

Mitohondrijski genom pacijenata oboljelih od bolesti COVID-19 u Hrvatskoj

Mamić, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:249128>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Antonija Mamić

**Mitochondrijski genom pacijenata oboljelih
od bolesti COVID-19 u Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Antonija Mamić

**Mitochondrial genome of COVID-19 patients
in Croatia**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Istraživačkom DNA laboratoriju Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“, u Laboratoriju za naprednu genomiku Instituta Ruđer Bošković i na Medicinskom fakultetu u Zagrebu na Odjelu za funkcionalnu genomiku, pod voditeljstvom dr. sc. Marine Korolije te suvoditeljstvom doc. dr. sc. Rose Karlić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Marini Koroliji na pomoći, trudu, strpljivosti te svakoj toploj riječi. Hvala Vam što ste uvijek našli vremena i imali strpljenja. Iznimno sam zahvalna što sam imala priliku izraditi diplomski rad u Istraživačkom laboratoriju Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“ i upoznati drage kolege.

Hvala doc. dr. sc. Rosi Karlić na stručnim savjetima i ljubaznosti.

Hvala prof. dr. sc. Kristianu Vlahovičeku na sudjelovanju u projektu i na potpori.

Hvala mag. biol. mol. Dunji Glavaš na statističkim i bioinformatičkim savjetima i srdačnosti.

Hvala dr. sc. Robertu Belužiću na savjetima i pomoći tijekom eksperimentalnog dijela.

Hvala dr. sc. Oliveru Vugreku i dipl. ing. Kristini Gotovac na ustupanju laboratorija.

Hvala svima iz Laboratorija za mitohondrijsku bioenergetiku i dijabetes Zavoda za molekularnu medicinu na Institutu Ruđer Bošković na ustupanju radnog mjesta i na izuzetno prijateljskoj atmosferi.

Hvala mag. mol. biol. Viktoriji Sukser na pomoći i srdačnosti.

Zahvaljujem svim prijateljima i dečku na podršci tijekom studiranja. Hvala što ste bili uz mene i vjerovali u mene te me ohrabivali.

Na kraju posebno hvala mojoj obitelji na razumijevanju i podršci tijekom studiranja te svim savjetima koji su me usmjeravali na pravi put.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Mitohondrijski genom pacijenata oboljelih od bolesti COVID-19 u Hrvatskoj

Antonija Mamić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

SARS-CoV-2, virus koji uzrokuje bolest COVID-19, je od svoje pojave u ljudskoj populaciji 2019. godine izazvao globalnu pandemiju koja još uvijek traje. Zbog toga je u ovom radu provedeno istraživanje na bolničkim pacijentima oboljelim od bolesti COVID-19. Prikupljeni su podaci za spol, dob, status, simptome i ostale kronične bolesti. Kliničkim podacima je utvrđena veća smrtnost muškaraca, te veća zastupljenost pacijenata starije životne dobi s kritičnim simptomima i kroničnim bolestima. Budući da mitohondrijska DNA svojom individualnom genetičkom uputom direktno oblikuje esencijalne biološke procese kao što su oksidacijska fosforilacija i produkcija reaktivnih kisikovih vrsta, postoji vjerojatnost da individualne razlike u mitohondrijskoj DNA utječu na intenzitet imunskog odgovora uslijed virusne infekcije. Stoga je naprednim sekvenciranjem mitohondrijskih genoma utvrđen haplotip svakog pacijenta. Distribucija mitohondrijskih makrohaplogrupa i submakrohaplogrupa pacijenata se ne razlikuje značajno od generalne hrvatske populacije. Međutim, otkriven je potencijalni zaštitni učinak makrohaplogrupe K koji treba ispitati na većem uzorku pacijenata, kako bi se dosegla statistička značajnost. Analizom varijanti koje mijenjaju aminokiselinsku sekvencu proteina kod pacijenata nije utvrđena niti jedna promjena direktno povezana s drugim patološkim stanjem. Napokon, ustanovljeno je da za analizu heteroplazmijskih mutacija treba koristiti uzorke krvi na kojima prethodno nisu provedene biokemijske analize.

(66 stranica, 29 slika, 6 tablica, 82 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: COVID-19, mtDNA, napredno sekvenciranje DNA, mitohondrijske haplogrupe

Voditelj: dr. sc. Marina Korolija

Suvoditelj: doc. dr. sc. Rosa Karlić

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc. Rosa Karlić

Doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Prof. dr. sc. Antun Alegro

Rad prihvaćen: 15.09.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Mitochondrial genome of COVID-19 patients in Croatia

Antonija Mamić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

SARS-CoV-2, a COVID-19 causing virus, spread globally in human population from its outbreak in 2019. Therefore, a study was conducted on hospitalized patients with COVID-19. Data for gender, age, status, symptoms, and other chronic diseases were collected. Clinical data have shown a higher mortality of men, and a higher prevalence of elderly patients with critical symptoms and chronic diseases. Because mitochondrial DNA with its individual genetic instruction is directly involved in essential biological processes such as oxidative phosphorylation and the production of reactive oxygen species, it is likely that individual variations in mitochondrial DNA affect the intensity of the immune response due to viral infection. Hence, individual haplotype of each patient was established by advanced mitochondrial genome sequencing. The distribution of mitochondrial macrohaplogroups and submacrohaplogroups of patients does not differ significantly from the general Croatian population. However, a potential protective effect of macrohaplogroup K has been identified, needing to be confirmed on larger patient pool in order to achieve statistical significance. By analyzing variants that cause amino-acid replacement within protein in patients, absence of any documented disease causing variant was established. Finally, it was shown that heteroplasmic mutation study should be performed on intact blood samples, which were not used previously for biochemical analysis.

(66 pages, 29 figures, 6 tables, 82 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: COVID-19, mtDNA, next generation sequencing, mitochondrial haplogroups

Supervisor: dr. sc. Marina Korolija

Co-supervisor: doc. dr. sc. Rosa Karlić

Reviewers:

Doc. dr. sc. Rosa Karlić

Doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Prof. dr. sc. Antun Alegro

Thesis accepted: 15.09.2021.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Mitochondriji	1
1.2. Mitochondrijska DNA.....	3
1.3. Mitochondrijske haplogrupe.....	5
1.4. Mitochondrijske heteroplazmije.....	8
1.5. Mitochondrijske bolesti	11
1.6. Koronavirusi i SARS-CoV-2.....	11
1.7. COVID-19	13
1.8. Imunosni odgovor na SARS-CoV-2	14
1.9. Uloga mitochondrija u virusnim zarazama	17
1.10. Povezanost virusnih zaraza i mitochondrijskih genoma	17
1.11. Cilj istraživanja	18
2. MATERIJALI I METODE.....	19
2.1. MATERIJALI.....	19
2.1.1. Otopine, puferi i reagensi.....	19
2.1.2. Uređaji i računalni programi	20
2.2. METODE.....	21
2.2.1. Uzorkovanje.....	21
2.2.2. Izolacija	21
2.2.3. Kvantifikacija.....	23
2.2.4. PCR za umnažanje dugih odsječaka mtDNA.....	24
2.2.5. Elektroforeza	26
2.2.5. Normalizacija i spajanje fragmenata	27
2.2.6. Tagmentacija	28
2.2.7. Indeksiranje	28
2.2.8. Pročišćavanje biblioteka	29
2.2.9. Kvantifikacija.....	30

2.2.10. Normalizacija i spajanje biblioteka.....	32
2.2.11. Priprema PhiX kontrolne DNA.....	32
2.2.12. Denaturacija biblioteka	33
2.2.13. Sekvenciranje	33
2.2.14. Provjera kvalitete pojedinačnog kruga sekvenciranja	35
2.2.15. Analiza podataka	36
3. REZULTATI	37
3.1 Klinički podaci pacijenata oboljelih od COVID-19	37
3.2. Kvaliteta sekvenciranja.....	40
3.3. Određivanje haplogrupa	41
3.4. Mitohondrijske heteroplazmije.....	47
4. RASPRAVA	50
5. ZAKLJUČCI	55
6. LITERATURA	56
7. ŽIVOTOPIS	66

POPIS KRATICA

ACE2	angiotenzin konvertaza 2 (engl. <i>angiotensin-converting enzyme 2</i>)
Acetil-CoA	acetil koenzim A
ADP	adenozin difosfat
AIDS	sindrom stečene imunodeficijencije (engl. <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
ATP	adenozin trifosfat
CFIIV „Ivan Vučetić“	Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“
COVID-19	Koronavirusna bolest (engl. <i>Coronavirus disease</i>)
CRS	Cambridge referentna sekvenca (engl. <i>Cambridge Referent Sequence</i>)
DNA	deksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfata
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FAD	flavin adenin dinukleotid
HBV	virus hepatitisa B (engl. <i>hepatitis B virus</i>)
HCV	virus hepatitisa C (engl. <i>hepatitis C virus</i>)
HIV	virus ljudske imunodeficijencije (engl. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HT1	Hibridizacijski pufer 1
mtDNA	mitohondrijska deoksiribonukleinska kiselina
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PRR	receptori za prepoznavanje uzorka (engl. <i>pattern recognition receptors</i>)
PRR	se receptori za prepoznavanje uzorka (engl. <i>pattern recognition receptors</i>)
RBD	domena za vezanje receptora (engl. <i>receptor-binding domain</i>)
rCRS	revidirana Cambridge referentna sekvenca (engl. <i>revised Cambridge Referent Sequence</i>)

RKV	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kiselina (engl. <i>Ribosomal ribonucleic acid</i>)
RSB	pufer za resuspenziju (engl. <i>Resuspension Buffer</i>)
RT-PCR	lančana reakcija polimerazom u realnom vremenu (engl. <i>real time polymerase chain reaction</i>)
SARS-CoV	teški akutni respiratorni sindrom koronavirus (engl. <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>)
SNP	promjena u jednom nukleotidu (engl. <i>single nucleotid polymorphism</i>)
TAE	tris-acetat etilendiamintetraoctena kiselina
TE pufer	Tris-EDTA pufer
UF-H ₂ O	ultrafiltrirana voda
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)

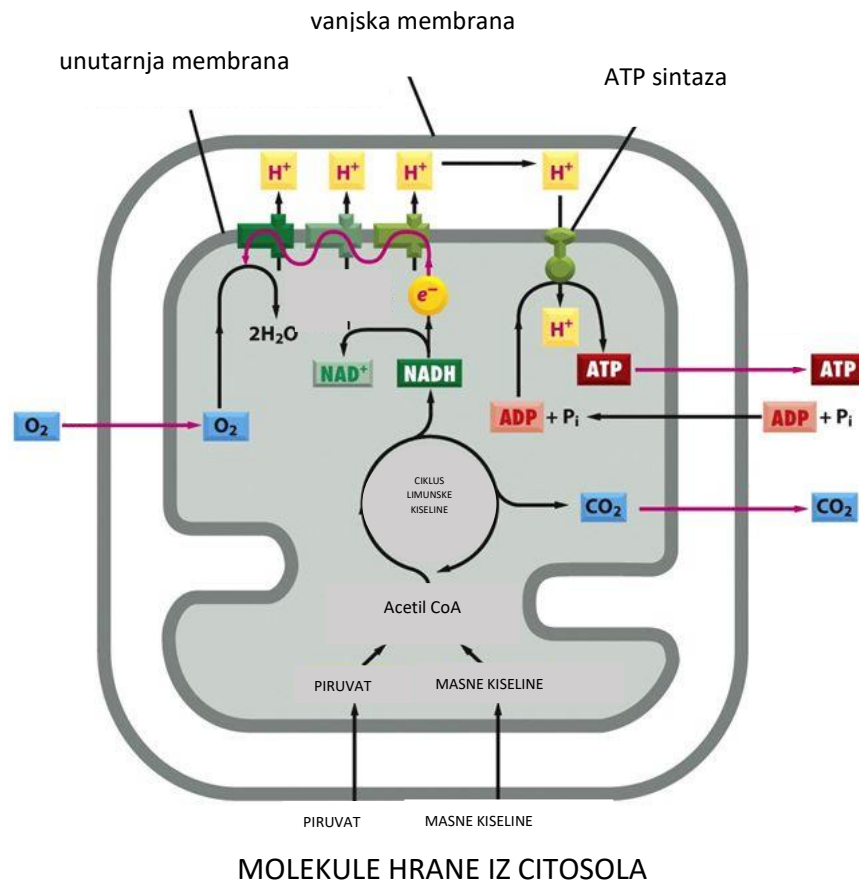
1. UVOD

1.1. Mitohondriji

Mitohondriji su stanični organeli čija je glavna biološka funkcija proizvodnja adenozin trifosfata (ATP) oksidacijskom fosforilacijom. Mitohondrije je otkrio švicarski histolog i fiziolog, Albert von Kölliker 1857. godine. Mitohondriji su ovalnog oblika, izuzetno pokretljivi u citoplazmi, fleksibilni te se povremeno stapaju (fuzija) i ponovno odvajaju (fisijsija). Veličina mitohondrija varira od 0,1 do 1 μm , a njihov broj po stanici se kreće od otprilike tisuću do deset tisuća, ovisno o tkivu. Ljudska stanica s najvećim brojem mitohondrija (više 100 000) je oocita (Cooper i Hausman, 2013). Mitohondriji se sastoje od unutarnje i vanjske membrane, međumembranskog prostora i središnjeg mitohondrijskog matriksa. Unutrašnja membrana invaginira kroz uske tubularne otvore tvoreći nabrane strukture, kriste koje ulaze u matriks. Postoje mjesta dodira unutrašnje i vanjske membrane, a glavna im je uloga prijenos proteina. Vanjska i unutrašnja membrana se razlikuju po molekularnom sastavu, što određuje i različite funkcije. Vanjska membrana sadrži velike količine porina koji tvore pore, kroz koje slobodno prolaze molekule do 5000 daltona, primjerice ioni, male molekule ATP i ADP. Prijenos većine većih molekula kroz vanjsku membranu katalizira enzimski protein translokaza. Većina mitohondrijskih proteina sintetizira se na slobodnim ribosomima u citoplazmi stanice, a njihov prijenos posredovan je signalnim molekulama. Matriks, koji se nalazi u unutarnjem prostoru, čini viskozna tekućina gušća od citoplazme s visokom koncentracijom enzima za oksidaciju piruvata i masnih kiselina, te za ciklus limunske kiseline. U matriksu se nalazi i genom mitohondrija, molekule RNA te razni proteini, enzimi i male molekule.

Mitohondriji oksidiraju hranjive tvari, proizvodeći oko 90 % stanične energije (Wallace i Chalkia, 2013). Glavni izvor energije je oksidativna razgradnja glukoze i masnih kiselina. Piruvat, nastao iz glukoze procesom glikolize, se u citosolu prenosi u mitohondrij, gdje oksidira do CO_2 uz otpuštanje velike količine energije (**Slika 1**). Prvom oksidacijskom reakcijom iz piruvata nastaje acetil koenzima A (acetil-CoA) koji ulazi u ciklus limunske kiseline te se u matriksu razgrađuje do

CO₂. K tome, u ciklusu se stvaraju visokoenergetski elektroni koje prenose molekularni nosači NAD⁺ (nikotinamid adenin dinukleotid) i FAD (flavin adenin dinukleotid). Oksidativna fosforilacija je proces koji se odvija na unutarnjoj membrani, gdje se nalazi preko 80 različitih polipeptida organiziranih u pet transmembranskih kompleksa. Oni služe za prijenos elektrona do molekularnog kisika, tijekom čega se stvara transmembranski elektrokemijski gradijent protona koji pokreće ATP-sintazu te proizvodnju ATP-a (Cooper i Hausman, 2013).



Slika 1. Metabolizam mitohondrija (preuzeto i prilagođeno iz: Alberts i sur., 2002)

Budući da su mitohondriji glavni izvor stanične energije, često su koncentrirani u tkivima gdje je važna konstantna i snažna opskrba energijom (npr. mišićno i živčano tkivo). Osim oksidativne fosforilacije, mitohondriji sudjeluju u regulaciji apoptoze, kontroli koncentracije kalcija u citosolu, glavni su izvor endogenih reaktivni kisikovih vrsta (RKV) te su odgovorni za biogenezu klastera željezo-sumpor (Stewart i Chinnery, 2015).

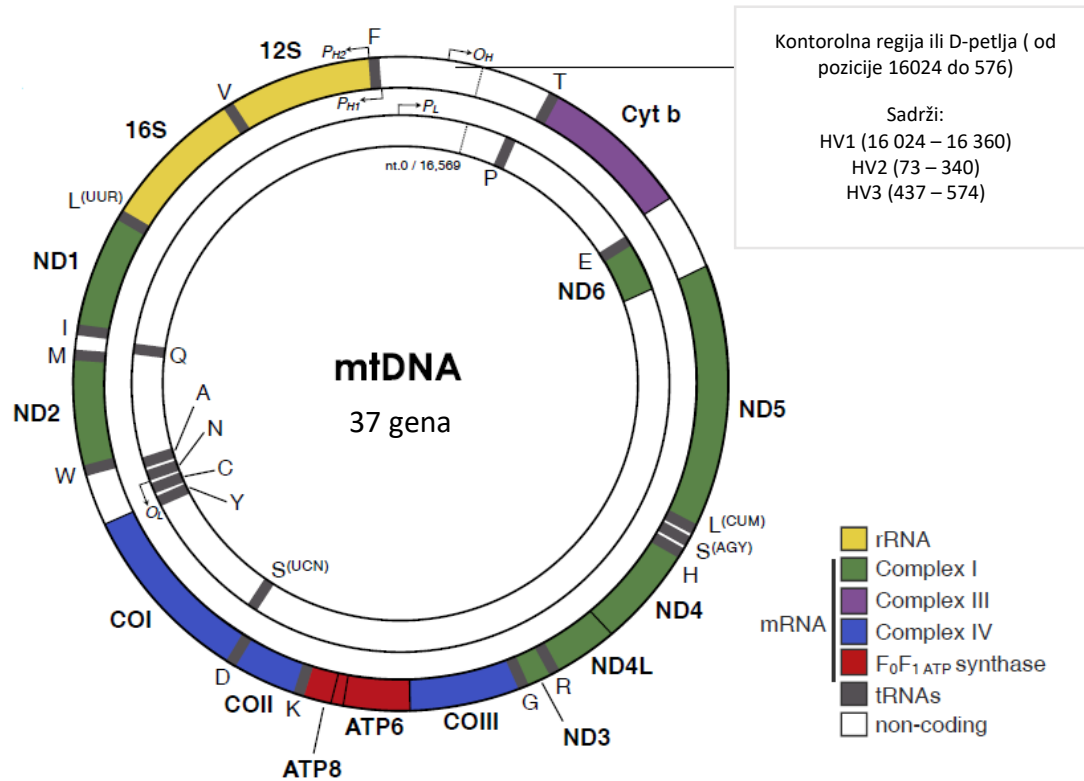
1.2. Mitohondrijska DNA

Mitohondriji su organeli koji imaju vlastiti genetički materijal, a to je kružna dvolančana molekula DNA. Smatra se da je u prošlosti veća eukariotska prastanica endocitozom unijela mikroorganizam, koji je s vremenom stupio u suživot s domaćinom. Došlo je do simbioze, a tijekom evolucije se većina genetičkog materijala pramitohondrija integrirala u genom jezgre eukariotske stanice. Ova hipoteza naziva se endosimbiotska, a predložila ju je Lynn Margulis 1967. godine. U prilog hipotezi govori postojanje dvostruke membrane i kružna molekula DNA koja nalikuje bakterijskoj te ima vlastitu ekspresiju i replikaciju.

Mitohondrijska DNA (mtDNA) čovjeka je približne veličine 16 569 parova baza i teška 10^7 daltona (Tannman, 1999), kodira za ključne proteinske komponente oksidativne fosforilacije, za sve ribosomske RNA (rRNA) mitohondrijskih ribosoma te za većinu transportnih RNA (tRNA) potrebnih za sintezu mitohondrijskih proteina (Cooper i Hausman, 2013) (**Slika 2**). Unatoč visokom stupnju neovisnosti, mitohondriji uvelike ovise o proteinskim produktima gena jezgre DNA, koji upravljaju procesima replikacije i transkripcije mitohondrijskog genoma (Tannman, 1999). Mitohondrijska DNA je kompaktna, sastoji se od dva lanca koji se razlikuju po gustoći zbog različitog GC sastava. Teški lanac (engl. *heavy*) sadrži više informacija, nosi gene za dvije rRNA (12S i 16S), 12 polipeptida i 14 tRNA dok lagani (eng. *light*) lanac sadrži gene za osam tRNA i jedan polipeptid. Svih 13 proteinskih produkata grade enzimski kompleks za sustav oksidativne fosforilacije (Tannman, 1999). Uz to, genom sadrži nekodirajući segment veličine 1121 pb pod nazivom kontrolna regija odnosno D-petlja (**Slika 2**). To je područje inicijacije replikacije i promotorskih regija za transkripciju (Cooper i Hausman, 2013).

Mitohondrijska DNA izolirana iz uzroka ženske osobe zapadnoeuropske biogeografske pripadnosti prvi puta je izolirana i sekvencirana 1981. godine na Sveučilištu u Cambridgeu. Dobivena sekvenca je nazvana referentnom (engl. *Cambridge Referent Sequence, CRS*) (Anderson i sur., 1981), s namjerom da se koristi kao ishodište za usporedbu s naknadno sekvenciranim uzorcima. Referentna sekvenca je revidirana 1999. godine zbog grešaka prilikom prvog sekvenciranja te je prvobitni naziv promijenjen u rCRS (engl. *revised CRS*). Revidirana sekvenca se

do danas koristi kao referenca u odnosu na koju se izražavaju svi sekvencirani mitohondrijski genomi čovjeka (Andrews i sur., 1999).

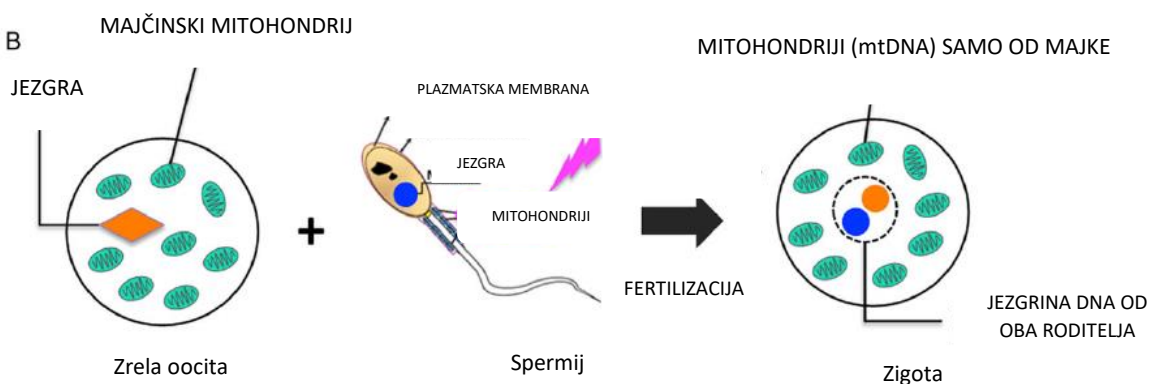


Slika 2. Ljudski mitohondrijski genom (preuzeto i prilagođeno iz: Picard i sur., 2016)

Nedostatak histona, smanjena preciznost mehanizma popravka DNA i mtDNA polimeraze te konstantna izloženost reaktivnim kisikovim vrstama pogoduju mutacijskim događajima koji su u mitohondrijskom genomu otprilike 10-17x učestaliji u usporedbi s jezgrinim genomom (Tuppen i sur., 2010). Mutacijske promjene u populaciji se manifestiraju kao polimorfizmi (dva ili više različitih fenotipova u populaciji) jednog nukleotida (engl. *single nucleotid polymorphism*, SNP) ili kao indel polimorfizmi¹ (van Oven i Kayser, 2009). Najviše polimorfizama se nalazi u hipervarijabilnim segmentima (HV1, HV2 i HV3) kontrolne regije mtDNA (Lutz i sur., 2000) (Slika 2). Zbog velike informativnosti na relativno kratkom odsječku DNA, hipervarijabilni segmenti se već desetljećima koriste u forenzičkim, antropološkim i medicinskim istraživanjima.

¹ Indel je insercija ili delecija baza u genom organizma

Budući da mitohondriji sadrže dvije do deset molekula mtDNA, a svaka stanica može sadržavati i više od tisuću mitohondrija (Elson i sur., 2001), broj kopija mtDNA u tkivu znatno premašuje broj alela u jezgrinom genomu (čak više stotina ili tisuća puta) (Stewart i Chinnery, 2015). Mitohondrijska DNA se nasljeđuje isključivo od majke, što rezultira istom ili u slučaju mutacije, vrlo sličnom nukleotidnom sekvencom mtDNA u svih potomaka jedne žene (Case i Wallace, 1981). Shodno tome, moguće je pratiti srodnike po majčinskoj liniji te u tom slučaju govorimo o mtDNA kao matrilinearnom molekularnom biljevu, što je direktna posljedica načina nastanka zigote u ljudi. Naime, jajna stanica sadrži oko sto tisuća mitohondrija, dok spermiji za potrebe pokretanja u vratu i repu sadrže njih svega 50 do 70. Tijekom oplodnje, u jajnu stanicu ulazi samo jezgra i mali dio citoplazme, a potencijalni zaostatak mitohondrija spermija se aktivno uništava (Slika 3).

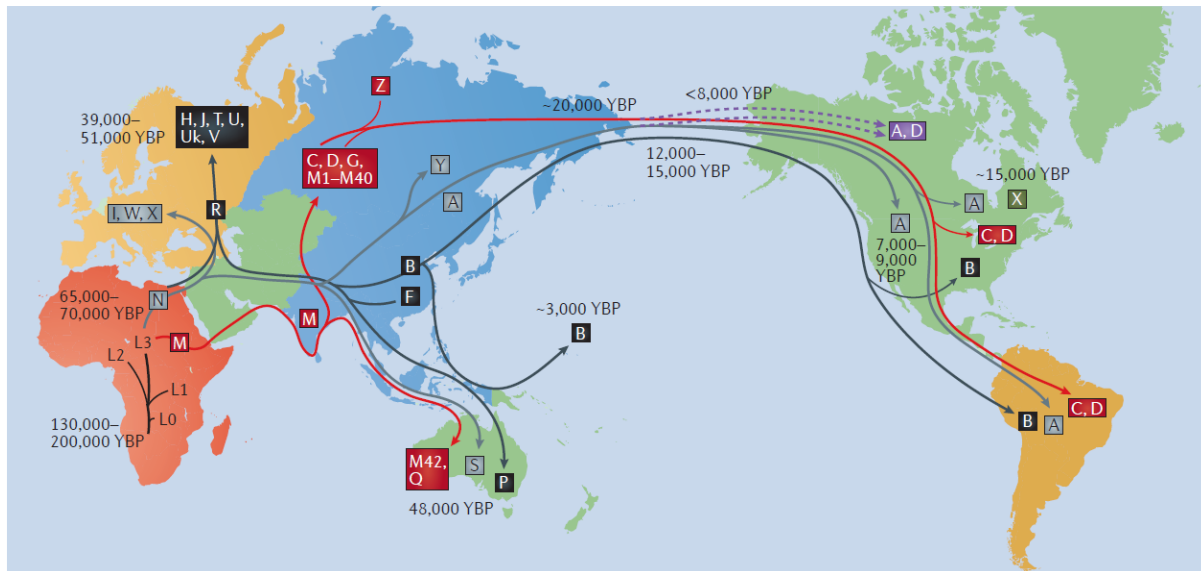


Slika 3. Prikaz mehanizma majčinskog nasljeđivanja mitohondrija tijekom oplodnje (preuzeto i prilagođeno iz: Craven i sur., 2017)

1.3. Mitohondrijske haplogrupe

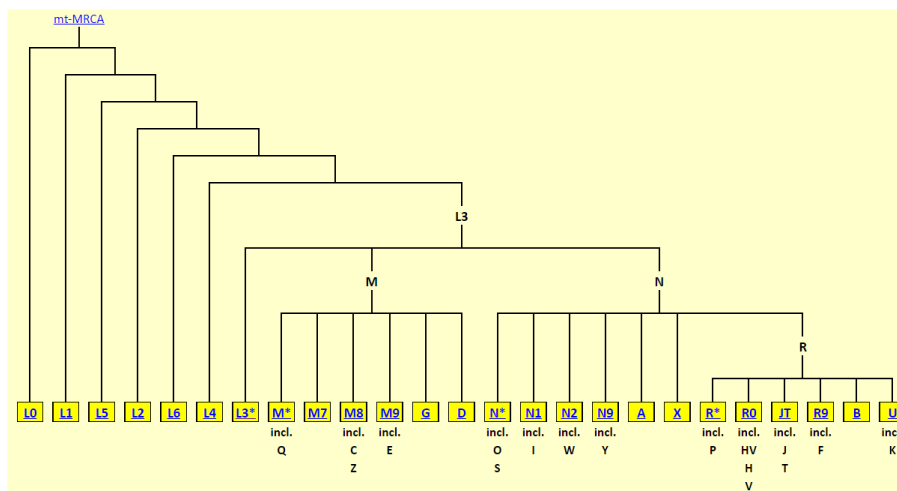
Nukleotidna sekvenca mtDNA se tijekom evolucije u populaciji postepeno mijenjala uslijed nakupljanja mutacija koje su se prenosile na potomstvo putem ženskih predaka. Sekvenca mtDNA svake osobe određuje individualni haplotip koji se izražava kao razlika u nukleotidnim pozicijama u odnosu na sekvencu rCRS. Osobe srodnih haplotipova sa sličnom kombinacijom pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama i indela naslijeđenih preko zajedničkog ženskog pretka pripadaju jednoj haplogrupi (Mitchell i sur., 2014). Sve do danas poznate haplogrupe su derivat izvorne mitohondrijske sekvence jedne žene koja je prije otprilike 200 000 godina živjela na području

afričkog kontinenta (Mitohondrijska Eva, najbliži zajednički predak svih modernih ljudi po majčinoj liniji) (Wallace i Chalkia, 2013). Naime, kako su se događale nove mutacije, tako su rasle nove grane filogenetskog stabla mtDNA. Dakle, ukoliko bi određena mutacija promijenila mitohondrijsku fiziologiju u korist populacije koja se naselila na novo regionalno područje, novonastali genotip bi opstao. Naknadne bazne supstitucije kod potomaka stvorile bi grupu povezanih regionalnih haplotipova oblikujući haplogrupu. Stoga je populacija svakog kontinenta i geografske regije povezana sličnom sekvencom mtDNA (Wallace i Chalkia, 2013). Svi afrički mitogenomi pripadaju makrohaplogrupi L, koja je specifična za kontinent i nastala je prije 130000 do 200000 godina. Afrički korijen je izvorni za četiri afričke linije: L0, L1, L2 i L3. Linija L3 se razgranala u haplogrupe M i N koje su dalje migrirale iz Afrike po cijelom svijetu. Haplogrupa M se proširila u južnu Aziju te dospjela čak do Australije. Kasnije su potomci haplogrupe M migrirali u sjevernu Aziju, iz koje su u centralnoj Aziji nastale haplogrupe C, D, G i M1-M20. Afrička haplogrupa N proširila se u dva smjera: u prvom kroz Australiju i južnu Aziju do centralnog i sjevernog dijela Azije formirajući haplogrupe A i Y, a u drugom kroz sjevernu Afriku do Europe formirajući grupe I, W i X. U zapadnom dijelu Euroazije, N je formirala submakrohaplogrupu R koja se dalje proširila po Europi na ogranke H, J, T, U, Uk i V, a u Aziji je formirala haplogrupe B i F (**Slika 4**). Prikazane evolucijske promjene mtDNA podudaraju se s velikim povijesno-geografskim migracijama ljudi po kontinentima. Zanimljiva je činjenica da sekvenca mtDNA iz haplogrupe N, koja je migrirala direktno iz Afrike u sjevernu Europu, nosi dvije polipeptidne varijante povezane s promjenama u mitohondrijskom membranskom potencijalu i metabolizmu Ca^{2+} . Ove varijante mijenjaju učinkovitost mitohondrijske oksidativne fosforilacije, uzrokujući povećanje sagorijevanja kalorija tako da se proizvodi više ATP-a za zagrijavanje. Naime, kalorija je jedinica topline te njeno sagorijevanje povisuje tjelesnu temperaturu kao odgovor na toplinski stres u hladnijim, sjevernijim područjima (Wallace i Chalkia, 2013).



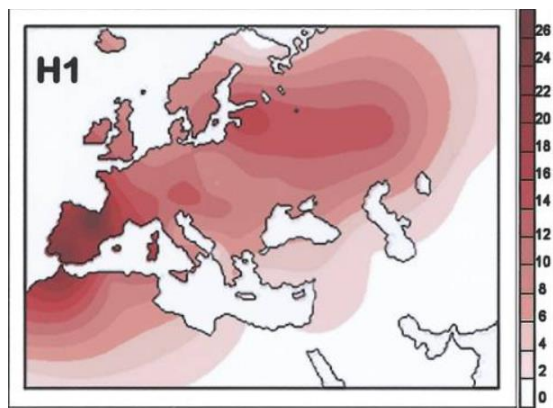
Slika 4. Migracija ljudske populacije i glavne haplogrupe mtDNA (YBP – engl. years before present, godina prije sadašnjosti) (preuzeto iz: Stewart i Chinnery, 2015)

Prva otkrivena mtDNA haplogrupa američkih domorodaca (Torrioni i sur., 1993) je dobila naziv haplogrupa A, no filogenetski nije najstarija, već su haplogrupe dobivale imena po abecedi redom kako su opisivane. Grafički se haplogrupe prikazuju pomoću filogenetskog stabla, *PhyloTree* (van Oven i Kayser, 2009) (**Slika 5**) koje se periodički ažurira u skladu s novo sekvenciranim mitohondrijskim segmentima. Filogenetsko stablo trenutno obuhvaća 5400 haplogrupa s popisom varijanti za svaki ogranak.



Slika 5. Prikaz pojednostavljenog filogenetskog stabla (verzija 17) i upotreba abecednih slova za haplogrupe (preuzeto s: <https://www.phylotree.org/tree/index.htm>)

Haplogrupa H je najčešća i najraznolikija linija u Europi s učestalošću između 40% i 50%. Haplogrupa H1 je najzastupljenija u Europi i pokriva otprilike pola zapadne Europe (Roostalu i sur., 2007). Nastala je prije otprilike 22 500 godina i razvila se u 65 ogranaka. Osim u Europi, H1 se još može naći u Sjevernoj Africi, Levantu, Anatoliji, Kavkazu, Centralnoj Aziji i Sibiru (**Slika 6**). U hrvatskoj populaciji učestalost haplogrupe H je 36%, što ju čini najučestalijom. Najzastupljenije submakrohaplogrupe unutar haplogrupe H su H1 i H5 (neobjavljeni rezultati Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“).

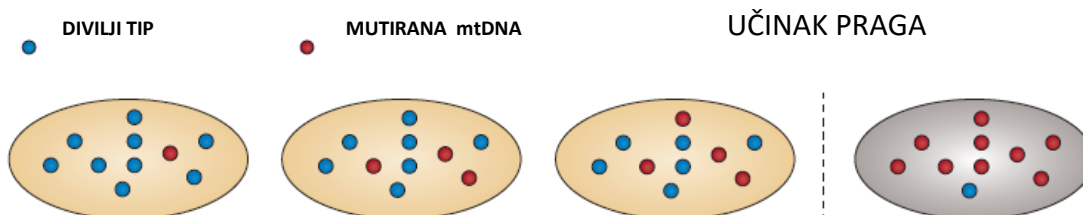


Slika 6. Prostorna raspodjela haplogrupe H1 (preuzeto iz: Achilli i sur., 2004) (sklala u postocima, svjetlije - manja učestalost, tamnije - veća učestalost)

1.4. Mitohondrijske heteroplazmije

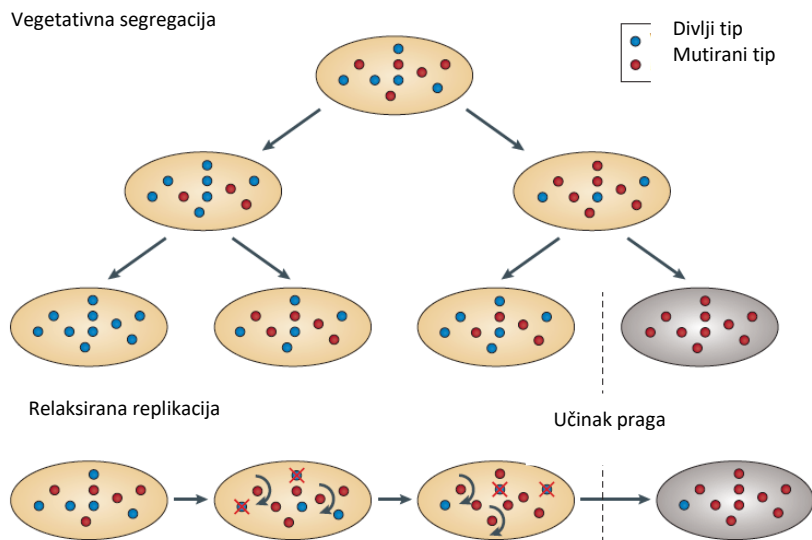
Mutacijski događaji na razini pojedinca se manifestiraju kao mitohondrijske heteroplazmije. Suprotno tome su homoplazmije, koje se definiraju kao pojava identičnih molekula mtDNA u istoj stanici, tkivu ili organizmu, a slučaj da postoji dvije ili više međusobno vrlo sličnih molekula mtDNA naziva se heteroplazmija. Razlikuju se dva razreda heteroplazmije, jedan podrazumijeva razliku u jednom nukleotidu (točkasta supstitucija), dok se drugi odnosi na razliku u duljini ponavljajućih nukleotidnih sljedova. Potonji, za razliku od polimorfizama jedne baze, nemaju utjecaja na divergenciju haplogrupa (Amorim i sur., 2019). Heteroplazmije su izuzetno zanimljive u medicini s obzirom da se patogene mutacije vrlo često nalaze u heteroplazmijskom obliku (mješavina mtDNA koje nose mutaciju i mtDNA divljeg tipa), kod kojeg je nužno da udio patogene mutacije prijeđe kritični prag, kako bi se bolest manifestirala (**Slika 7**) (Tuppen i sur., 2010). Spomenuti prag nije univerzalan, već ovisi o patogenom potencijalu mutacije i vrsti pogođenog

tkiva. Najčešće se kreće u rasponu od 60% do 90% mutirane varijante u odnosu na divlji tip (Tuppen i sur., 2010).

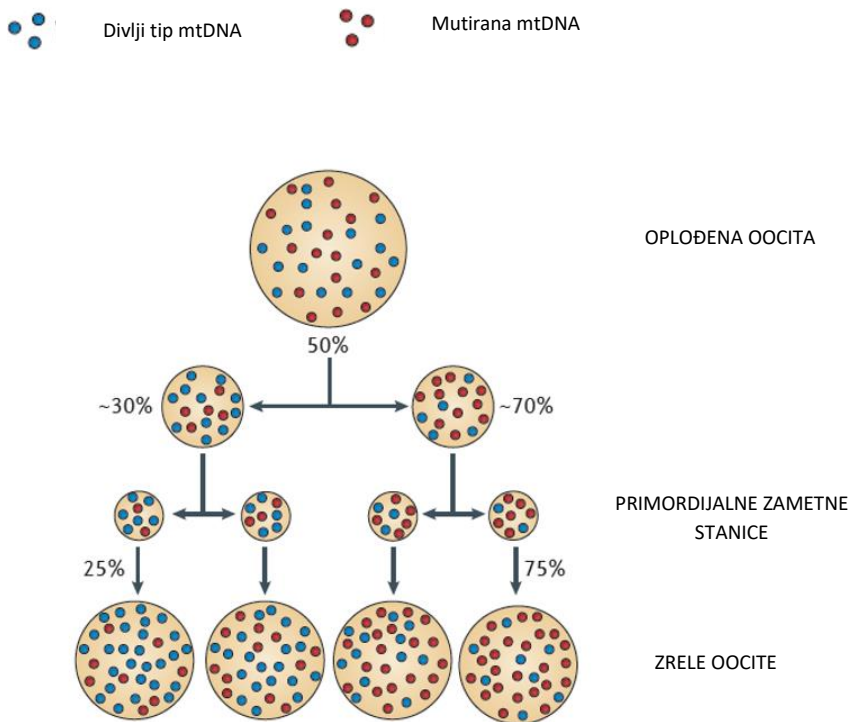


Slika 7. Prikaz učinka praga (preuzeto i prilagođeno iz: Stewart i Chinnery, 2015)

Heteroplazmije mogu biti sporadične (javljaju se i ekspaniraju u pojedinim tkivima tijekom života) ili mogu biti nasljedne te prisutne u većini ili svim tkivima osobe, uključujući i zametnu liniju (potencijal za prenošenje na potomke). Heteroplazmijske mutacije ekspaniraju kroz nasumični proces mitotičke segregacije, u slučaju kada stanica kćer naslijedi veći broj mutiranih mtDNA. Usporedno s ekspanzijom mutacija dolazi do narušavanja bioenergetske funkcije mitohondrija, a zbog nasumičnosti procesa, u raznim tkivima dolazi do fenotipske složenosti patološkog stanja (Wallace i Chalkia, 2013). Mozak je najosjetljiviji na djelomične bioenergetske nedostatke, zatim slijede mišići, jetra i endokrini sustav (Wallace, 2005). U postmitotičkim tkivima raste mutacijsko opterećenje ukoliko mutirane molekule mtDNA klonalno ekspaniraju kroz procese relaksirane ili pak selektivne replikacije (**Slika 8**). Posebna situacija ekspanzije heteroplazmijskih mutacija se događa tijekom oogeneze, uslijed nasumičnog genskog pomaka. Naime, u primordijalnim zametnim stanicama dolazi do izrazitog smanjenja kopija mtDNA (takozvani učinak uskog grla), što ubrzava stopu vegetativne segregacije (**Slika 9**). Na taj način zdrava majka kod koje je u oociti ekspandirala patogene mutacije, može imati potomke pogođene mitohondrijskom bolešću.



Slika 8. Prikaz učinka vegetativne segregacije i relaksirane replikacije na heteroplazmije mtDNA (preuzeto i prilagođeno iz: Stewart i Chinnery, 2015)



Slika 9. Prikaz učinka uskog grla uslijed smanjenja broja molekula mtDNA u primordijalnim zametnim stanicama s posljedičnim povećanjem stope vegetativne segregacije (preuzeto i prilagođeno iz: Stewart i Chinnery, 2015)

1.5. Mitohondrijske bolesti

Mitohondrijske bolesti su grupa klinički heterogenih poremećaja zajednički definiranih nedostatkom stanične energije zbog greške u oksidacijskoj fosforilaciji (Tuppen i sur., 2010). U nastanak mitohondrijskih bolesti uključen je jezgrin i mitohondrijski genom, što ih čini izuzetno kompleksnima. Godine 1988. je prvi puta opisana direktna uzročno-posljedična povezanost mutacije mitohondrijskog genoma s bolešću. Tada je pacijentu s miopatijom otkrivena patogena delecija mtDNA (Holt i sur., 1990) te se od tog trena ulaže značajan trud u kategorizaciju golemog niza genetičkih varijacija i oštećenja molekule mtDNA koje uzrokuju bolesti. Homoplazmične točkaste mutacije mtDNA obično pogađaju organ ili tkivo, dok heteroplazmične pogađaju više organskih sustava, najčešće mozak i leđnu moždinu, periferne živce, srce i endokrine organe (Stewart i Chinnery, 2015). Na kliničku manifestaciju mitohondrijskih bolesti, a posebno ako su one homoplazmične delecije mtDNA, utječe okoliš i epistatski² faktori (Stewart i Chinnery, 2015). Klinički sindromi povezani s mutacijama mtDNA su izuzetno promjenjivi i mogu se pojaviti u bilo kojoj fazi života. Mutacije mtDNA mogu biti nasljedne ili sporadične. Nasljedne mutacije pogađaju sva ili gotovo sva tkiva. Nasuprot njima su sporadične mutacije koje se dogode u tijelu tijekom života i tipično su tkivno ovisne (zahvaćeno je jedno ili nekoliko tkiva).

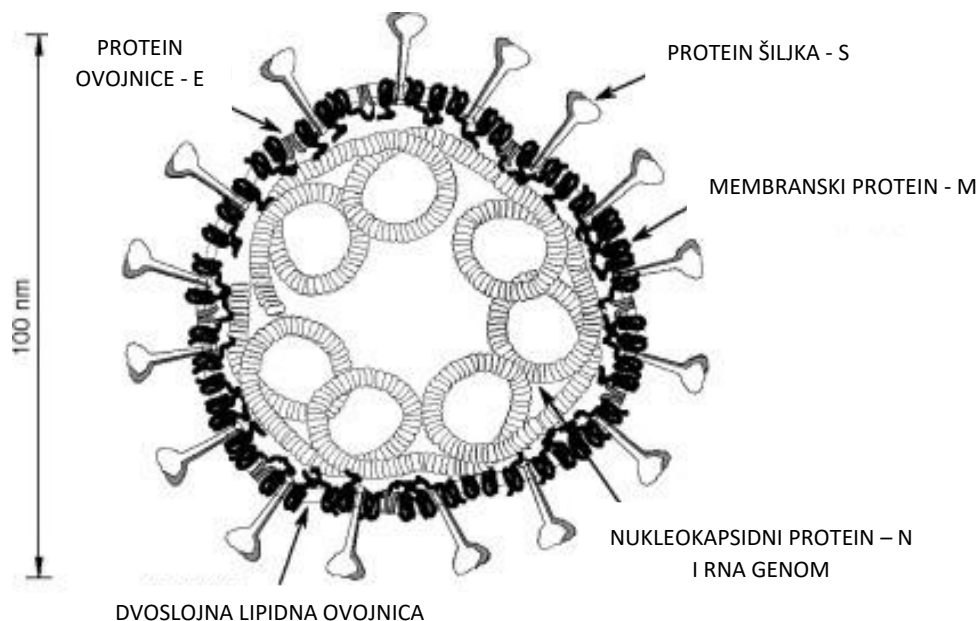
1.6. Koronavirusi i SARS-CoV-2

Koronavirusi najčešće uzrokuju zaraze respiratornog i probavnog trakta te su općenito klasificirani u četiri glavna roda: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* i *Deltacoronavirus* (Li, 2016). *Alfa-* i *Beta-koronavirusi* zaražavaju sisavce, dok *Gamma* i *Delta-koronavirusi* ptice (Tang i sur., 2015). *Betakoronavirusi* uzrokuju teške bolesti i mnogo smrtnih slučajeva, dok *alfakoronavirusi* djeluju asimptomatski ili s umjerenim simptomima (Velavan i Meyer, 2020).

² Epistaza je fenomen u kojem učinak mutacije gena ovisi o prisutnosti ili odsutnosti mutacije u jednom ili više drugih gena

Novi respiratorni sindrom povezan s koronavirusom nedavno se pojavio u ljudskoj populaciji kao ozbiljni patogen koji uzrokuje visoki morbiditet i znatnu smrtnost. Uzročnik je virus SARS-CoV-2 (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*), a bolest koju uzrokuje je COVID-19 (engl. *Coronavirus disease*). SARS-CoV-2 je jednolančani RNA virus pozitivnog smisla, koji kodira za više od 28 proteina, uključujući četiri strukturalna proteina, 16 ne strukturalnih proteina (NSP1-NSP16) i osam pomoćnih proteina (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b i ORF14) (Gordon i sur., 2020). Četiri glavna strukturalna proteina su glikoprotein koji nalikuje šiljku (engl. *spike*, S), mali protein ovojnice (engl. *envelope*, E), protein membrane (M) i nukleokapsidni protein (N) (**Slika 10**). Glikoprotein nalik šiljku (S protein) izražen je na površini virusne čestice i daje karakterističan oblik krune (lat. *corona* - kruna) po kojoj je čitava virusna porodica dobila ime (lat. *Coronaviridae*). Ključna mu je uloga vezanje za receptore na domaćinskoj stanici (Zhu i sur., 2018). SARS-CoV-2 kao glavni receptor za vezanje koristi angiotenzin konvertaza 2 (engl. *angiotensin-converting enzyme 2*, ACE2) (Ge i sur., 2013). Receptori ACE2 najviše su prisutni na membranama pneumocita u plućima, enterocitima u tankom crijevu i sekretornim stanicama u nosu (Drak Alsibai, 2020). S protein se sastoji od podjedinica S1 i S2. S1 sadrži amino-terminalnu domenu i veznu domenu za receptor (engl. receptor-binding domain, RBD) (Zirui Tay i sur., 2020). Podjedinica S2 se sastoji od regije za fuzioniranje peptida i dvije regije peptidnog ponavljanja: HR1 i HR2 (He i sur., 2004; Bosch i sur., 2004).

Genom koronavirusa je veličine između 26 000 i 32 000 baza (Fehr i Perlman, 2015), a osim strukturalnih proteina kodira i za mnoge proteine koji imaju ulogu u replikaciji i sklapanju virusnih čestica. Potonji sudjeluju u virusnoj patogenezi i mijenjaju regulaciju transkripcije, aktivnost helikaza, imunomodulaciju, aktivaciju gena i sprečavaju antivirusni odgovor (Alsaadi i Jones, 2019; Tang i sur., 2020).



Slika 10. Prikaz strukture koronavirusa i njegovih glavnih strukturnih proteina (pruzeto i prilagođeno iz: Masters, 2006)

1.7. COVID-19

Bolest uzrokovana koronavirusom COVID-19 (engl. **Coronavirus disease**) je zoonoza³ koja se proširila iz grada Wuhana u Kini, u prosincu 2019. godine. Kao najvjerojatnije izvor zaraze navodi se veletržnica živežnim namirnicama koja između ostaloga trguje divljim životinjama. Do danas je COVID-19 pokazao visok i morbiditetni i mortalitetni učinak. Stoga je Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) 11. ožujka 2020. godine proglasila pandemiju⁴ te se svakodnevno ulaže značajan trud u istraživanje samog virusa i bolesti koju izaziva. Virus je izrazito zarazan i prenosi se izravno kapljičnim putem ili neizravno kontaktom s objektima koje je koristila ili dirala zaražena osoba. Prosječno je potrebno pet do šest dana do pojave simptoma nakon infekcije virusom (https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_3). Simptomi su najčešće temperatura, suhi kašalj, umor i glavobolja, a rjeđe poteškoće u disanju, bol u mišićima i zglobovima, glavobolja, vrtoglavica, proljev, mučnina, krvavi kašalj te gubitak okusa i mirisa (Zirui Tay i sur., 2020). Pacijenti s teškom infekcijom i ozbiljnom kliničkom slikom COVID-19 kod kojih se javlja otežano disanje, mogu razviti

³ Zoonoza je zarazna bolest koja se može prenositi sa životinje na čovjeka i obratno

⁴ Pandemija je širenje zarazne bolesti u širokim zemljopisnim regijama, kontinentalnih ili globalnih razmjera

akutni, u nekim slučajevima i smrtonosni respiratorni sindrom (Zirui Tay i sur., 2020). Široki raspon simptoma bolesti dovodi do pitanja postoje li određene rizične skupine ljudi koje su češće zahvaćene težom kliničkom slikom. Centar za kontrolu bolesti i prevenciju (engl. *Center for Disease Control and Prevention*, CDC) navodi astmu, kronične bolesti bubrega, rak, kronične bolesti pluća, dijabetes, srčane bolesti, demenciju, Dawnov sindrom, trudnoću, bolesti jetre, prekomjernu težinu i pretilost, kao rizične čimbenike za razvoj teškog oblika COVID-19 (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html>).

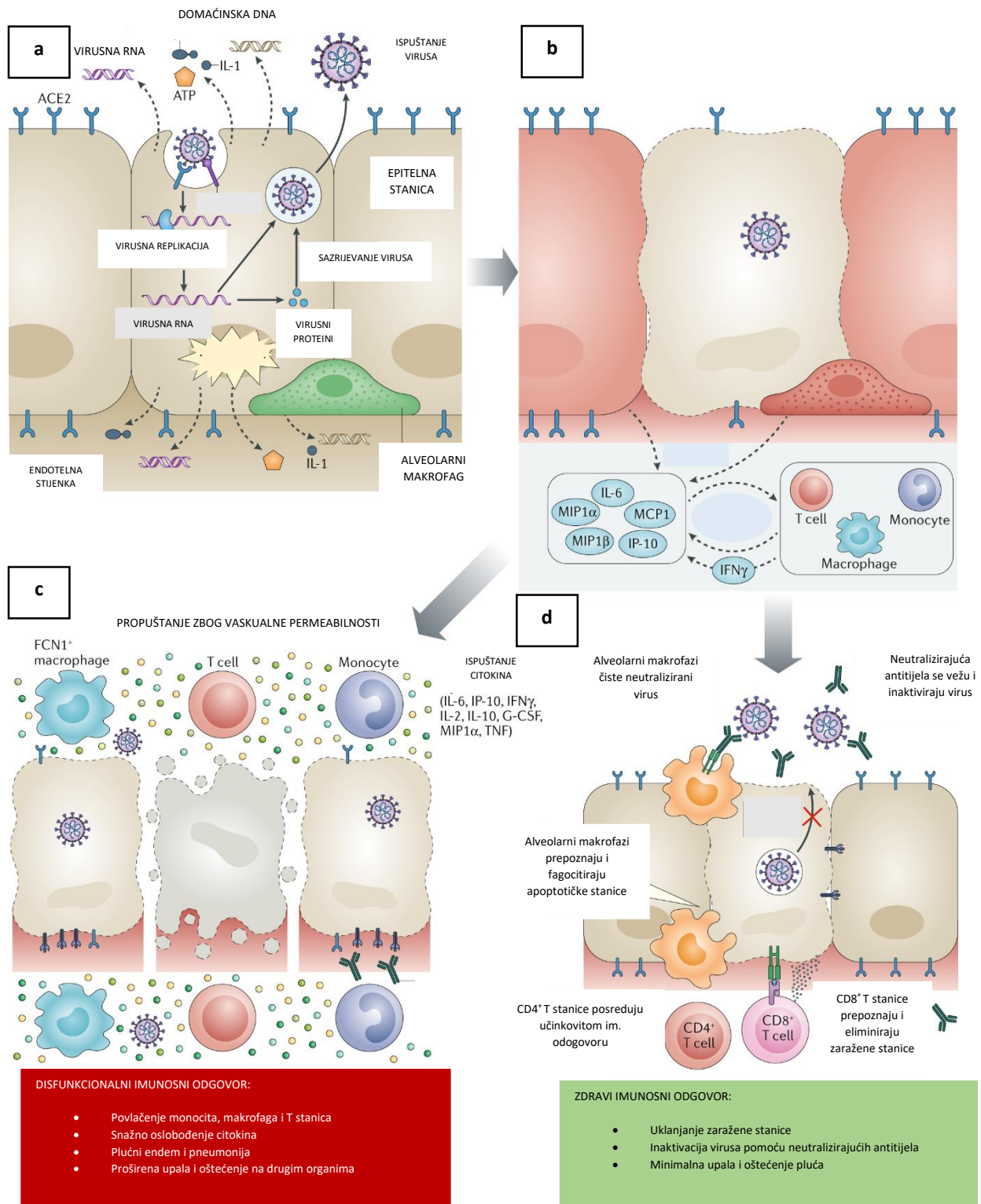
1.8. Imunosni odgovor na SARS-CoV-2

Virusi su obligatni paraziti čiji životni ciklus ovisi o stanicama domaćina kojeg su inficirali, pri čemu uzrokuju znatne promjene u staničnoj i fiziološkoj funkciji (Thaker i sur., 2019). SARS-CoV-2 ulazi u tijelo kroz nos, oči ili usta gdje se protein šiljka veže za ACE2 receptore koji su visoko izraženi na pneumocitima tipa 2 u alveolama pluća (**Slika 11a**). S protein svojom S1 podjedinicom koja sadrži domenu za vezanje za receptora (engl. receptor-binding domain, RBD) (Zirui Tay i sur., 2019) se veže za ACE2 na domaćinskoj stanici nakon čega počinje proces zaraze (Zhou i sur., 2020). Dakle, RBD se veže za ACE2 koji pokreće endocitozu SARS-CoV-2 (Simmons i sur., 2005). Druga podjedinica S2 sastoji se od regije za fuzioniranje peptida i dvije regije peptidnog ponavljanja: HR1 i HR2 (He i sur., 2004; Bosch i sur., 2004). Unutar endosoma, podjedinica S1 se cijepa, izlažući fuzijski peptid koji se ubacuje u membranu domaćina. Dok se regija S2 savija tako da spoji HR1 i HR2, što dovodi do fuzije membrane i otpuštanja virusne jedinice u citoplazmu domaćina (Zirui Tay i sur., 2019). SARS-CoV-2 unutar citoplazme domaćina ispušta lanac RNA pozitivnog smisla, koji je odmah spreman za replikaciju pomoću RNA polimeraze ovisne o RNA. Osim toga, RNA pozitivnog smisla se translatira kako bi se sintetizirali virusni proteini potrebni za stvaranje novih virusnih čestica. Naime, nakon replikacije se novosintetizirana RNA pakira u ovojnici te kao novonastala virusna čestica izlazi iz stanice domaćina egzocitozom. Cijeli proces replikacije i otpuštanja virusa uzrokuje programiranu staničnu smrt uz otpuštanje specifičnih molekularnih

obrazaca povezanih s oštećenjem⁵ (engl. *damage-associated molecular patterns- DAMP*) (Nailwal i Chan, 2019). Susjedne epitelne stanice, endotelne stanice i alveolarni makrofazi prepoznaju promjene te pokreću proizvodnju upalnih citokina i kemokina (uključujući IL-6, IL-10, makrofagni upalni protein 1 α –MIP1 α , MIO1 β i MCP1) i izražaj virusnih antigena (Kulkarni i sur., 2020). Proteini privlače monocite, makrofage i T stanice koji promiču daljnju upalu i uspostavljaju protuupalnu povratnu spregu. Kod poremećenog imunosnog odgovora (**Slika 11c**) moguće je nakupljanje imunskih stanica u plućima koje uzrokuju prekomjernu proizvodnju upalnih citokina i posljedično oštećenje plućnog tkiva. Takozvana citokinska oluja može doprijeti i do ostalih organa te uzrokovati njihova oštećenja. Međutim, kod zdravog imunosnog odgovora (**Slika 11d**), početna upala uzrokovana virusom privlači virus-specifične T stanice koje mogu ukloniti zaraženu stanicu prije širenja virusa. Neutralizirajuća antitijela mogu prepoznati virus i blokirati ga, što prepoznaju alveolarni makrofazi te ga fagocitiraju. Sve zajedno dovodi do uklanjanja virusa s minimalnim oštećenjem pluća te oporavkom (Zirui Tay i sur., 2020).

Vezano za samu bolest COVID-19, zanimljiva je činjenica različite stope smrtnosti između muškaraca (2,8%) i žena (1,7%) (Epidemiology Working Group for NCIP Epidemic Response, 2020). Budući da je ACE2 smješten na kromosomu X, moguća je prisutnost različitih alela koji potencijalno pružaju i veći raspon zaštite, što bi moglo objasniti manju stopu smrtnosti žena. Osim toga, spolni hormoni, estrogen u žena i testosteron u muškaraca, imaju drugačiju imunoregulatornu funkciju, koja može utjecati na bolju imunostnu zaštitu te posljedično blaži oblik bolesti kod ženskih pacijenata (Taneja, 2018).

⁵ Molekularni obrasci povezani s oštećenjem su molekule unutar stanica, koje su sastavni dio urođenog imunosnog odgovora, oslobođene iz oštećenih ili umirućih stanica zbog traume ili infekcije patogenom



Slika 11. Kronološki prikaz zaraze SARS-CoV-2 (preuzeto i prilagođeno iz: Zirui Tay i sur., 2019)

1.9. Uloga mitohondrija u virusnim zarazama

Mitohondriji su tijekom virusne infekcije, djelovanjem virusnih proteina, izloženi fiziološkim promjenama kao što su oksidativni stres, stres endoplazmatskog retikuluma te disregulacija kalcija u homeostazi (Asha i Sharma-Walia, 2018; Thaker i sur., 2019). Disfunkcija mitohondrija dovodi do ozbiljnih fizioloških posljedica koje mogu pridonijeti nastanku neurodegenerativnih i malignih bolesti, upale, metaboličkih sindroma i srčane disfunkcije te osjetljivosti na virusne bolesti (O'Neill i sur., 2016; Chen i sur., 2018). Osim navedenoga, virusi narušavaju i obrambenu funkciju mitohondrija koji imaju sposobnost tranzicije iz metabolizma oksidativne fosforilacije u glikolizu, koja se aktivira putem receptora za prepoznavanje uzorka (engl. *pattern recognition receptors-PRR*). Glikolitički način metabolizma priprema stanice za borbu protiv patogena, stoga virusi ometanjem metaboličke tranzicije direktno nanose štetu zaraženom domaćinu (Banoth i Cassel, 2018; Elesela i Lukacs, 2021). Usprkos mnogim antivirusnim mehanizmima domaćina, virusi i dalje preživljavaju pomoću vrlo učinkovitih strategija preživljavanja. Jedan od primjera je replikacija virusnog genoma unutar domaćinske stanice, što onemogućuje prepoznavanje pomoću membranskih receptora i posljedični odgovor imunskog sustava.

1.10. Povezanost virusnih zaraza i mitohondrijskih genoma

Budući da je općenito dokazana povezanost virusne infekcije s mitohondrijskom funkcijom, postoji mogućnost povezanosti varijanti mtDNA s progresijom virusne bolesti. Kao ključni regulator apoptoze i imunskog odgovora domaćina, mitohondrij je glavna meta virusa koji su razvili strategije sprečavanja virusne supresije putem apoptoze ili uključivanja u mitohondrijske puteve s ciljem uništenja stanica imunskog sustava. Jedan od takvih virusa je virus ljudske imunodeficijencije 1 (engl. *human immunodeficiency virus*, HIV), koji je povezan s promjenama u oksidativnoj fosforilaciji, proizvodnji RNV-a i apoptozi. Hendrickson i suradnici (2008) su proveli istraživanje na uzorku od 1833 HIV-1 pozitivnih Amerikanaca zapadno-euroazijskog porijekla te povezali njihove mitohondrijske haplogrupe s progresijom sindroma stečene imunodeficijencije (engl. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*, AIDS). Pokazali su da su haplogrupa J i U5a bile zastupljenije među HIV-1 pozitivnim osobama koje su bile pogođene ubrzanom progresijom

AIDS-a i smrću. S druge su pak strane haplogrupe Uk, H3 i IWX bile zastupljenije kod osoba sa sporijom progresijom i produljenim preživljavanjem (Hendrickson i sur., 2008).

Nadalje, Campo i suradnici (2016) su pokazali su da virus hepatitisa C (engl. *hepatitis C virus*, HCV) kod pacijenata s kroničnom bolešću ima veći prosječni broj nukleotidnih razlika u odnosu na nukleotidne razlike kod zdravih osoba, promatrano na mtDNA izoliranoj iz krvne plazme. Smanjenje nukleotidnih razlika su primijetili nakon terapije interferonom i ribavirinom, što ukazuje na reverzibilni učinak te da baš to svojstvo može poslužiti kao neinvazivni biomarker za određivanje stupnja zaraze HCV-a (Campo i sur., 2016).

Slično tomu, Li i suradnici (2018) se proveli istraživanje učinka virusa hepatitisa B (engl. *hepatitis B virus*, HBV), na mitohondrije i na osjetljivost domaćina. Istraživali su povezanost između kronične HBV zaraze i mtDNA u pokrajini Yunnan (jugozapad Kine). U istraživanju su sudjelovali pacijenti s kroničnom HBV zarazom, ljudi koji nisu nikad bili zaraženi HBV-om i ljudi koji su se spontano izliječili od HBV-a. Primijetili su veću učestalost haplogrupe D5 kod ljudi s kroničnom HBV zarazom, te stavili naglasak na haplogrupe kao mogući biomarker za prepoznavanje oblika bolesti ili samo liječenje (Li i sur., 2018).

1.11. Cilj istraživanja

Upravo zbog ranije navedenih povezanosti virusa i mitohondrijskog genoma te mitohondrijskih haplogrupa, ciljevi ovog diplomskog rada su:

- Identificirati potencijalne dijagnostičke pokazatelje za razvoj težih oblika bolesti, u svrhu otkrivanja osoba koje su u tom smislu pod povećanim rizikom.
- Ispitati razlikuje li se distribucija mitohondrijskih makrohaplogrupa i submakrohaplogrupa u skupini pacijenata oboljelih od bolesti COVID-19 od one utvrđene u generalnoj populaciji Hrvatske.
- Utvrditi povezanosti haplotipova i heteroplazmijskih mutacija mitohondrijskog genoma s težinom i vrstom kliničkih simptoma te tijekom bolesti u pacijenata oboljelih od COVID-19.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJALI

2.1.1. Otopine, puferi i reagensi

- Komplet reagensa za izolaciju DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, Hilden, Njemačka)
- Komplet reagensa Qubit™ dsDNA High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,USA)
- PrimeSTAR® GXL (TaKaRa, Kusatsu, Japan) polimeraza
- Agarozna i 1x TAE pufer (Sigma, St. Louis, Missouri, SAD)
- Midori Green Advanced DNA Stain (Nippom Genetics Europe GmbH, Düren, Njemačka)
- Boja za nanošenje uzoraka (engl. *loading dye*) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,USA),
- Molekularni standard (GeneRuler 1 kb, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,USA)
- Nextera® XT Library Prep Kit - komercijalni komplet za pripremu biblioteka (Illumina®, San Diego, CA, USA)
- Prijanjajuća folija B (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD)
- Komercijalno dostupni indeksi IDT® for Illumina® DNA/RNA UD Indexes Set A (Illumina®, San Diego, CA, USA)
- Prijanjajuća folija A (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD)
- Agencourt AMPure XP magnetske kuglice (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)
- Magnetni stalak Pharma Magnetic Stand-96 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,USA)
- Komercijalni komplet LabChip® DNA High Sensitivity (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)
- Tris-EDTA pufer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,USA)
- PhiX kontrolne DNA v3 (Illumina®, San Diego, CA, USA)
- Komercijalni kompleti MiSeq Reagent Kits v2 (Illumina®, San Diego, CA, USA)
- Natrijev hidroksid Sodium Hydroxide 1.0 N Solution (Sigma-Aldrich, St.Louise, Missouri)

2.1.2. Uređaji i računalni programi

- Uređaj za određivanje koncentracije nukleinskih kiselina Qubit™ 3.0 Fluorometer, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Centrifuga Eppendorf Minispin (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Centrifuga Eppendorf® Centrifuge 5430/5430R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- PCR uređaj Eppendorf® Mastercycler® Nexus Thermal Cyclers GSX1 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Uređaja za elektroforezu SubCell® GT system (BioRad, Hercules, CA, USA)
- Uređaj i program za vizualiziranje gela nakon elektroforeze GelDoc™ sistem i Image Lab™ program (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD)
- Električni termokružnik Eppendorf® ThermoMixer® C (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Uređaju za kapilarnu elektroforezu na čipu LabChip® GX Touch HT (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)
- Računalni program LabChip GX Reviewer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)
- Uređaj za masivno paralelno sekvenciranje Illumina® MiSeq FGx™ (Illumina®, San Diego, CA, USA)
- Program Illumina Experiment Manager (Illumina®, San Diego, Kalifornija, SAD)
- Program za provjeru kvalitete sekvenciranja Sequencing Analysis Viewer (Illumina®, San Diego, Kalifornija, SAD)
- Program MiSeq Reporter na MiSeq uređaju (Illumina®, San Diego, CA, USA)
- Program BBDuk (dio paketa programa BBDuk v38.87) (Bushnell, 2014)
- Programa za sravnjivanje sljedova s referentnim genomom BWA-MEM (v0.7.12) (Li i Durbin, 2009)
- Program samtools (v1.8) (Li i sur., 2009)
- Program za određivanje varijanti freeBayes (v1.1.0) (Garrison i Marth, 2012)
- Program za određivanje haplogrupa HaploGrep 2 (v2.2) (Weissensteiner i sur., 2016)
- Program MITOMAP (Ruiz-Pesini i sur., 2007)

2.2. METODE

2.2.1. Uzorkovanje

U istraživanju je sudjelovalo 57 pacijenata oboljelih od bolesti COVID-19 koji su se nalazili na bolničkom liječenju u Kliničkoj bolnici Dubrava u razdoblju od siječnja do travnja 2021. Etičko povjerenstvo KB Dubrava je odobrilo istraživanje kojeg je ovaj diplomski rad sastavni dio (broj odobrenja 2020/1610-03). Svi sudionici istraživanja su detaljno upoznati s načinom i ciljem njihovog sudjelovanja te su svojim potpisom na pisanom informativnom obrascu dali dobrovoljni pristanak za korištenje njihovih medicinskih podataka i bioloških uzoraka u znanstvene svrhe, dijelom obuhvaćene i ovim radom. Dijagnoza COVID-19 svih sudionika je potvrđena u uzorcima nazofaringealnih briseva testom lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (engl. *real time polymerase chain reaction*, RT-PCR). Prikupljeni su podaci za spol, dob, status, simptome i ostale kronične bolesti.

Za potrebe ovog istraživanja, radi ograničenog broja uzoraka, pacijenti s blagim i umjerenim simptomima su svrstani u kategoriju blagi, dok su pacijenti čije je liječenje zahtijevalo neki oblik invazivne respiratorne potpore kategorizirani kao kritični. Od svakog pacijenta je uzorkovana puna krv na kojoj su provedene biokemijske analize za potrebe liječenja. Iz preostale pune krvi sam u svrhu ovog diplomskog rada izolirala ukupnu DNA.

Kategorički statistički podaci usporedbi grupa pacijenata izraženi su postotkom i uspoređeni pomoću χ^2 testa i p-vrijednosti. Osim grupe pacijenata obuhvaćene ovim istraživanjem, u svrhu usporedbe je korištena distribucija mitohondrijskih haplogrupa u općoj populaciji Hrvatske, ustanovljena sekvenciranjem cijelih mitohondrijskih genoma iz 326 uzorka oralnog epitela zdravih ispitanika u laboratoriju Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“.

2.2.2. Izolacija

DNA sam iz uzoraka izolirala koristeći DNeasy® komercijalni komplet za krv i tkivo (Qiagen, Hilden, Njemačka). Na početku same izolacije umjesto uzorka krvi sam dodala 100 μ l fosfatnog pufera (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) kao negativnu kontrolu (NK-I). Negativna kontrola je

tretirana kao i svi uzorci te na koncu sekvencirana tako da se može utvrditi potencijalna kontaminacija. U epruvete sam dodala po 20 µl proteinaze K za lizu stanica, 100 µl krvi i 100 µl fosfatnog pufera. Zatim sam dodala 200 µl AL pufera i sve inkubirala u termokružniku 10 minuta na 56 °C pri 280 g. Nakon toga sam dodala 200 µl 96%-tnog etanola i promiješala. Cijelu sam smjesu prebacila u kolonu s kolekcijskom epruvetom i centrifugirala pri 6000 g u trajanju od jedne minute. Kako bih isprala uzorke DNA vezane na membranu kolone, kolonu sam prebacila u novu kolekcijsku epruvetu i dodala 500 µl AW1 pufera te centrifugirala prema uvjetima iz prethodnog koraka. Isti postupak sam ponovila s AW2 puferom, ali s različitim uvjetima centrifugiranja, tj. na 20 000 g u trajanju od tri minute. Puferi su prilagođeni za optimalno vezanje DNA za vezujuću membranu kolone za izolaciju (engl. *DNeasy Mini spin column*). Stoga je tijekom centrifugiranja DNA bila vezana za membranu, a kontaminanti (proteini, RNA, enzimski inhibitori, stanični dijelovi) su prolazili kroz membranu u epruvetu koju sam nakon svakog centrifugiranja odbacila. Na kraju sam DNA eluirala s membrane pomoću 200 µl AE pufera, inkubirala sam na sobnoj temperaturi 1 minutu i centrifugirala na 6000 g u trajanju od 1 minute. U konačnici sam dobila gotovo 200 µl pročišćene DNA (**Slika 12**).

DNasy Mini Protokol

UZORAK



DNA spremna za
korištenje

Slika 12. Princip izolacije DNA iz krvi pomoću DNasy kolona (preuzeto i prilagođeno iz protokola: DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, Hilden, Njemačka))

2.2.3. Kvantifikacija

Izoliranu DNA sam kvantificirala pomoću uređaja za određivanje koncentracije nukleinskih kiselina i proteina Qubit™ 3.0 Fluorometer koristeći Qubit™ dsDNA High Sensitivity komercijalni komplet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i odgovarajuće epruvete (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) prema uputama proizvođača. Qubit™ 3.0 fluorometar mjeri intenzitet fluorescencije izravno u epruveti izrađenoj od optički prikladne plastike te automatski

izračunava koncentraciju DNA na temelju dvije standardne otopine koje su dio kompleta. Za početak sam pripremila dvije epruvete za uzorke standarda poznate koncentracije koji su potrebni za izradu baždarne krivulje te po jednu epruvetu za svaki uzorak. Napravila sam matičnu otopinu za odgovarajući broj uzoraka u kojoj sam pomiješala po 199 μl Qubit dsDNA HS pufera i po 1 μl Qubit dsDNA HS reagensa po uzorku, uključujući dva standarda. DsDNA HS reagens je fluorescentna boja koje se specifično veže na dvostruku DNA uzvojnici. U 199 μl matične otopine sam dodavala po 1 μl uzorka, a u 190 μl matične otopine sam dodavala po 10 μl standarda do konačnog volumena 200 μl . Sve epruvete sam dobro izmiješala i inkubirala 2 minute na sobnoj temperaturi. Prema uputi na ekranu uređaja sam očitavala vrijednosti za standarde, a potom za svaki uzorak. Vrijednosti su bile izražene u $\text{ng}/\mu\text{l}$.

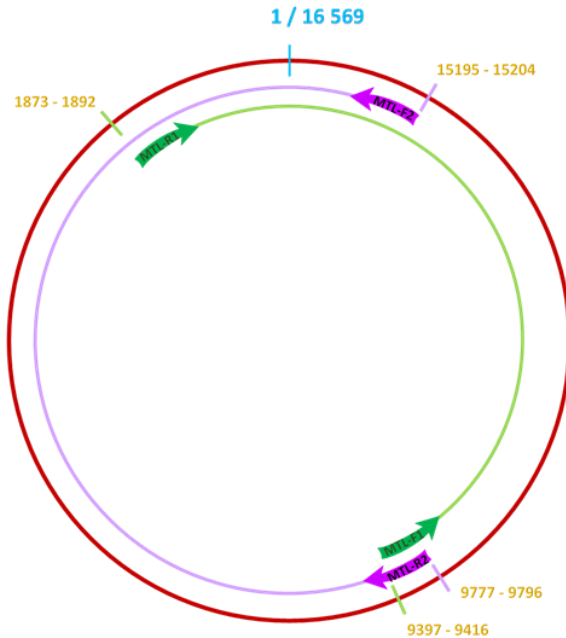
2.2.4. PCR za umnažanje dugih odsječaka mtDNA

Slijedeće korake sam izvodila prema validiranom protokolu Forenzičkog laboratorija Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“ (Sukser i sur., 2021). Kao početni korak pripreme biblioteka za sekvenciranje mtDNA, provela sam po dvije lančane reakcije polimerazom na ukupnoj DNA izoliranoj iz krvi pacijenata. Koristila sam dva para početnica specifičnih za mitohondrijski genom (**Slika 13**), a koji generiraju produkte duljine 9,1 kb i 11,2 kb.

Primer	Sequence
MTL-F1	5'- AAA GCA CAT ACC AAG GCC AC -3'
MTL-F2	5'- TAT CCG CCA TCC CAT ACA TT -3'
MTL-R1	5'- TTG GCT CTC CTT GCA AAG TT -3'
MTL-R2	5'- AAT GTT GAG CCG TAG ATG CC -3'

Slika 13. Početnice koje se koriste za umnažanje ljudskog mitohondrijskog genoma (preuzeto iz: protokola Human mtDNA Genome (Illumina, San Diego, California, SAD))

Umnoženi odsječci pokrivaju cijeli mitohondrijski genom, štoviše, preklapaju se u području kontrolne regije, što osigurava bolju pokrivenost tog hipervarijabilnog odsječaka kod sekvenciranja (**Slika 14**).



Slika 14. Mjesta vezanja početnica MTL-F1 i MTL-R1 (za produkt veličine 9,1 kb) te početnica MTL-F2 i MTL-R2 (za produkt veličine 11,2 kb) (slika preuzeta iz internog protokola Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“)

Prije umnažanja sam normalizirala izoliranu DNA kako bih osigurala ravnomjernu koncentraciju DNA u smjesi PCR-a za svaki uzorak. Prema koncentracijama izmjerenim na Qubit 3.0 fluorometru izračunala sam volumene potrebne za PCR, do konačne koncentracije DNA u PCR smjesi 0,08 ng/μl. Dodala sam i PCR negativnu kontrolu (ultrafiltrirana voda umjesto uzorka) koju nisam sekvencirala, već je služila kao kontrola kontaminacije prilikom postavljanja PCR-a. Za umnažanje sam koristila:

- 0,5 μl MTL-F1 i MTL-R1 početnica koncentracije 10 pM za odsječak duljine 9,1 kb
- 0,5 μl MTL-F2 i MTL-R2, početnica koncentracije 10 pM za odsječak duljine 11,2 kb
- 0,5 μl PrimeSTAR® GXL (TaKaRa, Kusatsu, Japan) polimeraza
- 5 μl PrimeSTAR® GXL pufer
- 2 μl mješavine deoksiribonukleotid trifosfata (dNTP)
- 11,5 μl ultrafiltrirane vode (UF-H₂O)
- 5 μl normaliziranog uzorka

Konačni volumen iznosio je 25 µl po uzorku. Sve je pripremljeno prema uputama proizvođača i stavljeno u uređaj za PCR (Eppendorf®Mastercycler®) po točno određenim uvjetima reakcije (**Tablica 1**).

Tablica 1. Uvjeti PCR-a za umnažanje mtDNA u dva odsječka

Dijelovi ciklusa za odsječak 9,1 kb	Trajanje	Temperatura	
DENATURACIJA	10 s	98°C	25 ciklusa
VEZANJE POČETNICA	15 s	60°C	
UMNAŽANJE	9.06 min	68°C	

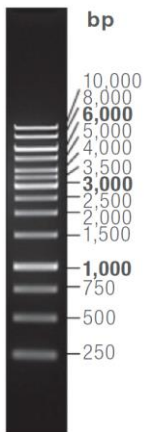
Dijelovi ciklusa za odsječak 11,2 kb	Trajanje	Temperatura	
DENATURACIJA	10 s	98°C	25 ciklusa
VEZANJE POČETNICA I UMNAŽANJE	10 min	68°C	

2.2.5. Elektroforeza

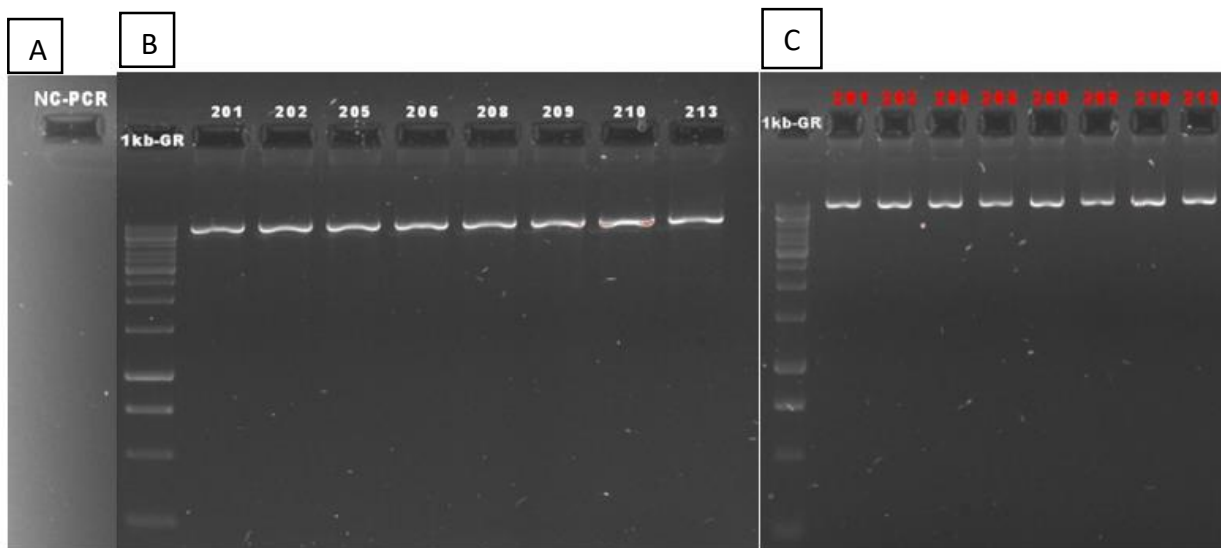
Prisutnost i kvalitetu produkata nastalih PCR-om sam provjerila agaroznom elektroforezom na 1 %-tnom gelu. Za pripremu gela sam koristila agarozu (Sigma, St. Louis, Missouri, SAD) i TAE pufera (Sigma, St. Louis, Missouri, SAD) te dodala 1 µL boje Midori Green Advanced DNA Stain (Nippom Genetics Europe GmbH, Düren, Njemačka). Pomiješala sam 5 µl PCR produkta s 1 µl boje za nanošenje uzoraka (engl. *loading dye*) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), resuspendirala i nanijela u jažice na gelu zajedno s molekularnim standardom (GeneRuler 1 kb, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (**Slika 15**) prema kojem sam uspoređivala veličinu PCR produkata. Elektroforeza je trajala 45 minuta pri 80 V u uređaju SubCell® GT system (BioRad, Hercules, CA, USA). Gel sam vizualizirala pomoću GelDoc™ sistema i Image Lab™ programa (BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD). Ako elektroforeza nije uspjela za neki od uzoraka, ponovila sam PCR i gel elektroforezu. PCR sam smatrala uspješnim ukoliko su nakon elektroforeze veličine fragmenata odgovarale predviđenoj veličini amplikona, ukoliko u uzorku nije bilo nespecifičnih fragmenata te ako u negativnoj kontroli PCR-a nije bilo vidljivih fragmenata (**Slika 16**).

Kvantifikaciju PCR produkata sam izvodila pomoću Qubit™ 3.0 Fluorometer koristeći Qubit™ dsDNA High Sensitivity komercijalni komplet prema ranije opisanom postupku. Izolaciju i

kvantifikaciju ukupne DNA iz uzoraka sam provela u Laboratoriju za naprednu genomiku Instituta Ruđer Bošković i na Medicinskom fakultetu u Zagrebu na Odjelu za funkcionalnu genomiku, jer su u tim institucijama osigurani uvjeti za obradu medicinskog infektivnog materijala.



Slika 15. Veličina fragmenata sadržanih u molekularnom standardu GeneRuler 1 kb (preuzeto iz protokola GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)) s kojim se uspoređuju dobiveni produkti



Slika 16. Primjer uspješne agarozne elektroforeze za odsječke duljine 9,1 kb(B) i 11,2 kb(C) i negativnu kontrolu PCR-a (A) (oznaka 1 kb-GR označava molekularni standard)

2.2.5. Normalizacija i spajanje fragmenata

Pripremu biblioteka i sekvenciranje sam izvodila u Istraživačkom DNA laboratoriju Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“.

Umnožene fragmente sam normalizirala u dva koraka. Prvo sam po 2 µl PCR produkta razrijedila s UF-H₂O tako da koncentracija bude 2 ng/µl, zatim sam od tog razrjeđenja uzimala po 1 µl i pomiješala s 9 µl pufera za resuspendiranje (engl. *Resuspension Buffer*) (Illumina, San Diego, Kalifornija, SAD) tako da je konačni volumen bio 10 µl, a konačna koncentracija 0,2 ng/µL. Sve sam dobro izmiješala pipetom i spustila na dno epruvete kratkim centrifugiranjem, te sam po 5 µl normaliziranih odsječaka duljine 9,1 kb i 11,2 kb od svakog uzorka pojedinačno spojila u jednu epruvetu, tako da se u jednoj epruveti nalazio cijeli mitohondrijski genom jedne osobe.

2.2.6. Tagmentacija

Pripremu biblioteka sam izvodila pomoću Nextera® XT Library Prep Kit komercijalnog kompleta za pripremu biblioteka (Illumina®, San Diego, CA, USA) prema protokolu Nextera XT DNA Library Prep (Illumina®, San Diego, CA, USA) koji se temelji na tagmentaciji⁶ (Slika 17). U PCR pločicu sam za svaki uzorak ispipetirala po 10 µl tagmentacijskog pufera (engl. *Tagment DNA Buffer*, TD). Zatim sam dodala po 5 µl uzorka mtDNA amplikona i 5 µl tagmentacijske smjese (engl. *Amplicon Tagment Mix*, ATM) u kojem se nalazi transpozonski kompleks. Smjesu sam promiješala, a pločicu prekrila prijanjajućom folijom B (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD) te centrifugirala 1 minutu pri 280 g. Pločicu sam stavila u uređaj za PCR (Eppendorf®Mastercycler®) te inkubirala 5 minuta pri 55 °C. Nakon inkubacije uslijedilo je hlađenje pločice do temperature 10 °C, nakon čega sam bez odgode u svaki uzorak dodala 5 µl neutralizacijskog pufera (engl. *Neutralize Tagment Buffer*, NT) kako bi se zaustavio proces tagmentacije. Pločicu sam ponovno prekrila folijom, centrifugirala 1 minutu pri 280 g i inkubirala 5 minuta na sobnoj temperaturi. Konačni volumen svakog uzorka iznosio je 25 µl.

2.2.7. Indeksiranje

Tagmentiranoj DNA sam dodala po 10 µl komercijalno dostupnih indeksa (IDT® for Illumina® DNA/RNA UD Indexes Set A, Illumina®, San Diego, CA, USA) i 15 µl PCR matične smjese (engl. *Nextera PCR Master Mix*, NPM) u kojoj se nalazi i DNA polimeraza. Indeksi su oligonukleotidi koji

⁶ Tagmentacija (engl. *tag* – označiti + engl. *fragmentation* – cjepljenje) je izraz koji opisuje enzimsku reakciju cijepanja DNA pomoću transpozonskog kompleksa na kratke odsječke (100 - 150 pb) te označavanja tih odsječaka kratkim adapterskim oligonukleotidima za koje će se u slijedećem koraku vezati indeksi.

svojom jedinstvenom sekvencom individualno obilježavaju svaki uzorak. To je nužno zbog toga što se prije sekvenciranja svi uzorci spajaju u jedinstvenu smjesu. Indeksi omogućuju računalnom programu da nakon sekvenciranja razvrstaju sekvence pripadajućim uzorcima. Pločicu s indeksima, uzorcima i NPM sam prekrila s folijom A (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD) i centrifugirala 1 minutu pri 280 g. Konačni volumen u svakoj jažici iznosio je 50 µl. Pločicu sam stavila u PCR uređaj gdje se reakcija odvijala po uvjetima u **Tablici 2**.

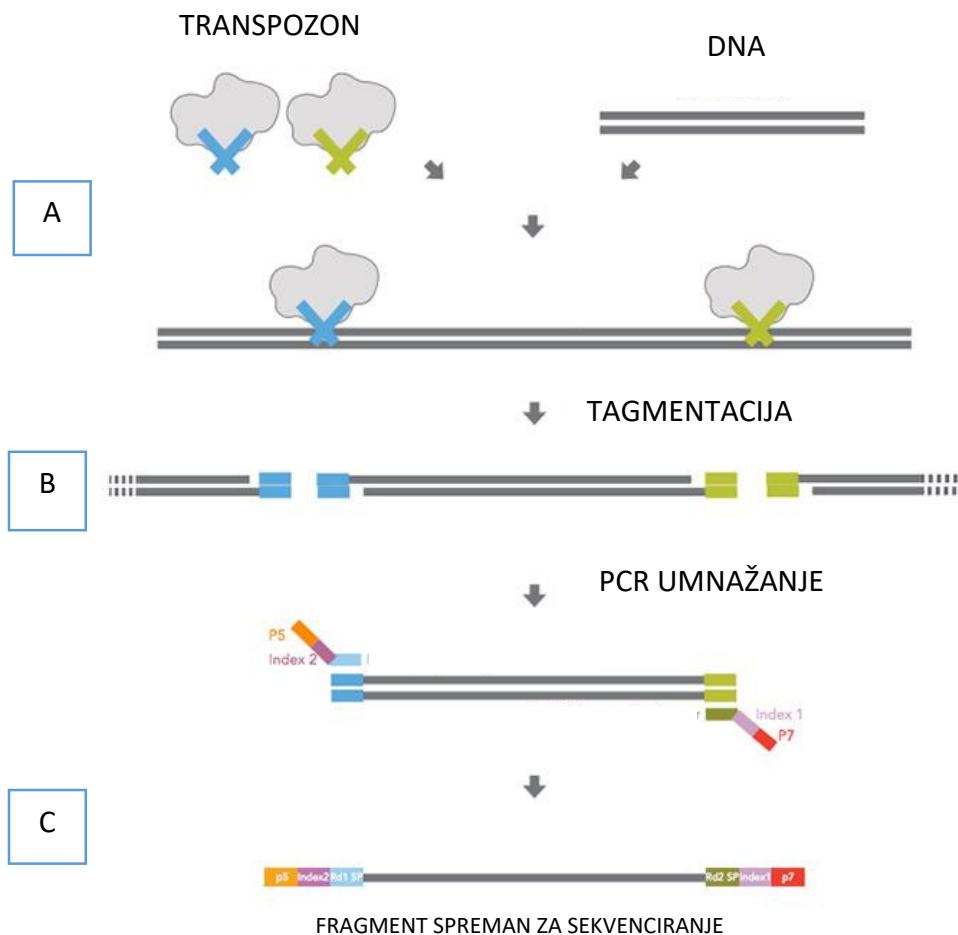
Tablica 2. Uvjeti PCR-a za umnažanje tagmentirane DNA, dodavanje indeksa i sekvenci za formiranje klastera

Dijelovi ciklusa	Trajanje	Temperatura	
	3 min	72 °C	
DENATURACIJA	30 s	95°C	12 ciklusa
	10 s	95°C	
VEZANJE POČETNICA	30 s	55°C	
UMNAŽANJE	30 s	72°C	
	5 min	72°C	

2.2.8. Pročišćavanje biblioteka

Biblioteke sam pročistila pomoću Agencourt AMPure XP magnetnih kuglica (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Bibliotekama sam dodala po 30 µl homogeniziranih magnetnih kuglica, a PCR pločicu sam prekrila ljepljivom folijom B (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD) i stavila na trešnju u električni termokružnik (Eppendorf® ThermoMixer® C) 2 minute pri 280 g. Potom sam pločicu kratko centrifugirala te inkubirala 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga biblioteke sam stavila na magnetni stalak (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 5 minuta, tako da magnetne kuglice s bibliotekama prionu uz magnetne šipke te se fiksiraju na stranici bunarića, a supernatant (oko 80 µl) sam pažljivo uklonila i dodala 100 µl svježeg pripremljenog 80%-tnog etanola. Nakon 30 sekundi uklonila sam supernatant (etanol) i ponovila postupak, te sam nakon drugog uklanjanja supernatanta pripazila da sav etanol ishlapi kako ne bi inhibirao denaturaciju biblioteka i samo sekvenciranja. Pločicu s bibliotekama sam uklonila s magneta i dodala 52,5 µl RSB-a, nakon čega sam pločicu prekrila ljepljivom folijom B i stavila na trešnju u električni termokružnik 2 minute pri 280 g. Pločicu sam zatim inkubirala 2 minute na sobnoj temperaturi,

nakon čega biblioteke nisu više vezane za magnetne kuglice. Pločicu sam opet na 5 minuta vratila na magnet, s tim da ovaj put umjesto magnetnih kuglica supernatant sadrži biblioteke spremne za sekvenciranje.



Slika 17. Princip tagmentacije i umnažanja (preuzeto i prilagođeno iz protokola Nextera XT (Illumina®, San Diego, CA, USA))

A) Transpozonski kompleks Nextera XT s adapterima i DNA

B) Cijepanje na fragmente i dodavanje adaptera

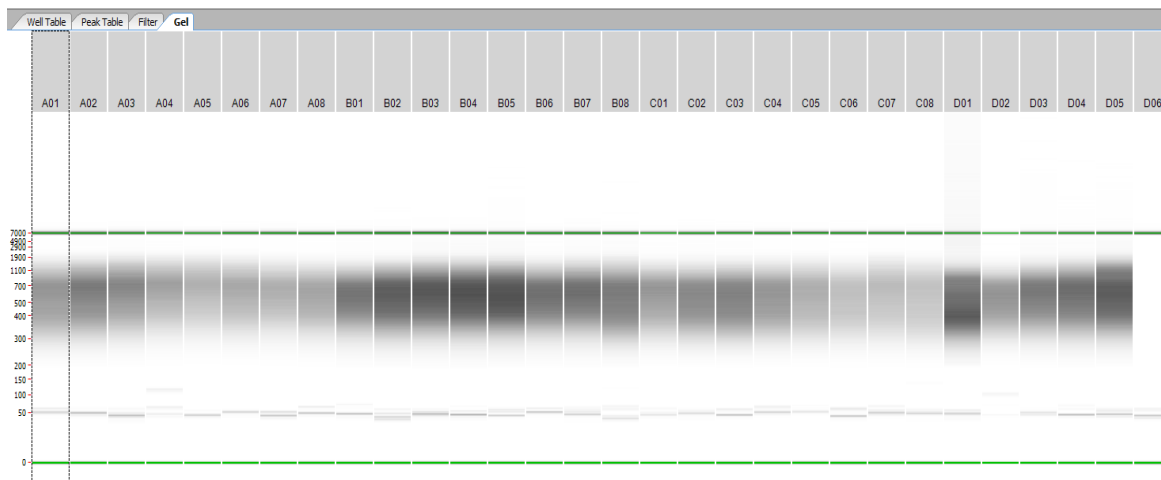
C) Umnažanje tagmentiranih fragmenata, dodavanje indeksa i dodavanje sekvenci (P5 i P7) potrebnih za formiranje klastera

2.2.9. Kvantifikacija

Kvantifikaciju biblioteka sam provela pomoću LabChip® DNA High Sensitivity Assay komercijalnog kompleta na uređaju LabChip® GX Touch HT (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Analiza LabChip GX Touch bazirana je na tradicionalnoj gel elektroforezi koja se prenosi u format čipa, pomoću

kojeg se reducira vrijeme razdvajanja i automatski određuje veličina te količina u digitalnom obliku. Polimer koji ispunjava mikro kanale u čipu je pogodan za analizu RNA/DNA ili proteina koji se razdvajaju prema različitim brzinama migracije u polimeru, slično kao kod elektroforeze na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu (**Slika 18**). Materijal koji se analizira je označen fluorescentnom bojom koja odašilje signal prolaskom kroz lasersku zraku. Program na temelju tih signala prikazuje elektroferogram za svaki uzorak. Veličina fragmenata u uzorku DNA određuje se usporedno s molekularnim standardom (eng. *ladder*) koji se priprema u posebnoj epruveti. U svaki uzorak se još dodaje interni standard poznate koncentracije prema kojem se vrši kvantifikacija. U High Sensitivity Assay komercijalnom kompletu nalazi se gel matriks, koncentrat fluorescentne boje, interni standard i molekularni standard. Čip se može koristiti više puta prema uputama proizvođača.

Za pripremu gela sam pomiješala 550 μl gel matriksa i 6,5 μl koncentrata boje u epruveti. Dobivenu smjesu sam prebacila u epruvetu s filterom (engl. *spin-filter*), te sam centrifugirala 10 minuta pri 9180 g. Nakon odbacivanja filtera, epruvetu s bojom sam spremila na tamno mjesto. Nadalje sam ispirala čip i bunarčice pomoću ultrafiltrirane vode i sušila vakuumskom sisaljkom, a prozorčić čipa sam očistila 70%-tnim izopropanolom. U određene bunarčice sam dodala po 50 μl mješavine gela i boje te 100 μl internog standarda. U epruvetu za pufer sam dodala 750 μl Tris-EDTA pufera (TE pufer) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a u posebnu epruvetu 108 μl TE pufera i 12 μl molekularnog standarda. Epruvetu za pufer, epruvetu s molekularnim standardom, pločicu s po 30 μl pročišćenih biblioteka u svakoj jažici i čip sam stavila na odgovarajuće mjesto u uređaju. Zatim sam na uređaju definirala parametre, označila pozicije uzoraka i pokrenula protokol za High Sensitivity Assay. Dobivene podatke sam analizirala pomoću LabChip GX Reviewer programa na računalu. Provjerila sam distribuciju fragmenata DNA u svakoj pojedinoj biblioteci (uzorku) za sekvenciranje (**Slika 18**) te odredila molarnu koncentraciju biblioteka na temelju kojih sam provela normalizaciju.



Slika 18. Prikaz gela dobivenog pomoću LabChip GX Touch HT uređaja (A01-A08, B01-B08, C01-C08, D01-D05 uzorci biblioteka za sekvenciranje, D06 negativna kontrola-NK-I). Biblioteka su mješavina fragmenata različite duljine pa se u gelu vide kao šmir (engl. smear), a veličine fragmenata su iskazane s lijeve strane prvog šmira. Najveći udio fragmenata u našim bibliotekama je veličine oko 600 pb.

2.2.10. Normalizacija i spajanje biblioteka

Normalizaciju sam provela razrjeđivanjem 5 μ l biblioteka RSB puferom na način da otopina bude 4 nM prema uputi u protokolu Denature and Dilute Libraries Guide (Illumina®, San Diego, Kalifornija, SAD). Nakon normalizacije, po 5 μ l svih normaliziranih biblioteka sam spojila u jednu epruvetu.

2.2.11. Priprema PhiX kontrolne DNA

Najprije sam za denaturaciju DNA pripremila 0,2 M NaOH. Veća koncentracija NaOH bi mogla inhibirati hibridizaciju biblioteka za protočnu stanicu (engl. *flow cell*) i smanjiti gustoću klastera. Početna koncentracija PhiX kontrolne DNA v3 (Illumina®, San Diego, Kalifornija, SAD) iznosi 10 nM, a za reagense iz MiSeq Reagent komercijalnog kompleta v2 (Illumina®, San Diego, Kalifornija, SAD), koji sam koristila za sekvenciranje, potrebno je razrijediti PhiX kontrolu do koncentracije 12,5 pM za optimalnu gustoću klastera. Stoga sam u epruveti pomiješala 2 μ l PhiX (10 nM) i 3 μ l pufera EBT (10mM TRIS, 0,1%Tween20) te sam dobila PhiX koncentracije 4 nM. U razrijeđeni PhiX (4 nM) sam dodala 5 μ l 0,2 M NaOH, do konačne koncentracije PhiX-a 2 nM. Epruvetu sam dobro promiješala i centrifugirala 1 minutu pri 280 g, te sam inkubirala 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim sam u PhiX (2 nM) dodala 990 μ l ohlađenog hibridizacijskog pufera HT1 (Illumina®, San Diego, Kalifornija, SAD), te je nakon razrjeđivanja koncentracija PhiX-a iznosila 20 pM. Ovakav

denaturirani PhiX (PhiX + NaOH) može se pohraniti u zamrzivaču do tri tjedna. U konačnici sam pomiješala 375 µl 20 pM PhiX-a s 225 µl HT1, te sam dobila 600 µl PhiX kontole, koncentracije 12,5 pM.

2.2.12. Denaturacija biblioteka

Spojene biblioteke (5 µl) sam denaturirala pomoću 5 µl NaOH (0,2M). Nakon miješanja i centrifugiranja 1 minutu pri 280 g, smjesu sam inkubirala 5 minuta na sobnoj temperaturi te dodala 990 µl HT1. Iz te epruvete sam uzela 570 µl i dodala 30 µl 20 pM PhiX-a (5% volumni udio) te sam postigla konačni volumen uzorka koji se u cijelosti koristi za sekvenciranje.

2.2.13. Sekvenciranje

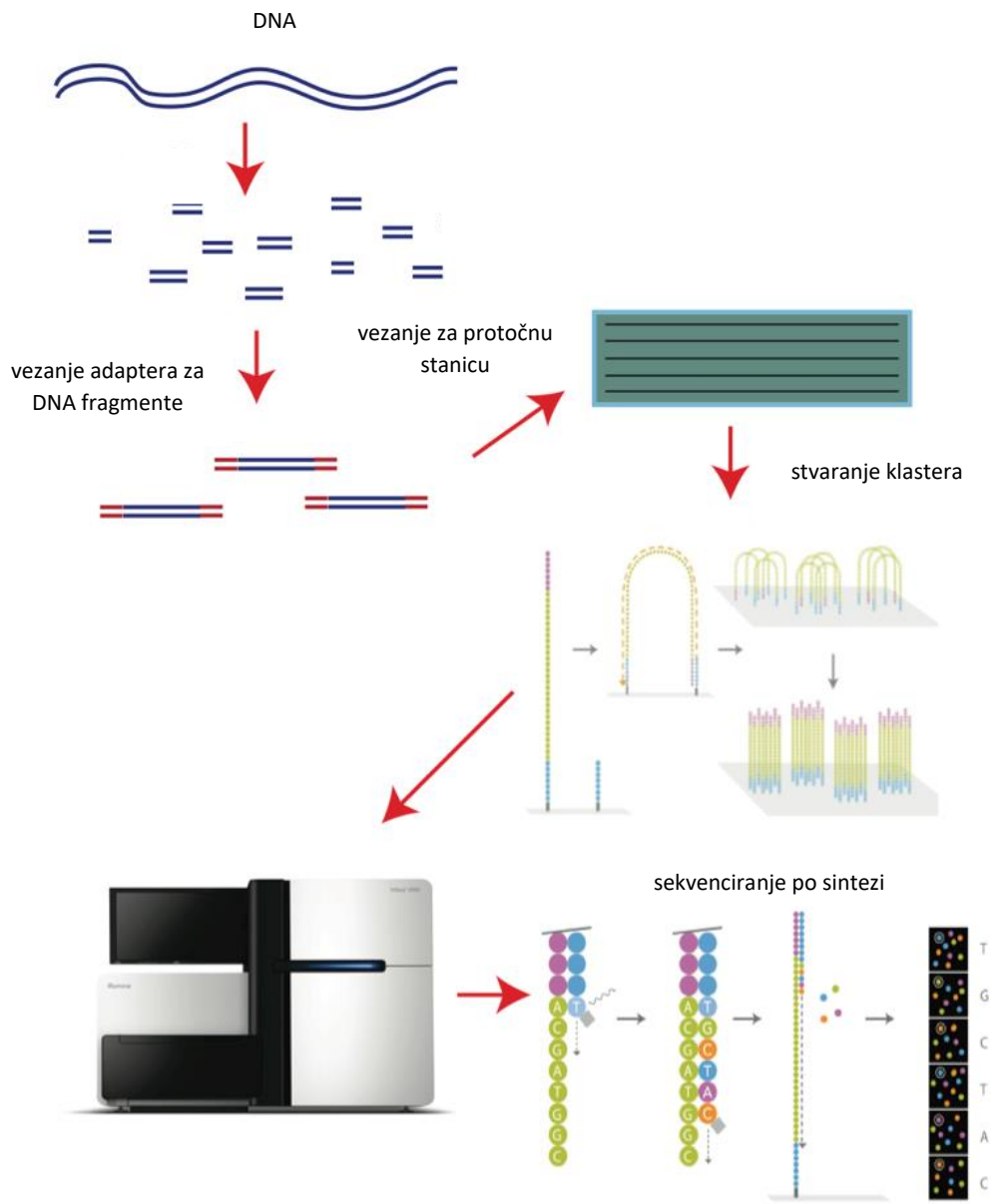
Za sekvenciranje sam koristila MiSeq® Reagent v2 (300-cycles) komercijalni komplet (Illumina®, San Diego, Kalifornija, SAD) i uređaj Illumina® MiSeq FGx. Uzorak sam nanijela na označeno mjesto spremnika s reagensima za sekvenciranje i slijedila upute na ekranu uređaja.

U program Illumina Experiment Manager (Illumina®, San Diego, Kalifornija, SAD) sam kreirala pločicu uzoraka (engl. „*Sample Plate*“). Naznačila sam korištenu Nextera XT komercijalni komplet, imenovala pločicu i odabrala korištene indekse - IDT-ILMN Nextera DNA UD Indexes (96 Indexes) Set A. Zatim sam imenovala svaki uzorak (engl. *Sample ID*) te ga povezala s pripadajućim indeksima, kreirala sam listu uzoraka (engl. „*Sample Sheet*“) i odabrala uređaj MiSeq. U izborniku „*MiSeq Application Selection*“ sam odabrala protokol „*Target Resequencing – PCR Amplicon*“. Unijela sam crtični kod (engl. *barcode*) spremnika s reagensima i odabrala upareni (engl. *Paired-End Read*) način očitavanja prilikom sekvenciranja i 150 ciklusa očitavanja sa svake strane fragmenta. Zatim sam unijela podatke o referentnom genomu za mitohondrijsku DNA na koji se sravnjuje sekvencirani uzorak (dokument rCRS.fa). U opciji „*Manifest*“ sam odabrala sekvenciranje cijele mtDNA (engl. *Whole Mito Genome*), a to je tekstualni dokument u kojem se nalaze informacije o referentnom genomu s kojim se sravnjuje, početne i završne koordinate svakog PCR odsječka te duljine početnica.

Za uspješno sekvenciranje fragmenti trebaju biti prostorno grupirani na staklenoj površini protočne stanice u klastere koji se sastoje od mnogobrojnih kopija određenog fragmenta. Illumina tehnologija sekvenciranja za tvorbu klastera koristi takozvano premosno PCR umnažanje

(engl. *Bridge amplification*) fragmenata. Lanci hibridiziraju svojim adapterskim sekvencama, koje su vezane za indekse s komplementarnim oligonukleotidima – početnicama nakon čega se sintetizira komplementarni lanac pomoću PCR-a. DNA lanci se denaturiraju u jednolančane, a početni lanac se ispire. Slobodni krajevi jednolančane DNA se prihvaćaju na površinu protočne stanice komplementarnim početnicama i stvaraju mostove. Zatim se DNA umnaža pomoću polimeraze koja tvori drugi lanac mosta koji se kasnije denaturira, a jednolančani fragment DNA se veže za fizički blisku početnicu. Ponavljanje ovog procesa vodi klonalnom umnažanju identičnih lanaca koji tvore lokalno usidrene klastere (nakupine, jednakih molekula DNA) (engl. *cluster generation*) (**Slika 19**) (Šimić, 2019).

Napredna metoda sekvenciranja po sintezi se izvodi pomoću fluorescentno označenih dNTP molekula. Svaka od četiri baze ima različito vezanu fluorescentnu boju i terminator (3-O-azidmetilnu grupu), koji zaustavlja daljnju polimerizaciju pa polimeraza može dodati svakom rastućem lancu DNA samo jednu bazu. Neugrađeni nukleotidi se ispiru, a laserom se određuje koji je dNTP ugrađen, nakon čega reagens TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) uklanja boju i terminator, obnavlja 3'-OH skupinu i ciklus se može ponoviti (Šimić, 2019).



Slika 19. Prikaz tehnologije masivnog paralelnog sekvenciranja (preuzeto i prilagođeno s : <https://bitesizebio.com/13546/sequencing-by-synthesis-explaining-the-illumina-sequencing-technology/>)

2.2.14. Provjera kvalitete pojedinačnog kruga sekvenciranja

Nakon sekvenciranja sam provjerila kakva je kvaliteta prikupljenih podataka u programu Sequencing Analysis Viewer (Illumina®, San Diego, Kalifornija, SAD). Za kontrolu kvalitete bitni su podaci za gustoću klastera, postotak klastera koji su prošli kroz filter te postotak Q ocjene veće ili jednake 30 (% baza \geq Q30). Ocjena Q30 znači da je vjerojatnost da je uređaj očitao pogrešnu bazu 1 od 1000. Viša razina kvalitete znači i bolja iskoristivost podataka. Za MiSeq® Reagent v2

komercijalni komplet preporuča se da gustoća klastera iznosi 1000–1200 K/mm², a da postotak klastera koji prolaze kroz filter bude što viši. Povezano s gustoćom klastera je i poravnavanje s PhiX kontrolom (engl. % *Aligned*). Kako sam opisala ranije, koristila sam 5% volumni udio PhiX kontrole u uzorku biblioteka, stoga sam očekivala sličan postotak koji je određen u samom instrumentu tijekom sekvenciranja (Sukser i sur., 2021).

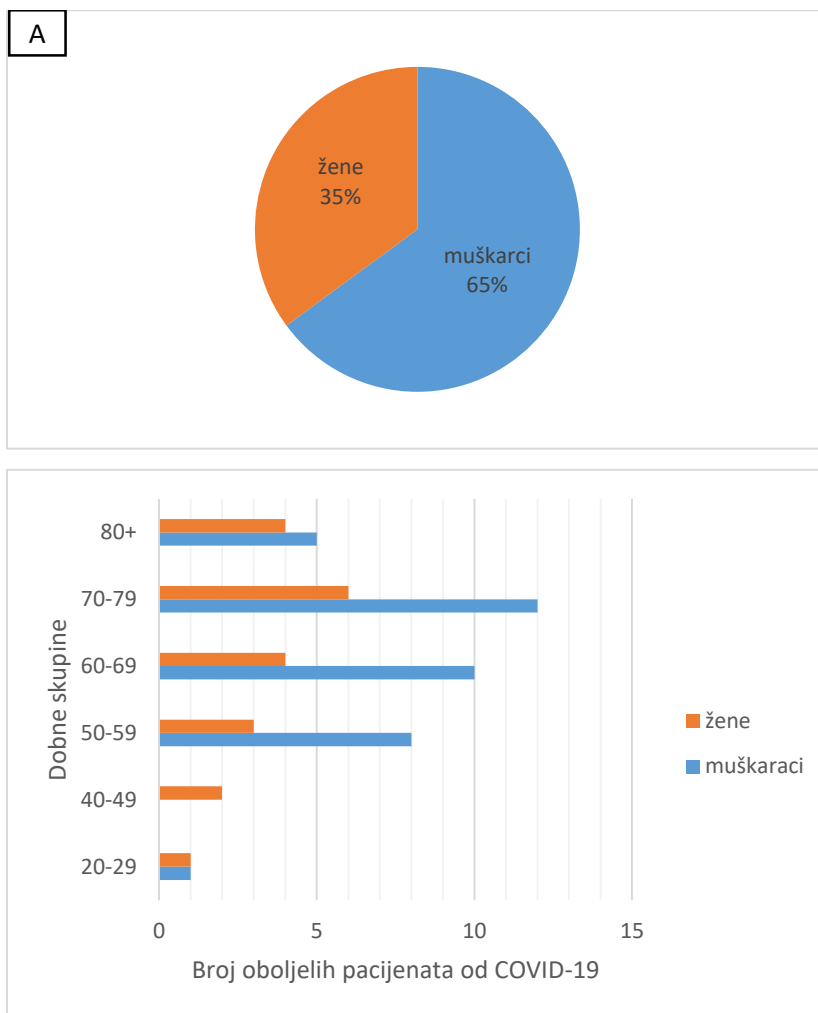
2.2.15. Analiza podataka

Nakon sekvenciranja i kontrole kvalitete samog eksperimenta, datoteke u FASTQ formatu koje generira program MiSeq Reporter (Illumina®, San Diego, CA, USA) sam dostavila na iscrpnu bioinformatičku analizu Grupi za bioinformatiku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. FASTQ datoteke s neobrađenim podacima sekvenci svih fragmenata biblioteke uzorka i pripadajućim vrijednostima kvalitete svakog očitavanja baze (Q rezultat) podvrgnute su uklanjanju adaptera i uklanjanju baza s kvalitetom manjom od 30 koristeći program BBDuk (dio paketa programa BBDuk v38.87) (Bushnell, 2014). Dobiveni sljedovi su sravnjeni s referentnim genomom mitohondrija pomoću programa BWA-MEM (v0.7.12) sa zadanim postavkama (Li i Durbin, 2009). Sravnjenja su filtrirana tako da ostanu samo primarna pravilno uparena jedinstvena sravnjenja, što je postignuto programom samtools (v1.8) (Li i sur., 2009). Na preostalim sravnjenjima je provedeno određivanje varijanti (engl. *Variant calling*), postupak identifikacije svih varijanti nađenih na određenim pozicijama u odnosu na referentni genom, pomoću programa freeBayes (v1.1.0) sa zadanim postavkama (Garrison i Marth, 2012). Za određivanje haplogrupa korišten je besplatno dostupni program HaploGrep 2 (v2.2) (Weissensteiner i sur., 2016). Program određuje haplogrupe prema globalnom filogenetskom stablu čovjeka PhyloTree (van Oven i Kayser, 2009). U besplatno dostupnom računalnom programu MITOMAP (Ruiz-Pesini i sur., 2007) nalazi se baza podataka specijalizirana za ljudski mitohondrijski genom za pregled svih njegovih polimorfizama i mutacija koje nisu vezane uz haplogrupu. U programu sam provjeravala promjene u aminokiselinama po pojedinim genima u mtDNA u odnosu na rCRS, a kao rezultat sam dobila tablicu sa svim varijantama po pojedinim genima u mtDNA u kojima je utvrđivana povezanost pojedine varijante s nekom bolešću.

3. REZULTATI

3.1 Klinički podaci pacijenata oboljelih od COVID-19

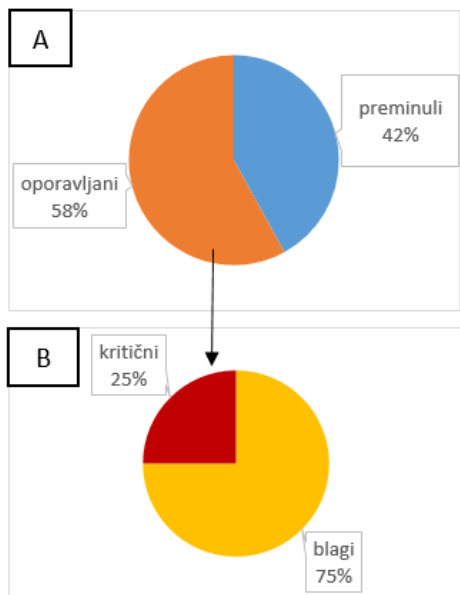
Među pacijentima koji su uključeni u istraživanje bilo je 37 muškaraca i 20 žena različitih dobnih skupina (**Slika 20**).



Slika 20. Spolna zastupljenost u skupini pacijenta oboljelih od COVID-19 (A); spolna zastupljenost pacijenata oboljelih od COVID-19 po dobnim skupinama (B)

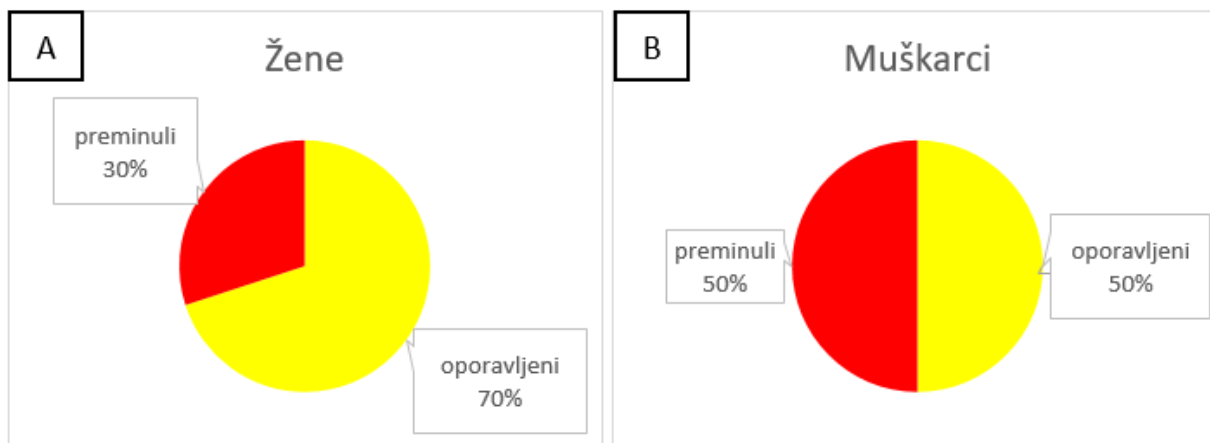
Od 50 pacijenata za koje su dostupni podaci, 29 ih je oporavljeno i otpušteno iz bolnice dok je za 21 pacijenta bolest završila smrtnim ishodom. Za potrebe prikaza rezultata i zbog ograničenog broja uzoraka, simptomi su podijeljeni u dvije kategorije: blagi i kritični simptomi. Očekivano, svi

preminuli pacijenti su imali kritične simptome bolesti COVID-19, a od 29 oporavljenih, 6 ih je imalo kritične, a 18 blage simptome (**Slika 21**).



Slika 21. Udio oporavljenih i preminulih pacijenata s COVID-19 (A); udio pacijenta s kritičnim i blagim simptomima među preživjelim pacijentima s COVID-19 (B)

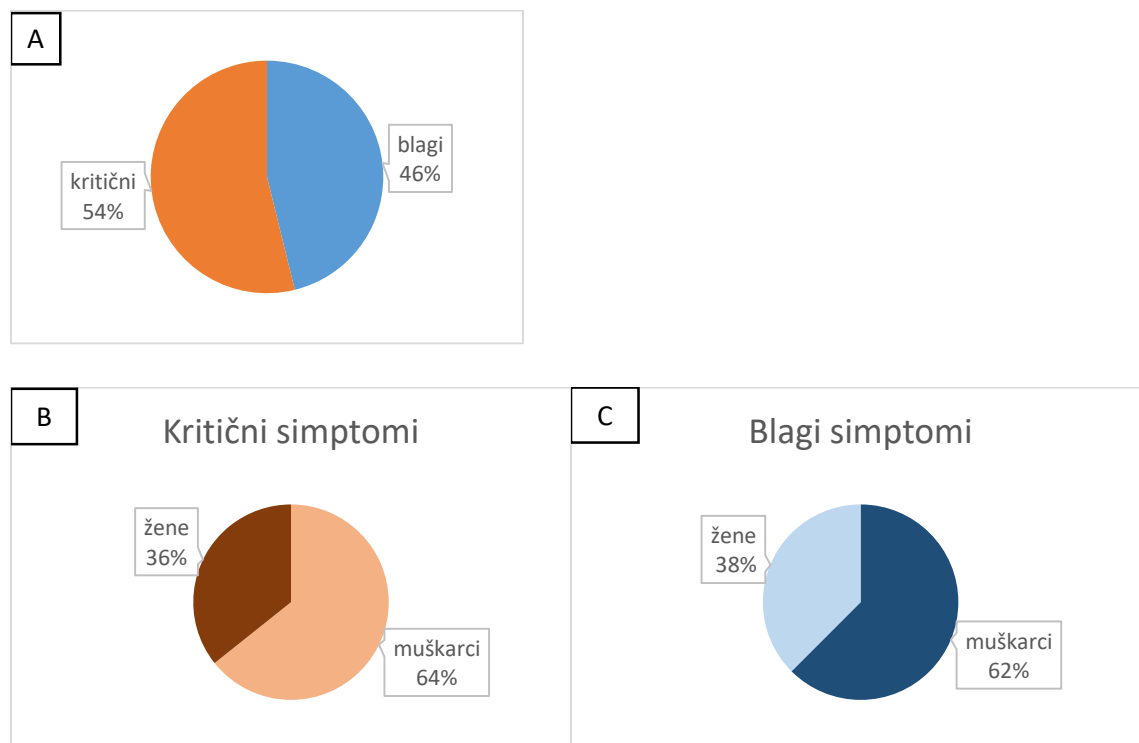
Od 20 žena 14 ih se oporavilo (**Slika 22A**), a od 26 muškaraca 13 ih se oporavilo (**Slika 22B**).



Slika 22. Udio oporavljenih i preminulih žena (A) i muškaraca (B) među pacijentima s COVID-19

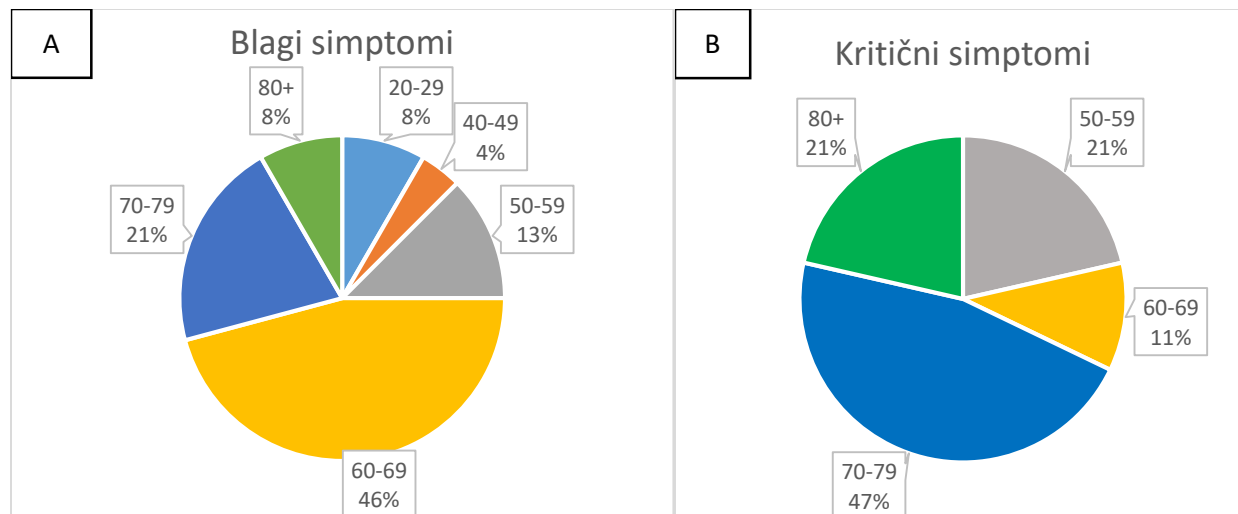
Od 52 pacijenta za koje su dostupni podaci, bez obzira na ishod bolesti, 28 ih je imalo kritične, a 24 blage simptome (**Slika 23A**). U grupi pacijenata s kritičnim simptomima je bilo 18 muškaraca i

10 žena (**Slika 23B**), dok je u grupi pacijenata s blagim simptomima bilo 15 muškaraca i 9 žena (**Slika 23C**).



Slika 23. Simptomi kod pacijenata s obzirom na težinu kliničke slike (A); spolna zastupljenost u skupini pacijenata s kritičnim simptomima (B) i blagim simptomima (C).

Dobna raspodjela pacijenata s obzirom na jačinu simptoma prikaza na je na **Slici 24**.



Slika 24. Udio dobni skupina u grupi pacijenata s blagim simptomima bolesti COVID-19 (A) i u grupi s kritičnim simptomima bolesti COVID-19 (B)

Od komorbiditeta u uzorku svih pacijenata oboljelih od COVID-19, daleko je najzastupljeniji povišeni krvni tlak s udjelom od 55%. Slijedi neki oblik maligne bolesti prisutan kod čak 26% pacijenata te dijabetes tipa II prisutan u 20% pacijenata.

3.2. Kvaliteta sekvenciranja

Sekvenciranje mtDNA u okviru ovog istraživanja je provedeno u dva eksperimenta, odnosno dva neovisna postupka izolacije DNA, pripreme biblioteka i sekvenciranja. U prvom eksperimentu je obrađeno 30 uzoraka, a u drugom eksperimentu 32. Kvaliteta eksperimenata je utvrđena pomoću relevantnih parametara iz SAV-a (Sequencing Analysis Viewer (Illumina®, San Diego, Kalifornija, SAD)) (**Tablica 3**). Preporučena gustoća klastera za MiSeq Reagent v2 komercijalni komplet iznosi 1000 – 1200 K/mm². Približno preporučenu gustoću smo postigli iskustveno, koristeći pouzdanu metodu kvantifikacije biblioteka za sekvenciranje (**Tablica 3**). Postotak klastera koji su prošli kroz filter označava udio klastera prikladnih za sekvenciranje, što podrazumijeva dobro definirani oblik bez preklapanja sa susjednim klasterima. Navedeno omogućuje da optika instrumenta bez poteškoća može detektirati fluorescentnu boju u svakom ciklusu sekvenciranja. Visok postotak klastera koji su prošli filter u našim eksperimentima ukazuje na uspješno proveden postupak tvorbe klastera na protočnoj stanici i posljedičnu maksimalnu iskoristivost protočne stanice (**Tablica 3**).

Ocjena kvalitete po Phredu (Q ocjena) u sekvenciranju je uobičajena mjera određivanja točnosti sekvenciranja. Ona ukazuje na stupanj vjerojatnosti pogrešnog očitavanja, odnosno stupanj pouzdanosti točnog očitavanja pojedinačne baze od strane instrumenta. Ocjena Q30 označava izuzetno visoku pouzdanost točnog prozivanja baze od 99,9%, te se u naprednom sekvenciranju koristi kao zlatna vrijednost kod koje se smatra da je očitana sekvenca potpuno točna. Izuzetno visok postotak baza \geq Q30 u našim eksperimentima (**Tablica 3**) ukazuje na kvalitetu, točnost i maksimalnu iskoristivost kemikalija za sekvenciranje.

S gustoćom klastera je povezan i postotak „pročitanih“ i poravnatih sekvenci kontrolne PhiX DNA. Kao što je opisano ranije, koristila sam 5% volumnog udjela PhiX kontrole. Budući da je postotak poravnanja u našim eksperimentima vrlo blizu predviđenoj vrijednosti od 5%, moguće je zaključiti da su koraci kvantifikacije i normalizacije biblioteka precizno provedeni (**Tablica 3**).

Tablica 3. Parametri kvalitete sekvenciranja provedenog u dva neovisna eksperimenta na Illumina®MiSeq FGx™ uređaju

Eksperiment	Gustoća klastera K/mm²	Postotak klastera koji prolaze kroz filter	Postotak baza ≥ Q30	Postotak poravnanja PhiX kontrole
1	1489 +/- 25	86,6 +/- 1,0	93,2	4,3 +/- 0,2
2	1251 +/- 14	90,7 +/- 1,6	94,5	4,2 +/- 0,2

3.3. Određivanje haplogrupa

Analizom podataka pomoću programa HaploGrep2 (Weissensteiner i sur., 2016) određene su mitohondrijske haplogrupe pacijenata oboljelih od COVID-19, koje su radi preglednosti prikazane tablično (**Tablica 4**).

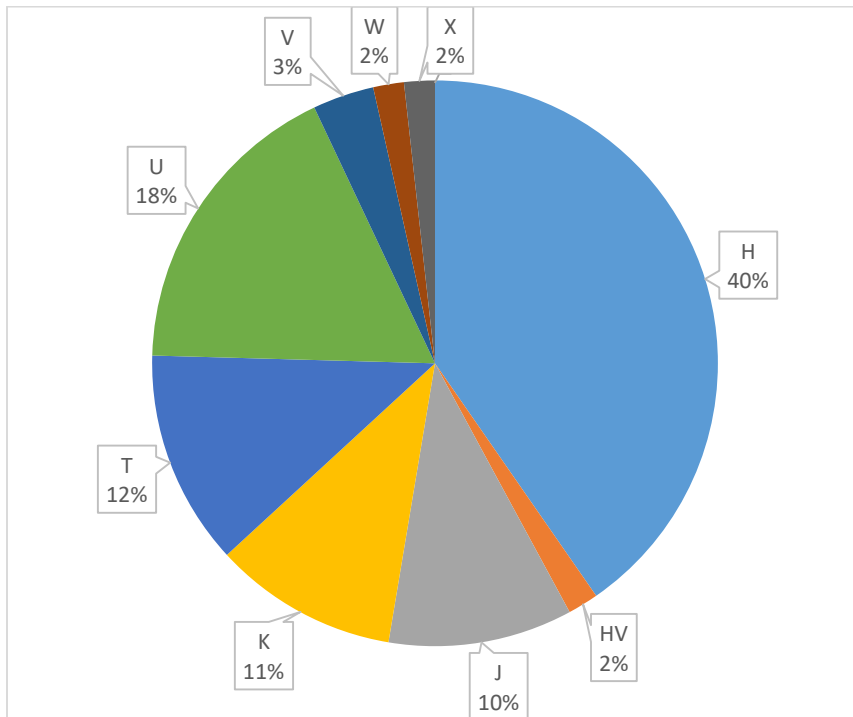
Tablica 4. Prikaz mitohondrijskih makrohaplogrupa, submakrohaplogrupa i haplogrupa pacijenata oboljelih od bolesti COVID-19

PACIJENTI COVID-19	S	MAKROHAPLOGRUPA	SUBMAKROHAPLOGRUPA	HAPLOGRUPA
12	H	H	H11	H11a2
13	H	H	H7	H7c1
14	H	H	H17	H17a
15	H	H	HV	HV18
16	H	H	H1	H1e1
17	H	H	H5	H5
Q20	H	H	H1	H1e1a
21	H	H	H1	H1
22	H	H	H55	H55b
24	H	H	H14	H14a2a
25	H	H	HV	HV16
29	H	H	H5	H5n
2	H	H	H5	H5b
130	H	H	H13	H13a1a1
132	H	H	H6	H6a1a
133	H	H	H2	H2a2a1a
138	H	H	H3	H30b1
139	H	H	H4	H4a1a3a
142	H	H	H2	H20

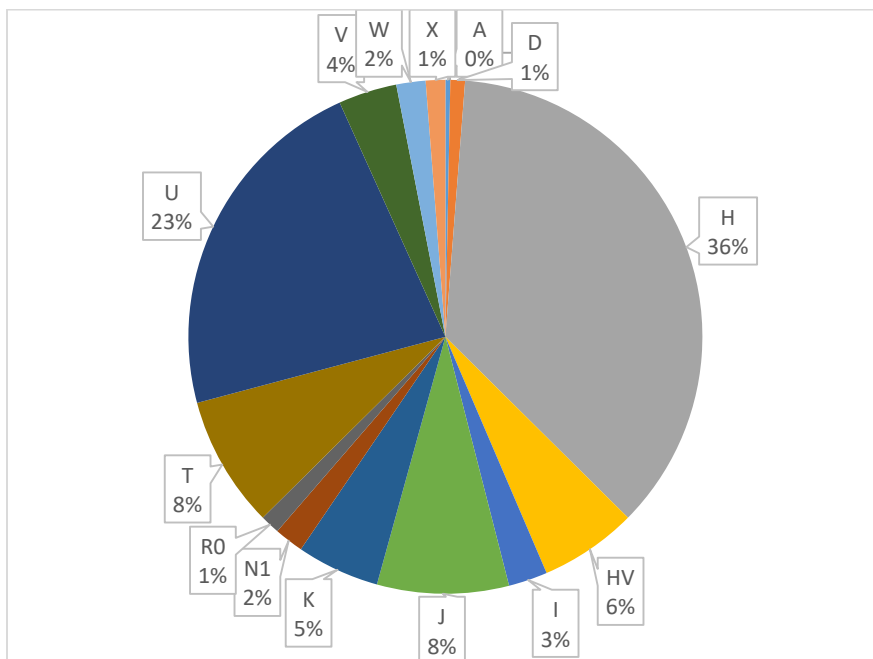
Nastavak *Tablice 4.*

146	H	H11	H11a2
156	H	H3	H3h
159	H	H1	H1c22
161	H	H6	H6a2
150	HV	HV	HV0c
7	J	J1	J1b1a1
131	J	J1	J1c2
137	J	J1	J1c2j
143	J	J1	J1c4
153	J	J1	J1c4b
158	J	J1	J1c3j
1	K	K1	K1a5a
26	K	K1	K1a1b
27	K	K1	K1c2
28	K	K1	K1a3a
148	K	K1	K1a1a1
152	K	K1	K1b2a1
11	T	T1	T1a1l
18	T	T2	T2b+16362
23	T	T2	T2b23a
4	T	T2	T2b4
5	T	T1	T1a1l
126	T	T2	T2+16189
135	T	T2	T2b5
10	U	U5	U5a1a1
3	U	U3	U3b1
6	U	U4	U4d2
8	U	U4	U4a3a
128	U	U5	U5a2a1
129	U	U5	U5a2b
141	U	U5	U5a2a1
145	U	U2	U2e2a1d
154	U	U5	U5a1b1c2
163	U	U2	U2e2a1
134	V	V1	V1a1
136	V	V1	V1a1
19	W	W5	W5a1
149	X	X2	X2c1b

Najveći udio od čak 40% pacijenata pripada makrohaplogrupi H, dok je slijedeća po zastupljenosti haplogrupa U koju nosi 17,5% pacijenata.



Slika 25. Zastupljenosti mitohondrijskih makrohaplogrupa među pacijentima s COVID-19

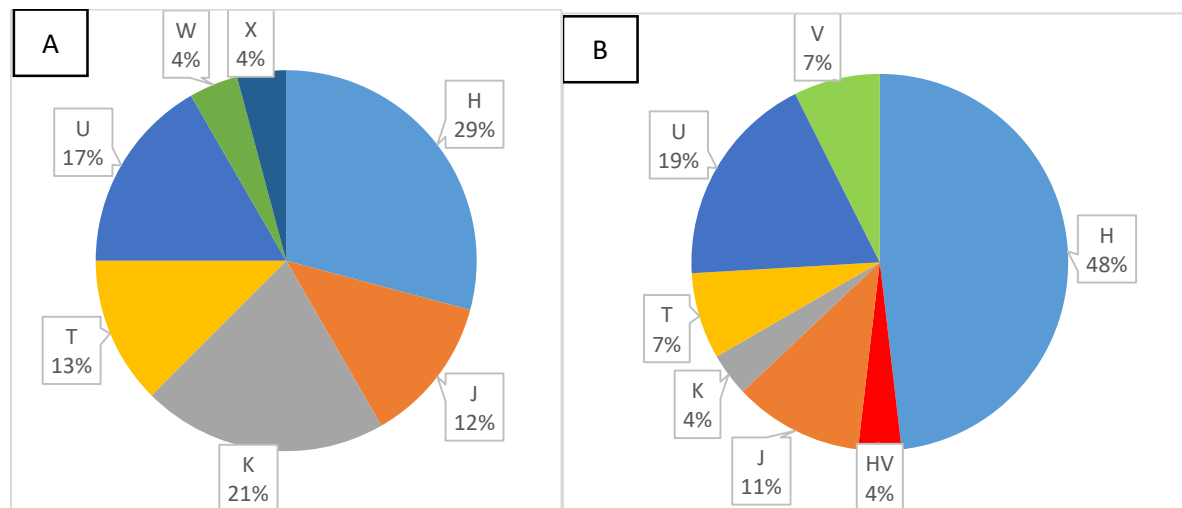


Slika 26. Zastupljenost mitohondrijskih makrohaplogrupa u općoj populaciji (326 uzoraka zdravih osoba s boravištem te mjestom rođenja predaka po majčinoj liniji u Hrvatskoj)

Rezultati raspodjele mitohondrijskih makrohaplogrupa u grupi pacijenata koji su sudjelovali u ovom istraživanju (**Slika 25**) su uspoređeni s mitohondrijskim makrohaplogrupama populacije Hrvatske koja je provedena u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“ (**Slika 26**).

Proveden je hi-kvadrat test za opažene frekvencije mitohondrijskih makrohaplogrupa kod pacijenata s COVID-19 i uzorka populacije Hrvatske. Pri broju stupnjeva slobode 13 i razini značajnosti 5% hi-kvadrat statistika iznosi 9.84, a kritična vrijednost je 22.36 dok je p-vrijednost 0.707. Izračunata hi-kvadrat vrijednost je manja od kritične vrijednosti (potrebne za odbacivanje hipoteze), odnosno p-vrijednost je puno veća od razine značajnosti α . Stoga, nisam utvrdila statistički značajnu razliku između frekvencije mitohondrijskih makrohaplogrupa kod pacijenata s COVID-19 i opće populacije.

Dalje sam ispitala postoji li odstupanje udjela makrohaplogrupa između grupa pacijenata s blagim i kritičnim simptomima. Kod pacijenata s blagim simptomima, najzastupljenije su makrohaplogrupe H i K, dok su kod pacijenata s kritičnim simptomima najzastupljenije makrohaplogrupe H i U. Udio makrohaplogrupe K je znatno manji u pacijenata s blagim simptomima u odnosu na pacijente s kritičnim simptomima (**Slika 27**).

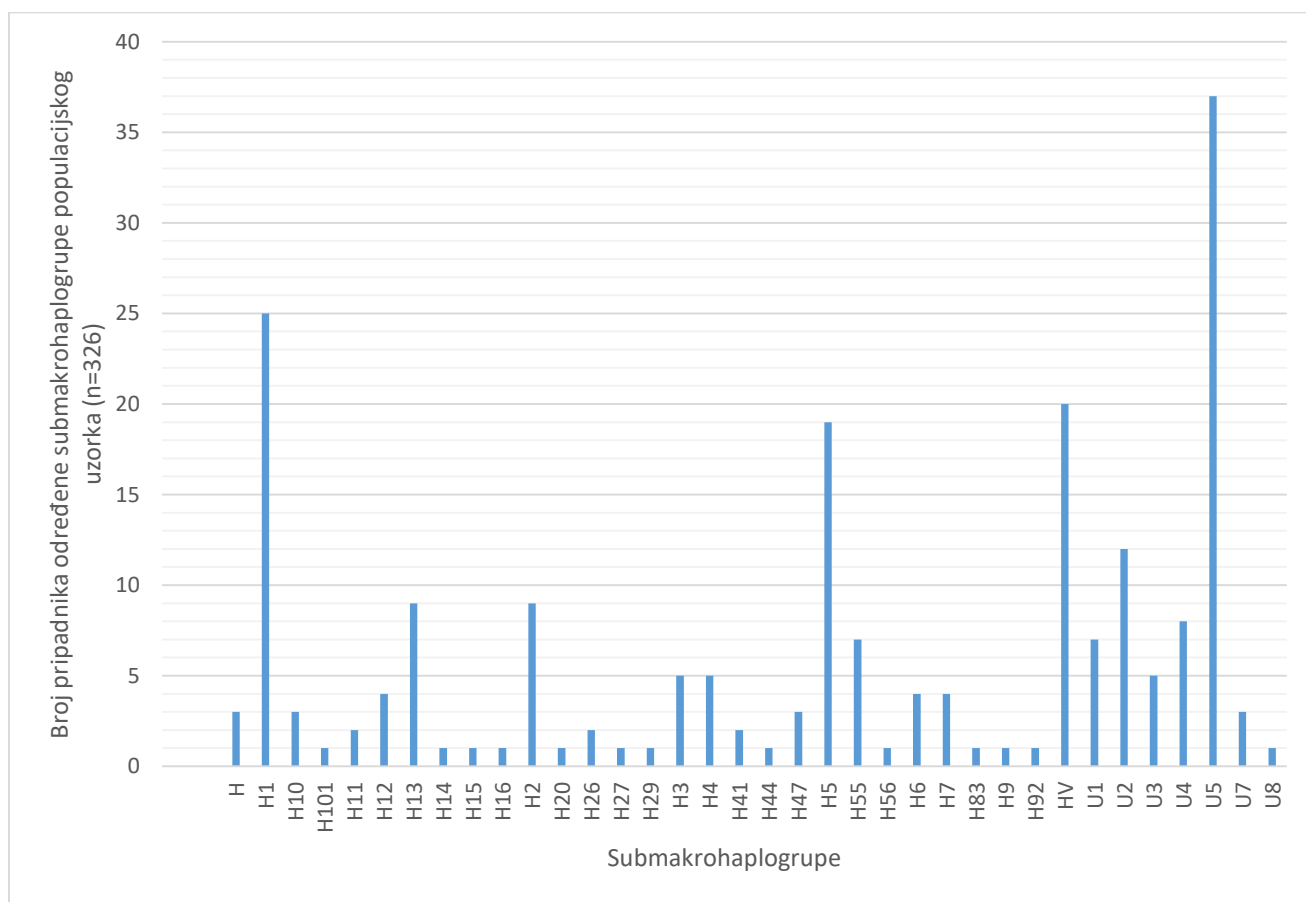


Slika 27. Udio makrohaplogrupa kod pacijenata oboljelih od COVID-19 s blagim (A) i kritičnim (B) simptomima

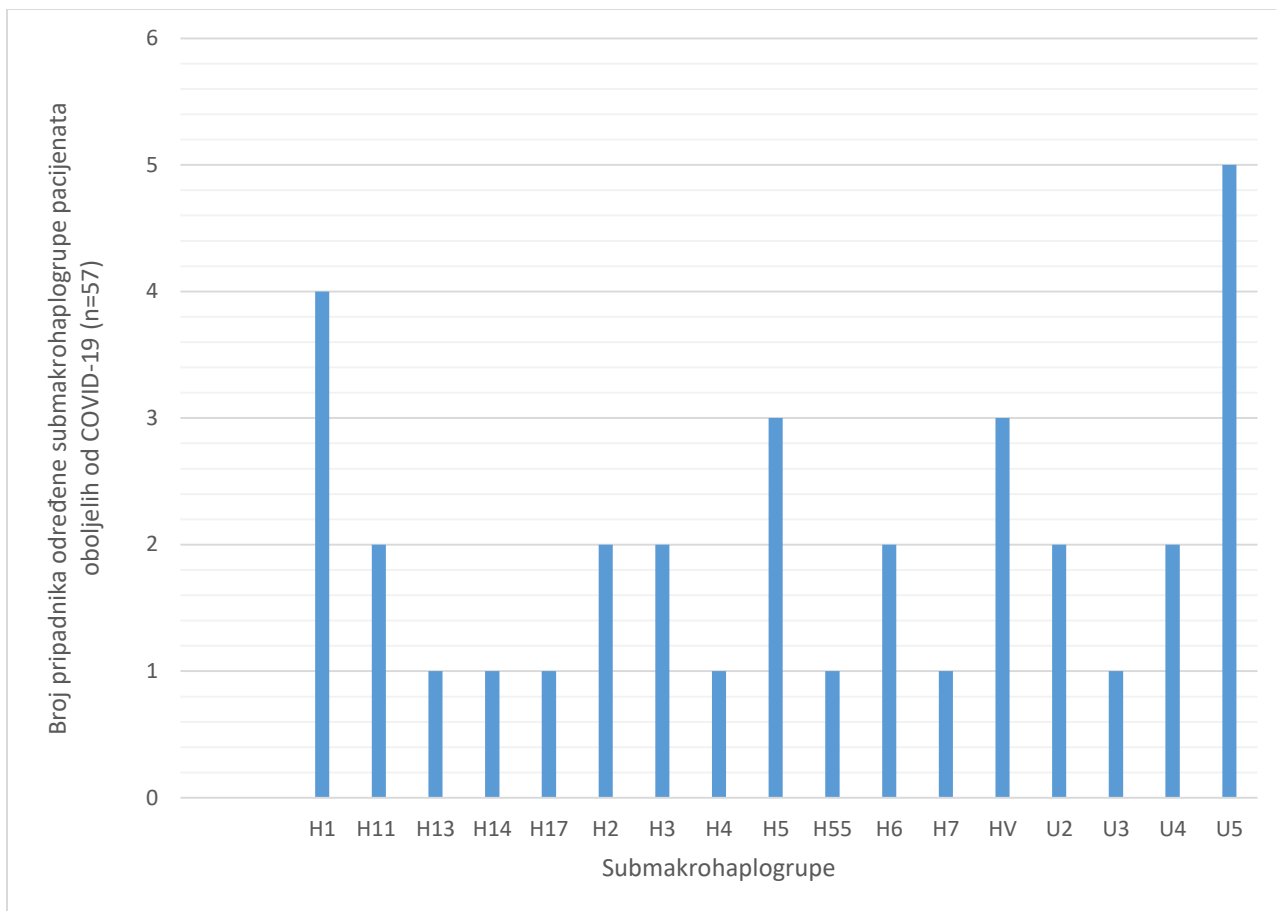
Proveden je hi-kvadrat test za opažene frekvencije mitohondrijskih makrohaplogrupa kod pacijenata s COVID-19 s kritičnim i blagim simptomima. Pri broju stupnjeva slobode 9 i razini

značajnosti 5%, hi-kvadrat iznosi 13.26, a kritična vrijednost je 16.92 dok je p-vrijednost 0.151. Izračunata hi-kvadrat vrijednost je nešto manja od kritične vrijednosti (potrebne za odbacivanje hipoteze), odnosno p-vrijednost je veća od razine značajnosti α . Stoga, nisam utvrdila statistički značajnu razliku između zastupljenosti mitohondrijskih makrohaplogrupa među pacijentima s blagim i kritičnim simptomima.

U općoj populaciji i kod pacijenata oboljelih od COVID-19 najzastupljenije su makrohaplogrupe H, HV i U, stoga sam provela usporedbu njihovih submakrohaplogrupa (**Slika 28 i 29**). U oba slučaja najdominantnija je submakrohaplogrupa U5, a slijede je HV, H1 i H5.



Slika 28. Raspodjela submakrohaplogrupa (unutar makrohaplogrupe H, HV i U) u općoj hrvatskoj populaciji



Slika 29. Raspodjela submakrohaplogrupa unutar makrohaplogrupa H, HV i U, kod pacijenata oboljelih od COVID-19

3.4. Mitohondrijske heteroplazmije

Analizom dobivenih varijanti uočen je neobično visok udio alternativnih alela na više pozicija mitohondrijskog genoma nego što bi to bilo biološki opravdano. Naime, prema dosadašnjim istraživanjima, maksimalni broj heteroplazmija u mitohondrijskom genomu jedne osobe, izoliranom iz uzoraka krvi, jest sedam (Just i sur., 2015; Li i sur., 2015). U velikom broju uzorka obrađenih unutar ovog rada pronađen je znatno veći broj heteroplazmija, što ukazuje na kontaminaciju (**Tablica 5**). Za nastavak istraživanja će biti neophodno koristiti uzorke krvi na kojima prethodno nisu vršene nikakve analize.

Tablica 5. Prikaz alternativnih alela s minimalnim udjelom od 1% za pet uzoraka. Prikazane su heteroplazmijske pozicije (brojevi u lijevim redovima) za pet uzoraka označenih brojevima 2, 129, 145, 159, 161 (stupci). Plavi kvadratići označavaju heteroplazmije s frekvencijama minornog alela iznad 1%.

	2	129	145	159	161
73					
146					
152					
153					
185					
188					
195					
199					
204					
207					
217					
228					
239					
242					
295					
296					
309					
310					
456					
462					
477					
489					
497					
499					
508					

930					
961					
1243					
1406					
1811					
1888					
2158					
2322					
2392					
2706					
2765					
3010					
3144					
3197					
3333					
3337					
3505					
3564					
3915					
3936					
4216					
4310					
4553					
4646					
4917					
5046					
5147					

	2	129	145	159	161
5162					
5194					
5261					
5460					
5471					
5999					
6047					
6293					
6722					
6983					
7028					
7080					
7245					
7389					
8116					
8119					
8239					
8251					
8269					
8311					
8448					
8578					
8697					
8898					
8994					
9380					
9404					

Nastavak *Tablice 5.*

9477					
9548					
9923					
10398					
10601					
10646					
10679					
10876					
11155					
11225					
11251					
11332					
11339					
11467					
11473					
11674					
11719					
11947					
11974					
12007					
12308					
12372					
12373					
12414					
12503					
12557					
12612					
12705					
12923					
13020					
13056					
13528					
13545					
13617					
13759					
13879					
13934					
14007					
14211					
14552					
14620					
14766					
14767					
14793					
14798					
14905					
15088					
15109					
15323					
15452					
15607					
15618					
15693					
15708					
15884					
15898					
15907					
15928					
16051					
16069					
16070					
16126					
16145					
16168					
16183					
16187					
16189					
16192					
16224					
16234					
16256					
16261					
16265					
16270					
16271					
16278					
16287					
16293					
16294					
16296					
16304					
16311					
16356					
16362					
16366					
16519					
16526					

U besplatno dostupnom računalnom programu MITOMAP (Ruiz-Pesini i sur., 2007) sam provjeravala imaju li ostale varijante detektirane u individualnim mitohondrijskim genomima, a koje ne utječu na determinaciju haplogrupa, patogeni potencijal. Promatrala sam nesinonimne varijante koje mijenjaju aminokiselinsku sekvencu proteina. Među 57 pacijenata oboljelih od COVID-19, kod njih 19 su pronađene takve varijante. Od 23 detektiranih nesinonimnih promjena, samo ih je 5 u MITOMAP-u klasificirano kao vjerojatno patogeno, bez dokumentirane jasne povezanosti s određenom bolešću. Mutacija na poziciji 14053 je detektirana kod dva pacijenta (**Tablica 6**). Kod tri pacijenta je detektirano više od jedne nesinonimne varijante, kod jednog

pacijenta (uzorak broj 4) od navedena tri, dvije nesinonimne varijante su detektirane u istom genu (Tablica 6).

Tablica 6. Mutacije mitohondrijskog genoma pacijenata oboljelih od COVID-19 analizirane u MITOMAP-u

Uzorak	Polimorfizmi koji uzrokuju promjenu	Predikcija iz Mitomapa
126	11447A [V230M Kodon 1 ND4]	vjerojatno benigna
129	12373G [T13A Kodon 1 ND5]	vjerojatno patogena
135	3368C [M21T Kodon 2 ND1]	vjerojatno patogena
142	10188G [M44V Kodon 1 ND3]	vjerojatno benigna
	15257A [D171N Kodon 1 CYTB]	vjerojatno benigna
145	7389C [Y496H Kodon 1 COX1]	vjerojatno benigna
148	13782A [I482M Kodon 3 ND5]	vjerojatno patogena
150	15747C [I334T Kodon 2 CYTB]	vjerojatno benigna
156	9064A [A180T Kodon 1 ATP6]	vjerojatno benigna
163	9630A [V142M Kodon 1 COX3]	vjerojatno benigna
12	14861A [A39T Kodon 1 CYTB]	vjerojatno benigna
16	5494C [F342S Kodon 2 ND2]	vjerojatno benigna
18	15317A [A191T Kodon 1 CYTB]	vjerojatno benigna
19	7673G [I30V Kodon 1 COX2]	vjerojatno patogena
20	5301G [I278V Kodon 1 ND2]	vjerojatno benigna
23	12011C [S418P Kodon 1 ND4]	vjerojatno benigna
24	15596A [V284I Kodon 1 CYTB]	vjerojatno patogena
29	8839A [A105T Kodon 1 ATP6]	vjerojatno benigna
3	14053G [T573A Kodon 1 ND5]	vjerojatno benigna
	15497A [G251S Kodon 1 CYTB]	vjerojatno benigna
4	14000A [L555Q Kodon 2 ND5]	vjerojatno benigna
	14053G [T573A Kodon 1 ND5]	vjerojatno benigna
	15519C [L258P Kodon 2 CYTB]	vjerojatno benigna

4. RASPRAVA

Pandemija bolesti COVID-19 uzrokovana virusom SARS-CoV-2 je zbog visokog morbiditeta i mortaliteta dovela do svjetske krize zastrašujućih razmjera. Pandemija se negativno odrazila na razne aspekte ljudskog društva, od medicinskih do socioekonomskih. Stoga se epidemiologija, dijagnoza, čimbenici rizika i liječenje bolesti COVID-19 intenzivno istražuju, praktički od trenutka pojave bolesti u Kini u prosincu 2019. godine (Roujian i sur., 2020). Virus SARS-CoV-2 se širi relativno brzo i uspješno u ljudskoj populaciji, uglavnom kapljičnim putem. Bolest poprima izuzetno širok raspon kliničkih simptoma, od blagih i asimptomatskih do težih, čak i smrtonosnih. Stoga je dobar dio znanstvene zajednice usmjerio napore na prepoznavanje čimbenika kojim bi se pouzdano mogao predvidjeti tijek i ishod bolesti. Jedan od mogućih pokazatelja čimbenika rizika je i mitohondrijski genom, koji svojom individualnom genetičkom uputom direktno oblikuje esencijalne biološke procese kao što su oksidacijska fosforilacija, produkcija RNV i apoptoza. Navedeni procesi su također usko povezani s imunosnim odgovorom organizma uslijed raznih oblika infekcije, stoga sam u ovom diplomskom radu ispitala vjerojatnost da individualne razlike u sekvenci mtDNA utječu na intenzitet imunosnog odgovora uslijed zaraze SARS-CoV-2.

Među pacijentima obuhvaćenim ovim istraživanjem većina su bili muškarci (**Slika 20A**), što se razlikuje od podataka za hrvatsku populaciju koji pokazuju da je do srpnja 2021. godine bilo zaraženo više žena nego muškaraca (podaci preuzeti s: https://www.koronavirus.hr/json/?action=po_osobama). Opažena razlika nije iznenađujuća jer uzorak pacijenata uključenih u ovu studiju nije reprezentativan za ukupnu populaciju pacijenata u Hrvatskoj, pa sukladno tome i spolna zastupljenost nije reprezentativna. Zanimljivo je da su svjetski podaci koji bilježe veći postotak muškaraca oboljelih od COVID-19 (Scully i sur., 2020) u suprotnosti s podacima za Hrvatsku. Trend nejednake spolne distribucije u populaciji oboljelih uočen na globalnoj razini, moguća je posljedica različitih socijalnih navika muškaraca i žena. Naime, istraživanje koje je provedeno 2009. godine pokazuje da je manje vjerojatno da će muškarci oprati ruke sapunom nakon korištenja toaleta (Judah i sur., 2009). Uz to, u mnogim kulturama postoji veća prisutnost muškaraca u područjima većih okupljanja (Peckham i sur., 2020). Uz to, Peckham i suradnici su pokazali da muškarci i žene imaju različiti imunosni odgovor

na SARS-CoV-2, a moguće je da su žene otpornije na zarazu zbog estrogena koji regulira gen za ACE2 na kromosomu X (Scully i sur., 2020). Navedeni čimbenici predstavljaju moguće razloge veće zastupljenosti muškaraca u populaciji osoba oboljelih od bolesti COVID-19. Isto tako, smrtnost muškaraca je veća (Scully i sur., 2020) što se također može objasniti prethodno navedenim činjenicama. Češći smrtni ishod muškaraca je ustanovljen i u ovoj studiji (**Slika 22**).

U cjelokupnom uzorku pacijenata s COVID-19 u ovoj studiji, udio preminulih pacijenata je relativno visok te su očekivano svi imali kritične simptome (**Slika 21**). S druge pak strane, četvrtina opravljenih pacijenata je također imala kritične simptome koji su uspješno prevladani. Relativno visoka smrtnost je posljedica činjenice da su među pacijentima na bolničkom liječenju, većinom oni s teškim oblikom bolesti.

Udio muškaraca i žena u grupama s kritičnim i blagim simptomima u ovoj studiji ostaje nepromijenjen u odnosu na udio u cjelokupnoj grupi pacijenata bez podjele na težinu simptoma (**Slika 23**). Iako se prema podacima znatnog broja istraživanja (Bwire, 2020; Guan i sur., 2020; Onder i sur., 2020) može zaključiti da su muškarcu skloniji razvoju težih oblika bolesti, broj pacijenata u ovoj studiji je nedostatan za provjeru spomenutog opažanja.

Analizom dobi pacijenata je utvrđeno da najviše pacijenata oboljelih od COVID-19 pripada starijoj dobnoj skupini, s podjednakim udjelom muškaraca i žena (**Slika 20B**). U podacima dostupnim za Hrvatsku populaciju za slučajeve registrirane do srpnja 2021. godine je utvrđeno da najviše ljudi oboljelih od COVID-19 pripada dobnoj skupini između 40 i 49 godina (podaci preuzeti s: https://www.koronavirus.hr/json/?action=po_osobama). Međutim, u podacima za Hrvatsku je uključena cijela populacija zaražena do srpnja 2021., dok se podaci prikupljeni za ovo istraživanje odnose na manji dio pacijenata zaprimljenih na bolničko liječenje. Tendenciju obolijevanja starijih ljudi potvrđuje i ova studija s visokim udjelom starije populacije među pacijentima u čitavom spektru simptoma (**Slika 24**). Opažena dobna zastupljenost je u skladu s prijašnjim radovima (Sun i sur., 2020; Li i sur., 2020). Mogući razlog veće osjetljivost starije populacije je, između ostaloga, i oslabljena funkcija mitohondrija zbog starenja (Huang i sur., 2020; Wallace, 2005). Nadalje, kod starijih ljudi je prisutno više kroničnih bolesti koje otežavaju simptome infekcije ili tijek oporavka. Nedavno je utvrđeno da kronična stanja poput respiratornih i kardiovaskularnih bolesti utječu na

lošiji ishod nakon zaraze (Guan i sur., 2020; Laires i sur., 2021). Navedeno je u skladu sa situacijom ustanovljenom kod pacijenata s COVID-19 u Hrvatskoj, gdje je lošiji ishod povezan s komorbiditetom.

Kvaliteta sekvenciranja te samim time i pouzdanost rezultata u ovom je radu osigurana uporabom negativnih kontrola u svakom ključnom eksperimentalnom koraku i metrikom sekvenciranja. Sve relevantne vrijednosti kvalitete postignute u ovoj studiji se kreću u optimalnim rasponima određenim od strane proizvođača i unutarnjom validacijom sekvenciranja cijelih mitohondrijskih genoma (Sukser i sur., 2021) (**Tablica 3**). Kod naprednog sekvenciranja je kontrola kvalitete svakog koraka izuzetno bitna, jer se radi o kompleksnom procesu s velikim brojem čimbenika koji mogu ugroziti vjerodostojnost krajnjeg rezultata. Nije rijedak slučaj da se rezultati brojnih znanstvenih članaka temeljenih na naprednom sekvenciranju naknadno dovedu u pitanje zbog propusta u kontroli kvalitete (Endrullat i sur., 2016).

Kako bismo ispitali potencijalnu povezanost sekvence mitohondrijskih genoma s težinom simptoma bolesti COVID-19, odredili smo mitohondrijske haplogrupe svih pacijenata koji su sudjelovali u studiji (**Tablica 4**). Ustanovljene makrohaplogrupe pacijenata se ne razlikuju značajno od distribucije makrohaplogrupa u populaciji Hrvatske (**Slika 25 i 26**). Taj rezultat je očekivan, jer ne postoje klinički, odnosno molekularno-genetički biljezi koji bi ukazivali na osjetljivost na zarazu SARS-CoV-2 u ljudskoj populaciji. Unatoč tome, postoji mogućnost različite distribucije haplogrupa u generalnoj populaciji i populaciji pacijenata koja bi se mogla ustanoviti na većem uzorku pacijenata. Stoga će se istraživanja nastaviti i izvan okvira ovog rada.

Analizom mitohondrijskih makrohaplogrupa kod pacijenata s blagim i kritičnim simptomima (**Slika 27**) je uočeno da je učestalost makrohaplogrupe K približno 5 puta veća kod pacijenata s blagim simptomima u odnosu na pacijente s kritičnim simptomima. Veći udio makrohaplogrupe K kod pacijenata oboljelih od bolesti COVID-19 ukazuje da je makrohaplogrupa K potencijalno otpornija na zarazu. Već je u prijašnjim istraživanjima prepoznat zaštitni učinak makrohaplogrupe K. Naime, pokazano je da nosioci makrohaplogrupe K imaju manji rizik obolijevanja od Parkinsonove bolesti (Ghezzi i sur., 2005) te da pripadnost haplogrupi K doprinosi zaštiti od raka štitnjače (Cocoş i sur., 2018). Međutim, u ovom radu se ne može isključiti mogućnost da je razlika

udjela mitohondrijskih makrohaplogrupa kod pacijenata oboljelih od COVID-19 s blagim i kritičnim simptomima (**Slika 27**) posljedica slučajnosti, jer je istražen premali broj pacijenata. U svakom slučaju, potencijalni zaštitni učinak makrohaplogrupe K treba istražiti u znatno proširenom opsegu.

Usporedba mitohondrijskih submakrohaplogrupa za najzastupljenije makrohaplogrupe, H, HV i U, u populaciji Hrvatske (**Slika 28**) i kod pacijenta (**Slika 29**), očekivano je dovela do sličnih rezultata u obje kategorije. Najzastupljenija submakrohaplogrupa je U5, a slijede je HV, H1 i H5.

U uzorcima krvi pacijenata izuzetih u bolničke svrhe, prilikom analize podataka sekvenciranja mtDNA, u većini uzoraka je utvrđena kontaminacija mitohondrijskom DNA porijeklom od druge, a moguće i više osoba. Budući da su u ovom radu provedene stroge antikontaminacijske mjere svojstvene molekularno-dijagnostičkim i forenzičnim laboratorijima, s negativnim kontrolama uvedenim kod izolacije DNA iz pune krvi pacijenata, zatim prilikom PCR-a, pripreme biblioteka i sekvenciranja, sa sigurnošću možemo zaključiti da je do kontaminacije došlo prije preuzimanja uzoraka krvi pacijenata iz bolnice. Ovdje je važno naglasiti da rezultati genotipizacije mtDNA i sve ostale analize provedene na uzorcima krvi nisu upitni, jer je riječ o kontaminacijskim tragovima. Međutim, za analizu heteroplazmijskih mutacija, ti tragovi mogu maskirati varijante koje su u individualnom uzorku prisutne s vrlo niskim frekvencijama. To je odraz specifične biologije mtDNA koja je ranije opisana i potrebne su posebne upute bolničkom osoblju koje vrši uzorkovanje i naknadne analize. Nažalost, u kriznoj situaciji kada su se prikupljali uzorci za analizu, hrvatske bolnice su bile pod velikim pritiskom zbog teškog epidemiološkog stanja i novonastale situacije u državi te je unatoč iskazanom trudu bilo nemoguće izuzimati uzorke krvi posebno za znanstveno istraživanje.

Unutar ovog istraživanja, utvrđene su sve varijante mtDNA u pojedinačnim uzorcima. Od varijanti u jednom mitohondrijskom genomu, nisu sve relevantne za filogenetsku klasifikaciju u haplogrupe. Stoga smo preostale varijante analizirali na način koji bi ukazao na eventualnu povezanost poznatih patoloških stanja s bolešću COVID-19. Budući da nesinonimne varijante utječu na proteinsku sekvencu, najveća je vjerojatnost da upravo takve promjene imaju i funkcionalne posljedice. Analizom nesinonimnih promjena mtDNA pacijenata utvrdili smo da su

one većinom benigne ili bez dokumentirane jasne povezanosti s određenom bolešću (**Tablica 6**). Uz to, nismo identificirali varijante kao potencijalne molekularne biljege tijekom bolesti COVID-19, zbog relativno malog broja analiziranih mitohondrijskih genoma.

Ovo istraživanje je imalo nekoliko ograničenja koja se moraju uzeti u obzir za ispravno tumačenje podataka. Naime, s ograničenim brojem uzoraka teško je procijeniti rizične čimbenike koji kod pacijenta utječu na težinu bolesti i smrtnost. Trebalo bi provesti opsežnije istraživanje na većem broju pacijenata sa zastupljenim čitavim spektrom simptoma, što bi pomoglo u daljnjem definiranju kliničke slike i molekularnih čimbenika rizika. U istraživanju su sudjelovali uglavnom stariji pacijenti koji su podložniji težem obliku bolesti. Za dobivanje šire kliničke slike u istraživanje bi trebalo uključiti pacijente pedijatrijske i adolescentne dobi. Budući da je virusni uzročnik tek identificiran, patogenost i epidemiologija još nisu u potpunosti razjašnjeni. Uz to, istraživanje je provedeno samo za pacijente u Hrvatskoj, koji većinski pripadaju u skupinu europskih mitohondrijskih haplogrupa, dok je virus prisutan u svim populacijama. Stoga bi bilo korisno odrediti potencijalne odnose između mitohondrijskih haplogrupa i metaboličkih poremećaja uzrokovanih virusom SARS-CoV-2 i u drugim populacijama.

5. ZAKLJUČCI

1. U grupi od 57 pacijenata oboljelih od bolesti COVID-19 i hospitaliziranih utvrđena je veća smrtnost u muškaraca, te veća zastupljenost pacijenata starije životne dobi s kritičnim simptomima i kroničnim bolestima.
2. Naprednim sekvenciranjem mitohondrijskih genoma utvrđeno je da distribucija mitohondrijskih makrohaplogrupa i submakrohaplogrupa pacijenata ne odstupa od distribucije u hrvatskoj populaciji. Najzastupljenije su makrohaplogrupe H (40%) i U (17,5%) te submakrohaplogrupe U5, HV, H1 i H5.
3. Makrohaplogrupa K je zastupljenija u grupi pacijenata s blagim simptomima bolesti COVID-19 (21%) u odnosu na grupu pacijenata s kritičnim simptomima (4%). Potencijalni protektivni učinak makrohaplogrupe K treba ispitati na većem uzorku pacijenata, kako bi se dosegla statistička značajnost.
4. U 57 analiziranih mitogenoma pronađene su 23 nesinonimne varijante koje nisu povezane s varijantama koje određuju haplogrupe. Niti jedna od njih, prema dosadašnjoj literaturi, direktno ne uzrokuje neko patološko stanje.
5. Analiza heteroplazmijskih mutacija nije provedena zbog kontaminacije uzoraka prilikom prethodnih bolničkih pretraga. Analiza heteroplazmijskih mutacija se mora provoditi na intaktnim biološkim uzorcima.

6. LITERATURA

1. Achilli, A., Rengo, C., Magri, C., Battaglia, V., Olivieri, A., Scozzari, R., Cruciani, F., Zeviani, M., Briem, E., Carelli, V., Moral, P., Dugoujon, J., Roostalu, U., Loogva, E., Kivisild, T., Richards, M., Villems, R., Santachiara-benerecetti, A. S., Semino, O., i Torrioni, A. (2004): The Molecular Dissection of mtDNA Haplogroup H Confirms That the Franco-Cantabrian Glacial Refuge Was a Major Source for the European Gene Pool. *American Journal of Human Genetics*, 75(5), 910–918. <https://doi.org/10.1086/425590>
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., i Walter, P. (2002): Molecular Biology of the Cell, 4th edition. *Garland Science*, New York.
3. Alsaadi, E. A. J., i Jones, I. M. (2019): Membrane binding proteins of coronaviruses. *Future Virology*, 14(4), 275–286. <https://doi.org/10.2217/fvl-2018-0144>
4. Amorim, A., Fernandes, T., i Taveira, N. (2019): Mitochondrial DNA in human identification: a review. *PeerJ*, 7, e7314. <https://doi.org/10.7717/peerj.7314>
5. Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., i Young, I. G. (1981): Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457–465 (1981). <https://doi.org/10.1038/290457a0>
6. Andrews, R., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R., Turnbull, D., i Howell, N. (1999): Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, 23, 147. <https://doi.org/10.1038/13779>
7. Asha, K., i Sharma-Walia, N. (2018): Virus and tumor microenvironment induced ER stress and unfolded protein response: from complexity to therapeutics. *Oncotarget*, 9(61), 31920–31936. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25886>
8. Banoth, B., i Cassel, S. (2018): Mitochondria in innate immune signaling. *Translational Research*, 202, 52-68. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.07.014>
9. Bosch, B. J., Martina, B. E., Van Der Zee, R., Lepault, J., Haijema, B. J., Versluis, C., Heck, A. J., De Groot, R., Osterhaus, A. D., i Rottier, P. J. (2004): Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad

- repeat-derived peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(22), 8455–8460. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400576101>
10. Bushnell, B. (2014). BBMap: A Fast, Accurate, Splice-Aware Aligner. United States, 1–2. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-238>
 11. Bwire, G. M. (2020): Coronavirus: Why Men are More Vulnerable to Covid-19 Than Women? *SN Comprehensive Clinical Medicine*, 1–3. <https://doi.org/10.1007/s42399-020-00341-w>
 12. Campo, D. S., Roh, H. J., Pearlman, B. L., Fierer, D. S., Ramachandran, S., Vaughan, G., Hinds, A., Dimitrova, Z., Skums, P., i Khudyakov, Y. (2016): Increased Mitochondrial Genetic Diversity in Persons Infected With Hepatitis C Virus. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 26(2), 676–684. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.05.012>
 13. Case, J. T., i Wallace, D. C. (1981): Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblasts. *Somatic cell genetics*, 7(1), 103–108. <https://doi.org/10.1007/BF01544751>
 14. Chen, Y., Zhou, Z., i Min, W. (2018): Mitochondria, Oxidative Stress and Innate Immunity. *Frontiers in Physiology*, 9,1487. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01487>
 15. Cocoş, R., Schipor, S., Badiu, C., i Raicu, F. (2018): Mitochondrial DNA haplogroup K as a contributor to protection against thyroid cancer in a population from southeast Europe. *Mitochondrion*, 39, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.08.012>
 16. Cooper, G. M., i Hausman, R. E. (2013): Stanica: Molekularni pristup. *Medicinska naklada*, Zagreb.
 17. Craven, L., Tang, M. X., Gorman, G. S., De Sutter, P., i Heindryckx, B. (2017): Novel reproductive technologies to prevent mitochondrial disease. *Human Reproduction Update*, 23(5), 501–519. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx018>
 18. Drak Alsibai, K. (2020): Expression of angiotensin-converting enzyme 2 and proteases in COVID-19 patients: A potential role of cellular FURIN in the pathogenesis of SARS-CoV-2. *Medical hypotheses*, 143, 109893. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109893>

19. Elesela, S., i Lukacs, N. W. (2021): Role of Mitochondria in Viral Infections. *Life*, 11(3), 232. <https://doi.org/10.3390/life11030232>
20. Elson, J. L., Andrews, R. M., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M., i Howell, N. (2001): Analysis of European mtDNAs for recombination. *American journal of human genetics*, 68(1), 145–153. <https://doi.org/10.1086/316938>
21. Endrullat, C., Jörn Glökler, J., Franke, P., i Frohme, M. (2016): Standardization and quality management in next-generation sequencing. *Applied & Translational Genomics*, 10, 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.atg.2016.06.001>
22. Epidemiology Working Group for NCIP Epidemic Response, Chinese Center for Disease Control and Prevention (2020): *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi*, 41(2), 145–151. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.003>
23. Fehr, A. R., i Perlman, S. (2015): Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1282, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
24. Garrison, E., i Marth, G. (2012): Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. 1–9. <http://arxiv.org/abs/1207.3907>
25. Ge, X. Y., Li, J. L., Yang, X. Lou, Chmura, A. A., Zhu, G., Epstein, J. H., Mazet, J. K., Hu, B., Zhang, W., Peng, C., Zhang, Y. J., Luo, C. M., Tan, B., Wang, N., Zhu, Y., Crameri, G., Zhang, S. Y., Wang, L. F., Daszak, P., i Shi, Z. L. (2013): Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*, 503(7477), 535–538. <https://doi.org/10.1038/nature12711>
26. Ghezzi, D., Marelli, C., Achilli, A., Goldwurm, S., Pezzoli, G., Barone, P., Pallecchia, M. T., Stanzione, P., Brusa, L., Bentivoglio, A. R., Bonuccelli, U., Petrozzi, L., Abbruzzese, G., Marchese, R., Cortelli, P., Grimaldi, D., Martinelli, P., Ferrarese, C., Garavaglia, B., ... Zeviani, M. (2005): Mitochondrial DNA haplogroup K is associated with a lower risk of parkinson's disease in Italians. *European Journal of Human Genetics*, 13(6), 748–752. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201425>

27. Gordon, D. E., Jang, G. M., Bouhaddou, M., Xu, J., Obernier, K., White, K. M., O'Meara, M. J., Rezelj, V. V., Guo, J. Z., Swaney, D. L., Tummino, T. A., Hüttenhain, R., Kaake, R. M., Richards, A. L., Tutuncuoglu, B., Foussard, H., Batra, J., Haas, K., Modak, M., ... Krogan, N. J. (2020): A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, 583(7816), 459–468. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>
28. Guan, W., Ni, Z., Hu, Y., Liang, W., Ou, C., He, J., Liu, L., Shan, H., Lei, C., Hui, D. S. C., Du, B., Li, L., Zeng, G., Yuen, K.-Y., Chen, R., Tang, C., Wang, T., Chen, P., Xiang, J., ... Zhong, N. (2020): Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*, 382(18), 1708–1720. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2002032>
29. He, Y., Zhou, Y., Liu, S., Kou, Z., Li, W., Farzan, M., i Jiang, S. (2004): Receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein induces highly potent neutralizing antibodies: implication for developing subunit vaccine. *Biochemical and biophysical research communications*, 324(2), 773–781. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.106>
30. Hendrickson, S. L., Hutcheson, H. B., Ruiz-Pesini, E., Poole, J. C., Lautenberger, J., Sezgin, E., Kingsley, L., Goedert, J. J., Vlahov, D., Donfield, S., Wallace, D. C., i O'Brien, S. J. (2008): Mitochondrial DNA haplogroups influence AIDS progression. *AIDS*, 22(18), 2429–2439. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32831940bb>
31. Holt, I. J., Harding, A. E., Petty, R. K., i Morgan-Hughes, J. A. (1990): A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *American journal of human genetics*, 46(3), 428–433.
32. Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020): Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
33. Judah, G., Aunger, R., Schmidt, W., Michie, S., i Granger, S. (2009): Experimental Pretesting of Hand-Washing Interventions in a Natural Setting. *American Journal of Public Health*, 99, 405–411. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2009.164160>
34. Just, R. S., Irwin, J. A., i Parson, W. (2015): Forensic Science International : Genetics Mitochondrial DNA heteroplasmy in the emerging field of massively parallel sequencing.

Forensic Science International: Genetics, 18, 131–139.

<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.003>

35. Kulkarni, H. S., Scozzi, D., i Gelman, A. E. (2020): Recent Advances into the Role of Pattern Recognition Receptors in Transplantation. *Cellular Immunology*, 351, 1–30.
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104088>
36. Laires, P. A., Dias, S., Gama, A., Moniz, M., Pedro, A. R., Soares, P., Aguiar, P., i Nunes, C. (2021): The Association Between Chronic Disease and Serious COVID-19 Outcomes and Its Influence on Risk Perception: Survey Study and Database Analysis. *JMIR public health and surveillance*, 7(1), e22794. <https://doi.org/10.2196/22794>
37. Li, F. (2016): Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual review of virology*, 3(1), 237–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>
38. Li, H., i Durbin, R. (2009).: Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
39. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., i Durbin, R. (2009): The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
40. Li, M., Schröder, R., Ni, S., Madea, B., i Stoneking, M. (2015): Extensive tissue-related and allele-related mtDNA heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(8), 2491–2496. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419651112>
41. Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., Ren, R., Leung, K. S. M., Lau, E. H. Y., Wong, J. Y., Xing, X., Xiang, N., Wu, Y., Li, C., Chen, Q., Li, D., Liu, T., Zhao, J., Liu, M., ... Feng, Z. (2020): Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 382(13), 1199–1207.
<https://doi.org/10.1056/nejmoa2001316>

42. Li, X., Zhou, T., Wu, C., Tao, L., Bi, R., Chen, L., i Deng, D. (2018): Correlations between mitochondrial DNA haplogroup D5 and chronic hepatitis B virus infection in Yunnan , China. *Scientific Reports*, 8(869), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19184-6>
43. Lutz, S., Wittig, H., Weisser, H. J., Heizmann, J., Junge, A., Dimo-Simonin, N., Parson, W., Edelmann, J., Anslinger, K., Jung, S., i Augustin, C. (2000): Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? *Forensic science international*, 113(1-3), 97–101. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(00\)00222-x](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(00)00222-x)
44. Masters, P. S. (2006): The Molecular Biology of Coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 66, 193–292. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)
45. Mitchell, S. L., Goodloe, R., Brown-Gentry, K., Pendergrass, S. A., Murdock, D. G., i Crawford, D. C. (2014): Characterization of mitochondrial haplogroups in a large population-based sample from the United States. *Human genetics*, 133(7), 861–868. <https://doi.org/10.1007/s00439-014-1421-9>
46. Nailwal, H., i Chan, F. K. (2019): Necroptosis in anti-viral inflammation. *Cell Death & Differentiation*, 26, 4–13. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0172-x>
47. Onder, G., Rezza, G., i Brusaferro, S. (2020): Case-Fatality Rate and Characteristics of Patients Dying in Relation to COVID-19 in Italy. *Journal of the American Medical Association*, 323(18), 1775–1776. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.4683>
48. O'Neill, L., Kishton, R., i Rathmell, J. (2016): A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews Immunology*, 16, 553–565. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.70>
49. Peckham, H., Gruijter, N. M. De, Ciurtin, C., Wedderburn, L. R., Deakin, C. T., Raine, C., Radziszewska, A., Rosser, E. C., i Webb, K. (2020): Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. *Nature Communications*, 11(1), 6317. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19741-6>
50. Picard, M., Wallace, D. C., i Burelle, Y. (2016): The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion*, 30, 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.07.003>

51. Roostalu, U., Kutuev, I., Loogva, E., Metspalu, E., Tambets, K., Reidla, M., Khusnutdinova, E. K., Usanga, E., Kivisild, T., i Villems, R. (2007): Origin and Expansion of Haplogroup H , the Dominant Human Mitochondrial DNA Lineage in West Eurasia : The Near Eastern and Caucasian Perspective. *Molecular Biology and Evolution*, 24(2), 436–448.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msl173>
52. Roujian, L., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., ... Tan, W. (2020): Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* (London, England), 395(10224), 567–574. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
53. Ruiz-Pesini, E., Lott, M. T., Procaccio, V., Poole, J. C., Brandon, M. C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P., i Wallace, D. C. (2007): An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Research*, 35, 823–828.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl927>
54. Scully, E. P., Haverfield, J., Ursin, R. L., i Klein, S. L. (2020): Considering how biological sex impacts immune responses and COVID-19 outcomes. *Nature Reviews Immunology*, 20, 442–447. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0348-8>
55. Simmons, G., Gosalia, D. N., Rennekamp, A. J., Reeves, J. D., Diamond, S. L., i Bates, P. (2005): Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33), 11876–11881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505577102>
56. Stewart, J., i Chinnery, P. (2015): The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 16, 530–542.
<https://doi.org/10.1038/nrg3966>
57. Sukser, V., Rokić, F., Barbarić, L., i Korolija, M. (2021): Assessment of Illumina® Human mtDNA Genome assay: workflow evaluation with development of analysis and interpretation guidelines. *International Journal of Legal Medicine*, 135, 1161–1178.
<https://doi.org/10.1007/s00414-021-02508-z>

58. Sun, K., Chen, J., i Viboud, C. (2020): Early epidemiological analysis of the coronavirus disease 2019 outbreak based on crowdsourced data: a population-level observational study. *The Lancet Digital Health*, 2(4), e201–e208. [https://doi.org/10.1016/S2589-7500\(20\)30026-1](https://doi.org/10.1016/S2589-7500(20)30026-1)
59. Šimić, I. (2019): Prisutnost virusa u populacijama šišmiša u Hrvatskoj (Disertacija). Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:093402>
60. Taanman, J. W. (1999): The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et biophysica acta*, 1410(2), 103–123. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(98\)00161-3](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(98)00161-3)
61. Taneja, V. (2018): Sex Hormones Determine Immune Response. *Frontiers in Immunology*, 9, 1931. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01931>
62. Tang, Q., Song, Y., Shi, M., Cheng, Y., Zhang, W., i Xia, X. (2015): Inferring the hosts of coronavirus using dual statistical models based on nucleotide composition. *Scientific Reports*, 5, 17155. <https://doi.org/10.1038/srep17155>
63. Tang, C., Deng, Z., Li, X., Yang, M., Tian, Z., Chen, Z., Wang, G., Wu, W., Feng, W., Zhang, G., i Chen, Z. (2020): Helicase of Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain HV Reveals a Unique Structure. *Viruses*, 12(2), 215. <https://doi.org/10.3390/v12020215>
64. Thaker, S. K., Ch'ng, J., i Christofk, H. R. (2019): Viral hijacking of cellular metabolism. *BMC Biology*, 17, 59. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0678-9>
65. Torroni, A., Sukernik, R. I., Schurr, T. G., Starikorskaya, Y. B., Cabell, M. F., Crawford, M. H., Comuzzie, A. G., i Wallace, D. C. (1993): mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans. *American journal of human genetics*, 53(3), 591–608.
66. Tuppen, H. A. L., Blakely, E. L., Turnbull, D. M., i Taylor, R. W. (2010): Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(2), 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.09.005>

67. van Oven, M., i Kayser, M. (2009): Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human Mutation*, 30(2), E386–E394.
<https://doi.org/10.1002/humu.20921>
68. Velavan, T. P., i Meyer, C. G. (2020): The COVID-19 epidemic. *Tropical Medicine and International Health*, 25(3), 278–280. <https://doi.org/10.1111/tmi.13383>
69. Wallace, D. C. (2005): A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual review of genetics*, 39, 359–407. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.110304.095751>
70. Wallace, D. C., i Chalkia, D. (2013): Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11). a021220. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021220>
71. Weissensteiner, H., Pacher, D., Kloss-Brandstätter, A., Forer, L., Specht, G., Bandelt, H. J., Kronenberg, F., Salas, A., i Schönherr, S. (2016): HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup classification in the era of high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W58–W63. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw233>
72. Zhou, P., Yang, X. Lou, Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. Di, Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., ... Shi, Z. L. (2020): A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
73. Zhu, Z., Zhang, Z., Chen, W., Cai, Z., Ge, X., Zhu, H., Jiang, T., Tan, W., i Peng, Y. (2018): Predicting the receptor-binding domain usage of the coronavirus based on kmer frequency on spike protein. *Infection, genetics and evolution: Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 61, 183–184.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.03.028>
74. Zirui Tay, M., Meng Poh, C., Rénia, L., MacAry, P. A., i P. Ng, L. F. (2020): The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*, 20, 363–374. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>

Internetski izvori:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/251831106> (pristupljeno 15.05.2021.)

<https://www.phylotree.org> (pristupljeno 20.05.2021.)

<https://www.phylotree.org/tree/index.htm> (pristupljeno 20.05.2021.)

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html> (pristupljeno 10.06.2021.)

https://www.koronavirus.hr/json/?action=po_osobama (pristupljeno: 12.07.2021.)

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html> (pristupljeno: 28.07.2021.)

<https://bitesizebio.com/13546/sequencing-by-synthesis-explaining-the-illumina-sequencing-technology/> (pristupljeno: 02.06.2021.)

https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_3 (pristupljeno 20.08.2021.)

7. ŽIVOTOPIS

Osobne informacije:

Ime i prezime: Antonija Mamić

E-adresa: antonija.mamic14@gmail.com

Obrazovanje i osposobljavanje:

U Zagrebu sam završila XI. gimnaziju te sam 2015. godine upisala preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a po završetku istog, svoje obrazovanje sam nastavila na diplomskom studiju eksperimentalne biologije, modul fiziologija i imunobiologija, na istom fakultetu. Tijekom studija sam stekla dodatno praktično iskustvo držanjem demonstracija iz kolegija Bakteriologija i virologija te odrađivanjem laboratorijske stručne prakse na Zavodu za sudsku medicinu i kriminalistiku na Medicinskom fakultetu u Zagrebu (voditelj prakse: dr.sc. Ivana Furač). Položila sam i LabAnim (kategorija A) tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama. Dobitnica sam Rektorove nagrade za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici u akademskoj godini 2017./2018. za organizaciju trećeg simpozija studenata bioloških usmjerenja. Uz to, sudjelovala sam na manifestaciji „Noć biologije“, a 2019. godine na predstavljanju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta na Smotri Sveučilišta u Zagrebu.

Ostale vještine:

Član udruge studenata biologije „BIUS“ (Botanička sekcija).

Vozačica sam B kategorije.