

# Detekcija rezistencijskih mutacija u regijama UL54 i UL97 ljudskog citomegalovirusa

---

**Mišković, Antonela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:224507>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-02**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Antonela Mišković

**Detekcija rezistencijskih mutacija u regijama  
UL54 i UL97 ljudskog citomegalovirusa**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Antonela Mišković

**Detection of resistance mutations in UL54  
and UL97 regions of human cytomegalovirus**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za imunološku i molekularnu dijagnostiku u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević”, pod voditeljstvom dr. sc. Ivane Grgić, te neposrednim voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Silvije Černi. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Ivani Grgić na vodstvu, uloženom trudu te korisnim savjetima prilikom izrade ovog rada. Također se zahvaljujem suvoditeljici dr. sc. Silviji Černi na uloženom trudu i izdvojenom vremenu za pregledavanje diplomskog rada. Na kraju bih se zahvalila svojoj obitelji i prijateljima koji su mi pružali podršku tijekom studiranja.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Detekcija rezistencijskih mutacija u regijama UL54 i UL97 ljudskog citomegalovirusa

Antonela Mišković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Ljudski citomegalovirus je široko rasprostranjen herpesvirus koji uspostavlja latentnu infekciju u domaćinu. Iako su infekcije uglavnom asimptomatske, u populaciji imunokompromitiranih osoba i novorođenčadi mogu dovesti do komplikacija. Trenutno dostupnu antivirusnu terapiju čine ganciklovir, valganciklovir, cidofovir i foskarnet koji djeluju na virusnu DNA polimerazu pri čemu se ganciklovir i valganciklovir moraju prethodno aktivirati virusnom kinazom. Rezistencijske mutacije javljaju se unutar gena za ova dva proteina (UL54 i UL97). Mutacije gena UL97 daju rezistenciju na ganciklovir i valganciklovir, dok mutacije gena UL54 dodatno daju rezistenciju i na cidofovir i foskarnet. Cilj ovog istraživanja bilo je detektirati rezistencijske mutacije u regijama UL97 i UL54 ljudskog citomegalovirusa izoliranog iz 14 uzoraka svakog od dva ispitanika (novorođenče i transplantirani pacijent koji su primali različitu terapiju). Nakon sekvenciranja regija UL54 i UL97 metodom po Sangeru, rezistencijske su mutacije analizirane u algoritmu *Mutation resistance analyzer*. Kod transplantiranog ispitanika na imunosupresivnoj terapiji, čija je terapija započeta ganciklovirom/valganciklovirom te je nastavljena foskarnetom, detektirane su rezistencijske mutacije u obje regije. Kod novorođenčeta, liječenog ganciklovirom i valganciklovirom, nisu detektirane rezistencijske mutacije. Zaključeno je da su dulja podvrgnutost terapiji i dulji period uzorkovanja kod transplantiranog ispitanika kao i naknadna terapija foskarnetom mogli pridonijeti razvoju rezistencije.

(69 stranica, 12 slika, 9 tablica, 113 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: antivirusna terapija, ganciklovir, sekvenciranje, filogenetska analiza

Voditelj: Dr. Sc. Ivana Grgić, znan. sur.

Suvoditelj: Izv. prof. dr. sc. Silvija Černi

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Silvija Černi

Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Prof. dr. sc. Zlatko Liber

Rad prihvaćen: 10.2.2022.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

## Detection of resistance mutations in UL54 and UL97 regions of human cytomegalovirus

Antonela Mišković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Human cytomegalovirus is a widespread herpesvirus that establishes a latent infection in the host. Although infections are mostly asymptomatic, they can cause complications in the immunocompromised population and newborns. Antiviral therapy includes ganciclovir, valganciclovir, cidofovir and foscarnet, which act on viral DNA polymerase, where ganciclovir and valganciclovir must be pre-activated by viral kinase. Resistance mutations occur within the genes for these two proteins (UL54 and UL97). UL97-mutations confer ganciclovir/valganciclovir-resistance while UL54-mutations further confer cidofovir- and foscarnet-resistance. The aim of this study was to detect resistance mutations in the UL97 and UL54 regions of isolated human cytomegalovirus from 14 samples from each of the two patients (infant and transplant patient receiving different therapies). After sequencing the UL54 and UL97 regions by the Sanger sequencing method, resistance mutations were analyzed in the Mutation Resistance Analyzer algorithm. Resistance mutations in both regions were detected in a transplant patient on immunosuppressive therapy whose antiviral therapy was initiated with ganciclovir/valganciclovir and continued with foscarnet. No resistance mutations were detected in infant treated with ganciclovir and valganciclovir. It was concluded that longer exposure to therapy and longer sampling period in the transplant patient as well as subsequent foscarnet therapy could contribute to the development of the resistance.

(69 pages, 12 figures, 9 tables, 113 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: antiviral therapy, ganciclovir, sequencing, phylogenetic analysis

Supervisor: Dr. Ivana Grgić, Res. Assoc.

Co-supervisor: Dr. Silvija Černi, Asst. Prof.,

Reviewers:

Dr. Silvija Černi, Asst. Prof.

Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Dr. Zlatko Liber, Prof.

Thesis accepted: 10.2.2022.

# Sadržaj

## 1. UVOD

<b>1.1. Ljudski citomegalovirus</b> .....	1
1.1.1. Virusna čestica.....	2
1.1.2. Genomska struktura.....	4
1.1.3. Replikacijski ciklus.....	6
1.1.4. Metode detekcije.....	9
1.1.5. Epidemiologija.....	11
1.1.6. Klinička slika infekcije.....	12
1.1.7. Patogeneza.....	13
1.1.8. Imunosna obrana domaćina i mehanizmi izbjegavanja imunosnog odgovora.....	14
<b>1.2. Virusne populacije</b> .....	16
<b>1.3. Antivirusni lijekovi</b> .....	17
1.3.1. Liječenje infekcije ljudskim citomegalovirusom.....	19
1.3.2. Rezistencija ljudskog citomegalovirusa na antivirusnu terapiju.....	20
<b>1.3.3. Laboratorijske metode za praćenje virusnih mutacija</b> .....	21
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	24
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	
<b>3.1. Ispitanici</b> .....	25
<b>3.2. Biološki uzorci</b> .....	25
<b>3.3. Reagensi i otopine</b>	
3.3.1. Reagensi i otopine za izolaciju virusne DNA.....	28
3.3.2. Reagensi i otopine za lančanu reakciju polimerazom.....	28
3.3.3. Reagensi i otopine za sekvenciranje.....	29
<b>3.4. Uređaji, računalni programi i potrošni materijal</b>	
3.4.1. Uređaji.....	30
3.4.2. Računalni programi.....	30
3.4.3. Potrošni materijal.....	30
<b>3.5. Metode</b>	
3.5.1. Izolacija virusne DNA.....	31
3.5.2. Lančana reakcija polimerazom.....	32
3.5.3. Određivanje nukleotidnog slijeda genskih regija UL54 i UL97.....	33



3.5.4. Računalne metode .....	35
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1. Detektirane mutacije u genskim regijama UL54 i UL97 .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3. Filogenetska analiza .....</b>	<b>45</b>
4.3.1. Filogenetska analiza genske regije UL54 .....	45
4.3.2. Filogenetska analiza genske regije UL97 .....	47
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>50</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>55</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>56</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>69</b>

## POPIS KRATICA

AIDS – sindrom stečene imunodeficijencije (eng. *acquired immunodeficiency syndrome*)

CDV – antivirusni lijek cidofovir (eng. *cidofovir*)

EC50 - polovina maksimalne efektivne koncentracije lijeka (eng. *half maximal effective concentration*)

EGFR – receptor epidermalnog čimbenika rasta (eng. *epidermal growth factor receptor*)

ELISA - enzimski imunosorbentni test (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

FOS – antivirusni lijek foskarnet (eng. *foscarnet*)

GC – glikoproteinski kompleks (eng. *glycoprotein complex*)

GCV – antivirusni lijek ganciklovir (eng. *ganciclovir*)

Gp – glikoprotein (eng. *glycoprotein*)

HCMV – ljudski citomegalovirus (human cytomegalovirus)

HSCT – transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (eng. *hematopoietic stem cell transplantation*)

IE – neposredno rani proteini (eng. *immediate-early*)

IFN- $\beta$  – interferon  $\beta$  (eng. *interferon beta*)

IFN $\gamma$  – interferon gama (eng. *interferon gamma*)

IL – interleukini (eng. *interleukins*)

IRS/TRS – kratko unutarnje/krajnje ponavljanje (*internal/terminal repeat short*)

MHC – glavni histokompatibilni kompleks (eng. *major histocompatibility complex*)

MIEP – glavni neposredno rani promotor (eng. *major immediate early promoter*)

MRA – eng. *Mutation resistance analyzer*

NCBI – nacionalni centar za biotehnoške informacije (*National Center for Biotechnology Information*)

NF- $\kappa$ B – transkripcijski čimbenik uključen u upalne i imunosne odgovore (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NK – prirodne stanice ubojice (eng. *natural killer cells*)

ORF – otvoreni okvir čitanja (eng. *open reading frame*)

PC – pentamerni kompleks (eng. *pentamer complex*)

PDGFR $\alpha$  – receptor trombocit-dobivenog čimbenika rasta  $\alpha$  (eng. *platelet-derived growth factor receptor alpha*)

SOT - transplantacija čvrstih (solidnih) organa (eng. *solid organ transplantation*)

TGF- $\beta$  – transformirajući čimbenik rasta (eng. *transforming growth factor  $\beta$* )

Th1 – T-stanice pomoćnice; stanice imunskog sustava koje aktiviraju limfocite B, makrofage i efektorne limfocite T (eng. *T helper cells*)

TLR2 – receptor koji ima ulogu u prepoznavanju patogena i aktivaciji urođenog imunskog odgovora (eng. *toll-like receptors 2*)

TNF- $\alpha$  – čimbenik tumorske nekroze (eng. *tumor necrosis factor*)

TRL/IRL – dugo krajnje/unutarnje ponavljanje (eng. *terminal/internal repeat long*)

UL – jedinstvena duga regija virusnog genoma (eng. *unique long*)

US – jedinstvena kratka regija virusnog genoma (eng. *unique short*)

vAC – kompleks za sklapanje virusnih čestica (eng. *viral assembly complex*)

VGCV – antivirusni lijek valganciklovir (eng. *valganciclovir*)

## 1. UVOD

### 1.1. Ljudski citomegalovirus

Ljudski citomegalovirus (human cytomegalovirus, HCMV), također poznat kao ljudski herpesvirus 5, pripada porodici *Herpesviridae* koja se dijeli na tri potporodice, a čini ju devet virusa koji mogu zaraziti čovjeka. Potporodicu *Alphaherpesvirinae* čine virusi herpes simplex 1 i 2 (HSV-1 i HSV-2) i virus varicella-zoster (VZV), potporodicu *Betaherpesvirinae* čine HCMV i ljudski herpes virusi 6A, 6B i 7 (HHV-6A, HHV-6B i HHV-7), dok potporodici *Gammaherpesvirinae* pripadaju Epstein-Barr virus (EBV) i ljudski herpes virus 8 (HHV-8) (Zarrouk i sur., 2017). Genom citomegalovirusa čini dvolančana linearna DNA duga 235000 parova baza (Hage i sur., 2017).

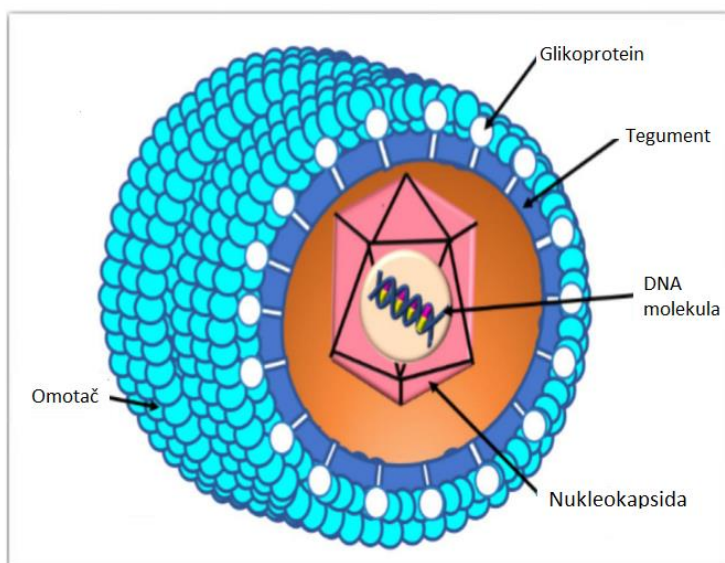
Prve studije vezane za HCMV datiraju iz 1881. godine, kada su njemački znanstvenici uočili intranuklearne inkluzije tipične za infekcije citomegalovirusom, misleći da predstavljaju protozoe. Nakon što su uzgojili viruse u staničnim kulturama, Weller, Smith i Rowe neovisno su izolirali i uzgajali CMV čovjeka i miševa u razdoblju od 1956.–1957. (Ho, 2008).

Virus je globalno prisutan te uzrokuje više morbiditeta i mortaliteta od bilo kojeg drugog herpesvirusa (Sezgin i sur., 2019). Procjenjuje se da je njime zaraženo između 30% i 100% populacije, ovisno o socio-ekonomskom statusu (Lee i Grey, 2020). Uzrokuje bolest u imunosuprimiranim populacijama poput osoba starije životne dobi, onkoloških bolesnika, pacijenata koji boluju od AIDS-a te novorođenčadi, dok je infekcija u imunokompetentnih osoba uglavnom asimptomatska i rijetko dovodi do nastanka bolesti (Britt i sur., 2018). Međutim, u niskom postotku imunokompetentnih osoba može doći do razvoja mononukleoze ili još rjeđe do drugih komplikacija kao što su artritis, ulcerozni kolitis, pneumonitis, hepatitis, aseptički meningitis i miokarditis (Nogalski i sur., 2014). Otprilike 10% novorođenčadi zaražene virusom HCMV ima simptomatsku infekciju dok ostali nemaju kliničke manifestacije. Oko 40-60% novorođenčadi sa simptomatskom infekcijom će imati trajne posljedice, od kojih je najčešća sensorineuralni gubitak sluha, zatim kognitivni poremećaj, retinitis i cerebralna paraliza. Manji postotak asimptomatske novorođenčadi će razviti navedene trajne posljedice (Fowler i Boppana, 2006).

Vilibić-Cavlek i sur. (2017) su u Hrvatskoj, u periodu od 2013.-2015. proveli seroepidemiološko istraživanje kojim se testirala prisutnost CMV IgG i IgM antitijela koristeći metodu ELISA (enzim-vezani imunosorbentni test, eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Seroprevalencija je iznosila 74.4 % za CMV antitijela IgG i 4.3 % za CMV antitijela IgM. Značajne razlike seroprevalencije IgG su uočene između različitih populacijskih skupina gdje su najmanji postotak antitijela imali djeca i adolescenti (54.6%), zatim odrasli (77.2%), a pacijenti na hemodijalizi su imali najveći postotak (91.4%). Seroprevalencija se nije značajno razlikovala između muškaraca i žena kao ni između stanovnika urbanih područja u odnosu na one iz prigradskih/ruralnih područja (Vilibić-Cavlek i sur., 2017).

### 1.1.1. Virusna čestica

Virusna čestica ljudskog citomegalovirusa promjera je 200 do 300 nm, a sastoji se od dvolančane linearne molekule DNA obavijene ikozaedarskom nukleokapsidom koja je omotana proteinima tegumenta te dvoslojnom lipidnom ovojnicom s glikoproteinima (slika 1) (Seedah i sur., 2014).



**Slika 1.** Struktura čestice ljudskog citomegalovirusa (preuzeto i prilagođeno prema Hasan i sur., 2021).

Ikozaedarska kapsida triangulacijskog broja 16 sadrži 60 asimetričnih jedinica, a svaku jedinicu čini 16 velikih kapsidnih proteina (*major capsid protein*, MCP), 16 najmanjih kapsidnih proteina (*smallest capsid protein*, SCP), 5 tripleksa (Ta, Tb, Tc, Td i Te) i 1/3 Tf tripleksa. Pet ili šest velikih kapsidnih proteina tvori pentamer ili heksamer koji je naknadno podijeljen na peripentonalne središnje i rubne heksone (Liu i sur., 2020).

Tegument je amorfni sloj smješten između nukleokapside i omotača, izgrađen je od različitih proteina, a sadrži i molekule mRNA (mRNA UL21.5, mRNA UL109, mRNA IRL4, mRNA IRL7) (Terhune i sur., 2004). Proteini tegumenta se direktno ispuštaju u citoplazmu domaćina te pospješuju sazrijevanje novih virusnih čestica i njihovu prilagodbu u novom staničnom okolišu (Wang i Zhao, 2020).

Vanjska ovojnica virusa HCMV sadrži mnogo proteina, s najmanje četiri različite vrste kovalentno vezanih glikoproteinskih kompleksa potrebnih za infektivnost, životni ciklus virusa, prihvaćanje i ulazak u različite vrste stanica (Gardner i Tortorella, 2016):

- a) glikoproteinski kompleks I (GCI, eng. *glycoprotein complex I*) čini gB oligomer
- b) glikoproteinski kompleks II (GCII) čini gM/gN dimer
- c) glikoproteinski kompleks III (GCIII) čini gH/gL/gO trimer
- d) pentamerni kompleks (PC, eng. *pentamer complex*) čini gH/gL/UL128/UL130/UL131 pentamer (Sandonis i sur., 2020)

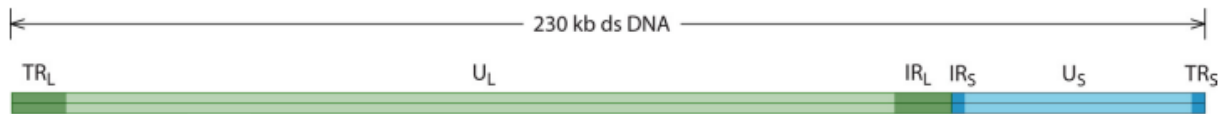
Proteinima omotača pripadaju i gpRL13 (RL13), gp1 (UL1), gp42 (UL132), gpTRL10 (RL10) te gp48 (UL4). Glikoprotein gpRL13 (RL13) se veže na konstantni fragment IgG (Fc $\gamma$ ), gp1 (UL1) pospješuje rast virusa u epitelnim stanicama, ali ne i u fibroblastima, gp42 (UL132) utječe na rast virusa u fibroblastima (Wang i Zhao, 2020), potreban je za staničnu endocitozu virusa te je potvrđeno da je optimalna replikacija ljudskog citomegalovirusa u korelaciji s endocitozom glikoproteina gp42. Proteinima gpTRL10 (RL10) i gp48 (UL4) još nije poznata funkcija, ali je za gp48 utvrđeno da nije esencijalan za replikaciju HCMV-a u staničnim kulturama (Fogliolini i sur., 2019).

### 1.1.2. Genomska struktura

Genom virusa HCMV čini dvolančana DNA molekula duga 235 kb te shodno tome HCMV ima najduži genom od svih herpesvirusa i jedan od najdužih genoma ljudskih virusa uopće (Sijmons i sur., 2015).

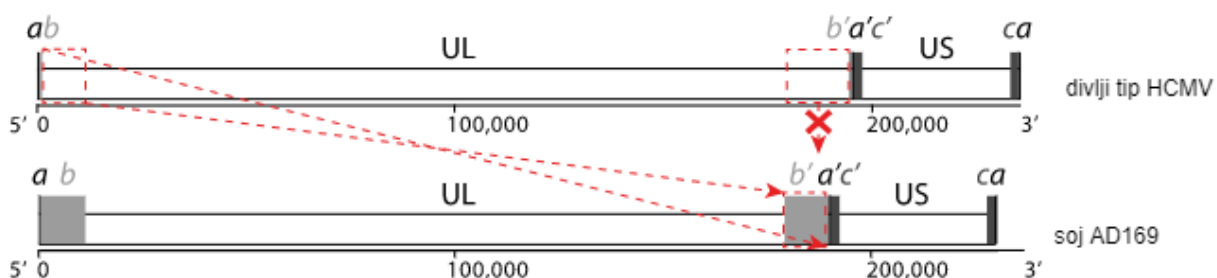
Genomska struktura svih herpesvirusa se može podijeliti na šest glavnih razreda (A, B, C, D, E i F) koji se međusobno razlikuju. Genom razreda A se sastoji od jedinstvene sekvencije omeđene izravnim ponavljanjem, dok genom razreda B također ima izravno ponovljene sekvencije na krajevima, ali one se sastoje od varijabilnog broja kopija tandemski ponavljajuće sekvencije od 0.8-2.3 kbp. Genomska struktura razreda C je derivat razreda B i osim terminalnog seta ponavljanja posjeduje i unutarnji set ponavljajućih sekvencija. Genom razreda D se sastoji od dvije jedinstvene regije koje se nazivaju jedinstvena duga i jedinstvena kratka regija (eng. *unique long* UL i *unique short* US) omeđene parom obrnutih ponavljanja, dugim krajnjim/unutarnjim ponavljanjem i kratkim unutarnjim/krajnjim ponavljanjem (eng. *terminal/internal repeat long* TRL/IRL i *internal/terminal repeat short* IRS/TRS). Regija UL je prisutna u jednoj orijentaciji, a regija US u dvije i genom se javlja u obliku dva izomera. Razred F se razlikuje od svih ostalih razreda genoma herpesvirusa budući da ne posjeduje ni obrnuta niti izravna ponavljanja sekvencija (Davison, 2007).

Genomska arhitektura koju posjeduje HCMV pripada razredu E budući da se sastoji od dvije jedinstvene regije UL i US koje su omeđene parom obrnutih ponavljanja TRL/IRL i IRS/TRS (slika 2). Ta dva seta ponavljanja dijele zajedničku regiju od nekoliko stotina parova baza koja je nazvana “a sekvencija” dok su ostale regije ponavljanja označene kao “b sekvencija” i “c sekvencija”. Inverzijom UL i US regija, genom se javlja u obliku četiri izomera koji mogu biti prisutni u jednakim koncentracijama (Sijmons i sur., 2015).



**Slika 2.** Struktura genoma ljudskog citomegalovirusa. Dva seta jedinstvenih regija (jedinstvena duga (UL) i jedinstvena kratka (US) regija) su omeđena parom obrnutih ponavljanja (terminalno (TR) i unutarnje (IR) ponavljanje) (preuzeto iz Lurain i Chou, 2010).

Početna istraživanja su vršena na laboratorijski adaptiranim sojevima HCMV gdje se došlo do saznanja da sojevi AD169 i *Towne*, pasažirani dugo u staničnim linijama ljudskih fibroblasta, uzrokuju vrlo nisku virulenciju ili uopće ne uzrokuju simptome. S druge strane, laboratorijski adaptirani soj *Toledo* koji je pasažiran znatno kraće, uzrokuje simptome mononukleoze. Daljnjim istraživanjima, analizom genoma ovih sojeva te njihovom usporedbom otkriveno je da su sojevi AD169 i *Towne* izgubili segmente od 15 kb i 13 kb u genomu. Ovi segmenti, smješteni na 3' kraju UL regije i zamijenjeni invertiranom kopijom 5' kraja UL regije, nazivaju se UL/b' segmenti. Budući da je UL/b' segment prisutan u nekoliko dodatnih kliničkih izolata kao *Toledo*, zaključeno je da je upravo taj dio jedno od najvažnijih obilježja sojeva divljeg tipa HCMV. Segment UL/b' sadrži čimbenike esencijalne za virulenciju *in vivo* (slika 3) (Sijmons i sur., 2015).



**Slika 3.** Genom HCMV klase E. UL i US predstavljaju jedinstvenu dugu i kratku regiju, a, b i c sekvencije se odnose na ponavljajuće regije dok a', b' i c' predstavljaju obrnute sekvencije. Sekvencije ab i b'a' predstavljaju dugo krajnje/unutarnje ponavljanje (TRL/IRL, eng. *terminal/internal repeat long*), a sekvencije a' c' i ca predstavljaju kratko unutarnje/krajnje ponavljanje (IRS/TRS, eng. *internal/terminal repeat*). Gornja slika predstavlja organizaciju genoma divljeg tipa virusa HCMV. Donja slika predstavlja organizaciju genoma laboratorijski-prilagođenog soja AD169. Crvene isprekidane linije predstavljaju preuređivanje genoma (deleciju 3' kraja te njegovu zamjenu obrnutom kopijom 5' kraja) koje je posljedica dugoročnog pasažiranja (preuzeto i prilagođeno prema Sijmons i sur., 2015).

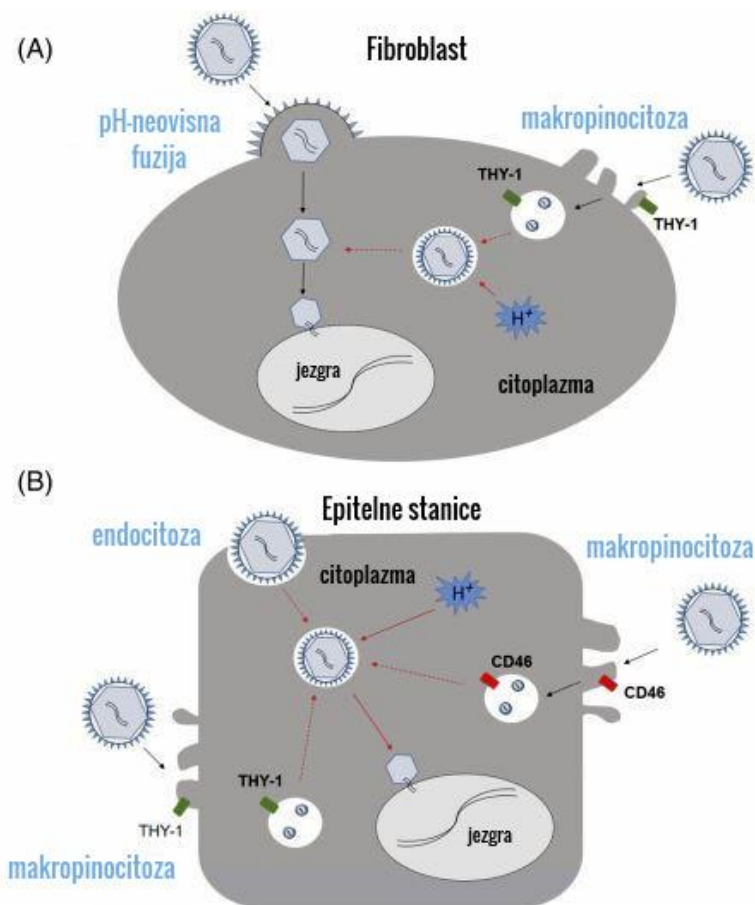


Genom virusa HCMV ima preko 200 otvorenih okvira čitanja, a ekspresija gena je slična kao i u ostalim herpesvirusima (Sijmons i sur., 2014). Vremenska kaskada ekspresije gena se sastoji od neposredno ranih (IE, eng. *immediate early*), ranih (E, eng. *early*) i kasnih gena (L, eng. *late*). Neposredno rani geni se ekprimiraju prilikom ulaska virusa u jezgru, a imaju ulogu transkripcijskih regulatora i potrebni su za ekspresiju sljedeće kaskade gena, odnosno ranih gena uključenih u virusnu replikaciju. Kada započne replikacija virusne DNA, ekprimiraju se kasni geni koji kodiraju za virusne strukturne proteine kao i proteine potrebne za sklapanje novih virusnih čestica (Lurain i Chou, 2010).

### 1.1.3. Replikacijski ciklus

Virus HCMV pokazuje širok stanični tropizam te tijekom infekcije, u ovisnosti od prirode stanice koju inficira, koristi različite mehanizme ulaska u stanicu domaćina. Ključnu ulogu u ovom procesu imaju glikoproteinski kompleksi GCI, GCII i GCIII (Nguyen i Kamil, 2018). Tijekom infekcije fibroblasta, inicijalno prihvaćanje virusne čestice za stanicu je posredovano vezanjem heterodimera gM/gN i glikoproteina gB za heparan sulfat proteoglikane. Nakon početnog prihvaćanja, ulazak virusa u stanicu je omogućen reakcijom gH/gL/gO s receptorom čimbenika rasta iz trombocita  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ , eng. *platelet-derived growth factor receptor alpha*) i integrinima kao i glikoproteina gB s receptorom epidermalnog čimbenika rasta (EGFR, eng. *epidermal growth factor receptor*), PDGFR $\alpha$  i integrinima. Navedeni procesi su popraćeni fuzijom neovisnom o pH virionske ovojnice i stanične membrane (Gardner i Tortorella, 2016). Drugi način infekcije fibroblasta je put nalik makropinocitozi, odnosno fuzijski mehanizam ovisan o pH koji je opisan interakcijom staničnog proteina THY-1 (protein teret klatrin-neovisnih endocitičkih vezikula) i gB ili gH (slika 4a) (Sandonis i sur., 2020). Heterodimer gH/gL također čini kompleks s malim topivim proteinima UL128, UL130 i UL131a, nazvan pentamerni kompleks (PC, eng. *pentamer complex*) koji je karakterističan za ulazak u epitelne, endotelne, monocitne i dendritičke stanice na dva moguća načina, a to su endocitoza i ulazak nalik makropinocitozi (Nguyen i Kamil, 2018). Nakon inicijalnog prepoznavanja, PC se veže za receptor Nrp2 (neuropilin 2), što potiče endocitozu. Makropinocitoza je posredovana interakcijom staničnog proteina CD46 (klaster diferencijacije, eng. *cluster of differentiation 46*) ili THY-1 s gB ili gH (slika 4b). Fuzija virusne ovojnice sa

staničnom membranom je ovisna o pH te je posredovana djelovanjem gB i gH/gL/gO (Sandonis i sur., 2020).



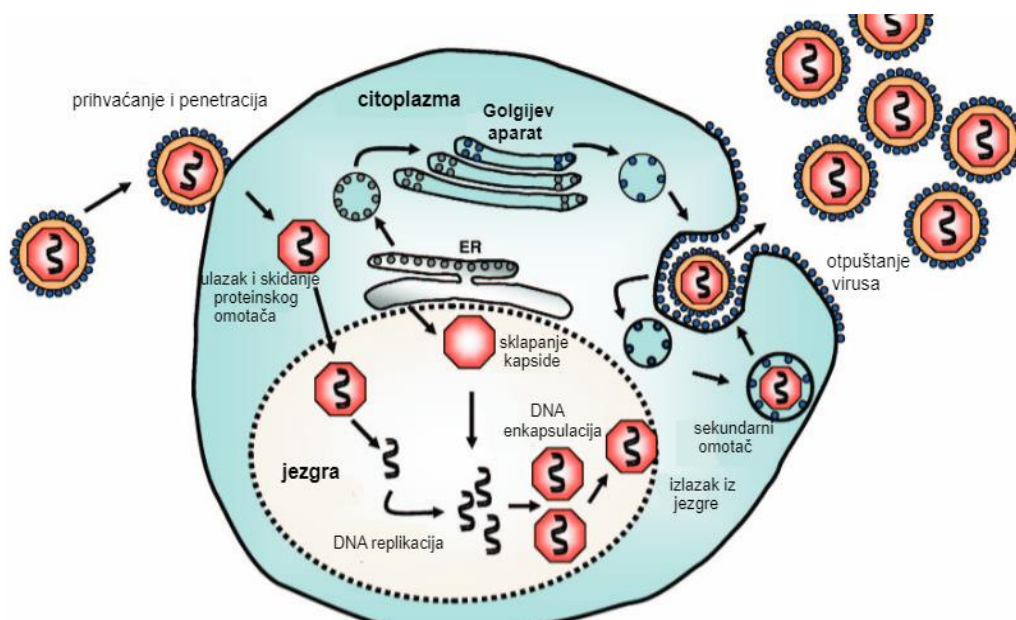
**Slika 4.** Mehanizam ulaska ljudskog citomegalovirusa u stanice: A) ulazak u fibroblaste je posredovan fuzijom neovisnom o pH virionske ovojnice i stanične membrane pri čemu bitnu ulogu imaju gB i gH/gL/gO, ali i fuzijom ovisnom o pH (makropinocitoza) međudjelovanjem staničnog proteina THY-1 s gB ili gH; B) za ulazak u epitelne stanice karakterističan je PC kompleks, a posredovan je endocitozom (vezanjem PC za receptor Nrp2) i makropinocitozom (interakcijom staničnog proteina CD 46 ili THY-1 s gB ili gH) (preuzeto i prilagođeno prema Sandonis i sur., 2020).

Ulaskom viriona u stanicu kapsida se otpušta u citoplazmu i putem mitohondrija prenosi do jezgrine ovojnice gdje se virusna DNA izbacuje u jezgru. Genom se tada cirkularizira i inicira se ekspresija gena pri čemu nastaju tri vrste proteina: neposredno rani, rani i kasni, čime se potiče litička virusna infekcija (Beltran i Cristea, 2014). Cirkularizirane virusne DNA molekule služe kao kalupi za DNA replikaciju i umnažaju se koristeći theta ( $\theta$ ) mehanizam replikacije. Ovaj korak je

popraćen replikacijom kotrljajućeg kruga kojom nastaju konkatemeri genoma (Ligat i sur.,2018). Umnažanje genoma se odvija nakon ekspresije ranih gena i prije ekspresije kasnih gena. Sinteza virusne DNA zasniva se na aktivnosti ori<sub>LYt</sub> promotora, a četiri fosfoproteina kodirana regijom UL112-113 (pp34, pp43, pp50 i pp84) djeluju na pre-replikativna mjesta u blizini jezgrenog tjelešca ND10 (eng. *nuclear domain 10*) i tako formiraju virusni replisom (Zarrouk i sur., 2017). Proteini replikacijske mašinerije su pUL54 (DNA polimeraza), pUL44 (čimbenik procesivnosti DNA polimeraze), pUL57 (protein koji se veže za jednolančanu DNA), pUL70 (primaza), pUL102 (čimbenik koji djeluje s primazom) i pUL105 (helikaza) (Wang i Zao, 2020). Uloga kompleksa helikaza-primaza je odmatanje DNA molekule, dok UL57 pridonosi lakšem odvajanju i sprječava ponovno spajanje lanaca tijekom sinteze DNA molekule. Kompleks UL54-UL44 sintetizira vodeći lanac od početnice. Replikacija virusne DNA rezultira nastankom dugih konkatemernih struktura koje sadrže četiri izomerne sekvencije od kojih se svaka pakira u kapsidu s jednakom efikasnošću. Nastali konkatemeri mogu služiti kao kalup za sljedeći replikacijski ciklus ili se cijepaju terminazama i pakiraju (Zarrouk i sur., 2017).

Mjesno-specifično cijepanje se odvija na sekvencijama bogatim adeninom ili timinom unutar motiva *pac* ('*cis-djelujući signal za pakiranje*') smještenog u sekvenciji '*a*' krajnjih i unutrašnjih ponavljajućih regija. Terminazni kompleks, kojeg čine UL56 i UL89 (posjeduju nukleazne i ATPazne aktivnosti) te proteini UL51, prepoznaje sekvencije *pac* na konkatemernoj DNA molekuli i čini prvo specifično cijepanje pri čemu nastaje slobodni kraj na kojem se inicira pakiranje molekule. Terminazni kompleks se tada veže za jedinstveno mjesto prazne prokapside kroz koje je DNA translocirana. Drugim mjesno-specifičnim cijepanjem, nakon što je u prokapsidu translocirana jedinica duljine genoma, završava se pakiranje (Ligat i sur.,2018). Sastavljanje virusnih čestica HCMV odvija se u dvije faze. Prva faza se odvija u jezgri gdje se stvara kapsida koja obavlja DNA te novonastala nukleokapsida putuje do unutarnje jezgrine membrane s kojom se stapa (Lv i sur., 2019). Pupanjem na unutarnjoj jezgrinoj membrani nastaje virionska čestica s primarnim omotačem u perinuklearnom prostoru. Novonastala čestica s primarnim omotačem zatim fuzionira s vanjskom jezgrinom ovojnicom te otpušta nukleokapsidu u citoplazmu (Marschall i sur., 2020). U drugoj fazi bitnu ulogu ima stvaranje odjeljka za sastavljanje čestica u citoplazmi. Ovaj odjeljak, nazvan kompleks za sklapanje (eng. *assembly complex*, AC), predstavlja mjesto konačnog sazrijevanja čestica te dodavanja glavnog tegumenta (Smith i sur., 2014). U citoplazmi nukleokapsida dobiva proteine tegumenta i kao takva pupa u specifične vezikule koje

potječu od trans-Golgijeve mrežice, ranog endosoma ili autofagosoma. Unutar vezikula nastaju zreli virioni sa sekundarnim omotačem i nastale vezikule fuzioniraju s plazmatskom membranom te ispuštaju zrele virione u vanstanični okoliš (Lv i sur., 2019). Životni ciklus virusa u ljudskoj stanici prikazan je na slici 5.



**Slika 5.** Životni ciklus ljudskog citomegalovirusa u zaraženoj stanici (preuzeto i prilagođeno prema Crough i Khanna, 2009).

#### 1.1.4. Metode detekcije

Dijagnostika ljudskog citomegalovirusa se temelji na molekularnim (lančana reakcija polimerazom; PCR) i nemolekularnim metodama (antigenemija, stanična kultura, histopatologija i serologija) detekcije. Antigenemija je kvantitativni test koji se temelji na upotrebi monoklonalnih antitijela usmjerenih na virusni antigen pp65 koji se eksprimira u leukocitima tijekom rane faze replikacijskog ciklusa HCMV. Svjetlosnom ili florescentnom mikroskopijom se određuje broj stanica pozitivnih na pp65 po ukupnom broju leukocita (Dioverti i Razonable, 2016). Detekcija virusa HCMV u staničnim kulturama bazirana je na umnažanju virusa u staničnoj kulturi ljudskih

fibroblasta. U konvencionalnoj kulturi stanica se svjetlosnim mikroskopom uočava karakterističan citopatski učinak karakteriziran žarištima ravnih, uvećanih stanica, dok se u modificiranoj staničnoj kulturi koriste monoklonalna antitijela usmjerena na neposredno rane virusne antigene što se detektira imunoflorescencijom (Razonable i sur., 2020). Histopatologijom se, uporabom mikroskopa, detektiraju citopatske promjene u uzorcima tkiva, ali i antigeni HCMV. Histološki uzorci se boje bojom hematoksilin-eozin što omogućava uočavanje velikih stanica s tipičnim unutarstaničnim virusnim inkluzijama (“oči sove”), a imunohistokemijskim metodama se detektiraju antigeni HCMV u uzorcima tkiva (Dioverti i Razonable, 2016). Serološke metode se koriste za detekciju antitijela IgG i IgM, a najčešće korišteni test je ELISA. Testovi za detekciju antitijela IgM imaju nisku specifičnost za primarnu infekciju iz razloga što se IgM antitijela zadržavaju nekoliko mjeseci nakon primarne infekcije te su prisutna tijekom reaktivacije. Iz tog razloga su zastupljeniji testovi avidnosti antitijela IgG koji mogu pomoći u razlikovanju primarne infekcije od reaktivacije. Antitijela IgG niskog aviditeta (niskog afiniteta za antigen) se stvaraju u početku primarne infekcije te tijekom vremena i sazrijevanjem imunološkog odgovora dolazi do porasta aviditeta (Ross i sur., 2011).

Lančana reakcija polimerazom je najčešće korištena dijagnostička metoda, a bazira se na umnažanju i detekciji virusnih nukleinskih kiselina. Metoda je brza i visoko osjetljiva, a HCMV DNA se može izolirati iz uzoraka pune krvi, leukocita, plazme te tjelesnih tekućina. Iako je u upotrebi kvalitativna metoda PCR koja pouzdano detektira DNA HCMV u uzorku, zastupljenija je kvantitativna metoda koja je standardizirana te daje podatak o količini prisutnog virusa u uzorku. Kvantitativna metoda, koja daje podatak o broju kopija virusa po mililitru uzorka, ima velik klinički značaj budući da je relevantna metoda za praćenje antivirusne terapije, razvoja bolesti, ali i razlikovanja litičke i latentne faze virusa (velik broj kopija virusa označava litičku infekciju). Iako je molekula DNA glavni cilj umnažanja i detekcije reakcijom PCR, često se detektira i molekula RNA metodom RT-PCR (lančana reakcija polimeraze reverznom transkriptazom, eng. *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*). Budući da do transkripcije i proizvodnje molekula mRNA dolazi samo za vrijeme aktivne infekcije, ova metoda je pouzdana za detekciju litičke HCMV infekcije. Međutim, RNA molekula je jako nestabilna te se lako razgrađuje što za posljedicu ima nisku osjetljivost metode RT-PCR (Dioverti i Razonable, 2016).

### 1.1.5. Epidemiologija

Ljudski citomegalovirus je globalno rasprostranjen i procjenjuje se da inficira više od 50% ljudske populacije (Nogalski i sur., 2014), ali nisu uočene sezonske varijacije kao ni epidemije (Kalenić, 2013). Seroprevalencija raste s godinama, ali uvelike ovisi o socio-ekonomskom statusu i geografskom području kao i higijenskim uvjetima. Prevalencija antitijela IgG, koja predstavljaju prošlu infekciju, ovisi o socio-ekonomskom statusu te u odraslih osoba iznosi oko 60% u razvijenim zemljama, a 100 % u zemljama u razvoju. Virus se prenosi bliskim kontaktom, a najčešći putevi prijenosa su preko sline, urina, majčinog mlijeka, spolnim kontaktom, transfuzijom krvi i transplantacijom organa ili krvotvornih matičnih stanica (Gökçe, 2020). Primarnom načinu širenja virusa bliskim kontaktom sa slinom ili drugim tjelesnim tekućinama koje sadrže infektivni virus pridonosi i činjenica da dojenčad obično izlučuju značajne količine virusa HCMV mjesecima i godinama nakon infekcije. Starija djeca i odrasli su također skloni izlučivanju velikih količina virusa dulje vrijeme (>6 mjeseci) nakon primarne infekcije. Značajnu ulogu u visokoj učestalosti kongenitalnih i perinatalnih infekcija HCMV ima stopa seroprevalencije žena u fertilnom razdoblju (Fowler i Boppana, 2006). Otprilike 2% žena koje su bile seronegativne prilikom ulaska u trudnoću postaju seropozitivne do porođaja. Među ženama koje dobiju primarnu infekciju tijekom trudnoće, u 32% slučajeva virus se prenosi preko placente te uzrokuje infekciju unutar maternice koja u 20 % slučajeva uzrokuje ozbiljne bolesti u novorođenčeta. Fetus se može inficirati i reaktivacijom latentnog virusa majke ili ponovnom infekcijom majke novim sojem virusa, a postotak kongenitalne infekcije u ovim slučajevima iznosi 1%. Prilikom transplantacije čvrstih organa, seropozitivni donori u otprilike 78% slučajeva prenese infekciju HCMV seronegativnim recipijentima, dok seropozitivni recipijenti u otprilike 40% slučajeva prođu kroz reaktivaciju latentne faze virusa tijekom imunosupresivne terapije (Griffits i sur., 2014). Kod alogene transplantacije krvotvornih matičnih stanica 30% recipijenata razvija bolest HCMV, dok je kod autologne transplantacije taj postotak znatno niži, a iznosi 5%. U recipijenata alogenih krvotvornih matičnih stanica u najvećem su riziku za razvoj bolesti HCMV-u izloženi seropozitivni recipijenti (Azevedo i sur., 2015).

### 1.1.6. Klinička slika infekcije

Infekcija virusom HCMV je u zdravih, imunokompetentnih osoba uglavnom asimptomatska i rijetko dovodi do nastanka bolesti, no u otprilike 10% slučajeva može doći do razvoja mononukleoznog sindroma koji se klinički ne razlikuje od infektivne mononukleoze uzrokovane Epstein-Barr-ovim virusom (EBV). Međutim, tijekom infekcije HCMV rjeđe se javljaju faringitis, adenopatija i splenomegalija, dok su najčešći simptomi groznica, malaksalost, mijalgija, glavobolja i umor (Nogalski i sur., 2014). Kod malog broja imunokompetentnih osoba mogu se javiti druge komplikacije poput artralgijske i artritisa, ulceroznog kolitisa, pneumonitisa, hepatitisa, aseptičnog meningitisa i miokarditisa (Crough i Khanna, 2009). Budući da je infekcija virusom HCMV u zdravih pojedinaca uglavnom asimptomatska, to predstavlja veliki zdravstveni problem zbog visoke stope kongenitalne infekcije HCMV. Simptomatsku infekciju pokazuje otprilike 10% novorođenčadi s infekcijom cCMV (kongenitalna CMV infekcija, eng. *congenital CMV-infection*) od kojih 40-60% razvije trajne posljedice poput sensorineuralnog gubitka sluha (najčešća posljedica), kognitivnog poremećaja, retinitisa i cerebralne paralize. Asimptomatska infekcija se javlja u otprilike 90% novorođenčadi s cCMV infekcijom, ali također imaju mogućnost razvoja bolesti povezanih s infekcijom HCMV. Otprilike 10-15% asimptomatske novorođenčadi će razviti sensorineuralni gubitak sluha, dok su retinitis i kognitivni poremećaj zastupljeni u dosta manjem postotku (Fowler i Boppana, 2018). Najčešće kliničke manifestacije novorođenčadi s infekcijom cCMV su petehija, žutica, petehijalni osip, hepatosplenomegalija, mikrocefalija, polimikrogirija, ventrikulomegalija, korioretinitis, intrakranijalna kalcifikacija i sensorineuralni gubitak sluha. Dugoročne posljedice su gubitak sluha, oštećenje vida, mentalna retardacija i cerebralna paraliza, a ukupna stopa smrtnosti iznosi 4-8% (smrtno posljedice se najčešće javljaju kod nedonoščadi ili novorođenčadi s poremećajima imunološkog sustava) (Gökçe, 2020). Do perinatalne HCMV infekcije dolazi tijekom porođaja izlaganjem virusu prisutnom u genitalnom traktu majke, putem transfuzije krvi ili dojenjem. U zdravog novorođenčeta, perinatalna infekcija HCMV je uglavnom asimptomatska i bez ozbiljnih posljedica, dok u nedonoščeta takva infekcija može dovesti do razvoja sepse (Boppana i sur., 2013). U transplantiranih pacijenata, primarna infekcija HCMV može imati teže posljedice od reaktivacije virusa ili reinfekcije. Najčešći simptomi bolesti HCMV u pacijenata s transplantacijom čvrstih organa su groznica, malaksalost, bol u zglobovima, leukopenija i makularni osip, a također može doći i do ozbiljnijih posljedica kao

što su pneumonitis, gastrointestinalna ulceracija, oštećenje jetre, gljivične i bakterijske infekcije te oštećenje i/ili odbacivanje transplantata. Najčešća posljedica infekcije HCMV u pacijenata s transplantacijom matičnih stanica je intersticijska pneumonija koja pridonosi visokom mortalitetu, čak više od 50%. Visoka stopa smrtnosti u pacijenata s transplantacijom je posljedica kasnog pojavljivanja bolesti HCMV. U imunokompromitiranih pacijenata zaraženih virusom HIV, bolest HCMV se najčešće (~85%) manifestira u obliku retinitisa. Infekcija virusom HCMV predstavlja velik problem za pacijente zaražene virusom HIV jer direktno i/ili indirektno ubrzava progresiju u bolest AIDS i smrt (Crough i Khanna, 2009).

### **1.1.7. Patogeneza**

Nakon ulaska virusa kroz sluznicu orofarinksa ili genitalnog trakta, dolazi do razvoja infekcije, a inkubacija traje 4-8 tjedana. Infekcija je perzistena, tj. trajna kao i u ostalih herpesvirusa zbog mogućnosti izbjegavanja imunskih odgovora domaćina i uspostavljanja latentne faze. Virus se umnožava i uglavnom neopaženo širi, i uz prisutnost humoralnih antitijela, od stanice do stanice, limfocitima i leukocitima te može dospjeti u različite organe. Nakon primarne infekcije, virus prelazi u latentnu fazu u CD34+ mijeloidnim progenitorskim stanicama te se održava u stanicama mijeloidne linije. Reaktivacije su česte u imunokompromitiranih bolesnika, a vironoše mogu, nakon primarne infekcije, izlučivati virus iz ždrijela i bubrega mjesecima, pa i godinama (Kalenić, 2013). U imunokompromitiranih osoba, kao što su pacijenti koji boluju od sindroma AIDS te osobe s transplantacijom čvrstih organa ili krvotvornih matičnih stanica, infekcija virusom HCMV može imati jako patogen učinak i dovesti do razvoja raznih bolesti. Mehanizam patogeneze ovih bolesti se može okarakterizirati kao kombinacija tri čimbenika: 1) povišene razine proupalnih citokina koji potiču diferencijaciju latentno inficiranih stanica te reaktivaciju virusa, 2) imunosupresije koja omogućava virusnu replikaciju i umnažanje, 3) direktnih ili indirektnih oštećenja, posredovanih virusom ili domaćinskim imunitetom, koja mogu uzrokovati akutnu ili kroničnu bolest (Knipe i Howley, 2007). Imunopatogeneza infekcije HCMV je okarakterizirana nastankom autoimunosti na tri načina: 1) proizvodnjom autoantitijela – pojava virusnih epitopa koji su strukturno slični domaćinskim staničnim antigenima (molekularna mimikrija) te se njihovom prezentacijom



pomoću stanica APC (antigen-prezentirajuće stanice, eng. *antigen-presenting cells*) aktiviraju limfociti B i T (sistemski lupus, sistemska skleroza), 2) povećanjem upale – nespecifični imunski odgovor na HCMV koji potiče otpuštanje vlastitih antigena i citokina iz oštećenog tkiva te dolazi do prezentacije vlastitih antigena stanicama APC i aktivacije autoreaktivnih limfocita T (multipla skleroza, reumatoidni artritis, sistemski lupus, sistemska skleroza, juvenilni artritis), 3) vaskularnim oštećenjem potaknutim dugotrajnom infekcijom HCMV – otpuštanje endotelnih antigena i citokina potiče aktivaciju autoreaktivnih limfocita T i B pri čemu su endotelni antigeni izloženi napadu autoantitijela (arteroskleroza, reumatoidni artritis, ateroskleroza) (Gugliesi i sur., 2021).

### **1.1.8. Imunosna obrana domaćina i mehanizmi izbjegavanja imunskog odgovora**

Primarna infekcija HCMV inducira snažne urođene i adaptivne anti-virusne imunski odgovore. U početnom koraku urođenog imunskog odgovora dolazi do prepoznavanja virusa, odnosno vezanja virusnih površinskih glikoproteina gB i gH za receptore TLR2 (eng. *toll-like receptors* 2) što za posljedicu ima aktivaciju signalnih puteva koji potiču proizvodnju pro-upalnih citokina u dendritičnim stanicama ili makrofagima. Lučenje pro-upalnih citokina (INF $\alpha/\beta$ , IL-12, IL-15, IL-18) aktivira prirodne stanice ubojice (NK, eng. *natural killer cells*) koje izlučuju citokine (IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) te na taj način potiču citolizu stanica inficiranih virusom ili zaustavljaju virusnu replikaciju (Manandhar i sur., 2019).

Adaptivni imunski sustav, koji podrazumijeva humoralnu (limfociti B i proizvodnja antitijela) i staničnu (limfociti T) imunost, uvelike pospješuje obranu i specifičnost protiv HCMV. Aktivacijom limfocita B potiče se proizvodnja antitijela na HCMV. Dva osnovna cilja neutralizirajućih antitijela su gB koji je ključan za stanično prihvaćanje i penetraciju te gH potreban za fuziju virusnog omotača i stanične membrane domaćina. Tijekom primarne infekcije antitijela imunoglobulin M (IgM) se proizvode brzo i traju 3-4 mjeseca, dok antitijela imunoglobulin G (IgG) ostaju cijeli život (Crough i Khanna, 2009).

Staničnu imunost čine CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfociti T koji na svojoj površini imaju receptore TCR (receptor limfocita T, eng. *T cell receptor*). Ovi receptori prepoznaju virusne peptide prezentirane

pomoću MHCI i MHCII (glavni histokompatibilni kompleks, eng. *major histocompatibility complex*) molekula, na antigen-prezentirajućim stanicama. Limfociti T CD4<sup>+</sup> specifični za HCMV počinju cirkulirati otprilike 7 dana nakon početka replikacije, dok se limfociti T CD8<sup>+</sup> specifični za HCMV pojavljuju kasnije (Manandhar i sur., 2019). Tijekom infekcije, populacije limfocita T se mijenjaju i diferenciraju te mogu biti prisutni naivni, efektorski i memorijski limfociti T. Naivni CD8<sup>+</sup> limfociti T se diferenciraju u citotoksične limfocite T (CTL, eng. *cytotoxic T lymphocytes*) koji proizvode velike količine efektornih molekula kao što su IL-2 (interleukin-2), IFN- $\gamma$  (interferon gama), TNF- $\alpha$  (čimbenik tumorske nekroze, eng. *tumor necrosis factor*), perforin i granzim B što dovodi do citolize inficirane stanice. Naivni CD4<sup>+</sup> limfociti T se diferenciraju u Th1 stanice (T-stanice pomoćnice, eng. *T helper cells*) koje proizvode velike količine IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  i na taj način posreduju aktivaciji CD8<sup>+</sup> T-limfocitnim i B-limfocitnim odgovorima (Vieira Braga i sur., 2015). Ciljni proteini CD8<sup>+</sup> T-limfocitnog odgovora su pp65, pp50 i glikoproteini IE-1 i IE-2, dok CD4<sup>+</sup> T-limfocitni odgovor prepoznaje virusne proteine pp65, glikoproteine B i H, IE72, IE86 i UL69. Nakon neutralizacije patogena, limfociti T specifični za HCMV se diferenciraju u memorijske stanice i pružaju zaštitu prilikom reinfekcije (Blyth i sur., 2016).

Virus evoluirao zajedno sa svojim domaćinskim organizmom tijekom godina i unatoč robusnom imunom odgovoru domaćina, virus je sposoban uspostaviti latenciju i doživotno se zadržati u domaćinu. Borba između imunog odgovora i virusa se nastavlja tijekom cijelog života domaćina budući da je HCMV razvio brojne mehanizme izbjegavanja imunog odgovora. Više od 40 genskih produkata HCMV ima ulogu u moduliranju imunostane obrane i većina njih su homolozi domaćinskih gena uključenih u obranu organizma (Patro, 2019). Specifični produkti virusa mogu negativno djelovati na odgovore urođene imunosti kao što su interferonski odgovori i odgovori stanica NK. Virusni protein pp65 sprječava transkripciju gena za interferonski odgovor što dovodi do ometanja puta NF $\kappa$ B i signaliziranja INF $\alpha$ . Mnogi virusni produkti smanjuju količinu liganada koji se vežu za aktivirajuće receptore na površini NK stanica na način da ih degradiraju ili zadržavaju unutar stanice ili pak kodiraju za stanične homologe koji imaju ulogu negativnih liganada te dovode do supresije djelovanja NK stanica (Wills i sur., 2015). Nekoliko gena kodiranih s HCMV mogu ometati MHCI i MHCII procesiranje i prezentaciju antigena kako bi stanice inficirane s HCMV ostale neprepoznate od strane limfocita T i zaštićene od citolize. Genski klaster virusa US2-11 ima bitnu ulogu u ovom procesu, a djeluje na zadržavanje molekula MHCI i MHCII

unutar endoplazmatskog retikula, preusmjeravanje molekula MHC za degradaciju te sprječavanje prijenosa peptida putem transportera TAP (transporter povezan s procesiranjem antigena, eng. *transporter associated with antigen processing*) (Jackson i sur., 2017). Virus također kodira za imunosupresivni homolog IL-10 koji djeluje kao inhibitor Th1 citokina (IFN- $\gamma$  i IL-2) i sprječava proizvodnju upalnih citokina što dovodi do smanjene ekspresije površinskih molekula MHCII i smanjene prezentacije antigena CD4<sup>+</sup> limfocitima T. Virus izbjegava imunski odgovor i proizvodnjom proteina koji djeluju kao receptori za upalne citokine te tako smanjuju učinkovitost citokina (Wills i sur., 2015).

## 1.2. Virusne populacije

Virusi su podložni čestim mutacijama, a njihova sposobnost da razviju *de novo* raznolikost pridonosi boljoj adaptaciji u novom domaćinu ili u novom okruženju. Točkaste mutacije i rekombinacije su najčešći mehanizmi promjene genetičkog materijala. Stopa mutacije je definirana kao mogućnost prijenosa promijenjene genetičke informacije na potomstvo. Mutacije su posljedica grešaka tijekom replikacije, oštećenja nukleinskih kiselina ili uređivanja genetskog materijala domaćinskim proteinima ili specijaliziranim molekularnim sustavima. Stope mutacija su više u RNA virusa u usporedbi s DNA virusima iz razloga što je tijekom replikacije molekule RNA potrebna RNA polimeraza koja nema mogućnost provjere i ispravaka grešaka za razliku od DNA polimeraze. Veća stopa mutacija je također uočena u virusa koji imaju jednolančani genom kao i u manjim virusnim genomima (Sanjuán i Domingo-Calap, 2016). Rekombinacija je mehanizam izmjene genetskih dijelova između različitih virusnih genoma, a javlja se u stanicama koje su koinficirane s barem dvije različite populacije virusa. Homolognom rekombinacijom se genetski materijal izmjenjuje između regija s homolognim sekvencijama, dok se nehomolognom rekombinacijom ta izmjena događa između različitih genomskih regija. Rearanžmani su poseban oblik rekombinacije koji je prisutan u virusa koji imaju segmentirane genome, a temelji se na izmjeni cijelih genomskih segmenata što za posljedicu ima potomstvo s novim kombinacijama segmenata (Stern i Andino, 2016). Virusnim mutacijama stvara se genetička raznolikost na koju djeluju sile različitog učinka, odnosno prirodna selekcija i genetičko pomjeranje (genetički *drift*). Pozitivna selekcija je proces kojim genotip ili skup genotipova postaje dominantan u populaciji

koja evoluirala kao rezultat posjedovanja pozitivnih fenotipskih obilježja. Negativnom selekcijom se eliminira genotip ili genotipovi koji posjeduju negativne fenotipske karakteristike jer se teži njihovom uklanjanju iz populacije. Selekcija je dominantna u velikim populacijama, dok je u malim populacijama češća pojava genetičkog pomjeranja, odnosno nasumična i slučajna promjena u frekvenciji gena jedne generacije u odnosu na drugu, u istoj populaciji. Genetičkim pomjeranjem može doći do potpunog gubitka nekih alela što pridonosi smanjenju genetske raznolikosti populacije, ali i do visoke učestalosti štetnih alela u populaciji (Domingo i sur., 2012).

Kratki replikacijski ciklusi, velika količina novih virusnih čestica oslobođena iz jedne stanice domaćina te neprecizne virusne polimeraze pridonose brzom evoluciji i adaptaciji virusa u odgovoru na selektivni pritisak. Virusi su skloni razvoju rezistencijskih mutacija kao odgovor na antivirusnu terapiju, a njihov razvoj se odvija postepeno (Müller i Kräusslich, 2009). Virusna populacija, prije uvođenja terapije, sadrži varijante koje su spontanom mutacijama razvile otpornost na antivirusnu terapiju. Takve varijante su prisutne u niskom udjelu budući da rezistencijske mutacije, u odsutnosti selektivnog pritiska, negativno djeluju na stopu replikacije. Kada se naknadno uvede antivirusna terapija koja ne suprimira u potpunosti virusnu replikaciju, najčešće zbog suboptimalne doze lijeka, takve varijante postaju favorizirane te selektirane. Rezistentne varijante se repliciraju u prisustvu suboptimalne doze lijekova što rezultira stvaranjem i selekcijom novih aminokiselinskih supstitucija koje mogu poboljšati sposobnost replikacije i povećati rezistenciju. Na ovaj način se stvaraju velike populacije visoko rezistentnih virusa koji imaju visoku stopu replikacije (Komatsu i sur., 2014).

### **1.3. Antivirusni lijekovi**

Antivirusni lijekovi se koriste za liječenje virusne infekcije ili kao prevencija razvoja infekcije. Lijekovi mogu biti specifični za virus kao i pružati širok spektar djelotvornosti na različite vrste virusa, a cilj im je spriječiti razvoj virusa. Lijekovi mogu imati dva načina djelovanja na virus, odnosno mogu biti dizajnirani da direktno djeluju na virus ili na čimbenike domaćinske stanice u kojoj se virus replicira. Direktno djelujući lijekovi uključuju inhibitore prihvatanja, ulaska, skidanja omotača virusa, zatim inhibitore virusnih enzima (polimeraze, proteaze, integraze) te nukleozidne i nukleotidne inhibitore reverzne transkriptaze (Kausar i sur., 2021). Inhibitori

virusnih enzima su često korišteni u liječenju, a mehanizam djelovanja se temelji na analozima supstrata ili alosteričkim komponentama. Najčešće korišteni inhibitori polimeraza su nukleozidni analozi koji se u stanici modificiraju dobivanjem trifosfatne skupine te tako aktivirani natječu s deoksiribonukleotidima za aktivno mjesto polimeraze i ugradnju u nastajući lanac nukleinske kiseline. Prva fosforilacija lijeka je posredovana virusnom kinazom, a dvije naknadne staničnim kinazama. Budući da analozi nemaju 3' OH skupinu, nije moguće vezanje sljedećeg nukleotida i time dolazi do prekida sinteze lanca nukleinske kiseline. Drugi način djelovanja na polimeraze je alosteričkim komponentama koje dovode do promjene konformacije enzima van aktivnog mjesta. Virusne proteaze su također dobro okarakterizirane pa su time često cilj antivirusnih lijekova, a mehanizam djelovanja se temelji na uobičajenom virusnom proteolitičkom cijepanju poliproteina virusnim proteazama čime se stvaraju funkcionalne jedinice. Proteazni inhibitori su najčešće supstratni analozi koji oponašaju peptidnu vezu, no ona se ne može pocijepati, a omeđena je strukturnim elementima koji imaju iste karakteristike kao srodna mjesta cijepanja (Müller i Kräusslich, 2009). Integrazni inhibitori pripadaju skupini antiretroviralnih lijekova koji sprječavaju umetanje virusne DNA u DNA domaćina čime virus osigurava svoju replikaciju. Lijekovi koji sprječavaju prihvaćanje virusa na stanicu temelje se ne ometanju vezivanja virusnih proteina za receptore na površini stanice domaćina. Ometanje ulaska virusa u stanice je posljedica korištenja inhibitora fuzije koji sprječavaju konformacijske promjene kakve pogoduju membranskoj fuziji, dok je skidanje omotača virusa cilj lijekovima koji stabiliziraju kapsidu i teže njenom očuvanju. Nukleozidni i nukleotidni inhibitori reverzne transkriptaze su analozi endogenih nukleozida i nukleotida, a koriste se za liječenje retrovirusne infekcije (HIV). Analozi se moraju aktivirati fosforilacijom staničnim kinazama i fosfotransferazama kako bi nastali trifosfatni derivati sposobni za virusnu inhibiciju. Trifosfatni oblici se natječu s endogenim deoksinukleoznim trifosfatima za ugrađivanje reverznom transkriptazom. Na ovaj način se prekida sinteza virusnih transkripata, a samim time i sinteza proviralne DNA te njene ugradnje u genom domaćina (Vardanyan i Hruby, 2016).

### 1.3.1. Liječenje infekcije ljudskim citomegalovirusom

Prvu liniju terapije lijekovima čine ganciklovir (*ganciclovir*, GCV) ili njegov prolijek valganciklovir (*valganciclovir*, VGCV) koji se prvo moraju aktivirati fosforilacijom kako bi djelovali na HCMV (Sedlak i sur., 2013). Ganciklovir, analog deoksigvanozina, je prvi odobreni lijek za liječenje infekcije HCMV. Nakon ulaska u zaražene stanice, GCV se selektivno fosforilira pomoću HCMV fosfotransferaze (produkt gena UL97), a nakon toga stanične kinaze imaju ulogu u dodatnoj fosforilaciji GCV monofosfata pretvarajući ga u aktivni trifosfatni oblik. Tako aktivirani GCV se natječe s deoksigvanozin trifosfatom za aktivno mjesto virusne DNA polimeraze (produkt gena UL54) prilikom sinteze virusne DNA molekule. Ako se fosforilirani GCV ugradi u rastući lanac dolazi do zaustavlja produženja DNA lanca te djeluje kao snažni inhibitor DNA polimeraze HCMV (Piret i Boivin, 2019). Daje se oralno, intravenozno ili kao očni implantat za liječenje retinitisa izazvanog virusom HCMV, a zbog niske bioraspoloživosti GCV (~6%) tijekom oralne primjene razvijen je njegov prolijek VGCV s 10 puta većom bioraspoloživošću (Piret i Boivin, 2014). Drugu liniju terapije lijekovima čine foscarnet (*foscarnet*, FOS) i cidofovir (CDV) koji ne zahtijevaju aktivaciju virusnom fosfotranferazom. Foscarnet je odobren kao lijek za HCMV infekciju na temelju njegove učinkovitosti u liječenju HCMV retinitisa kod pacijenata koji boluju od sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS) i koristi se kao alternativni lijek za HCMV infekciju nakon transplantacije. Koristi se samo parenteralno budući da je njegova oralna apsorpcija slaba. Foscarnet je analog pirofosfata te na taj način inhibira funkciju HCMV DNA polimeraze. Pričvrsti se za vezujuće mjesto pirofosfata, blokira cijepanje pirofosfata dolazećeg nukleozid trifosfata te tako dolazi do prekida sinteze HCMV DNA. Foscarnet se najčešće koristi prilikom HCMV bolesti koje su rezistentne ili otporne na ganciklovir, ali često dovodi do bubrežne disfunkcije taloženjem kristala foscarneta u lumenu glomerularnih kapilara (Meesing i Razonable, 2018). Cidofovir je ciklički analog citidin monofosfata koji difosforilacijom pomoću staničnih kinaza prelazi u aktivni oblik. Tako aktivirani oblik cidofovira se ugrađuje u virusnu DNA i dovodi do prekida sinteze DNA lanca. Kao i FOS, CDV se koristi kao alternativni lijek kod GCV-rezistentnih sojeva virusa i pokazuje nefrotoksičnost (Frange i Leruez-Ville, 2018).

### 1.3.2. Rezistencija ljudskog citomegalovirusa na antivirusnu terapiju

Dostupni antivirusni lijekovi se koriste za liječenje infekcije HCMV te kao prevencija razvoja infekcije nakon transplantacije, ali virusnim mutacijama su se razvile i HCMV varijante otporne na terapiju antivirusnim lijekovima koje su karakterizirane nezadovoljavajućim padom virusnog titra (Razonable, 2018). Glavni čimbenici pojave HCMV rezistencije na antivirusnu terapiju su trajanje izloženosti terapiji i stalna virusna replikacija kao posljedica suboptimalne doze lijeka ili imunosupresije. Pacijenti s transplantacijom imaju najveći rizik za razvoj rezistencije, a učestalost mutacija odgovornih za rezistenciju na lijekove (DRM, eng. *drug resistance mutations*) u primatelja transplantata iznosi 5-12% ovisno o skupini proučavanih pacijenata (López-Aladid i sur., 2019).

Rezistencijske mutacije virusa HCMV se javljaju u genima za virusnu fosfotransferazu (UL97) i virusnu DNA polimerazu (UL54). Otpornost na lijek GCV/VGCV je posljedica mutacija nastalih u oba gena budući da u aktivaciji lijeka GCV ulogu ima fosfotransferaza, a njegov cilj je DNA polimeraza (Gilbert i Boivin, 2005). Rezistenciji na lijekove CDV i FOS pridonose isključivo mutacije u genu UL54 na koji navedeni lijekovi djeluju. S obzirom na to da je fosfotransferaza ključna za virusnu replikaciju, rezistencijske mutacije u genu UL97 koje pružaju otpornost na GCV su točkaste mutacije ili male delecije u konzerviranim regijama enzima odgovornim za fosforilaciju lijeka, ali ne utječu na biološku funkciju samog enzima. Aminokiselinske supstitucije i male delecije prisutne u kodonima 460 i 520 te regiji 590-607 djeluju na ATP vezujuće mjesto i mjesto prepoznavanja supstrata (James i Prichard, 2011). Najčešće aminokiselinske supstitucije u regiji UL97 koje uzrokuju rezistenciju na GCV su A594V, L595S, M460V/I, H520Q, C592G i C603W. Sve ove mutacije povećavaju GCV EC50 (polovina maksimalne efektivne koncentracije lijeka, eng. *half maximal effective concentration*) vrijednosti 5 do 15 puta, osim mutacije C592G koja povećava vrijednost 3 puta (Chou, 2015).

Mutacije u genu virusne DNA polimeraze UL54 doprinose rezistenciji na bilo koji lijek koji djeluje kao inhibitor polimeraze HCMV odnosno ganciclovir, cidofovir i foskarnet. Rezistencija se obično javlja zbog mutacije u regiji UL97 koja pridonosi smanjenoj aktivaciji lijeka, a dodatne UL54-mutacije pridonose višoj razini rezistencije na GCV te unakrsnoj rezistenciji na lijekove druge linije terapije CDV i FOS (Lurain i Chou, 2010). Za razliku od

poznatih kanonskih rezistencijskih mutacija u regiji UL97, unutar regije UL54 nema karakterističnih, kanonskih mutacija, već postoje razni klasteri mutacija u određenim funkcionalnim domenama koje pokazuju rezistencijski fenotip (Chou, 2015). Mutacije regije UL54 pridonose rezistenciji na tri načina, ovisno o lokaciji mutacije: smanjenjem afiniteta enzima za lijek, smanjenjem ugradnje lijeka u DNA lanac i pojačanim izrezivanjem lijeka iz nastajućeg DNA lanca. Kod nastanka FOS-rezistencije, moguć je samo prvi mehanizam (Hakki i Chou, 2011).

### **1.3.3. Laboratorijske metode za praćenje virusnih mutacija**

Dva tipa testova koji se koriste za određivanje rezistencijskih mutacija virusa su fenotipski i genotipski testovi. Fenotipske metode su prve razvijene u svrhu identifikacije i karakterizacije mutacija, a temelje se na određivanju koncentracije lijeka potrebne za smanjenje virusnog rasta. Najčešća fenotipska metoda određivanja osjetljivosti HCMV na lijekove je test smanjenja plaka (PRA, eng. *plaque reduction assay*) pri čemu se inokulum kliničkog izolata umnaža u staničnoj kulturi u prisustvu različitih koncentracija lijeka (Göhring i sur., 2015). Nakon 7-14 dana inkubacije se određuje IC<sub>50</sub> (50%-tna inhibitorna koncentracija, eng. 50% *inhibitory concentration*), odnosno koncentracija lijeka koja smanjuje rast virusnih plakova za 50% (Lurain i Chou, 2010). Ostale fenotipske metode se također temelje na kulturi stanica i princip je isti kao i s testom PRA, ali virusna produkcija se mjeri metodama baziranim na imunoflorescenciji, imunoperoksidazi, ELISA testu ili protočnoj citometriji kako bi se detektirale i kvantificirale stanice koje eksprimiraju antigene HCMV (neposredno rani, rani ili kasni) (Campos i sur., 2016). Test DNA-DNA hibridizacije je još jedna fenotipska metoda koja koristi radioaktivno označene probe specifične za HCMV DNA, a IC<sub>50</sub> se određuje pomoću smanjenja radioaktivnosti za 50% u usporedbi s kontrolnim uzorcima (Lurain i Chou, 2010). Fenotipski testovi zahtijevaju mnogo vremena te nisu dovoljno osjetljivi za detekciju niske razine rezistencije kao ni malih rezistentnih subpopulacija. Zbog toga su danas sve češće u upotrebi genotipske metode iako su za njihovu validaciju potrebni fenotipski testovi (Campos i sur., 2016).

Genotipski testovi su brži budući da se rade direktno na kliničkim uzorcima bez potrebe za staničnim kulturama što smanjuje pristrasni odabir i povećava pouzdanost, a dizajnirani su tako da detektiraju mutacije u genima za koje se zna da sadrže mutacije koje pružaju otpornost na lijekove.



Najčešća genotipska metoda za detekciju rezistentnih HCMV varijanti je Sangerovo sekvenciranje gena UL97 i UL54, umnoženih lančanom reakcijom polimeraze (Lurain i Chou, 2010). Danas je u upotrebi automatizirana Sangerova metoda koja se temelji na korištenju dideoksinukleotida obilježenih molekulom fluorofora koji nakon što se ugrade prekidaju sintezu lanca budući da nisu sposobni stvoriti fosfodiestersku vezu sa sljedećim nukleotidom. Ugradnjom dideoksinukleotida emitira se signal da je zadnji nukleotid inkorporiran, a zatim se kapilarnom elektroforezom nastale molekule raspoređuju prema molekularnoj masi. Rezultati se prikazuju u obliku kromatograma s različitim bojama za svaku bazu. Međutim, ova metoda ima slabiju osjetljivost za uzorke koji imaju virusnu koncentraciju manju od 1000 HCMV kopija/ml te ima smanjenu mogućnost detekcije mutacija koje su prisutne u manje od 10%-20% virusne populacije (Chou, 2020). Sekvenciranje nove generacije (NGS, eng. *Next Generation Sequencing*) omogućava detekciju rezistencijskih mutacija u ranijim stadijima, odnosno pruža mogućnost detekcije malih virusnih subpopulacija (1%-3%). Za interpretaciju dobivenih sekvencija je dostupan bioinformatički alat MRA (analizator rezistencijskih mutacija, eng. *Mutation Resistance Analyzer*) koji uspoređuje dobivene sekvencije s bazom podataka koja sadrži sve objavljene mutacije u genima UL97 i UL54 (Campos i sur., 2016). Dostupne su još dvije genotipske metode koje su manje zastupljene, a to su polimorfizam duljine restrikcijskog fragmenta (RFLP, eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*) i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu. Restrikcijska analiza se temelji na promjenama u sekvencijama koje prepoznaje restrikcijska endonukleaza u PCR produktima ciljnih gena. Ove promjene rezultiraju povećanjem ili gubitkom restrikcijskih mjesta, a detekcija mutacija je omogućena cijepanjem PCR produkata restrikcijskim endonukleazama te usporedbom s kontrolom divljeg tipa na agaroznoj gel elektroforezi. Koristi se samo za poznate mutacije regije UL97 budući da su u ovoj regiji prisutne kanonske mutacije te je puno kraća u odnosu na regiju UL54 (Göhring i sur., 2015). Za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu se koriste fluorescentno obilježene hibridizirajuće probe za svako specifično mjesto mutacije, a umnažanjem ciljnih gena u PCR uređaju se u stvarnom vremenu prate promjene krivulje taljenja uzrokovane mutacijama (Lurain i Chou, 2010). Iako su genotipske metode jednostavnije, brže i osjetljivije, njihova mana je to što ne mogu razlikovati prirodne polimorfizme od rezistencijskih mutacija. U tu svrhu se koristi rekombinantno fenotipiziranje koje se temelji na uvođenju mutacije, koja potencijalno uzrokuje rezistenciju, u virus poznate osjetljivosti na antivirusnu terapiju te se provodi fenotipska analiza rezistencije. U bakterijske umjetne kromosome (BAC, eng. *bacterial artificial*

*chromosome*) se uklonira HCMV soj divljeg tipa (Chou, 2020). U specifičnim sojevima *E. coli* je kontrolirana rekombinacija između HCMV BAC i PCR produkta koji sadrži željenu nepoznatu mutaciju te umnažanje HCMV mutanata. Rezultirajuća mutirana BAC DNA se zatim transfecira u staničnu kulturu fibroblasta i umnaža nakon čega se fenotipski analizira, najčešće metodom smanjenja plaka (Göhring i sur., 2015).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U svrhu detekcije rezistencijskih mutacija, koje pružaju otpornost na liječenje dostupnim antivirusnim lijekovima ganciklovirom, valganciklovirom, cidofovirom i foskarnetom, potrebno je odrediti slijed nukleotida regija UL97 i UL54 genoma ljudskog citomegalovirusa. Budući da kod analiziranih virusnih populacija u početku nisu detektirane rezistencijske mutacije, cilj rada bio je pratiti dinamiku njihovog pojavljivanja tijekom terapije te prirodu detektiranih mutacija. Osim biološki značajnih informacija o razvoju rezistencije na antivirusne lijekove, dobivene informacije značajne su i za, eventualnu prilagodbu terapije te mogu pomoći efikasnijem liječenju.

Specifični ciljevi istraživanja bili su:

- izolirati virusnu DNA iz po 14 uzoraka svakog od dvaju ispitanika sakupljenih u vremenskom periodu od 41, odnosno 176 dana
- metodom lančane reakcije polimerazom umnožiti genomske regije UL54 i UL97 ljudskog citomegalovirusa
- sekvenciranjem po Sangeru odrediti slijed nukleotida umnoženih regija
- analizom dobivenih sekvencija u algoritmu *Mutation resistance analyzer* (MRA) istražiti postoje li mutacije povezane s rezistencijom na antivirusne lijekove ganciklovir, valganciklovir, cidofovir i foskarnet
- izraditi filogenetsko stablo s ciljem utvrđivanja međusobne srodnosti analiziranih sekvencija dvaju ispitanika te njihove sličnosti s referentnim sekvencijama različitog geografskog podrijetla

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Ispitanici**

Istraživanje je provedeno na Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević” u Zagrebu. Uključena su dva ispitanika u kojih je prethodno potvrđena infekcija ljudskim citomegalovirusom. Prvi ispitanik (šifra CP) je muško dijete rođeno 25.5.2020. godine, dok je drugi ispitanik (šifra SD) muškarac rođen 1998. godine koji ima transplantirano srce. Ispitanik CP je liječen antivirusnim lijekovima ganciklovirom/valganciklovirom, dok je ispitanik SD terapiju započeo istim lijekovima, a koja je otprilike dva tjedna prije pojave rezistencije zamijenjena s foskarnetom.

#### **3.2. Biološki uzorci**

Uzorci ispitanika CP bili su različitog porijekla (plazma, urin, likvor, aspirat traheje i bronho-alveolarni lavat) te su prikupljeni u vremenskom razdoblju od 41 dana budući da viremija u ovog ispitanika nije padala tijekom terapije. Kod ispitanika SD prikupljeni su uzorci plazme te jedan uzorak likvora. Uzorci ovog ispitanika su prikupljeni u vremenskom razdoblju od 176 dana jer je tijekom terapije viremija padala, pa opet rasla zbog razvoja rezistencijskih mutacija. Uzorci krvi su prikupljeni u epruvete *Vacutainer* od 3,5 ml s antikoagulansom K3EDTA, centrifugirani pri 3500 okretaja u minuti te je odvojena plazma. Svi prikupljeni uzorci su pohranjeni pri -20°C do obrade. Ukupno je prikupljeno 14 uzoraka ispitanika CP te 14 uzoraka ispitanika SD (Tablice 1 i 2).

Viremija (broj kopija HCMV/ml) je određena pomoću testa COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV (Roche, Basel, Švicarska). Virusna DNA izolirana je korištenjem uređaja COBAS® AmpliPrep izolatora. Simultano PCR umnožavanje i detekcija ciljane DNA, kao i unutarnje kontrole QS (kvantitativni standard, eng. “Quantitative Standard”), je automatizirano COBAS® TaqMan® uređajem za umnožavanje DNA. Virusna DNA kvantificirana je usporedbom razlike između Ct vrijednosti (vrijednost praga ciklusa, eng. “cycling threshold”) virusnog uzorka i kvantitativnog standarda. U istraživanje su uključeni uzorci s viremijom većom od 1000 kopija HCMV/ml uzorka.

Korišteni uzorci, datumi uzorkovanja te viremija za svakog pojedinog ispitanika su prikazani u Tablici 1 i Tablici 2.

**Tablica 1.** Karakteristike uzoraka ljudskog citomegalovirusa ispitanika CP (novorođenče).

<b>Datum</b>	<b>Viremija (broj kopija HCMV/ml uzorka)</b>	<b>Vrsta uzorka</b>	<b>Oznaka nukleotidne sekvencije</b>
27.08.2020.	>10 000 000	urin	CMVCP1
27.08.2020.	>10 000 000	bronho-alveolarni lavat (BAL)	CMVCP2
28.08.2020.	7 291 885	plazma	CMVCP3
28.08.2020.	7 291 885	plazma	CMVCP4
28.08.2020.	1 585	likvor	CMVCP5
07.09.2020.	3 740 957	plazma	CMVCP6
08.09.2020.	3 498 513	urin	CMVCP7
08.09.2020.	25 654 820	aspirat traheje	CMVCP8
23.09.2020.	799 540	plazma	CMVCP9
23.09.2020.	>10 000 000	aspirat traheje	CMVCP10
23.09.2020.	558 490	urin	CMVCP11
07.10.2020.	291 617	urin	CMVCP12
07.10.2020.	70 972	plazma	CMVCP13
07.10.2020	15 495	aspirat traheje	CMVCP14

**Tablica 2.** Karakteristike uzoraka ljudskog citomegalovirusa ispitanika SD (pacijent s transplantatom srca).

<b>Datum</b>	<b>Viremija (broj kopija HCMV/ml uzorka)</b>	<b>Vrsta uzorka</b>	<b>Oznaka nukleotidne sekvencije</b>
02.01.2020.	3 308	plazma	CMVSD1
12.02.2020.	356 837	plazma	CMVSD2
28.02.2020.	196 440	plazma	CMVSD3
10.03.2020.	88 203	plazma	CMVSD4
08.04.2020.	2 481 361	plazma	CMVSD5
09.04.2020.	3 636	likvor	CMVSD6
24.04.2020.	6 046	plazma	CMVSD7
29.04.2020.	3 769	plazma	CMVSD8
07.05.2020.	8 901	plazma	CMVSD9
15.05.2020.	8 929	plazma	CMVSD10
26.05.2020.	3 500	plazma	CMVSD11
02.06.2020.	5 810	plazma	CMVSD12
10.06.2020.	1 282	plazma	CMVSD13
29.06.2020.	2 596	plazma	CMVSD14

### 3.3. Reagensi i otopine

#### 3.3.1. Reagensi i otopine za izolaciju virusne DNA

- Komplet reagensa za izolaciju virusne DNA *QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit (250)* (Qiagen, Hilden, Njemačka)
  - Proteaza (Proteinaza K) *QIAGEN*
  - Pufer za lizu (AL)
  - Pufer za ispiranje 1 (AW1)
  - Pufer za ispiranje 2 (AW2)
  - Pufer za oslobađanje DNA (AE)
- Etanol (96-100%)

#### 3.3.2. Reagensi i otopine za lančanu reakciju polimerazom

- Komplet reagensa za PCR *FastStart<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System* (Roche, Basel, Švicarska)
  - smjesa dNTP-ova (10 mM)
  - 10 x koncentriran reakcijski pufer koji sadrži 18 mM MgCl<sub>2</sub>
  - smjesa enzima *FastStart High Fidelity* (5U/μl) koja uključuje DNA polimerazu *FastStart Taq* i termostabilni protein s 3'-5' egzonukleaznom aktivnošću koji se aktiviraju zagrijavanjem pri 95°C
- uzvodne početnice UL541\_255\_F, UL542\_471\_F, UL543\_612\_F, UL544\_848\_F, UL971\_439\_F, UL972\_550\_F (tablica 3)
- nizvodne početnice UL541\_465\_R, UL542\_607\_R, UL543\_860, UL544\_1028\_R, UL971\_557\_R, UL972\_645\_R (tablica 3)
- autoklavirana i destilirana voda

**Tablica 3.** Nukleotidni sljedovi početnica za umnažanje regija UL54 i UL97 ljudskog citomegalovirusa lančanom reakcijom polimerazom (Sedlak i sur., 2013.)

NAZIV POČETNICE	REGIJA	NUKLEOTIDNI SLIJED	ORIJENTACIJA
UL541_255_F	UL541	5' GGTGCTCCGTGAATCGTTAC 3'	UZVODNA
UL542_471_F	UL542	5' CGGCCGCCACCAAGGTGTATATTG 3'	UZVODNA
UL543_612_F	UL543	5' CGTTGCTGTGTCACCTAACG 3'	UZVODNA
UL544_848_F	UL544	5' CGCGGTTTCATCAAAGACAAC 3'	UZVODNA
UL971_439_F	UL971	5' TGGCCGACGCTATCAAATTT 3'	UZVODNA
UL972_550_F	UL972	5' ATGTGCGGAGCTGTCGGCG 3'	UZVODNA
UL541_465_R	UL541	5' GTGAGAAGCCGAGGGAAAGG 3'	NIZVODNA
UL542_607_R	UL542	5' GCACCGTCGTACCTTTGCTGTAG 3'	NIZVODNA
UL543_860_R	UL543	5' AACACGGCTCTGAAAAG/ATTG 3'	NIZVODNA
UL544_1028_R	UL544	5' CACGCCGTATTTCTTGACTT 3'	NIZVODNA
UL971_557_R	UL971	5' CCCAGCGCCGACAGCTCCGAC 3'	NIZVODNA
UL972_645_R	UL972	5' CGACACGAGGACATCTTG 3'	NIZVODNA

### 3.3.3. Reagensi i otopine za sekvenciranje

- komplet reagensa za reakciju sekvenciranja *BigDye<sup>TM</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA)
  - reakcijska smjesa za Sangerovu dideoksi metodu sekvenciranja *BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Ready Reaction Mix* koja sadrži polimerazu *AmpliTaq<sup>®</sup> DNA*, svaki od dNTP-ova i fluorokromima označene ddNTPove
  - 5x pufer za sekvenciranje *BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 & v3.1*
- uzvodne početnice navedene u tablici 3
- nizvodne početnice navedene u tablici 3
- autoklavirana i destilirana voda
- 3 M natrijev acetat
- 100% etanol
- 70% etanol
- visokoionizirani formamid (Hi-Di)



- spremnik anodnog pufera (*Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series*) koji sadrži pufer za sekvenciranje (*running buffer*)
- spremnik katodnog pufera (*Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series*) koji sadrži pufer za sekvenciranje (*running buffer*)

### **3.4. Uređaji, računalni programi i potrošni materijal**

#### **3.4.1. Uređaji**

- uređaj za PCR *GeneAmp™ PCR System 9700* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- centrifuga *Sigma 3K30* (Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode am Harz, Njemačka)
- centrifuga 5430 (Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka)
- sekvenator *ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA)

#### **3.4.2. Računalni programi**

- program za analizu podataka dobivenih sekvenciranjem *DNA Sequencing Analysis* verzija 5.1 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA)
- računalni program za uređivanje sekvencija *Vector NTI* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- računalni program za izradu filogenetskih stabala *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis*
- bioinformatički algoritam za detekciju mutacija *Mutation resistance analyzer (MRA)*

#### **3.4.3. Potrošni materijal**

- automatske pipete (Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka)
- nastavci za automatske pipete (Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka)
- kolone s membranom od silikagela za koju se vežu nukleinske kiseline, *QIAamp Spin Columns* (Qiagen, Hilden. Njemačka)
- kolekcijske epruvete od 2 mL (Qiagen, Hilden. Njemačka)

- epruvete volumena 1,5 mL Eppendorf® (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- reakcijske epruvete volumena 0,2 mL s čepovima *MicroAmp*® (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA)
- set držača za pločice od 96 jažica *MicroAmp*®, *96-Well Tray/Retainer Set* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA)
- gumeni zatvarač za pločicu od 96 jažica (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA)

### 3.5. Metode

#### 3.5.1. Izolacija virusne DNA

Virusna DNA izolirana je korištenjem kompleta reagensa *QIAamp*® *DNA Blood Mini Kit* prema uputama proizvođača. U epruvetu od 1,5 ml dodala sam 20 µl Proteaze (Proteinaza K) *QIAGEN*, a zatim 200 µl uzorka. Nakon toga sam u epruvetu dodala i 200 µl pufera za lizu AL za razgradnju membrane kako bi se DNA molekula oslobodila, a proteinaza K denaturira proteine. Smjesu proteinaze K, uzorka i pufera AL sam miješala 15 sekundi na vrtložnoj mješalici te inkubirala 10 minuta pri 56°C da bi se osigurala efikasna liza stanica. Nakon inkubacije dodala sam 200 µl etanola (96-100%) i miješala 15 sekundi na vrtložnoj mješalici. Sadržaj epruvete sam prenijela na kolonu s membranom od silikagela *QIAamp Spin Column* postavljenu u epruvetu za sakupljanje uzorka od 2 ml i centrifugirala 1 minutu na 8000 rpm kako bi se virusna DNA vezala za membranu. Nakon toga sam kolonu *QIAamp Spin* prebacila u čistu epruvetu za sakupljanje uzorka, dodala 500 µl pufera za ispiranje 1 (AW1) te centrifugirala 1 minutu na 8000 rpm. Kolonu *QIAamp Spin* sam ponovno prebacila u čistu epruvetu za sakupljanje uzorka, dodala 500 µl pufera za ispiranje 2 (AW2) i centrifugirala 3 minute na 14000 rpm. Puferi za ispiranje koriste se za uklanjanje zaostalih „nečistoća“ poput proteinskih ostataka, soli, ugljikohidrata, RNA molekula te imaju ulogu u poboljšanju čistoće eluirane DNA, ali puferi sadrže etanol koji inhibira djelovanje polimeraze i onemogućava PCR. Kako bi se svi ostaci uklonili s kolone, prebacila sam je u čistu epruvetu za sakupljanje uzorka i centrifugirala pri 14000 rpm tijekom 1 minute. Zatim sam kolonu *QIAamp Spin* prebacila u novu epruvetu volumena 1,5 mL Eppendorf® za sakupljanje izolata i u nju dodala 100 µl pufera za oslobađanje DNA (pufer AE), uzorak sam inkubirala 1 minutu na sobnoj temperaturi kako bi se DNA otpustila s kolone, a zatim

centrifugirala 1 minutu na 8000 rpm. Izolate sam pohranila pri -18°C ili koristila odmah za lančanu reakciju polimerazom.

### 3.5.2. Lančana reakcija polimerazom

Za umnažanje dijela regija UL54 i UL97 genoma virusa HCMV koristila sam komplet reagensa *FastStart<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System*. Reagensi i njihove upotrijebljene količine navedene su u tablici 4.

**Tablica 4.** Sastav reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom

KOMPONENTA REAKCIJSKE SMJESE	KOLIČINA (μl)
smjesa dNTP (10 mM)	0,5
10 x reakcijski pufer s 18 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5
početnice UL541_255_F, UL542_471_F, UL543_612_F, UL544_848_F; UL971_439_F, UL972_550_F (50 mM)	0,2
početnice UL541_465_R, UL542_607_R, UL543_860_R, UL544_1028_R; UL971_557_R, UL972_645_R (50 mM)	0,2
smjesa enzima FastStart High Fidelity (5U/μl)	0,25
H <sub>2</sub> O	15,9
DNA kalup	5
<b>UKUPAN REAKCIJSKI VOLUMEN</b>	<b>25</b>

Reakcijsku smjesu sam izmiješala u epruvetama od 200 μl koje sam potom stavila u uređaj za PCR *GeneAmp PCR System* prema uvjetima umnažanja navedenim u tablici 5.

**Tablica 5.** Program umnažanja lančane reakcije polimerazom

umnažanje, 45 ciklusa						
KORAK	inicijalna denaturacija	denaturacija	vezanje početnica	produljenje lanca	završno produljenje lanca	hlađenje
<b>temperatura</b>	95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
<b>vrijeme</b>	2 min	30 s	30 s	60 s	7 min	∞

Nakon završetka reakcije, umnoženu DNA sam pohranila pri -18°C ili odmah koristila u reakciji sekvenciranja.

### 3.5.3. Određivanje nukleotidnog slijeda genskih regija UL54 i UL97

Za određivanje slijedova nukleotida umnožene DNA koristila sam komplet reagensa za reakciju sekvenciranja *BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit*. U epruvetu od 0,2 ml *MicroAmp<sup>®</sup>* dodala sam reakcijsku smjesu te početnice prema tablici 6. Regije su sekvencirane u dijelovima, regija UL54 podijeljena je na četiri (UL541 (255.-465. nt), UL542 (471.-607. nt) UL543 (612.-860. nt) i UL544 (848.-1028. nt)), a regija UL97 na dva dijela (UL971 (439.-557. nt) i UL972 (550.-645. nt)). Za svaki uzorak sam pripremila 12 reakcija (4 reakcije za regiju UL54 i 2 reakcije za regiju UL97 s uzvodnim, odnosno nizvodnim početnicama).

**Tablica 6.** Sastav smjese reagensa za reakciju sekvenciranja

<b>KOMPONENTA REAKCIJSKE SMJESE</b>	<b>KOLIČINA (μl)</b>
BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	0,5
5 x reakcijski pufer	2
početnice UL541_255_F, UL542_471_F, UL543_612_F, UL544_848_F; UL971_439_F, UL972_550_F ili UL541_465_R, UL542_607_R, UL543_860_R, UL544_1028_R; UL971_557_R, UL972_645_R (20x razrijeđene od 50 mM koncentracije)	0,6
H <sub>2</sub> O	5,9
razrijeđeni PCR produkt (10x za viremije do 10 000 kopija, 20x za viremije 10 000-100 000, 50x za viremije >100 000)	1
<b>UKUPAN REAKCIJSKI VOLUMEN</b>	<b>10</b>

Reakcija sekvenciranja provedena je u uređaju za PCR prema uvjetima navedenim u Tablici 7.

**Tablica 7.** Uvjeti umnažanja DNA za reakciju sekvenciranja

	<b>umnažanje, 25 ciklusa</b>			
<b>KORAK</b>	denaturacija	vezanje početnica	produljenje kanca	hlađenje
<b>temperatura</b>	96°C	50°C	60°C	4°C
<b>vrijeme</b>	10 s	5 s	55 s	∞

Nakon provedene reakcije sekvenciranja, umnožene fragmente DNA je potrebno pročistiti od neugrađenih ddNTP, dNTP i početnica. Pročišćavanje je provedeno pomoću etanola i natrijeva acetata. U svaku epruvetu sam dodala smjesu 3.0 M natrijeva acetata i 100% etanola u omjeru 1:25 te sam epruvete dobro zatvorila i miješala na vrtložnoj mješalici. Nakon toga, uzorke sam centrifugirala na 2000 x g tijekom 20 minuta. Odmah nakon centrifugiranja uklonila sam poklopce, na epruvete stavila papirnate ručnike te sam ih preokrenute centrifugirala na 150 x g jednu minutu. U epruvete sam potom dodala 150 µL hladnog 70% etanola, dobro promiješala i ponovno centrifugirala na 2000 x g u trajanju od 5 minuta. Kada je centrifugiranje završeno, uklonila sam poklopce, na epruvete stavila papirnate ručnike i preokrenute centrifugirala na 150 x g jednu minutu. Kako bi se uzorci denaturirali, koristila sam visoko deionizirani formamid. U svaki uzorak sam dodala 10 µL formamida, uzorke sam dobro promiješala i stavila u uređaj za PCR na 95°C u trajanju od 2 minute nakon čega su ohlađeni na 4°C. Epruvete s denaturiranim sekvencijskim produktima premjestila sam na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica, poklopila septom i stavila u uređaj *ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer*. Za kapilarnu elektroforezu korišten je POP-7 polimer i kapilara od 50 cm (3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array, 50 cm, Applied Biosystems™).

#### **3.5.4. Računalne metode**

U računalnom programu *Vector NTI* sam analizirala ukupno 165 dobivenih nukleotidnih sekvencija genomskih regija UL54 i UL97. Kromatograme dobivene korištenjem uzvodne i nizvodne početnice sam preklopila u sastavljenu sekvenciju, tzv. „contig“. Kromatograme sastavljenih sekvencija sam pregledala te ručno ispravila u slučaju postojanja pogrešaka. Uređene sekvencije sam kopirala u Notepad.

Za detekciju mutacija korišten je bioinformatički algoritam *Mutation resistance analyzer* (MRA). U algoritmu su dobivene sekvencije uspoređene s odgovarajućim referentnim sekvencijama, odnosno s ABV71585.1 za regiju UL54 i s Q6SW46.1 za regiju UL97. Na taj način su, na određenim lokusima, detektirane mutacije koje su u prethodnim istraživanjima okarakterizirane kao rezistencijske mutacije. U algoritmu su detektirani i razni polimorfizmi.

Dobivene sekvencije svake regije svakog ispitanika sravnila sam koristeći *CustalW* program unutar paketa *MEGA X* te ih pohranila u gensku banku. Za filogenetsku analizu sam sravnila dobivene sekvencije oba ispitanika, za svaku regiju posebno. Osim eksperimentalno

dobivenih sekvencija, za izradu filogenetskog stabla koristila sam i 15 referentnih genomskih sekvencija iz *NCBI* banke gena. Filogenetsko stablo sam konstruirala u računalnom programu MEGA X koristeći metodu najveće vjerojatnosti, General Time Reversible (GTR) evolucijski model (koristi se ukoliko se analiziraju vrlo slične sekvencije) te metodu samoučitanja sa 100 replika.

## **4. REZULTATI**

Iz uzoraka plazme, urina, likvora, aspirata traheje i bronho-alveolarnog lavata ispitanika koji je novorođenče (CP) i uzoraka plazme i likvora transplantiranog ispitanika (SD) je izolirana DNA HCMV i umnožena je reakcijom PCR te direktno podvrgnuta reakciji sekvenciranja. Budući da je viremija određena prije izolacije virusne DNA iz uzoraka, naknadne provjere izolacije i reakcije PCR nisu provedene, a uspješno dobivene sekvencije su dokaz uspješno izolirane te umnožene virusne DNA. Za početni uzorak likvora ispitanika CP u regiji UL544 (CP5UL544) te uzorak plazme 179. dan od početnog uzorkovanja ispitanika SD u regijama UL543 i UL544 (SD14UL543 i SD14UL544) nisu dobivene uspješne sekvencije.

Duljina sravnjenih sekvencija ispitanika CP iznosi: 537 nukleotida za regiju UL541, 358 nukleotida za regiju UL542, 645 nukleotida za regiju UL543, 497 nukleotida za regiju UL544, 293 nukleotida za regiju UL971 i 263 nukleotida za regiju UL972. U ispitanika SD duljina sekvencija iznosi: 473 nukleotida za regiju UL541, 338 nukleotida za regiju UL542, 645 nukleotida za regiju UL543, 504 nukleotida za regiju UL544, 276 nukleotida za regiju UL971 i 246 nukleotida za regiju UL972. Sravnjene sekvencije su pohranjene u GenBank pod pristupnim brojevima: MW366558-MW366627, MW400554-MW400595 i MW596419-MW596471.

### **4.1. Detektirane mutacije u genskim regijama UL54 i UL97**

Sekvencirane su regije UL54 i UL97 unutar kojih dolazi do razvoja rezistencijskih mutacija kao posljedica djelovanja antivirusnih lijekova na njihove produkte zbog selektivnog pritiska.

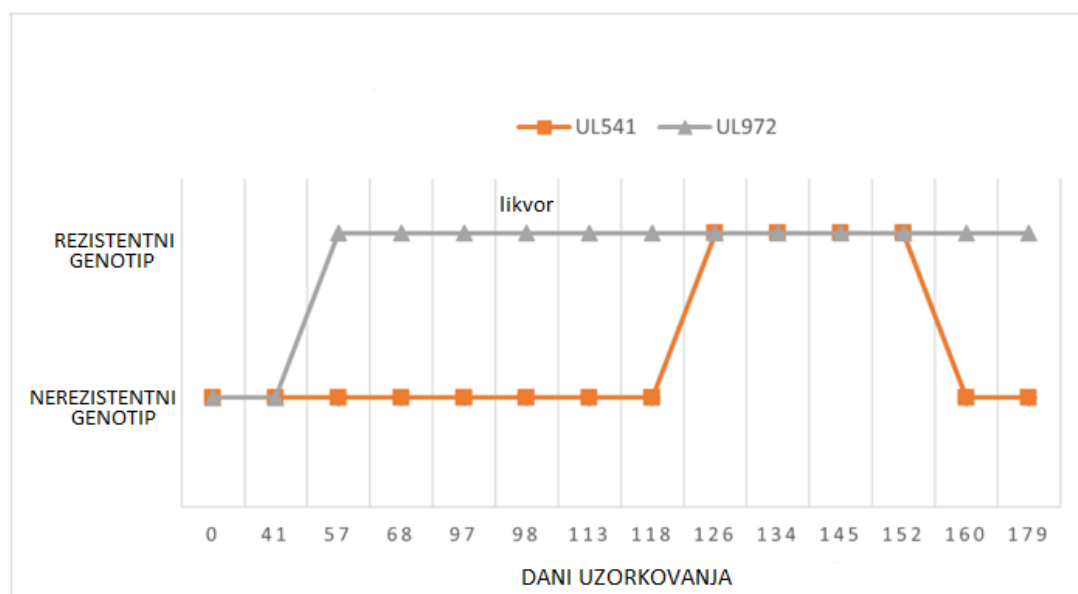
Dobivene sekvencije su u algoritmu MRA uspoređene s odgovarajućim referentnim sekvencijama- ABV71585.1 za regiju UL54 i Q6SW46.1 za regiju UL97. Detektirane su mutacije za koje se u prethodnim istraživanjima pokazalo da uzrokuju rezistenciju na antivirusne lijekove koji djeluju direktno (GCV, VGCV, FOS i CDV) kao i ostale prisutne mutacije.

Rezistencija na antivirusne lijekove je detektirana samo u uzorcima ispitanika SD (unutar regija UL541 i UL972) koji ima transplantiran organ i izložen je imunosupresivnoj terapiji. Polimorfizmi su detektirani unutar regije UL543 u oba ispitanika te unutar regije UL544 samo u ispitanika CP. Mutacije koje nisu u bazi podataka, tj. nisu detektirane u bioinformatičkom



algoritmu su uočene u oba ispitanika. Prisutne su u regijama UL541 i UL542 (različite mutacije u istim regijama oba ispitanika), UL543 (ispitanik SD) i UL544 (ispitanik CP). Tihe mutacije (eng. *silent mutations*) su uočene u regiji UL541 ispitanika CP te u regiji UL543 ispitanika SD. Referentnoj sekvenciji su posve jednake regije UL971 u oba ispitanika, UL544 u ispitanika SD i UL972 u ispitanika CP.

Rezistencijske mutacije su detektirane samo u uzorcima ispitanika SD u regijama UL541 i UL972. Unutar regije UL541 detektirana je rezistencijska mutacija N408D u uzorcima plazme, odnosno 126 (SD9UL541), 134 (SD10UL541), 145 (SD11UL541) i 152 (SD12UL541) dana nakon početnog uzorka (slika 6).



**Slika 6.** Prikaz dinamike pojave rezistencijskih mutacija tijekom vremena u transplantiranog ispitanika u regijama UL541 i UL972.

Nakon 126 dana, samo dio varijanti pod selektivnim pritiskom terapije prelazi u rezistentnu formu gdje je detektiran nukleotid R (kombinacija A i G nukleotida). U sljedeća dva uzorka, 134 i 145 dana nakon početnog, prisutan je samo nukleotid G što upućuje na detekciju rezistentnih varijanti. U uzorku nakon 152 dana opet je prisutna miješana populacija s nukleotidom R nakon čega se vraćaju u potpuno nerezistentnu formu s prisutnim nukleotidom A (slika 7).







```

554 SerAlaLeuGlyAsnValLeuGlyPheCysLeuMetArgLeuLeuAspArgArgGlyLeuAspGluValArgMetGly
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
   1 UCGGCGCUGGGUAAACGUGCUGGGCUUUUGCCUCAUGCGGCGUGUUGGACCGGCGGGUCUGGACGAGGUGCGCAUGGGC

580 ThrGluAlaLeuLeuPheLysHisAlaGlyAlaAlaCysArgAlaLeuGluAsnGlyLysLeuThrHisCysSerAsp
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||***|||***|||
   79 ACGGAGGCGUUGCUCUUUAAGCACGCCGGCGCGGCCUGCCGCGCCUGGAGAGAACGGCAAGCUCACGCACJGGJCCGAC

606 AlaCysLeuLeuIleLeuAlaAlaGlnMetSerTyrGlyAlaCysLeuLeuGlyGluHisGlyAlaAlaLeuValSer
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
   157 GCCUGUCUGCUCUAUUCUGGGCGGCGCAAUGAGCUACGGCGCCUGUCUCCUGGGCGAGCAUGGGCGCCGCGCUGGUGUCG

632 HisThrLeuArgPheValGluAlaLys
   |||||||||||||||
   235 CACACGCGCGCUUUGUGGAGGCCAAG

```

**Slika 10.** Prikaz sravnanja sekvencije uzorka likvora ispitanika s transplantiranim organom, regije UL972 s referentnom sekvencijom Q6SW46.1 (divlji tip sekvencije koja kodira za serin/treonin protein kinazu UL97). Označene su mutacije L595W (lijevo) i C603W (desno).

Osim rezistencijskih mutacija, detektirani su i polimorfizmi koji razlikuju analizirane sekvencije od referentnih. U ispitanika CP detektirane su mutacije L655S i S685N unutar regije UL543 te mutacije P887S i S897L unutar regije UL544. Uzorak plazme (CP9UL544), 26 dana nakon početnog, ima i dodatnu mutaciju N867Y koja nije detektirana u bioinformatičkom algoritmu. U svim uzorcima ispitanika SD unutar regije UL543 je detektiran genetički polimorfizam F669L, a uzorak likvora (SD6UL543) ima i dodatnu mutaciju A835T (nije detektirana u bioinformatičkom algoritmu) samo u nekim sekvencijama budući da je prisutna miješana populacija varijanti koje sadrže nukleotid A ili G (oznaka R).

Mutacije koje nisu u bazi podataka, a prisutne su u analiziranim sekvencijama su: G358E, K475Q, N867Y, G358V, Y477H i A835T. U oba ispitanika, u uzorcima plazme, prisutna je mutacija G358E unutar regije UL541. U ispitanika CP je prisutna 10 dana nakon početnog uzorkovanja (CP6UL541), dok je u ispitanika SD uočena 179 dana nakon početnog uzorkovanja (SD14UL541). Samo dio varijanti ima mutaciju G358E zbog prisustva miješane populacije varijanti koje sadrže nukleotid A ili G (oznaka R). Ispitanik SD (unutar regije UL541) ima prisutnu i mutaciju G358V, 97 dana nakon početnog uzorkovanja plazme (SD14UL541). Budući da je prisutna miješana populacija varijanti koje sadrže nukleotid A, T, G ili C (oznaka N), u navedenom uzorku plazme samo dio varijanti ima promjenu G358V. Mutacija K475Q je prisutna u regiji UL542,

ispitanika CP, 15 dana nakon početnog uzorka aspirata traheje (CP10UL542), a unutar iste regije u ispitanika SD je uočena mutacija Y477H, 126 dana nakon početnog uzorka plazme (SD9UL542).

Tihe mutacije u ispitanika CP su prisutne u regiji UL541, 26 dana nakon početnog uzorka plazme (CP9UL541) i 15 dana nakon početnog uzorka aspirata traheje (CP10UL541). U uzorku plazme je primjetna promjena 366. tripleta ACG u ACK (miješana populacija varijanti koje sadrže nukleotid G ili T), ali aminokiselina treonin ostaje nepromijenjena, dok u uzorku aspirata traheje 448. triplet CCC je promijenjen u CCG (oba tripleta kodiraju za aminokiselinu prolin). Ispitanik SD ima tihu mutaciju unutar regije UL543, 57 dana nakon početnog uzorka plazme. Triplet na poziciji 739 je promijenjen iz CCG u CCR (miješana populacija varijanti koje sadrže nukleotid G ili A), ali je aminokiselina prolin na toj poziciji ostala nepromijenjena.

**Tablica 8.** Detektirane mutacije te njihova priroda i vrijeme detekcije u regijama virusne DNA polimeraze (UL541, UL542, UL543 i UL544) i virusne kinase (UL971 i UL972) ljudskog citomegalovirusa u uzorcima ispitanika koji je novorođenče (oznaka CP).

OZNAKA UZORKA	UZORAK	DAN DETEKCIJE MUTACIJE	REGIJA	NUKLEOTIDNI POLOŽAJ	MUTACIJA	PRIRODA MUTACIJE
CP1	urin	početni	UL543	655685	L655S,S685N	Genetički polimorfizmi
			UL544	887,897	P887S,S897L	Genetički polimorfizmi
CP2	Bronho-alveolarni lavat	početni	UL543	655,685	L655S,S685N	Genetički polimorfizmi
			UL544	887,897	P887S,S897L	Genetički polimorfizmi
CP3	plazma	početni	UL543	655,685	L655S,S685N	Genetički polimorfizmi
			UL544	887,897	P887S,S897L	Genetički polimorfizmi
CP4	plazma	početni	UL543	655,685	L655S,S685N	Genetički polimorfizmi
			UL544	887,897	P887S,S897L	Genetički polimorfizmi
CP5	likvor	početni	UL543	655,685	L655S,S685N	Genetički polimorfizmi
CP6	plazma	10.	UL541	358	P887S,S897L	Genetički polimorfizmi
			UL543	655,685	L655S,S685N	Genetički polimorfizmi
			UL544	887,897	P887S,S897L	Genetički polimorfizmi
CP7	urin	13.	UL543	655,685	L655S,S685N	Genetički polimorfizmi
			UL544	887,897	P887S,S897L	Genetički polimorfizmi
CP8	aspirat traheje	početni	UL543	655,685	L655S,S685N	Genetički polimorfizmi
			UL544	887,897	P887S,S897L	Genetički polimorfizmi
CP9	plazma	26.	UL541	366	T366T (ACG→ACT)	Tiha mutacija
			UL543	655,685	L655S,S685N	Genetički polimorfizmi
			UL544	887,897	P887S,S897L	Genetički polimorfizmi
				867	N867Y	Nije u bazi podataka
CP10	aspirat traheje	15.	UL541	448	P448P (CCC→CCG)	Tiha mutacija
			UL543	655,685	L655S,S685N	Genetički polimorfizmi
			UL544	887,897	P887S,S897L	Genetički polimorfizmi
CP11	urin	28.	UL543	655,685	L655S,S685N	Genetički polimorfizmi
			UL544	887,897	P887S,S897L	Genetički polimorfizmi
CP12	urin	42.	UL543	655,685	L655S,S685N	Genetički polimorfizmi
			UL544	887,897	P887S,S897L	Genetički polimorfizmi
CP13	plazma	40.	UL543	655,685	L655S,S685N	Genetički polimorfizmi
			UL544	887,897	P887S,S897L	Genetički polimorfizmi
CP14	aspirat traheje	29.	UL543	655,685	L655S,S685N	Genetički polimorfizmi
			UL544	887,897	P887S,S897L	Genetički polimorfizmi

**Tablica 9.** Detektirane mutacije te njihova priroda i vrijeme detekcije u regijama virusne DNA polimeraze (UL541, UL542, UL543 i UL544) i virusne kinase (UL971 i UL972) ljudskog citomegalovirusa u uzorcima ispitanika ima transplantiran organ (oznaka SD).

OZNAKA UZORKA	UZORAK	DAN DETEKCIJE MUTACIJE	REGIJA	NUKLEOTIDNI POLOŽAJ	MUTACIJA	PRIRODA MUTACIJE
SD1	plazma	početni	UL543	669	F669L	Genetički polimorfizam
SD2	plazma	41.	UL543	669	F669L	Genetički polimorfizam
SD3	plazma	57.	UL543	669	F699L	Genetički polimorfizam
				739	P739P (CCG→CCA)	Tiha mutacija
			UL972	603	C603W	Rezistencijska mutacija
SD4	plazma	68.	UL543	669	F669L	Genetički polimorfizam
			UL972	603	C603W	Rezistencijska mutacija
SD5	plazma	97.	UL541	358	G358V	Nije u bazi podataka
			UL543	669	F669L	Genetički polimorfizam
			UL972	603	C603W	Rezistencijska mutacija
SD6	likvor	98.	UL543	669	F669L	Genetički polimorfizam
				835	A835T	Nije u bazi podataka
			UL972	603	C603W	Rezistencijska mutacija
				595	L595W	Rezistencijska mutacija
SD7	plazma	113.	UL543	669	F669L	Genetički polimorfizam
			UL972	603	C603W	Rezistencijska mutacija
SD8	plazma	118.	UL543	669	F669L	Genetički polimorfizam
			UL972	603	C603W	Rezistencijska mutacija
SD9	plazma	126.	UL541	408	N408D	Rezistencijska mutacija
			UL542	477	Y477H	Nije u bazi podataka
			UL543	669	F669L	Genetički polimorfizam
			UL972	603	C603W	Rezistencijska mutacija
SD10	plazma	134.	UL541	408	N408D	Rezistencijska mutacija
			UL543	669	F669L	Genetički polimorfizam
			UL972	603	C603W	Rezistencijska mutacija
SD11	plazma	145.	UL541	408	N408D	Rezistencijska mutacija
			UL543	669	F669L	Genetički polimorfizam
			UL972	603	C603W	Rezistencijska mutacija
SD12	plazma	152.	UL541	408	N408D	Rezistencijska mutacija
			UL543	669	F669L	Genetički polimorfizam
			UL972	603	C603W	Rezistencijska mutacija
SD13	plazma	160.	UL543	669	F669L	Genetički polimorfizam
			UL972	603	C603W	Rezistencijska mutacija
SD14	plazma	179.	UL541	358	G358E	Nije u bazi podataka
			UL543	669	F669L	Genetički polimorfizam
			UL972	603	C603W	Rezistencijska mutacija

### **4.3. Filogenetska analiza**

Filogenetska analiza provedena je s ciljem utvrđivanja srodnosti svih analiziranih (rezistentnih i nerezistentnih varijanti) i referentnih sekvencija preuzetih iz banke gena *NCBI*. Odabrane su nasumične sekvencije cijelih genoma koje imaju različite postotke sličnosti s analiziranim sekvencijama. Duljina sravnjenih sekvencija virusa (oba ispitanika) za regiju UL54 je: 464 nukleotida (UL541), 338 nukleotida (UL542), 645 nukleotida (UL543) i 497 nukleotida (UL544), a za regiju UL97 je: 258 nukleotida (UL971) i 246 nukleotida (UL972). Filogenetska stabla, za svaku regiju posebno, su konstruirana metodom najveće vjerojatnosti. Korišten je evolucijski model General Time Reversible (GTR) koji se pokazao kao najbolji za konstrukciju stabala sličnih sekvencija i metoda samoučitanja sa 100 ponavljanja. Statistički pouzdanim rezultatima smatraju se grananja koja imaju  $\geq 70$  vrijednost samoučitanja.

#### **4.3.1. Filogenetska analiza genske regije UL54**

Filogenetska stabla s najvećim log vrijednostima za regije UL541 (-851.43), UL542 (-550.67), UL543 (-1208.88) i UL544 (-870.83) su prikazana na slici 11.





**Slika 11.** Prikaz filogenetskih stabala za genomske regije UL541, UL542, UL543 I UL544 ljudskog citomegalovirusa uzoraka ispitanika koji je novorođenče (CP uzorci plazme, urina, bronho-alveolarnog lavata, aspirata traheje i likvora) te ispitanika koji ima transplantiran organ (SD uzorci plazme i likvora). Za konstrukciju stabla korištena je metoda najveće vjerojatnosti, GTR evolucijski model te metoda samoučitanja sa 100 ponavljanja. Vrijednosti samoučitanja ( $\geq 70\%$ ) su prikazane na granama stabla, a duljina grana proporcionalna je broju supstitucija (crtica na dnu označava 0.0050 supstitucija za regije UL541, UL543 i UL544 te 0.0020 za regiju UL542). Referentne sekvencije su preuzete iz baze NCBI te označene bojama ovisno o geografskom podrijetlu.

Analizirane sekvencije dvaju ispitanika, svih regija se različito grupiraju na filogenetskom stablu te nisu filogenetski jako slične. Usporedbom s vanjskim sekvencijama, uočava se da su, u regiji UL541, sekvencijama ispitanika CP najbližije referentne sekvencije iz Njemačke (KU317610.1 i MW528464.1), Belgije (KP745687.1 i KP745658.1) i Izraela (KR534208.1), dok ispitanik SD ima sekvencije najbližije onima iz Njemačke (KY490083.1 i MT044479.1), Izraela (KR534202.1) i Francuske (KT959235.1). Analizirane sekvencije oba ispitanika najviše se razlikuju od sekvencija iz Zambije (MK290742.1).

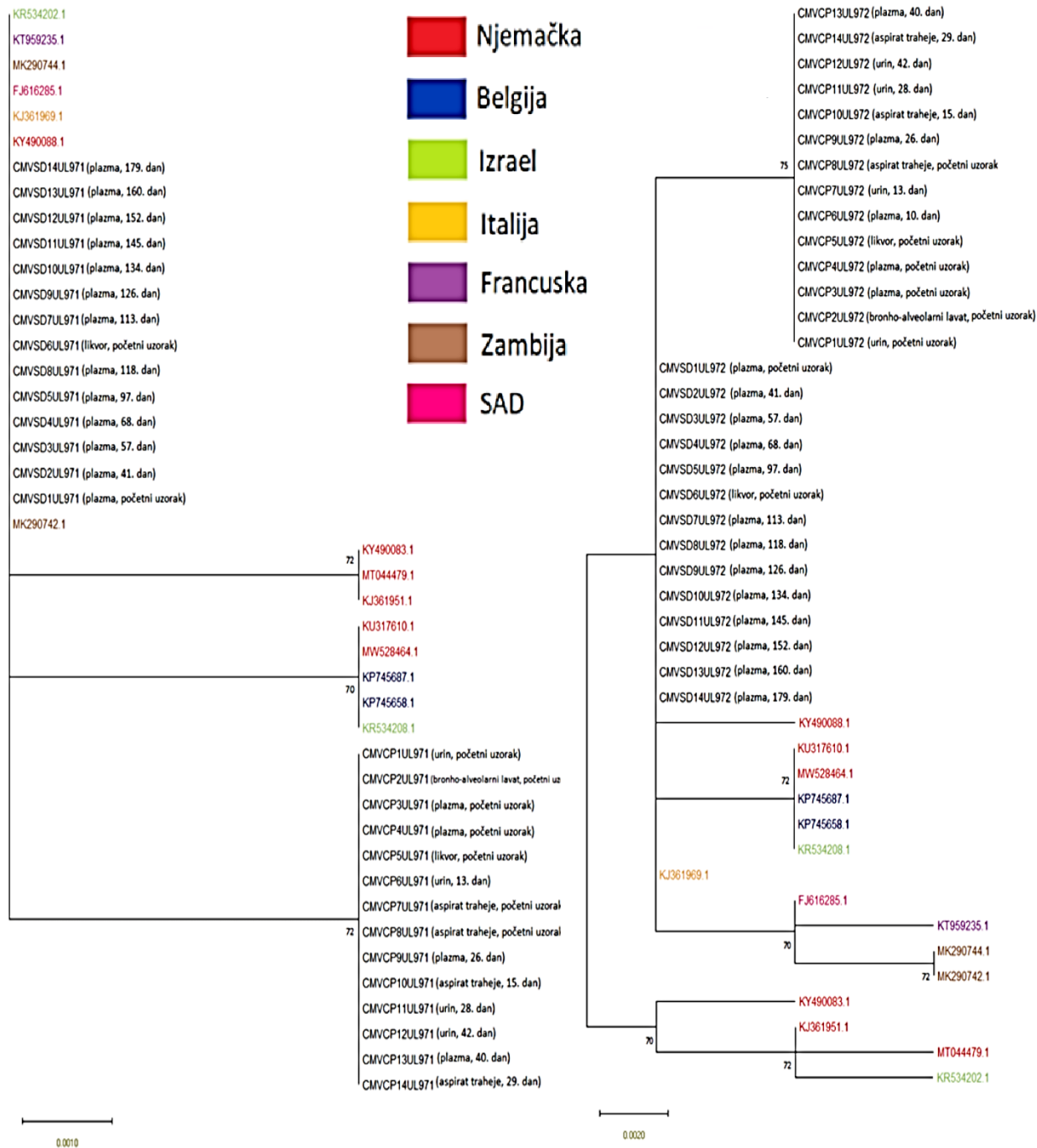
Grupiranje je isto u regiji UL542, ali osim sa sekvencijama iz Njemačke (KY490083.1 i MT044479.1), Izraela (KR534202.1) i Francuske (KT959235.1), sekvencije ispitanika SD se grupiraju zajedno s još jednom sekvencijom koja je iz Italije (KJ361969.1).

Regija UL543 ima sekvencije koje se u oba ispitanika grupiraju s vanjskim sekvencijama kao i u regiji UL541 osim što sekvencije ispitanika CP u ovoj regiji nisu toliko srodne se jednom sekvencijom iz Njemačke (KU317610.1) kao što je slučaj u regiji UL541. Međutim, u istoj regiji se sekvencije ispitanika CP najviše razlikuju od onih koje se grupiraju sa sekvencijama ispitanika SD, tj. od sekvencija iz Njemačke (KY490083.1 i MT044479.1), Izraela (KR534202.1) i Francuske (KT959235.1). Sekvencije ispitanika SD su najmanje srodne s jednom sekvencijom iz Njemačke (KY490088.1).

Za regiju UL544, sekvencije ispitanika CP su najbližije onima iz Njemačke (MW528464.1), Belgije (KP745687.1 i KP745658.1) i Izraela (KR534208.1), dok ispitanik SD ima sekvencije koje su filogenetski najrodnije onima iz Njemačke (MT044479.1), Izraela (KR534202.1) i Francuske (KT959235.1). U ovoj regiji, referentna sekvencija iz Njemačke (KY490083.1) nije potpuno srodna sekvencijama ispitanika SD kao što je bila u prethodnim regijama. Sekvencije oba ispitanika su filogenetski najudaljenije od referentnih sekvencija iz Zambije (MK290744.1).

#### **4.3.2. Filogenetska analiza genske regije UL97**

Filogenetska stabla s najvećim log vrijednostima za regije UL971 (-365.73) i UL972 (-400.51) su prikazana na slici 12.



**Slika 12.** Prikaz filogenetskih stabala za genomske regije UL971 i UL972 ljudskog citomegalovirusa uzoraka ispitanika koji je novorođenče (CP uzorci plazme, urina, bronho-alveolarnog lavata, aspirata traheje i likvora) te ispitanika koji ima transplantiran organ (SD uzorci plazme i likvora). Za konstrukciju stabla korištena je metoda najveće vjerojatnosti, GTR evolucijski model te metoda samoučitanja sa 100 ponavljanja. Vrijednosti samoučitanja ( $\geq 70\%$ ) su prikazane na granama stabla, a duljina grana proporcionalna je broju supstitucija (crtica na dnu označava 0.0010 supstitucija za regiju UL971 te 0.0020 za regiju UL972). Referentne sekvencije su preuzete iz NCBI banke gena te označene bojama ovisno o geografskom podrijetlu.

Filogenetskom analizom sekvencija ispitanika SD, regije UL971, utvrđeno je da se grupiraju s velikim brojem referentnih sekvencija iz različitih država, odnosno iz Izraela (KR534202.1), Francuske (KT959235.1), Zambije (MK290744.1 i MK290742.1), Italije (KJ361969.1), Sjedinjenih Američkih Država (FJ616285.1) i Njemačke (KY490088.1). S druge strane, sekvencije ispitanika CP se ne grupiraju niti s jednom vanjskom sekvencijom, a kao najrodnije se mogu navesti iste sekvencije iz Izraela, Francuske, Zambije, Italije, Sjedinjenih Američkih Država i Njemačke te samo jedna iz Zambije (MK290744.1). Ostale vanjske sekvencije su nešto manje filogenetski srodne sekvencijama oba ispitanika. U regiji UL972, sekvencijama ispitanika SD su najbližije referentne sekvencije iz Italije (KJ361969.1), dok u istoj regiji ispitanik CP nema nijednu sekvenciju identičnu vanjskim, ali najrodnije su mu sekvencije iz Njemačke (KY490088.1, KU317610.1 i MW528464.1), Belgije (KP745687.1 i KP745658.1), Izraela (KR534208.1), Italije (KJ361969.1) i Sjedinjenih Američkih Država (FJ616285.1). Sekvencije oba ispitanika su filogenetski najudaljenije od dvije sekvencije iz Njemačke (KY490083.1 i MT044479.1).

## 5. RASPRAVA

Komplikacije koje nastaju kao posljedica infekcije ljudskim citomegalovirusom su česte u novorođenčadi kao i u imunosuprimiranih pacijenata, osobito onih koji su podvrgnuti transplantaciji organa ili krvotvornih matičnih stanica (Razonable, 2018). Unatoč dostupnosti antivirusnih lijekova (ganciklovir, valganciklovir, foskarnet i cidofovir), infekciju HCMV kod ovih pacijenata je teško suzbiti budući da se često razvija rezistentna subpopulacija virusa. Čimbenici rizika za razvoj rezistencije na lijek su razni: produljeno izlaganje terapiji (za ganciklovir otprilike 5 mjeseci), aktivna virusna replikacija kao posljedica nedostatka prethodnog HCMV imuniteta (seronegativni pacijenti koji su primili organ od seropozitivnih donora), jake imunosupresivne terapije ili primjene neadekvatnih lijekova (Kotton i sur., 2018). U ovom istraživanju su analizirani uzorci dvaju ispitanika (plazma, urin, likvor, aspirat traheje i bronho-alveolarni lavat u ispitanika koji je novorođenče; plazma i likvor u ispitanika s transplantiranim organom) u različitim vremenskim točkama (dani nakon početnog uzorkovanja) kako bi se ispitalo postojanje rezistencijskih mutacija te pratio tijek razvoja rezistencije. Prvi ispitanik (CP) je novorođenče te je liječen samo ganciklovirom/valganciklovirom, dok je drugi ispitanik (SD) muškarac koji ima transplantirano srce, njegovo liječenje je također započeto kombiniranom terapijom ganciklovirom/valganciklovirom te je nastavljeno foskarnetom dva tjedna prije pojave rezistencijskih mutacija. Analizom rezultata sekvenciranih regija UL54 i UL97 utvrđeno je da ispitanik CP nije razvio rezistencijske mutacije, ali do njihove pojave je došlo u sekvencijama ispitanika SD budući da je on dulje vrijeme izložen antivirusnoj terapiji te je vremenski period uzorkovanja bio puno dulji u odnosu na ono u ispitanika CP. Od početnog do krajnjeg uzorka ispitanika CP je prošlo 41 dan, a u ispitanika SD 176 dana. Genetički polimorfizmi detektirani u ovom istraživanju u svim uzorcima ispitanika CP unutar regija UL543 (L665S, S685N) te UL544 (P887S, S897L) su potvrđeni u ranijim istraživanjima španjolskih znanstvenika kako u ispitanicima s transplantiranim hematopoetskim matičnim stanicama (Guiu i sur., 2020) tako i u onih koji imaju transplantirane solidne (čvrste) organe (López-Aladid i sur., 2017). U ispitanika SD rezistencijske mutacije su detektirane unutar regija UL541 i UL972. U regiji UL972, u svim uzorcima plazme radilo se o mutaciji C603W, a u jedinom uzorku likvora je osim navedene mutacije detektirana i mutacija L595W. Obje mutacije pridonose rezistenciji na ganciklovir. Analizom regije UL541 ispitanika SD, u četiri uzorka plazme detektirana je rezistencijska mutacija N408D koja povećava

rezistenciju na ganciklovir te pruža unakrsnu rezistenciju na cidofovir. Genetički polimorfizmi u ispitanika SD (F669L) su detektirani samo unutar regije UL543, u svim uzorcima te u svim vremenskim točkama.

Rezistencijske mutacije koje su detektirane u ovom istraživanju u ispitanika SD, odnosno C603W (prisutna u uzorcima plazme od 57.-179. dana od početnog uzorkovanja kao i u jedinom uzorku likvora) i L595W (prisutna u uzorku likvora) unutar regije UL972 te N408D (prisutna u uzorcima plazme od 126.-152. dana od početnog uzorkovanja) unutar regije UL54, detektirane su i u ranijim istraživanjima u različitim europskim državama. Menghi i sur. (2016) su predstavili slučaj 53-godišnjeg muškarca seronegativnog na HCMV koji je podvrgnut transplantaciji bubrega dobivenog od donora seropozitivnog na HCMV. Ispitanik je bio tretiran imunosupresivnom, kao i antivirusnom terapijom. Prvu liniju antivirusne terapije su činili ganciklovir i valganciklovir te je nakon njihove primjene provedena genotipizacija zbog sumnje u postojanje rezistencijskih mutacija. Deset dana nakon početka terapije, detektirana je rezistencijska mutacija C603W koja pruža rezistenciju na ganciklovir i valganciklovir. Hantz i sur. (2010) su objavili kohortnu studiju provedenu u 16 različitih francuskih centara za transplantaciju. U istraživanje je bilo uključeno 346 ispitanika, odnosno 287 ispitanika s transplantiranim čvrstim (solidnim) organom i 59 primatelja hematopoetskih matičnih stanica koji su bili tretirani antivirusnim lijekovima ganciklovirom, valganciklovirom ili foskarnetom. Rezistencijske mutacije, detektirane unutar regija UL97 i UL54 u 18 ispitanika (5,2 %) bile su L595S, M460V, A594P, C603W, del 591-603, L595F, A594V i C592G (UL97) te L802M, D515Y, A614S, A834P, D413E, A987G i N408K (UL54). Mutacija C603W, koja pruža otpornost na ganciklovir, detektirana je u ispitanika koji ima transplantiran bubreg (tretiran s ganciklovirom i valganciklovirom). Hantz i sur. (2010) su uočili postojanje rezistencijske mutacije u kodonu 595, ali za razliku od ovog istraživanja gdje je u uzorku likvora ispitanika SD unutar regije UL972 detektirana supstitucija leucina triptofanom (L595W), u istraživanju koje su proveli Hantz i sur. (2010) je u istom kodonu detektirana supstitucija leucina serinom (L595S) i fenilalaninom (L595F). Mutacija u kodonu 408 je također prisutna u oba istraživanja, ali za razliku od mutacije N408K (supstitucija asparagina lizinom) koju su detektirali Hantz i sur. (2010), u ovom istraživanju je prisutna N408D mutacija (supstitucija asparagina asparaginskom kiselinom) u uzorcima plazme (126, 134, 145, 152 dana nakon početnog uzorka) unutar regije UL541 ispitanika SD. Goldsmith i sur. (2012) su predstavili slučaj 34-godišnje žene seronegativne na HCMV kojoj su transplantirani čvrsti organi (tanko crijevo, želudac, gušterača i

bubreg) od donora seropozitivnog na HCMV te je ispitanica bila izložena imunosupresivnoj terapiji. Prvu liniju antivirusne terapije činili su ganciclovir i valganciklovir te je detektirana rezistencijska mutacija na navedene lijekove (C603W). Terapija je zamijenjena foskarnetom, a nakon nekog vremena su detektirane i mutacije u regiji UL54 koje pridonose otpornosti na foskarnet (L545S i Q578H). U studiju koju su objavili Gracia-Ahufinger i sur. (2013) bilo je uključeno šest ispitanika koji su primatelji čvrstih organa, a svi su tretirani valganciklovirom ili ganciklovirom. Svih šest ispitanika, nakon izlaganja antivirusnoj terapiji, je razvilo rezistencijsku mutaciju ili unutar regije UL97 (C603W, A594V, N460V/I, A594T, L595S) ili unutar regije UL54 (T503I). Supstitucija u kodonu 603 (C603W) je detektirana u ispitanika koji je imao transplantiran bubreg, a liječen je u početku valganciklovirom, dok je kasnije bio izložen djelovanju valganciklovira i ganciklovira zajedno. Jedini detektirani genetički polimorfizam u ispitanika SD (prisutan u svim uzorcima) unutar regije UL543 (F669L) je također potvrđen u istraživanju Guiu i sur. (2020). Myre i sur. (2011) su objavili veliku studiju u koju je bilo uključeno 1244 recipijenta bubrega kojima je transplantacija organa izvršena u Oslu u Sveučilišnoj bolnici Rikshospitalet, u periodu od 2004-2008. godine. Ganciklovir-rezistencijske mutacije su detektirane u 27 (2,2%) ispitanika, a svi su imali mutacije UL97 regije, dok mutacije UL54 regije nisu zabilježene. Svi su tretirani valganciklovirom prije detekcije ganciklovir-rezistencijskih mutacija, dok je kasnije terapija ili nastavljena valganciklovirom ili je uveden foskarnet. Najčešće detektirane mutacije su bile A594V (20%) i L595S (17,1%) kao i prisutstvo miješanih populacija na tim istim kodonima – A594V/A (14,3%) i L595S/L (8,6%). U manjem postotku su detektirane mutacije C603W (5,7%) i A595A/V (5,7%), dok su najmanje bile zastupljene (2,8%) sljedeće mutacije: M460M/I, L595F, H520Q, E595E/D, C603C/S, M460M/V, L595W, K599del, del594-597 i del597-602.

Rezistencijske mutacije detektirane unutar ovog istraživanja su ranije opisane i u istraživanjima na drugim kontinentima. Kleiboeker i sur. (2014) su objavili studiju u koju je bilo uključeno 570 kliničkih uzoraka imunosuprimiranih ispitanika koji su tretirani ganciklovirom kao prvom linijom terapije, dok je liječenje nastavljeno cidofovirom ili foskarnetom. Najčešće detektirane mutacije u regiji UL97 su bile A594V (26,6%), L595S (16,2%), C603W (12,7%) i C529G (9,2%) a u regiji UL54 u najvećem postotku su bile prisutne rezistencijske mutacije A987G (14,5%), L545S (10,1%), P522S (10,1%), T503I (8,7%) i N408K (7,2%), dok je mutacija N408D također detektirana, ali u puno manjem postotku (1,4%). Unutar regije UL97 zabilježeno je i prisutvo mutacije L595W (koja je detektirana i u ovom istraživanju u uzorku likvora ispitanika SD

unutar regije UL972), također u nešto manjem postotku (5,8%). Keyvani i sur. (2016) su analizirali 87 uzoraka imunosuprimiranih pacijenata u vremenskom razdoblju prije izlaganja gancikloviru te nakon liječenja s ganciklovirom. Rezultati su pokazali da je u ranoj fazi (prije izlaganja ispitanika tretmanu ganciklovirom) detektirana samo jedna rezistencijska mutacija (A594V), dok su u kasnoj fazi kao najčešće mutacije koje pružaju rezistenciju na ganciklovir detektirane A594V, H520Q i M460V. U najmanjem postotku su detektirane L595S, E596G i del 594 (1.14%), a mutacija C603W je, uz mutacije C592 i M460I, okarakterizirana kao srednje prisutna. Australaska istraživačka skupina, koju su činili Iwasenko i sur. (2010), objavila je studiju u koju je bilo uključeno 39 ispitanika, odnosno 81 uzorak. Svi ispitanici su bili tretirani ganciklovirom ili valganciklovirom, dok je mali broj naknadno bio izložen djelovanju cidofovira ili foskarneta. Prisutnost DNA molecule ljudskog citomegalovirusa je identificirana u 32 (82%) ispitanika, a rezistencija na antivirusne lijekove je detektirana u 16 (50%) od 32 HCMV-pozitivna ispitanika. Od detektiranih rezistencijskih mutacija unutar regije UL97, najučestalija je bila A594V, zatim L595S, M460V i C603W te u najmanjem postotku C592G, C607F, N597D, E596G, H520Q i del 590-593. Sve identificirane rezistencijske mutacije regije UL54 (T700A, P522S, D485N, T503I, L802M, A809V, F412S, A987G) su prisutne u kombinaciji s rezistencijskim mutacijama UL97, a čak je 86% detektiranih mutacija UL54 identificirano u ispitanika s transplantatom srca ili pluća. Supstitucija cisteina triptofanom na 603. kodonu (C603W) je detektirana u ispitanika koji ima transplantirana pluća. Liječen je ganciklovirom na koji je nakon dulje izloženosti razvio rezistenciju, a u istom izolatu je detektirana i rezistencijska mutacija A987G (koja je odgovorna za jaču rezistenciju na ganciklovir i cidofovir) unutar regije UL54. U drugog ispitanika, s istim transplantiranim organom, liječenog istom antivirusnom terapijom uočene su identične mutacije u regijama UL97 (C603W) i UL54 (A987G).

Analizirane sekvencije ispitanika CP i ispitanika SD se međusobno razlikuju te nisu filogenetski jako srodne. Njihovom usporedbom s 15 referentnih sekvencija iz genske banke s različitih geografskih područja utvrđeno je da se za svakog ispitanika razlikuje filogenetska srodnost s vanjskim sekvencijama.

Sekvencije ispitanika CP za regije UL541 i UL542 su identične sekvencijama koje su objavili Götting i sur. (2021) pod pristupnim brojem MW528464.1 (Njemačka), Sijmons i sur. (2015) pod pristupnim brojevima KP745658.1 i KP745687.1 (Belgija), Ostermann i sur. (2016)



pod pristupnim brojem KU317610.1 (Njemačka) te Suárez i sur. (2019) pod pristupnim brojem KR534208.1 (Izrael). Regije UL543 i UL544 istog ispitanika dijele jednaku sličnost sa svim navedenim sekvencijama iz genske banke uz izuzetak sekvencije koja potječe iz članka koji su objavili Ostermann i sur. (2016.). Ova sekvencija porijeklom iz njemačkog izolata (KU317610.1) je manje srodna s analiziranim sekvencijama ispitanika CP. Sekvencije ispitanika SD, regija UL541 i UL543 su filogenetski srodne sekvencijama koje su povučene iz genske banke, a potječu iz provedenih istraživanja koja su objavili Suárez i sur. (2019) s pristupnim brojem sekvencije KY490083.1 (Njemačka), Suárez i sur. (2020) s pristupnim brojem MT044479.1 (Njemačka), Suárez i sur. (2019) s pristupnim brojem KR534202.1 (Izrael) i Khan i sur. (2009) s pristupnim brojem KT959235.1 (Francuska). Sekvencije regije UL542 istog ispitanika imaju jednaku sličnost s navedenim referentnim sekvencijama, ali su filogenetski srodne i s još jednom dodatnom sekvencijom s pristupnim brojem KJ361969.1 (Italija) koja potječe iz istraživanja provedenog od strane Suárez i sur. (2019). Regija UL544 također pokazuje sličnost analiziranih sekvencija ispitanika SD s navedenim referentnim sekvencijama iz drugih istraživanja, ali gubi srodnost s jednom sekvencijom iz Njemačke (KY490083.1).

Sekvencije spitanika SD, u regiji UL971 su identične sekvencijama dobivenim iz ranijih istraživanja te sekvencijama s različitih geografskih područja. Potpuno su identične vanjskim sekvencijama dobivenih iz istraživanja Suárez i sur. (2019), a koje su objavljene pod pristupnim brojevima KY490088.1 (Njemačka), KJ361969.1 (Italija) i KR534202.1 (Izrael). Iz drugog istraživanja objavljenog pod autorima Suárez i sur. (2019), dvije vanjske sekvencije iz Zambije (MK290742.1 i MK290744.1) također imaju potpunu sličnost sa sekvencijama ispitanika SD regije UL971. Sekvencije istog ispitanika iste regije imaju potpunu sličnost i sa sekvencijama pod pristupnim brojevima KT959235.1 (Francuska) koja je dobivena u istraživanju Khan i sur. (2009) te FJ616285.1 (Sjedinjene Američke Države) koja je dobivena u istraživanju Dolin i sur. (2004). Regija UL972 ispitanika SD pokazuje potpunu srodnost analiziranih sekvencija samo s jednom referentnom sekvencijom koju su objavili Suárez i sur. (2019) pod pristupnim brojem KJ361969.1 (Italija). Sekvencije ispitanika CP u regijama UL971 i UL972 nisu potpuno srodne niti s jednom od vanjskih sekvencija, ali ipak u regiji UL971 pokazuju najveću filogenetsku srodnost s istim vanjskim sekvencijama koje su potpuno srodne sekvencijama ispitanika SD u toj istoj regiji (Suárez i sur., 2019; Khan i sur., 2009; Dolin i sur., 2004).

## 6. ZAKLJUČCI

- Analizom sekvencija regija UL54 i UL97 ljudskog citomegalovirusa, rezistencijske mutacije su detektirane u obje regije u ispitanika s transplantiranim organom te uzrokuju rezistenciju na ganciklovir/valganciklovir.
- Sekvencije ispitanika koji je novorođenče nemaju detektirane rezistencijske mutacije, već samo polimorfizme u odnosu na divlji tip virusa.
- Filogenetskom analizom utvrđeno je da virusne sekvencije, regija UL54 i UL97, u dvaju ispitanika nisu međusobno jako slične te da se na filogenetskom stablu grupiraju s različitim referentnim sekvencijama iz genske banke.
- Srodnost analiziranih sekvencija oba ispitanika s referentnim sekvencijama je uniformirana u regiji UL54 pri čemu su sekvencije novorođenčeta najsrodnije sekvencijama iz Njemačke, Belgije i Izraela, dok sekvencije transplantiranog ispitanika pokazuju najviše sličnosti sa sekvencijama iz Njemačke, Izraela i Francuske.
- Sekvencije novorođenčeta regije UL97 zasebno se grupiraju u odnosu na referentne sekvencije i ispitanika s transplantiranim organom čije su sekvencije u dijelu UL971 srodne sa sekvencijama iz Njemačke, Italije, Izraela, Francuske, Zambije i Sjedinjenih Američkih Država, dok su u dijelu UL972 srodne samo sa sekvencijama iz Italije.

## 7. LITERATURA

Azevedo, L.S., Pierrotti, L.C., Abdala, E., Costa, S.F., Strabelli, T.M., Campos, S.V., Ramos, J.F., Latif, A.Z., Litvinov, N., Maluf, N.Z., Caiaffa Filho, H.H., Pannuti, C.S., Lopes, M.H., Santos, V.A., Linardi Cda, C., Yasuda, M.A., Marques, H.H. (2015): Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clinics (Sao Paulo)*. 70: 515-23.

Azimi, T., Tavakolian, S., Goudarzi, H., Pourmand, M. R., Faghihloo, E. (2020): Global estimate of phenotypic and genotypic ganciclovir resistance in cytomegalovirus infections among HIV and organ transplant patients; A systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*. 141: 104012.

Bender, B. J., Coen, D. M., Strang, B. L. (2014): Dynamic and Nucleolin-Dependent Localization of Human Cytomegalovirus UL84 to the Periphery of Viral Replication Compartments and Nucleoli. *Journal of Virology*. 88: 11738–11747.

Biolatti, M., Dell'Oste, V., Pautasso, S., Gugliesi, F., von Einem, J., Krapp, C., Jakobsen, M. R., Borgogna, C., Gariglio, M., De Andrea, M., Landolfo, S. (2018): Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp65 (pUL83) Dampens Type I Interferon Production by Inactivating the DNA Sensor cGAS without Affecting STING. *Journal of virology*. 92: e01774-17.

Blyth, E., Withers, B., Clancy, L., Gottlieb, D. (2016): CMV-specific immune reconstitution following allogeneic stem cell transplantation. *Virulence*. 7: 967–980.

Boppana, S. B., Ross, S. A., Fowler, K. B. (2013): Congenital Cytomegalovirus Infection: Clinical Outcome. *Clinical Infectious Diseases*. 57: S178–S181.

Bowen, E.F., Cherrington, J.M., Lamy, P.D., Griffiths, P.D., Johnson, M.A., Emery, V.C. (1999): Quantitative changes in cytomegalovirus DNAemia and genetic analysis of the UL97 and UL54 genes in AIDS patients receiving cidofovir following ganciclovir therapy. *Journal of Medical Virology*. 58: 402–407.

Britt, W. J., Prichard, M. N. (2018): New therapies for human cytomegalovirus infections. *Antiviral Research*. 159: 153-174.

Campos, A. B., Ribeiro, J., Boutolleau, D., Sousa, H. (2016): Human cytomegalovirus antiviral drug resistance in hematopoietic stem cell transplantation: current state of the art. *Reviews in Medical Virology*. 26: 161–182.

Chou, S. (2015): Approach to drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 28: 293–299.

Chou, S. (2020): Advances in the genotypic diagnosis of cytomegalovirus antiviral drug resistance. *Antiviral Research* 176: 104711.

Costa, H., Nascimento, R., Sinclair, J., Parkhouse, R.M.E. (2013): Human Cytomegalovirus Gene UL76 Induces IL-8 Expression through Activation of the DNA Damage Response. *PLoS Pathogens*. 9: e1003609.

Crough, T., Khanna, R. (2009): Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clinical Microbiology Reviews*. 22: 76–98.

Davison, A.J., Bhella, D. (2007): Comparative genome and virion structure. U: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore, P.S., Roizman, B., Whitley, R., Yamanishi, K., (ur.) *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press, str. 27-43

DeRussy, B.M., Tandon, R. (2015): Human Cytomegalovirus pUL93 Is Required for Viral Genome Cleavage and Packaging. *Journal of Virology*. 89: 12221–12225.

Dietrich, M.L., Schieffelin, J.S. (2019): Congenital Cytomegalovirus Infection. *Ochsner Journal*. 19: 123-130.

Dietz, A.N., Villinger, C., Becker, S., Frick, M., von Einem, J. (2017): A Tyrosine-Based Trafficking Motif of the Tegument Protein pUL71 Is Crucial for Human Cytomegalovirus Secondary Envelopment. *Journal of Virology*. 92: e00907-17.

Dioverti, M. V., Razonable, R. R. (2016): Cytomegalovirus. *Microbiology spectrum* 4: 4.4.20.

Dolan, A., Cunningham C., Hector R.D., Hassan-Walker A.F., Lee L., Addison C., Dargan D.D., McGeoch D.J., Gatherer D., Emery V.C., Griffiths P.D., Sinzger C., McSharry

B.P., Wilkinson G.W.G., Davison A.J. (2004): Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *Journal of General Virology*. 85: 1301-1312.

Domingo, E., Sheldon, J., Perales, C. (2012): Viral Quasispecies Evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76: 159–216.

Feng, L., Sheng, J., Vu, G.P., Liu, Y., Foo, C., Wu, S., Trang, P., Liu, F. (2018): Human cytomegalovirus UL23 inhibits transcription of interferon- $\gamma$  stimulated genes and blocks antiviral interferon- $\gamma$  responses by interacting with human N-myc interactor protein. *PLOS Pathogens*, 14: e1006867.

Fletcher-Etherington, A., Nobre, L., Nightingale, K., Antrobus, R., Nichols, J., Davison, A.J., Stanton, R.J., Weekes, M.P. (2020): Human cytomegalovirus protein pUL36: A dual cell death pathway inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 117: 18771-18779.

Fogliolini, M., Marcandalli, J., Perez, L. (2019): HCMV Envelope Glycoprotein Diversity Demystified. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1005.

Foulongne, V., Turrière, C., Diafouka, F., Abraham, B., Lastere, S., Segondy, M. (2004): Ganciclovir resistance mutations in UL97 and UL54 genes of Human cytomegalovirus isolates resistant to ganciclovir. *Acta virologica*. 48 :51-5

Fowler, K. B., Boppana, S. B. (2006): Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 35: 226–231.

Frange, P., Leruez-Ville, M. (2018): Maribavir, brincidofovir and letermovir: Efficacy and safety of new antiviral drugs for treating cytomegalovirus infections. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 48:495-502

Fu, Y. Z., Su, S., Gao, Y. Q., Wang, P. P., Huang, Z. F., Hu, M. M., Luo, W. W., Li, S., Luo, M. H., Wang, Y. Y., Shu, H. B. (2017): Human Cytomegalovirus Tegument Protein UL82 Inhibits STING-Mediated Signaling to Evade Antiviral Immunity. *Cell host & microbe*. 21: 231–243

Fu, Y. Z., Su, S., Zou, H. M., Guo, Y., Wang, S. Y., Li, S., Luo, M. H., Wang, Y. Y. (2019): Human Cytomegalovirus DNA Polymerase Subunit UL44 Antagonizes Antiviral Immune Responses by Suppressing IRF3- and NF- $\kappa$ B-Mediated Transcription. *Journal of virology*. 93: e00181-19.

Gardner, T. J., Tortorella, D. (2016): Virion Glycoprotein-Mediated Immune Evasion by Human Cytomegalovirus: a Sticky Virus Makes a Slick Getaway. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80: 663–677.

Garrigue, I., Moulinas, R., Recordon-Pinson, P., Delacour, M.-L., Essig, M., Kaminski, H., Rerolle, J.P., Merville, P., Fleury, H., Alain, S. (2016): Contribution of next generation sequencing to early detection of cytomegalovirus UL97 emerging mutants and viral subpopulations analysis in kidney transplant recipients. *Journal of Clinical Virology*. 80: 74–81.

Gilbert, C., Boivin, G. (2005): Human Cytomegalovirus Resistance to Antiviral Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 873–883.

Goldsmith, P. M., Husain, M. M., Carmichael, A., Zhang, H., Middleton, S. J. (2012): Case report: Multidrug-resistant cytomegalovirus in a modified multivisceral transplant recipient. *Transplantation*. 93: e30-e32.

Göhring, K., Hamprecht, K., Jahn, G. (2015): Antiviral Drug- and Multidrug Resistance in Cytomegalovirus Infected SCT Patients. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 13: 153–158.

Götting, J., Lazar, K., Suárez, N. M., Steinbrück, L., Rabe, T., Goelz, R., Schulz, T. F., Davison, A. J., Hamprecht, K., Ganzenmueller, T. (2021): Human Cytomegalovirus Genome Diversity in Longitudinally Collected Breast Milk Samples. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 11: 664247.

Gracia-Ahufinger, I., Gutiérrez-Aroca, J., Cordero, E., Vidal, E., Cantisán, S., del Castillo, D., Martín-Gandul, C., Rivero, A., Torre-Cisneros, J. (2013): Use of high-dose ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus replication in solid organ transplant patients with ganciclovir resistance-inducing mutations. *Transplantation*. 95: 1015–1020.

Griffiths, P., Baraniak, I., Reeves, M. (2014): The pathogenesis of human cytomegalovirus. *The Journal of Pathology*. 235: 288–297.

Gugliesi F, Pasquero S, Griffante G, Scutera, S., Albano, C., Pacheco, S.F.C., Riva, G., Dell'Oste, V., Biolatti, M. (2021): Human Cytomegalovirus and Autoimmune Diseases: Where Are We?. *Viruses*. 13: 260.

Guiu, A., López-Aladid, R., Cardeñoso, L., Mosquera, M. M., de la Cámara, R., Marcos, M. A. (2020): Study of cytomegalovirus resistance in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Medicina Clínica (English Edition)*. 154: 433–439.

Hage, E., Wilkie, G.S., Linnenweber-Held, S., Dhingra, A., Suárez, N.M., Schmidt, J.J., Kay-Fedorov, P.C., Mischak-Weissinger, E., Heim, A., Schwarz, A., Schulz, T.F., Davison, A.J., Ganzenmueller, T. (2017): Characterization of Human Cytomegalovirus Genome Diversity in Immunocompromised Hosts by Whole-Genome Sequencing Directly From Clinical Specimens. *The Journal of Infectious Diseases*. 215: 1673–1683.

Hakki, M., Chou, S. (2011): The biology of cytomegalovirus drug resistance. *Current opinion in infectious diseases*. 24 :605-11.

Hall Sedlak, R., Castor, J., Butler-Wu, S. M., Chan, E., Cook, L., Limaye, A. P., Jerome, K. R. (2013): Rapid Detection of Human Cytomegalovirus UL97 and UL54 Mutations Directly from Patient Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 51: 2354–2359.

Hantz, S., Garnier-Geoffroy, F., Mazon, M. C., Garrigue, I., Merville, P., Mengelle, C., Rostaing, L., Saint Marcoux, F., Essig, M., Rerolle, J. P., Cotin, S., Germe, R., Pillet, S., Lebranchu, Y., Turlure, P., Alain, S., French CMV Resistance Survey Study Group (2010): Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 65: 2628–2640.

Ho, M. (2008): The history of cytomegalovirus and its diseases. *Medical Microbiology and Immunology*. 197: 65–73.

Iwahori, S., Kalejta, R. F. (2017): Phosphorylation of transcriptional regulators in the retinoblastoma protein pathway by UL97, the viral cyclin-dependent kinase encoded by human cytomegalovirus. *Virology*. 512: 95–103.

Iwasenko, J. M., Scott, G. M., Naing, Z., Glanville, A. R., Rawlinson, W. D. (2010): Diversity of antiviral-resistant human cytomegalovirus in heart and lung transplant recipients. *Transplant Infectious Disease*. 13: 145–153.

Jackson, S. E., Redeker, A., Arens, R., van Baarle, D., van den Berg, S., Benedict, C. A., Čičin-Šain, L., Hill, A. B., Wills, M. R. (2017): CMV immune evasion and manipulation of the immune system with aging. *GeroScience*. 39: 273–291.

James, S.H., Prichard, M.N. (2011): The genetic basis of human cytomegalovirus resistance and current trends in antiviral resistance analysis. *Infectious disorders drug targets*. 11: 504-13.

Jean Beltran, P. M., Cristea, I. M. (2014): The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Review of Proteomics*. 11: 697–711.

Kalejta, R. F. (2008): Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 72: 249–265.

Kalenić, S. (2013): *Medicinska mikrobiologija*. Medicinska naklada, Zagreb.

Kausar, S., Said Khan, F., Ishaq Mujeeb Ur Rehman, M., Akram, M., Riaz, M., Rasool, G., Hamid Khan, A., Saleem, I., Shamim, S., Malik, A. (2021): A review: Mechanism of action of antiviral drugs. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 35: 20587384211002621.

Keyvani, H., Taghinezhad Saroukalaei, S., Mohseni, A.H. (2016): Assessment of the Human Cytomegalovirus UL97 Gene for Identification of Resistance to Ganciclovir in Iranian Immunosuppressed Patients. *Jundishapur journal of microbiology*. 9: e31733.

Khan, K. A., Coaquette, A., Davrinche, C., Herbein, G. (2009): Bcl-3-Regulated Transcription from Major Immediate-Early Promoter of Human Cytomegalovirus in Monocyte-Derived Macrophages. *The Journal of Immunology*. 182: 7784–7794.

Kleiboeker, S., Nutt, J., Schindel, B., Dannehl, J., Hester, J. (2014): Cytomegalovirus antiviral resistance: characterization of results from clinical specimens. *Transplant Infectious Disease*. 16: 561–567.

Knipe, D.M., Howley, P.M. (2007): *Fields Virology*. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers.



Komatsu, T. E., Pikis, A., Naeger, L. K., Harrington, P. R. (2014): Resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir/valganciclovir: A comprehensive review of putative resistance pathways. *Antiviral Research*. 101: 12–25.

Kotton, C. N., Kumar, D., Caliendo, A. M., Huprikar, S., Chou, S., Danziger-Isakov, L., Humar, A. (2018): The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation*. 102: 900–931.

Köppen-Rung, P., Dittmer, A., Bogner, E. (2016): Intracellular Distribution of Capsid-Associated pUL77 of Human Cytomegalovirus and Interactions with Packaging Proteins and pUL93. *Journal of Virology*. 90: 5876–5885.

Kronig, I., Elkrief, L., Berney, T., Van Delden, C., Neofytos, D. (2020): Combination Treatment With Letermovir and Ganciclovir for Maintenance Therapy of Multidrug-resistant CMV Infection in a Liver Transplant Recipient. *Transplantation*. 104: e248–e249.

Kwon, K. M., Oh, S. E., Kim, Y. E., Han, T.-H., Ahn, J.-H. (2017): Cooperative inhibition of RIP1-mediated NF- $\kappa$ B signaling by cytomegalovirus-encoded deubiquitinase and inactive homolog of cellular ribonucleotide reductase large subunit. *PLOS Pathogens*, 13: e1006423.

La Rosa, C., Diamond, D.J. (2012): The immune response to human CMV. *Future Virology*. 7: 279-293.

Lee, C.H., Grey, F. (2020): Systems Virology and Human Cytomegalovirus: Using High Throughput Approaches to Identify Novel Host-Virus Interactions During Lytic Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10: 280.

Ligat, G., Cazal, R., Hantz, S., Alain, S. (2018): The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: a close-up view. *FEMS Microbiology Reviews*. 42: 137–145.

Lischka, P., Rauh, C., Mueller, R., Stamminger, T. (2006): Human Cytomegalovirus UL84 Protein Contains Two Nuclear Export Signals and Shuttles between the Nucleus and the Cytoplasm. *Journal of Virology*. 80: 10274–10280.

Liu, W., Cui, Y., Wang, C., Li, Z., Gong, D., Dai, X., Bi, G.Q., Sun, R., Zhou, Z.H. (2020): Structures of capsid and capsid-associated tegument complex inside the Epstein–Barr virus. *Nature microbiology*. 5: 1285–1298

López-Aladid, R., Guiu, A., Mosquera, M.M., López-Medrano, F., Cofán, F., Linares, L., Torre-Cisneros, J., Vidal, E., Moreno, A., Aguado, J.M., Cordero, E., Martin-Gandul, C., Carratalá, J., Sabé, N., Niubó, J., Cervera, C., Capón, A., Cervilla, A., Santos, M., Bodro, M., Muñoz, P., Fariñas, M.C., Antón, A., Aranzamendi, M., Montejo, M., Pérez-Romero, P., Len, O., Marcos, M.Á. (2019): Improvement in detecting cytomegalovirus drug resistance mutations in solid organ transplant recipients with suspected resistance using next generation sequencing. *PLoS One*. 14: e0219701.

López-Aladid, R., Guiu, A., Sanclemente, G., López-Medrano, F., Cofán, F., Mosquera M., Torre Cisneros,, J., Vidal, E., Moreno Camacho, M.A., Aguado, J.M., Cordero, E., Martin Gandul, C., Pérez Romero, P., Carratalà, J., Sabé, N., Niubó, J., Cervera, C., Cervilla, A., Bodro, M., Muñoz, P., Fariñas María, C., Codina Grau ,M.G., Aranzamendi, M., Montejo, M., Len, O., Marcos, M.A. (2017): Detection of cytomegalovirus drug resistance mutations in solid organ transplant recipients with suspected resistance. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 90: 57–63.

Lurain, N.S., Chou, S. (2010): Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clinical Microbiology Reviews*. 23 :689-712.

Lv, Y., Zhou, S., Gao, S., Hongyu, D. (2019): Remodeling of host membranes during herpesvirus assembly and egress. *Protein Cell*. 10: 315–326.

Lye, M. F., Sharma, M., El Omari, K., Filman, D. J., Schuermann, J. P., Hogle, Coen, D.M. (2015): Unexpected features and mechanism of heterodimer formation of a herpesvirus nuclear egress complex. *The EMBO Journal*. 34: 2937–2952.

Madhavan, H., Moses, S., Malathi, J., Singha, N., Bagyalakshmi, R. (2012): Determination of human cytomegalovirus pp65 antigenemia among renal transplant patients. *Indian Journal of Nephrology*. 22: 347.

Manandhar, T., Hò, G.T., Pump, W.C., Blasczyk, R., Bade-Doeding, C. (2019): Battle between Host Immune Cellular Responses and HCMV Immune Evasion. *International journal of molecular sciences*. 20:3626.

Marschall, M., Häge, S., Conrad, M., Alkhashrom, S., Kicuntod, J., Schweininger, J., Kriegel, M., Lösing, J., Tillmanns, J., Neipel, F., Eichler, J., Müller, Y.A., Sticht, H. (2020): Nuclear Egress Complexes of HCMV and Other Herpesviruses: Solving the Puzzle of Sequence Coevolution, Conserved Structures and Subfamily-Spanning Binding Properties. *Viruses*. 12: 683.

Maschkowitz, G., Gärtner, S., Hofmann-Winkler, H., Fickenscher, H., Winkler, M. (2018): Interaction of Human Cytomegalovirus Tegument Proteins ppUL35 and ppUL35A with Sorting Nexin 5 Regulates Glycoprotein B (gpUL55) Localization. *Journal of Virology*. 92: JVI.00013-18.

Meesing, A., Razonable, R.R. (2018): New Developments in the Management of Cytomegalovirus Infection After Transplantation. *Drugs*. 78: 1085–1103.

Menghi, V., Comai, G., Baraldi, O., Liviano D’Arcangelo, G., Lazzarotto, T., La Manna, G. (2016): Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Infection in a Kidney Transplant Recipient Successfully Treated with Foscarnet and Everolimus. *Case Reports in Nephrology*. 2016: 2736805.

Myhre, H.A., Haug Dorenberg, D., Kristiansen, K.I., Rollag, H., Leivestad, T., Asberg, A., Hartmann, A. (2011): Incidence and outcomes of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infections in 1244 kidney transplant recipients. *Transplantation*. 92: 217-23.

Müller, B., Kräusslich, HG. (2009): Antiviral strategies. U: Müller, B., Kräusslich, HG. (ur.) Antiviral strategies. *Handbook of Experimental Pharmacology*, str. 1-24.

Nijhuis, M., van Maarseveen, N. M., Boucher, C. A. B. (2009): Antiviral Resistance and Impact on Viral Replication Capacity: Evolution of Viruses Under Antiviral Pressure Occurs in Three Phases. U: Müller, B., Kräusslich, HG. (ur.) Antiviral strategies. *Handbook of Experimental Pharmacology*, str. 299–320.

Nguyen, C.C., Kamil, J.P. (2018): Pathogen at the Gates: Human Cytomegalovirus Entry and Cell Tropism. *Viruses*. 10: 704.

Nogalski, M.T., Collins-McMillen, D., Yurochko, A.D. (2014): Overview of human cytomegalovirus pathogenesis. *Methods in Molecular Biology*. 1119: 15-28.

Ostermann, E., Spohn, M., Indenbirken, D., Brune, W. (2016): Complete Genome Sequence of a Human Cytomegalovirus Strain AD169 Bacterial Artificial Chromosome Clone. *Genome announcements*. 4: e00091-16.

Patro, A. R. K. (2019): Subversion of Immune Response by Human Cytomegalovirus. *Frontiers in Immunology*. 10: 1155.

Perng, Y.C., Qian, Z., Fehr, A. R., Xuan, B., Yu, D. (2011): The Human Cytomegalovirus Gene UL79 Is Required for the Accumulation of Late Viral Transcripts. *Journal of Virology*. 85: 4841–4852.

Phillips, S. L., Cygnar, D., Thomas, A., Bresnahan, W. A. (2012): Interaction between the Human Cytomegalovirus Tegument Proteins UL94 and UL99 Is Essential for Virus Replication. *Journal of Virology*. 86: 9995–10005.

Piret, J., Boivin, G. (2014): Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. *Reviews in Medical Virology*. 24: 186–218.

Piret, J. i Boivin, G. (2019): Clinical development of letermovir and maribavir: Overview of human cytomegalovirus drug resistance. *Antiviral Research*. 163: 91–105.

Razonable, R. R. (2018): Drug-resistant cytomegalovirus. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 23: 388-394.

Razonable, R. R., Inoue, N., Pinninti, S. G., Boppana, S. B., Lazzarotto, T., Gabrielli, L., Simonazzi, G., Pellett, P.E., Schmid, D. S. (2020): Clinical Diagnostic Testing for Human Cytomegalovirus Infections. *The Journal of Infectious Diseases*. 221: S74–S85.

Ross, S.A., Novak, Z., Pati, S., Boppana, S.B. (2011): Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infectious disorders drug targets*. 11:466-74.

Sanjuán, R., Domingo-Calap, P. (2016): Mechanisms of viral mutation. *Cellular and molecular life sciences*. 73: 4433–4448.

Sandonís, V., García-Ríos, E., McConnell, M. J., Pérez-Romero, P. (2020): Role of Neutralizing Antibodies in CMV Infection: Implications for New Therapeutic Approaches. *Trends in Microbiology*. 28: 900-912.

Seedah, E. A., Frye, Z. P., Maynard, J. A. (2014): Immunotherapeutic Approaches To Prevent Cytomegalovirus-Mediated Disease. *Microbiology spectrum*. 2: 2.1.21.

Sezgin, E., An, P., Winkler, C. A. (2019): Host Genetics of Cytomegalovirus Pathogenesis. *Frontiers in Genetics*. 10: 616

Sijmons, S., Thys, K., Mbong Ngwese, M., Van Damme, E., Dvorak, J., Van Loock, M., Li, G., Tachezy, R., Busson, L., Aerssens, J., Van Ranst, M., Maes, P. (2015): High-throughput analysis of human cytomegalovirus genome diversity highlights the widespread occurrence of gene-disrupting mutations and pervasive recombination. *Journal of virology*. 89: 7673–7695.

Smith, R., Kosuri, S., Kerry, J. (2014): Role of Human Cytomegalovirus Tegument Proteins in Virion Assembly. *Viruses*. 6: 582–605.

Stern, A., Andino, R. (2016): Viral Evolution: It Is All About Mutations. *Viral Pathogenesis*. 2016: 233–40.

Suárez, N. M., Blyth, E., Li, K., Ganzenmueller, T., Camiolo, S., Avdic, S., Withers, B., Linnenweber-Held, S., Gwinner, W., Dhingra, A., Heim, A., Schulz, T. F., Gunson, R., Gottlieb, D., Slobedman, B., Davison, A. J. (2020): Whole-Genome Approach to Assessing Human Cytomegalovirus Dynamics in Transplant Patients Undergoing Antiviral Therapy. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 10: 267.

Suárez, N. M., Musonda, K. G., Escriva, E., Njenga, M., Agbueze, A., Camiolo, S., Davison, A. J., Gompels, U. A. (2019): Multiple-Strain Infections of Human Cytomegalovirus With High Genomic Diversity Are Common in Breast Milk From Human Immunodeficiency Virus-Infected Women in Zambia. *The Journal of infectious diseases*. 220: 792–801.

Suárez, N. M., Wilkie, G. S., Hage, E., Camiolo, S., Holton, M., Hughes, J., Maabar, M., Vattipally, S. B., Dhingra, A., Gompels, U. A., Wilkinson, G., Baldanti, F., Furione, M., Lilleri, D., Arossa, A., Ganzenmueller, T., Gerna, G., Hubáček, P., Schulz, T. F., Wolf, D., Zavattoni, M., Davison, A. J. (2019): Human Cytomegalovirus Genomes Sequenced Directly From Clinical Material: Variation, Multiple-Strain Infection, Recombination, and Gene Loss. *The Journal of infectious diseases*. 220: 781–791.

Sun, Y., Bao, Q., Xuan, B., Xu, W., Pan, D., Li, Q., Qian, Z. (2018): Human Cytomegalovirus Protein pUL38 Prevents Premature Cell Death by Binding to Ubiquitin-Specific Protease 24 and Regulating Iron Metabolism. *Journal of Virology*. 92: e00191-18.

Terhune, S. S., Schröer, J., Shenk, T. (2004): RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *Journal of virology*. 78: 10390–10398.

Tomtishen III, J.P. (2012): Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology Journal*. 9: 22.

Vardanyan, R., Hruby, V. (2016): Antiviral Drugs. *Synthesis of Best-Seller Drugs*. 687–736.

Vilibic-Cavlek, T., Kolaric, B., Beader, N., Vrtar, I., Tabain, I., Mlinaric-Galinovic, G. (2017): Seroepidemiology of cytomegalovirus infections in Croatia. *Wiener klinische Wochenschrift*. 129: 129–135

Vieira Braga, F. A., Hertoghs, K. M. L., van Lier, R. A. W., van Gisbergen, K. P. J. M. (2015): Molecular characterization of HCMV-specific immune responses: Parallels between CD8+T cells, CD4+T cells, and NK cells. *European Journal of Immunology*. 45: 2433–2445.

Wang, D., Li, G., Schauflinger, M., Nguyen, C. C., Hall, E. D., Yurochko, A. D., von Einem, J., Kamil, J.P. (2013): The ULb' region of the human cytomegalovirus genome confers an increased requirement for the viral protein kinase UL97. *Journal of virology*. 87: 6359–6376.

Wang, Y.Q., Zhao, X.Y. (2020): Human Cytomegalovirus Primary Infection and Reactivation: Insights From Virion-Carried Molecules. *Frontiers in Microbiology*. 11: 1511.

Webel, R., Hakki, M., Prichard, M. N., Rawlinson, W. D., Marschall, M., Chou, S. (2014): Differential Properties of Cytomegalovirus pUL97 Kinase Isoforms Affect Viral Replication and Maribavir Susceptibility. *Journal of Virology*. 88: 4776–4785.

Wills, M., Poole, E., Lau, B., Krishna, B., Sinclair, J.H. (2015): The immunology of human cytomegalovirus latency: could latent infection be cleared by novel immunotherapeutic strategies?. *Cellular & Molecular Immunology*. 12: 128–138.

Yu, X., Jih, J., Jiang, J., Zhou, Z. H. (2017): Atomic structure of the human cytomegalovirus capsid with its securing tegument layer of pp150. *Science*. 356: eaam6892.

Zarrouk, K., Piret, J., Boivin, G. (2017): Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors. *Virus Research*. 234: 177–192.

Zimmermann, C., Büscher, N., Krauter, S., Krämer, N., Wolfrum, U., Sehn, E., Tenzer, S., Plachter, B. (2018): The abundant tegument protein pUL25 of human cytomegalovirus prevents proteasomal degradation of pUL26 and supports its suppression of ISGylation. *Journal of Virology*. 92: e01180-18.

## 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci:

Ime i prezime: Antonela Mišković

### Obrazovanje:

2017. - danas            **Diplomski studij Molekularne biologije**  
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet
2013. - 2016.           **Preddiplomski studij Biologije i kemije**  
Sveučilište u Mostaru, Prirodoslovno- matematički fakultet
2009. - 2013.           Opća gimnazija  
Travnik, Bosna i Hercegovina

### Laboratorijska stručna praksa:

- 3/2018. - 6/2018.            Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković

### Ostale vještine:

- Engleski jezik (B2)  
Rad na računalu te korištenje Microsoft Office paketa  
Vozačka dozvola B kategorije