrenja Etičkog povjerenstva i Povjerenstva za dobrobit životinja za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Eksperimentalni miševi korišteni u ovom istraživanju uzgajani su u uvjetima bez prisutnosti specifičnih patogena (SPF) u Laboratoriju za inženjerstvo i uzgoj miševa Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci (LAMRI). Tijekom pokusa miševi su držani u Pokusnom objektu u pojedinačno prozračenom sustavu kaveza (IVC sustav). Soj miša koji sam koristila u ovome istraživanju je OT-1 C57BL/6J.

Spomenuti soj miševa sadrži transgene umetke za mišje gene Tcr $\alpha$ -V2 i Tcr $\beta$ -V5. Transgeni receptor za T stanice dizajniran je da prepozna ovalbumin peptide (OVA257-264) u kontekstu H2Kb (interakcija T-staničnog receptora s molekulom MHC klase I). To rezultira MHC I, restriktivnim, ovalbumin specifičnim klonovima CD8 limfocita T (OT-I stanice). Odnosno, CD8 limfociti T kod ovih miševa primarno prepoznaju OVA257-264 u sklopu molekule MHC I. Dinamika imunološkog odgovora može se proučavati *in vivo* adaptivnim transferom ili *in vitro* u modelu stanične kulture uz stimulaciju s ovalbumin peptidima (77).

#### 3.1.2. Mediji za uzgoj stanica

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

DMEM medij (Pan Biotech, GmbH, Aidenbach, Njemačka), 3-10% fetalni teleći serum (FCS) (Pan Biotech), 10 mM HEPES (pH 7,2) (Pan Biotech), 2 mM L-glutamin, 105 U/l Penicilin (Pan Biotech), 0,1 g/l streptomycin (Pan Biotech).

### Kompletni RPMI medij, RPMI 1640 (engl. *Roswell park memorial institute medium*)

RPMI medij (Pan Biotech), 3-10% FCS (Pan Biotech), 10 mM HEPES (pH 7,2) (Pan Biotech), 2 mM L-glutamin (Pan Biotech), 105 U/l penicilin (Pan Biotech), 0,1 g/l Streptomycin (Pan Biotech),  $\beta$ 2-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA).

### 3.1.3. Ostali puferi i mediji

#### Pufer za lizu eritrocita (10 x)

140 mM amonijevog klorida (NH<sub>4</sub>Cl) (Sigma-Aldrich Corporation), 2,7 mM kalijevog klorida (KCl) (Sigma-Aldrich Corporation), 1,5 mM monokalijevog fosfata (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich Corporation), 6,5 mM dinatrijevog fosfata (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich Corporation), 0,7 mM kalcijevog klorida (CaCl<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich Corporation). Za radnu otopinu (1X) razrijedite pufer s H<sub>2</sub>O.

#### Pufer za magnetsku izolaciju stanica, MACS (engl. *Magnetic-activated cell sorting buffer*)

PBS (Lonza Group), 1% FCS (Pan Biotech), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich Corporation).

#### Medij za protočnu citometriju, FACS medij (engl. *Flow cytometry medium*)

PBS, 1% goveđeg serumskog albumina (BSA) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 0,1% natrijevog azida (NaN<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich Corporation), 1 mM etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) (Sigma-Aldrich Corporation).

### 3.1.4. Peptidi

Za stimulaciju OT1 CD8 limfocita T korišteni su sljedeći peptidi: H-2 Kb (SIINFEKL) i H-2 Kb (SIIQFEKL). Peptidi se razlikuju u afinitetu, odnosno jačini vezanja za TCR receptor. Peptid SIINFEKL (N4) ima veći afinitet vezanja od SIIQFEKL (Q4).

Manipulacijom, odnosno promjenom jedne aminokiseline u spomenutom N4 peptidu, možemo dobiti njegove mutante, što dovodi do promjene afiniteta vezanja, odnosno specifičnosti za T-stanični receptor (36).

### 3.1.5. Inhibitori

#### BAl1 (engl. *Brain-specific angiogenesis inhibitor-1*)

BAl1 je izravni alosterički inhibitor BAX-a s konstantom disocijacije (K<sub>d</sub>) od  $15,0 \pm 4 \mu\text{M}$ .

Za istraživanje pripremljen je serijom razrjeđenja u koncentracijama od 10, 1, 0,1, 0,01 i 0  $\mu$ M.

#### ABT-199 (Venetoclax)

BCL-2-selektivni inhibitor s  $K_i < 0,01$  nM u testovima bez stanica. Venetoclax dovodi do smanjenog rasta stanica, apoptoze, zaustavljanja staničnog ciklusa i autofagije u stanicama u različitim modelima. (dodaj literaturu od kud si to našla)

Za istraživanje pripremljen je serijom razrjeđenja u koncentracijama od 1, 0,1, 0,01 i 0  $\mu$ M.

#### 3.1.6. Monoklonska protutijela

Štakorski PercpCy5.5 anti mišji CD8a, eBioscience (klon 53-6.7) (engl. *Rat Anti-mouse monoclonal CD8a-PercpCy5.5*)

Štakorski APC anti mišji CD25, eBioscience (klon PC61.5) (engl. *Rat Anti-mouse Monoclonal Antibody CD25 APC*)

Štakorski PE anti mišji CD127, eBioscience (klon A7R34) (engl. *Rat Anti-mouse Monoclonal Antibody CD127 PE*)

Štakorski FITC anti mišji CD44, eBioscience (klon IM7) (engl. *Rat Anti-mouse Monoclonal Antibody CD44 FITC*)

Štakorski PE anti mišji CD62L, eBioscience (klon MEL-14) (engl. *Rat Anti-mouse Monoclonal Antibody CD62L PE*)

Proizveden u armenijskom zamorcu FITC anti mišji CD69, eBioscience (klon H1.2F3) (engl. *Armenian hamster Anti-mouse Monoclonal Antibody CD69 FITC*)

Štakorski APC anti mišji CCR7, eBioscience (klon 4B12) (engl. *Rat Anti-mouse Monoclonal Antibody CCR7 APC*)

Štakorski PE anti mišji IL-2, eBioscience (klon JES6-5H4) (engl. *Rat Anti-mouse Monoclonal Antibody IL-2 PE*)

Štakorski APC anti mišji IFN $\gamma$ , eBioscience (klon XMG1.2) (engl. *Rat Anti-mouse Monoclonal Antibody IFN $\gamma$  APC*)

### 3.1.7. Ostali reagensi

Rekombinantni mišji IL-15 (Peprotech)

$\alpha$ CD28 (engl. Anti-CD28 Antibody) (eBioscience)

Brefeldin A (Thermo Fischer Scientific)

Fiksirajuća boja za detekciju živih stanica eFluor® 780-FVD (engl. *fixable viability dye*), eBioscience

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izolacija limfocita iz slezene

Nakon žrtvovanja miša, izdvojena je slezena koja je zatim homogenizirana kroz stanično sito koristeći 3% DMEM. Zatim se homogenat centrifugira na 1500 rpm 5 minuta. Nakon toga supernatant se odlije, a talog stanica je resuspendiran u 3 ml pufera za lizu eritrocita radi njihovog uklanjanja. Nakon inkubacije, u trajanju od 5 minuta na ledu, dodano je 5 ml 3% DMEM. Uslijedilo je ponovno centrifugiranje 5 minuta 1500 rpm, nakon čega je supernatant odliven, a stanice su resuspendirane u 5 ml 3% DMEM.

### 3.2.2. Dobivanje čiste populacije CD8 limfocita T magnetskom separacijom

Kako bi dobili čistu populaciju CD8 limfocita T korištena je metoda magnetske separacije (MACS). Izolirani splenociti OT-1 miševa obilježe se magnetskim kuglicama CD8 $\alpha$  (Ly-2) T Cell Isolation Kit, mouse (MACS, Miltenyi Biotec) te inkubiraju 30 minuta na 4 °C. Nakon inkubacije stanice se resuspendiraju u MACS puferu te propuštaju kroz specifičnu magnetsku kolonu, prema uputama proizvođača (MACS, Miltenyi Biotec). Radilo se o pozitivnoj selekciji, budući da su se CD8 limfociti T vezali na kolonicu, a istiskivanjem se dobije pročišćena populacija ovih stanica. Stanice se ispiru od MACS medija, odlije se supernatant, a talogu stanica dodaje se 5 ml 10% RPMI te su tako pripremljeni za *in vitro* model za formiranje memorije. Protočnom citometrijom je određena čistoća (postotak) CD8 limfocita T pri čemu se na ovakav način dobilo oko 95% čiste populacije (rezultati nisu prikazani).

### 3.2.3. Određivanje broja stanica

Broj stanica određivan je brojanjem u Neubauerovoj komorici pomoću tripanskog modrila. Pri tome su brojane samo žive stanice koje se, za razliku od mrtvih, nisu obojale tripanskim modrilom. Ukupan broj stanica dobiva se množenjem srednje vrijednosti broja stanica po kvadrantu komorice s korektivnim faktorom 10 000, faktorom razrjeđenja u tripanskom modrilu i ukupnim volumenom uzorka.

### 3.2.4. *In vitro* model za formiranje memorijskih CD8 limfocita T

Nakon što se odredi broj pozitivno selektiranih CD8 limfocita T, pripremi se broj stanica kako bi mogli dodati 30.000 stanica po jažici na ploču s 96 jažica (96-well, U-bottom, Cellstar). Stanice su stimulirane s aCD28 u koncentraciji od 0.5 ug/ml (eBioscience). Osim kostimulacije, stanicama se dodaje odabrani peptid, SIINFEKL, odnosno SIIQFEKL (N4 ili Q4) u koncentraciji od 1 ng/ml te inhibitor, BAI1 ili ABT-199 različitih koncentracija, pripremljenih serijskim razrjeđenjima (10, 1, 0.1, 0.01 or 0  $\mu$ M). Nakon 24 sata od početka stimulacije, stanice u kulturi se ispiru tri puta dodatkom 100  $\mu$ l 10 % RPMI te naknadnim centrifugiranjem 5 minuta pri 300 x g. Zatim, stanice se resuspendiraju u 10% RPMI uz dodatak citokina IL-15 u koncentraciji od 50 ng/ml (Peprotech). Inkubacija traje slijedećih 5 dana na 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2.5. Fenotipska analiza protočnom citometrijom

Fenotipska analiza limfocita provedena je koristeći protutijela navedena u sekciji 3.1.6.. Za protočnu citometriju, stanice iz kulture se najprije centrifugiraju 5 min i 300 x g. Zatim se pripremaju protutijela u FACS-mediju te inkubiraju sa stanicama 30 minuta na + 4 °C. Nakon toga stanice se ispiru FACS medijem, centrifugiraju 5 min i 300 x g. Supernatant je uklonjen i stanice su resuspendirane u 150  $\mu$ l FACS medija. Uzorci su analizirani na uređaju FACS Verse (BD) i analizirani pomoću softvera FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, Oregon, SAD).

### 3.2.6. Analiza produkcije citokina protočnom citometrijom

Analiza lučenja citokina od strane memorijskih CD8 limfocita T je provedena na način da su stanice na dan 6 *in vitro* kulture ponovno stimulirane s N4 peptidom u koncentraciji 10 ng/ml pripremljenom u 10% RPMI-mediju uz dodatak inhibitora proteinskog transporta -

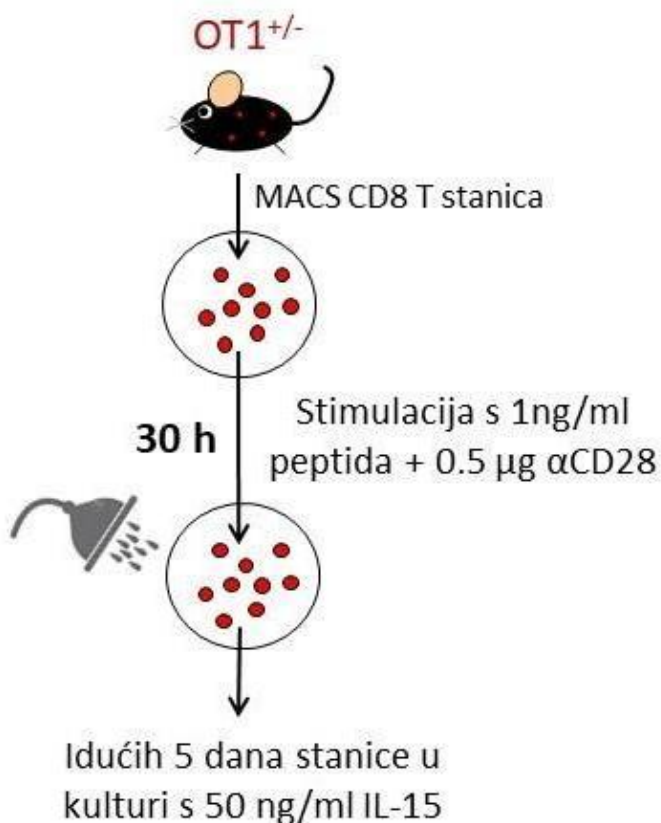


Brefeldin A. Nakon 4 sata inkubacije na 37°C i 5% CO<sub>2</sub>, stanice su obojane protutijelima specifičnim za površinske biljege stanica (populacija CD8<sup>+</sup> FVD- stanica). Potom su fiksirane i permeabilizirane koristeći kit za fiksaciju i permeabilizaciju stanica prema uputama proizvođača (BD Biosciences, San Jose, SAD) te unutarstanično bojane s odgovarajućim protutijelima za citokine (IFN $\gamma$  i IL-2).

## 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 4.1. Uspostavljanje *in vitro* modela za stvaranje memorijskih CD8 limfocita T

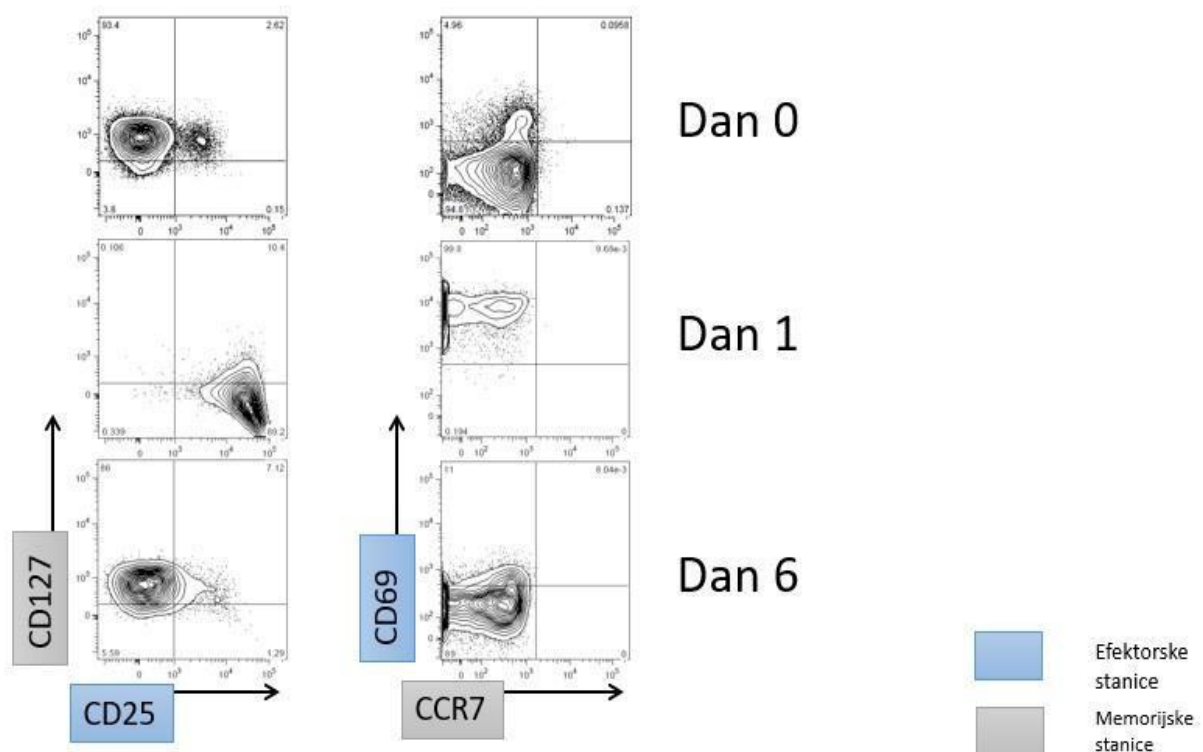
Za *in vitro* model za formiranje memorijskih CD8 limfocita T, nakon izolacije limfocita iz slezene miševa soja OT-1 C57BL/6J (postupkom opisanom u odjeljku 3.2.1) potrebno je izdvojiti, odnosno selektirati samo populaciju CD8 limfocita T postupkom magnetske separacije (MACS Kit za izolaciju) (Slika 8.). Čistoća populacije provjeri se korištenjem protočne citometrije, a broj stanica se određuje pomoću Neubauerove komore. Stanice se stimuliraju 30 sati s peptidima SIINFEKL (N4) ili SIIQFEKL (Q4) te  $\alpha$ CD28 (engl. *Anti-CD28 Antibody*) koja je u našem modelu služila kao kostimulacija tj. drugi ključni signal za aktivaciju CD8 limfocita T.



**Slika 8.** *In vitro* model za formiranje memorijskih CD8 limfocita T

Nakon 30 sati od početka stimulacije, stanice u kulturi se ispiru tri puta s 10 % RPMI medijem i naknadnim centrifugiranjem, a zatim se resuspendiraju u istom mediju uz dodatak citokina IL-15. Slijedi inkubacija sljedećih 5 dana na 37 °C.

Za fenotipsku analizu CD8 limfocita T korištena su fluorokromom obilježena protutijela koja su specifična za stanične markere, a uzorci su analizirani na protočnom citometru (FACS Verse).



**Slika 9.** Rezultati fenotipske analize CD8 limfocita T

Iz dobivenih rezultata na **Slici 9.** je vidljivo da na dan 0, odnosno prije početka stimulacije, stanice ispoljavaju markere naivnih CD8 limfocita T, odnosno ispoljavaju visoke razine molekule CD127 a niske razine molekula CD25 i CD69. CD8 limfociti T, 30 sati nakon stimulacije sa specifičnim Ova peptidom (SIINFEKL), poprimaju efektorski fenotip, odnosno ispoljavaju efektorske markere na površini. Efektorski markeri na površini su CD25 i CD69.

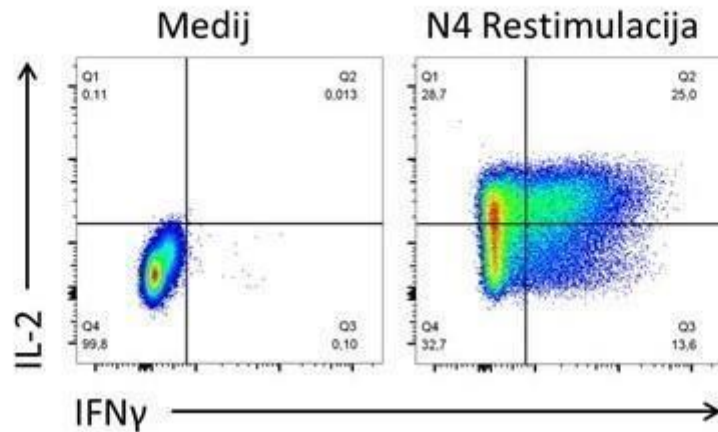
Najraniji aktivacijski marker je CD69, koji je inducibilan glikoprotein na površini stanice, eksprimiran aktivacijom putem TCR-a ili IL-2 receptora. Igra ulogu u proliferaciji i preživljavanju aktiviranih T limfocita (78, 79). Izražava se na vrlo niskim bazalnim razinama u mirujućim limfocitima; međutim, aktivacijom s fitohemaglutininom (mitogenom koji uzrokuje

aktivaciju putem TCR-a) njegova se ekspresija povećava na vremenski ovisan način između 3 i 12 sati, ostaje povišen do 24 sata, a nakon toga opada (80). CD25 je alfa lanac trimernog receptora za IL-2 i smatra se najistaknutijim markerom stanične aktivacije. Izražava se konstitutivno na površini nekoliko podskupina limfocita periferne krvi, kao što su efektorske i memorijske T stanice (81).

Nakon 30 sati stanice se ispiru te inkubiraju idućih 5 dana s IL-15 citokinom, za kojeg je poznato da usmjerava diferencijaciju prema memorijskim stanicama. Interleukin IL-15 je citokin kojeg proizvode monociti, a pospješuje razvoj i homeostazu limfocita. Također, IL-15 reguliran je kao odgovor na infekcije patogena i autoimune bolesti (82). IL-15 koristi komponente IL-2, odnosno imaju slično djelovanje. IL-15 igra glavnu ulogu u razvoju upalnih i zaštitnih imunoloških odgovora na patogene modulirajući imunološke stanice i urođenog i adaptivnog imunološkog sustava (83).

Nakon šest dana stanične kulture, CD8 limfociti T poprimaju fenotip karakterističan za memorijske stanice ispoljavajući visoke razine CD127 i CCR7 markera. CD127 je koristan marker za prepoznavanje memorijskih i efektorskih T stanica te je receptor za IL-7 citokin (interleukin 7) čija signalizacija također potiče kasniji rast i diobu (proliferaciju) i preživljavanje CD8 limfocita T. Također, poznato je da receptor CD127 izražavaju i prirodni regulacijski limfociti. Ekspresija molekule CD127, zapravo utječe na razvoj memorijskih stanica koje imaju zaštitnu ulogu (84). CCR7, kemokinski receptor, igra ključnu ulogu u migraciji naivnih i memorijskih T stanica, kao i zrelih dendritičnih stanica u limfne čvorove vezanjem na svoje ligande izražene na visokim endotelnim venulama i u zonama T stanica unutar sekundarnih limfoidnih organa (85, 86). Osim toga, na površini stanica se smanjuje ispoljavanje efektorskih markera (CD69 i CD25).

## 4.2. Rezultati funkcionalne analize memorijskih CD8 limfocita T u *in vitro* modelu



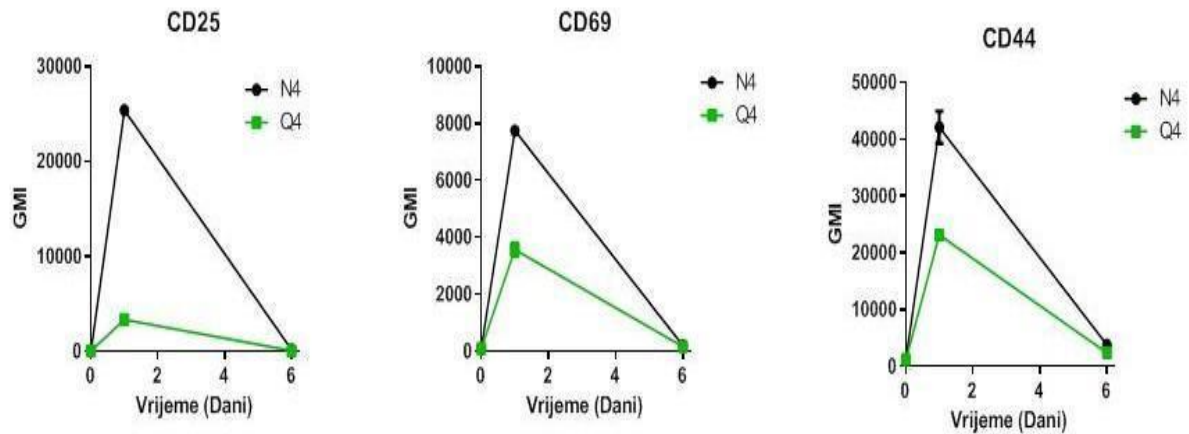
**Slika 10.** Funkcionalna analiza memorijskih CD8 limfocita T u *in vitro* modelu

Nakon što se fenotipskom analizom utvrdi da stanice na dan 6 u uspostavljenom *in vitro* modelu ispoljavaju markere karakteristične za memorijske CD8 limfocite odlučeno je provjeriti i njihova funkcionalna svojstva kako bi se potvrdilo da se radi o memorijskim stanicama. Glavno obilježje memorijskih CD8 limfocita T je da prilikom ponovnog susreta s antigenom imaju sposobnost bržeg i učinkovitijeg reagiranja od naivnih stanica i sprječavanja širenja infekcije i prije pojave kliničkih simptoma, pružajući tako organizmu dugotrajnu zaštitu (7). Na dan 6 *in vitro* kulture stanice se restimuliraju s 10 ng/ml N4 peptida uz prisutnost Brefeldina A. Nakon 4 h stanice smo intracelularno obojali te analizirali produkciju citokina pomoću protočne citometrije. Uočeno je da u odnosu na kontrolu (samo medij), stanice ponovno stimulirane s peptidom produciraju visoke razine citokina IL-2 i IFN $\gamma$  što je dokaz da se radi o pravim i funkcionalnim memorijskim stanicama.

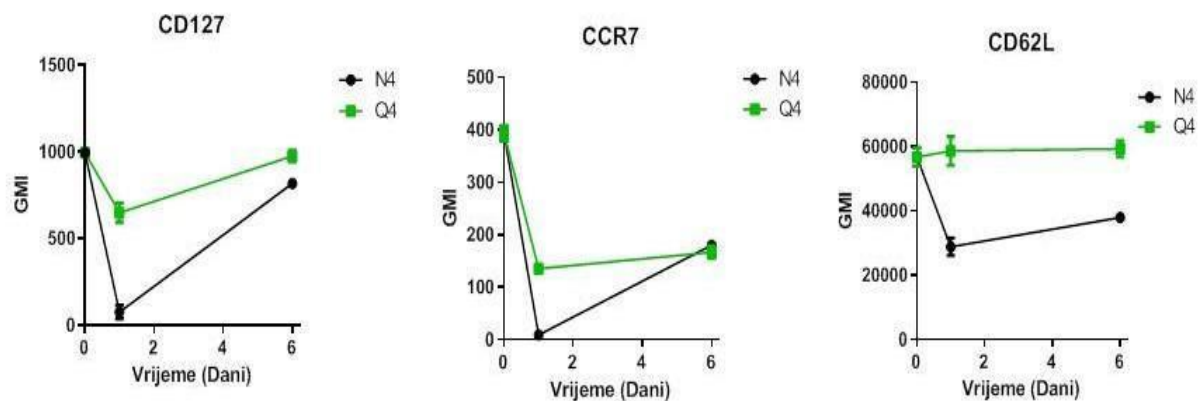
## 4.3. Fenotipska analiza CD8 limfocita T stimuliranih *in vitro* s peptidima visokog (N4) ili niskog (Q4) afiniteta za T-stanični receptor

Za utvrđivanje signala TCR koji doprinose razvoju stanične memorije i utvrđivanja postojanja razlike s obzirom na jačinu signala, primijenjen je model *in vitro* stimulacije stanica s peptidima različitog afiniteta vezanja za TCR. Korišteni peptidi su: SIINFEKL (N4) peptid jakog afiniteta te SIIQFEKL (Q4) peptid slabijeg afiniteta. Grafovi u nastavku prikazuju koji

markeri i kada se (1.dan – efektorske stanice ili 6. dan – memorijske stanice) ispoljavaju nakon stimulacije peptidima različitog afiniteta.



**Slika 11.** Fenotipska analiza CD8 limfocita T stimuliranih *in vitro* s peptidima visokog (N4) ili niskog (Q4) afiniteta za antigen – efektorski markeri



**Slika 12.** Fenotipska analiza CD8 limfocita T stimuliranih *in vitro* s peptidima visokog (N4) ili niskog (Q4) afiniteta za antigen – memorijski markeri

Za ovo istraživanje korišten je prethodno opisani *in vitro* model za formiranje memorijskih stanica, a stanice su stimulirane s peptidima različitog afiniteta. Prethodno je spomenuto da SIINFEKL (N4) je peptid s visokim afinitetom vezanja, dok je SIIQFEKL (Q4)

peptid sa nižim afinitetom vezanja. 30 sati nakon inkubacije na 37 °C, vidljivo je da su na površini CD8 limfocita T najviše ispoljeni CD25, CD69 i CD44 (**Slika 11.**), odnosno markeri efektorskih stanica, koji su ispoljeni jer su stanice susrele svoj specifični antigen te je započet proces diferencijacije u efektorske CD8 limfocite T. Također, iz **Slike 11.** lako je uočiti da stanice stimulirane N4 peptidom (peptid visokog afiniteta vezanja) u prvim danima kulture, neposredno nakon stimulacije ispoljavaju više razine CD25, CD69 i CD44 markera. Za razliku od stimulacije stanica s N4 peptidom, stanice stimulirane peptidom niskog afiniteta vezanja, Q4, ispoljavale su niže razine efektorskih markera. Ukratko, s obzirom da među peptidima postoji razlika u afinitetu, gdje N4 ima viši afinitet vezanja od Q4, stanice stimulirane peptidom N4 imaju višu razinu ispoljavanja efektorskih markera.

Nakon dodatnih 5 dana inkubacije, stanice poprimaju memorijski fenotip, dok se razina ekspresije efektorskih stanica vratila na početnu razinu, neovisno o tome jesu li stanice stimulirane N4 ili Q4 peptidom (**Slika 11.**). Na **Slici 12.** vidljivo je da stanice koje su stimulirane Q4 peptidom, odnosno peptidom niskog afiniteta vezanja, nakon 6 dana inkubacije ispoljavaju višu razinu memorijskih markera, CD127, CCR7 i CD62L, za razliku od stanica koje su stimulirane N4 peptidom. Promatramo li ekspresiju molekula CD127, CCR7 i CD62L, kod stanica koje su stimulirane ili N4 ili Q4 peptidom, nakon prvoga dana, razina ekspresije ovih molekula se snizuje, a povećava se kako se povećavaju dani inkubacije tj. kako stanice poprimaju memorijski fenotip.

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da CD8 limfociti T stimulirani peptidom visokog afiniteta vezanja za TCR, N4, bolje poprimaju efektorski fenotip (ispoljavaju više razine CD25, CD69 i CD44), dok CD8 limfociti T stimulirani peptidom nižeg afiniteta vezanja, Q4, brže poprimaju memorijski fenotip te imaju značajno višu razinu ispoljavanja CD127, CCR7 i CD62L markera.

#### **4.4. Utjecaj inhibitora BAI1 na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T *in vitro***

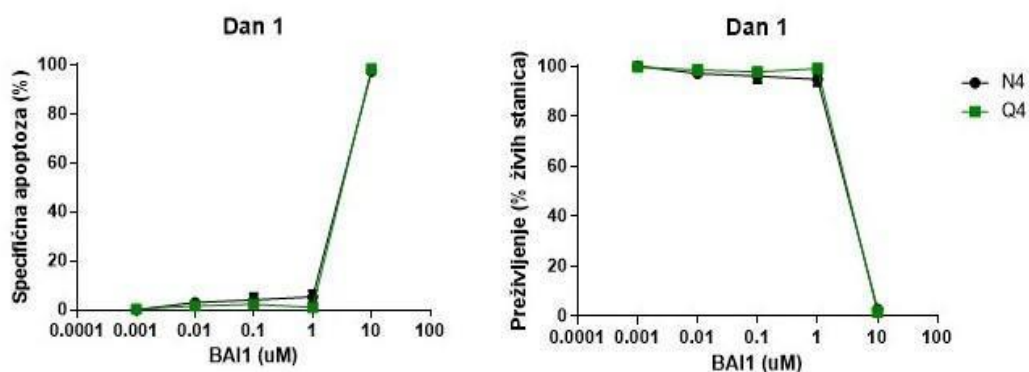
Nakon što je uspostavljen i validiran model za stvaranje memorijskih CD8 limfocita T *in vitro*, istražen je utjecaj specifičnih inhibitora proteina BCL-2 obitelji na diferencijaciju, tj. preživljenje memorijskih CD8 limfocita T.

Ponovno se koristi isti protokol za stimulaciju stanica, ali za ovaj pokus, osim što se stanice stimuliraju različitim peptidima, stimulirane su i s BAI1 inhibitorom pripremljenim

serijskim razrjeđenjima (10, 1, 0,1, 0,001 i 0  $\mu$ M). BAI1 (engl. *Brain-specific angiogenesis inhibitor*) je selektivni i alosterički inhibitor molekule BAX-a, regulatora apoptoze. Inhibitor se izravno se veže na spomenutu molekulu te na taj način inhibira njezinu aktivaciju (65, 66) Aktivacija i vezanje članova obitelji BAX na membranu mitohondrija inducira oslobađanje citokroma C i indukciju apoptotske stanične smrti (76). Stoga, pretpostavili smo da će primjena BAI1 inhibitora promicati preživljavanje CD8 limfocita T.

30 sati nakon inkubacije, stanice se obilježavaju određenim protutijelima, a analiza se provodi na protočnom citometru (FACS Verse). Fokus ispitivanja bio je na preživljenju stanica te je, stoga, uz protutijelo specifično za CD8 marker korišteno i protutijelo kojim se mogu razlikovati žive stanice od mrtvih. FVD (engl. *Fixable viability dye*) je boja koja se koristi za nepovratno obilježavanje mrtvih stanica prije postupaka krioprezervacije, fiksacije i/ili permeabilizacije. Može se koristiti za obilježavanje svih vrsta stanica. Također, obilježavanjem FVD-om omogućuje uklanjanje mrtvih stanica iz analize kada se proučavaju unutarstanične mete (87).

Na **Slici 13.** prikazan je utjecaj inhibitora BAI1 1 dan nakon stimulacije u *in vitro* modelu. Uočeno je da pri koncentraciji od 10  $\mu$ M BAI1 inhibitora stanice odumiru, što ukazuje da je ova koncentracija inhibitora toksična, neovisno o tome jesu li stanice stimulirane N4 peptidom (visoki afinitet vezanja) ili Q4 peptidom (niski afinitet vezanja). Pri nižim koncentracijama BAI1 inhibitora, vidljivo je da stanice preživljavaju neovisno o razlikama u afinitetu peptida (N4 ili Q4).

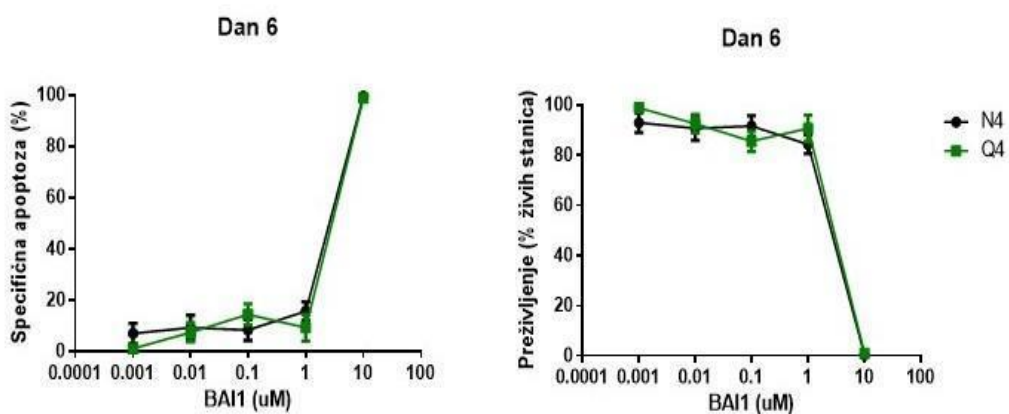


**Slika 13.** Utjecaj inhibitora BAI1 na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T *in vitro* – Dan 1

30 sata nakon stimulacije, stanice se tri puta ispiru s 10 % RPMI medijem, tretira ih se s citokinom IL-15 i ponovo s inhibitorom pripremljenog sustavnim razrjeđenjem (10, 1, 0,1,



0,001 i 0  $\mu\text{M}$ ), Za analizu utjecaja inhibitora BAI1 na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T, stanice je potrebno analizirati nakon 6 dana inkubacije na 37 °C. Ekvivalentno danu 1, nakon 6 dana inkubacije stanice se obilježe određenim protutijelima te se analiza provodi na protočnom citometru. Također, kao i na dan 1. stanične kulture, na 6. dan pri koncentraciji BAI1 10  $\mu\text{M}$  stanice su odumrle, što ponovno ukazuje da je ta koncentracija toksična. Pri manjim koncentracijama BAI1 inhibitora, vidljivo je da je većina stanica preživjela, neovisno o tome jesu li stanice prethodno bile stimulirane N4 ili Q4 peptidom (**Slika 14.**).



**Slika 14.** Utjecaj inhibitora BAI1 na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T *in vitro* – Dan 6

Zaključno, iz provedenog pokusa s BAI1 inhibitorom uočavamo da inhibicija molekule BAX ne utječe na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T, bez obzira jesu li stanice stimulirane N4 ili Q4 peptidom. Također, koncentracija od 10  $\mu\text{M}$  BAI1 inhibitora je toksična te su gotovo sve stanice, stimulirane spomenutom koncentracijom, odumrle.

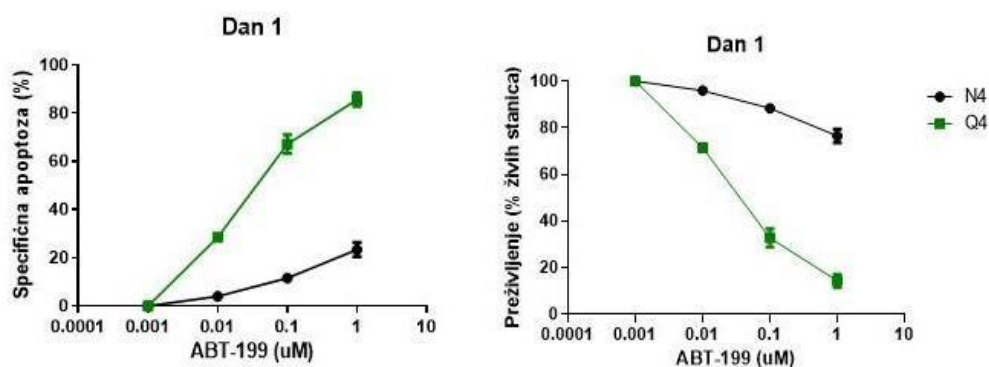
#### **4.5. Utjecaja inhibitora ABT-199 na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T *in vitro***

Nakon pokusa provedenog s BAI1 inhibitorom, stanice su istim postupkom stimulirane s inhibitorom ABT-199.

Stanice su stimulirane s peptidom različitog afiniteta, N4 ili Q4 te s ABT-199 inhibitorom pripremljenim serijskim razrjeđenjima (1, 0,1, 0,001 i 0  $\mu\text{M}$ ). Isto kao i u prethodnoj sekciji, 30

sati nakon stimulacije, stanice se obilježavaju određenim protutijelima kako bi se ispitao postotak preživljenja, a analiza se provodi korištenjem protočnog citometara (FACS Verse).

Na **Slici 15.** prikazani su rezultati nakon 1. dana u kulturi. Uočeno je da korištenjem viših koncentracija ovog inhibitora stanice slabije preživljavaju, tj. odlaze u apoptozu (programirana stanična smrt). Osim toga, vidljivo je da stanice koje su stimulirane peptidom slabijeg afiniteta vezanja, Q4, slabije preživljavaju pri većim koncentracijama ABT-199, dok stanice koje su stimulirane N4 peptidom, čiji je afinitet vezanja jači, bolje preživljavaju. Odnosno, ABT-199 ima veći utjecaj na inhibiciju preživljenja stanica stimuliranih s peptidima nižeg afiniteta. S obzirom da ABT-199 inhibira BCL-2 molekulu, koja ima anti-apoptotičko djelovanje, očekivano je da će stanice imati nižu razinu preživljenja te je ovim pokusom pokazano da stanice stimulirane Q4 peptidom više ovise o molekuli BCL-2 za svoje preživljenje.

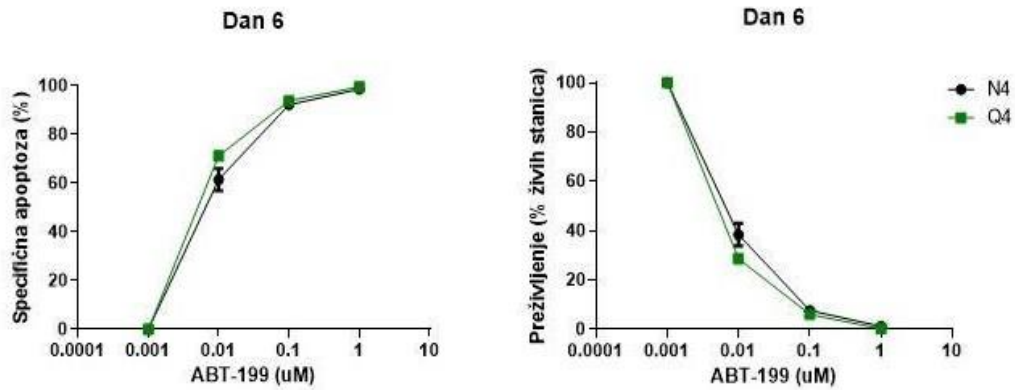


**Slika 15.** Utjecaj inhibitora ABT-199 na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T *in vitro* – Dan 1

Također, stanice su analizirane nakon šest dana inkubacije na 37 °C. Ponovljen je isti postupak kao u prethodnoj sekciji tj. 30 sati nakon stimulacije, stanice se ispiru te ih se tretira s citokinom IL-15 i s inhibitorom pripremljenog sustavnim razrjeđenjem (1, 0,1, 0,001 i 0 μM). Stanice se na dan 6 obilježe specifičnim protutijelima te mjeri se preživljenje na protočnom citometru (FACS Verse).

Na **Slici 16.**, prikazani su rezultati za dan 6. Ponovno, uočeno je da prilikom korištenja viših koncentracija ABT-199 inhibitora stanice odumiru (odlaze u apoptozu), dok stimulacijom stanica s niskim koncentracijama inhibitora, CD8 limfociti T bolje preživljavaju. Za razliku od

analize na dan 1, na dan 6 korišteni peptidi različitog afiniteta vezanja, N4 ili Q4, ne utječu na preživljavanje, odnosno specifičnu apoptozu.



**Slika 16.** Utjecaj inhibitora ABT-199 na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T *in vitro* –

Dan 6

Stoga, možemo zaključiti da inkubacija stanica s inhibitorom ABT-199 dovodi do smanjenja preživljavanja CD8 limfocita T u našem *in vitro* modelu. Međutim, razlike u apoptozi između stanica stimuliranih s peptidima višeg (N4) i onih stimuliranih s peptidom nižeg (Q4) afiniteta uočavamo jedino nakon 1. dana u kulturi (**Slika 15.**) dok se te razlike gube kada stanice poprime memorijski fenotip – na dan 6 (**Slika 16.**).

## 5. RASPRAVA

T i B limfociti sudjeluju u stečenom ili antigen-specifičnom imunološkom odgovoru s obzirom na to da su jedine stanice u organizmu koje mogu prepoznati i specifično reagirati na određeni antigeni epitop (88). CD8 Limfociti T, mogu prepoznati samo određene slijedove aminokiselina proteinskih antigena vezanih MHC (89). Nakon što naivni limfociti prepoznaju specifični antigen, uz dodatne signale oni proliferiraju i diferenciraju u efektorske i memorijske stanice. Aktivacija i diferencijacija T stanica bit će uspješni samo ako su prisutna tri signala: i) interakcija TCR s peptidom predstavljenim molekulom MHC (tj. HLA – eng. *human leukocyte antigen*, humani leukocitni antigen) ii) signaliranje putem kostimulacijskih molekula iii) sudjelovanje citokina koji iniciraju klonsku ekspanziju (15).

U ovome istraživanju praćeno je kako različiti inhibitori proteina BCL-2 obitelji utječu na stvaranje memorijskih CD8 stanica. Imunost posredovana CD8 T stanicama ima presudnu ulogu u zaštiti našeg tijela od infekcija i ponovne infekcije unutarstaničnim patogenima poput virusa i od tumora, izravnim ciljanjem i ubijanjem zahvaćenih stanica.

Teixero i suradnici (90) u svom istraživanju pokazali su važnost intenziteta signala u procesu diferencijacije naivni CD8 limfociti T u efektorske, tj. memorijske T stanice. U istraživanju, Keach i suradnici (7), naveli su nekoliko modela koji objašnjavaju kako tijekom infekcija nastaju heterogene populacije efektorskih i memorijskih T stanica, koje se razlikuju prema fenotipu, njihovim funkcijama i njihovoj sposobnosti za preživljavanje. Model koji navode, *model snage signala*, opisuje kako sama formacija heterogene populacije efektorskih stanica najviše ovisi o ukupnoj snazi signala s kojim se susreću prilikom infekcije, a snaga signala je, također, ključan faktor u procesu ekspanzije, ali i odabiru klonova CD8 limfocita T koje će diferencirati u memorijske stanice. Zehn i suradnici (36), istraživali su utjecaj razlika u afinitetu na funkciju CD8 limfocita T i stvaranju imunološke memorije. Pokazali su da i vrlo slaba simulacija može pokrenuti formiranje funkcionalne memorije.

U prvom dijelu ovog istraživanja analiziran je fenotip CD8 limfocita T u *in vitro* modelu. Za fenotipsku analizu korištena su određena fluorokromom obilježena protutijela koja su specifična za stanične markere. Stanice su prema protokolu stimulirane peptidima različitog afiniteta vezanja za T-stanični receptor. Analizom je utvrđeno da CD8 limfociti T, koji su prepoznali specifični antigen 24 sata nakon stimulacije peptidima, poprimaju efektorski fenotip, odnosno eksprimiraju efektorske markere na površini. Efektorski markeri na površini su CD44,

CD25 i CD69. Nakon 5 dana u kulturi s citokinom IL-15 na 37 °C, stanice poprimaju fenotip karakterističan za memorijske CD8 limfocite T. Odnosno, na površini stanica se povećava ispoljavanje memorijskih markera, a smanjuje se ispoljavanje efektorskih stanica. Memorijski markeri na stanici koji ispoljavaju, a čija su protutijela korištena za obilježavanje stanica jesu CD127, CCR7 i CD62L. S obzirom da su korišteni peptidi N4 i Q4, različitog afiniteta vezanja, uočeno je da stanice stimulirane N4 peptidom (peptid visokog afiniteta vezanja) u prvim danima kulture, neposredno nakon stimulacije brže poprimaju efektorski fenotip, odnosno ispoljavaju višu razinu CD25, CD69 i CD44 markera. Stanice stimulirane peptidom niskog afiniteta vezanja, Q4 ispoljavale su niže razine efektorskih markera, ali su te stanice na dan 6 ispoljavale višu razinu memorijskih markera, CD127, CCR7 i CD62L, za razliku od stanica koje su stimulirane N4 peptidom. Rezultati ovoga istraživanja podudaraju se s istraživanjem kojeg su proveli Daniels i suradnici. Daniels i suradnici (91) u svom istraživanju iskazuju kako CD8 limfociti T koji su izloženi jakim signalima postaju kratkotrajni efektori koje imaju funkciju da iskorijene infekciju, a zatim ih većina umire apoptozom. CD8 limfociti T koji su primili slabiji signal, bolje diferenciraju u memorijske T stanice. Knudson i suradnici (92) su istraživali utječe li promjena snage signala na razvoj memorijskih stanica, s obzirom da je od prije poznato da T-stanični signali i s visokim i s niskim afinitetom mogu potaknuti diferencijaciju CD8 limfocita T. Dobiveni rezultati su pokazali da i slabi signali mogu potaknuti stvaranje memorijskih CD8 limfocita T te da se oni fenotipski i funkcionalno razlikuju od memorijskih stanica nastalih kao odgovor na jaki signal, stoga zastupaju hipotezu da ligandi (peptidi) visokog i niskog afiniteta vezanja utječu različito na stvaranje memorijskih stanica. Prethodno sam spomenula istraživanje Zehna i suradnika (36) koji su istraživali fenotipske razlike CD8 limfocita T stimuliranih peptidima različitih afiniteta. Prvenstveno njihovo je istraživanje bilo usmjereno na peptide niskog afiniteta. Dobiveni rezultati njihovog istraživanja pokazali su kako tijekom *in vivo* odgovora na patogene, i peptidi slabog intenziteta su bili dovoljni za aktivaciju naivnih CD8 limfocita T te su potakli brzu proliferaciju i diferencijaciju efektorskih i memorijskih stanica. Također, njihovo istraživanje je pokazalo da i vrlo slaba simulacija može pokrenuti formiranje funkcionalne memorije, što je i u skladu s rezultatima naših i drugih istraživanja.

Daljnijim istraživanjem utvrđeni su utjecaji različitih inhibitora (BA11 i ABT-199) na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T, nakon stimulacije s peptidima različitog afiniteta vezanja (N4 ili Q4) te s inhibitorima različitih koncentracija pripremljenih serijskim razrjeđenjima. Nakon provedenog pokusa s BA11 inhibitorom, uočeno je da niske koncentracije

inhibitora ne utječu na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T, bez obzira jesu li stanice stimulirane N4 ili Q4 peptidom. Također, koncentracija od 10  $\mu$ M BAI1 inhibitora je toksična te su gotovo sve stanice, stimulirane spomenutom koncentracijom, odumrle. Poznato je da je BAI1 alosterički inhibitor pro-apoptotične molekule BAX, koja regulira tj. potiče apoptozu. Izravnim vezanjem BAI1 inhibitora na molekulu BAX, alosterički se inhibira aktivacija ove molekule. Inače, aktivirana molekula BAX u membrani mitohondrija inducira oslobađanje citokroma C te posljedično i staničnu smrt. Odnosno, nakon aktivacije molekule BAX i BAK stvaraju se pore u membrani mitohondrija i započinje aktivacija kaspaza (73). Očekivano je da će inhibicijom molekule BAX stanice bolje preživljavati te smo ovim pokusom htjeli ispitati te testirati ako postoje razlike između stanica koje su prethodno stimulirane peptidima različitog afiniteta vezanja (N4 i Q4). Nakon provedenog pokusa uočeno je da BAI1 ne potiče preživljenje stanica te nema razlike u preživljenju, bez obzira jesu li stanice stimulirane N4 ili Q4 peptidom, odnosno ako su tretirane različitim koncentracijama BAI1 inhibitora. Moguće objašnjenje dobivenog rezultata leži u tome što osim BAX molekule, na membrani mitohondrija postoji i molekula BAK koju BAI1 ne inhibira. Utjecaj na preživljavanje CD8 limfocita T možda bi uočili kada bi postojao inhibitor koji bi inhibirao i BAX i BAK molekulu. Također, utjecaj na preživljenje potencijalno bi se mogao uočiti ukoliko bi se koristio soj miševa kojima nedostaje molekula BAK te da se ti miševi *in vivo* tretiraju inhibitorom BAI1. Limitacija ovog istraživanja je ta da u provedenom pokusu nismo testirali ako inhibitor BAI1 zapravo blokira molekulu BAX. Upravo bi to bilo teško za pokazati bez korištenja soja miša kojemu nedostaje molekula BAK. No, iz prethodno provedenih istraživanja poznato je da BAI1 inhibira konformacijske promjene prilikom aktivacije BAX molekule koji sprečavaju njegovu mitohondrijsku translokaciju i oligomerizaciju. Podaci istraživanja ističu novu paradigmu za učinkovito i selektivno farmakološko ciljanje BAX-a kako bi se omogućio racionalan razvoj inhibitora stanične smrti posredovane BAX-om (93, 94).

Uz BAI1 inhibitor korišten je i ABT-199. Iz prethodnih istraživanja poznato je da je ABT-199 (Venetoclax) visoko selektivni inhibitor BCL-2 molekule, koja je važna u regulaciji apoptoze, tumorigeneze i staničnih odgovora na terapiju protiv raka. ABT-199 je specifičan za BCL-2 i inducira selektivnu smrt tumorskih stanica ovisnih o BCL-2. U *in vitro* modelu stanične kulture, Davids i Letai (95) pružaju uvjerljive dokaze da ABT-199 selektivno ubija stanice ovisne o BCL-2 te da ih ubija mitohondrijskim putem apoptoze, što je prikazano u ovom istraživanju. Nakon provedenog pokusa s ABT-199 inhibitorom u uspostavljenom *in vitro* modelu, 30 sati nakon stimulacije, uočeno je da korištenjem niskih koncentracija inhibitora

stanice bolje preživljavaju, odnosno korištenjem viših koncentracija stanice odlaze u proces apoptoze (programirana stanična smrt). Upravo je takav rezultat bio očekivan, s obzirom da ABT-199 inhibira BCL-2 molekulu, koja ima anti-apoptotičko djelovanje. Osim toga, vidljivo je da stanice koje su prethodno stimulirane peptidom slabijeg afiniteta vezanja, Q4, slabije preživljavaju prilikom kultivacije s višim koncentracijama ovog inhibitora, dok stanice koje su stimulirane N4 peptidom, čiji je afinitet vezanja jači, bolje preživljavaju. ABT-199 ima veći utjecaj na inhibiciju preživljenja stanica stimuliranih s peptidima nižeg afiniteta, tj. stanice stimulirane Q4 peptidom više ovise o molekuli BCL-2 za svoje preživljenje. Ovi rezultati se podudaraju s rezultatima nedavno objavljenim u časopisu PLOS Biology (48). U istraživanju je pokazano da stanice stimulirane s peptidom nižeg afiniteta ispoljavaju više razine anti-apoptotičke molekule BCL-2. Stoga, inhibicijom spomenute molekule, stanice stimulirane Q4 peptidom, ulaze u proces apoptoze što rezultira smanjenim postotkom preživljenja na dan 1 u opisanom *in vitro* modelu. Nakon šest dana inkubacije, analizom je utvrđeno da prilikom korištenja viših koncentracija ABT-199 inhibitora stanice odumiru (odlaze u apoptozu), dok stimulacijom stanice s niskim koncentracijama inhibitora, CD8 limfociti T bolje preživljavaju. Za razliku od analize na dan 1, na dan 6 nema razlike u preživljenju nakon stimulacije s peptidima različitog afiniteta (N4 i Q4), tj. pokazali smo da na dan 6 razlika u afinitetu ne utječe na postotak preživljenja, odnosno specifičnu apoptozu. Dobiveni rezultati su očekivani i podudaraju se s nedavno objavljenim istraživanjem gdje je pokazano da je razina ispoljavanja BCL-2 molekule nakon stimulacije s peptidima niskog afiniteta za antigen najviša prvih par dana nakon stimulacije. U tom periodu ispoljavanje BCL-2 molekule je značajno više nakon stimulacije peptidima nižega afiniteta (Q4) u odnosu na stimulaciju peptidima višeg afiniteta za TCR (N4) dok se u kasnijim vremenskim točkama statistički značajna razlika gubi (48). Stoga, u našem modelu uočavamo razlike u preživljenju između stanica višeg i nižeg afiniteta samo 24 sata nakon stimulacije.

U opisanom *in vitro* modelu pokazali smo da inkubacija s BAI1 inhibitorom ne utječe na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T, bez obzira jesu li stanice stimulirane N4 ili Q4 peptidom, dok korištenje ABT-199 inhibitora, rezultira smanjenim preživljavanjem stanica stimuliranih s Q4 peptidom, u odnosu na stanice stimulirane s N4 peptidom u prvih 30 sati nakon stimulacije.

## 6. ZAKLJUČAK

CD8 limfociti T su ključni u zaštiti našeg tijela od infekcija unutarstaničnim patogenima poput virusa i tumora. Aktivacija CD8 limfocita T strogo je reguliran proces za koji su potrebna 3 signala: i) prepoznavanje antigena pomoću TCR, ii) kostimulacija i iii) lučenje citokina. TCR signalizacija omogućuje integraciju signala s različitim intenzitetima, koji se dalje pojačavaju pravim citokinima i kostimulacijskim molekulama. Nakon uklanjanja infekcije, većina antigen-specifičnih CD8 limfocita T odumiru procesom apoptoze, što rezultira preživljavanjem male populacije dugovječnih memorijskih stanica (5-10% antigen-specifičnih stanica). Te stanice imaju potencijal samoobnavljanja i održavaju se na antigen-neovisni način.

U ovom diplomskom radu istražen je utjecaj specifičnih inhibitora proteina BCL-2 obitelji na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T *in vitro*. Prvo je uspostavljen model za stvaranje memorijskih CD8 limfocita T *in vitro* te su testirane njihove fenotipske i funkcionalne karakteristike. Zatim je testiran utjecaj dvaju inhibitora (BAI1 i ABT-199) na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T u *in vitro* modelu koristeći stimulaciju peptidima različitog afiniteta za T-stanični receptor.

Zaključno, u *in vitro* modelu pokazali smo:

Inhibitor BAI1 ne utječe na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T u validiranom *in vitro* modelu, bez obzira jesu li stanice stimulirane N4 ili Q4 peptidom. Također, koncentracija od 10  $\mu$ M BAI1 inhibitora je toksična te su gotovo sve stanice odumrle. Provedenim pokusom ustanovljeno je da korištenje BAI1, koji inhibira samo BAX molekulu nije dovoljno da se poveća postotak preživljenja stanica te je predloženo da se razmotri za buduća istraživanja inhibicija obje pro-apoptotske molekule (BAX i BAK). Inkubacija stanica s inhibitorom ABT-199 rezultirala je smanjenim preživljenjem stanica u opisanom *in vitro* modelu. Stanice stimulirane s peptidom nižeg afiniteta (Q4) ispoljavaju više razine anti-apoptotičke molekule BCL-2 u prvim danima nakon stimulacije. Stoga, inhibicijom spomenute molekule, stanice stimulirane Q4 peptidom, ulaze u proces apoptoze što rezultira smanjenim postotkom preživljenja na dan 1 u odnosu na stanice stimulirane s peptidom višeg afiniteta (N4). Za razliku od analize na dan 1, na dan 6 kada su stanice poprimile memorijski fenotip ne uočavamo više razliku u preživljenju između stanica stimuliranih s peptidima različitog afiniteta.



## 7. LITERATURA

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S., *Osnove imunologije, Funkcije i poremećaji imunološkog sustava*; peto izdanje, Split: Medicinski fakultet Sveučilište u Splitu, 2016.
2. Čulo F., Batinić D. *Stanice, tkiva i organi imunskog sustava*. U: Imunologija, sedmo, obnovljeno i dopunjeno izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2010., str. 18-57.
3. ReasrchGate, dostupno na: [https://www.researchgate.net/figure/Illustrations-of-innate-and-adaptive-immune-system-effectors-The-response-of-the-innate\\_fig1\\_264987834](https://www.researchgate.net/figure/Illustrations-of-innate-and-adaptive-immune-system-effectors-The-response-of-the-innate_fig1_264987834),
4. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. New York: Garland Science; *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition, 2002. (citirano: 13.5.2021.) dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26846/>
5. Zemljčić S. *Trajanje stanične imunosti u kokoši lake pasmine za virus newcastleske bolesti određene stimulacijom leukocita in vitro*, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, 2018.
6. Nikolich-Zugich J., Slifka M.K., Messaoudi I. *The many important facets of T-cell repertoire diversity*. Nat Rev Immunol. 2004;4(2):123-32.
7. Kaech S.M., Cui W. *Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation*. Nat Rev Immunol. 2012;12(11):749-61.
8. Arstila, T.P. et al., *A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity*. Science, 1999. 286(5441): p. 958-61.
9. Shedlock, D.J. et al., *Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during Listeria monocytogenes infection*. J Immunol, 2003. 170(4): p. 2053-63.
10. Lenschow D.J., Walunas T.L., Bluestone J.A., *CD28/B7 system of T cell costimulation*. Annu Rev Immunol, 1996. 14: p. 233-58.
11. Kaech S.M., Wherry E.J., Ahmed R., *Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(4): p. 251-62.
12. von Andrian U.H., Mempel T.R., *Homing and cellular traffic in lymph nodes*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(11): p. 867-78.
13. Dorner B.G., et al., *Selective expression of the chemokine receptor CXCR1 on crosspresenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells*. Immunity, 2009. 31(5): p. 823-33.
14. Castellino F., et al., *Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction*. Nature, 2006. 440(7086): p. 890-5.

15. Kapsenberg M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T Cell polarization*. Nat Rev Immunol. 2003;3:984–93.
16. Mousavi S.F., et al., *OX40 costimulatory signals potentiate the memory commitment of effector CD8+ T cells*. J Immunol, 2008. 181(9): p. 5990-6001.
17. Hendriks J., et al., *During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8+ memory T cells and their capacity for secondary expansion*. J Immunol, 2005. 175(3): p. 1665-76.
18. Williams M.A., Bevan M.J., *Effector and memory CTL differentiation*. Annu Rev Immunol, 2007. 25: p. 171-92.
19. Pulle G., Vidric M., Watts T.H., *IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent CD8 memory T cell survival*. J Immunol, 2006. 176(5): p. 2739-48
20. Shedlock D.J., et al., *Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during Listeria monocytogenes infection*. J Immunol, 2003. 170(4): p. 2053-63.
21. Andreasen S.O., et al., *Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses*. J Immunol, 2000. 164(7): p. 3689-97.
22. Liu Y., et al., *Distinct costimulatory molecules are required for the induction of effector and memory cytotoxic T lymphocytes*. J Exp Med, 1997. 185(2): p. 251-62.
23. Lenschow D.J., Walunas T.L., Bluestone J.A., *CD28/B7 system of T cell costimulation*. Annu Rev Immunol, 1996. 14: p. 233-58.
24. Badovinac V.P., Harty J.T., *Manipulating the rate of memory CD8+ T cell generation after acute infection*. J Immunol, 2007. 179(1): p. 53-63.
25. Kaech S.M., Wherry E.J., *Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection*. Immunity, 2007. 27(3): p. 393-405.
26. Surh C.D., Sprent J., *Homeostasis of naive and memory T cells*. Immunity, 2008. 29(6): p. 848-62.
27. Kaech S.M., et al., *Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells*. Nat Immunol, 2003. 4(12): p. 1191-8.
28. Kaech S.M., Ahmed R., *Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells*. Nat Immunol, 2001. 2(5): p. 415-22.
29. Joshi, N.S., et al., *Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+)  
T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor*. Immunity, 2007. 27(2): p. 281-95.

30. Wensveen F.M., van Gisbergen K.P., Eldering E., *The fourth dimension in immunological space: how the struggle for nutrients selects high-affinity lymphocytes*. Immunol Rev, 2012. 249(1): p. 84-103.
31. Viola A., et al., *T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains*. Science, 1999. 283(5402): p. 680-2.
32. Valitutti S., et al., *Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes*. Nature, 1995. 375(6527): p. 148-51.
33. Corse E., Gottschalk R.A., Allison J.P., *Strength of TCR-peptide/MHC interactions and in vivo T cell responses*. J Immunol, 2011. 186(9): p. 5039-45.
34. Masopust D., et al., *The role of programming in memory T-cell development*. Curr Opin Immunol, 2004. 16(2): p. 217-25.
35. Busch D.H., Pamer E.G., *T cell affinity maturation by selective expansion during infection*. J Exp Med, 1999. 189(4): p. 701-10.
36. Zehn D., Lee S.Y., Bevan M.J., *Complete but curtailed T-cell response to very low affinity antigen*. Nature, 2009. 458(7235): p. 211-4.
37. Wherry E.J., et al., *The induction of virus-specific CTL as a function of increasing epitope expression: responses rise steadily until excessively high levels of epitope are attained*. J Immunol, 1999. 163(7): p. 3735-45.
38. Badovinac V.P., Porter B.B., Harty J.T., *CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation*. Nat Immunol, 2004. 5(8): p. 809-17.
39. Wensveen F.M., et al., *Pro-apoptotic protein Noxa regulates memory T cell population size and protects against lethal immunopathology*. J Immunol, 2013. 190(3): p. 1180-91.
40. Wensveen F.M., et al., *Apoptosis threshold set by Noxa and Mcl-1 after T cell activation regulates competitive selection of high-affinity clones*. Immunity, 2010. 32(6): p. 754-65.
41. Kundig T.M., et al., *Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells*. Immunity, 1996. 5(1): p. 41-52.
42. Acuto O., Michel F., *CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(12): p. 939-51.
43. Peperzak V., et al., *CD27 sustains survival of CTLs in virus-infected nonlymphoid tissue in mice by inducing autocrine IL-2 production*. J Clin Invest, 2010. 120(1): p. 168-78.
44. van Gisbergen K.P., et al., *The costimulatory molecule CD27 maintains clonally diverse CD8(+) T cell responses of low antigen affinity to protect against viral variants*. Immunity, 2011. 35(1): p. 97-108.

45. Pipkin M.E., et al., *Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells*. *Immunity*, 2010. 32(1): p. 79-90.
46. Badovinac V.P., et al., *Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination*. *Nat Med*, 2005. 11(7): p. 748-56.
47. Au-Yeung B.B., et al., *IL-2 Modulates the TCR Signaling Threshold for CD8 but Not CD4 T Cell Proliferation on a Single-Cell Level*. *J Immunol*, 2017. 198(6): p. 2445-2456.
48. Kavazović I. *The role of T-cell receptor signal strength in controlling clonal diversity of CD8 T-cell memory*, [Disertacija] 2020. Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet
49. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R., *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*, 1972. 26(4):239-57
50. Horvitz H.R., *Genetic control of programmed cell death in the nematode Caenorhabditis elegans*. 1999. 59(7 Suppl):1701s-1706s.
51. Formigli L., Papucci L., Tani A., Schiavone N., Tempestini A., Orlandini G.E., Capaccioli S., Orlandini S.Z., *Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis*. 2000. 182(1):41-9.
52. Norbury C.J., Hickson I.S., *Cellular responses to DNA damage*. 2001. 41(1):367-401.
53. BMG LabTech, Dr Tobias Pusterla (2020.) *Apoptosis – what assay should I use?*, dostupno na: <https://www.bmglabtech.com/apoptosis-what-assay-should-i-use/>
54. Hirsch T., Marchetti P., Susin S.A., Dallaporta B., Zamzami N., Marzo I., Geuskens M., Kroemer G., *The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death*. 1997. 15(13):1573-81.
55. Zeiss C.J., *The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice*, 2003. 40(5):481-95.
56. Pop C., Salvesen G.S., *Human caspases: activation, specificity, and regulation*. *J. Biol. Chem.* 2009. 284: 21777-21781.
57. Bredesen D.E., *Programmed cell death mechanisms in neurological disease*. *Curr. Mol. Med.* 2008. 8: 173-186.
58. Vince J. E., Wong W.W., Khan N., Feltham R, Chau D., Ahmed A.U., Benetatos C.A., Chunduru S.K., Condon S.M., McKinlay M., Brink R., Leverkus M., Tergaonkar V., Schneider P., Callus B.A., Koentgen F., Vaux D.L., Silke J., *IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis*. *Cell* 2007. 131: 682-693.
59. Chen L., Park S.M., Tumanov A.V., Hau A., Sawada K., Feig C., Turner J.R., Fu Y.X., Romero I.L., Lengyel E., Peter M.E., *CD95 promotes tumour growth*. *Nature* 2010.465: 492-496.

60. Youle R. J., Strasser A., *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2008. 9: 47-59.
61. Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Chipuk J.E., Bonzon C., Sullivan B.A., Green D.R., Newmeyer D.D., *BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly*. Mol. Cell 2005. 17:525-535.
62. Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell 1998. 94: 491-501.
63. Kim H., Rafiuddin-Shah M., Tu H.C., Jeffers J.R., Zambetti G.P., Hsieh J.J., Cheng E.H., *Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies*. Nat. Cell Biol. 2006. 8: 1348-1358.
64. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. (citirano: 21.5.2021.) dostupno na: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=27451>
65. Kornberg A., *For the love of enzymes – The Odyssey of a biochemist*. Harvard University Press, Cambridge, 1989. (Mass.), London,
66. Tsujimoto Y., Gorham J., Cossman J., *“The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining,”* Science, vol. 229, no. 4720, pp. 1390–1393, 1985.
67. Cory S., Adams J.M., *“The BCL2 family: regulators of the cellular life-or-death switch,”* Nature Reviews Cancer, vol. 2, no. 9, pp. 647–656, 2002.
68. Pickering B.M., De Mel S., Lee M. et al., *“Pharmacological inhibitors of NF-kappaB accelerate apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells,”* Oncogene, vol. 26, no. 8, pp. 1166–1177, 2007.
69. Walczak H. And Krammer P.H., *“The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems,”* Experimental Cell Research, vol. 256, no. 1, pp. 58–66, 2000.
70. Kapoor I., Bodo J., Hill B.T., Hsi E.D., Almasan A., *Targeting BCL-2 in B-cell malignancies and overcoming therapeutic resistance*, Cell Death & Disease volume 11, 2020., Article number: 941
71. Youle R.J., Strasser A., *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol 2008. 9: 47-59
72. Silverstein R.L., Febbraio M., *“CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior“*. 2009. Sci Signal 2:re3.

73. Nishimori H., et al. „A novel brain-specific p53-target gene, *BAI1*, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis“. 1997. *Oncogene* 15:2145–2150.
74. Park D. et al., „*BAI1* is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the *ELMO/Dock180/Rac* module 3“. 2007. *Nature* 450:430–434
75. Medchemexpress, *BAI 1*, (citirano: 19.5.2021) dostupno na: <https://www.medchemexpress.com/BAI1.html>,
76. Zong W.X., Lindsten T., Ross A.J., MacGregor G.R., Thompson C.B., *BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak*. *Genes Dev* 2001. 15: 1481-1486.
77. The Jackson laboratory C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J, Stock No: 003831 | OT-1, [Transgenic](https://www.jax.org/strain/003831), (citirano: 20.5.2021.) dostupno na: <https://www.jax.org/strain/003831>
78. Cambiaggi C., Scupoli M.T., Cestari T., et al., “Constitutive expression of *CD69* in interspecies T-cell hybrids and locus assignment to human chromosome 12,” *Immunogenetics*, vol. 36, no. 2, pp. 117–120, 1992.
79. Lopez-Cabrera M., Santis A.G., Fernández-Ruiz E., et al., “Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen *AIM/CD69*, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 178, no. 2, pp. 537–547, 1993.
80. Reddy M., Eirikis E., Davis C., Davis H.M., Prabhakar U., “Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function,” *Journal of Immunological Methods*, vol. 293, no. 1-2, pp. 127–142, 2004.
81. Hosono M., de Boer O.J., van der Wal A.C., et al., “Increased expression of T cell activation markers (*CD25*, *CD26*, *CD40L* and *CD69*) in atherectomy specimens of patients with unstable angina and acute myocardial infarction,” *Atherosclerosis*, vol. 168, no. 1, pp. 73–80, 2003.
82. Poulton T.A., Gallagher A., Potts R.C., Beck J.S., “Changes in activation markers and cell membrane receptors on human peripheral blood T lymphocytes during cell cycle progression after PHA stimulation,” *Immunology*, vol. 64, no. 3, pp. 419–425, 1988.
83. Anthony S., Schluns K.S., *Emerging roles for IL-15 in the activation and function of T-cells during immune stimulation*, review, volume 2015:6 Pages 25-37
84. Pin-Yu Perera, Lichy J.H., Waldmann T.A., Perera L.P., *The role of Interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use*, *Microbes Infect.* 2012 Mar; 14(3): 247–261.

85. Berber, D. L., Wherry, E., Ahmed, R., *Cutting Edge: Rapid In Vivo Killing by Memory CD8 T Cells*. Journal of Immunology 2013.; 171(1), str. 27-31
86. Czystowska M., Gooding W., Szczepanski M.J., Lopez-Abaitero A., Ferris R.L., Johnson J.T., Whiteside T.L., *The Immune Signature of CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T Cells in the Peripheral Circulation Associates with Disease Recurrence in Patients with HNSCC*, Clin Cancer Res. 2013 Feb 15; 19(4): 889–899.
87. [ThermoFisher SCIENTIFIC](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/65-0865-14#65-0865-14), eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780, (citirano: 31.5.2021.) dostupno na: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/65-0865-14#65-0865-14>
88. Anaya J., Shoenfeld Y., Rojas-Villarraga A., Levy R.A., Cervera R., *Autoimmunity: From Bench to Bedside*, Chapter 5 Introduction to T and B lymphocytes, Bogota (Colombia): El Rosario University Press; 2013 Jul 18.
89. Bousso P., *T Cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies*. Nat Rev Immunol. 2008;8:675–84.
90. Teixeira E., Daniels M.A., Hamilton S.E., Schrum A.G., Bragado R., Jameson S.C., Palmer E., *Different T Cell Receptor Signals Determine CD8<sup>+</sup> Memory Versus Effector Development*. Science 2009. 23; 323(5913), str. 502-505. doi: 10.1126/science.1163612.
91. Daniels M.A., Teixeira E., *TCR signaling in T cell Memory*. Frontiers in Immunology 2015.; 6(617), str. 1-10. doi: 10.3389/fimmu.2015.00617
92. Knudson K.M., Hamilton S.E., Daniels M.A., Jameson S.C., Teixeira E., *Cutting edge: the signals for the generation of T cell memory are qualitatively different depending on TCR ligand strength*. J Immunol 2013. 191, str. 5797–5801. doi:10. 4049/jimmunol.1300905
93. Whelan R.S., et al. *Bax regulates primary necrosis through mitochondrial dynamics*. Proc Natl Acad Sci U S A 2012. 109, 6566–71
94. Karch J. et al. *Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice*. Elife 2, 2013. e00772
95. Davids M.S., Letai A., *ABT-199: A New Hope for Selective BCL-2 Inhibition*, Cancer Cell. 2013. Feb 11; 23(2): 139–141. doi: 10.1016/j.ccr.2013.01.018

## POPIS SLIKA I GRAFOVA

**Slika 1.** Tkiva i organi imunološkog sustava (2)

**Slika 2.** Razlike i sličnosti prirođenog i stečenog imunološkog sustava (3)

**Slika 3.** Razlike između humoralne i stanične imunosti (5)

**Slika 4.** Kinetika odgovora CD8 T stanica nakon stanične infekcije

**Slika 5.** Apoptoza (53)

**Slika 6.** Signalni putevi apoptoze

**Slika 7.** Anti- i pro-apoptične molekule

**Slika 8.** *In vitro* model za formiranje memorijskih CD8 limfocita T

**Slika 9.** Rezultati fenotipske analize CD8 limfocita T

**Slika 10.** Funkcionalna analiza memorijskih CD8 limfocita T u *in vitro* modelu

**Slika 11.** Fenotipska analiza CD8 limfocita T stimuliranih *in vitro* s peptidima visokog (N4) ili niskog (Q4) afiniteta za antigen – efektorski markeri

**Slika 12.** Fenotipska analiza CD8 limfocita T stimuliranih *in vitro* s peptidima visokog (N4) ili niskog (Q4) afiniteta za antigen – memorijski markeri

**Slika 13.** Utjecaj inhibitora BAI1 na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T *in vitro* – Dan 1

**Slika 14.** Utjecaj inhibitora BAI1 na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T *in vitro* – Dan 6

**Slika 15.** Utjecaj inhibitora ABT-199 na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T *in vitro* – Dan 1

**Slika 16.** Utjecaj inhibitora ABT-199 na stvaranje memorijskih CD8 limfocita T *in vitro* - Dan 6



## POPIS KORIŠTENIH SKRAĆENICA

**MALT** – *mucosal-associated lymphoid tissue*

**PAMP** - *pathogen-associated molecular patterns* (molekularni obrasci povezani s patogenima)

**DAMP** - *damage-associated molecular patterns* (molekularni obrasci oštećenja patogenima)

**TCR** – *T cell receptor* (T-stanični receptor)

**BCR** – *B cell receptor* (B-stanični receptor)

**MHC** – *major histocompatibility complex* (molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti)

**HLA** – *human leukocyte antigen* (humani leukocitni antigen)

**CD** - *clusters of differentiation*

**SLO** – sekundarni limfni organi

**APC** – *antigen presenting cells* (antigen prezentirajuće stanice)

**S1PR1** – sfingozin 1-fosfatni receptor 1

**S1P** – sfingozin 1-fosfat

**VSV** – virus vezikularnog stomatitisa

**IL** – interleukin

**MPEC** - *memory precursor effector cells* (markeri za identifikaciju memorijskih prekursora)

**SLEC** - *short-lived effector cells* (kratkotrajne efektorske stanice)

**Mcl-1** - *Myeloid cell leukemia-1*

**TNF** - *Tumor necrosis factor* (tumor nekrotski faktor)

**TRAIL** - *TNF related apoptosis inducing ligand* (TNF vezani aktivator apoptoze)

**FAS** - *Fas cell surface death receptor*

**APAF1** - *Apoptotic protease activating factor 1*

**BCL-2** - *B-cell lymphoma 2* (B-stanični limfom 2)

**CLL** - *chronic lymphocytic leukemia* (kronična limfocitna leukemija)

**AML** – *acute myeloid leukemia* (akutna mijeloična leukemija)

**ABT-199** – *Venetoclax*

**BAI1** – *brain-specific angiogenesis inhibitor 1*

**TSR** - *thrombospondin-1* (trombospondina tipa 1)

**DMEM** - *Dulbecco's modified eagle medium* (Dulbeccov modificirani minimalni esencijalni medij)

**RPMI** - *Roswell park memorial institute medium* (Kompletni RPMI medij)

**MACS** - *magnetic-activated cell sorting buffer* (Puffer za magnetsku izolaciju stanica)

**FACS** - *flow cytometry medium* (Medij za protočnu citometriju)

**N4** – SIINFEKL

**Q4** - SIIQFEKL

# ŽIVOTOPIS

Dora Majnarić

## OSOBNI PODACI

Mjesto i datum rođenja: Rijeka, 10.08.1997.

Adresa: Franje Čandeka 23b, Rijeka

Država: Hrvatska

Telefon: 091 255 5899

e-mail: [doramajnaric7@gmail.com](mailto:doramajnaric7@gmail.com)

## OBRAZOVANJE:

2004.-2008. Osnovna škola – Scuola elementare Gelsi, Rijeka

2008.-2012. Osnovna škola Podmurvice, Rijeka

2012.-2016. Prva riječka hrvatska gimnazija, Rijeka

2016.-2019. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva

2019.-danas Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Diplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva

## RADNO ISKUSTVO

Kolovoz – rujan 2018. godine: Administrativni poslovi u Jadran galenskom laboratoriju

Ožujak – danas: Epidemiološki poslovi vezani za COVID-19 na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo PGŽ

## DODATNA ZNANJA:

Dobro poznavanje rada na računalu (MS Office paket), aktivno poznavanje engleskog i talijanskog jezika. Položen vozački ispit B kategorije.