

Komplementacija citomegalovirusnih varijanti in vivo

Čičin-Šain, Luka

Doctoral thesis / Disertacija

2006

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:956774>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



150

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

LUKA ČIČIN-ŠAIN

KOMPLEMENTACIJA CITOMEGALOVIRUSNIH
VARIJANTI IN VIVO

Doktorska disertacija

Rijeka, 2006

PODACI O AUTORU I DOKTORSKOM RADU

1. AUTOR

IME I PREZIME	Luka Čičin - Šain
DATUM I MJESTO ROĐENJA	6. srpnja 1972., Rijeka
NAZIV FAKULTETA I GODINA ZAVRŠETKA DODIPLOMSKOG STUDIJA	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, 1996.
NAZIV FAKULTETA I GODINA ZAVRŠETKA POSLIJEDIPLOMSKOG STUDIJA	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, 2004.
SADAŠNJE ZAPOSLENJE, ADRESA	Oregon Health and Science University, SAD

2. DOKTORSKI RAD

NASLOV	Komplementacija citomegalovirusnih varijanti in vivo
USTANOVA NA KOJOJ JE PRIJAVLJEN I IZRAĐEN DOKTORSKI RAD	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; Max Von Pettenkofer Institut, Njemačka
BROJ STRANICA, SLIKA, GRAFIKONA, TABLICA I BIBLIOGRAFSKIH PODATAKA	Stranica 75, slika 13, bibliografskih podataka 106
ZNANSTVENO PODRUČJE, POLJE I GRANA	Znanstveno područje <i>biomedicina i zdravstvo</i> , znanstveno polje <i>temeljne medicinske znanosti</i> , znanstvena grana <i>infektologija</i>
IME I PREZIME MENTORA	Prof.dr.sc. Stipan Jonjić
FAKULTET NA KOJEM JE OBRANJEN DOKTORSKI RAD	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

3. OCJENA I OBRANA

DATUM PRIJAVE TEME	11. srpnja 2005.
DATUM PREDAJE RADA	2. veljače 2006.
DATUM SJEDNICE FAKULTETSKOG VIJEĆA NA KOJOJ JE RAD PRIHVAĆEN	14. ožujka 2006.
POVJERENSTVO ZA OCJENU DOKTORSKOG RADA	Prof.dr.sc. Pero Lučin, doc.dr.sc. Ivica Pavić, doc.dr.sc. Alemka Markotić
POVJERENSTVO ZA OBRANU DOKTORSKOG RADA	Prof.dr.sc. Pero Lučin, doc.dr.sc. Ivica Pavić, doc.dr.sc. Alemka Markotić, prof.dr.sc. Stipan Jonjić
DATUM OBRANE	24. ožujka 2006.

Mentor rada: Prof. Dr. Stipan Jonjić

Doktorska disertacija obranjen/a je dana _____ na Medicinskom fakultetu u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Pero Lučin
2. Doc. dr. sc. Ivica Pavić
3. Doc. dr. sc. Alemka Markotić
4. Prof. dr. sc. Stipan Jonjić

Rad ima 74 lista.

UDK: _____

Predgovor

Ovaj je rad napravljen u suradnji s Max Von Pettenkofer Institutom, Ludwig Maximilian Univerziteta u Münchenu, Njemačka, pod mentorstvom prof. dr. Stipana Jonjića.

Iskreno se zahvaljujem svojoj supruzi Sanji na ljubavi, povjerenju i podršci.

Zahvaljujem se i svojim mentorima, Stipi i Ulrichu, koji su mi pomogli da sazrijem i naučim se razmišljati kao znanstvenik.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Višestruke infekcije različitim sojevima citomegalovirusa (CMV) koreliraju s težom kliničkom slikom i prognozom. Klinička istraživanja nisu mogla razjasniti jesu li koinfekcije učestale kod neotpornih bolesnika, čija je prognoza lošija, ili do pogoršanja prognoze dolazi zbog komplementacije među CMV sojevima.

Cilj je ovoga rada definirati uzročno-posljedičnu vezu CMV-replikacije i koinfekcije s različitim virusnim sojevima *in vivo*.

Materijal i metode: Singenični miševi su inficirani atenuiranim mutantama mišjeg CMV-a (MCMV). Kvantitativnim je PCR-om te titracijom infektivnog virusa u organima uspoređena replikacija MCMV mutanti u prisustvu ili odsustvu virulentnog virusa. Uloga funkcionalne trans-komplementacije u virusnim *in vivo* interakcijama određena je koinfekcijom mutantama koje su ekspimirale Cre-rekombinazu ili Cre-inducibilni GFP gen. Trans-komplementacija je kvantificirana fluorescentnom mikroskopijom za GFP te potvrđena PCR-om. Rezultate smo zaključno potvrdili *in situ* hibridizacijom specifičnom za različite varijante MCMV-a.

Rezultati: Pri koinfekciji su atenuirane virusne varijante bolje replicirale nego li pri infekciji pojedinačnim mutantama. Koinfekcija MCMV-om koji je ispoljavao Cre redovito je dovođila do rekombinacije genoma koinfekcijskog partnera te ekspresije GFP gena. Genomi različitih mutanti su se nalazili u istim hepatocitima inficiranih miševa, a većina je stanica inficiranih atenuiranom varijantom bila istovremeno inficirana virulentnim virusom.

Zaključak: Različite se MCMV varijante nalaze u istim stanicama pri *in vivo* koinfekciji, što olakšava virusnu trans-komplementaciju te replikaciju virusnih varijanti. Stoga, rezultati ukazuju da pri istovremenoj infekciji različitim sojevima CMV-a dolazi do njihove komplementacije, što pogoršava kliničku sliku i prognozu.

ABSTRACT

Aim: Multiple cytomegalovirus (CMV) strain infections correlate with more severe clinical outcomes. Clinical studies could not clarify whether the resistance to CMV defines the number of CMV strains in a patient, or whether viral complementation may aggravate the prognosis. This study will define the cause-effect relationship between infections by multiple viral strains and cytomegalovirus in vivo growth.

Materials and Methods: Singenic mice were infected with attenuated mutants of the mouse cytomegalovirus (MCMV). We compared the growth of attenuated MCMVs in the presence or absence of virulent virus by real-time PCR and infectious virus titration. The role of trans-complementation in MCMV strain interactions in vivo was assessed using MCMV mutants expressing Cre-recombinase or a Cre-inducible GFP gene. Fluorescent microscopy for GFP expression was used to quantify trans-complementation and results were confirmed by PCR. The relevance of complementation for virus replication was confirmed by in situ hybridization assays specific for different MCMV variants.

Results: Coinfection resulted in better replication of attenuated mutants than single infection. The coinfection with the MCMV expressing Cre-recombinase resulted in regular recombination and expression of the GFP gene by the coinfecting virus. Genomes of multiple MCMV variants were found in the same hepatocytes of coinfecting animals, and the majority of the cells infected with the attenuated mutant were at the same time infected with the replication competent MCMV.

Conclusion: Multiple CMV variants are found in the same cells during in vivo coinfection, facilitating functional complementation and replication of viral variants. Thus, the results indicate that coinfection with multiple CMV strains leads to viral complementation, which may worsen the clinical picture and the prognosis.

Ključne riječi

Citomegalovirus; Komplementacija; Rekombinacija; Cre-rekombinaza; *In situ* hibridizacija; PCR

Keywords

Cytomegalovirus; Complementation; Recombination; Cre-recombinase; *In situ* hybridization; PCR

SADRŽAJ

SAŽETAK	IV
ABSTRACT	V
Ključne riječi	VI
SADRŽAJ	VII
UVOD	1
Citomegalovirusi	1
Epidemiologija HCMV-a	1
Klinička slika HCMV infekcije	2
Koinfekcija različitim kliničkim sojevima HCMV-a	4
Molekularni mehanizmi herpesvirusnih interakcija	7
Eksperimentalni modeli koinfekcije herpesvirusnim varijantama	10
MATERIJAL I METODE	14
Materijal	14
Metode	15
REZULTATI	22
Sinergija MCMV-mutanti tijekom koinfekcije	22
Utjecaj WT-MCMV-a na replikaciju atenuiranih mutanti in vivo	23
Utjecaj rekombinacije DNA na komplementaciju MCMV-varijanti	29
Izravan uvid u funkcionalnu trans-komplementaciju	31
Funkcionalna trans-komplementacija in vivo	35
Izravan uvid u koinfekciju pojedinačnih stanica in vivo	40
RASPRAVA	45
ZAKLJUČAK	55

LITERATURA.....	56
LUKA ČIČIN-ŠAIN - ŽIVOTOPIS.....	72

UVOD

Citomegalovirusi

Citomegalovirusi (CMV) su najznačajniji članovi obitelji beta-herpesvirusa. Značajke su CMV-a uska specifičnost za vrstu, izrazito spori replikacijski ciklus, sposobnost održavanja doživotne latencije po infekciji te široki dijapazon staničnog tropizma koji uključuje epitelne, endotelne i hematopoetske stanice (1). Humani CMV (HCMV) među najčešćim je uzročnicima urođenih virusnih infekcija koje prate razvojni i drugi poremećaji. HCMV je također značajan uzročnik morbiditeta i mortaliteta u bolesnika podvrgnutih transplantacijskim procedurama, kao i bolesnika s urođenim ili stečenim imunodeficijencijama (2).

Epidemiologija HCMV-a

HCMV je ubikvitaran virus. Serološko-epidemiološke su studije dokazale da je HCMV univerzalno endemski prisutan u svim proučavanim društvenim sredinama, od tehnološki razvijenih zemalja do izoliranih skupina Aboridžina (2). Za dobnu skupinu od 35 do 40 godina prevalencija infekcije HCMV-om iznosi oko 80% u razvijenim zemljama (3). Ovaj je postotak još viši u zemljama u razvoju, u kojima može iznositi i oko 95%. Ujedno, budući da se radi o virusu koji perzistira u stanju latencije po aktivnoj infekciji, prevalencija raste u starijim dobnim skupinama (3). Infektivni se HCMV luči mjesecima po infekciji u urinu i drugim tjelesnim izlučevinama, što uz općenito blage simptome pogoduje širenju HCMV-a kroz populaciju.

Klinička slika HCMV infekcije

U većine je imunokompetentnih osoba tijekom akutne HCMV-infekcije iznimno benigna i prolazi kao subklinička infekcija ili, u oko 5% slučajeva, uz blagu i nespecifičnu kliničku sliku, bez patognomoničnih simptoma (3). Iznimno se akutna infekcija može prezentirati kliničkom slikom virusne mononukleoze, tako da je za oko 8% kliničkih slika infektivne mononukleoze odgovorna primoinfekcija HCMV-om (2). Pa ipak, u odsustvu laboratorijske dijagnostike, akutnu je HCMV-infekciju u odraslih bolesnika uglavnom nemoguće razlikovati od drugih virusnih infekcija te stoga najčešće ostaje neprepoznata.

Kongenitalna citomegalovirusna infekcija znatno češće rezultira klinički evidentnom slikom. Oko 1% novorođenčadi inficirano je HCMV-om, a oko 7% inficiranih razvija simptomatsku kongenitalnu CMV-infekciju karakteriziranu ikterusom, trombocitopenijom, petehijalnim krvarenjem i hepatosplenomegalijom, a kasnije teškoćama psihomotornog razvoja, gluhoćom ili sljepoćom (4, 5). Dugoročna je prognoza za novorođenčad sa simptomatskom CMV-bolesti naročito slaba jer većina preživjelih razvija dugoročne simptome. Kongenitalna je infekcija HCMV-om potencijalno opasna i u slučaju izostanka očitih akutnih simptoma pri porodu zbog povišenog rizika razvitka gluhoće ili psihomotorne retardacije. Oko 15% asimptomatskih slučajeva kongenitalne infekcije HCMV-om rezultira trajnim oštećenjima. Godišnje samo u SAD-u HCMV-infekcija u oko 8000 novorođenčadi rezultira oštećenjima CNS-a, pa se stoga kongenitalna infekcija ovim virusom ubraja u najznačajnije virusne infekcije u razvijenim zemljama.

Imunodeficitne su osobe, bilo zbog urođenih ili stečenih imunodeficijencija, također iznimno osjetljive na infekciju CMV-om. Imunosuprimirani bolesnici naročito često bivaju inficirani HCMV-om zbog njegove rasprostranjenosti, ali i zbog

herpesvirusne sposobnosti održavanja u latenciji te reaktivacije u bolesnicima po imunosupresiji. Stoga su simptomi citomegalovirusne bolesti u bolesnika sa stečenim imunodeficijencijama često rezultat reaktivacije latentnog HCMV-a. Kod svih je ovih sindroma pravilo da težina kliničke slike korelira s težinom imune supresije (2, 4).

Kod bolesnika zaraženih AIDS-om HCMV je najčešći oportunistički infekt i javlja se pri niskim razinama CD4 limfocita T . Premda je retinitis najčešća klinička manifestacija HCMV-infekcije pri AIDS-u (85,3%), infekcija se HCMV-om može očitovati i ezofagitisom (9,2%), kolitisom (7,3%), a rjeđe i infekcijom drugih organa te mješovitim kliničkim slikama (6).

Citomegalovirusne se infekcije manifestiraju i kod bolesnika podvrgnutih transplantacijskim zahvatima. Imunosupresija, kojoj primatelji organa bivaju rutinski podvrgnuti kako bi se smanjila opasnost odbacivanja presatka, dovodi do učestale HCMV-infekcije koja se manifestira vrućicom, leukopenijom, klonulošću, artralgijama i makularnim osipom. Najteža je posljedica HCMV-infekcije odbacivanje presatka i zatajivanje njegove funkcije (2). Seroški status davatelja i primatelja organa znatno utječe na vjerojatnost infekcije HCMV-om te razvitka kliničkih simptoma. Stoga je rizik razvitka HCMV-infekcije veći kod seropozitivnih primatelja organa jer kod njih može doći do reaktivacije virusa. U slučaju organa porijeklom od seropozitivnih davatelja također dolazi do češćih epizoda HCMV infekcije i bolesti, a naročito je opasna kombinacija seropozitivnog davatelja i seronegativnog primatelja jer u odsustvu protuvirusne imunosti dolazi do vrlo česte reaktivacije HCMV-a i citomegalovirusne bolesti (7, 8). U ovom slučaju, u odsustvu protuvirusne profilakse dolazi do citomegalovirusne bolesti u preko 50% slučajeva. Šestomjesečna profilaksa ganciklovirom je znatno smanjila CMV-reaktivaciju i citomegalovirusnu bolest tijekom prvih šest mjeseci po transplantacijskom zahvatu,

čime je smanjena i opasnost od akutnog odbacivanja presatka (2). Pa ipak, po prekidu profilakse često dolazi do reaktivacije virusa i citomegalovirusne bolesti, a preliminarni rezultati upućuju na zaključak da produžetak profilakse može odgoditi, ali ne i eliminirati citomegalovirusne komplikacije (9).

Kod transplantacije koštane srži, kao i kod transplantacije solidnih organa, dolazi do reaktivacije endogenog virusa iz tkiva primatelja organa ili iz presađenih stanica. Pri transplantaciji alogenične koštane srži znatno češće dolazi do reaktivacije HCMV-a, nego li pri transplantaciji autologne srži (10). Stoga se alogena reaktivnost smatra značajnim faktorom rizika u reaktivaciji CMV-a pri transplantaciji koštane srži. Multivarijantna je analiza izdvojila reakciju presatka na domaćina (*Graft versus Host*) kao jedini faktor rizika koji statistički značajno dovodi do posttransplantacijske CMV-bolesti i smrti (11). Među posttransplantacijskim bolesnicima koji obole od citomegalovirusne bolesti najčešća je klinička prezentacija intersticijski pneumonitis (63,6%), ali vrlo je česta i gastrointestinalna prezentacija simptoma (18,2%) kao i miješana slika pneumonitisa i gastroenteritisa (9,1%) (11).

U svim kliničkim prezentacijama CMV-bolesti težina kliničke slike ovisi o intenzitetu replikacije virusa u zahvaćenim organima (12, 13). Količina virusnog genoma u većini suvremenih kliničkih viroloških laboratorija se prati kvantitativnom PCR analizom krvi, likvora, krvne plazme ili seruma (14–16), a alternativna metoda nešto niže osjetljivosti, ali veće specifičnosti je praćenje antigenemije virusnog antigena pp65 (12, 17). Neovisno o metodi opće je prihvaćeni stav da je visok titar virusnih antigena ili velik broj kopija virusne DNA povezan s težom kliničkom slikom i nepovoljnijom prognozom.

Koinfekcija različitim kliničkim sojevima HCMV-a

Za razliku od mnogih drugih virusnih infekcija, primarna infekcija HCMV-om pruža tek djelomičnu zaštitu protiv ponovne infekcije heterolognim sojevima istog virusa (18). Ovo kliničko opažanje podrazumijeva da se različiti sojevi HCMV-a mogu kumulirati u pojedincima. Izolacijom genoma reaktiviranog CMV-a kod imunodeficitnih bolesnika, te analizom obrasca fragmenata virusnog genoma po endonukleaznoj restrikciji, potvrđeno je da su pojedini bolesnici inficirani mješavinom različitih sojeva HCMV-a (19). Prisustvo većeg broja CMV-sojeva identificirano je u odraslih imunodeficitnih bolesnika, ali ne i kod pedijatrijskih bolesnika (20), što je navelo neke autore na pomisao da do koinfekcije dolazi isključivo kod imunodeficitnih bolesnika (20). Alternativno je tumačenje ovog rezultata bilo da reinfekcija dovodi do kumuliranja HCMV-sojeva u pojedincima tijekom života pa je statistička vjerojatnost akumulacije sojeva niža kod pedijatrijskih bolesnika nego li kod odraslih. Ova je dvojba razriješena genotipizacijom pomoću PCR-a kojom je dokazana istovremena prisutnost različitih latentnih sojeva i u slučaju imunokompetentnih pojedinaca (21–23). Stoga je istovremena replikacija različitih virusnih sojeva, zapažena kod imunodeficitnih bolesnika, mogla biti uzrokovana i istovremenom reaktivacijom prethodno stečenih virusnih sojeva, a ne isključivo reinfekcijom novim HCMV-sojevima po imunosupresiji.

Jedno je suvremeno istraživanje utvrdilo da je prisustvo većeg broja citomegalovirusnih sojeva/varijanti snažno koreliralo sa smrtnosti ploda tijekom gestacije (24). Slično tome, istraživanja su na odraslim imunosuprimiranim bolesnicima, primateljima transplantata solidnih organa, dokazala korelaciju prisustva dvaju ili više HCMV-sojeva s povišenim titrom virusne DNA određene kvantitativnim PCR-om u plazmi bolesnika (25), češćim odbacivanjem presatka nego li u skupini bolesnika inficiranih samo jednim CMV-sojem (25), produljenim poluživotom CMV DNA-emije određene kvantitativnim PCR-om u plazmi bolesnika

(26), te češćom simptomatskom CMV-bolešću (25, 27). Gledano u cijelosti, ovi rezultati upućuju na zaključak da koinfekcija različitim sojevima virusa korelira s nepovoljnim kliničkim i laboratorijskim nalazima te je stoga nepovoljan prognostički faktor.

Pravi razlozi ove korelacije nisu poznati. Zbog ograničenja svojstvenih kliničkim istraživanjima, prethodno navedene studije nisu mogle definirati uzročno-posljedičnu vezu HCMV-infekcije i bolesnikova stanja. Naime, slabi imuni odgovor pojedinog bolesnika može biti razlog za težu kliničku sliku te za prisustvo većeg broja virusnih sojeva. U tom slučaju osobine domaćina određuju sklonost višestrukim infekcijama. S druge strane, općenito je prihvaćeno da istovremene infekcije ili superinfekcije različitim mikroorganizmima dovode do težih bolesti (28). Genske su varijante rasprostranjene u HCMV-genomu i opisane su za virusne glikoproteine gB, gN ili gH, ali i za nestrukturane gene poput UL4, UL144 ili UL146-147 (29-35). Stoga ovaj genski polimorfizam pruža molekularnu osnovu biološke različitosti sojeva i varijanti HCMV-a. Ako interakcija različitih virusnih sojeva/varijanti može dovesti do međusobne komplementacije i posljedičnog poticanja virusnih varijanti, višestruke infekcije mogu uzrokovati pojačanu patogenost i težu kliničku sliku. U tom bi slučaju pogoršanje prognoze u višestrukoj infekciji moglo nastati uslijed virusne kooperacije. Virusna bi varijanta koja efikasno modulira upalnu reakciju, npr. citokinskim i kemokinskim analogima, mogla poticati replikaciju virusa čiji su geni slabije funkcionalni. S druge strane, interakcije bi mogle biti i izravne. Koinfekcija pojedinačnih stanica višestrukim CMV-varijantama dovela bi do genetske rekombinacije ili trans-komplementacije CMV-varijanti, što također nosi rizik pojačane patogenosti. Premda izolacija HCMV-rekombinanti iz bolesnika koinficiranih različitim sojevima HCMV-a upućuje na mogućnost koinfekcije pojedinačnih stanica (21, 23, 24), vjerojatnost izravne interakcije CMV varijanti *in*

vivo nije istražena. Sva ova pitanja mogu biti razjašnjena jedino istraživanjima na eksperimentalnom modelu infekcije.

Molekularni mehanizmi herpesvirusnih interakcija

Virusne interakcije, pri kojima se dvije međusobno različite virusne varijante uzajamno pomažu, prvotno su opisane kod T13 bakteriofaga (36), ali je mogućnost interakcije virusnih sojeva potom dokazana kod većine klinički relevantnih virusa (37–39). Virusne se interakcije mogu prema molekularnom mehanizmu okvirno podijeliti na funkcionalnu komplementaciju (trans-komplementaciju) i DNA-rekombinaciju (cis-komplementaciju).

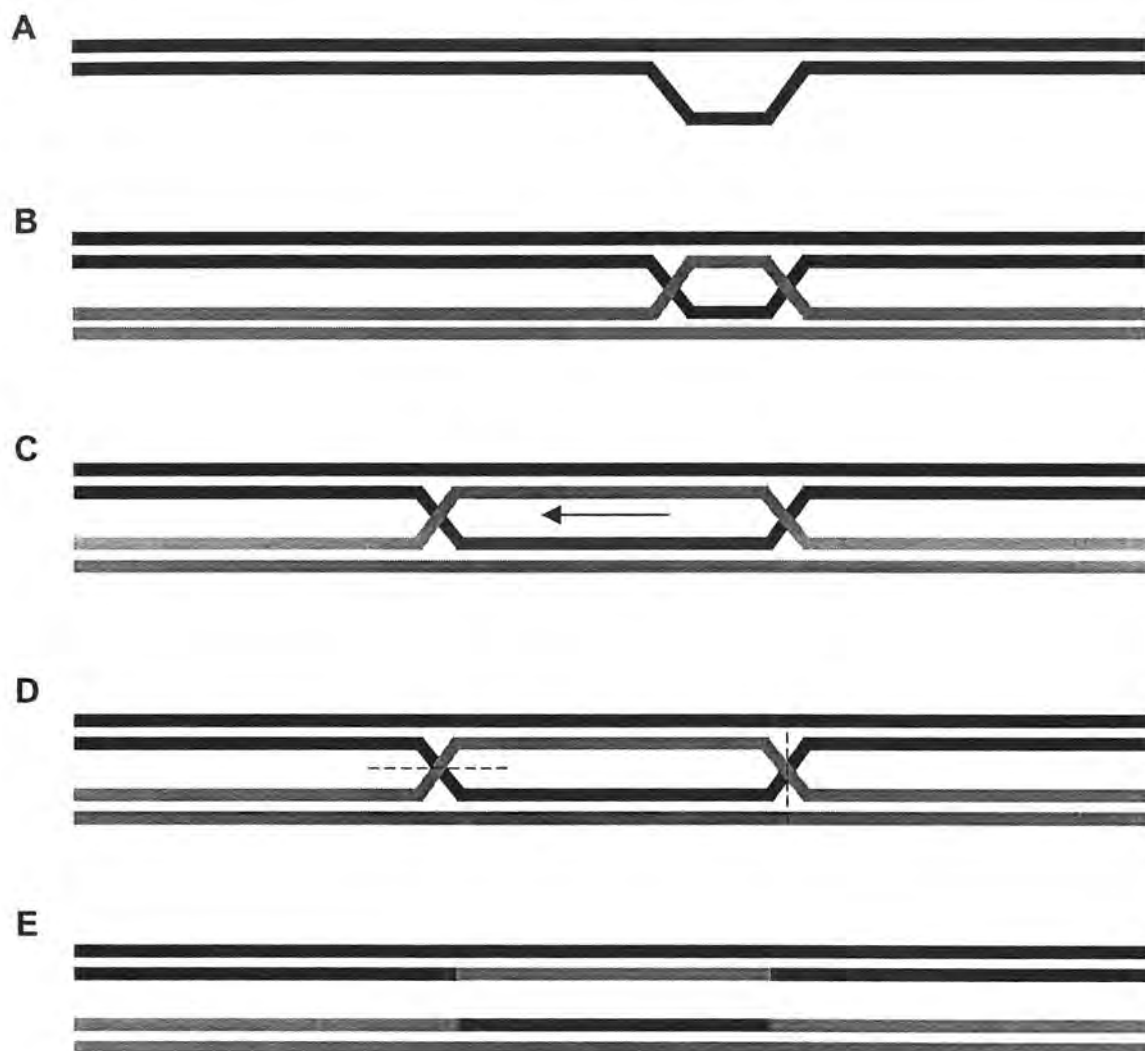
Pri funkcionalnoj se komplementaciji geni jedne virusne varijante prepisuju i prevode u bjelančevine čija funkcija pomaže replikaciju drugoj virusnoj varijanti. Budući da pri funkcionalnoj komplementaciji virusne interakcije ne uključuju miješanje genetskog materijala, a svaka od virusnih varijanti zadržava svoj neizmijenjeni genetski kod, ove se komplementacije nazivaju i trans-komplementacijama. Ovakve su interakcije opisane kod *in vitro* infekcije stanica u slučaju inkompletnih čestica virusa influence (40), ali su dokazane i kod interakcija heterolognih virusnih vrsta, poput CMV-a i HIV-a (41) (42). Kod interakcije heterolognih virusa najčešće dolazi do komplementacije nestrukturnih gena, poput transkripcijskih faktora (41, 43, 44), a tek iznimno i do komplementacije strukturalnih gena, kao što je to slučaj pri komplementaciji virusa hepatitisa D površinskim antigenom hepatitisa B (45). Pa ipak su mehanizmi virusne komplementacije te njena važnost u patogenezi virusne infekcije najjasnije definirani kod RNA virusa, čija neprecizna replikacija genomskog materijala dovodi do brze evolucije virusnih kvazivirsa koje koegzistiraju u istom domaćinu (46, 47). Kod virusnih se kvazivirsa

geni razlikuju u području mutacija, što implicira da neke od kvazivirsa imaju barem neke nefunkcionalne gene. Stoga je kod kvazivirsa koje nose različite nefunkcionalne gene funkcionalna komplementacija važan mehanizam očuvanja replikacijske sposobnosti i virulencije (46). Premda je trans-komplementacija DNA-virusa moguća (42, 48), mogućnost je funkcionalne komplementacije herpesvirusnih varijanti slabo istražena.

Pri DNA-rekombinaciji dolazi do razmjene genetskog materijala među virusnim varijantama, što dovodi do stvaranja virusnih hibrida u kojima su prisutne genetske karakteristike obiju virusnih varijanata. Stoga se ova vrsta virusnih interakcija naziva i cis-komplementacija. Prema molekularnom se mehanizmu DNA-rekombinacija može podijeliti na homolognu i nehomolognu rekombinaciju (49).

Homologna se rekombinacija odvija u području koje se nalazi pored područja DNA-homologije virusnih varijanti i sastoji se od četiriju koraka, kao što je prikazano na slici 1: (A) inicijacija, (B) homologno sparivanje, (C) ekstenzija DNA-heterodupleksa te (D) razriješenje. Tijekom inicijacije, pod utjecajem DNA-helikaza dolazi do otvaranja DNA-uzvojnice te se lanci DNA fizički razdvajaju. Jednom razdvojeni, lanci se zahvaljujući aktivnosti DNA-rekombinaza mogu spariti s lancima susjedne homologne DNA. Po spajanju DNA dolazi do širenja područja DNA-heterodupleksa na susjedna područja, kao što je strelicom označeno na slici 1C. DNA-homologija ovdje ne mora biti prisutna, što može dovesti do razmjene genetskog materijala. Ovo se širenje prekida simetričnim rezanjem razmijenjenih lanaca u spojnom području (tzv. *Holliday Junction*), koje odgovara isprekidanoj liniji slike 1D. Ovime se završava razmjena DNA-lanaca (49). Valja istaknuti da su kod herpes simpleks virusa tipa I identificirani geni koji posjeduju helikaznu i rekombinaznu aktivnost, kao i geni koji djeluju u konačnom rješenju homologne rekombinacije (50), što bi moglo upućivati na zaključak da do homologne rekombinacije herpesvirusnih

genoma ne dolazi slučajno, nego uslijed aktivnosti unaprijed zadanog genetskog programa.



Slika 1: Shematski prikaz mehanizma homologne rekombinacije virusnih genoma: (A) inicijacija, (B) homologno sparivanje, (C) ekstenzija DNA heterodupleksa, (D) razriješenje (rezolucija), (E) stanje po homolognoj rekombinaciji (modificirano iz: Umene, K, *Mechanism and Application of Genetic Recombination in Herpesviruses*, Rev. in Med. Virol. ,1999).

Kod nehomologne rekombinacije (49), dolazi do integracije genetskog materijala u virusni genom neovisno o područjima homologije. Suštinski je nehomologna rekombinacija mehanizam reparacije dvolančanih prekida DNA. Ovim se mehanizmom DNA-irelevantne sekvence nadovezuje na područje prekida. Stoga ovim mehanizmom može doći do duplikacija genskih područja, ali i do delecija u

virusnom genomu. Lomovi su herpesvirusnih genoma letalni ukoliko ne dođe do reparacije DNA. Očito je također da tek mali broj nehomolognih rekombinacija može virusu povratiti sposobnost replikacije. Stoga ne čudi podatak da je učestalost ovih vrsta rekombinacija znatno niža nego li učestalost homolognih DNA-rekombinacija (49).

Eksperimentalni modeli koinfekcije herpesvirusnim varijantama

Zbog uske specifičnosti za vrstu nije moguće izravno testirati značaj komplementacije varijanti HCMV-a na životinjskim modelima (1). Prethodna su istraživanja na srodnim životinjskim modelima dokazala sinergiju višestrukih sojeva herpes simpleks virusa tipa I (HSV-1) *in vivo* (48, 51, 52). U izvornoj je studiji dokazano da miješana koinfekcija HSV-1 sojevima ANG i KOS (koji su posve avirulentni za miševе, čak i pri visokom titru) rezultira letalnim ishodom koinficiranih miševa (51). Istraživanja su pokazala da pri koinfekciji dolazi do čestih DNA-rekombinacija koinficiranih HSV-1 sojeva (51), ali i da velika većina *ex vivo* izoliranih i kloniranih virusnih rekombinanti nije virulentna (48). Zaključno, premda istraživanja na eksperimentalnim modelima koinfekcije miševa herpesvirusnim sojevima nisu do kraja razjasnila molekularni mehanizam virusne sinergije, rezultati su konzistentno pokazali da koinfekcija HSV-1 varijantama pospješuje njihovu *in vivo* replikaciju i rasap te dovodi do znatno težih simptoma bolesti.

Rezultati na eksperimentalnim modelima HSV-1 koinfekcije su odgovarali kliničkim slikama pacijenata koinficiranih višestrukim HCMV-sojevima. Međutim, HSV-1 i HCMV se bitno razlikuju po biološkim svojstvima koja određuju vjerojatnost virusne interakcije, na primjer po staničnom tropizmu, kinetici infekcije i

mehanizmu sistemskog rasapa. HSV-1 se širi retrogradnim aksonalnim transportom u perikarione neurona koji inerviraju područje primoinfekcije, a CMV pretežno hematogenim rasapom kod kojega bi vjerojatnost sekundarne koinfekcije pojedinačnih stanica mogla biti niža nego li u slučaju HSV-1 infekcije. Stoga nije jasno u kojoj mjeri rezultati koinfekcije miševa sojevima HSV-1 odgovaraju i objašnjavaju kliničke opservacije CMV-infekcije. Mišji citomegalovirus (MCMV) slični HCMV-u po većini bioloških svojstava, poput hematogenog rasapa, staničnog tropizma ili održavanja doživotne latencije u domaćinu, ali i zbog brojnih strukturalnih i funkcionalnih genskih homologija. Stoga MCMV predstavlja najrasprostranjeniji *in vivo* model CMV-infekcije (53, 54) te adekvatan eksperimentalni model za istraživanje utjecaja koinfekcije virusnim varijantama na virusnu replikaciju i patogenost.

Infekcija miševa MCMV-om uvedena je kao prvi eksperimentalni *in vivo* model CMV-infekcije još u ranim pedesetim godinama dvadesetog stoljeća (55, 56), vjerojatno stoga što su miševi tradicionalno najčešće korištene male eksperimentalne životinje. Zbog svoje male veličine, brzog generacijskog ciklusa, ali i zbog dostupnosti velikog broja singeničnih i transgeničnih životinja, miševi su često korišteni u *in vivo* eksperimentalnim modelima infekcije i imunosti. U proteklim je desetljećima ovaj model izuzetno dobro istražen (53) te je danas jedan od najznačajnijih modela ne samo citomegalovirusne infekcije, već i imunosti na infekciju općenito. MCMV je u brojnim dosadašnjim studijama korišten kao paradigmatički model istraživanja MHC-prezentacije virusnih antigena (57, 58) te izmicanja imunološkom nadzoru (59–64). Ujedno je MCMV bio prvi herpes virus čiji je genom uspješno kloniran i održavan kao bakterijski artifičijelni kromosom (BAC) (65). Napredne su metode BAC-mutageneze omogućile rekonstituciju virusa iz bakterijskih molekularnih klonova, čija se *in vivo* kinetika replikacije i rasta ne

razlikuje od one koju posjeduje izvorni, divlji virusni soj (66). Velik broj virusnih delecijских mutanti napravljenih ovom tehnologijom uspješno je testiran *in vitro* (67–72), ali i *in vivo* (60–64), a ciljana je delecija pojedinačnih virusnih gena omogućila utvrđivanje njihove funkcije u kontekstu virusne infekcije *in vivo*. Ujedno valja napomenuti da je BAC-mutageneza omogućila ne samo ciljanu deleciju postojećih virusnih gena, nego i inerciju transgena u virusni genom (73–75), čime su virusne mutante dobile nove osobine koje inače nisu svojstvene prirodnoj virusnoj infekciji. Ovim je metodama omogućen unos heterolognih peptida ili cijelih gena, kao novih antigenskih determinanti u virusni genom (73, 76), omogućena je kinetička detekcija virusne replikacije u eksperimentalnim modelima *in vivo* (73), ali i kondicionalna ekspresija virusnih gena u svrhu manipulacije virusnom replikacijom *in vitro* i *in vivo* (75).

Prema našim je spoznajama u dvjema do sada objavljenim studijama korištena koinfekcija različitim varijantama MCMV-a iako nijedno od ovih istraživanja nije bilo usmjereno na razjašnjavanje utjecaja koinfekcije na replikaciju MCMV-a. U oba je slučaja opažena poboljšana replikacija atenuiranih virusnih mutanti u prisustvu virulentnog MCMV-a (54, 77).

Koinfekcija različitim varijantama mišjeg citomegalovirusa mogla bi dovesti do njihove kompeticije, sinergije, ili biti irelevantna za replikaciju virusnih varijanti. Klinička i eksperimentalna opažanja ukazuju da koinfekcija CMV-varijantama rezultira sinergističkim učinkom. U tom slučaju CMV-varijante mogu pospješivati uzajamni rast (a) genetskom rekombinacijom, kojom virusni geni mogu biti razmijenjeni i integrirani u genom varijante kojoj određeni gen nedostaje, ili (b) funkcionalnom komplementacijom, pri kojoj genski produkti koje sintetizira efikasnija varijanta CMV-a pomažu replikaciji deficitne varijante u odsustvu trajne razmjene gena.

Cilj je ovog istraživanja definirati utjecaj koinfekcije CMV-varijantama na pospješene virusnog rasta *in vivo*. Obzirom na klinička opažanja, ovaj rad polazi od hipoteze da koinfekcija CMV-varijantama dovodi do njihove sinergije. Osim toga, ovaj će rad ispitati učestalost koinfekcije pojedinačnih stanica MCMV-varijantama kako bismo odredili potencijal izravnih virusnih interakcija u virusnoj sinergiji. Konačno, u ovom će radu biti određeni molekularni mehanizmi izravnih interakcija virusnih varijanti (DNA rekombinacija ili funkcionalna trans-komplementacija).

MATERIJAL I METODE

Materijal

Stanice: NIH-3T3 (ATCC kataloški br. CRL-1658) i M2-10B4 (ATCC kataloški br. CRL-1972) su stanične linije mišjeg podrijetla čije je održavanje ranije opisano (72). Mišji embrionalni fibroblasti (MEF) su izolirani iz BALB/c miševa metodom koja je drugdje iscrpno opisana (54).

Miševi: Ženke BALB/c miševa su nabavljene iz vivarija tvrtke Harlan-Winkelmann i inficirane u dobi 7–8 tjedana. C3H/J miševi su uzgojeni u vivariju Max Von Pettenkofer instituta, a ženke su ovog soja inficirane u dobi 7–9 tjedana. Tijekom cijelog pokusa miševi su održavani u SPF uvjetima.

Virusi i virusna mutageneza: MCMV divljeg soja (WT-MCMV) je dobiven kao molekularni klon bakterijskog umjetnog kromosoma pSM3fr (66). **Cre-MCMV** te **loxP-MCMV** su napravljeni mutagenezom virusnog genoma održavanog kao bakterijski umjetni kromosom u *E.coli* (65). Cre-MCMV je generiran homolognom rekombinacijom neesencijalnog MCMV gena IE-2, genom Cre-rekombinaze pod kontrolom CMV-IE promotera. LoxP-MCMV je stvoren u dva koraka. U prvome je 3 kb duga stop-kaseta, omeđena loxP sekvencama na 5' i 3' krajevima, unesena u kodirajuću sekvencu gena za zeleni fluorescentni protein (GFP), čime je onemogućeno njegovo prevađanje u polipeptidnu sekvencu. U drugome je ovaj konstrukt pod kontrolom CMV-IE promotera unesen u MCMV genom na mjesto IE-2 gena. Budući da Cre-rekombinaza izrezuje sekvence između dva loxP lokusa, do ekspresije GFP-a u inficiranim stanicama može doći jedino ako se loxP-MCMV nalazi u stanicama koje sadrže Cre-rekombinazu. Stoga je ekspresija GFP-a po

koinfekciji loxP-MCMV-om i Cre-MCMV-om korištena kao dokaz koinfekcije pojedinačnih stanica višestrukim virusnim varijantama.

Δ M27-MCMV je virusna mutanta kojoj nedostaje M27, citomegalovirusni gen koji inhibira JAK-STAT unutarstaničnu prijenos interferonskih signala. Mutageneza i fenotip ove mutante su drugdje iscrpno opisani (78). Tn-M36.A je mutanta u kojoj je prvi egzon antiapoptotskog MCMV gena M36 prekinut transpozonom koji eksprimira GFP (vidi sliku 2). Δ M36-MCMV je mutanta u kojoj je kodirajuća sekvenca M36 gena zamijenjena genom za kanamicinsku rezistenciju (*kan*) pod kontrolom prokariotskog promotera. Obje su mutante prethodno opisane (72). Δ m152-MCMV je mutanta u kojoj je m152, gen kojim virus izbjegava imuni nadzor citotoksičnih T-limfocita (62) i NK stanica (63) zamijenjen genom za otpornost na zeocin (79). Mutante kojima nedostaju geni M27, M36 ili m152 su atenuirane *in vivo* (62, 80, 81).

Metode

Uzgoj i detekcija virusa: Svi su virusi uzgajani na M2-10B4 stanicama i purificirani na sukroznom gradijentu prema prethodno opisanim protokolima (72). Titar infektivnog virusa u virusnim štokovima određen je *plaque-assay*-om (testom virusnih čistina) na mišjim embrionalnim fibroblastima (MEF) (82).

***In vivo* koinfekcija:** Purificirani virusni pripravci su razrijeđeni u sterilnom PBS-u i držani odvojeno prije infekcije. Virusni pripravci su injicirani odvojenim intraperitonealnim injekcijama ili, u pojedinim pokusima, odvojeno intravenski, s vremenskim intervalom od 45 minuta među injekcijama. Ovim je postupcima onemogućena agregacija heterolognih viriona i artifičijelna sklonost koinfekciji pojedinačnih stanica višestrukim virusnim varijantama. U pokusima u kojima su

korištene dvije atenuirane virusne mutante, iste su pomiješane prije infekcije, a životinje su inficirane mješavinom virusa.

Kvantifikacija infektivnog virusa u organima: Virusi su kvantificirani *plaque-assay*-om prema proceduri koja je ranije opisana (82), uz određene modifikacije. Ukratko, homogenati organa su serijski razrijeđeni u Dulbeccovu modificiranom MEM-u s 10% FCS-a te položeni na ploče obložene MEF-om i centrifugirani 30 minuta (1000 x g). Potom su stanice inkubirane s homogenatima dodatnih 30 minuta na 37°C, nakon čega su homogenati odstranjeni, a stanice prekrivene medijem koji sadrži karboksimetilcelulozu, čime je onemogućen sekundarni rasap virusa u staničnoj kulturi. Titar je ovih virusa očitavan četvrtog dana po infekciji, koristeći fluorescentni mikroskop za očitavanje plakova koji ekspimiraju GFP ili kontrastni inverzni mikroskop u slučaju ostalih plakova. Pri kvantifikaciji virusnih plakova koji ekspimiraju GFP po koinfekciji Cre i loxP-MCMV-om, triplicati homogenata svakog organa su titrirani pri razrjeđenjima od 1:3,2, što omogućava idealan broj od 20 do 40 plakova po jažici u svakom uzorku. Ovim je postupkom smanjen rizik fuzije plakova koji odgovaraju Cre i loxP-MCMV-u tijekom *plaque-assay*-a te posljedična aktivacija GFP-a *in vitro*. Na ovaj je način omogućena identifikacija rijetkih GFP-pozitivnih plakova u mješovitim populacijama, ukoliko su GFP plakovi frekventniji od jednog na ukupno stotinjak plakova. Mali broj plakova po jažici, uz karboksimetilcelulozni pokrov, priječio je spajanje virusnih plakova u staničnoj kulturi i minimizirao mogućnost rekombinacije *in vitro*. Da bismo u potpunosti isključili ovu mogućnost, kao pozitivni plakovi označeni su isključivo oni kod kojih su sve inficirane stanice ekspimirale GFP.

Kvantifikacija MCMV-genoma *in vivo*: MCMV DNA je izolirana iz homogenata organa pomoću *High Pure Viral Nucleic Acid Kit*-a (Roche, Mannheim, Njemačka). 2µl izolirane DNA korišteno je za kvantitativni PCR pomoću Light Cycler[®] aparata

(Roche, Mannheim, Njemačka) uz pomoć *Quantitect SYBR Green PCR Kit*-a (QIAGEN, Hilden, Njemačka). Ovom je metodom moguće selektivno kvantificirati genome atenuiranih MCMV-mutanti u prisustvu genoma divljeg soja, koristeći primere specifične za mutirane DNA-sekvence. Kan-fw 5'-GGT TTG GTT GAT GCG AGT GAT-3' i Kan-rev. 5'-GAC GAC TGA ATC CGG TGA GAA T-3'. PCR reakcija je obavljena kroz 45 ciklusa, pod uvjetima 95°C 5", 61°C 15", 72°C 10", uz detekciju signala pri 78°C na koncu svakog ciklusa.

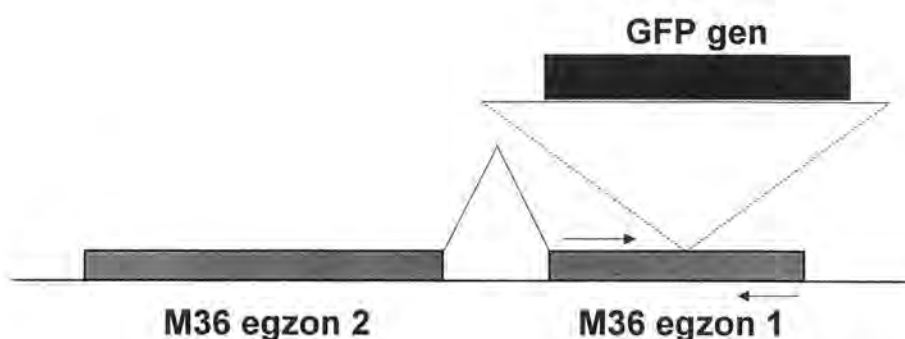
Genomi MCMV-mutante $\Delta m152$ su kvantificirani u PCR-reakciji specifičnoj za sekvencu u genu za rezistenciju na Zeocin (*Zeo*). Pri tome su korišteni primeri: Zeofw 5'-CGC ATA CAG GTG GCA CTT T-3' te Zeorev. 5'-GGT TAT TGT CTC ATG AGC GGA-3'. PCR-reakcija je obavljena kroz 45 ciklusa, pod uvjetima 95°C 5", 55°C 15", 72°C 12". Specifitet je svake PCR-reakcije određen analizom krivulje temperaturne disocijacije PCR produkta nakon 45. ciklusa.

Utjecaj virulentnog MCMV-a na replikaciju atenuiranih mutanti *in vivo*:

Replikacija je atenuiranih MCMV-mutanti u prisustvu virulentnog MCMV-a određena titracijom infektivnog virusa na MEF-u i kvantitativnim PCR-om. *In vivo* utjecaj virulentnog virusa na replikaciju atenuirane mutante Tn-M36.A je određen mjerenjem infektivnog titra MCMV-mutante u prisustvu ili u odsustvu virulentnog virusa. Virusni plakovi atenuirane mutante Tn-M36.A ekspimiraju GFP te stoga mogu biti razlikovani od plakova koje tvori MCMV divljeg soja (koji ne ekspimiraju GFP). Kontrolne su skupine miševa inficirane samo s Tn-M36.A MCMV-om da bismo utvrdili replikacijski potencijal mutante u odsustvu virulentnog virusa. Rezultati *plaque-assay*-a su potvrđeni *real-time* PCR kvantifikacijom genoma mutanti u prisustvu ili odsustvu virulentnog virusa. U tu su svrhu korišteni primeri koji su bili specifični za sekvence u genomima atenuiranih mutanti, ali ne i u virusu divljeg soja.

Sekvence korištenih DNA-početnica i uvjeti PCR reakcije su prethodno opisani u potpoglavlju o kvantifikaciji MCMV genoma *in vivo*.

Detekcija nehomologne rekombinacije: Skupine su miševa koinficirane Tn-M36.A i WT-MCMV-om (5×10^5 PFU svakog virusa i.p.). Pet dana po infekciji u homogenatima pluća određen je titar virusa. Virus je izoliran iz plakova koji su ekspimirali GFP (pa bi stoga teoretski trebali odgovarati virusnim mutantama) te dva puta uzastopno titriran kako bi se odstranila kontaminacija virusima koji ne ekspimiraju GFP, a izolirali isključivo klonovi koji stvaraju fluorescentne plakove. Po drugoj titraciji svi su izolirani virusni klonovi ekspimirali GFP. Ovim smo postupkom izdvojili tri klona TN-M36.A MCMV-a iz pluća triju različitih miševa te im prethodno opisanim postupkom izolirali DNA. Uzorci DNA su testirani PCR-om na reinzerciju M36 gena. U tu smo svrhu koristili DNA-početnice (primere) koje su se vezale za područja na suprotnim stranama lokusa inzercije transpozona, kao što je prikazano na slici 2. U slučaju je nehomologne rekombinacije ova genska sekvenca trebala biti prisutna u virusnom genomu, neovisno o prisustvu transpozona koji je nosio GFP.



Slika 2: Shematski prikaz transpozonske mutageneze kojom je prvi egzon M36 gena prekinut transpozonom koji ekspimirira GFP. Strelice označavaju područje vezivanja primera koji su korišteni pri detekciji nehomolognih rekombinacija.

PCR prvog egzona MCMV-a je obavljen primerima M36EX1-fw 5'-TCA TCA CAC AGA CCA CCG TAT C-3' te M36EX1-rev. 5'-GCA AGA GGA ACA ACA ACC CG-3'. PCR je obavljen u 40 ciklusa na 95°C 30", 59°C 30", 72°C 45". Kontrolnim smo PCR-om, specifičnim za M54 gen MCMV-a, testirali prisustvo virusne DNA u svim testiranim uzorcima. U ovom PCR-u smo koristili primere MCMV-fw 5'-ATC ATC CGT TGC ATC TCG TTG -3' i MCMV-rev 5'-CGC CAG TCT GTA TCC GTC CAT -3'. Reakcija je obavljena u 30 ciklusa pri uvjetima od 95°C 30", 58°C 30", 72°C 30". Na taj smo način isključili mogućnost da je negativan PCR za prvi egzon M36 gena bio uzrokovan tehničkim problemima u izolaciji virusne DNA.

Detekcija virusne komplementacije: Koinfekcijom miševa MCMV-varijantama Cre-MCMV te loxP-MCMV određen je potencijal virusne komplementacije MCMV-varijanti. Komplementacija loxP-MCMV-a rekombinazom koju je ekspimirao Cre-MCMV, dovela je do rekombinacije genoma loxP-MCMV-a i ekspresije GFP-a. Posljedično, do ekspresije GFP-a došlo je u virusnim plakovima koji odgovaraju rekombiniranom loxP-MCMV-u. *Plaque-assay*-om homogenata organa koinficiranih miševa kvantificirana je učestalost virusne komplementacije *in vivo*. Ujedno je rekombinacija GFP-a posredstvom Cre-rekombinaze detektirana i PCR-om, koristeći primere GFPloxP-fw 5'-GCG TGG ATA GCG GTT TGA CT-3' i GFPloxP-rev. 5'-GTC GTG CTG CTT CAT GTG GT-3', s 40 ciklusa na 94°C 30", 59°C 30", 72°C 60", u Perkin-Elmerovu PCR aparatu. Kontrolne su skupine životinja inficirane loxP-MCMV-om u odsustvu Cre-MCMV-a radi kontrole teoretski mogućih, sporadičnih rekombinacija u odsustvu Cre-rekombinaze.

Dvobojna *in situ* hibridizacija (2B-ISH): Istovremena je replikacija dviju virusnih varijanti u istim pojedinačnim stanicama istraživana mikroskopskom

analizom serijskih histoloških sekcija jetre koinficiranih životinja. U tu je svrhu korištena 2B-ISH, kojom su *in situ* prikazane dvije varijante MCMV-a, u histološkim sekcijama jetre, prema metodama koje su prethodno iscrpno opisane (54, 81).

U suštini je hibridizacija vršena na histološkim preparatima jetre koji su prethodno fiksirani u formalinu, uklopljeni u parafin te narezani mikrotomom. Hibridizacija je vršena na deparafiniziranim sekcijama 1 ili 2 μm debljine. Korištene su dvije hibridizacijske probe. Prva, M36-P pokriva 1644 parova baza virusnog gena M36, a u MCMV genomu (soj Smith) odgovara nukleotidnim (nt) pozicijama 47,624 – 49,248 [GenBank/EMBL/DDBJ, accession no. U68299 (complete sequence)] (83). Ova je proba sintetizirana PCR-om koristeći plazmid pCR3-M36 kao predložak, a oligonukleotide 5'-ATA TCC CCG TGT CAT CTT AA-3' (nt 47,624-47,643) te 5'-ATG TAT GAG CAA GAG GAA CA-3' (nt 49,267-49,248) kao primere. M36-P je tijekom PCR reakcije obilježen inkorporacijom fluoresceinskog konjugata dUTP-a (fluorescein-12-dUTP, kataloški br. 1373242, Roche Laboratories). Druga hibridizacijska proba, Kan-P pokriva 558n parova baza gena za kanamicinsku rezistenciju *kan* (transpozon Tn903, EMBL accession no. V00359). Ova je proba sintetizirana PCR-om, koristeći pDrive vektor (iz QIAGEN PCR Cloning Kit-a) kao predložak, a oligonukleotide 5'- TCA GGT GCG ACA ATC TAT CG-3' te 5'- TCC GAC TCG TCC AAC ATC AA-3' kao primere. Kan-P je obilježen prilikom PCR reakcije inkorporacijom digoxigenin-11-dUTP-a (kataloški br. 1093088, Roche Laboratories). M36-P je obilježena crvenom bojom pomoću protutijela specifičnih za fluorescein, a konjugiranih za alkalnu fosfatazu, koristeći fuksin kao kromogeni supstrat, a služila je za detekciju stanica inficiranih WT-MCMV-om. Kan-P je obilježena crnom bojom pomoću protutijela specifičnog za digoksigenin, a konjugiranog za peroksidazu, koristeći diaminobenzidin-tetraklorid kao supstrat te amonij-nikal-sulfat-heksahidrat kao pojačivač boje. Ova je proba selektivno bojala

jezgre stanica inficiranih Δ M36-MCMV-om. Po hibridizaciji, stanice su obojene hemalaun-eozinom radi prikaza strukture jetrenog tkiva. Kvantitativna je mikroskopska analiza, kao i fotodokumentacija, obavljena prema prethodno opisanim protokolima (84).

Statistička analiza: Vjerojatnost je slučajne koinfekcije jetrenih stanica određena Poissonovom funkcijom distribucije $F(n) = \lambda^n \times e^{-\lambda}/n!$ (faktorijel), kojom je vjerojatnost jednostruke infekcije $F(1) = \lambda \times e^{-\lambda}$, a vjerojatnost dvostruke infekcije $F(2) = F(1) \times \lambda/2$ (85).

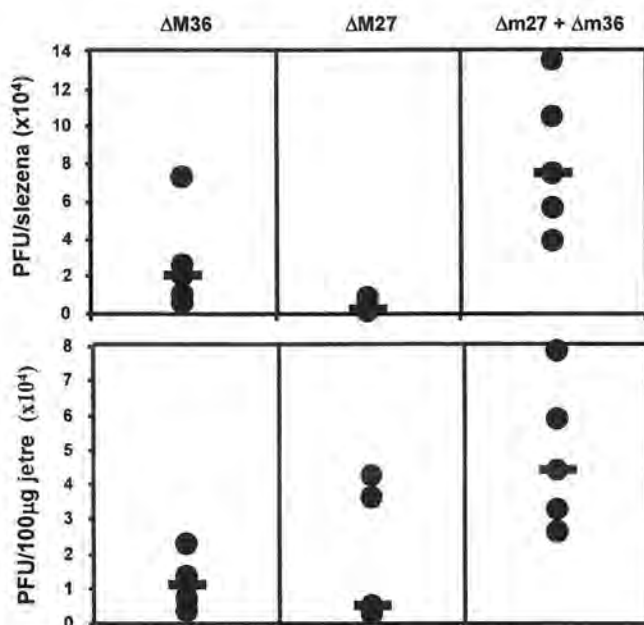
REZULTATI

Sinergija MCMV-mutanti tijekom koinfekcije

Da bismo utvrdili u kojoj se mjeri citomegalovirusne varijante uzajamno komplementiraju, višestrukim smo varijantama citomegalovirusa inficirali skupine genetski identičnih miševa. Kao prvi je paradigmatski model korištena koinfekcija dvjema atenuiranim MCMV-varijantama, $\Delta M36$ kojoj je ciljanom mutagenozom uklonjen gen M36, te $\Delta M27$ kojoj je uklonjen M27 gen. M36 je antiapoptotski gen koji određuje protein koji veže kaspazu-8 i na taj način inhibira apoptozu potaknutu FAS, TRAIL ili TNFp55 receptorima (72). MCMV-mutanta kojoj nedostaje ovaj gen je atenuirana u makrofazima, ali ne i fibroblastima ili endotelnim stanicama (72). M27 je MCMV-gen koji se vezuje za STAT-2 (*engl.* signal transducer and activator of transcription), blokira unutarstaničnu signalizaciju posredovanu JAK-STAT signalnim putem te stoga i interferonsku protuvirusnu aktivnost (78). U odnosu na WT-MCMV, $\Delta M27$ -MCMV je *in vivo* značajno atenuiran (78). Skupine od pet C3H/J miševa su i.p. inficirane s 10^6 PFU $\Delta M27$ ili $\Delta M36$ -MCMV-a. Treća je skupina miševa inficirana mješavinom ovih virusnih mutanti koja je sadržavala 5×10^5 PFU svakog od ovih dvaju virusa. Tri dana po infekciji miševi su žrtvovani, a virusni je titar određen u slezeni i jetri miševa (slika 3).

U oba je organa virusni titar bio oko 5 puta viši u skupini koja je dobila oba virusa nego li u bilo kojoj skupini koja je dobila samo jedan virus, premda je teoretska infektivna doza u svim skupinama bila ista. Ova značajna razlika u titru nije mogla biti uzrokovana individualnim razlikama u osjetljivosti na MCMV među miševima koji su pripadali različitim skupinama, jer su svi miševi iz ovog pokusa bili istog spola i dobi te pripadali istom soju. Budući da su mutantama u ovom pokusu

nedostajali različiti geni, komplementacija je virusnih mutanti predstavljala najplauzibilnije tumačenje visokog virusnog titra u koinficiranim miševima. U tom su slučaju mutante razmijenile gene (ili genske produkte) koji su im nedostajali te su stoga bolje replicirale prilikom miješane infekcije.



Slika 3: Utjecaj koinfekcije na virusni titar. Skupine miševa su inficirane s 5×10^5 PFU-a $\Delta M36$, istom količinom $\Delta M27$ MCMV-a, ili s 5×10^5 PFU-a virusne mješavine koja je sadržavala mješavinu obje virusne varijante. Tri dana po infekciji, u homogenatima je slezene i jetre titar infektivnog virusa određen *plaque-assay*-om. Kružići označavaju individualne razine titra virusa a horizontalna crta označava medijan.

Utjecaj WT-MCMV-a na replikaciju atenuiranih mutanti in vivo

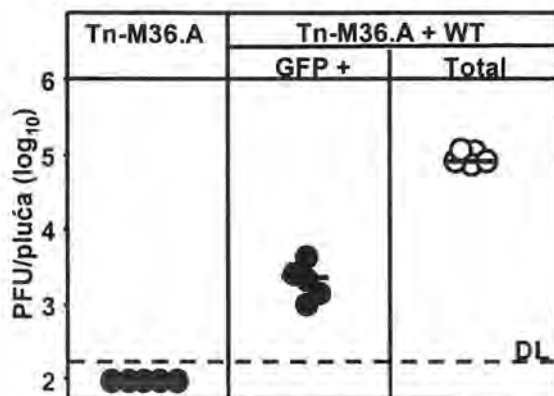
Premda je prethodni rezultat upućivao na zaključak da koinfekcija MCMV-varijantama dovodi do sinergije u replikaciji, u ovom modelu nismo mogli pratiti učinak koinfekcije na rast svake od pojedinih varijanti, već samo zbirni virusni titar. Utjecaj smo koinfekcije na replikaciju pojedine atenuirane MCMV-varijante izravno pratili koinfekcijskim modelom virusne mutante koja je bila atenuirana i ekspimirala GFP, i WT-MCMV-a. Virusna je replikacija u organima domaćina kvantificirana

testom virusnih čistina pri čemu je određen broj fluorescentnih i nebojenih plakova. Stoga je titar fluorescentnih plakova u organima koinficiranih miševa označavao titar atenuirane mutante, dok je titar običnih plakova odražavao količinu WT-MCMV-a. Usporedbom titra fluorescentnih plakova u organima koinficiranih miševa s virusnim titrom u organima miševa koji su bili inficirani samo atenuiranom mutantom, određen je utjecaj virulentnog virusa na oslabljenu mutantu.

U našim smo pokusima koristili atenuiranu MCMV-mutantnu TN-M36.A (72), kojoj je ekspresijska kasetna GFP-a unesena transpozonskom inzercijom u prvi egzon virusnog gena M36. Stoga ova mutanta eksprimira GFP umjesto M36 gena (72). Dvije skupine po pet BALB/c miševa inficirane su i.p. s 5×10^5 PFU-a M36tn.A MCMV-a. Jedna je od mišjih skupina 45 minuta kasnije inficirana istim putem i količinom WT-MCMV-a, dok je kontrolna skupina injicirana istim volumenom PBS-a.

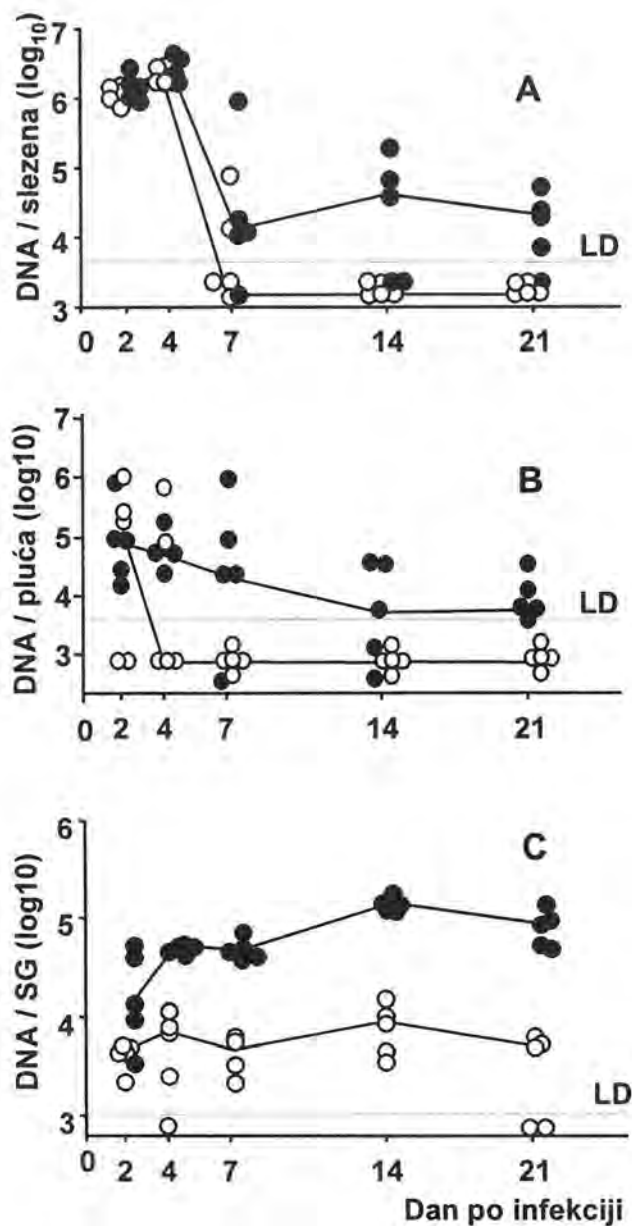
Pet dana po infekciji miševi su žrtvovani te im je određen titar virusa u pojedinim organima (82). U plućima miševa inficiranih samo TN-M36.A MCMV-om titar je infektivnog virusa bio ispod praga detekcije (slika 4). U plućima svih miševa koji su uz TN-M36.A mutantu inficirani i WT-MCMV-om utvrđen je visok titar infektivnog MCMV-a (slika 4). U plućima su svih miševa iz ove skupine detektirani i virusni plakovi koji su ekspimirali GFP, pri čemu je njihov titar bio oko 10 puta iznad detekcijskog praga, dok je njihov udio u ukupnom infektivnom titru bio oko 2%. Stoga je prisustvo virulentnog WT-MCMV-a dovelo do efikasnije replikacije i rasapa atenuirane TN-M36.A mutante. Treba naglasiti da je MCMV-titar u miševa iz iste skupine bio gotovo identičan. Ovaj rezultat potvrđuje izvornu eksperimentalnu premisu da je osjetljivost singeničnih miševa na MCMV gotovo identična te da razlike među skupinama u infektivnom virusnom titru ne mogu biti odraz domaćinova stanja već isključivo razlika u protokolu infekcije. Slični su rezultati dobiveni u

pokusima u kojima je umjesto TN-M36.A korištena mutanta TN-M45, kojoj je isti transpozon inseriran u područje antiapoptotskog gena M45 (67). Ova je mutanta izuzetno atenuirana *in vivo* i plakovi joj nisu detektibilni čak ni u imunodeficitnim SCID miševima (86), ali je mogla biti sustavno detektirana u organima miševa koji su uz mutantu dobili WT-MCMV (rezultati nisu prikazani).



Slika 4: WT-MCMV pomaže replikaciju atenuirane virusne mutante *in vivo*. Skupine su miševa inficirane s 5×10^6 PFU-a TN-M36.A MCMV-a u prisustvu ili odsustvu iste količine WT-MCMV-a. Petog dana po infekciji određen je ukupan virusni titar u plućima (bijeli krugovi), kao i titar mutante (crni krugovi). Svaki krug označava jednu životinju a horizontalna crta označava medijan.

Da bismo utvrdili utjecaj WT-MCMV-a na replikaciju atenuiranih virusnih mutanti kroz vrijeme, pratili smo kinetiku replikacije virusne mutante u slezeni, plućima i žlijezdi slinovnici pokusnih životinja, u prisustvu WT-MCMV-a ili u njegovom odsustvu. U ovom je pokusu korištena mutanta $\Delta M36$ (72), u kojoj je gen M36 zamijenjen genom za kanamicinsku rezistenciju (*kan*). Kinetika je replikacije $\Delta M36$ -MCMV-a praćena kvantitativnim PCR-om, pomoću primerskog para specifičnog za sekvencu *kan* gena.



Slika 5: Kinetika utjecaja WT-MCMV-a na *in vivo* replikaciju atenuirane MCMV mutante Δ M36. 10^5 PFU-a Δ M36-MCMV-a je i.p. injicirano u skupinu od 5 miševa (bijeli krugovi). Druga skupina miševa (crni krugovi) je uz istu količinu Δ M36-MCMV-a 30 minuta kasnije inficirana i WT-MCMV-om (10^5 PFU-a/miš). Količina DNA specifične za virusnu mutantu u slezeni (A), plućima (B) i žlijezdama slinovnicama (C) je kvantitativnim PCR-om određena 2, 4, 7, 14 i 21 dana po infekciji. Svaki krug označava jednog miša. Spojeni su medijani pojedinih grupa.

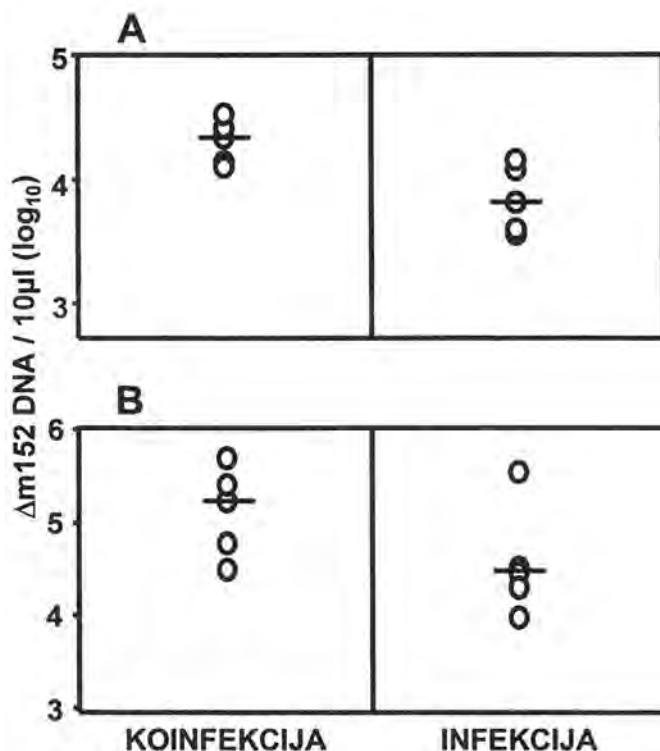
Stoga su genomi virusne mutante mogli biti selektivno kvantificirani u homogenatima navedenih organa, neovisno o prisustvu WT-MCMV-a. Δ M36 genomi su kvantificirani drugog, četvrtog, sedmog, četrnaestog te dvadeset i prvog dana po infekciji. I u ovom je pokusu atenuirana mutanta bolje replicirala u prisustvu

WT-MCMV-a, a ovaj je učinak s vremenom postajao evidentniji (slika 5). Neočekivano je, pa stoga i zanimljivo, da je najizraženija razlika u količini $\Delta M36$ genomskog materijala zabilježena u žlijezdama slinovnicama, koje MCMV inficira tek sekundarnom diseminacijom, nekoliko dana po infekciji. Posljedično, ovaj rezultat upućuje na zaključak da su WT-MCMV i $\Delta M36$ -MCMV zajedno diseminirali do udaljenih sekundarnih infektivnih žarišta i da je prisustvo WT-MCMV-a omogućavalo ne samo bolju replikaciju, nego i rasap atenuirane mutante.

Prethodno opisani pokusi su utvrdili da WT-MCMV može komplementirati i poticati rast atenuiranih mutanti deficitnih za gene kojima MCMV inhibira apoptozu inficiranih stanica. Da bismo utvrdili je li ovaj princip primjenjiv i na MCMV-mutante kojima nedostaju geni čija funkcija nije usmjerena isključivo na blokadu apoptoze, koristili smo kombinaciju WT-MCMV-a i $\Delta m152$ -MCMV-a, virusne mutante kojoj nedostaje imunosubverzivni gen *m152* (79), čiji produkt onemogućuje ekspresiju MHC-I molekula na staničnoj površini, zadržavajući ih u ERGIC/cis Golgi staničnom odjeljku (87), čime omogućuje MCMV-u izbjegavanje staničnog imunog odgovora posredovanog $CD8^+$ T-limfocitima. Ujedno, *m152* igra i ulogu u izbjegavanju NK imunosti jer u inficiranim stanicama snižava ekspresiju RAE-1, staničnog liganda za NKG2D aktivacijski receptor na NK-stanicama (63, 88).

Skupine su miševa bile inficirane WT-MCMV-om, $\Delta m152$ MCMV-om ili kombinacijom ovih virusa. $\Delta m152$ -MCMV-u korištenom u ovom pokusu je ciljanom mutagenезom *m152* zamijenjen genom za zeocinsku rezistenciju (*zeo*). Pet dana po infekciji miševi su žrtvovani, a DNA je izolirana iz homogenata slezena i pluća metodom koja je opisana u poglavlju o materijalima i metodama. Genomi $\Delta m152$ su kvantificirani u ovim uzorcima kvantitativnim PCR-om, koristeći primere specifične za *zeo* (slika 6).

U organima miševa koji su dobili $\Delta m152$ u kombinaciji s WT-MCMV-om genomi mutante su bili oko tri puta brojniji nego li u slučaju životinja inficiranih isključivo $\Delta m152$ MCMV-om. Ova je razlika bila statistički značajna u slezeni ($p=0,029$). Stoga je komplementacija WT-MCMV-om općeniti princip koji pospješuje replikaciju bilo koje virusne mutante.



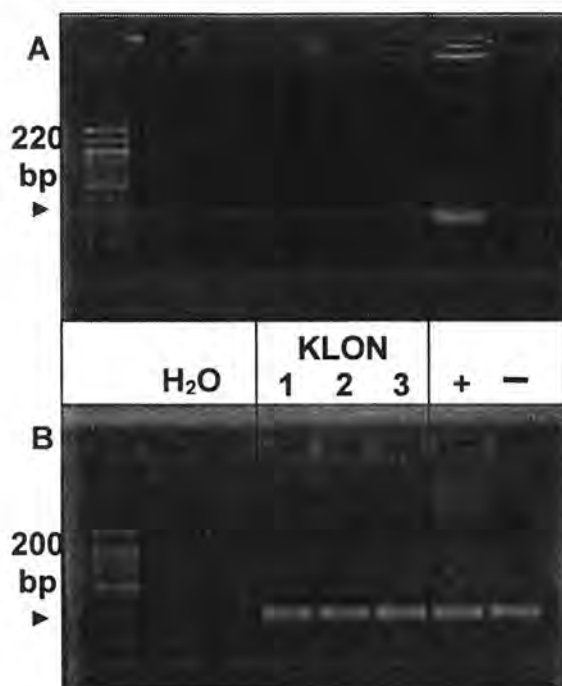
Slika 6: WT-MCMV pomaže *in vivo* replikaciju $\Delta m152$ MCMV-a. Skupine su miševa inficirane $\Delta m152$ MCMV-om (3×10^5) u prisustvu iste količine WT-MCMV-a (koinfekcija) ili u njegovom odsustvu (infekcija). Petog dana po infekciji DNA specifična za mutantu određena je kvantitativnim PCR-om u slezeni (A) ili plućima (B). Svaki krug označava jednog miša, horizontalne linije označavaju medijane.

Utjecaj rekombinacije DNA na komplementaciju MCMV-varijanti

Dosadašnjim smo rezultatima dokazali bolju replikaciju MCMV-mutanti bez pojedinih gena tijekom koinfekcije s MCMV-varijantama koje te gene posjeduju. Pa ipak, ovi modeli nisu mogli definirati molekularni mehanizam komplementacije atenuiranih mutanti. Teoretski, do komplementacije može doći rekombinacijom virusnih gena, ili funkcionalnom trans-komplementacijom. Prilikom genetske rekombinacije dolazi do izmjene genetskog materijala između virusnih mutanti, što može dovesti do reinzercije nedostajućeg gena u genom mutante te stoga i reverzije fenotipa. Prema molekularnom mehanizmu, DNA se rekombinacija može podijeliti na homolognu i nehomolognu rekombinaciju. Kod homologne rekombinacije do interakcije među virusnim genomima dolazi u područjima homologije njihovih sekvenci, a razmjenjuje se genetski materijal koji se nalazi između dva područja homologije (49).

Budući da kod homologne rekombinacije dolazi do zamjene genetskog materijala, ovaj mehanizam podrazumijeva eksciziju DNA-sekvence koju novouneseni genetski materijal zamjenjuje. U slučaju bi homologne rekombinacije Δ M36 i WT-MCMV-a to dovelo do reinzercije M36 gena u isti lokus u kojem se nalazio prije ciljane mutageneze. Međutim, u tom bi slučaju sekvence koje su korištene radi identifikacije i kvantifikacije atenuiranih mutanti bile izbrisane iz njihovih genoma. Posljedično, rekombinirani virusi ne bi mogli biti detektirani. Stoga porast broja MCMV-mutanti koje su nosile *kan* gen (detektiranih kvantitativnim PCR-om) ili MCMV-mutanti koje su eksprimirale GFP u testu virusnih čistina, ne može biti posljedica homologne rekombinacije s WT-MCMV-om.

Kod nelegitimne rekombinacije dolazi do inzercije genetskog materijala neovisno o homologiji u području koje omeđuje inzerciju. Ovaj mehanizam omogućava reinzerciju nedostajućeg virusnog gena bilo gdje u genom mutante, što bi teoretski moglo dovesti do pojave Δ M36-MCMV revertanti koje bi sadržavale i M36 gen, ali i genetski materijal koji je korišten da bi ih se razlikovalo od WT-MCMV-a.



Slika 7. Izostanak rekombinacije u izoliranim MCMV-klonovima. Miševi su inficirani s 5×10^5 PFU-a TN-M36.A i istom količinom WT-MCMV-a. Petog dana po infekciji, iz homogenata pluća su izolirana te opetovanom *plaque*-purifikacijom klonirana 3 virusna klona koja su ekspimirala GFP. DNA izolirana iz supernatanta virusnih klonova podvrgnuta je PCR-u specifičnom za prvi egzon M36 gena (A). Pozitivna se kontrola (+) sastojala od DNA WT-MCMV-a, a negativna (-) se sastojala od DNA Δ M36-MCMV-a. U trećoj smo kontroli (H₂O) umjesto DNA koristili vodu. Kontrolnim PCR-om, specifičnim za M54 gen MCMV-a, odredili smo prisustvo virusnih genoma u analiziranim uzorcima (B).

Da bismo utvrdili je li nehomologna rekombinacija dovela do porasta titra atenuiranih mutanti u prisustvu WT-MCMV-a, koristili smo model koinfekcije miševa TN-M36.A i WT-MCMV-om. Petog smo dana po koinfekciji iz homogenata pluća klonirali virusne plakove koji su ekspimirali GFP (pa stoga odgovarali virusnoj

mutanti). Potom smo iz triju klonova TN-M36.A MCMV-a, izoliranih iz pluća triju različitih miševa, izolirali virusnu DNA te ju PCR-om testirali na ektopičnu reinzerciju M36 gena. U tu smo svrhu koristili primere koji su se vezali za područja na suprotnim stranama lokusa inzercije transpozona, kao što je detaljno opisano u poglavlju o materijalima i metodama (vidi sliku 2). Budući da su svi klonovi ekspimirali GFP iz transpozona koji je prekidao M36 gen, pozitivan bi PCR signal označavao ektopičnu inzerciju M36 gena u ispitivanom uzorku. Nijedan od triju testiranih klonova nije bio pozitivan u PCR-u specifičnom za prvi egzon M36 gena (slika 7A).

Da bismo isključili mogućnost da je negativni PCR u slici 7A bio uzrokovan tehničkim problemima u izolaciji virusne DNA, isti su uzorci paralelno testirani PCR-om koji je bio specifičan za jedno drugo područje MCMV-genoma. Svi su uzorci u ovom PCR-u bili pozitivni (slika 7B). Stoga je odsustvo signala u PCR-u za M36 gen doista odgovaralo odsustvu nehomologne rekombinacije M36 gena u genomu mutanti. Premda ovaj rezultat ne isključuje mogućnost rijetkih i pojedinačnih nehomolognih rekombinacija, očito je da nehomologne rekombinacije ne mogu objasniti porast titra MCMV-mutanti u prisustvu WT-MCMV-a. Zbog toga mora postojati neko drugo objašnjenje za porast titra virusa.

Izravan uvid u funkcionalnu trans-komplementaciju

Da bismo izravno dokazali trans-komplementaciju dviju MCMV-varijanti, uspostavili smo reporterski sistem u kojem je funkcionalna trans-komplementacija dovodila do ekspresije reporterskog gena. Prvu smo virusnu mutantu nazvali loxPGFP-MCMV. Ova je mutanta sadržavala inaktivni GFP gen u *ie2* genskom lokusu, području MCMV-genoma koje je opisano kao irelevantno za virusnu replikaciju *in vitro* i *in vivo* (89, 90). GFP je bio inaktiviran stop kasetom od 3 kbp

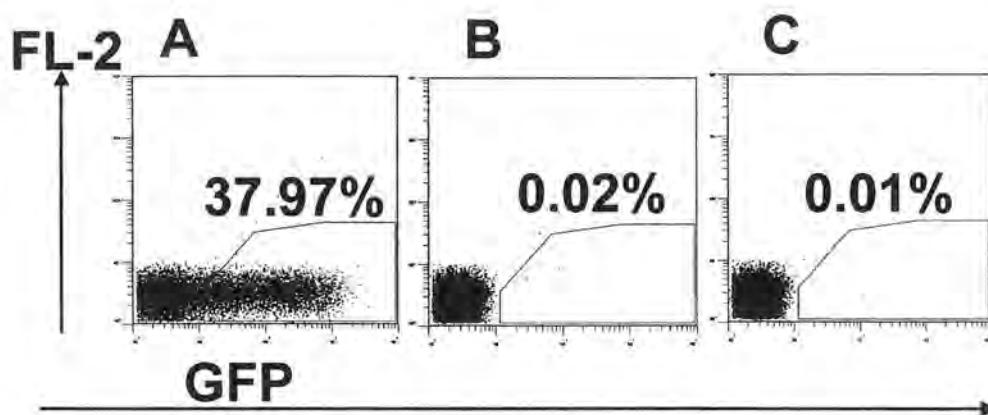
kojom je njegova sekvenca bila prekinuta neposredno iza početnog kodona. Ova je stop kasete s obje strane bila omeđena loxP sekvencama, akceptorskim DNA lokusima za Cre-rekombinazu. Stoga je ekspresija Cre-rekombinaze u stanicama koje su sadržavale genome loxPGFP-MCMV-a mogla dovesti do ekscizije stop kasete iz virusnog genoma te ekspresije GFP gena. Posljedično, stanice inficirane rekombiniranim loxPGFP-MCMV-om smo mogli identificirati protočnom citometrijom ili UV-mikroskopskom analizom.

Druga virusna mutanta, nazvana Cre-MCMV, je u genskom području *ie2* sadržavala Cre-rekombinazu. Stoga je u slučaju koinfekcije pojedinačnih stanica Cre-MCMV ekspimirala Cre-rekombinazu, koja je potom aktivirala GFP gen u genomu loxPGFP-MCMV-a.

U prvom smo pokusu inficirali NIH-3T3 stanice Cre-MCMV-om dozom od jednog PFU-a na dvije stanice. Četrdeset i osam sati po infekciji pokupili smo supernatante s inficiranih stanica. Ove smo supernatante prebacili na svježije NIH-3T3 stanice, koje smo istovremeno inficirali s loxPGFP-MCMV-om u dozi od 1 PFU-a po stanici. Dvadeset i četiri sata po koinfekciji ekspresija je GFP-a utvrđena protočnom citometrijom u oko 38% stanica (slika 8A). Kontrolne su stanice inficirane loxPGFP-MCMV-om u odsustvu supernatanta koji su sadržavali Cre-MCMV. Ove stanice nisu ekspimirale GFP (slika 8B). Isto je zabilježeno i po infekciji Cre-MCMV-om u odsustvu loxPGFP-MCMV-a (rezultat nije prikazan).

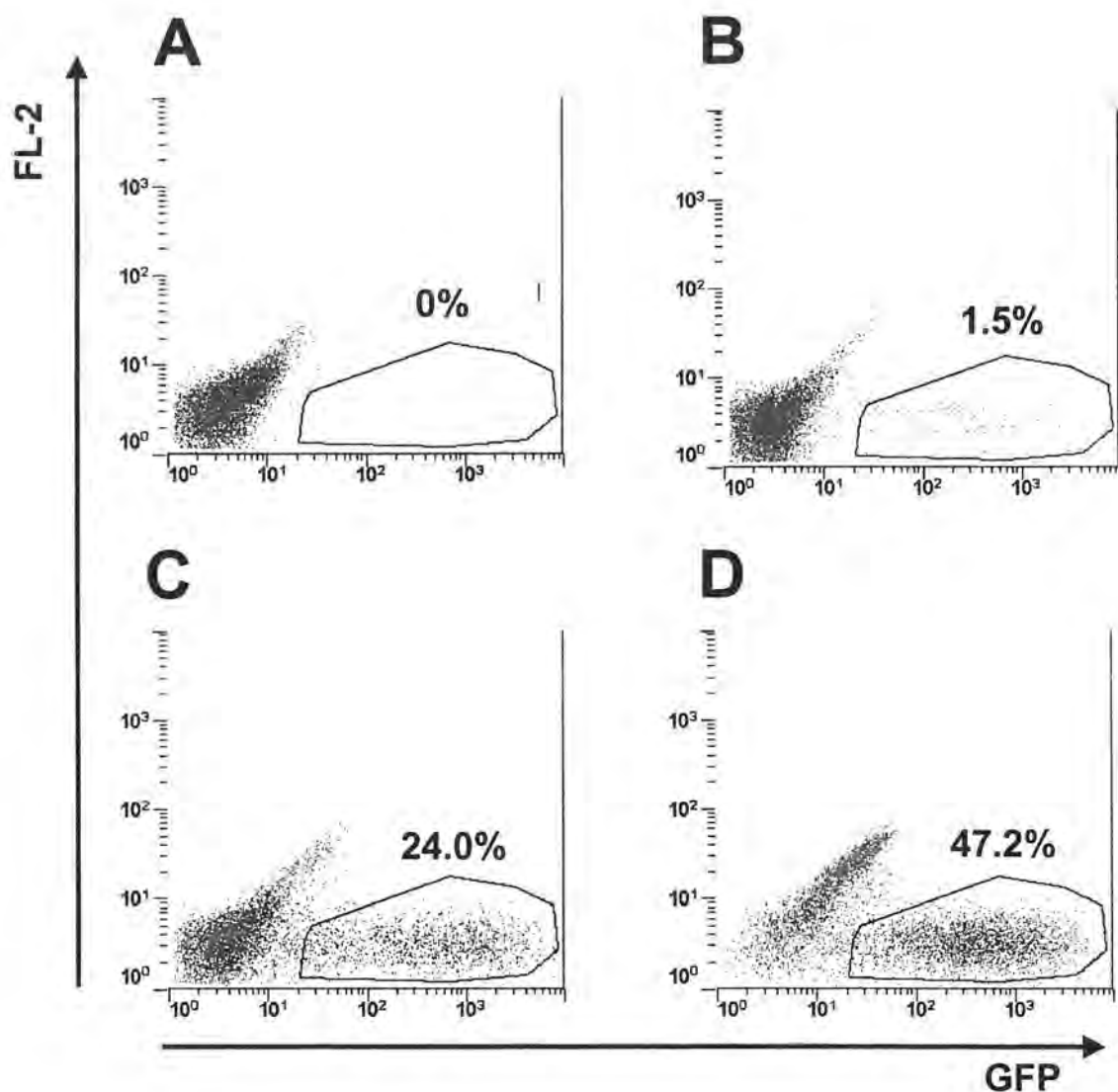
Premda je funkcionalna komplementacija dviju MCMV varijanti ovime izravno dokazana, mehanizam kojim je došlo do komplementacije ostao je nejasan. Jednostavnija bi i neposrednija interpretacija rezultata bila da je do komplementacije dolazilo po koinfekciji pojedinačnih stanica objema mutantama. Alternativno je postojala mogućnost da su stanice inficirane Cre-MCMV-om lučile Cre-rekombinazu,

koja je potom ulazila u susjedne stanice, inficirane loxPGFP-MCMV-om. U tom bi slučaju do komplementacije dolazilo u odsustvu koinfekcije na staničnoj razini.



Slika 8: Izravan dokaz funkcionalne komplementacije MCMV-varijanti pri koinfekciji pojedinačnih stanica. Ekspresija GFP-a iz NIH-3T3 fibroblasta inficiranih Cre-MCMV-om te loxPGFP-MCMV-om je utvrđena protočnom citometrijom 24 sata po infekciji (A). Kontrolne su skupine stanica inficirane loxPGFP-MCMV-om (B), ili loxPGFP-MCMV-om uz supernatant koji smo skupili s Cre-MCMV inficiranih stanica te filtrirali kroz pore promjera 0.1 nm (C).

Da bismo utvrdili može li Cre-rekombinaza prelaziti iz jedne u drugu stanicu neovisno o virusu koji je sintetizira, filtrirali smo supernatante stanica inficiranih s Cre-MCMV-om kroz filtere čije pore su imale promjere 0.1 nm pa su bile nepropusne za virione, ali ne i za pojedinačne proteine. Filtrirane smo supernatante stavili na svježe stanice koje smo odmah potom inficirali loxPGFP-MCMV-om te 24 sata kasnije utvrdili ekspresiju GFP-a. Budući da filtrirani supernatanti nisu doveli do aktivacije GFP-a (slika 8C), njihov je učinak bio jednak onome u odsustvu Cre-MCMV-a. Stoga Cre-rekombinaza nije mogla aktivirati GFP gen u odsustvu virusne koinfekcije. Posljedično, aktivacija se GFP-a događala uslijed koinfekcije pojedinačnih stanica objema virusnim varijantama.



Slika 9: Učestalost funkcionalne komplementacije izravno ovisi o infektivnoj dozi. Ekspresija GFP-a iz NIH-3T3 inficiranih fibroblasta Cre je utvrđena protočnom citometrijom 24 sata po infekciji. Kontrolne su skupine stanica inficirane loxPGFP-MCMV-om (A). Testirane skupine su inficirane dozama od 0.1 (B), 1 (C), ili 5 (D) PFU-a svake od komplementirajućih virusnih rekombinanti po stanici.

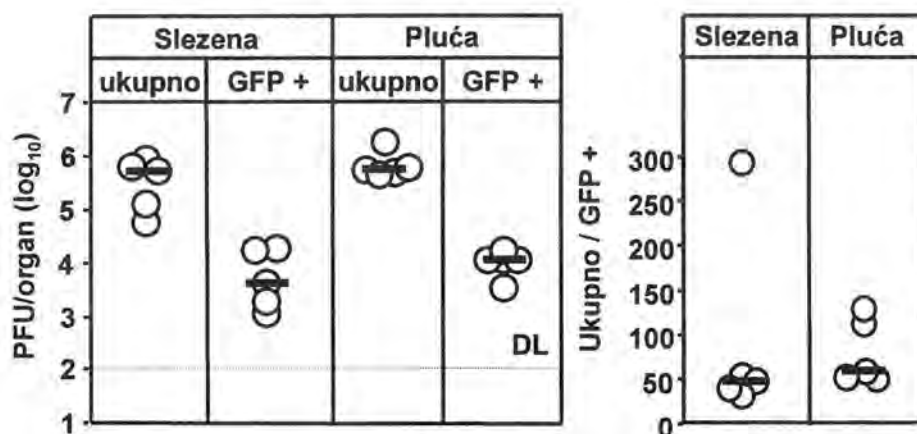
Potvrdu smo virusne komplementacije uslijed koinfekcije virusnim varijantama potražili u neovisnom pokusu, u kojem smo NIH-3T3 fibroblaste istovremeno koinficirali Cre-MCMV-om i loxPGFP-MCMV-om pri gradiranim infektivnim dozama. Fibroblasti su istovremeno inficirani svakim od ovih dvaju virusa dozom od 0.1, 1 ili 5 PFU-a po stanici. Kontrolne su stanice inficirane samo

loxPGFP-MCMV-om pri dozi od 1 PFU-a po stanici. Dvadeset i četiri sata po infekciji stanice su tripsinizirane te analizirane na ekspresiju GFP-a protočnim citometrom (slika 9). U kontrolnim stanicama nije došlo do ekspresije GFP-a (slika 9A), dok je u stanicama inficiranim objema virusnim varijantama (slika 9 B, C, D) došlo do zamjetne ekspresije GFP-a koja je progresivno rasla s virusnom infektivnom dozom. Stoga je učestalost virusne koinfekcije, kao funkcija virusne infektivne doze u ovom pokusu, izravno određivala učestalost virusne funkcionalne komplementacije.

Funkcionalna trans-komplementacija in vivo

Kako bismo utvrdili može li i *in vivo* doći do trans-komplementacije po koinfekciji, inficirali smo skupine miševa Cre-MCMV-om i loxPGFP-MCMV-om. Viruse smo aplicirali odvojeno, i.p. u dozi od 2×10^5 PFU-a svakog virusa po mišu. Petog smo dana po infekciji utvrdili učestalost funkcionalne trans-komplementacije. U tu smo svrhu koristili *plaque-assay*, mjereći omjer MCMV plakova koji su ekspimirali GFP u odnosu na ukupan broj plakova. U slezeni i plućima svih inficiranih miševa utvrdili smo prisustvo GFP-pozitivnih MCMV-plakova (slika 10). Premda je apsolutni broj plakova koji su u našem pokusu ekspimirali GFP varirao u rasponu od 1 000 do 20 000 plakova po slezeni, ovaj je broj korelirao ukupnom broju plakova u slezeni. Stoga se omjer ukupnih plakova u odnosu na GFP-pozitivne kretao unutar vrlo uskog raspona (slika 10, desno).

Kod većine je testiranih životinja omjer GFP-pozitivnih naspram ukupnih plakova iznosio oko 1:50. U plućima je zabilježen nešto manji rasap apsolutnih vrijednosti, ali praktično istovjetan omjer ukupnih i GFP-pozitivnih plakova. Stoga je oko 2% infektivnog MCMV-a nosilo biljeg funkcionalne komplementacije, a s time i koinfekcije pojedinačnih stanica različitim MCMV-varijantama *in vivo*.



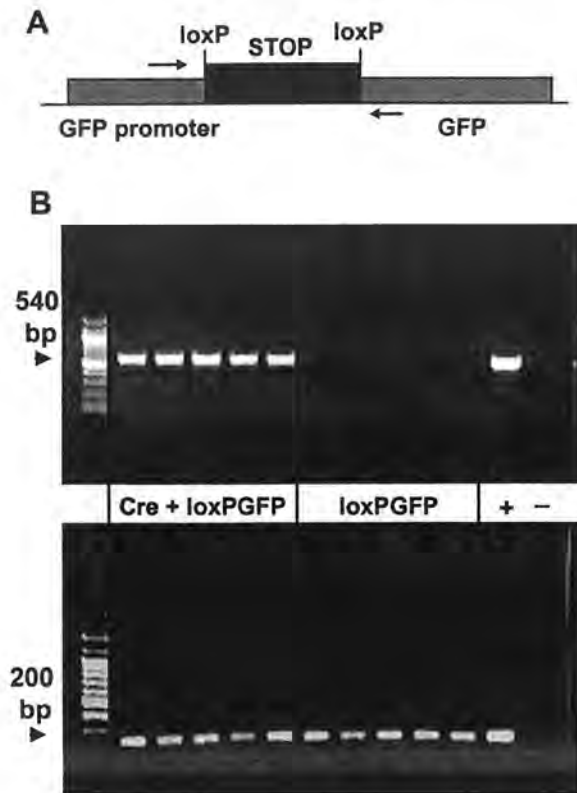
Slika 10: Redovita i česta funkcionalna komplementacija MCMV-varijanti. Skupine su miševa koinficirane Cre-MCMV-om te loxPGFP-MCMV-om (2×10^5 PFU-a svakog virusa po mišu), a infektivni je virus titriran petog dana po infekciji *plaque-assay*-om u slezeni i plućima miševa. Plakovi koji su ekspimirali GFP su kvantificirani UV mikroskopom (GFP +) i uspoređeni s količinom plakova detektiranih svjetlosnom mikroskopijom (ukupno). Prikazani su apsolutni virusni titrovi (lijevo) te relativni odnos ukupnog virusa u odnosu na GFP pozitivne (desno). Svaki krug označava jednog miša, horizontalne linije označavaju medijane rezultata.

Premda su ovi rezultati nedvojbeno dokazali da je u našem pokusu došlo do komplementacije, postojala je teoretska mogućnost da je do komplementacije došlo tijekom *plaque-assay*-a, a ne *in vivo*. Ova je mogućnost bila minimalna jer je *plaque-assay* obavljen pri niskom broju plakova po jažici (vidi poglavlje o materijalima i metodama), a inficirane stanice prekrivene karboksimetilceluloznim pokrovom, čime je spriječena sekundarna diseminacija virusa. Ujedno su pri očitavanju plakovi smatrani GFP-pozitivnima jedino ako su sve stanice unutar plaka ekspimirale GFP kako bi se izbjegli lažno pozitivni *in vitro* rezultati, nastali pri spajanju dvaju plakova heterolognih virusa. Pa ipak, konačan je dokaz da do komplementacije uistinu dolazi *in vivo*, a ne tijekom *plaque-assay*-a, bio moguć jedino izravnom analizom virusnih genoma u homogenatima organa inficiranih životinja.

Da bismo isključili moguće *in vitro* utjecaje te izravno dokazali *in vivo* komplementaciju, uspostavili smo PCR-reakciju specifičnu za rekombinirane

loxPGFP-MCMV genome. Vezna su mjesta za parove DNA-početnica bila u GFP genu u područjima nasuprot inzerciji stop kasete (slika 11A). Stoga je tek po Cre-rekombinaciji moglo doći do međusobnog približavanja parova DNA-početnica i tek je tada PCR reakcija mogla postati pozitivnom.

Testirali smo skupinu od 5 miševa i.p. inficiranih Cre-MCMV-om te četrdeset i pet minuta kasnije inficiranih loxPGFP-MCMV-om. Kao kontrolu smo koristili miševe inficirane loxPGFP-MCMV-om. Petog smo dana po infekciji izolirali DNA iz homogenata slezene i pluća te testirali rekombinaciju virusnih genoma u njoj. Slezene su svih miševa koinficiranih s oba virusa u našem pokusu bile pozitivne, što nije bio slučaj ni kod jednog kontrolnog miša (slika 11B, gore). Premda je ovaj rezultat upućivao na zaključak da je do rekombinacije došlo uslijed koinfekcije i komplementacije virusa *in vivo*, postojala je teoretska mogućnost da je PCR-reakcija bila lažno pozitivna u koinficiranoj skupini, a lažno negativna u kontrolnoj skupini. Do ovog bi slučaja moglo doći pod uvjetom da se DNA-početnice vežu za neku sekvencu virusne DNA koja ne odgovara području Cre-rekombinacije, a koju nije moguće detektirati u uzorcima iz kontrolne skupine. Budući da je kontrolna skupina inficirana samo jednim virusom, postojala je mogućnost da je u organima ovih miševa prisutna niža količina ukupne virusne DNA, što bi moglo pružiti teoretsku podlogu ovom slučaju. Da bismo isključili i ovu mogućnost, testirali smo sve uzorke na prisustvo MCMV DNA, koristeći par DNA-početnica specifičan za virusnu polimerazu. Svi su testirani miševi bili pozitivni na virusnu DNA u slezeni (slika 11B, dolje).

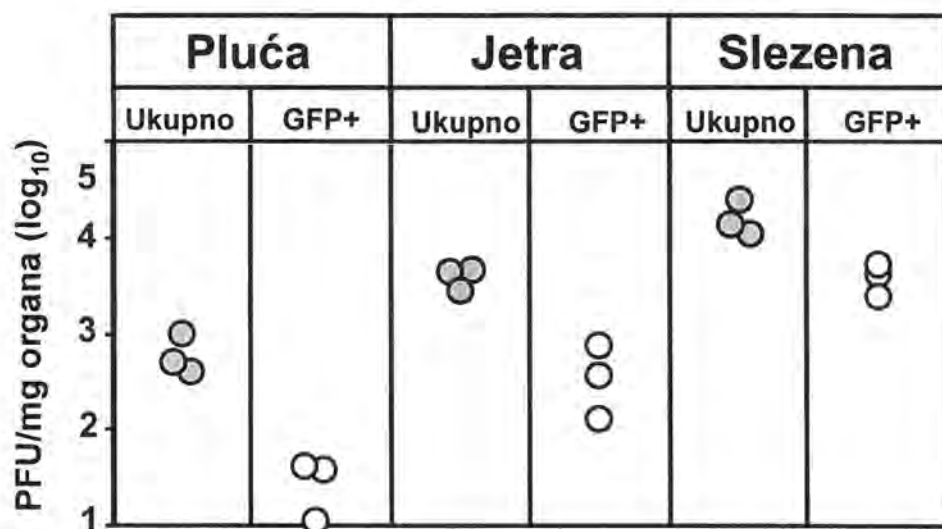
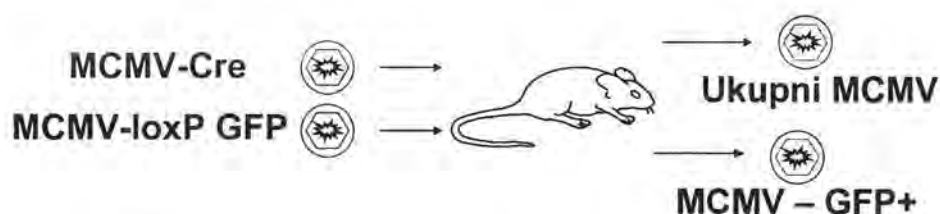


Slika 11: Redovita funkcionalna rekombinacija MCMV-varijanti *in vivo*. (A) Shematski prikaz veznog mjesta primera korištenih za detekciju Cre-posredovane rekombinacije. (B) DNA je izolirana iz miševa koinficiranih Cre-MCMV-om i loxPGFP-MCMV-om (Cre+loxPGFP) te kontrolnih miševa inficiranih samo loxP-GFP MCMV-om (loxPGFP) te podvrgnuta PCR-analizi. U prvoj su reakciji (gore) korišteni primeri specifični za područja GFP proteina prikazana u panou A. Kontrolni uzorci sadrže DNA rekombiniranog loxPGFP-MCMV-a (+) te loxPGFP-MCMV-a prije rekombinacije (-). Kontrolni je PCR (dolje) obavljen primerima za M54 gen. Pozitivna kontrola (+) sadrži MCMV DNA, a negativna (-) mišju genomsku DNA. Svaka kolona nosi DNA iz pojedinačnog miša. Strelica označava PCR produkt i njegovu očekivanu duljinu.

Identični rezultati u obje PCR-reakcije zabilježeni su u plućima svih inficiranih miševa (rezultati nisu prikazani). Stoga je kod svih koinficiranih miševa došlo do funkcionalne komplementacije virusnih varijanti, što je posredno ukazivalo na zaključak da je pri sistemskoj koinfekciji došlo do vjerojatne koinfekcije pojedinačnih stanica.

Rezultati istraživanja provedenih *in vitro* ukazivali su na mogućnost da je učestalost virusne komplementacije ovisna o uvjetima infekcije, poput npr. infektivne

doze (slika 9). Da bismo utvrdili dolazi li do slične pojave i *in vivo*, intraperitonealno smo inficirali miševe visokom infektivnom dozom (10^6 PFU-a po mišu) Cre-MCMV-a i loxPGFP-MCMV-a pomješanih u omjeru 1:1. Ovim smo postupkom pogodovali koinfekciji pojedinačnih stanica različitim virusnim varijantama jer je vjerojatnost koinfekcije iste stanice veća ukoliko se u istom području nalazi više virusa. Ujedno, miješanje je virusa prije infekcije teoretski moglo dovesti do njihovog sljepljivanja i stoga usmjeravanja u iste stanice. Četvrtog su dana po koinfekciji miševi žrtvovani, a titar virusa koji eksprimiraju GFP te ukupnog infektivnog virusa je određen *plaque-assay*-om u homogenatima pluća, jetara i slezena inficiranih miševa (slika 12).



Slika 12: Funkcionalna komplementacija MCMV-varijanti kao funkcija virusnog titra u inficiranom organu. Skupine su miševa koinficirane mješavinom Cre-MCMV-a te loxPGFP-MCMV-a (10^6 PFU-a ukupnog MCMV-a po mišu), a infektivni je virus titriran četvrtog dana po infekciji *plaque-assay*-om u jetri, slezeni i plućima miševa. Plakovi koji su eksprimirali GFP su kvantificirani UV mikroskopom (GFP +) i uspoređeni s količinom plakova detektiranih svjetlosnom mikroskopijom (ukupno). Svaki krug označava jednog miša.

Ukupna je količina infektivnog virusa po organu bila najviša u slezeni, a najniža u plućima. Apsolutni broj plakova koji su ekspimirali GFP pratio je ovaj obrazac te je bio najniži u plućima, a najviši u slezeni. Omjer virusa koji je ekspimirao GFP u odnosu na ukupan virus je bio znatno viši u ovom pokusu nego li u pokusu prikazanom na slici 9 i iznosio je oko 1:20 u plućima, 1:10 u jetri i oko 1:5 u slezeni (slika 12). Stoga je pri infekciji mješavinom virusa i visokoj infektivnoj dozi češće dolazilo do rekombinacije nego li u slučaju separatne infekcije nižim infektivnim dozama.

Ujedno treba istaknuti da je omjer ukupnog u odnosu na rekombinirani virus bio najviši u organima u kojima je apsolutni titar virusa bio najniži (pluća), a najniži u organima u kojima je apsolutni titar bio najviši (slezena). Zaključno, virusna je trans-komplementacija, a time i koinfekcija pojedinačnih stanica, bila češća u eksperimentalnim uvjetima koji su pogodovali ulasku virusa u iste stanice. Učestalost je trans-komplementacije korelirala apsolutnom titru virusa u pojedinim organima, što je moglo biti uzrokovano visokom vjerojatnošću koinfekcije pojedinačnih stanica različitim virusnim varijantama pri visokom virusnom infektivnom titru.

Izravan uvid u koinfekciju pojedinačnih stanica in vivo

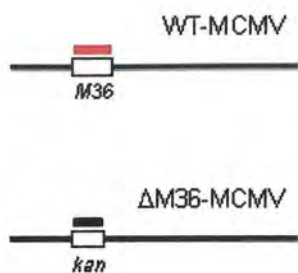
Prethodno opisani rezultati su utvrdili da se MCMV-varijante uzajamno mogu komplementirati te da tijekom *in vivo* koinfekcije različitim virusnim varijantama dolazi do redovite koinfekcije pojedinačnih stanica i funkcionalne komplementacije. Premda se nameće zaključak da je koinfekcija pojedinačnih stanica uzrokovala komplementaciju i poboljšanu replikaciju virusa, ova se uzročno-posljedična veza mogla konačno i izravno potvrditi jedino histološkom *in situ* analizom. Stoga smo *in situ* hibridizacijom pratili replikaciju i lokalizaciju genoma atenuiranih virusnih varijanti, u prisustvu ili u odsustvu virulentnog virusa.

Inficirali smo skupine miševa WT-MCMV-om i ranije opisanom Δ M36-MCMV mutantom, a u kontrolnoj skupini isključivo atenuiranom mutantom. Virusne smo genome detektirali koristeći dvije različite hibridizacijske probe. Prva je, obilježena crvenom bojom, bila specifična za sekvencu M36 gena, a zbog toga i za WT-MCMV. Druga je, obilježena crnom bojom, bila specifična za sekvencu *kan* kasete koja se nalazila umetnuta u genom Δ M36-MCMV mutante umjesto M36 gena (slika 13A). Stoga je bilo moguće istovremeno detektirati stanice inficirane WT-MCMV-om i virusnom mutantom.

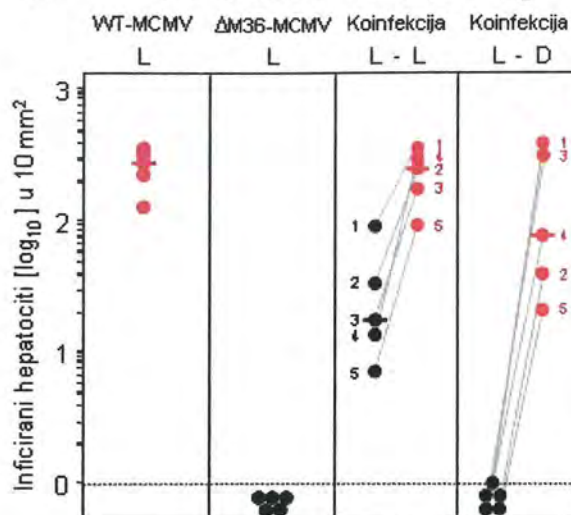
Skupine su miševa inficirane u potkožno tkivo šapa. U pokusu smo koristili četiri skupine miševa: skupinu inficiranu isključivo WT-MCMV-om, skupinu koja je inficirana samo Δ M36-MCMV-om, skupinu koinficiranu obama virusima u istu šapu (homotopna koinfekcija), te skupinu u kojoj su WT i Δ M36-MCMV ubrizgani u različite šape (heterotopna koinfekcija). Virusni su genomi sedmog dana po infekciji detektirani *in situ* hibridizacijom u mišjim hepatocitima, a broj inficiranih stanica po jedinici površine histološkog presjeka određen u svim eksperimentalnim skupinama (slika 13B).

Stanice inficirane WT-MCMV-om smo detektirali u svim skupinama koje su njime bile inficirane, ali stanice inficirane Δ M36-MCMV-om su bile prisutne jedino u skupini koja je uz mutantu dobila i WT-MCMV u istu šapu. Stoga je homotopna, ali ne i heterotopna koinfekcija WT-MCMV-om omogućila replikaciju i rasap atenuirane mutante. Važno je naglasiti da je u skupini, u kojoj je bilo moguće detektirati Δ M36-MCMV, broj stanica inficiranih mutantom korelirao s brojem stanica inficiranih WT-MCMV-om premda je broj stanica inficiranih mutantom bio znatno niži nego li broj stanica koje su bile inficirane WT-MCMV-om. Posljedično, virusna komplementacija može pomoći replikaciju atenuirane mutante, ali ne i u potpunosti nadomjestiti genski defekt.

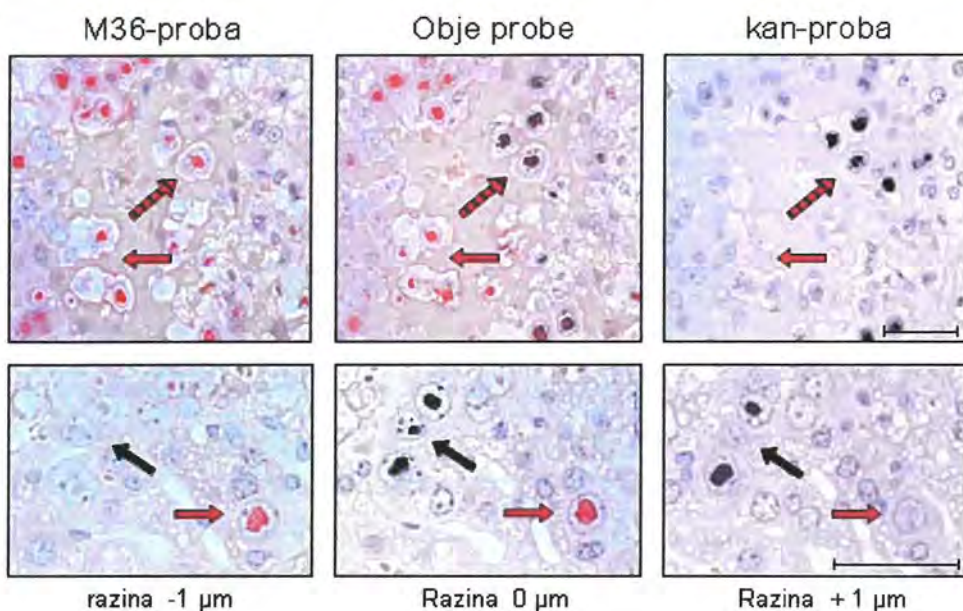
A



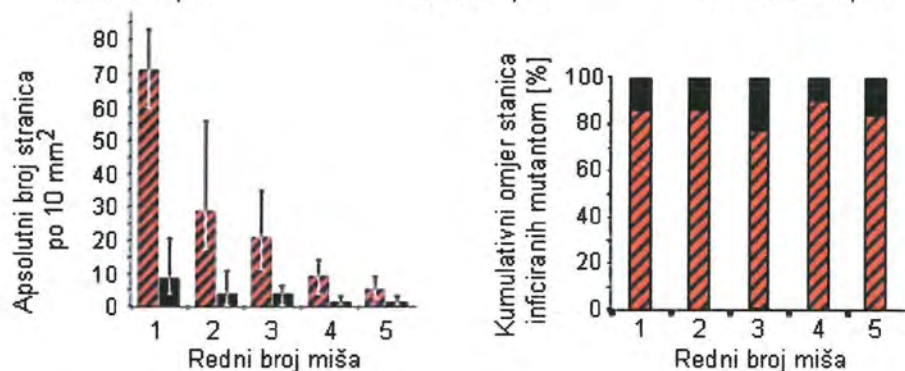
B Virusi korišteni u infekciji



C



D



Slika 13: Koinfekcija pojedinačnih stanica in vivo. (A) Shematski prikaz DNA proba i njihovog veznog mjesta u virusnom genomu (proporcije ne odgovaraju realnima). M36-P, proba označena crvenom bojom, identificira DNA WT-MCMV-a u jezgrama inficiranih stanica, dok Kan-P, proba označena crnom bojom identificira DNA virusne mutante. (B) Funkcionalna komplementacija po homotopnoj koinfekciji. Skupine BALB/c miševa (n=5),

Analizom serijskih histoloških rezova utvrdili smo da je koinfekcija pojedinačnih stanica objema MCMV-varijantama moguća (slika 13C). MCMV je inficirao jetreno tkivo eksperimentalnih životinja tvoreći žarišta infekcije unutar kojih je bilo moguće naći skupine inficiranih stanica. Važno je naglasiti da su kod žarišta inficiranih objema varijantama sve stanice bile dvostruko pozitivne (slika 13C, gore). Neovisno su o tome identificirana i infektivna žarišta u kojima su stanice bile inficirane isključivo WT ili Δ M36-MCMV-om (slika 13C). Stoga je Δ M36-MCMV mogao replicirati u jetrenom tkivu neovisno o WT-MCMV-u, ali je prisustvo WT-MCMV-a u području primarne infekcije bilo nužno za rasap mutante od potkožja do jetre.

Pa ipak, ovi rezultati nisu razjasnili je li (i u kojoj mjeri) prisustvo WT-MCMV-a u stanicama inficiranim Δ M36-MCMV-om utjecalo na replikaciju atenuirane mutante. Da bismo razjasnili ovo pitanje, prebrojali smo stanice

imunokompromitiranih gama-iradijacijom, su supkutano inficirane WT-MCMV-om (crveni simboli) te Δ M36-MCMV-om (crni simboli). L označava pojedinačnu infekciju s 10^5 PFU virusa u lijevu stražnju šapu, L-L homotopnu koinfekciju objema varijantama u stražnju lijevu šapu, dok L-D označava heterotopnu koinfekciju pri kojoj su WT-MCMV i Δ M36-MCMV injicirani u potkožje kontralateralnih šapa. Dvanaestog dana po infekciji, virusom inficirane stanice su identificirane 2B-ISH metodom te kvantificirane u reprezentativnim arealima od 10mm^2 . Točke označavaju vrijednosti pojedinačnih miševa, a horizontalna crta označava medijan. U koinficiranim skupinama, miševi su pobrojani prema redoslijedu kojega je odredio rang infekcijskog titra Δ M36 mutante. (C) 2B-ISH histološka analiza serijskih rezova jetrenog tkiva, 12. dana po homotopnoj koinfekciji. Serijski rezovi, $1\mu\text{m}$ razmaknuti jedan od drugog, su hibridizirani označenim probama. Crne ili crvene strelice označavaju inkluzijska tjelešca u jezgrama hepatocita inficiranih isključivo Δ M36-MCMV-om ili WT-MCMV-om. Crveno-crne isprugane strelice označavaju koinficirane stanice, čije jezgre sadrže obje DNA varijante. Kontrastno bojenje je obavljeno hemotoksilinom, a marker označava $50\mu\text{m}$ duljine. (D) Kvantifikacija koinficiranih stanica te stanica inficiranih isključivo mutantom. Brojevi pojedinačnih miševa odgovaraju oznakama s panela B. Histogrami označavaju apsolutni (lijevo) ili relativni (desno) broj stanica inficiranih Δ M36 mutantom. Koinficirane stanice (crveno-crni histogrami) ili stanice inficirane isključivo mutantom (crni histogrami) su prikazane. Prikazane su aritmetičke sredine skupina od deset areala površine 10mm^2 te standardne devijacije.

koinficirane MCMV-mutantom i WT-MCMV-om, a njihov broj usporedili s brojem stanica inficiranih isključivo virusnom mutantom. Kvantifikacijom stanica inficiranih Δ M36-MCMV-om utvrđene su velike individualne razlike u apsolutnom broju inficiranih stanica, ali je kod svih miševa utvrđeno da je broj koinficiranih stanica daleko premašivao broj stanica inficiranih samo Δ M36-MCMV-om (slika 13D, lijevo). U odnosu na ukupan broj stanica inficiranih Δ M36-MCMV-om postotak je stanica koje su bile koinficirane Δ M36-MCMV-om i WT-MCMV-om varirao u uskom rasponu između 80 i 90% (slika 13D, desno). Posljedično je postotak stanica koje su bile inficirane samo Δ M36-MCMV-om iznosio između 10 i 20% u testiranim životinjama. Stoga je velika većina Δ M36-MCMV-a replicirala u stanicama koje su istovremeno bile inficirane WT-MCMV-om, što je ukazivalo na zaključak da je koinfekcija pojedinačnih stanica pogodovala replikaciji atenuirane virusne varijante. Ujedno se, s obzirom na velike individualne razlike u apsolutnoj količini MCMV-a u jetri, nameće zaključak da do koinfekcije stanica nije dolazilo uslijed stohastičke distribucije virusnih varijanti u tkivu jetre, nego zbog procesa koji su usmjeravali viruse u iste stanice.

Zaključno, koinfekcija je pojedinačnih stanica različitim MCMV-varijantama pogodovala funkcionalnoj virusnoj komplementaciji i replikaciji atenuiranih virusnih varijanti.

RASPRAVA

Klinička su istraživanja dokazala da višestruka infekcija različitim citomegalovirusnim sojevima korelira s povišenom i produženom viremijom (25, 26). Još je značajnije da je u kliničkim istraživanjima konzistentno zabilježena teža klinička slika (25, 27, 91) i lošija prognoza (24, 27) pri koinfekciji različitim sojevima humanog CMV-a. Pa ipak, klinička istraživanja nisu mogla utvrditi jesu li interakcije među citomegalovirusnim sojevima optimizirale njihovu replikaciju i dovele do sinergije virusnih varijanti. Ovdje smo dokazali da višestruke infekcije doista pogoduju replikaciji MCMV-varijanti jer interakcije među virusima dovode do poboljšane replikacije i diseminacije virusa u zaraženom domaćinu. Kod miševa inficiranih samo atenuiranom MCMV-mutantom, u odsustvu WT-MCMV-a, zabilježili smo značajno niže virusne titrove i bržu eliminaciju virusa iz organa nego li kod miševa koji su uz mutantu inficirani i WT-MCMV-om. Budući da smo koristili miševe istoga spola, dobi i genetskog naslijeđa, isključili smo mogućnost da su se eksperimentalne životinje značajno razlikovale u osjetljivosti ili otpornosti na infekciju, što je i potvrđeno relativno malim rasponom titra infektivnog MCMV-a unutar pojedinih skupina. Stoga su uvjeti virusne infekcije, a ne osobine domaćina, određivali razlike koje smo opservirali među eksperimentalnim skupinama. Zaključno, međusobne interakcije pojedinih varijanti MCMV-a su poboljšale replikaciju atenuiranih virusnih varijanti, dovodeći do njihova višeg titra pri vrhuncu virusne replikacije, ali i usporivši njihovu eliminaciju iz organizma.

Ranije objavljena opažanja ukazala su da je koinfekcija s virulentnim MCMV-om u stanju pospješiti *in vivo* replikaciju atenuiranih ili čak replikacijski inkompetentnih mutanti (54, 92), ali ni mehanizam interakcije virusnih varijanti tijekom koinfekcije niti njihova frekvencija nisu bili određeni. Prema našim

spoznajama, ovdje prikazani rezultati predstavljaju prvi izravan i nepobitan dokaz *in vivo* trans-komplementacije CMV-varijanti. Zbog karakteristika našeg eksperimentalnog modela homologna rekombinacija ni teoretski ne može objasniti poboljšanje replikacije virusnih mutanti u prisustvu WT-MCMV-a. Naime, homolognom bi rekombinacijom moglo doći do rekonstitucije izvorne genetske sekvence virusa i stoga do njegove poboljšane replikacije, ali bi istovremeno iz genoma bile izbrisane genetske sekvence koje su korištene za selektivnu kvantifikaciju atenuiranih mutanti u prisustvu virulentnog MCMV-a. Stoga bi homologna rekombinacija teoretski mogla objasniti međusobnu interakciju dviju atenuiranih mutanti, poput $\Delta M36$ i $\Delta M27$ sa slike 3, ali ne i porast infektivnog titra TN-M36.A u prisustvu WT-MCMV-a, prikazane na slici 4, ili povišeni broj kopija virusnog genoma u slučaju koinfekcije $\Delta M36$ i WT-MCMV-om sa slike 5. Osim toga, naši rezultati ukazuju na zaključak da su nehomologne rekombinacije rijetke pojave te se porast titra virusnih mutanti, zabilježen u prisustvu WT-MCMV-a, ne može objasniti cis-komplementacijom. Stoga je funkcionalna trans-komplementacija značajan, ako ne i isključivi mehanizam kojim je WT-MCMV pogodovao replikaciji atenuiranih mutanti korištenih u našim pokusima. Pa ipak, treba naglasiti da ovdje prikazani rezultati ne mogu odrediti ulogu i utjecaj homologne rekombinacije na virusnu replikaciju u uvjetima u kojima bi ona bila moguća.

U pokusima su korištene MCMV-mutante kojima su nedostajali geni čija je funkcija prethodno definirana. Radilo se o genima koji su kontrolirali antiapoptotske ili imunomodulacijske virusne funkcije. Stoga je ekspresija nedostajućeg genskog produkta mogla koristiti atenuiranim virusima jedino ako je WT ekspimirao gene u stanicama u kojima se nalazila i mutanta. Eksperimenti u kojima smo koristili hibridizaciju *in situ* i Cre-rekombinaciju izravno su dokazali, pa čak i vizualno prikazali da se upravo to događa u tkivima koinficiranih miševa: atenuirana je virusna

varijanta replicirala u jezgrama istih stanica kao i replikativno kompetentni WT-MCMV.

Budući da se deficit replikacije atenuiranih MCMV-mutanti kompenzira u prisustvu WT-MCMV-a, koinfekcija u kojoj je barem jedan od virusa atenuiran teoretski bi trebala voditi do prednosti koinfekcije pojedinačnih stanica. Ova hipoteza polazi od darvinističke pretpostavke da bi preživljavanje atenuiranih mutanti koje su se zatekle u istoj stanici s WT-MCMV-om, a gubitak onih koje nisu dobile pomoć od virulentnog koinfekcijskog partnera, rezultirao selekcijom mutanti koje su koinficirale iste stanice. Seleksijski je tlak u našim eksperimentalnim uvjetima bio naročito jak, jer pojedine mutante uopće nisu mogle replicirati u odsustvu WT-MCMV-a. Stoga su pokusi s atenuiranim virusnim sojevima pogodni za istraživanja koinfekcije *in vivo*.

Ovako jak seleksijski tlak za koinfekciju individualnih stanica nije realno očekivati u kliničkim uvjetima jer su klinički sojevi HCMV-a rezultat dugotrajne prirodne selekcije pa su stoga i odabrani zahvaljujući svojoj replikacijskoj kompetentnosti. Zato smo testirali frekvenciju stanične koinfekcije i međusobne komplementacije replikacijski kompetentnih CMV-varijanti. U tu smo svrhu koristili mutante koje su ekspimirale Cre-rekombinazu i inducibilni GFP. U ovim smo pokusima utvrdili da do učestale trans-komplementacije dolazi neovisno o seleksijskom tlaku koji bi atenuacija koinfekcijskih partnera uzrokovala. Stoga je trans-komplementacija pri višestrukoj infekciji virusnim varijantama princip koji dovodi do interakcije replikacijski-kompetentnih virusnih sojeva te zato može dovoditi i do povećane virulencije ionako virulentnih sojeva pri mješovitoj infekciji. Ujedno smo u našim pokusima utvrdili da je do koinfekcije pojedinačnih stanica dolazilo češće ako je titar infektivnog virusa po permisivnoj stanici bio viši, bilo *in vitro* ili *in vivo*. Stoga do koinfekcije pojedinačnih stanica, a time i do virusne

interakcije, može lakše doći u floridnim infekcijama u kojima je virusni titar ionako značajno povišen.

Treba napomenuti da koinfekcija pojedinačnih stanica nije nužno jedini i isključivi mehanizam kojim se različite CMV varijante mogu komplementirati. Ekspresija virusnih citokinskih ili kemokinskih homologa važna je za njihovu *in vivo* replikaciju i diseminaciju (93, 94). Stoga bi njihovo lučenje iz inficiranih stanica te vezivanje na receptore susjednih ili udaljenih stanica moglo pružiti podlogu virusnoj trans-komplementaciji u odsustvu koinfekcije pojedinačnih stanica. U tom bi slučaju do komplementacije CMV-varijanti dolazilo još češće nego li u našem eksperimentalnom modelu, jer mehanizam ne bi ovisio o frekvenciji koinfekcije pojedinačnih stanica različitim virusnim varijantama.

Pitanje o mehanizmu virusne komplementacije ima implikacije koje sežu dalje od akademske rasprave o mehanistici virusnih interakcija. Mehanizam virusne komplementacije može objasniti virusnu diseminaciju, ali i njihovu evoluciju. Učestala bi genetska rekombinacija pri koinfekciji omogućila brzu genezu velikog broja novih virusnih varijanti među kojima bi se odabrale najefikasnije i propagirale prirodnom selekcijom. S druge strane, ukoliko se virusi mogu komplementirati i kodiseminirati u odsustvu trajne razmjene genetskog materijala, utoliko bi selekcijski tlak za odabir najefikasnijih prirodnih virusnih rekombinanti trebao biti znatno niži jer bi i slabije efikasne CMV varijante mogle replicirati. Zanimljivo je da je barem jedno kliničko istraživanje opisalo kinetiku pojave višestrukih citomegalovirusnih varijanti tijekom longitudinalnog praćenja bolesnika sa stečenim imunodeficitnim sindromom (95). Ova je studija pratila kinetiku virusnih mutacija koje omogućavaju rezistenciju na antivirusne lijekove *Ganciclovir* i *Foscarnet* te je utvrdila da je do pojave mutacija dolazilo postepeno, tek u dijelu virusne populacije, ali su ove mutacije omogućile ganciklovirsku rezistenciju svim virusnim varijantama. Ovaj rezultat, uz ostale

rezultate prikazane u ovom radu, upućuje na zaključak da virusna trans-komplementacija utječe na dinamiku virusne evolucije u kliničkim situacijama. Pa ipak, premda smo u našim pokusima dokazali relevantnost funkcionalne rekombinacije u virusnim interakcijama, daljnja su istraživanja potrebna da bi se odredila uloga i važnost genetske rekombinacije u interakcijama herpesvirusnih sojeva, a time i u evoluciji novih virusnih varijanti.

Zanimljivo je da je najznačajniji porast titra mutante u prisustvu WT-MCMV-a zabilježen u žlijezdi slinovnici, koja je poznata kao područje sekundarne virusne infekcije (53) i do koje virus diseminira tek nakon prvobitne replikacije u drugim organima. Isto je vrijedilo za potkožno injicirani $\Delta M36$ -MCMV koji je diseminirao do jetre u slučaju koinfekcije WT-MCMV-om u istu šapu. Ovi su rezultati upućivali na zaključak da je mutanta kodiseminirala s WT-MCMV-om do udaljenih područja u organizmu. Ovaj je rezultat iznenađujući ukoliko polazimo od premise da virioni diseminiraju pojedinačno i stohastički kroz organizam. U tom bi se slučaju statistička vjerojatnost rasapa višestrukih virusa u istu stanicu smanjivala s njenom udaljenošću od područja primoinfekcije, a pri našem bi koinfekcijskom modelu do komplementacije atenuiranih varijanti dolazilo pretežno lokalno, u području primoinfekcije. Ova je premisa dijametralno suprotna našim rezultatima, u kojima je najznačajniji utjecaj WT-MCMV-a na atenuiranu mutantu $\Delta M36$ opažen upravo u sekundarnim žarištima infekcije.

Jedno od mogućih objašnjenja ovog nesklada mogla bi pružiti sposobnost MCMV-a da tvori višekapsidne virione u staničnoj kulturi ili čak *in vivo* (96, 97). Ovi se virioni sastoje od većeg broja kapsida i virusnih genoma koji dijele zajednički tegument i virusnu membranu. Stoga bi, pri koinfekciji iste stanice, dva međusobno različita virusna genoma mogla biti zapakirana u isti virion te zajedno diseminirati do

udaljenih područja u organizmu. Pa ipak, treba naglasiti da infektivnost ovih virusnih čestica još nije formalno dokazana.

Alternativno plauzibilno tumačenje zajedničke diseminacije MCMV-varijanti je kodiseminacija u udaljene organe istim inficiranim stanicama. Dendritičke stanice (98), ili monociti/makrofazi (99) su uključeni u diseminaciju MCMV-a kroz organizam domaćina, a Δ M36 je značajno atenuiran u makrofazima (72). Veći broj studija ukazuje na mogućnost da sekrecija virusnih kemokinskih analoga iz inficiranih stanica privlači monocitne stanice u područje infekcije koje potom MCMV iskorištava za diseminaciju u udaljene organe (77, 92, 99). Ovdje valja istaći da koinfekcija WT-MCMV-om omogućava bolju *in vivo* replikaciju i diseminaciju MCMV-mutante kojoj nedostaje MCK-2, jedan od virusnih kemokinskih analoga (77).

U ovom je radu opisana i po prvi put mehanistički razjašnjena interakcija citomegalovirusnih varijanti tijekom višestruke infekcije. Virusne interakcije tijekom koinfekcije višestrukim sojevima ili varijantama herpes virusa su prethodno opisane u eksperimentalnim modelima mišje infekcije herpes simpleks – 1 (HSV-1) virusom (48, 51). Infekcija miševa mješavinom dvaju avirulentnih HSV-1 sojeva, zvanih ANG i KOS, rezultirala je letalnom infekcijom u 62% slučajeva. Infekcija je miševa stotinu puta većom infektivnom dozom bilo kojeg od ovih dvaju sojeva, u odsustvu koinfekcije, bila dobro tolerirana i sve su inficirane životinje preživjele (51). Iz moždanog su tkiva uginulih životinja izolirane virusne rekombinante, među kojima je izdvojeno nekoliko klonova koji su bili podjednako letalni kao i mješavina virusa. Zanimljivo je istaknuti da su miješane infekcije bile letalne isključivo ako su oba virusa pomiješana prije infekcije te injicirana u istu šapu. Ako ANG i KOS HSV-1 nisu bili injicirani u istu šapu, infekcija nije bila letalna (51), što je upućivalo na to da su izravne interakcije među virusnim varijantama dovele do povećanja njihove virulentnosti. Proširena je studija dokazala da ni ANG ni KOS soj nisu

neuroinavazivni pa je stoga nedostatak njihove patogenosti bio odraz njihove nesposobnosti da diseminiraju i repliciraju u mozgu inficiranih životinja (48). U miješanoj je infekciji ovaj nedostatak diseminacije bio prevladan zahvaljujući virusnoj interakciji. Premda je iz mozga koinficiranih životinja izoliran velik broj virusnih rekombinanti, većina purificiranih rekombinanti nije bila neuroinavazivna ni virulentna, što je upućivalo na zaključak da je funkcionalna komplementacija najplauzibilnije tumačenje letalnosti miješane infekcije (48). Slični su rezultati objavljeni u neovisnoj studiji u kojoj je korišten model koinfekcije virulentnim i avirulentnim HSV-1 sojevima (52). U tom je radu prikazano da se HSV-1, kojemu nedostaje gen za timidin-kinazu, nalazi u mozgu miševa jedino u slučaju koinfekcije s virulentnim virusom koji posjeduje taj gen. Hibridizacijom genomske DNA izolirane iz mozga zaraženih životinja utvrđeno je da se sekvence specifične za atenuiranu mutantu mogu identificirati jedino u koinficiranim životinjama, ali ne i u onima koje su inficirane samo timidin-kinaza deficitnim virusom (52). Stoga je i ovaj rad upućivao na zaključak da je replikacija i diseminacija atenuirane herpesvirusne varijante pospješena zahvaljujući funkcionalnoj komplementaciji virusnih varijanti. Pa ipak, u svim prethodno navedenim studijama funkcionalnu komplementaciju nije bilo moguće izravno dokazati, nego se zaključak o njoj kao o vjerojatnom molekularnom mehanizmu nametao uslijed nedostatka dokaza o virusnoj rekombinaciji. U ovom je radu funkcionalna komplementacija izravno dokazana, a posredno i njena relevantnost za replikaciju atenuiranih mutanti u prisustvu virulentnog MCMV-a.

Ovdje prikazani rezultati sukladni su rezultatima dobivenim na modelima koinfekcije miševa varijantama HSV-1. Pa ipak, zbog razlika u diseminaciji alfa- i beta-herpes virusa, rezultati na modelu koinfekcije HSV-1 varijantama nisu mogli jasno predvidjeti frekvenciju i mehanizam interakcija CMV-varijanti. Kodiseminacija

alfa-herpesvirusa je određena usmjerenom diseminacijom virusa kroz aksone neurona koji inerviraju područje primarne infekcije. Diseminacija beta-herpesvirusa iz područja primarne infekcije do udaljenih organa nije do kraja razjašnjena premda neki rezultati ukazuju na mogućnost diseminacije posredstvom krvnih stanica (77, 99). Stoga je vjerojatnost koinfekcije istog neurona pri diseminaciji HSV-1 varijanti vrlo velika, a vjerojatnost koinfekcije iste krvne stanice relativno niža. U pokusima u kojima smo pratili diseminaciju atenuirane virusne mutante $\Delta M36$ te njenu replikaciju u sekundarnim žarištima infekcije utvrdili smo da je prisustvo WT-MCMV-a pogodovalo replikaciji mutante u jetri po supkutanoj inokulaciji mutante te replikaciji mutante u žlijezdama slinovnicama nekoliko tjedana po infekciji. Stoga se pomoć koju je virulentna MCMV-varijanta pružala atenuiranoj očitovala kroz veći broj virusnih replikacijskih ciklusa i u udaljenim organima.

Alfa- i beta-herpesvirusi se razlikuju i po staničnom tropizmu. Patologija HSV-1 infekcije ovisi o replikaciji virusa u epitelnim stanicama te u neuronima, dok CMV posjeduje širok dijapazon staničnog tropizma i može inficirati endotelne, epitelne, dendritične i mišićne stanice, ali i fibroblaste, stromalne stanice koštane srži te monocite/makrofage (54, 98–103). Mali bi broj infektivnih čestica u velikoj populaciji permisivnih stanica trebao smanjiti vjerojatnost da se virusne varijante sretnu u istoj stanici, kao što je i prikazano na slici 9. Razlike u biološkim svojstvima virusnih varijanti mogle bi čak i pogodovati segregaciji virusnih varijanti u stanične populacije koje bolje pogoduju replikaciji određenog CMV-soja, kao što je već drugdje predloženo (104). Pa ipak, naši rezultati jasno ukazuju na interakciju MCMV-varijanti, ne samo u slučaju supkutane inokulacije kojom su različite varijante bile usmjerene u relativno mali broj stanica u području inokulacije, nego i pri sistemske infekciji u kojoj su virusne varijante zasebno intravenski inokulirane. Stoga je, unatoč velikom broju permisivnih stanica koje su virusu bile dostupne tijekom sistemske

infekcije, do koinfekcije pojedinačnih stanica dolazilo znatno češće nego što bi bio slučaj pri stohastičkoj raspodjeli virusa na permisivne stanice. Plauzibilno bi tumačenje ovog fenomena moglo biti da je MCMV tijekom svog rasapa do ciljnih organa mogao inficirati samo relativno mali broj permisivnih stanica jer bi time vjerojatnost virusnih interakcija porasla. U prilog ovom tumačenju svjedoči i izostanak virusne komplementacije pri injekciji dvaju virusa u međusobno udaljena područja (slika 13B, četvrti panel) jer ovaj rezultat implicira da je do virusnih interakcija dolazilo jedino kad su virusi bili u bliskom kontaktu.

Multipli su sojevi citomegalovirusa identificirani u obdukcijском materijalu porijeklom iz fetusa koji su *in utero* podlegli citomegalovirusnoj bolesti (24), što jasno ukazuje da istovremena ili uzastopna infekcija različitim sojevima citomegalovirusa dovodi do njihove kohabitacije u organizmu tijekom primarne infekcije HCMV-om. Nije izvjesno dolazi li i kod odraslih bolesnika do istovremene primarne infekcije s više različitih sojeva HCMV-a što bi se moglo zaključiti na temelju nalaza kliničkih izolata virusa (105, 106), iako postoje i nalzi koji to ne potvrđuju (20, 34). Budući da nema razloga zbog kojeg bi se odrasli bolesnici selektivno višestruko inficirali različitim sojevima HCMV-a, povećan broj citomegalovirusnih sojeva kod odraslih u odnosu na pedijatrijske bolesnike vjerojatno nastaje uslijed reinfekcije HCMV-om te postepenom akumulacijom citomegalovirusnih sojeva tijekom života. U tom su slučaju, ako pri imunosupresiji dolazi do istovremene reaktivacije većeg broja prethodno stečenih CMV-sojeva, moguće virusne interakcije, a time i virusna komplementacija.

Reaktivacija većeg broja HCMV-sojeva definiranih na osnovu gB, gN ili gO genotipa je opisana u kliničkim istraživanjima (91, 105). Veći broj HCMV-sojeva nije bilo moguće identificirati odmah po imunosupresiji pri renalnoj transplantaciji, već su se pojavili kasnije, nekoliko mjeseci po imunoj supresiji (105). U istraživanju u kojem

je genotipiziran veći broj virusnih gena (gB, gN i gO) primjećeno je da je većina primatelja transplantata pluća nosila veći broj CMV-sojeva, neovisno o serološkom statusu davatelja i primatelja organa (91). Ako pri imunosupresiji dolazi do reaktivacije većeg broja prethodno stečenih HCMV-sojeva, teoretski su moguće njihove interakcije, a time i sinergija. Ova je mogućnost naročito zabrinjavajuća u slučaju transplantacijskih zahvata u kojima su i davatelj i primatelj seropozitivni na HCMV jer se sojevi HCMV-a rutinski ne genotipiziraju, a čak i u slučaju genotipizacije sojevi se međusobno ne usklađuju. Stoga postoji i mogućnost da davatelj i primatelj nose različite latentne sojeve HCMV-a. U tom bi slučaju, po reaktivaciji virusa iz tkiva davatelja i primatelja organa, imunosuprimirani bolesnik bio izložen većem riziku od citomegalovirusne bolesti nego li bolesnici kod kojih dolazi do reaktivacije samo jednog HCMV-soja.

ZAKLJUČAK

U ovome su radu, na modelu infekcije miša, opisani mehanizmi komplementacije i sinergije citomegalovirusnih varijanti *in vivo*. Pri koinfekciji je dolazilo do značajno bolje replikacije atenuiranih virusnih varijanti nego li pri pojedinačnoj infekciji. Funkcionalna komplementacija je identificirana kao najznačajniji mehanizam virusne komplementacije premda rezultati ne isključuju mogućnost da i DNA-rekombinacija može pospješiti virusnu replikaciju. U pokusima s transgeničnim virusima uspostavljen je reporterski sustav kojim je dokazano da do funkcionalne komplementacije dolazi vrlo često. Sklonost koinfekciji pojedinačnih stanica različitim varijantama MCMV-a pruža prihvatljivo objašnjenje učestalosti funkcionalne komplementacije, a posljedično i virusne sinergije.

Istovremena je infekcija različitim sojevima CMV-a opisana u kliničkim istraživanjima, a novija su istraživanja dokazala korelaciju prisustva većeg broja virusnih varijanti te teže kliničke slike i nepovoljnije prognoze. Stoga ovaj rad, osim općenitog doprinosa našem razumijevanju replikacije i patogeneze CMV-a, ima i neposredne implikacije u kliničkoj praksi, definirajući biološku osnovu i mehanizam klinički relevantnog fenomena.

LITERATURA

1. Mocarski, E. S. - Courcelle, C. T. *Cytomegaloviruses and their replication*, str. 2629-2673. U: *Field's Virology*. 2000.
2. Pass, R. F. *Cytomegalovirus*, str. 2675-2705. U: Knipe, D. M. - Howley, P. M. (urednici), *Fields Virology*. Lippincott/The Williams & Wilkins Co., Philadelphia, Pa. 2000.
3. Marx, J. L. *Cytomegalovirus: A Major Cause of Birth Defects*. *Science*. 1975. 190:1184-1186.
4. Griffiths, P. D. - Walter, S. *Cytomegalovirus*. *Curr.Opin.Infect.Dis*. 2005. 18:241-245.
5. Stagno, S. *Cytomegalovirus*, str. 389-242. U: Remington, J. S. - Klein, J.O. (urednici), *Infectious diseases of the fetus and newborn infants*. W.B. Saunders, Philadelphia. 2000.
6. Cheung, T. W. - Teich, S. A. *Cytomegalovirus infection in patients with HIV infection*. *Mt.Sinai J.Med*. 1999. 66:113-124.
7. Metselaar, H. J. - Weimar, W. *Cytomegalovirus infection and renal transplantation*. *J.Antimicrob.Chemother*. 1989. 23 Suppl E:37-47.
8. Wiesner, R. H. - Marin, E. - Porayko, M. K. - Steers, J. L. - Krom, R. A. - Paya, C. V. *Advances in the diagnosis, treatment, and prevention of*

cytomegalovirus infections after liver transplantation.

Gastroenterol.Clin.North Am. 1993. 22:351-366.

9. Kijpittayarit, S. - Deziel, P. - Eid, A. J. - Razonable, R. R. *Primary cytomegalovirus disease after five years of antiviral prophylaxis.* Transplantation. 2006. 81:137-138.
10. Boeckh, M. - Bowden, R. *Cytomegalovirus infection in marrow transplantation*, str. 97-136. U: Buckner, C. D. (urednik), *Technical and Biological Components of Marrow Transplantation.* Kluwer Academic, Boston. 1995.
11. Ljungman, P. *Cytomegalovirus infections in transplant patients.* Scand.J.Infect.Dis.Suppl. 1996. 100:59-63.
12. Gerna, G. - Zipeto, D. - Parea, M. - Revello, M. G. - Silini, E. - Percivalle, E. - Zavattoni, M. - Grossi, P. - Milanesi, G. *Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia, and DNAemia.* J.Infect.Dis. 1991. 164:488-498.
13. Fox, J. C. - Kidd, I. M. - Griffiths, P. D. - Sweny, P. - Emery, V C. *Longitudinal analysis of cytomegalovirus load in renal transplant recipients using a quantitative polymerase chain reaction: correlation with disease.* J.Gen.Virol. 1995. 76 (Pt 2):309-319.
14. Aspin, M. M. - Gallez-Hawkins, G. M. - Giugni, T. D. - Tegtmeier, B. - Lang, D. J. - Schmidt, G. M. - Forman, S. J. - Zaia, J. A. *Comparison of plasma PCR and bronchoalveolar lavage fluid culture for detection of cytomegalovirus*

infection in adult bone marrow transplant recipients. J.Clin.Microbiol. 1994. 32:2266-2269.

15. Wolf, D. G. - Spector, S. A. *Diagnosis of human cytomegalovirus central nervous system disease in AIDS patients by DNA amplification from cerebrospinal fluid. J.Infect.Dis. 1992. 166:1412-1415.*
16. Einsele, H. - Ehninger, G. - Hebart, H. - Wittkowski, K. M. - Schuler, U. - Jahn, G. - Mackes, P. - Herter, M. - Klingebiel, T. - Loffler, J. - Wagner, S. - Muller, C. A. *Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. Blood. 1995. 86:2815-2820.*
17. Boeckh, M. - Bowden, R. A. - Goodrich, J. M. - Pettinger, M. - Meyers, J. D. *Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogeneic marrow transplantation. Blood. 1992. 80:1358-1364.*
18. Boppana, S. B. - Rivera, L. B. - Fowler, K. B. - Mach, M. - Britt, W. J. *Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. N.Engl.J.Med. 2001. 344:1366-1371.*
19. Drew, W. L. - Sweet, E. S. - Miner, R. C. - Mocarski, E. S. *Multiple infections by cytomegalovirus in patients with acquired immunodeficiency syndrome: documentation by Southern blot hybridization. J.Infect.Dis. 1984. 150:952-953.*
20. Baldanti, F. - Sarasini, A. - Furione, M. - Gatti, M. - Comolli, G. - Revello, M. G. - Gerna, G. *Coinfection of the immunocompromised but not the*

immunocompetent host by multiple human cytomegalovirus strains.

Arch.Virol. 1998. 143:1701-1709.

21. Haberland, M. - Meyer-Konig, U. - Hufert, F. T. *Variation within the glycoprotein B gene of human cytomegalovirus is due to homologous recombination.* J.Gen.Virol. 1999, 80 (Pt 6):1495-1500.
22. Al Ahdal, M. N. - Frayha, H. H. - Al Thawadi, S. I. - Kessie, G. *Typing of human cytomegalovirus clinical isolates from Saudi patients by PCR-RFLP.* Infection. 2005. 33:73-76.
23. Meyer-Konig, U. - Ebert, K. - Schrage, B. - Pollak, S. - Hufert, F. T. *Simultaneous infection of healthy people with multiple human cytomegalovirus strains.* Lancet. 1998. 352:1280-1281.
24. Arav-Boger, R., - Willoughby, R. E. - Pass, R. F. - Zong, J. C. - Jang, W. J. - Alcendor, D. - Hayward, G. S. *Polymorphisms of the cytomegalovirus (CMV)-encoded tumor necrosis factor-alpha and beta-chemokine receptors in congenital CMV disease.* J.Infect.Dis. 2002. 186:1057-1064.
25. Coaquette, A. - Bourgeois, A. - Dirand, C. - Varin, A. - Chen, W. - Herbein, G. *Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients.* Clin.Infect.Dis. 2004. 39:155-161.
26. Humar, A. - Kumar, D. - Gilbert, C. - Boivin, G. *Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B genotypes and response to antiviral therapy, in solid-organ-transplant recipients with CMV disease.* J.Infect.Dis. 2003. 188:581-584.

27. Sarcinella, L. - Mazzulli, T. - Willey, B. - Humar, A. *Cytomegalovirus glycoprotein B genotype does not correlate with outcomes in liver transplant patients.* J.Clin.Virol. 2002. 24:99-105.
28. Griffiths, P. D. *Biological synergism between infectious agents.* Rev.Med.Virol. 2000. 10:351-353.
29. Lurain, N. S. - Kapell, K. S. - Huang, D. D. - Short, J. A. - Painsil, J. - Winkfield, E. - Benedict, C. A. - Ware, C. F. - Bremer, J. W. *Human cytomegalovirus UL144 open reading frame: sequence hypervariability in low-passage clinical isolates.* J.Virol. 1999. 73:10040-10050.
30. Rossini, G. - Pignatelli, S. - Dal Monte, P. - Camozzi, D. - Lazzarotto, T. - Gabrielli, L. - Gatto, M. R. - Landini, M. P. *Monitoring for human cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients through antigenemia and glycoprotein N (gN) variants: evidence of correlation and potential prognostic value of gN genotypes.* Microbes.Infect. 2005. 7:890-896.
31. Lurain, N. S. - Fox, A. M. - Lichy, H. S. - Bhorade, S. M. - Ware, C. F. - Huang, D. D. - Kwan, S. P. - Garrity, E. R. - Chou, S. *The human cytomegalovirus genomic region from UL146 through UL147A reveals sequence hypervariability, genotypic stability, and overlapping transcripts.* Virol.J. 2006. 3:4.
32. Pignatelli, S. - Rossini, G. - Dal Monte, P. - Gatto, M. R. - Landini, M. P. *Human cytomegalovirus glycoprotein N genotypes in AIDS patients.* AIDS. 2003. 17:761-763.

33. Bar, M. - Shannon-Lowe, C. - Geballe, A. P. *Differentiation of human cytomegalovirus genotypes in immunocompromised patients on the basis of UL4 gene polymorphisms.* J.Infect.Dis. 2001. 183:218-225.
34. Trincado, D. E. - Scott, G. M. - White, P. A. - Hunt, C. - Rasmussen, L. - Rawlinson, W. D. *Human cytomegalovirus strains associated with congenital and perinatal infections.* J.Med.Virol. 2000. 61:481-487.
35. Prichard, M. N. - Penfold, M. E. - Duke, G. M. - Spaete, R. R. - Kemble, G. W. *A review of genetic differences between limited and extensively passaged human cytomegalovirus strains.* Rev.Med.Virol. 2001. 11:191-200.
36. Stahl, F. W. - Modersohn, H. - Terzaghi, B. E. - Crasemann, J. M. *The genetic structure of complementation heterozygotes.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1965. 54:1342-1345.
37. Simpson, R. W. - Hirst, G. K. *Temperature-sensitive mutants of influenza A virus: isolation of mutants and preliminary observations on genetic recombination and complementation.* Virology. 1968. 35:41-49.
38. Bergholz, C. M. - Kiley, M. P. - Payne, F. E. *Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of measles virus.* J.Virol. 1975. 16:192-202.
39. Hirsch, M. S. - Schooley, R. T. - Ho, D. D. - Kaplan, J. C. *Possible viral interactions in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).* Rev.Infect.Dis. 1984. 6:726-731.
40. Kaverin, N. V. - Kolomietz, L. I. - Rudneva, I. A. *Incomplete influenza virus: partial functional complementation as revealed by hemadsorbing cell count test.* J.Virol. 1980. 34:506-511.

41. Davis, M. G. - Kenney, S. C. - Kamine, J. - Pagano, J. S. - Huang, E. S. *Immediate-early gene region of human cytomegalovirus trans-activates the promoter of human immunodeficiency virus.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1987. 84:8642-8646.
42. Cockley, K. D. - Rapp, F. *Complementation for replication by unrelated animal viruses containing DNA genomes.* Microbiol.Rev. 1987. 51:431-438.
43. Siddiqui, A. - Gaynor, R. - Srinivasan, A. - Mapoles, J. - Farr, R. W. *Trans-activation of viral enhancers including long terminal repeat of the human immunodeficiency virus by the hepatitis B virus X protein.* Virology. 1989. 169:479-484.
44. Gendelman, H. E. - Phelps, W. - Feigenbaum, L. - Ostrove, J. M. - Adachi, A. - Howley, P. M. - Khoury, G. - Ginsberg, H. S. - Martin, M. A. *Trans-activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat sequence by DNA viruses.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1986. 83:9759-9763.
45. Karayiannis, P. *Hepatitis D virus.* Rev.Med.Virol. 1998. 8:13-24.
46. Vignuzzi, M. - Stone, J. K. - Arnold, J. J. - Cameron, C. E. - Andino, R. *Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population.* Nature. 2006. 439:344-348.
47. Lori, F. - Hall, L. - Lusso, P. - Popovic, M. - Markham, P. - Franchini, G. - Reitz, Jr., M. S. *Effect of reciprocal complementation of two defective human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) molecular clones on HIV-1 cell tropism and virulence.* J.Virol. 1992. 66:5553-5560.

48. Sedarati, F. - Javier, R. T. - Stevens, J. G. *Pathogenesis of a lethal mixed infection in mice with two nonneuroinvasive herpes simplex virus strains.* J.Virol. 1988. 62:3037-3039.
49. Umene, K. *Mechanism and application of genetic recombination in herpesviruses.* Rev.Med.Virol. 1999. 9:171-182.
50. Roizman, B. *The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1996. 93:11307-11312.
51. Javier, R. T. - Sedarati, F. - Stevens, J. G. *Two avirulent herpes simplex viruses generate lethal recombinants in vivo.* Science. 1986. 234:746-748.
52. Efstathiou, S. - Kemp, S. - Darby, G. - Minson, A. C. *The role of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase in pathogenesis.* J.Gen.Virol. 1989. 70 (Pt 4):869-879.
53. Krmptotic, A. - Bubic, I. - Polic, B. - Lucin, P. - Jonjic, S. *Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection.* Microbes.Infect. 2003. 5:1263-1277.
54. Podlech J. - Holtappels, R. - Grzimek, N. K. A. - Reddehase, M. J. *Animal models: murine cytomegalovirus*, str. 493-525. U: Kaufmann, S. H. E. - Kabelitz, D. (urednici), *Methods In Microbiology.* Academic Press, London and San Diego, CA. 2002.
55. Smith, M. G. *Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures.* Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 1954. 86:435-440.

56. Smith, M. G. - Vellios, F. *Inclusion disease or generalized salivary gland virus infection*. AMA.Arch.Pathol. 1950. 50:862-884.
57. Koszinowski, U. H. - Keil, G. M. - Schwarz, H. - Schickedanz, J. - Reddehase, M. J. *A nonstructural polypeptide encoded by immediate-early transcription unit 1 of murine cytomegalovirus is recognized by cytolytic T lymphocytes*. J.Exp.Med. 1987. 166:289-294.
58. Reddehase, M. J. - Koszinowski, U. H. *Significance of herpesvirus immediate early gene expression in cellular immunity to cytomegalovirus infection*. Nature. 1984. 312:369-371.
59. Del Val, M. - Munch, K. - Reddehase, M. J. - Koszinowski, U. H. *Presentation of CMV immediate-early antigen to cytolytic T lymphocytes is selectively prevented by viral genes expressed in the early phase*. Cell. 1989. 58:305-315.
60. Bubic, I. - Wagner, M. - Krmptotic, A. - Saulig, T. - Kim, S. - Yokoyama, W. M. - Jonjic, S. - Koszinowski, U. H. *Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus*. J.Virol. 2004. 78:7536-7544.
61. Hasan, M. - Krmptotic, A. - Ruzsics, Z. - Bubic, I. - Lenac, T. - Halenius, A. - Loewendorf, A. - Messerle, M. - Hengel, H. - Jonjic, S. - Koszinowski, U. H. *Selective down-regulation of the NKG2D ligand H60 by mouse cytomegalovirus m155 glycoprotein*. J.Virol. 2005. 79:2920-2930.
62. Krmptotic, A. - Messerle, M. - Crnkovic-Mertens, I. - Polic, B. - Jonjic, S. - Koszinowski, U. H. *The immunoevasive function encoded by the mouse*

cytomegalovirus gene m152 protects the virus against T cell control in vivo.

J.Exp.Med. 1999. 190:1285-1296.

63. Krmpotic, A. - Busch, D. H. - Bubic, I. - Gebhardt, F. - Hengel, H. - Hasan, M. - Scalzo, A. A. - Koszinowski, U. H. - Jonjic, S. *MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo.* Nat.Immunol. 2002. 3:529-535.
64. Krmpotic, A. - Hasan, M. - Loewendorf, A. - Saulig, T. - Halenius, A. - Lenac, T. - Polic, B. - Bubic, I. - Kriegeskorte, A. - Pernjak-Pugel, E. - Messerle, M. - Hengel, H. - Busch, D. H. - Koszinowski, U. H. - Jonjic, S. *NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145.* J.Exp.Med. 2005. 201:211-220.
65. Messerle, M. - Crnkovic, I. - Hammerschmidt, W. - Ziegler, H. - Koszinowski, U. H. *Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1997. 94:14759-14763.
66. Wagner, M. - Jonjic, S. - Koszinowski, U. H. - Messerle, M. *Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution.* J.Virol. 1999. 73:7056-7060.
67. Brune, W. - Menard, C. - Heesemann, J. - Koszinowski, U. H. *A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism.* Science. 2001. 291:303-305.

- 68 . Angulo, A. - Ghazal, P. - Messerle, M. *The major immediate-early gene ie3 of mouse cytomegalovirus is essential for viral growth.* J.Virol. 2000. 74:11129-11136.
- 69 . Ghazal, P. - Visser, A. E. - Gustems, M. - Garcia, R. - Borst, E. M. - Sullivan, K. - Messerle, M. - Angulo, A. *Elimination of ie1 significantly attenuates murine cytomegalovirus virulence but does not alter replicative capacity in cell culture.* J.Virol. 2005. 79:7182-7194.
- 70 . Ghazal, P. - Messerle, M. - Osborn, K. - Angulo, A. *An essential role of the enhancer for murine cytomegalovirus in vivo growth and pathogenesis.* J.Virol. 2003. 77:3217-3228.
- 71 . Loewendorf, A. - Kruger, C. - Borst, E. M. - Wagner, M. - Just, U. - Messerle, M. *Identification of a mouse cytomegalovirus gene selectively targeting CD86 expression on antigen-presenting cells.* J.Virol. 2004. 78:13062-13071.
- 72 . Menard, C. - Wagner, M. - Ruzsics, Z. - Holak, K. - Brune, W. - Campbell, A. E. - Koszinowski, U. H. *Role of murine cytomegalovirus US22 gene family members in replication in macrophages.* J Virol. 2003. 77:5557-5570.
- 73 . Brune, W. - Hasan, M. - Krych, M. - Bubic, I. - Jonjic, S. - Koszinowski, U. H. *Secreted virus-encoded proteins reflect murine cytomegalovirus productivity in organs.* J.Infect.Dis. 2001. 184:1320-1324.
- 74 . Cicin-Sain, L. - Brune, W. - Bubic, I. - Jonjic, S. - Koszinowski, U. H. *Vaccination of mice with bacteria carrying a cloned herpesvirus genome reconstituted in vivo.* J.Virol. 2003. 77:8249-8255.

75. Rupp, B. - Ruzsics, Z. - Sacher, T. - Koszinowski, U. H. *Conditional cytomegalovirus replication in vitro and in vivo*. J.Virol. 2005. 79:486-494.
76. Karrer, U. - Wagner, M. - Sierro, S. - Oxenius, A. - Hengel, H. - Dumrese, T. - Freigang, S. - Koszinowski, U. H. - Phillips, R. E. - Klenerman, P. *Expansion of protective CD8+ T-cell responses driven by recombinant cytomegaloviruses*. J.Virol. 2004. 78:2255-2264.
77. Saederup, N. - Aguirre, S. A. - Sparer, T. E. - Bouley, D. M. - Mocarski, E. S. *Murine cytomegalovirus CC chemokine homolog MCK-2 (m131-129) is a determinant of dissemination that increases inflammation at initial sites of infection*. J.Virol. 2001. 75:9966-9976.
78. Zimmermann, A. - Trilling, M. - Wagner, M. - Wilborn, M. - Bubic, I. - Jonjic, S. - Koszinowski, U. H. - Hengel, H. *A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- γ signaling and antiviral responses*. J.Exp.Med. 2005. 201:1543-1553.
79. Wagner, M. - Gutermann, A. - Podlech, J. - Reddehase, M. J. - Koszinowski, U.H. *Major histocompatibility complex class I allele-specific cooperative and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus*. J.Exp.Med. 2002. 196:805-816.
80. Abenes, G. - Lee, M. - Haghjoo, E. - Tong, T. - Zhan, X. - Liu, F. *Murine cytomegalovirus open reading frame M27 plays an important role in growth and virulence in mice*. J.Virol. 2001. 75:1697-1707.
81. Cicin-Sain, L. - Podlech, J. - Messerle, M. - Reddehase, M. J. - Koszinowski, U. H. *Frequent coinfection of cells explains functional in vivo*

complementation between cytomegalovirus variants in the multiply infected host. J.Virol. 2005. 79:9492-9502.

82. Reddehase, M. J. - Weiland, F. - Munch, K. - Jonjic, S. - Luske, A. - Koszinowski, U. H. *Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. J.Virol. 1985. 55:264-273.*
83. Rawlinson, W. D. - Farrell, H. E. - Barrell, B. G. *Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. J. Virol. 1996. 70:8833-8849.*
84. Grzimek, N. K. - Podlech, J. - Steffens, H. P. - Holtappels, R. - Schmalz, S. - Reddehase, M. J. *In vivo replication of recombinant murine cytomegalovirus driven by the paralogous major immediate-early promoter-enhancer of human cytomegalovirus. J. Virol. 1999. 73:5043-5055.*
85. Lefkovitz, I. - Waldman, H. *U Limiting dilution analysis of cells in the immune system. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1979.*
86. Lembo, D. - Donalisio, M. - Hofer, A. - Cornaglia, M. - Brune, W. - Koszinowski, U. H. - Thelander, L. - Landolfo, S. *The ribonucleotide reductase R1 homolog of murine cytomegalovirus is not a functional enzyme subunit but is required for pathogenesis. J.Virol. 2004. 78:4278-4288.*
87. Ziegler, H. - Thale, R. - Lucin, P. - Muranyi, W. - Flohr, T. - Hengel, H. - Farrell, H. - Rawlinson, W. - Koszinowski, U. H. *A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. Immunity. 1997. 6:57-66.*

88. Lodoen, M. - Ogasawara, K. - Hamerman, J. A. - Arase, H. - Houchins, J. P. - Mocarski, E. S. - Lanier, L. L. *NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules.* J.Exp.Med. 2003. 197:1245-1253.
89. Cardin, R. D. - Abenes, G. B. - Stoddart, C. A. - Mocarski, E. S. *Murine cytomegalovirus IE2, an activator of gene expression, is dispensable for growth and latency in mice.* Virology. 1995. 209:236-241.
90. Messerle, M. - Keil, G. M. - Koszinowski, U. H. *Structure and expression of murine cytomegalovirus immediate-early gene 2.* J.Virol. 1991. 65:1638-1643.
91. Puchhammer-Stockl, E. - Gorzer, I. - Zoufaly, A. - Jaksch, P. - Bauer, C. C. - Klepetko, W. - Popow-Kraupp, T. *Emergence of multiple cytomegalovirus strains in blood and lung of lung transplant recipients.* Transplantation. 2006. 81:187-194.
92. Saederup, N. - Lin, Y. C. - Dairaghi, D. J. - Schall, T. J. - Mocarski, E. S. *Cytomegalovirus-encoded beta chemokine promotes monocyte-associated viremia in the host.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1999. 96:10881-10886.
93. MacDonald, M. R. - Li, X. Y. - Virgin, H. W. *Late expression of a beta chemokine homolog by murine cytomegalovirus.* J.Virol. 1997. 71:1671-1678.
94. Penfold, M. E. - Dairaghi, D. J. - Duke, G. M. - Saederup, N. - Mocarski, E. S. - Kemble, G. W. - Schall, T. J. *Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1999. 96:9839-9844.
95. Baldanti, F. - Paolucci, S. - Parisi, A. - Meroni, L. - Gerna, G. *Emergence of multiple drug-resistant human cytomegalovirus variants in 2 patients with*

- human immunodeficiency virus infection unresponsive to highly active antiretroviral therapy.* Clin.Infect.Dis. 2002. 34:1146-1149.
96. Chong, K. T. - Mims, C. A. *Murine cytomegalovirus particle types in relation to sources of virus and pathogenicity.* J.Gen.Virol. 1981. 57:415-419.
97. Weiland, F. - Keil, G. M. - Reddehase, M. J. - Koszinowski, U. H. *Studies on the morphogenesis of murine cytomegalovirus.* Intervirology. 1986. 26:192-201.
98. Andrews, D. M. - Andoniou, C. E. - Granucci, F. - Ricciardi-Castagnoli, P. - Degli-Esposti, M. A. *Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis.* Nat.Immunol. 2001. 2:1077-1084.
99. Stoddart, C. A. - Cardin, R. D. - Boname, J. M. - Manning, W. C. - Abenes, G. B. - Mocarski, E. S. *Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus.* J.Virol. 1994. 68:6243-6253.
100. Myerson, D. - Hackman, R. C. - Nelson, J. A. - Ward, D. C. - McDougall, J. K. *Widespread presence of histologically occult cytomegalovirus.* Hum.Pathol. 1984. 15:430-439.
101. Hahn, G. - Jores, R. - Mocarski, E. S. *Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1998. 95:3937-3942.
102. Sinzger, C. - Jahn, G. *Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis.* Intervirology. 1996. 39:302-319.

103. Sinzger, C. - Plachter, B. - Grefte, A. - The, T. H. - Jahn, G. *Tissue macrophages are infected by human cytomegalovirus in vivo.* J.Infect.Dis. 1996. 173:240-245.
104. Kahl, M. - Siegel-Axel, D. - Stenglein, S. - Jahn, G. - Sinzger, C. *Efficient lytic infection of human arterial endothelial cells by human cytomegalovirus strains.* J.Virol. 2000. 74:7628-7635.
105. Aquino, V. H. - Figueiredo, L. T. *High prevalence of renal transplant recipients infected with more than one cytomegalovirus glycoprotein B genotype.* J.Med.Virol. 2000. 61:138-142.
106. Tarrago, D. - Quereda, C. - Tenorio, A. *Different cytomegalovirus glycoprotein B genotype distribution in serum and cerebrospinal fluid specimens determined by a novel multiplex nested PCR.* J.Clin.Microbiol. 2003. 41:2872-2877.

LUKA ČIČIN-ŠAIN - ŽIVOTOPIS

Datum i mjesto rođenja: 6. 7. 1972, Rijeka

Bračno stanje: Oženjen, dvoje djece

Stalna adresa (privatno):

Orlići 9a,
51000 Rijeka,
Tel. (051) 458-014

Adresa (posao):

Oregon Health and Science University
Vaccine and Gene Therapy Institute
505NW 185th Ave
Beaverton, OR, 97006, SAD
E-mail: cicinsai@ohsu.edu

Školovanje:

Osnovno: 1978-1986, OŠ "Gelsi", Rijeka.

Srednje: 1986-1990, CUO na talijanskom jeziku, Rijeka.

Visoko: 1990-1996, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, studij medicine.

Postdiplomsko: 1997-2001, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, studij biomedicine.

Akademski naslovi:

1996: Doktor medicine, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci.

2004: Magistar biomedicinskih znanosti, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci.

Zaposlenja:

1997: Mladi asistent, Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci.

1997-1998: Postdorski stipendist, BMC-Immunology group, Lund University, Lund, Švedska.

1998-1999: Liječnik pripravnik, Ortopedska klinika Lovran.

2000-2001: Znanstveni novak, Zavod za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci.

2001-2004: Postdorski suradnik, Max von Pettenkofer Institut, Ludwig-Maximillan University, München, Njemačka.

2004-danas: Postdorski stipendist, Oregon Health and Science University, Vaccine and Gene Therapy Institute, Portland, USA.

Nagrade i priznanja:

1994-1996: Stipendija grada Rijeke za iznimno nadarene učenike i studente.

2003: Kongres Hrvatskog imunološkog društva. Sporedna nagrada za najbolji poster.

2005: 10th International CMV Workshop, travel award.

2005: Nagrada zaklade Tartar Trust.

2005: Dvogodišnja stipendija Njemačke zaklade za znanost .

Znanstveni interesi: Immunologija, virologija, vakcinologija.

Stručne aktivnosti:

Članstva u udrugama:

2006-danas: Gesellschaft für Virologie (Njemačka virološka udruga) – redovni član

Kongresne prezentacije (prvi autor):

1. (1998) *Cod lambda5?*. 29th Annual Meeting of the Scandinavian Society for Immunology. Copenhagen, Danska.
2. (2002) *Bacterial transfer of recombinant attenuated herpesvirus vaccines*. 23rd Annual Meeting of the German Society for Virology. Erlangen, Njemačka.
3. (2002) *Cytomegalovirus infection in mice after injection of E. coli containing viral genomes*. I. hrvatski kongres za molekularne bioznanosti s međunarodnim sudjelovanjem. Opatija, Hrvatska.
4. (2003) *Cytomegaloviral mutants interact in vivo*. 24th Annual Meeting of the German Society for Virology. Berlin, Njemačka.
5. (2003) *Cytomegalovirus infection in mice after injection of E. coli containing viral genomes*. 9th International Cytomegalovirus Workshop and 1st International Betaherpesvirus Workshop. Maastricht, Nizozemska.
6. (2003) *Wild-type Cytomegalovirus Functionally Complements Attenuated Mutants in Vivo*. 28th International Herpesvirus Workshop. Madison, SAD.
7. (2003) *Wild-type Cytomegalovirus Functionally Complements Attenuated Mutants in Vivo*. Hrvatsko imunološko društvo, Godišnja skupština 2003. Brioni, Hrvatska.
8. (2004) *A severely attenuated cytomegalovirus induces protective immunity*. 2nd International Conference: Strategies for Immune Therapy. Würzburg, Njemačka.
9. (2004) *High Propensity for Single-Cell Co-infection and Functional Complementation of Attenuated Mutants by Virulent Cytomegalovirus in Vivo*. 25th Annual Meeting of the German Society for Virology. Tübingen, Njemačka.
10. (2004) *A cytomegaloviral anti-apoptotic gene prevents synergic antiviral activity of IFN γ and Toll-like receptor signalling*. 29th International Herpesvirus Workshop. Reno, SAD.
11. (2004) *A Cytomegalovirus Lacking 44 Genes is Avirulent, but Induces Protective Immunity in Mice*. 29th International Herpesvirus Workshop. Reno, SAD.
12. (2005) *Loss of Virulence but not Cell Tropism in a Recombinant Cytomegalovirus Lacking 44 Genes from Genome Ends Abrogates Reactivation from Latency but Allows Long-term Immunization*. 10th International Cytomegalovirus Workshop and 2nd International Betaherpesvirus Workshop. Williamsburg, VA, SAD.
13. (2005) *Vaccination and Cellular Immune Senescence in Primates*. 23rd Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. Portland, OR, USA.

Publikacije:

1. Čičin-Šain, L. – Brune, W. – Bubić, I. – Jonjić, S. – Koszinowski, U. H. *Vaccination of mice with bacteria carrying a cloned herpesvirus genome reconstituted in vivo*. J Virol. 2003. 77: 8249-8255.
2. Čičin-Šain, L. – Podlech, J. – Messerle, M. – Reddehase, M. J. – Koszinowski, U.H. *Frequent Coinfection of Cells Explains Functional In Vivo Complementation between Cytomegalovirus Variants in the Multiply Infected Host*. J. Virol. 2005. 79:9492-502.

Međunarodni tečajevi:

1998: Summer School of Immunology of the Scandinavian Society for Immunology. Copenhagen, Danska.

2002: Principles of Laboratory Animal Science and Methods of Animal Experimentation – Category B-FELASA. Heidelberg, Njemačka.

Kompjuterske aplikacije:

1. 2001: Baza podataka dijagnostičkih zahvata Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.
2. 2001: Baza podataka pacijenata obrađenih na Hitnom traktu Kliničkog bolničkog centra u Rijeci.

Ostalo:

Aktivno znanje engleskog, talijanskog i njemačkog jezika.

Referenti:

Stipan Jonjić, M.D., Ph.D.

Zavod za histologiju i embriologiju

Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka, Hrvatska

Ulrich Koszinowski, M.D., Professor and chairman

Max von Pettenkofer Institut, LMU München

Pettenkoferstr. 9a, 80336 München, Njemačka