

# Infekcija neurona citomegalovirusom

---

Materljan, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:184:995563>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Jelena Materljan

**INFEKCIJA NEURONA CITOMEGALOVIRUSOM**

Diplomski rad

Rijeka, 2020. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Jelena Materljan

**INFEKCIJA NEURONA CITOMEGALOVIRUSOM**

Diplomski rad

Rijeka, 2020. godina

Mentor rada: doc. dr. sc. Ilija Brizić, mag. ing. biotechn.

Diplomski rad ocijenjen je dana \_\_\_\_\_ u/na

\_\_\_\_\_, pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Astrid Krmpotić, dr. med.
2. Prof. dr. sc. Jelena Tomac, dr. med.
3. Doc. dr. sc. Vanda Juranić Lisnić, dipl. ing. biotechn.

Rad sadrži: 44 stranice, 10 slika, 1 tablicu i 40 literaturnih navoda.

## **ZAHVALE**

Zahvaljujem se svojem mentoru doc. dr. sc. Iliji Briziću na načinu i savjetima kojima me uveo u znanstveno-istraživački rad te na svesrdnoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Stipanu Jonjiću na jedinstvenoj prilici koju mi je pružio omogućivši mi rad na Zavodu za histologiju i embriologiju i Centru za proteomiku te na odobrenju za pisanje diplomskog rada.

Na kraju se zahvaljujem noni i tati na bezuvjetnoj podršci i motivaciji tijekom cijelog studija.

# SADRŽAJ RADA

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Citomegalovirusi</b> .....	1
<b>1.2. Tropizam citomegalovirusa</b> .....	2
<b>1.3. Kongenitalna infekcija citomegalovirusom</b> .....	5
1.3.1. Imunološki odgovor na kongenitalnu infekciju CMV-om.....	7
1.3.2. Mišji modeli kongenitalne infekcije citomegalovirusom.....	11
<i>1.3.2.1. Razvojne promjene mozga na mišjim modelima kongenitalne infekcije</i> <i>citomegalovirusom</i> .....	12
<b>1.4. Cre-loxP sustav za praćenje širenja MCMV-a <i>in vivo</i></b> .....	14
<i>1.4.1. Transgenični miševi BAF53b-Cre (Act16b-Cre)</i> .....	17
<b>2. SVRHA RADA</b> .....	18
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	19
<b>3.1. Virus</b> .....	19
<b>3.2. Izolacija DNA iz repova</b> .....	19
<b>3.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)</b> .....	21
<b>3.4. Gel elektroforeza za DNA</b> .....	22
<b>3.5. Određivanje titra MCMV-a primjenom testa virusnih čistina</b> .....	25
<b>4. REZULTATI</b> .....	29
<b>4.1. Genotipizacija miševa</b> .....	29

<b>4.2. Produkcija infektivnog MCMV-a u neuronima</b> .....	31
4.2.1. <i>In vivo</i> konverzija reporterskog virusa u mozgu .....	31
4.2.2. <i>In vivo</i> konverzija reporterskog virusa u žlijezdama slinovnicama.....	32
<b>5. RASPRAVA</b> .....	34
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	36
<b>7. SAŽETAK</b> .....	37
<b>8. SUMMARY</b> .....	38
<b>9. LITERATURA</b> .....	39
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	44

## POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA

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

CMV – *engl.* cytomegalovirus (citomegalovirus)

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

DMEM medij - *engl.* Dulbecco's modified Eagle's medium

EGFP - *engl.* enhanced green fluorescent protein (pojačani zeleni fluorescentni protein)

gC-I, gC-II, gC-III - *engl.* glycoprotein complexes I, II, III (glikoproteinski kompleksi I, II, III)

HCMV - *engl.* human cytomegalovirus (ljudski citomegalovirus)

IFN- $\gamma$  - *engl.* interferon gamma (interferon gama)

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

MCMV - *engl.* murine cytomegalovirus (mišji citomegalovirus)

NK stanice - *engl.* natural-killer cells (prirodno-ubilačke stanice)

Nrp2 - *engl.* neuropilin-2 (neuropilin-2)

NSPC - *engl.* neural stem/progenitor cells (neuronske matične stanice)

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

PDGFR $\alpha$  - *engl.* platelet-derived growth factor receptor alpha (receptor za faktor rasta alfa podrijetlom iz trombocita)

PFU - *engl.* plaque forming unit (jedinica koja tvori plak)

pMEF - *engl.* primary murine embryonic fibroblasts (primarni mišji embrionalni fibroblasti)

T<sub>RM</sub> stanice - *engl.* T resident memory cells (tkivno rezidentni memorijski limfociti T)



# 1. UVOD

## 1.1. Citomegalovirusi

Citomegalovirusi (CMV-i) su prototipni predstavnici  $\beta$  herpesvirusa. Njihovi veliki DNA genomi (oko 230 kilobaza) sadrže više od 200 otvorenih okvira čitanja (*engl.* open reading frames - ORFs) koji uz veoma kompleksne uzorke genske ekspresije čine citomegaloviruse jedne od virusa s najvećom mogućnošću kodiranja kod sisavaca (1). Za citomegaloviruse karakterističan je visok stupanj specifičnosti za vrstu, stoga ljude inficira humani ili ljudski citomegalovirus (*engl.* human cytomegalovirus - HCMV). Kod najvećeg broja dosad istraženih sisavaca pronađeni su virusi čija je građa i patobiologija vrlo slična onoj humanog citomegalovirusa. *In vivo*, citomegalovirusi inficiraju širok raspon stanica, uključujući fibroblaste, glatke mišićne stanice, endotelne stanice, epitelne stanice, stromalne stanice, živčane stanice i mijeloidne stanice (2).

Nakon primarne infekcije virusima iz porodice herpesvirusa ne dolazi do njihove eliminacije iz organizma. Umjesto toga, ti virusi perzistiraju u domaćinu u stanju latencije u kojem je moguće detektirati čitav genom, ali ne i infektivne čestice. Promjene u staničnom signaliziranju uzrokovane stresom ili diferencijacijom mogu dovesti do reaktivacije replikacije virusa iz stanja latencije (2,3). Primarne infekcije citomegalovirusima vrlo su česte u općoj populaciji, a njihova prevalencija ovisi o zemljopisnoj lokaciji i društveno-ekonomskim prilikama. Protutijela IgG razreda karakteristična za preboljelu infekciju pronađena su u otprilike 60% odrasle populacije u razvijenim zemljama i u oko 100% odrasle populacije u zemljama u razvoju (4). Primarna infekcija citomegalovirusom najčešće je asimptomatska, iako se kod nekih imunokompetentnih inficiranih pacijenata mogu uočiti blaži simptomi nalik onima kod infektivne mononukleoze poput vrućice, umora, mialgije i glavobolje (5). Međutim, primarna infekcija citomegalovirusima predstavlja opasnost kod pacijenata s narušenom

funkcijom imunološkog sustava, primjerice kod pacijenata na imunosupresivnoj terapiji nakon trasplantacije organa, kod pacijenata na intenzivnoj njezi i kod pacijenata sa sindromom stečene imunodeficijencije (*engl.* acquired immunodeficiency syndrome - AIDS). Citomegalovirusne infekcije stečene *in utero* posebno ugrožavaju plod zbog nezrelosti imunološkog sustava i mogu dovesti do ozbiljnih neurorazvojnih posljedica u budućnosti (4). Budući da imunosni sustav domaćina ima ključnu ulogu u određivanju tijeka i ishoda infekcije citomegalovirusima, mnogobrojna istraživanja bave se proučavanjem interakcija virus-domaćin i složenih aspekata imunološke kontrole infekcije. Zbog stroge specifičnosti CMV-a za vrstu i nemogućnosti infekcije životinja ljudskim citomegalovirusom, citomegalovirusi glodavaca (npr. miša, štakora i zamoraca) korišteni su kao modeli za razumijevanje bolesti uzrokovanih ljudskim citomegalovirusima (2).

## **1.2. Tropizam citomegalovirusa**

Smatra se da se HCMV u domaćinu diseminira primarno direktnim širenjem iz stanice u stanicu, za razliku od otpuštanja izvanstaničnih viriona koji bi bili podložni odgovoru protutijela (6). HCMV pokazuje tropizam za mnogo vrsta stanica, što znači da može izazvati bolest u mnogobrojnim tkivima i organima. Regulacija staničnog tropizma još nije dovoljno razjašnjena. Otkriveno je da tri glavna disulfidno povezana glikoproteinska kompleksa, izvorno označena gC-I, gC-II i gC-III, imaju ključnu ulogu u ulasku HCMV u stanice. Danas je poznata virusnim genima kodirana konstitucija svakog kompleksa. Neki kompleksi zajednički su među porodicom Herpesviridae (npr. gH/gL = glikoprotein H/glikoprotein L kompleks), dok su neki kompleksi jedinstveni za HCMV (6).

gC-I kompleks sastoji se od homotrimeru glikoproteina B (gB), koji je glikoprotein zajednički porodici *Herpesviridae* i ima ulogu proksimalnog medijatora fuzije membrane

tijekom ulaska virusa (6). HCMV gB kojega kodira gen *UL55* sintetiziran je kao prekursor veličine 160 kDa. Nakon prerade u Golgijevu tijelu iz tog prekursora nastanu dva fragmenta veličine 116 kDa i 55 kDa međusobno povezana disulfidnom vezom (7). Pronađeni su površinski proteini koji služe kao receptori za glikoprotein B, uključujući receptor za epidermalni faktor rasta (*engl.* epidermal growth factor receptor – EGFR), receptor za faktor rasta alfa podrijetlom iz trombocita (*engl.* platelet-derived growth factor receptor alpha - PDGFR $\alpha$ ) i integrini. Međutim, pretpostavlja se da neke funkcije gB-a kao virusnog fuzogena ne zahtijevaju vezivanje za stanične receptore (6).

gC-II kompleks sastoji se od heterodimera disulfidno povezanih glikoproteina M (gM) i glikoproteina N (gN), koje kodiraju geni *UL100* i *UL73* (8). gM/gN je najbrojniji glikoproteinski kompleks na virionima. Uz važnu ulogu prijanjanja na stanice domaćina putem interakcije s proteoglikanima heparan sulfata ima i neovisnu unutarstaničnu ulogu tijekom virusne replikacije. gM je N-glikozilirani tip III transmembranskog glikoproteina veličine 48 kDa koji sadrži sedam spirala. gN jednostruki je tip I transmembranskog glikoproteina veličine 65 kDa nakon opsežne O-glikozilacije. Kodirajuća sekvenca za gN značajno varira među sojevima HCMV-a, čineći kompleks gM/gN važnom metom za humoralni imunski odgovor (6,8).

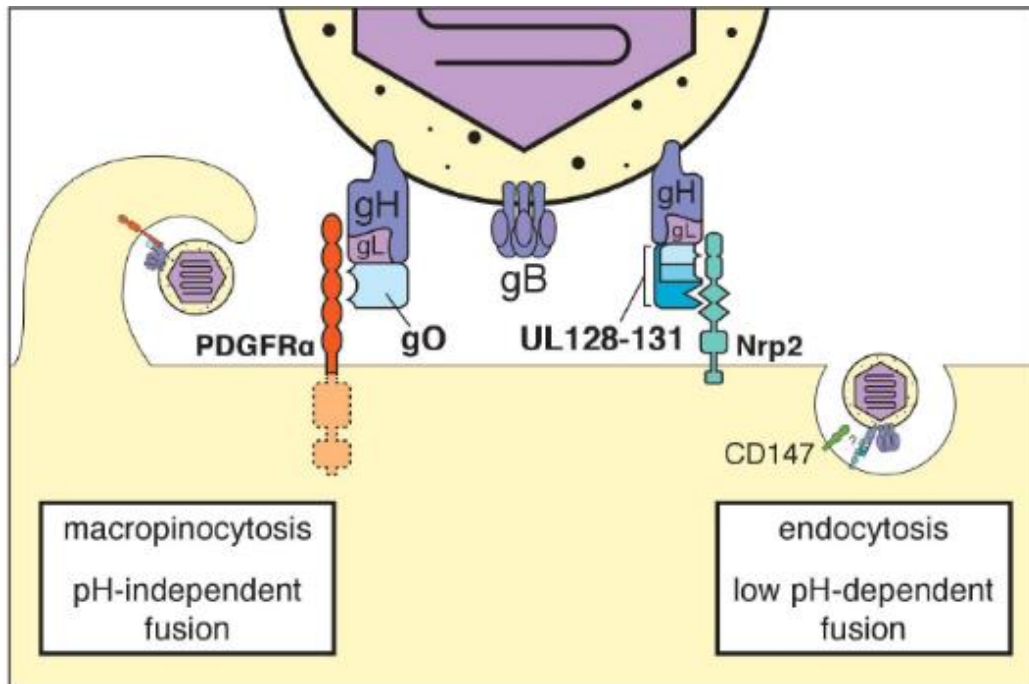
gC-III kompleks, poznat i kao trimer ili gH/gL/gO, heterotrimerni je kompleks u kojem je heterodimer gH (kodiran genom *UL75*) i gL (kodiran genom *UL115*) disulfidnom vezom povezan s glikoproteinom O (gO), N-glikoziliranim proteinom koji kodira gen *UL74* (9). Svi herpesvirusi kodiraju kompleks gH/gL jer gH/gL i gB zajedno čine središte mehanizma herpesvirusa za membransku fuziju. Međutim, homolozi glikoproteina O pronadjeni su samo među betaherpesvirusima. Smatra se da je glikoprotein O u kontekstu trimera potreban za infektivnost viriona izvan stanice (6). Receptor alfa za faktor rasta podrijetlom iz trombocita (PDGFR $\alpha$ ) identificiran je kao stanični receptor za trimer gH/gL/gO potreban za infekciju

fibroblasta (10). Međutim, ostaje nejasno koji je receptor za gO potreban epitelnim ili endotelnim stanicama koje inače ne izražavaju PDGFR $\alpha$  ili ga izražavaju u niskim količinama koje nisu dovoljne za vezanje trimera za površinu stanice.

Pentamerski kompleks sastoji se od heterodimera glikoprotein H/glikoprotein L (gH/gL) koji je povezan s tri mala glikoproteina koje kodiraju geni *UL128*, *UL130* i *UL131* (poznat i kao *UL131A*) (9). Neuropilin-2 (Nrp2) identificiran je kao funkcionalni stanični receptor za pentamer te je dokazana njegova važna uloga u infekciji endotelnih i epitelnih stanica (11). Od dodatnih receptora, pokazalo se da je CD147 potreban za ulazak virusa u epitelne stanice ovisan o pentameru bez direktne interakcije s pentamerom (6). Molekula THY-1 (CD90) također služi kao HCMV receptor jer ulazi u interakciju s glikoproteinom H i glikoproteinom B. CD90 angažira  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrine i privlači signalnu adaptorsku molekulu paksilin tijekom signaliziranja. Otkriveno je da  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrini imaju ulogu koreceptora ovisnih o glikoproteinu H, dok je paksilin važan tijekom ulaska virusa u monocite.

Za mnogo staničnih površinskih proteina i molekula tijekom godina otkriveno je da služe kao receptori ulaska HCMV-a ili na drugi način pridonose njegovom ulasku u stanicu domaćina (6). Neki od tih molekula vjerojatno služe kao primarni receptori ulaska virusa koji ulaze u fizičku interakciju s virusnim glikoproteinskim kompleksima na specifičan način ovisno o tipu inficirane stanice. Receptori i koreceptori za ulazak virusa često funkcioniraju u vremenski i prostorno odvojenim koracima. Uz dokazane uloge staničnih površinskih receptora PDGFR $\alpha$  i Nrp-2, koreceptori su nužni u daljnjem procesu ulaska virusa unutar stanice. Mehanizam ulaska citomegalovirusa u stanicu ponajprije ovisi o tipu stanice koja se inficira. Ulazak virusa u fibroblaste ovisan o trimernu brz je, ne zahtijeva klatrin, neovisan je o pH, uključuje fuziju plazmatske membrane i brzu makropinocitozu (6,10). S druge strane, ulazak virusa u epitelne i endotelne stanice ovisan o pentamerima je sporiji, zahtijeva nizak pH i uključuje produženi oblik endocitoze. Specifični površinski receptori potrebni za ulazak HCMV-a u različite stanice

ukazuju da postoje barem dva glavna mehanizma: ulazak ovisan o trimerima i ulazak ovisan o pentamerima (**slika 1**). U svakom od tih modela vjerojatno postoji jedinstveni set proteina domaćina koji imaju stanično specifične uloge kao receptori, koreceptori i dodatni faktori koji pojačavaju infekciju.



**Slika 1: Prikaz kompleksa koji posreduju ulazak HCMV-a u stanicu.** Trimerni gH/gL/gO kompleks ulazi u interakciju s PDGFR $\alpha$  na pH-neovisan način koji uključuje makropinocitozu. Pentamerski kompleks gH/gL/UL128-UL130-UL131 ulazi u interakciju s Nrp2 na način koji zahtijeva niski pH i uključuje endocitozu. Molekula CD147 ima ulogu koreceptora kod ulaska u stanicu posredovanom pentamerskim kompleksom. Slika preuzeta iz (6).

### 1.3. Kongenitalna infekcija citomegalovirusom

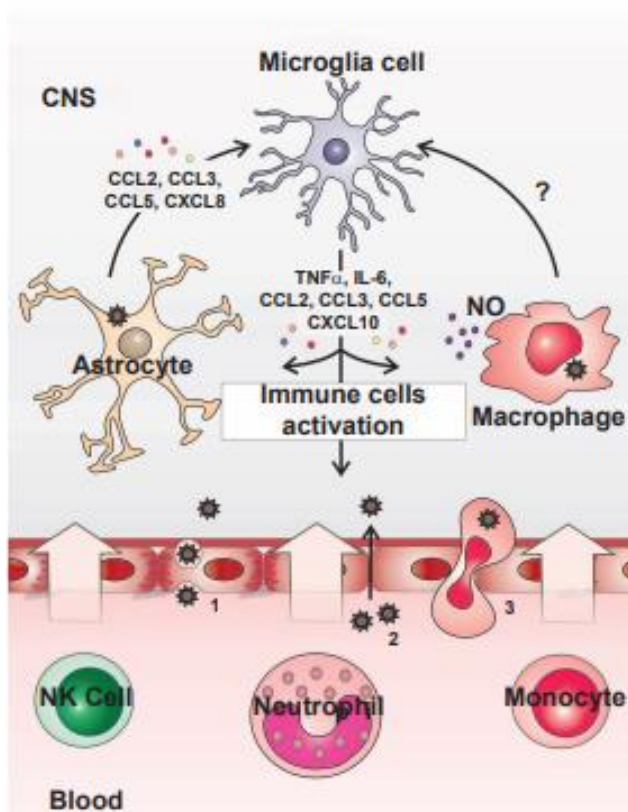
Ljudski citomegalovirus najčešći je uzrok kongenitalnih virusnih infekcija s prosječnom prevalencijom od 0,64% trudnoća i rasponom prevalencije od 0,4% do 1,2% trudnoća u razvijenom svijetu. Tijekom primarne infekcije majke u trudnoći HCMV prelazi placentarnu barijeru u 32% slučajeva i inficira fetus, dok se u manjem broju slučajeva intrauterina infekcija

zbiva tijekom sekundarne infekcije majke (12). U novorođenačkom razdoblju infekcija može proći inaparentno, tj. bez kliničkih znakova bolesti, ili može biti klinički vidljiva sa zastojem u rastu, žuticom, hepatosplenomegalijom, mikrocefalijom, oštećenjem sluha i trombocitopenijom kao najčešćim simptomima. U klinički manifestne novorođenčadi infekcija može biti životno ugrožavajuća, ali i ostaviti dugoročne posljedice od kojih su najopasnije one koje zahvaćaju središnji živčani sustav zbog svoje ireverzibilnosti. Među česte morbiditete CNS-a (*engl.* central nervous system - središnji živčani sustav) spadaju mikrocefalija, cerebralna paraliza, mentalna zaostalost, konvulzije, gubitak sluha, očne abnormalnosti i kognitivno oštećenje. Kongenitalna CMV infekcija uzrokuje otprilike 14%-25% kongenitalnog gubitka sluha, što je čini vodećim infektivnim uzrokom deficita sluha u djece (13,14). Oštećenje sluha uzrokovano CMV-om može biti prisutno pri rođenju ili progredirati tijekom ranog djetinjstva u prvotno asimptomatske novorođenčadi. Varijabilnost u težini kliničke slike kreće se od jednostranog gubitka sluha na visokim frekvencijama do obostranog gubitka sluha na svim frekvencijama, zbog čega je teško predvidjeti kod koje će djece doći do daljnje progresije (15). Patogenetski mehanizam nastanka gubitka sluha još nije objašnjen. Budući da su u vestibularnom labirintu preminulih fetusa pronađeni znakovi CMV infekcije senzornih stanica utrikulusa i criste ampularis, pretpostavlja se da bi CMV-om inducirani labirintitis mogao biti jedan od uzroka (14). Virus je detektiran i unutar striae vascularis i Reissnerove membrane zajedno s CD8+ limfocitima T kao dominantnim stanicama upalnog odgovora. Drugi mogući uzrok gubitka sluha je oštećenje endokohlearnog potencijala zbog poremećaja ionske cirkulacije kroz striu vascularis uslijed upalnog procesa, koje bi posljedično dovelo do inaktivacije ili degeneracije stanica s dlačicama u Cortijevu organu (16).

### 1.3.1. Imunološki odgovor na kongenitalnu infekciju CMV-om

Na mišjem modelu identificirani su mogući mehanizmi ulaska MCMV-a u CNS koji uključuju infekciju moždanih mikrovaskularnih endotelnih stanica s bazolateralnim širenjem virusa, gubitak integriteta krvno-moždane barijere s disrupcijom *tight junction* spojeva i model „Trojanskog konja“, tj. intracelularnog transporta s inficiranim monocitima (14). Virus u CNS-u inficira različite ciljane stanice, a najvećim dijelom astrocite. Citomegalovirusna infekcija potiče upalni odgovor karakteriziran regrutacijom i perifernih imunih stanica, aktivacijom glija stanica i ekspresijom velikog broja proupalnih citokina i gena reguliranih interferonom (**slika 2**) (14). Astrociti kao najbrojnije inficirane stanice u CNS-u aktiviraju rezidentne stanice mikroglije koje prve odgovaraju na infekciju. Potom dolazi do ulaska stanica prirodne imunosti u CNS - monocita, neutrofila i prirodno-ubilačkih stanica ili NK stanica (*engl.* natural killer cells - NK cells). Pristigli monociti s periferije prekursori su makrofaga, a moguće i mikroglia stanica. Dušični oksid (NO) kojega otpuštaju makrofagi mogao bi pridonijeti eliminaciji MCMV-a iz mozga (14,17). Neutrofilu su važne stanice u borbi protiv izvanstaničnih patogena poput bakterija i protiv unutarstaničnih patogena poput CMV-a. Unatoč važnoj ulozi NK stanica u obrani od infekcije MCMV-om u perifernim organima miša, još nije adekvatno istražena njihova uloga u kontroli infekcije CNS-a (17). U modelu intraperitonealne infekcije MCMV-om početni neuroimuni odgovor dominiran je ulaskom NK stanica koji se podudara s detekcijom virusa u CNS-u. Postupno razine NK stanica opadaju tako da 8. dana nakon infekcije iznose oko 20% ukupnih leukocita u mozgu, a nakon što ih počnu zamjenjivati druge stanice imunskog odgovora razina im se smanji na oko 1% 10. dana nakon infekcije (14).

## Innate immune response



**Slika 2: Prirodni imuni odgovor u CNS-u tijekom perinatalne infekcije MCMV-om.** Mogući mehanizmi ulaska MCMV-a u CNS su: infekcija moždanih mikrovaskularnih endotelnih stanica s bazolateralnim širenjem virusa (1), gubitak integriteta krvno-moždane barijere s disrupcijom *tight junction* spojeva (2) intracelularni transport s inficiranim monocitima (3). Najveća inficirana populacija stanica u CNS-u su astrociti čija produkcija kemokina i proinflamatornih citokina uzrokuje aktivaciju mikroglia stanica i makrofaga, te regrutaciju upalnih stanica s periferije - NK stanica, neutrofila i monocita. Slika preuzeta iz (14).

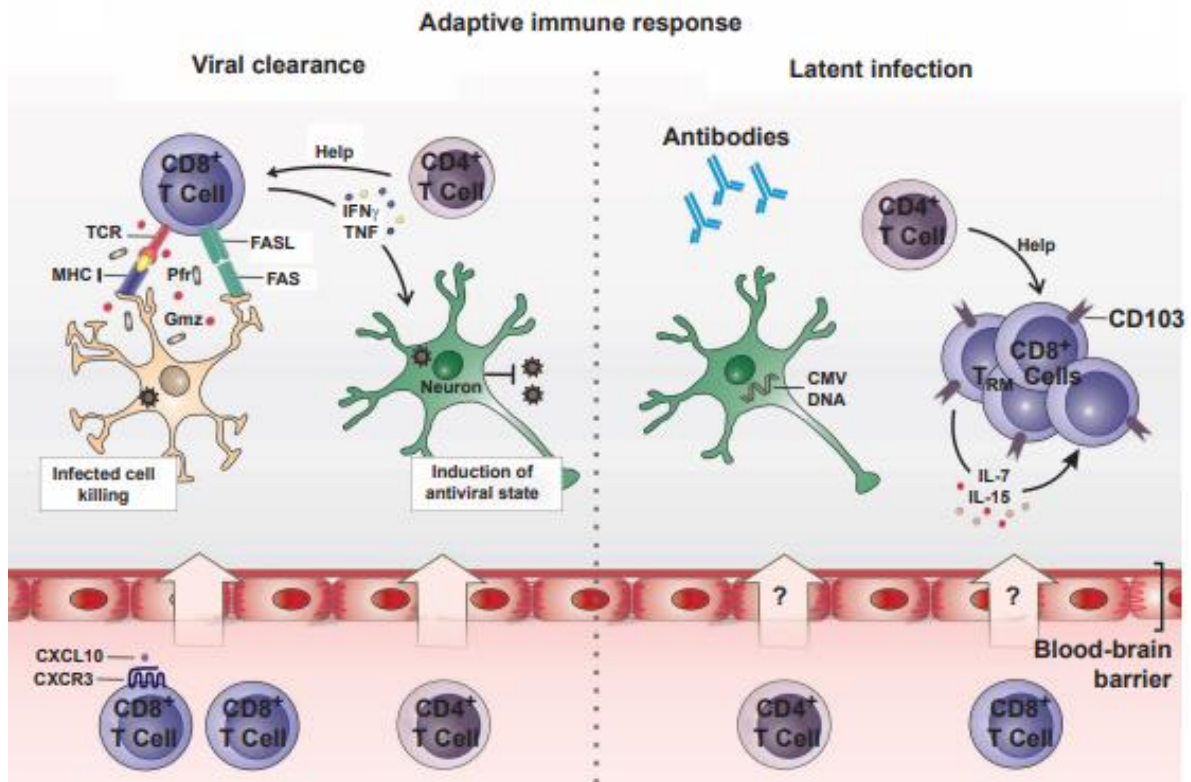
Iako prirodni imuni odgovor predstavlja prvu liniju obrane protiv infekcije MCMV-om, stečeni imuni odgovor potreban je za uklanjanje virusa iz mozga novooslobođenog miša (**slika 3**). Unutar prvih nekoliko dana infekcije u CNS-u započinje infiltracija CD8<sup>+</sup> limfocita T i CD4<sup>+</sup> limfocita T, koji su aktivirani u sekundarnim limfnim organima. Kemoatraktant CXCL10 je ključni citokin za obranu CNS-a od infekcije CMV-om, koji putem svog receptora CXCR3



potiče dolazak CD8+ limfocita T (18). Upravo CD8+ limfociti T imaju ključnu ulogu u rješavanju akutne MCMV infekcije u CNS-u, koja bi inače bila letalna za novookočene miševe. Najviše razine CD8+ limfocita T iznosile su oko 70% ukupnih leukocita u mozgu i zabilježene su 18. dana nakon okota. Povećanje broja CD8+ limfocita T koji čine u CNS-u korelira s brzim padom virusnog titra (18,19). Limfociti T koriste specifične antiviralne efektorske mehanizme protiv ciljanih stanica u obrani protiv infekcije. Još nije sa sigurnošću utvrđeno koji mehanizmi dominiraju u uklanjanju virusne infekcije u CNS-u (14,20). Aktivirani CD8+ limfociti T luče interferon gama (IFN- $\gamma$ ) koji učinkovito inhibira virusnu replikaciju, ali ne eliminira nužno virusnu DNA iz stanice. Među CD8+ limfocitima T koji su izolirani iz mozga miševa inficiranih MCMV-om pronađena je velika frakcija limfocita koji produciraju TNF- $\alpha$  (*engl.* tumour necrosis factor alpha – tumorski čimbenik nekroze alfa) i interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) koji su deficitarni u degranulaciji i potencijalno manjkavog kapaciteta za posredovanje citolize. S obzirom na široki raspon stanica u CNS-u koje inficira CMV, moguće je da uklanjanje virusa posredovano CD8+ limfocitima T ovisi o antiviralnim efektorskim funkcijama i tipu stanica (18). Tako bi citolitički mehanizmi poput perforina i interakcija transmembranskog proteina FAS (CD95) i njegovog liganda FASL (CD95L) mogli biti važni za uklanjanje virusa iz ne-neuronalnih stanica, dok bi ne-citolitičko uklanjanje bez konkomitantnog gubitka stanica moglo biti predominantno u neuronima (14,19).

Nakon rezolucije aktivne infekcije infiltracija limfocita opada, ali virus specifični CD8+ limfociti T dugo perzistiraju u mozgu, služe održavanju latentne infekcije te se mogu detektirati duže od godine dana u mozgu miševa (14,18). Dio ovih stanica su tkivno rezidentni memorijski limfociti T (*engl.* T resident memory cells – T<sub>RM</sub> stanice), koje karakterizira visoka ekspresija integrina CD103 i dugotrajna opstojnost. Za održavanje T<sub>RM</sub> stanica u mozgu važan je lokalni okoliš, uključujući interleukine IL-7 i IL-15, kao i pomoć CD4+ limfocita T, dok im direktna cirkulacijska opskrba vjerojatno nije nužna (21). Magnituda odgovora CD4+ limfocita T u

CNS-u ostaje relativno konstantna tijekom infekcije, a odnos broja CD8<sup>+</sup> limfocita T i CD4<sup>+</sup> limfocita T iznosi otprilike 3:1. CD4<sup>+</sup> limfociti T pokazali su se ključnim u uklanjanju infekcije MCMV-om iz mozga neonatalnog miša i u prevenciji rekurentnog latentnog MCMV-a (22). Dodatna uloga CD4<sup>+</sup> limfocita T je indukcija i održavanje T<sub>RM</sub> stanica u mozgu miševa perinatalno inficiranih MCMV-om. Iako antivirusna protutijela koja produciraju limfociti B ne pridonose značajno rezoluciji aktivne infekcije CMV-om, smatra se da imaju ključnu ulogu u ograničavanju diseminacije virusa kod rekurentne infekcije (23). Pretpostavka da bi prisutnost majčinih antiviralnih protutijela pridonijela smanjenoj incidenciji transmisije HCMV-a u trudnoći opovrgnuta je u randomiziranom kontroliranom pokusu kada primjena CMV-specifičnog hiperimunog globulina trudnicama sa simptomatskim kongenitalnim HCMV infekcijama nije značajno modificirala tijek infekcije (24). U kohortnoj studiji multipara iz populacije s visokom stopom kongenitalne infekcije CMV-om pokazalo se da prirodno stečeni imunitet majke rezultira u smanjenju rizika od kongenitalne infekcije CMV-om za 69% u sljedećim trudnoćama. Zbog moguće reinfekcije novim HCMV serotipom ili reaktivacije endogenog virusa ni majčin prekonceptijski imunitet ne pruža apsolutnu zaštitu od kongenitalne HCMV infekcije (25).



**Slika 3: Stečeni imuni odgovor u CNS- u tijekom perinatalne infekcije MCMV-om. (lijevo)** Unutar prvih nekoliko dana od infekcije CMV-om, započinje infiltracija CD8+ limfocita T i CD4+ limfocita T u CNS. Kemoatraktant CXCL10 putem svog receptora CXCR3 potiče ulazak CD8+ limfocita T u CNS koji su ključni za eliminaciju replikacije virusa putem citolitičkih mehanizama (perforin, FAS-FASL) u ne-neuronskim stanicama i necitolitičkih mehanizmama u neuronima. CD4+ limfociti T poboljšavaju preživljavanje i funkciju CD8+ limfocita T. **(desno)** Virus specifični CD8+ limfociti T perzistiraju u CNS-u nakon rezolucije produktivne infekcije i najvažniji su u održavanju latencije virusa. Dio tih limfocita čine tkivno rezidentne memorijske stanice (T<sub>RM</sub> stanice) karakterizirane ekspresijom integrina CD103 i održavanjem u lokalnom okolišu pod utjecajem CD4+ limfocita T, IL-7 i IL-15. Antivirusna protutijela ograničavaju diseminaciju virusa kod rekurentne infekcije. Slika preuzeta iz (14).

### 1.3.2. Mišji modeli kongenitalne infekcije citomegalovirusom

Mišji citomegalovirus (*engl.* murine cytomegalovirus - MCMV) najbolje je istražen model koji je doveo do otkrića mnogih gena za izbjegavanje imunskog odgovora i objašnjenja

patogeneze infekcije CMV-om (2). Budući da MCMV nema mogućnost prolaska preko placente, u istraživanjima se virus direktno injicira u placentu ili u embrio, dok alternativne rute za utvrđivanje infekcije u mozgu miša uključuju direktnu intrakranijalnu inokulaciju virusa i intraperitonealnu (i.p.) inokulaciju virusa (14). Nakon i.p. infekcije MCMV-a novookoćenom mišu, virus diseminira u CNS hematogenim putem i replicira se u moždanom parenhimu. Točan mehanizam kojim virus prelazi krvno-moždanu barijeru još uvijek je nepoznat (26). Nakon i.p. inokulacije, MCMV se može detektirati u plazmi i u krvnim stanicama novookoćenih miševa, što bi značilo da MCMV može ući u CNS kao slobodan virus ili kao virus vezan uz stanicu (27). Središnji živčani sustav novookoćenog miša embriološki je istovjetan ljudskom fetusu u dobi od 15 tjedana gestacije, što je ujedno i doba kada najčešće dolazi do HCMV infekcije *in utero*. Novookoćeni miševi inficirani MCMV-om pokazuju neurorazvojne posljedice poput senzori-neurološkog gubitka sluha i poremećaja ravnoteže (14).

#### *1.3.2.1. Razvojne promjene mozga na mišjim modelima kongenitalne infekcije citomegalovirusom*

Na mišjim modelima utvrđene su promjene razvoja mozga novookoćenih miševa uzrokovane infekcijom MCMV-om koje su slične nalazima na mozgovima novorođenčadi zaraženih HCMV-om *in utero* (26). Morfološki defekti najviše su izraženi u malom mozgu koji se opsežno razvija u postnatalnom razdoblju, dok veliki mozak zaraženih novookoćenih miševa nalikuje onome nezaraženih miševa. Pronađene su disrupcije laminacije cerebelarnog korteksa u područjima malog mozga uz infektivna žarišta, ali i značajne globalne abnormalnosti kortikalnog razvoja malog mozga u područjima koja su bila prostorno udaljena od infektivnih žarišta i infiltracije upalnih stanica. Zrnatih neurona vanjskog zrnatog sloja zbog niskog proliferacijskog indeksa pokazuju odgođenu migraciju u dublje dijelove cerebelarnog korteksa,

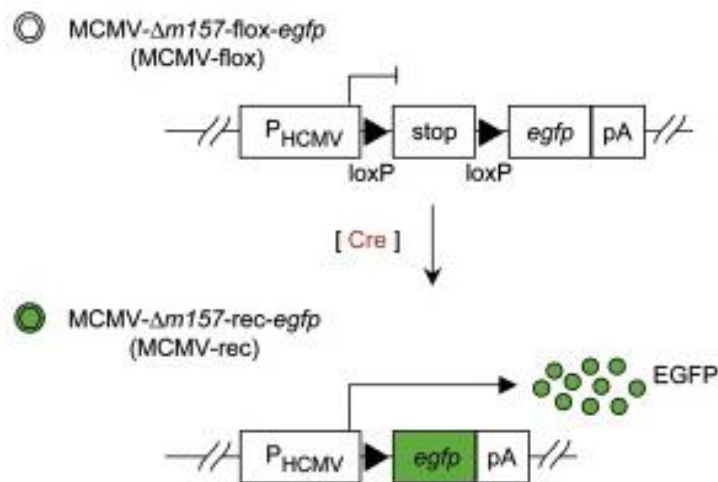
što rezultira redukcijom brazdanja površine malog mozga, smanjenjem debljine cerebelarnog korteksa i povećanjem debljine vanjskog zrnatog sloja (26,28). Debljina cerebelarnog molekularnog sloja smanjena je zbog slabijeg grananja dendrita Purkinjeovih neurona, što dovodi do neprimjerenog poravnjanja Purkinjeovih neurona unutar stratuma gangliosuma (26).

Iako točan uzrok ovim promjenama u mozgu novoookoćenih miševa inficiranih MCMV-om nije dokazan, u pretpostavljene mehanizme osim direktne virusne replikacije spadaju i indirektni, virusom inducirani mehanizmi. Među indirektnim mehanizmima izdvaja se infekcija radijalnih glija stanica koje imaju važnu ulogu u navođenju migracije neurona u mozgu, zatim insuficijentna krvna opskrba zbog infekcije endotelnih stanica i upale žilnog zida te infekcija neuronskih matičnih stanica (*engl.* neural stem/progenitor cell - NSPC) (14). Neuronske matične stanice predominantno smještene u ventrikularnoj/periventrikularnoj zoni imaju sposobnost migracije, proliferacije i diferencijacije u neurone, astrocite i oligodendrocite (14,29). Veoma su podložne infekciji CMV-om koja mijenja njihov diferencijacijski program, koči proliferaciju, inducira njihovu apoptozu te smanjuje razine mRNA (*engl.* messenger ribonucleic acid – glasnička ribonukleinska kiselina) gena ključnih za održanje multipotencije NSPC-a. *In utero* defekti CNS-a fetusa mogli bi se objasniti preuranjenim i abnormalnim diferencijacijama neuronskih matičnih stanica prozročnim infekcijom HCMV-om (29,30). Golemi opseg utjecaja infekcije MCMV-om na mišjem modelu dokazuje i istraživanje u kojem je primjenom RNA-Seq (RNA *next generation* sekvenciranje) u kombinaciji s analizom diferencijacije genskog biološkog puta i genske ontologije ekspresije utvrđeno čak 10 748 značajno promijenjenih gena u fibroblastima (31). Još jedan mogući mehanizam oštećenja mozga upalni je odgovor domaćina u CNS-u na infekciju CMV-om koji uzrokuje odgodu razvoja malog mozga (14). U mozgu novoookoćenih miševa inficiranih MCMV-om utvrđena je povećana ekspresija pro-inflamatornih gena poput interferonskih (IFN) gena i gena kemokinskih receptora. Tretman kortikosteroidima koji moduliraju upalni odgovor ispravio je

morfološke defekte malog mozga u miševa inficiranih MCMV-om, što govori u prilog značajnom utjecaju upalnog odgovora kao jednog od mehanizama oštećenja CNS-a (26,28).

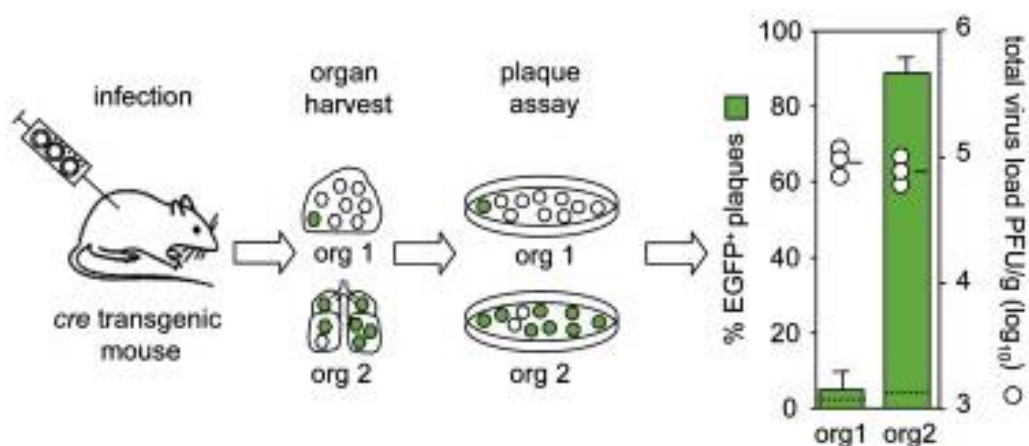
#### **1.4. Cre-loxP sustav za praćenje širenja MCMV-a *in vivo***

Za praćenje širenja virusa u ovom radu na mišjem modelu koristili smo strategiju označavanja virusa Cre-loxP sustavom. Cre rekombinaza katalizira rekombinaciju dva uzastopno ponovljena loxP mjesta što rezultira izbacivanjem stop kazete između njih, omogućujući tako vremensku i prostornu kontrolu ekspresije gena *in vivo* (32). U ovom radu korišten je reporterski MCMV-flox (33). Floksirani virus MCMV- $\Delta$ m157-flox-egfp (MCMV-flox) konstruiran je umetanjem Cre-inducibilne ekspresijske kazete u gen *m157* MCMV genoma (**slika 4**). Između glavnog neposrednog ranog promotera HCMV-a i kodirajuće sekvence Cre-inducibilnog fluorescentnog reportera EGFP-a (*engl.* enhanced green fluorescent protein - pojačani zeleni fluorescentni protein) nalazi se transkripcijska stop sekvenca obilježena (floksirana) loxP mjestima s obje strane. U stanicama koje ekspimiraju Cre rekombinazu transkripcijska stop sekvenca se uklanja što omogućuje ekspresiju EGFP-a i nastanak rekombiniranog virusa MCMV- $\Delta$ m157-rec-egfp (MCMV-rec).



**Slika 4: Virus MCMV-flox (floksirani) i MCMV-rec (rekombinirani).** MCMV-Δm157-flox-egfp (MCMV-flox) je konstruiran umetanjem Cre-inducibilne ekspresijske kazete u gen *m157* MCMV genoma. Po infekciji stanice koja izražava/eksprimira Cre rekombinazu, Cre rekombinaza izreže transkripcijsku stop sekvencu između dva loxP mjesta, što dovodi do ekspresije pojačanog zelenog fluorescentnog proteina (enhanced green fluorescent protein – EGFP). Ekspresija EGFP-a je pod kontrolom promotora HCMV glavnog neposrednog ranog gena nakon uklanjanja stop sekvence. Slika je preuzeta iz (33).

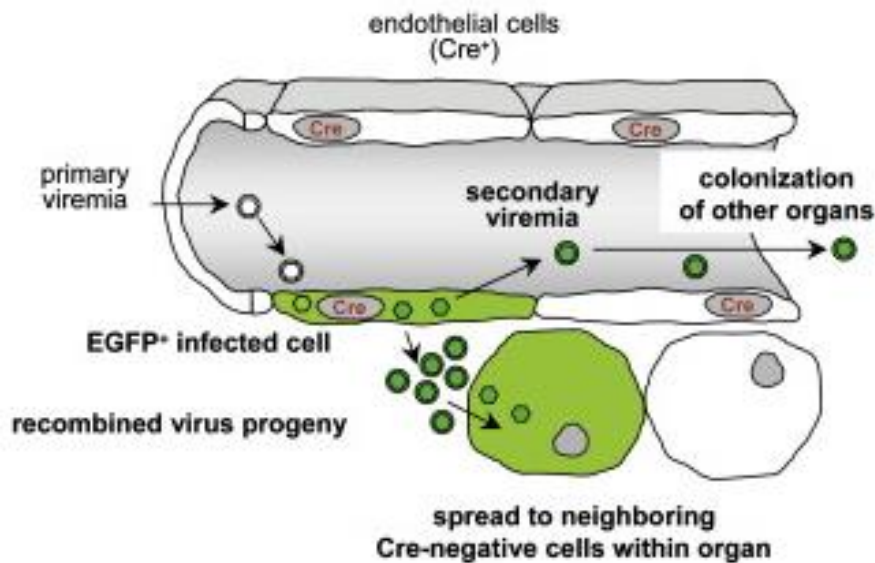
Virusom MCMV-flox inficiraju se transgenični miševi koji ekspimiraju Cre rekombinazu pod kontrolom promotora specifičnog za određenu vrstu stanica. Nakon žrtvovanja miševa u različitim razdobljima nakon infekcije, uzimanja i obrade raznih organa, testom virusnih čistina odredi se broj jedinica koje tvore plakove (*engl.* plaque forming units - PFU). Nakon prvog ciklusa virusne replikacije broj EGFP pozitivnih (EGFP+) plakova predstavlja apsolutnu produktivnost Cre-ekspimirajućeg staničnog tipa, a usporedba s brojem EGFP negativnih (EGFP-) plakova označava relativni doprinos ukupne virusne produkcije određenog organa (**slika 5**) (33).



**Slika 5: Eksperimentalni pristup i analiza.** Transgenični miševi inficirani s virusom MCMV-flox u različitim razdobljima nakon infekcije žrtvuju se, a u homogenatima prikupljenih organa testom virusnih čistina odredi se broj jedinica koje tvore plakove (PFU). Grafički prikaz objedinjuje ukupnu količinu virusa (MCMV-rec + MCMV-flox) po gramu organa za svakog pojedinog miša označenu u obliku otvorenih kružića koji se odnose na logaritamsku vrijednost PFU/gramu organa s desne strane grafa, horizontalne linije kao srednje vrijednosti, a iscrtkane linije kao granice detekcije ukupne količine virusa, te zelene stupce koji prikazuju srednji postotak EGFP+ plakova i odnose se na linearnu skalu s lijeve strane. Slika je preuzeta iz (33).

Analizom EGFP pozitivnih stanica i rekombinantnog virusnog potomstva tijekom vremena može se analizirati način širenja virusa između različitih tipova stanica unutar organa, kao i diseminaciju virusa među organima (**slika 6**) (33).





**Slika 6: Mehanizam širenja virusa MCMV-rec iz primarno inficiranih stanica.** Rekombinirano virusno potomstvo se širi na susjedne Cre-negativne stanice te nadalje uzrokuje sekundarnu viremiju i diseminaciju u druge organe. Slika je preuzeta iz (33).

#### 1.4.1. Transgenični miševi *BAF53b-Cre* (*Actl6b-Cre*)

Geni koji kodiraju zasebne podjedinice neuron-specifičnih kompleksa za remodelaciju kromatina (nBAF kompleksa) kombinatornim sastavljanjem svojih produkata omogućuju rast dendritskih izdanaka. Gen *BAF53b* (poznat i kao *Actl6b*) koji kodira podjedinicu SWI/SNF-like BAF kompleksa izražen je specifično u neuronima (34). Transgenični miševi koji izražavaju Cre pod kontrolom *BAF53b* regulatornih elemenata stvoreni su uporabom konstrukta umjetnog bakterijskog kromosoma (*engl.* Bacteria artificial chromosome - BAC) koji je sadržavao gen *BAF53b*. U središnjem i perifernom živčanom sustavu *BAF53b-Cre* je izražen u svim pregledanim razvojnim neuronima, ali nije bio izražen u neuralnim progenitorima niti u stanicama glijе. Stoga se *BAF53b-Cre* ili *Actl6b-Cre* transgenični miševi koriste u istraživanjima za manipulaciju genske ekspresije u razvojnim neuronima (35).

## 2. SVRHA RADA

Svrha ovog rada bila je odrediti produciraju li inficirani neuroni infektivne virusne čestice citomegalovirusa. U tu svrhu novookoćeni miševi dobiveni križanjem miševa heterozigotnih za BAF53b-Cre (poznati i kao Act16b-Cre) i divljeg soja miševa C57BL/6 (*engl.* wild type – WT) su inficirani reporterskim virusom - rekombinantnim MCMV-om sa Cre-inducibilnim fluorescentnim reporterom EGFP. Transkripcijska stop sekvenca ugrađena između promotora HCMV glavnog neposrednog ranog gena i kodirajuće EGFP sekvence obilježena je (floksirana) loxP mjestima (MCMV-flox R129) koje prepoznaje Cre rekombinaza (33,36). Kako transgenični miševi BAF53b-Cre (Act16b-Cre) imaju izražaj Cre samo u neuronima, što se postiglo ugradnjom gena za Cre zajedno s promotorom BAF53b (Act16b) koji je aktivan u neuronima prilikom kloniranja transgeničnog miša (35), u stanicama koje eksprimiraju Cre transkripcijska stop sekvenca se uklanja, što omogućuje ekspresiju proteina EGFP.

Kvantificiranjem udjela EGFP-obilježenih virusa u homogenatima organa inficiranih Cre transgeničnih miševa testom virusnih čistina *in vitro* u mozgu odredit će se produciraju li neuroni virusne čestice i u kojoj mjeri.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Virus i infekcija miševa

U ovom radu korišten je soj virusa MCMVrep  $\Delta$ m157-flox-egfp (MCMV-flox) (36). Za rekultivaciju rekombinantnog virusa MCMVrep  $\Delta$ m157-flox-egfp, primarni mišji embrionalni fibroblasti (*engl.* primary murine embryonic fibroblasts - pMEF) iz BALB/c miševa su transfecirani s pročišćenom DNA pSM3frMCK-2fl-Dm157-flox-egfp BAC-a izoliranom iz klona provjerene sekvence. Supernatant je pasažiran na pMEF stanicama šest puta da bi se uklonila BAC kazeta iz virusnog genoma te su štokovi virusa propagirani infekcijom na pMEF s visokom pasažom inokuluma MCMVrep  $\Delta$ m157-flox-egfp (36,37). Virusni štokovi su pročišćeni ultracentrifugiranjem na gradijentu gustoće sukroze (36). Novookoćeni Act16b-Cre i C57BL/6 miševi su inficirani s 500 PFU-a virusa MCMV-flox, te su organi miševa skupljeni i smrznuti 10. i 14. dan nakon okota.

#### 3.2. Izolacija DNA iz repova

Materijali

- proteinaza K (koncentracija stocka je 10 mg/ml, aq 200  $\mu$ l)
- pufer za razgradnju repova (*engl.* tail lysis buffer)

recept: 10 mM Tris-HCl pH 8      20 ml 0,5M

10 mM EDTA PH 8      20 ml 0,5M

150 mM NaCl      30 ml 5M

0,2 % SDS      20 ml 10%

dopuniti do 1000 ml sa destiliranom H<sub>2</sub>O

Otopinu autoklavirati.

- izopropanol ili 100%-tni etanol (EtOH)
- 70%-tni etanol (EtOH)
- destilirana H<sub>2</sub>O
- termo blok model HTMR-133 (proizvođač: HLC Haep Labor Consult, Bovenden, Njemačka)
- centrifuga 5415 R s rotorom (proizvođač: Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka)
- pipete veličine 20-200μl, 100-1000 μl (proizvođač: Gilson)
- epruvete volumena 2 ml

### Postupak

1. Odrezati cca 0,5 cm mišjeg repa.
2. Na svaki uzorak repa dodati 0,3 ml pufera za razgradnju repova u koji je dodana proteinaza K u konačnoj koncentraciji 200 μg/ml. Ostaviti preko noći na 56°C u termo bloku.
3. Ručno promućkati prije centrifugiranja. Centrifugirati uzorke 5 minuta na 12000 rpm.
4. Postaviti epruvete volumena 2 ml u plastični stalak i označiti ih. Prebaciti supernatant iz centrifugiranih epruveta u nove epruvete.
5. Dodati 0,3 ml izopropanola u svaku epruvetu i promućkati (okretanjem gore-dolje) dok se ne pojavi „oblačić“ DNA.
6. Centrifugirati 5 minuta na 12000 rpm, odliti supernatant, „potufati“ ependorfice na staničevini.
7. Na talog dodati 0,6 ml 70%-tnog etanola, centrifugirati 5 minuta na 12000 rpm, odliti supernatant, ponoviti postupak sa 70%-tnim etanolom još jedanput.
8. Okrenuti ependorfice na staničevinu da se ocijede i ostaviti da se DNA osuši na zraku.
9. U sterilnoj komori, dodati 150 μl destilirane H<sub>2</sub>O u ependorfice da bi se DNA otopila. Spremiti uzorke u hladnjak.

### 3.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

#### Materijali

- mini-centrifuga s 2 rotora (proizvođač: IKA mini G)
- uređaj za PCR s blokovima DNA Engine Peltier Thermal Cycler (proizvođač: Bio-Rad)
- vortex s promjenjivom brzinom (proizvođač: Phoenix Instrument)
- epruvete s čepom volumena 0,2 ml
- reagensi korišteni u PCR protokolu za genotipizaciju BAF53b-Cre (Actl6b-Cre) transgeničnih miševa

**Tablica 1: Reagensi u PCR protokolu za genotipizaciju Actl6b-Cre miševa**

Reagensi	volumen za 1 uzorak
H <sub>2</sub> O	19,875 µl
pufer (standard buffer)	2,5 µl
primer F (forward) <sup>1</sup>	0,5 µl
primer R (reverse) <sup>2</sup>	0,5 µl
DNA polimeraza	0,125 µl
dNTPs <sup>3</sup>	0,5 µl
DMSO <sup>4</sup>	1 µl
V (MM = Master Mix)	24 µl
DNA	1 µl

<sup>1</sup>prednja početnica

<sup>3</sup>deoksiribonukleotid fosfati

<sup>2</sup>stražnja početnica

<sup>4</sup>dimetilsulfoksid

#### Postupak

1. Prema PCR protokolu za genotipizaciju Actl6b-Cre miševa izračunaju se volumeni reagensa potrebni za zadani broj uzoraka koji će se obraditi.

2. U sterilnoj komori na posudi s ledom pripremi se Master Mix koji se sastoji od H<sub>2</sub>O, standardnog pufera, prednje početnice, stražnje početnice, dNTP-a, DMSO i Taq DNA polimeraze. Pripremljeni Master Mix kratko se vorteksira da bi se sastojci bolje izmiješali.
3. Epruvete volumena 0,2 ml označe se markerom i postave na led u sterilnoj komori. U svaku od epruveta mikropipetom se prebaci 24 µl Master Mixa i 1 µl odgovarajućeg DNA uzorka. Epruvete se postave na mikro-centrifugu nekoliko sekundi za spin down (slijeganje na dno) sadržaja epruvete.
4. Epruvete se postave u termoblok PCR uređaja na kojem se namjeste željeni uvjeti. Program traje 1 h i 45 minuta, a sastoji se od 3 glavna dijela: denaturacija DNA, sparivanje početnica s kalupom (annealing) i sinteza DNA (ekstenzija). Početna denaturacija DNA traje 30 sekundi na temperaturi od 95°C. Slijedi 30 ciklusa u kojima se izmjenjuju denaturacija kalupa DNA na 95°C tijekom 30 sekundi, sparivanje početnica s kalupom na 53°C tijekom 30 sekundi i sinteza DNA na 68°C tijekom 45 sekundi. Završna ekstenzija odvija se na 68°C tijekom 5 minuta. Na kraju slijedi hlađenje (hold) na temperaturi od 4-10°C. Dobiveni umnoženi fragmenti DNA u epruvetama spremaju se u hladnjak.

### **3.4. Gel elektroforeza za DNA**

#### **Materijali**

- vaga CS 200 (proizvođač: Ohaus Corp., USA)
- mini-orbitalni shaker SSM1 (proizvođač: Stuart)
- Erlenmeyerova tikvica
- mini-gel sustav za elektroforezu (proizvođač: HVD, Austrija)

- izvor struje za elektroforezu EPS 201
- kadice s pozitivnim i negativnim polom
- UV transiluminator LM-20 (proizvođač: UVP, SAD)
- UV kamera (proizvođač: Uvitec, Cambridge, Velika Britanija)
- uređaj za slikanje DNA UVISave Gel
- standardne pipete veličine 2-20  $\mu$ l i 0,2-2  $\mu$ l
- standard agaroze (500g) za DNA/RNA elektroforezu (proizvođač: Carl Roth GrubH + Co.KG, Karlsruhe, Njemačka)
- 50xTAE recept za 1 l
  - 242 g Tris baze u 500 ml ddH<sub>2</sub>O (miješati da se otopi)
  - dodati 57,2 ml octene kiseline
  - dodati 100 ml 0,5 EDTA pH 8,0
  - izmjeriti u granuliranom cilindru i dodati ddH<sub>2</sub>O do 1 l
- 1xTAE recept za 100 ml
  - 20ml 50xTAE + 980ml ddH<sub>2</sub>O
- otopina za nanašanje uzoraka Gel Loading Dye Purple (6x koncentrat) #B7024S (proizvođač: New England BioLabs Inc.)
- molekularni marker Quick-Load Purple 1 kb Plus DNA Ladder NO550S VIAL (proizvođač: New England BioLabs Inc.)
- etidij-bromid (0,5  $\mu$ g/ml)

## Postupak

1. Otvori se sterilna Erlenmeyerova tikvica i stavi na vagu. Doda se 1 g agaroze za DNA/RNA elektroforezu.

2. U Erlenmeyerovu tikvicu nalije se 100 ml 1xTAE i promiješa.
3. Erlenmeyerova tikvica stavi se u mikrovalnu pećnicu na grijanje dok se agarozna ne otopi. Mikrovalna pećnica otvara se svaki put kada tekućina provri, promiješa se i vrati u mikrovalnu pećnicu dok ne postane u potpunosti prozirna bez mjehurića, što je znak da se agarozna otopila u TAE puferu.
4. Vatrostalnim rukavicama Erlenmeyerova tikvica prebaci se na mini-orbitalni shaker i brzina se postavi na 70. Čeka se da se gel ohladi na oko 60°C.
5. Nosač za gel zaštiti se graničnicima i u njega se postave „češljevi“ s 15 izbočina. Gel ohlađen na 60°C izlije se u nosač pazeći pritom da se „češljevi“ ne pomaknu. Gel se ostavi 20 minuta da se polimerizira.
6. Kadica s negativnim i pozitivnim polom napuni se TAE puferom za razdvajanje DNA. Uklone se graničnici s nosača za gel i nosač se postavi u kadicu. Pažljivo se izvuku „češljevi“ iz gela i na mjestu izbočina vide se jažice u gelu.
7. Iz hladnjaka se uzmu uzorci DNA koji su prethodno prošli lančanu reakciju polimerazom. 5,5  $\mu$ l svakog uzorka DNA pomiješa se s 1  $\mu$ l otopine za nanošenje Gel Loading Dye Purple te se mikropipetom unose u jažice na gelu pazeći da se pritom ne probuši gel.
8. U središnju jažicu stavi se 1  $\mu$ l molekularnog markera Quick-Load Purple 1 kb DNA ljestve koji će služiti za usporedbu veličine DNA uzoraka.
9. Kadica se spoji s izvorom struje za elektroforezu tako da se pozitivan pol kadice spoji s pozitivnim polom, a negativan pol kadice s negativnim polom na izvoru struje. Uključi se izvor struje i namjesti napon na 100 mV i jakost struje na 0,25 mA. Pojava mjehurića u kadici znak je da je struja počela teći.
10. Nakon što su se uzorci DNA razdvojili krećući se prema pozitivnom polu kadice i došli do donjeg dijela gela, isključi se izvor struje i prekine se elektroforeza.



11. Gel se prebaci u otopinu etidijevog bromida (0,5 µg/ml) gdje se inkubira 30 minuta.
12. DNA uzorci na gelu vizualiziraju se na UV transiluminatoru UV kamerom i snime uređajem za snimanje.

### 3.5. Određivanje titra MCMV-a primjenom testa virusnih čistina

Postupak je proveden prema objavljenom protokolu (2).

#### Materijali

- mišji embrionalni fibroblasti (*engl.* murine embryonic fibroblasts - MEF)
- testirani uzorak: homogenat organa MCMV inficiranog miša
- kompletan medij: 3%-tni DMEM (*engl.* Dulbecco's modified Eagle's medium)
  - recept: 4,5 g/l glukoze, L-glutamin, natrijev piruvat, 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>
  - proizvođač: PAN Biotech 531
- metil-celulozni medij
  - recept: medij DMEM, 2,2% metil-celuloza, 10% FCS (fetalni goveđi serum)
- mikrotitarska ploča za staničnu kulturu s 48 jažica (6x8 - 6 jažica vertikalno, 8 jažica horizontalno)
- sterilne epruvete bez čepa volumena 1.5 ml
- standardne pipete volumena 1000 µl
- multikanalna mikropipeta (50-200 µl)
- kuglični homogenizator Star-Beater (proizvođač: VWR)
- mikrocentrifuga Heraeus Pico 17 (proizvođač: Thermo Scientific)
- centrifuga SL 40 (proizvođač: Thermo Scientific)
- invertirani mikroskop

## Postupak

1. Dan prije titracije nasade se primarni mišji embrionalni fibroblasti (MEF) na mikrotitarsku ploču s 48 jažica u kompletan medij DMEM u koncentraciji  $2 \times 10^5$  stanica po jažici. Ploče se ostavljaju u  $37^\circ\text{C}$  u inkubatoru s 5%-tnim  $\text{CO}_2$  preko noći. Sljedeći dan sloj stanica trebao bi biti 80% do 90% konfluentan za titraciju.
2. Epruvete koje sadrže 1 ml 3% DMEM-a i organe žrtvovanih miševa izvade se iz zamrzivača ( $-20^\circ\text{C}$ ) te se ostave da se odmrznu u frižideru na  $4-8^\circ\text{C}$ .
3. U sterilnoj komori sterilne epruvete bez čepa volumena 1.5 ml postavljaju se na plastični stalak tako da zauzimaju  $4 \times 6$  mjesta na stalku (4 mjesta u okomitom smjeru i 6 mjesta u horizontalnom smjeru). Tako se popuni 24 mjesta na lijevom kraju stalka i analogno na desnom kraju stalka tako da je ukupno zauzeto 48 mjesta na stalku. U svaku epruvetu doda se  $900 \mu\text{l}$  kompletnog medija DMEM koristeći dispensor.
4. Metalne kuglice promjera 2 mm dodaju se u odmrznute epruvete s organima koristeći sterilnu pincetu u sterilnoj komori. Epruvete se prebace u homogenizator na 2 minute. Nakon toga postavljaju se u centrifugu na 15 sekundi ( $300 \times g$ ) da se eventualno preostali veći komadi tkiva slegnu na dno.
5. Pripreme se serijska razrjeđenja homogenata organa na ledu kako slijedi:
  - a) U sterilnoj komori  $100 \mu\text{l}$  prvog uzorka homogenata organa prebaci se u prvu epruvetu prvog reda.  $100 \mu\text{l}$  drugog uzorka homogenata organa prebaci u drugu epruvetu prvog reda. Po istom principu ispune se preostale epruvete prvog reda, koje sada svaka sadrže po  $1000 \mu\text{l}$  mješavine kompletnog medija DMEM i pripadajućeg uzorka homogenata organa.
  - b) Koristeći multikanalnu pipetu u šest epruveta prvoga reda prvo se resuspendira mješavina kompletnog medija i uzorka homogenata organa, a zatim se  $100 \mu\text{l}$  suspenzije prebaci u sljedećih šest epruveta u drugom redu. Iz šest epruveta drugog

reda resuspendira se mješavina i onda se prebaci 100  $\mu$ l suspenzije u sljedećih šest epruveta u trećem redu. Isti se postupak ponovi za treći red epruveta. Prije svakog sljedećeg prebacivanja moraju se promijeniti nastavci pipeta jer se ide iz manjeg razrjeđenja prema većem razrjeđenju.

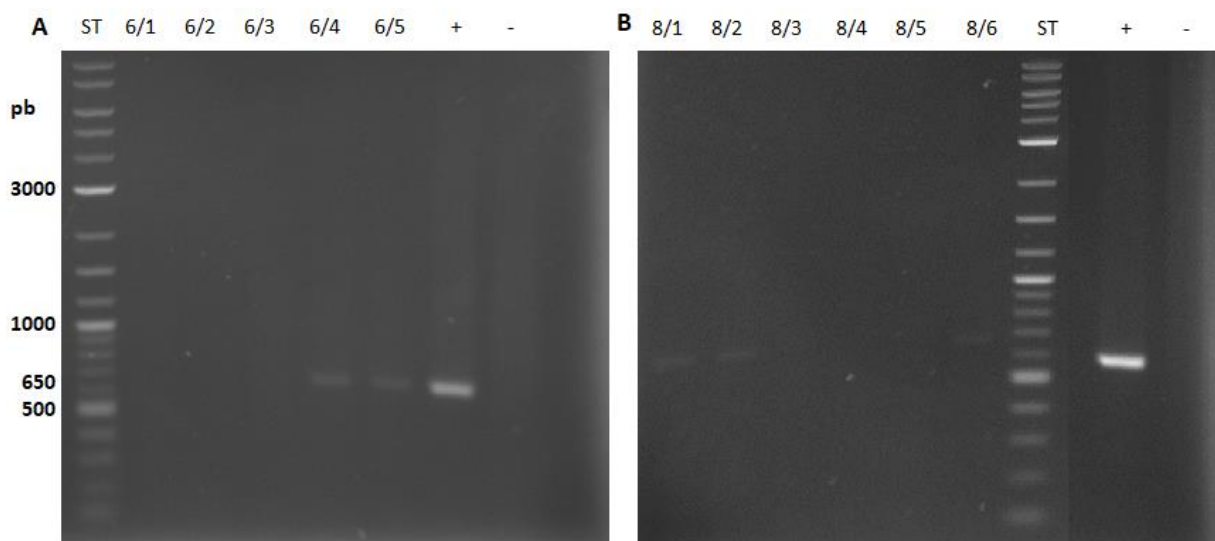
6. Ploče kultura s 48 jažica provjere se pod invertnim mikroskopom. Na pločama se markerima označi organ iz kojeg su homogenati (npr. pluća, slezena) i zatim razrjeđenja u horizontalnom smjeru tako da jedno razrjeđenje zauzima po dva vertikalna niza jažica. Krećući slijeva na desno označi se:  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  i  $10^5$  ( $2 \times 4 = 8$  jažica u horizontalnom smjeru). U vertikalnom smjeru markerom se označe uzorci homogenata tkiva po principu svaki uzorak u svoj red krećući od gore prema dolje (npr. 6/1 uzorak u gornji red, zatim 6/2 u red ispod sve do 6/6 u posljednji red).
7. Medij se aspiracijom ukloni s prethodno pripremljenih MEF stanica iz mikrotitarskih ploča s 48 jažica. Pritom se ploča ne smije nagnjati tako da mala količina medija ostane u jažicama kako bi se spriječilo isušivanje stanica.
8. 100  $\mu$ l suspenzije kompletnog medija i homogenata organa prebaci se u jažice na pločama kultura. Kreće se od najvećeg razrjeđenja ( $10^5$ ) prema najmanjem razrjeđenju ( $10^2$ ). Prvo se iz šest epruveta u četvrtom redu razrjeđenja  $10^5$  resuspendira tekućina i onda se prebaci 100  $\mu$ l na ploču kultura u jažice označene tim razrjeđenjem. Taj postupak ponavlja se još jednom jer za svako razrjeđenje postoje duplikati na ploči kultura. Iz sljedećeg razrjeđenja ( $10^4$ ) uzima se 100  $\mu$ l suspenzije i prebacuje se na ploču kultura označenu istim razrjeđenjem. Analogno, taj postupak se ponavlja da bi se dobili duplikati. Navedeni postupci ponavljaju se za razrjeđenja  $10^3$  i  $10^2$ . U ovom koraku nije potrebno mijenjati nastavke pipeta jer se ide iz najvećeg razrjeđenja ( $10^5$ ) prema najmanjem razrjeđenju ( $10^2$ ).
9. Ploče sa stanicama inkubiraju se u  $37^\circ\text{C}$  tijekom 30 minuta u inkubatoru s 5%  $\text{CO}_2$ .

10. Ploče sa stanicama stavljaju se u centrifugu na 2100 okretaja (1000xg) tijekom 30 minuta. Kada završi centrifugiranje, ploče sa stanicama se vraćaju u inkubator s 5% CO<sub>2</sub> u 37°C tijekom 30 minuta.
11. U sterilnoj komori na ploče sa stanicama pomoću sterilne granulirane menzure izlije se 500 - 1000 µl metil-celuloznog medija u svaku jažicu. Ploče se zatim ponovno vraćaju u inkubator gdje ostaju sljedeća tri do četiri dana, koliko je uobičajeno potrebno da se formiraju jasno vidljivi plakovi (čistine).  
*Metil-celulozni medij je viskozan i sprečava širenje virusa supernatantom. Na taj način virus se širi iz inficirane stanice samo na susjedne stanice te dolazi do formiranja plakova.*
12. Nakon četiri dana, u svakoj jažici prebroje se plakovi koristeći invertni mikroskop te se izračuna broj jedinica koje tvore plakove (PFU) po mililitru (ml) suspenzije homogenata organa tako da se pomnoži prosječni broj prebrojanih plakova u svakoj jažici s faktorom razrjeđenja odgovarajućeg serijskog razrjeđenja koje je korišteno za inficiranje stanica u jažici.
13. Konfokalnim mikroskopom promatraju se ploče sa stanicama pod UV svjetlom da bi se utvrdilo vide li se fluorescentni zeleni plakovi.

## 4. REZULTATI

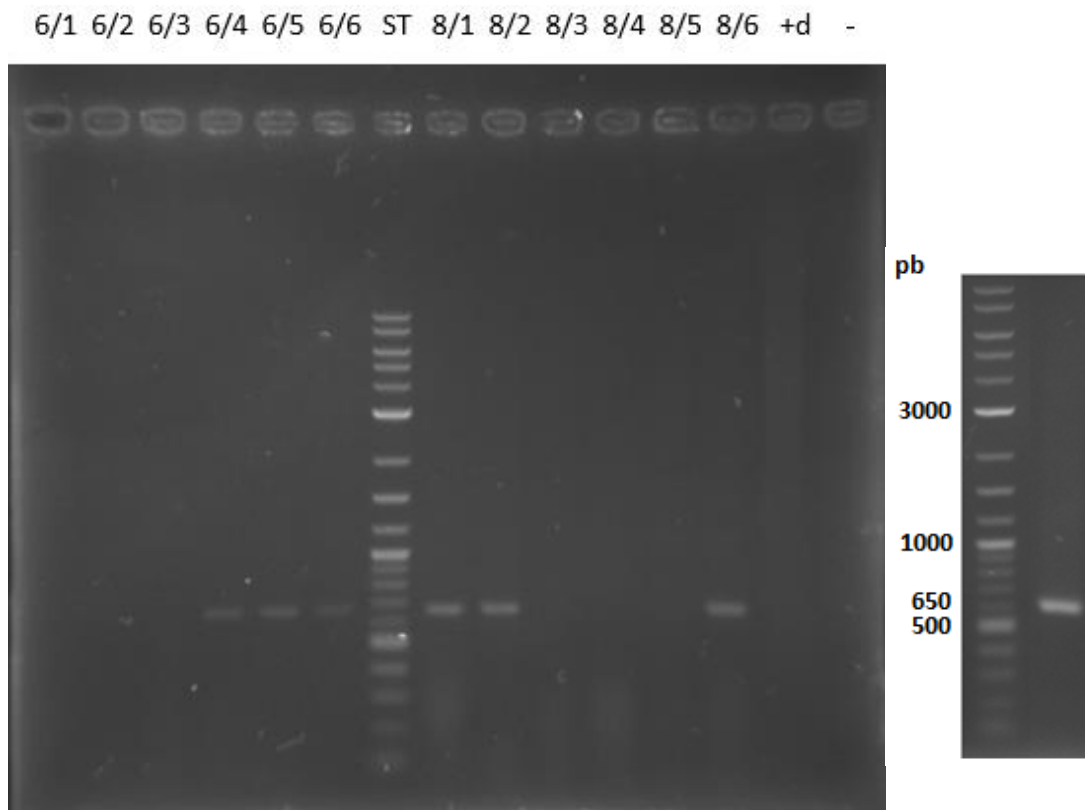
### 4.1. Genotipizacija miševa

Uzorci DNA izolirane iz repova pet miševa iz istog legla koji su žrtvovani 10. dan nakon okota označeni su: 6/1, 6/2, 6/3, 6/4 i 6/5, dok su uzorci DNA šest miševa iz drugog legla koji su žrtvovani 14. dan nakon okota označeni: 8/1, 8/2, 8/3, 8/4, 8/5 i 8/6. Navedeni su uzorci DNA eksponencijalno umnoženi PCR-om, naneseni na agarozni gel i razdvojeni postupkom elektroforeze (**slika 7**). Pod UV svjetlom vizualizirani su umnoženi fragmenti DNA označeni s 6/4, 6/5, 8/1, 8/2 i 8/6, što znači da su ti miševi transgenični BAF53b-Cre (Actl6b-Cre) miševi. Veličina umnoženih fragmenata DNA iznosila je 650 parova baza (pb), što odgovara očekivanoj veličini. Pozitivna kontrola (0.5 µl Actl6b-Cre+ DNA) bila je vidljiva na oba gela, dok negativne kontrole (NcrCre+ za uzorke od 6/1 do 6/5 i Eomes flox/flox za uzorke od 8/1 do 8/6 ) nisu bile vidljive na gelovima.



**Slika 7: Genotipizacija Actl6b-Cre miševa.** (A) Gel elektroforeza DNA uzoraka označenih sljedećim redoslijedom: ST (standard), 6/1, 6/2, 6/3, 6/4 i 6/5. Na gelu su vizualizirani umnoženi fragmenti DNA 6/4 i 6/5 te pozitivna kontrola (0.5 µl Actl6b-Cre+ DNA). Veličina fragmenata iznosi 650 parova baza (pb). (B) Gel elektroforeza DNA uzoraka označenih sljedećim redoslijedom: 8/1, 8/2, 8/3, 8/4, 8/5 i 8/6, ST (standard). Na gelu su vizualizirani umnoženi fragmenti DNA 8/1, 8/2 i 8/6 te pozitivna kontrola (0.5 µl Actl6b-Cre+ DNA). Veličina fragmenata iznosi 650 pb.

S obzirom na slabi signal u dijelu uzoraka i radi potvrde dobivenih podataka, PCR i gel elektroforeza su ponovljeni (**slika 8**). Pod UV svjetlom vizualizirani su umnoženi fragmenti DNA koji pripadaju uzorcima 6/4, 6/5, 8/1, 8/2 i 8/6, što se poklapa s prijašnjim rezultatima i potvrđuje da su ti miševi transgenični BAF53b-Cre (Act16b-Cre) miševi.



**Slika 8: Ponovljena genotipizacija Act16b-Cre miševa.** (**lijevo**) Gel elektroforeza DNA uzoraka označenih sljedećim redoslijedom: 6/1, 6/2, 6/3, 6/4, 6/5, 6/6, ST (standard), 8/1, 8/2, 8/3, 8/4, 8/5 i 8/6. Na gelu su vizualizirani umnoženi fragmenti DNA 6/4, 6/5, 8/1, 8/2 i 8/6 veličine 650 parova baza (pb). Pozitivna kontrola (0.5  $\mu$ l Act16b-Cre+ DNA) nije vizualizirana. Stoga su uzorci uspoređeni s prethodno vizualiziranom pozitivnom kontrolom (**desno**).

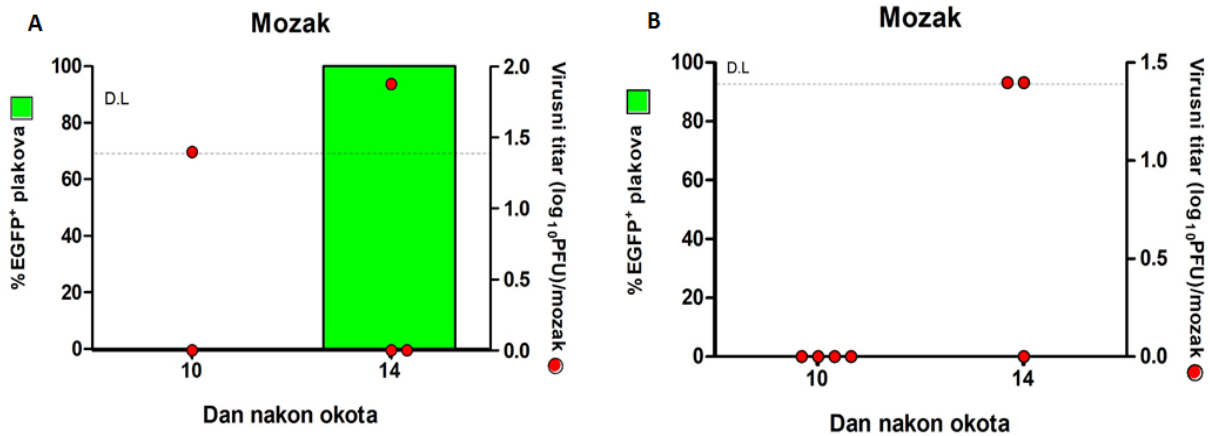
## 4. 2. Produkcija infektivnog MCMV-a u neuronima

### 4.2.1. *In vivo* konverzija reporterskog virusa u mozgu

Mozgovi pet miševa iz istog legla označeni brojevima 6/1, 6/2, 6/3, 6/4 i 6/5 žrtvovanih 10. dana nakon okota pripremljeni su kao homogenati za određivanje titra MCMV-a u testu virusnih čistina. Prethodnom gel elektroforezom utvrđeno je da su miševi označeni brojevima 6/4 i 6/5 BAF53b-Cre (Actl6b-Cre) transgenični miševi. Nakon prebrojavanja plakova pod invertnim mikroskopom, izračunate su jedinice koje tvore plakove (PFU) po mililitru suspenzije homogenata mozga (**slika 9A**). Vrijednosti PFU-a prikazane su kao logaritamske funkcije s bazom 10. Pod konfokalnim mikroskopom nisu utvrđeni zeleni fluorescentni plakovi pa je u odnosu na utvrđene plakove pod svjetlosnim mikroskopom, postotak EGFP pozitivnih stanica 0 % u mozgu Actl6b-Cre transgeničnih miševa. Miševi označeni brojevima 6/1, 6/2 i 6/3 utvrđeni su kao BAF53b-Cre (Actl6b-Cre) negativni miševi gel elektroforezom. Budući da plakovi nisu utvrđeni ni u jednom od uzoraka pod svjetlosnim mikroskopom, ni pod konfokalnim mikroskopom nisu mogli biti vidljivi zeleni fluorescentni plakovi pa postotak EGFP pozitivnih stanica nije mogao biti određen u mozgu Actl6b-Cre negativnih miševa (**slika 9B**).

Na isti način kao i za prethodnu skupinu miševa provedena je analiza mozgova šest miševa iz istog legla označenih brojevima 8/1, 8/2, 8/3, 8/4, 8/5 i 8/6 i žrtvovanih 14. dana nakon okota. Prethodnom gel elektroforezom utvrđeno je da su miševi označeni brojevima 8/1, 8/2 i 8/6 BAF53b-Cre (Actl6b-Cre) transgenični miševi. Pod konfokalnim mikroskopom utvrđeni su zeleni fluorescentni plakovi u jednakom broju kao i plakovi vidljivi pod svjetlosnim mikroskopom, što bi značilo da postotak EGFP pozitivnih stanica iznosi 100 % u mozgu Actl6b-Cre transgeničnih miševa (**slika 9A**). Miševi označeni brojevima 8/3, 8/4, 8/5 utvrđeni su kao BAF53b-Cre (Actl6b-Cre) negativni miševi gel elektroforezom. Pod konfokalnim

mikroskopom nisu pronađeni zeleni fluorescentni plakovi pa postotak EGFP pozitivnih stanica iznosi 0 % u mozgu Act16b-Cre negativnih miševa (**slika 9B**).



**Slika 9: Produktivna infekcija neurona.** Novookočeni miševi dobiveni križanjem miševa heterozigotnih za Act16b-Cre i divljeg soja miševa (C57BL/6) inficirani su s MCMV-flox virusom. 10 i 14 dana nakon infekcije mozgovi su izolirani, smrznuti, te je određen titar virusa i udio EGFP-pozitivnih stanica svjetlosnom i konfokalnom mikroskopijom. **(A)** Graf prikazuje titar virusa ( $\log_{10}$  PFU/mozak; crveni kružići) i udio EGFP+ pozitivnih plakova (zeleni stupići) u mozgu Act16b-Cre transgeničnih miševa. Udio EGFP+ plakova iznosi 100 % u miševa žrtvovanih 14. dana. D.L. - granica detekcije (*engl.* detection limit). **(B)** Graf prikazuje titar virusa ( $\log_{10}$  PFU/mozak; crveni kružići) u mozgu Act16b-Cre negativnih miševa, dok EGFP+ plakova nije bilo (nema zelenih stupića). D.L. - granica detekcije (*engl.* detection limit).

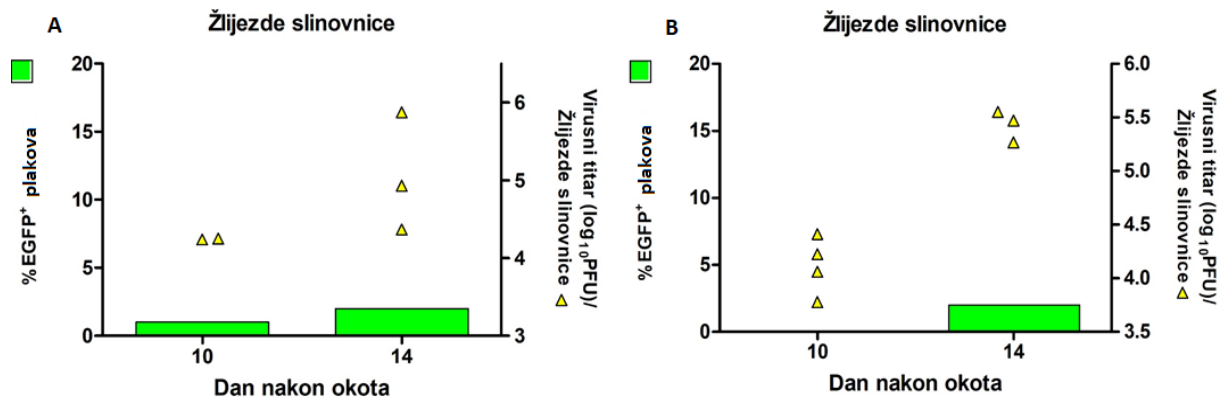
#### 4.2.2. *In vivo* konverzija reporterskog virusa u žlijezdama slinovnicama

Na analogan način kao i za mozak, miševima su izvađene žlijezde slinovnice i pripremljene kao homogenati za određivanje titra MCMV-a u testu virusnih čistina. U žlijezdama slinovnicama Act16b-Cre transgeničnih miševa 6/4 i 6/5 pod konfokalnim mikroskopom pronađeni su zeleni fluorescentni plakovi, te je usporedbom broja plakova pod konfokalnim mikroskopom i broja plakova pod svjetlosnim mikroskopom dobiven postotak



EGFP pozitivnih stanica od 1 % (**slika 10A**). Isti postupak proveden je i kod Act16b-Cre transgeničnih miševa 8/1, 8/2 i 8/6 kod kojih je utvrđen postotak EGFP pozitivnih stanica od 2 %.

U žlijezdama slinovnicama Act16b-Cre negativnih miševa 6/1, 6/2 i 6/3 pod konfokalnim mikroskopom nisu utvrđeni zeleni fluorescentni plakovi pa postotak EGFP pozitivnih stanica iznosi 0 %, dok je u žlijezdama slinovnicama Act16b-Cre negativnih miševa 8/3, 8/4 i 8/5 utvrđen postotak EGFP pozitivnih stanica od 2 % (**slika 10B**).



**Slika 10: Konverzija reporterskog virusa u žlijezdama slinovnicama.** Novookočeni miševi dobiveni križanjem miševa heterozigotnih za Act16b-Cre i divljeg soja miševa (C57BL/6) inficirani su s MCMV-flox virusom. 10 i 14 dana nakon infekcije žlijezde slinovnice su izolirane, smrznute, te je određen titar virusa i udio EGFP-pozitivnih stanica svjetlosnom i konfokalnom mikroskopijom. (A) Graf prikazuje titar virusa (log<sub>10</sub> PFU/žlijezde slinovnice; žuti trokutići) i udio EGFP+ pozitivnih plakova (zeleni stupići) u žlijezdama slinovnicama Act16b-Cre transgeničnih miševa koji iznosi 1 % u miševa žrtvovanih 10. dana i 2 % u miševa žrtvovanih 14. dana. D.L. - granica detekcije (*engl.* detection limit). (B) Graf prikazuje titar virusa (log<sub>10</sub> PFU/žlijezde slinovnice; žuti trokutići) i udio EGFP+ pozitivnih plakova (zeleni stupići) u žlijezdama slinovnicama Act16b-Cre negativnih miševa koji iznosi 0 % u miševa žrtvovanih 10. dana i 2 % u miševa žrtvovanih 14. dana. D.L. - granica detekcije (*engl.* detection limit).

## 5. RASPRAVA

Kongenitalne infekcije predstavljaju veliku opasnost za plod zbog nezrelosti njegovog imunološkog sustava i mogućih dugoročnih negativnih posljedica na daljnji razvoj i zdravlje. HCMV kao najčešći uzrok kongenitalnih virusnih infekcija može uzrokovati teške morbiditete CNS-a poput gubitka sluha, cerebralne paralize i kognitivnog oštećenja (12,13). Zbog specifičnosti CMV za vrstu provode se brojna istraživanja na mišjem modelu koristeći MCMV za otkrivanje složenih mehanizama patogeneze infekcije CMV-om i imunološkog obrambenog odgovora domaćina (2,14). U ovom radu koristili smo mišji model kongenitalne infekcije kako bismo analizirali je li infekcija neurona produktivna i u kojoj mjeri. U tu svrhu korišten je reporterski MCMV i transgenični soj miševa koji izražava Cre rekombinazu u neuronima. Dobiveni rezultati ukazuju da neuroni mogu producirati infektivni virus.

Budući da sklonost HCMV-a prema diferenciranim neuronima još nije točno utvrđena, veoma je važno provoditi istraživanja koja bi razjasnila patogenetski mehanizam infekcije neurona HCMV-om. Sva dosadašnja istraživanja na neuronima provedena su u *in vitro* uvjetima i zato su potrebna *in vivo* istraživanja koja će pokazati ponašanje virusa u organizmu. *In vitro* istraživanja ukazala su da HCMV ima veću sklonost ekspresiji i citopatskoj replikaciji u astrocitima u odnosu na mikrogliju i neurone. Astroцити su veoma podložni infekciji HCMV-om koja može uzrokovati njihovu apoptotičku smrt na vrhuncu replikacije virusa (38). Utvrđeno je i da su NPSC također podložne infekciji HCMV-om koja sprječava indukciju diferencijacije NPSC stanica u neurone na način da inhibira progresiju staničnog ciklusa. Kao i kod astrocita, HCMV uzrokuje apoptotičku smrt NPSC-a. Ovisno o stadiju diferencijacije NPSC-a, *in vitro* HCMV onemogućuje sazrijevanje NPSC u početna 24h od početka diferencijacije, dok u razdoblju nakon 24h do 72h nakon početka diferencijacije uzrokuje apoptozu, ali ne utječe više na staničnu proliferaciju (29). Nakon diferencijacije NSPC stanica u astrogliju i u miješanu populaciju astroglije i neurona s identificiranim  $\beta$ -tubulinom III

markerom, obje skupine stanica bile su podložne infekciji HCMV-om i producirale su značajni broj infektivnih viriona. Utvrđeno je da su inficirani neuroni s  $\beta$ -tubulinom III preživjeli dulje od NPSC stanica ili astroglije, čak do 14. dan nakon inficiranja, što bi govorilo u prilog da neuroni mogu služiti kao rezervoar HCMV-a tijekom razvoja mozga (39).

Svrha preliminarnog eksperimenta opisanog u ovom radu bila je utvrditi hoće li u transgeničnim miševima BAF53b-Cre (Act16b-Cre) koji imaju izražaj Cre samo u neuronima doći do konverzije MCMV-flox virusa u MCMV-rec virus po infekciji (36), odrediti udio EGFP-obilježenih virusa te mogu li i u kojoj mjeri neuroni producirati virusne čestice. Rezultati su pokazali da ne dolazi do konverzije virusa 10. dan nakon infekcije, ali dolazi 14. dan. Nadalje, u mozgu kontrolnih Act16b-Cre negativnih miševa nije došlo do konverzije što ukazuje da ne dolazi do spontane konverzije virusa. Međutim, važno je napomenuti da su detektirane vrlo niske razine virusa u mozgu, te su stoga potrebna daljnja istraživanja koja će omogućiti analizu većeg broja inficiranih stanica u mozgu. U žlijezdama slinovnicama replikacija virusa bila je značajna, što je i očekivano s obzirom da je to organ iz kojeg se virus širi na nove domaćine (40). Iako je očekivano velika većina plakova bila EGFP negativna u žlijezdama slinovnicama, pronađen je 1-2 % EGFP-pozitivnih plakova. S obzirom da je isto pronađeno i u transgeničnih miševa koji izražavaju Cre i u kontrolnih miševa koji ne izražavaju Cre, pretpostavljamo da se radi o spontanim promjenama u MCMV-flox virusu koje rezultiraju ekspresijom EGFP-a.

## 6. ZAKLJUČAK

U ovome radu prikazani su rezultati preliminarnog eksperimenta u kojem su BAF53b-Cre (Actl6b-Cre) transgenični miševi inficirani reporterskim MCMV-flox virusom, dok su Actl6b-Cre negativni miševi bili kontrolna skupina. Rezultati su pokazali da do konverzije MCMV-flox virusa u MCMV-rec virus dolazi 14. dan nakon infekcije u mozgu Actl6b-Cre transgeničnih miševa, što je dokazano pojavom EGFP+ plakova.

Rezultati eksperimenta upućuju na zaključak da su neuroni Actl6b-Cre transgeničnih miševa produktivno inficirani reporterskim virusom. Međutim, zbog malog broja EGFP+ plakova u mozgu Actl6b-Cre transgeničnih miševa potrebna su daljnja istraživanja da bi se utvrdilo u kojoj mjeri neuroni mogu producirati virusne čestice.

## 7. SAŽETAK

Infekcija HCMV-om, pripadnikom porodice  $\beta$  herpesvirusa, široko je rasprostranjena u ljudskoj populaciji. Kod imunokompetentnih pojedinaca infekcija uzrokuje blaže ili nikakve simptome, dok kod osoba sa oslabljenim ili nezrelim imunološkim sustavom može biti životno ugrožavajuća. Kao najčešći uzročnik kongenitalnih virusnih infekcija, HCMV uzrokuje teška strukturalna i funkcionalna oštećenja CNS-a. Trenutno ne postoji cjepivo za citomegalovirus, a dostupni terapijski postupci pokazuju ograničenu učinkovitost, stoga su istraživanja temeljnih mehanizama nastanka bolesti od izuzetne važnosti.

Skoro sva dostupna istraživanja infekcije neurona CMV-om provedena su u *in vitro* uvjetima i pokazuju oprečne rezultate o sklonosti CMV-a prema neuronima. Svrha ovog rada bila je provesti *in vivo* istraživanje na mišjem modelu s reporterskim MCMV virusom kako bi se otkrilo mogu li neuroni biti produktivno inficirani. Rezultati su pokazali da u mozgu miševa dolazi do *in vivo* konverzije reporterskog virusa 14. dan nakon infekcije. Ovi rezultati ukazuju da inficirani neuroni produciraju virus, ali zbog niskog titra reporterskog virusa u mozgu korištenih miševa nismo saznali koliki postotak neurona ima sposobnost produkcije virusnih čestica. Stoga, ovo istraživanje služi kao preliminarno za daljnja *in vivo* istraživanja citomegalovirusne infekcije neurona.

Ključne riječi: MCMV, transgenični miševi, *in vivo* konverzija, EGFP, neuroni

## 8. SUMMARY

Infection with HCMV, a member of the  $\beta$  herpesvirus family, is widely distributed within the human population. In immunocompetent individuals the infection causes mild or none symptoms. On the other hand, it can be a life-threatening infection in people with weakened or immature immune system. As the most common cause of congenital viral infections, HCMV leads to severe structural and functional abnormalities of the CNS. At the moment there is no vaccine to prevent cytomegalovirus infection. Also, the available therapeutic procedures show limited efficacy. Therefore, the research on basic mechanisms of CMV infection are of great importance.

Almost all the available research on CMV infection of neurons have been conducted *in vitro* and suggest conflicting results on CMV preference for neurons. The purpose of this paper was to conduct an *in vivo* research using mouse model with reporter MCMV virus to determine whether neurons can be productively infected. The results have demonstrated that *in vivo* conversion of the reporter virus occurs in the brain of mice 14 days after the infection. These results indicate that infected neurons can produce the virus. However, due to the low titer of reporter virus in the brain of mice, we haven't found out the exact percentage of neurons that has the ability to produce the virus. In conclusion, this paper serves as a preliminary research for necessary further *in vivo* research on CMV infection of neurons.

Key words: MCMV, transgenic mice, *in vivo* conversion, EGFP, neurons

## 9. LITERATURA

1. Stern-Ginossar N, Weisburd B, Michalski A, Le VTK, Hein MY, Huang SX, et al. Decoding human cytomegalovirus. *Science* (80- ). 2012;
2. Brizic I, Lisnic B, Brune W, Hengel H, Jonjic S. Cytomegalovirus Infection: Mouse Model. *Curr Protoc Immunol*. 2018 Aug;122(1):e51.
3. Collins-McMillen D, Buehler J, Peppenelli M, Goodrum F. Molecular determinants and the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Viruses*. 2018.
4. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol*. 2015 Jan 1;235(2):288–97.
5. Lancini D, Faddy HM, Flower R, Hogan C. Cytomegalovirus disease in immunocompetent adults. *Med J Aust*. 2014;
6. Nguyen CC, Kamil JP. Pathogen at the gates: Human cytomegalovirus entry and cell tropism. Vol. 10, *Viruses*. MDPI AG; 2018.
7. Britt WJ, Auger D. Synthesis and processing of the envelope gp55-116 complex of human cytomegalovirus. *J Virol*. 1986;
8. Mach M, Kropff B, Kryzaniak M, Britt W. Complex Formation by Glycoproteins M and N of Human Cytomegalovirus: Structural and Functional Aspects. *J Virol*. 2005;
9. Ciferri C, Chandramouli S, Donnarumma D, Nikitin PA, Cianfrocco MA, Gerrein R, et al. Structural and biochemical studies of HCMV gH/gL/gO and pentamer reveal mutually exclusive cell entry complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;
10. Wu Y, Prager A, Boos S, Resch M, Brizic I, Mach M, et al. Human cytomegalovirus glycoprotein complex gH/gL/gO uses PDGFR- $\alpha$  as a key for entry. *PLoS Pathog*.

- 2017;
11. Martinez-Martin N, Marcandalli J, Huang CS, Arthur CP, Perotti M, Foglierini M, et al. An Unbiased Screen for Human Cytomegalovirus Identifies Neuropilin-2 as a Central Viral Receptor. *Cell*. 2018;
  12. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Reviews in Medical Virology*. 2007.
  13. Dreher AM, Arora N, Fowler KB, Novak Z, Britt WJ, Boppana SB, et al. Spectrum of disease and outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 2014;
  14. Slavuljica I, Kveštak D, Csaba Huszthy P, Kosmac K, Britt WJ, Jonjić S. Immunobiology of congenital cytomegalovirus infection of the central nervous system - The murine cytomegalovirus model. Vol. 12, *Cellular and Molecular Immunology*. Chinese Soc Immunology; 2015. p. 180–91.
  15. Fowler KB, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. In: *Journal of Clinical Virology*. 2006.
  16. Gabrielli L, Bonasoni MP, Santini D, Piccirilli G, Chiereghin A, Guerra B, et al. Human fetal inner ear involvement in congenital cytomegalovirus infection. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;
  17. Kosugi I, Kawasaki H, Arai Y, Tsutsui Y. Innate immune responses to cytomegalovirus infection in the developing mouse brain and their evasion by virus-infected neurons. *Am J Pathol*. 2002;
  18. Bantug GRB, Cekinovic D, Bradford R, Koontz T, Jonjic S, Britt WJ. CD8 + T Lymphocytes Control Murine Cytomegalovirus Replication in the Central Nervous



- System of Newborn Animals . J Immunol. 2008;
19. Cheeran MCJ, Gekker G, Hu S, Palmquist JM, Lokensgard JR. T cell-mediated restriction of intracerebral murine cytomegalovirus infection displays dependence upon perforin but not interferon- $\gamma$ . J Neurovirol. 2005;
  20. Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T Cell Effector Mechanisms in Resistance to Infection. Annu Rev Immunol. 2000;
  21. Wakim LM, Woodward-Davis A, Bevan MJ. Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;
  22. Brizić I, Hiršl L, Šustić M, Golemac M, Britt WJ, Krmpotić A, et al. CD4 T cells are required for maintenance of CD8 TRM cells and virus control in the brain of MCMV-infected newborn mice. Med Microbiol Immunol. 2019;
  23. Jonjić S, Pavić I, Polić B, Crnković I, Lučin P, Koszinowski UH. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. J Exp Med. 1994;
  24. Revello MG, Lazzarotto T, Guerra B, Spinillo A, Ferrazzi E, Kustermann A, et al. A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus. N Engl J Med. 2014;
  25. Fowler KB, Stagno S, Pass RF. Maternal Immunity and Prevention of Congenital Cytomegalovirus Infection. J Am Med Assoc. 2003;
  26. Koontz T, Bralic M, Tomac J, Pernjak-Pugel E, Bantug G, Jonjic S, et al. Altered development of the brain after focal herpesvirus infection of the central nervous system. J Exp Med. 2008;

27. Cekinović Đ, Golemac M, Pugel EP, Tomac J, Čičin-Šain L, Slavuljica I, et al. Passive Immunization Reduces Murine Cytomegalovirus-Induced Brain Pathology in Newborn Mice. *J Virol.* 2008;
28. Kosmac K, Bantug GR, Pugel EP, Cekinovic D, Jonjic S, Britt WJ. Glucocorticoid Treatment of MCMV Infected Newborn Mice Attenuates CNS Inflammation and Limits Deficits in Cerebellar Development. *PLoS Pathog.* 2013;
29. Odeberg J, Wolmer N, Falci S, Westgren M, Seiger Å, Söderberg-Nauclér C. Human Cytomegalovirus Inhibits Neuronal Differentiation and Induces Apoptosis in Human Neural Precursor Cells. *J Virol.* 2006;
30. Luo MH, Hannemann H, Kulkarni AS, Schwartz PH, O'Dowd JM, Fortunato EA. Human Cytomegalovirus Infection Causes Premature and Abnormal Differentiation of Human Neural Progenitor Cells. *J Virol.* 2010;
31. Juranic Lisnic V, Babic Cac M, Lisnic B, Trsan T, Mefferd A, Das Mukhopadhyay C, et al. Dual Analysis of the Murine Cytomegalovirus and Host Cell Transcriptomes Reveal New Aspects of the Virus-Host Cell Interface. *PLoS Pathog.* 2013;
32. Lewandoski M. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nature Reviews Genetics.* 2001.
33. Sacher T, Podlech J, Mohr CA, Jordan S, Ruzsics Z, Reddehase MJ, et al. The Major Virus-Producing Cell Type during Murine Cytomegalovirus Infection, the Hepatocyte, Is Not the Source of Virus Dissemination in the Host. *Cell Host Microbe.* 2008 Apr 17;3(4):263–72.
34. Wu JI, Lessard J, Olave IA, Qiu Z, Ghosh A, Graef IA, et al. Regulation of Dendritic Development by Neuron-Specific Chromatin Remodeling Complexes. *Neuron.* 2007;

35. Zhan X, Cao M, Yoo AS, Zhang Z, Chen L, Crabtree GR, et al. Generation of BAF53b-Cre transgenic mice with pan-neuronal Cre activities. *Genesis*. 2015;
36. Tegtmeyer PK, Spanier J, Borst K, Becker J, Riedl A, Hirche C, et al. STING induces early IFN- $\beta$  in the liver and constrains myeloid cell-mediated dissemination of murine cytomegalovirus. *Nat Commun*. 2019 Dec 1;10(1).
37. Wagner M, Jonjić S, Koszinowski UH, Messerle M. Systematic Excision of Vector Sequences from the BAC-Cloned Herpesvirus Genome during Virus Reconstitution. *J Virol*. 1999;
38. Lokensgard JR, Cheeran MCJ, Gekker G, Hu S, Chao CC, Peterson PK. Human cytomegalovirus replication and of apoptosis in astrocytes. *J Hum Virol*. 1999;
39. Luo MH, Schwartz PH, Fortunato EA. Neonatal Neural Progenitor Cells and Their Neuronal and Glial Cell Derivatives Are Fully Permissive for Human Cytomegalovirus Infection. *J Virol*. 2008;
40. Lucin P, Pavić I, Polić B, Jonjić S, Koszinowski UH. Gamma interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. *J Virol*. 1992;

## 10. ŽIVOTOPIS

Jelena Materljan rođena je 24. 04. 1996. godine u Rijeci. Nakon završene Osnovne škole Centar upisuje se u opći b razred Prve riječke hrvatske gimnazije 2010. godine. Temeljem uspjeha na maturi i prosječne ocjene iz gimnazije upisuje Medicinski fakultet u Rijeci 2014. godine. Redovitim polaganjem kolegija na fakultetu na kraju akademske godine 2019./2020. opći prosjek ocjena iznosi joj 4,893, a težinski prosjek ocjena 4,770.

Od akademske godine 2016./2017. do aktualne akademske godine 2019./2020. obavlja dužnost demonstratora na Zavodu za anatomiju, Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku i Zavodu za histologiju i embriologiju. Od akademske godine 2018./2019. do aktualne akademske godine 2019./2020. zaposlena je kao demonstrator na Katedri za Internu medicinu u sklopu kolegija Klinička propedeutika. Tijekom studija osvojila je dvije Dekanove nagrade za izvrsnost, za akademsku godinu 2016./2017. i akademsku godinu 2018./2019.

Od travnja 2019. godine nakon odobrenja prof. dr. sc. Stipana Jonjića uključuje se u znanstveno-istraživački rad Centra za proteomiku i Zavoda za histologiju i embriologiju pod vodstvom mentora doc. dr. sc. Ilije Brizića.