

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Ivona Viduka

CITOPATOGENI UČINCI CITOMEGALOVIRUSNE INFEKCIJE I
IDENTIFIKACIJA MEMBRANSKIH ORGANELA UKLJUČENIH
U SKLAPANJE VIRIONA

Doktorski rad

Rijeka, 2025.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Ivona Viduka

CITOPATOGENI UČINCI CITOMEGALOVIRUSNE INFEKCIJE I
IDENTIFIKACIJA MEMBRANSKIH ORGANELA UKLJUČENIH
U SKLAPANJE VIRIONA

Doktorski rad

Mentor: prof. dr. sc. Pero Lučin

Rijeka, 2025.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE

Ivona Viduka

CYTOPATHOGENIC EFFECTS OF CYTOMEGALOVIRUS
INFECTION AND IDENTIFICATION OF MEMBRANE
ORGANELLES INVOLVED IN VIRION ASSEMBLY

Doctoral thesis

Mentor: Prof. Pero Lučin

Rijeka, 2025

Mentor rada: prof. dr. sc. Pero Lučin, dr. med.

Doktorski rad obranjen je dana _____ u/na _____,
pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____
2. _____
3. _____

Rad ima ____ listova.

UDK: _____

PREDGOVOR

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Istraživanje je provedeno u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Sekundarno omatanje i izlazak beta-herpesvirusa iz stanice“ (HRZZ; IP-201 9-04-3582) pod voditeljstvom prof. dr. sc. Pere Lučina i projekta „Citomegalovirusni odjeljak za sklapanje viriona“ (uniri-biomed-18-88), pod voditeljstvom prof. dr. sc. Pere Lučina, financiranog sredstvima Sveučilišta u Rijeci.

ZAHVALE

Prije svega želim zahvaliti svom mentoru, prof. dr. sc. Peri Lučinu na ukazanoj prilici za izradu doktorskog rada, kao i na ostalim prilikama koje mi je pružio tijekom ovoga puta, prenesenom znanju i podršci za vrijeme cijelog istraživanja. Prof. dr. sc. Lučin me uveo u fascinantan svijet stanične fiziologije i virologije te me svojim vodstvom usmjeravao na pravi put, na čemu ću mu uvijek biti iskreno zahvalna.

Hvala prof. dr. sc. Hani Mahmutefendić Lučin, prof. dr. sc. Gordani Blagojević Zagorac i izv. prof. dr. sc. Tamari Gulić na pomoći i dragocjenim savjetima tijekom provedbe istraživanja.

Veliko hvala i mojim kolegama iz naše grupe „petkom zajedno“ - Igoru, Maji, Silviji, Tihani, Nataliji, Ljerki, Hrvoju, Tatjani, Sanji te Elizabeti i Sari na pomoći u laboratoriju, smijehu, marendama i svim zajedničkim trenucima koji su mi uljepšali ovo iskustvo. Posebice hvala Marini, Alenu, Barbari i Vedrani na prijateljstvu, pomoći, podršci i razgovorima koji su mi pomogli sagledati probleme iz drugačije perspektive. Zahvaljujući vama, uredski dani će mi ostati zauvijek u najljepšem sjećanju. Zahvaljujem se i svim ostalim članovima Zavoda koji su mi na bilo koji način pomogli tijekom mog rada na Zavodu.

Posebno mjesto u ovoj zahvali i mom srcu imaju moje drage prijateljice, Ines i Tea iz Tri slova, Karla, Anamaria i Lea iz Posvuduša te Dora, Katarina i Valentina. Uvijek ste znale kada me treba nasmijati, ohrabriti ili jednostavno biti tu – hvala vam što ste vjerovale u mene čak i kada ja nisam.

Veliko hvala mojim nećacima i bratu na toplini i ljubavi zbog kojih su i oni teži trenutci bili lakši.

Neizmjerno sam zahvalna svojem Petru na ljubavi, razumijevanju i podršci. Hvala ti što si bio moj oslonac u trenucima sumnje i umora, i što si me uvijek podsjećao zašto ovo radim.

Na kraju, najveće hvala upućujem svojim roditeljima, na bezuvjetnoj ljubavi, odricanjima i vjeri u mene od samoga početka. Bez vaše podrške ovaj put ne bi bio moguć, a ja ne bih bila osoba koja danas jesam.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Citomegalovirusna (CMV) infekcija uzrokuje opsežnu reorganizaciju staničnog endosomalnog sustava i stvaranje viriona, pri čemu kapside u završnoj fazi sazrijevanja stječu ovojnica sekundarnim omatanjem. Identitet i nastanak membranskih odjeljaka uključenih u ovaj proces još uvijek nisu razjašnjeni. Cilj istraživanja je identificirati membranske organele uključene u sklapanje viriona mišjeg citomegalovirusa (MCMV) i sistematizirati citopatogene promjene MCMV infekcije. Posebno su istraženi sortirajući neksini (SNX) koji sudjeluju u endosomalnom sortiranju i formiranju tubula, a čija uloga može biti ključna u replikacijskom ciklusu MCMV-a i stvaranju odjeljka za sklapanje virusnih čestica (pre-AC).

Materijali i metode: Stanične linije mišjih fibroblasta Balb3T3 i NIH3T3 te NIH3T3 stanične linije s doksiciklin inducibilnom ekspresijom EGFP-mSNX27 i EGFP-Rab10 inficirane su divljim tipom MCMV-a ili nekom od njegovih mutanti: $\Delta m138$ -MCMV (uklonjen gen za vezanje Fc fragmenta imunoglobulina), C3X-GFP-MCMV (eksprimira GFP protein u ranoj fazi) i S-mCherry-SCP-MCMV (mali kapsidni protein obilježen proteinom mCherry). Digitalnom holotomografskom mikroskopijom (DHTM) su snimane i kvantificirane citopatogene promjene od 0-72 sati infekcije. Imunofluorescentnom mikroskopijom analizirano je 46 markera membranskih organela 48 sati nakon infekcije (hpi) virusom S-mCherry-SCP-MCMV te su provedene kolokalizacijske analize. Za 27 proteina iz endosomalnog sustava provedeno je tranzijentno utišavanje pomoću siRNA, a za stabilno utišavanje proteina SNX3 je proizvedena stanična linija pomoću shRNA. Učinak utišavanja staničnih proteina na biogenezu MCMV-a ispitan je imunofluorescentnom mikroskopijom, western blot analizom ili testom virusnih plakova.

Rezultati: Citopatogeni učinci infekcije MCMV-om u obliku zaokruživanja stanica bili su vidljivi unutar 6 hpi, a u kasnijoj fazi infekcije uočeno je stvaranje mjehurića na staničnoj membrani i stanična fuzija. DHTM analiza je pokazala promjenu morfoloških parametara stanica, uključujući prosječnu vrijednost refraktivnog indeksa koja se povećala do 72 hpi. Kolokalizacijska analiza kimeričnog virusnog proteina S-mCherry-SCP i proteina endosomalnih odjeljaka je ukazala na moguće Rab15 pozitivne membranske organele koje MCMV koristi za sekundarno omatanje i izlazak iz stanice. Rezultati deplecije proteina endosomalnog sustava su pokazali da supresija klatrina i Rab11 smanjuje produkciju infektivnih viriona, dok utišavanje EHD1, MICAL-L1 i PACSIN2 povećava produkciju. SNX3 doprinosi stvaranju pre-AC i sklapanju MCMV-a, a djeluje sekvencijalno sa SNX27, SNX4 i SNX17 duž reciklirajućeg puta u procesu proizvodnje i oslobađanju infektivnih viriona.

Zaključak: Citopatogeni učinci tijekom infekcije MCMV-om su dinamične prilagodbe stanice za potrebe virusne replikacije i odvijaju se kontinuirano tijekom litičke infekcije. Rezultati deplecije proteina endosomalnog sustava zajedno s kolokalizacijskim analizama ukazuju na potrebitost tubulacije u endosomalnim reciklirajućim odjeljcima za sekundarno omatanje MCMV viriona. SNX3 pridonosi mehanizmu koji kontrolira sklapanje i izlazak viriona te ima aditivni učinak s deplecijom ostalih sortirajućih neksina.

Ključne riječi: Citomegalovirus; Citopatogeni učinak, virusni; Sklapanje virusa; Sortirajući neksini

SUMMARY

Objectives: Cytomegalovirus (CMV) infection causes extensive reorganization of the cellular endosomal system and the formation of virions, whereby capsids in the final phase of maturation acquire an envelope through secondary envelopment. The identity and formation of membrane compartments involved in this process are unclear. The aim of this study is to identify membrane organelles involved in the assembly of murine cytomegalovirus (MCMV) virions and to systematize the cytopathogenic effects of MCMV infection. Sorting nexins (SNX) that participate in endosomal sorting and tubule formation, and whose role may be crucial in the MCMV replication cycle and the formation of the virion assembly compartment (pre-AC), were specifically investigated.

Material and methods: Balb3T3 and NIH3T3 murine fibroblast cell lines and NIH3T3 cell lines with doxycycline-inducible expression of EGFP-mSNX27 and EGFP-Rab10 were infected with wild-type MCMV or one of its mutants: Δ m138-MCMV (deleted gene for binding the Fc fragment of immunoglobulin), C3X-GFP-MCMV (GFP protein expression in the early phase) and S-mCherry-SCP-MCMV (small capsid protein tagged with mCherry protein). Cytopathogenic effects from 0-72 hours of infection were recorded and quantified by digital holotomographic microscopy (DHTM). 46 markers of membrane organelles were analyzed by immunofluorescence microscopy 48 hours after infection (hpi) with the S-mCherry-SCP-MCMV, and colocalization analyzes were performed. Transient siRNA knockdown was performed for 27 endosomal proteins, and a cell line was generated using shRNA for stable knockdown of SNX3. The effect of silencing cellular proteins on MCMV biogenesis was examined by immunofluorescence microscopy, western blot analysis, or standard viral plaque assay.

Results: Cytopathogenic effects in the form of cell rounding were visible within 6 hpi. In the later phase of infection, plasma membrane blebbing and cell fusion were observed. DHTM analysis showed changes in the morphological parameters of the cells, including the average value of the refractive index, which increased until 72 hpi. Colocalization analysis of the S-mCherry-SCP chimeric viral protein and endosomal compartment proteins indicated possible Rab15-positive membrane organelles used by MCMV for secondary envelopment and cell egress. The results of protein depletion of the endosomal system showed that the suppression of clathrin and Rab11 reduces the production of infectious virions, while the silencing of EHD1, MICAL-L1, and PACSIN2 increases the production. SNX3 contributes to pre-AC formation and MCMV assembly. It acts sequentially with SNX27, SNX4, and SNX17 along the recycling pathway in the production and release of infectious virions.

Conclusion: Cytopathogenic effects during MCMV infection are dynamic adaptations of the cell for the needs of viral replication and occur continuously during lytic infection. The results of endosomal system protein depletion and colocalization analyses indicate the necessity of tubulation in endosomal recycling compartments for the secondary envelopment of MCMV virions. SNX3 contributes to the mechanism that controls virion assembly and exit, and has an additive effect with the depletion of other sorting nexins.

Keywords: Cytomegalovirus; Cytopathogenic Effect, Viral; Sorting Nexins, Virus Assembly

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Herpesvirusi.....	1
1.2. Citomegalovirus	2
1.2.1. Patogeneza citomegalovirusne infekcije	3
1.2.2. Antivirusna terapija	4
1.2.3. Razvoj HCMV cjepiva	4
1.2.4. Građa citomegalovirusa.....	5
1.2.5. Replikacijski ciklus	7
1.3. Citopatogeni učinci virusa.....	10
1.3.1. Povezanost CPE s infektivnošću	10
1.3.2. Citopatogeni učinci citomegalovirusne infekcije	11
1.3.2.1. Nuklearne i citoplazmatske inkluzije	12
1.3.2.2. Remodeliranje citoskeleta	12
1.3.2.3. Stanično zaokruživanje.....	13
1.3.2.4. Stanična fuzija i agregacija.....	14
1.4. Reorganizacija membranskog sustava stanice domaćina u CMV infekciji.....	14
1.4.1. Citoplazmatski odjeljak za sklapanje viriona	15
1.4.2. Sekundarno omatanje i izlazak viriona.....	16
1.4.3. Membranske organele uključene u sklapanje viriona.....	20
1.4.4. Sortirajući neksini.....	22
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	25
3. MATERIJAL I METODE.....	26
3.1. Materijal	26
3.1.1. Kemikalije	26
3.1.2. Mediji za uzgoj kultura stanica i puferi	28
3.1.3. Laboratorijski pribor.....	30
3.1.4. Protutijela	32
3.1.4.1. Primarna protutijela.....	32
3.1.4.2. Sekundarna protutijela.....	35
3.1.5. Kratke RNA sekvence (siRNA) za utišavanje proteina.....	36
3.1.6. Plazmidi	37
3.1.7. Stanične linije	37
3.1.8. Mišji citomegalovirus.....	37
3.2. Metode.....	38
3.2.1. Uzgoj staničnih linija.....	38
3.2.2. Uzgoj hibridomskih linija i proizvodnja monoklonskih protutijela	38

3.2.3. Proizvodnja mišjih embrionalnih fibroblasta	38
3.2.4. Proizvodnja i određivanje titra virusa.....	39
3.2.5. Infekcija stanica mišjim citomegalovirusom.....	39
3.2.6. Utišavanje izražaja staničnih proteina pomoću malih interferirajućih RNA.....	40
3.2.7. Utišavanje izražaja staničnih proteina pomoću RNA sa strukturom ukosnice	40
3.2.8. Kvantifikacija unutar- i izvanstaničnih virusnih čestica testom virusnih plakova	40
3.2.9. Protočna citometrija.....	41
3.2.9.1. Detekcija stanica inficiranih s C3X-GFP-MCMV	41
3.2.9.2. Površinska ekspresija virusnog glikoproteina B/pM55	41
3.2.10. Imunofluorescentna i konfokalna mikroskopija	42
3.2.10.1. Analiza slika uzoraka dobivenih konfokalnom mikroskopijom.....	43
3.2.11. Western blot analiza	43
3.2.12. Izolacija RNA i kvantitativna lančana reakcija polimerazom	44
3.2.13. Proizvodnja BioID2 fuzijskih rekombinantnih MCMV-a.....	45
3.2.14. Promatranje živih stanica upotrebom digitalne holotomografske mikroskopije	45
3.2.15. Statistička obrada podataka	46
4. REZULTATI.....	47
4.1. Analiza citopatogenih učinaka citomegalovirusne infekcije korištenjem digitalne holotomografske mikroskopije (DHTM)	47
4.1.1. Uspostavljanje tehnologije DHTM.....	47
4.1.2. Vizualizacija citopatogenih učinaka.....	48
4.1.3. Kvantifikacija staničnih morfoloških parametara tijekom replikacijskog ciklusa MCMV	51
.....	56
4.2. Karakterizacija citoplazmatskog odjeljka s nakupljenim kapsidama	57
4.2.1. Praćenje fluorescentno obilježenih virusnih kapsida koristeći DHTM	58
4.2.2. Rab15 pozitivne membranske organele kao moguće mjesto sekundarnog omatanja i oslobađanja MCMV iz stanica	62
4.2.3. Ispitivanje uloge Rab15 u MCMV replikacijskom ciklusu	66
4.3. Detekcija staničnih proteina domaćina potrebnih za sekundarno omatanje i izlazak viriona	68
4.3.1. Dodavanje biljega BioID2-HA na C-terminalni dio proteina M55 onemogućuje replikaciju virusa	68
4.3.2. Identifikacija staničnih faktora uključenih u sekundarno omatanje korištenjem siRNA	70
4.4. Ispitivanje uloge SNX3 u replikacijskom ciklusu i sklapanju MCMV viriona.....	71
4.4.1. SNX3 se akumulira u unutarnjem pre-AC i perifernom membranskom sustavu inficiranih stanica u E fazi infekcije i u AC tijekom L faze.....	72
4.4.2. SNX3 se lokalizira na Rab10-PD koji ovisi o SNX27	75
4.4.3. SNX3 doprinosi širenju Rab10-PD	78
4.4.4. Deplecija SNX3 otežava sastavljanje viriona, ali ne smanjuje prinos virusa.....	83
4.4.5. Deplecija SNX3 korištenjem shRNA relokalizira virusni glikoprotein B.....	84
4.4.6. SNX3 pridonosi mehanizmu koji kontrolira sklapanje i izlazak viriona, zajedno s deplecijom ostalih sortirajućih neksina	85

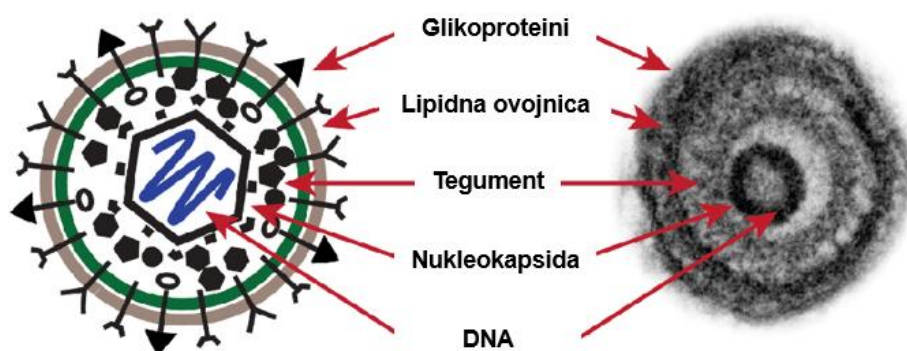
5. RASPRAVA.....	88
6. ZAKLJUČCI	97
7. LITERATURA	98
ILUSTRACIJE	125
Popis slika	125
Popis tablica	127
POPIS POKRATA	128
PRIVITAK A	131
Proizvodnja rekombinantnih MCMV-a M55-BioID2-HA i m06-BioID2-HA	131
Umnažanje i purifikacija rekombinantnih MCMV-a	133
ŽIVOTOPIS	134

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Virusi su jedinstveni u prirodi. Oni su najmanji od svih samoreplicirajućih organizama, a u svom najosnovnijem obliku se sastoje isključivo od malog segmenta nukleinske kiseline obavijene jednostavnom proteinskom ovojnicom. Nemaju vlastiti metabolizam nego su obligatorni, unutarstanični paraziti koji iskorištavaju i moduliraju staničnu mašineriju za vlastite svrhe, a inficiraju gotovo svaki organizam u prirodi [1].

1.1. Herpesvirusi

Obitelj Herpesvirusa (Herpesviridae) je obitelj velikih DNA virusa koja sadrži preko sto različitih vrsta virusa koji inficiraju domaćine u rasponu od ljudi do ptica i gmazova. Klasifikacija virusa kao člana obitelji Herpesviridae temelji se na zajedničkoj strukturi viriona: linearni, dvolančani genom DNA nalazi se unutar središnje jezgre, okružene ikosaedralnom (dvadesetostranom) kapsidom. Kapsida je okružena amorfnim proteinskim slojem, poznatim kao tegument, a zatim ovojnicom koja sadrži virusne glikoproteine [2]. Građa herpesvirusnog viriona je prikazana na slici 1.



Slika 1. Građa herpesvirusnog viriona. Virion je građen od četiri glavna elementa: dvolančane DNA, ikosaedralne kapside, proteinskog tegumenta koji može sadržavati virusne RNA i ovojnice koja sadrži glikoproteine. Komponente su ilustrirane na lijevoj strani, dok je desno prikazan virion slikan elektronskim mikroskopom. Prilagođeno prema [3].

Trenutno postoji osam herpesvirusa za koje se zna da mogu zaraziti ljude: herpes simpleks virus tip 1 (HSV-1) i tip 2 (HSV-2), humani citomegalovirus (HCMV), varicella zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV), herpesvirus povezan s Kaposijevim sarkomom (engl. *Kaposi's sarcoma herpes virus*, KSHV) i humani herpesvirus 6 (HHV-6) i 7 (HHV-7). Ovi virusi, zajedno s većinom ostalih koji inficiraju sisavce i ptice, su podijeljeni u tri potporodice: alfa-, beta- i gama-herpesviruse, na temelju bioloških svojstava. HSV-1, HSV-2 i VZV su članovi alfa-herpesvirusne potporodice, EBV i KSHV su članovi gama-herpesvirusne, dok su ostali virusi (HCMV, HHV-6A, HHV-6B i HHV-7) članovi beta-herpesvirusne potporodice [4]. Svi herpesvirusi uspostavljaju latentnu infekciju unutar specifičnog tkiva

[5]. Raspon domaćina, duljina replikacijskog ciklusa, vrsta stanica u kojoj se ostvaruje latencija te kliničke manifestacije bolesti variraju među članovima obitelji [4].

Članove potporodice alfa-herpesvirusa karakterizira promjenjiv raspon domaćina, kratki reproduktivni ciklusi, sposobnost brzog širenja u staničnoj kulturi i učinkovito uništavanje zaraženih stanica, te sposobnost uspostavljanja latentnih infekcija u senzornim ganglijima. Gama-herpesviruse karakterizira replikacija u epitelnim stanicama, uspostavljanje latencije u limfocitima te onkogeni učinak. Beta-herpesvirusi karakterizirani su ograničenim rasponom domaćina, dugim reproduktivnim ciklusom i sposobnošću uspostavljanja latentne infekcije u sekretornim žlijezdama, limforetikularnim stanicama i bubrežima. Imaju najvišu razinu evolucijske i genetske raznolikosti od tri spomenute potporodice. Postoje četiri roda unutar potporodice beta-herpesvirusa: citomegalovirusi, muromegalovirusi, roseolovirusi i proboscivirusi [2].

Svi ljudi postanu inficirani s jednim ili više herpesvirusa tijekom svojeg životnog vijeka. Herpesvirusi opstaju u domaćinu dulji period nakon primarne infekcije, ali teške bolesti i smrtnost u zdravih imunokompetentnih pojedinaca uzrokovanih alfa- ili gama-herpesvirusa su rijetki. Međutim, citomegalovirusna infekcija koja uključuje ključne organe živčanog sustava, hematološki, vaskularni i gastrointestinalni sustav može biti popraćena teškim ishodom bolesti kod naizgled zdravih osoba [6]. Antivirusni lijekovi inhibiraju replikaciju virusa, ali nemaju učinka na virus u latentnoj fazi stoga niti jedna od trenutnih terapija ne može trajno izliječiti bolest povezanu s herpesvirusima. Razvoj novih antiherpesvirusnih lijekova ili cjepiva, te primjena herpesvirusa kao onkolitičkih sredstava, vektora cjepiva ili genske terapije ovisi o razumijevanju interakcija između virusa i faktora stanice domaćina [7].

1.2. Citomegalovirus

Citomegalovirus (CMV) je virus iz roda Herpesvirusa, reda Herpesvirales, obitelji Herpesviridae, iz potporodice Betaherpesvirinae [8]. Prenosi se izravnim ili neizravnim kontaktom s ljudskim izlučevinama kao što su urin, slina, vaginalni sekret, sjemenja tekućina, majčino mlijeko, krvni pripravci i kroz presađene organe. Sekrecija virusa je najduža kod primarne infekcije i vodeći je uzrok kongenitalne infekcije. Transmisija s majke na fetus nakon primarne infekcije se javlja u oko 30% slučajeva tijekom prvog tromjesečja i preko 70% u trećem tromjesečju [9].

Stroga specifičnost CMV-a za određenu vrstu isključuje eksperimentalnu infekciju životinja humanim citomegalovirusom. Zbog toga se citomegalovirusi glodavaca (npr. miševa, štakora i zamoraca) i rezus citomegalovirusi koriste kao modelni sustav za razumijevanje HCMV bolesti i za odgovor na osnovna pitanja koja se ne mogu lako riješiti u kliničkim ispitivanjima. Među navedenima, mišji citomegalovirus (engl. *murine cytomegalovirus*, MCMV) je daleko najbolje proučen. MCMV kao model za HCMV infekciju je odigrao golemu ulogu u otkrivanju brojnih imunoloških gena i razjašnjavanju patogeneze CMV infekcije [10].

1.2.1. Patogeneza citomegalovirusne infekcije

HCMV je vodeći uzrok kongenitalnih infekcija i ističe se svojim značajnim medicinskim i javnozdravstvenim utjecajem [11]. HCMV inficira većinu ljudi širom svijeta, obično bez izazivanja očitih simptoma. Privukao je medicinsku pozornost kada su karakteristične inkluzije oblika sovinog oka uočene u stanicama u slučajevima mrtvorodenčadi 1910. godine te ponovno 1964. godine među pacijentima koji su podvrgnuti pionirskim transplantacijama organa [12,13]. Razlikujemo tri različita podtipa infekcije: primarna infekcija koja nastaje kada se osoba bez imuniteta prvi put zarazi. Nakon toga virus uspostavlja latenciju iz koje se može reaktivirati (drugi tip infekcije). Treći tip infekcije naziva se reinfekcija i događa se kada kontakt sa zaraznom osobom rezultira superinfekcijom kod osobe koja je već bila zaražena, unatoč postojanju prirodnog imuniteta [14]. Bilo koji od ovih triju podtipova infekcije može zakomplicirati trudnoću, zbog čega je HCMV najčešći uzrok kongenitalne infekcije [15]. Također je najčešća i najozbiljnija oportunistička infekcija nakon transplantacije solidnih organa, hematopoetskih matičnih stanica i kod osoba zaraženih s virusom humane imunodeficijencije (HIV) [14,16–18].

Infekcija HCMV-om obično ne izaziva simptome, osim povremenih slučajeva infektivne mononukleoze jer snažan imunološki odgovor na HCMV sprječava razvitak visoke razine virusa potrebne za izazivanje krajnjeg oštećenja organa (engl. *end-organ disease*, EOD) koja se javlja kod imunokompromitiranih osoba. Međutim, unatoč odsutnosti očitih simptoma, postoje dokazi da zaražene osobe mogu imati dugoročne negativne posljedice povezane s indukcijom kroničnog upalnog imunološkog odgovora [19].

Najčešće manifestacije CMV bolesti su vrućica, malaksalost, leukopenija, bolni zglobovi i makularni osip. Primarna CMV infekcija kod pacijenata s transplantiranim solidnim organima dosljedno se povezuje s disfunkcijom transplantiranog organa — oštećenjem bubrega kod primatelja bubrežnog transplantata, hepatitisom nakon transplantacije jetre, koronarnom stenozom ili odbacivanjem transplantata kod pacijenata s transplantiranim srcem te pneumonitisom nakon transplantacije pluća ili srca i pluća, a još je vrijedno spomenuti pankreatitis, miokarditis, encefalitis i ostale EOD [20].

Kongenitalna citomegalovirusna infekcija (engl. *congenital cytomegalovirus*, cCMV) može zahvatiti oko 1% svih novorođenčadi diljem svijeta kao rezultat primarne ili ponavljajuće infekcije ljudskim citomegalovirusom. Dok je oko 90% novorođenčadi pogođene cCMV-om asimptomatsko pri rođenju, preostalih 10% ima simptome, često povezane s neurološkim razvojnim oštećenjima i gubitkom sluha [21]. Najčešći znakovi simptomatske kongenitalne CMV infekcije u novorođenčadi su žutica, petehije, hepatosplenomegalija i mikrocefalija [1,22]. Otprilike 5-15% asimptomatskih novorođenčadi kasnije razvije dugotrajne posljedice, pri čemu je ranije spomenuti gubitak sluha najčešća manifestacija. Dugoročni rizik od kognitivnog i razvojnog kašnjenja nije sustavno proučavan, međutim neka istraživanja su pokazala određeni stupanj kognitivnog kašnjenja ili oslabljenih funkcionalnih sposobnosti kod dugoročnog praćenja asimptomatske dojenčadi [22].

1.2.2. Antivirusna terapija

Antivirusni lijekovi za liječenje HCMV-a se koriste kao profilaktička terapija te kao lijekovi za već započetu bolest [23]. Trenutno dostupni antivirusni lijekovi ograničeni su na virostatske inhibitore polimeraze (ganciklovir, njegov oralni prolijevak valganciklovir, cidofovir i foskarnet) čija je upotreba zabranjena u trudnica zbog njihove toksičnosti. Navedeni inhibitori su ključne molekule za smanjenje morbiditeta i smrtnosti povezane sa CMV infekcijom nakon transplantacije. Međutim, neutropenija ograničava učinkovitost ganciklovira i valganciklovira, a ova hematološka toksičnost sprječava njihovu primjenu kao profilaksu kod primatelja transplantacije matičnih stanica. Cidofovir i foskarnet izrazito su nefrotoksični što onemogućava njegovu upotrebu u rutinskoj kliničkoj praksi. Drugo ograničenje ovih molekula je pojava rezistencije, koja je potaknuta produljenim tretmanima kod izrazito imunokompromitiranih pacijenata i primjenom nižih doza zbog oštećenja bubrega [19,24].

Od nedavno se koriste dva nova protuvirusna lijeka visoke specifičnosti i niske toksičnosti, letermovir i maribavir. Letermovir je odobren 2017. godine od strane FDA (Američke agencije za lijekove), a inhibira komponentu terminalnog kompleksa virusne DNA (pUL56) koja je odgovorna za cijepanje i pakiranje DNA [25]. Visoko specifičan je za virus i samim time nije jako toksičan. Koristi se kao profilaksa kod pacijenata s transplantiranim hematopoetskim matičnim stanicama s visokim rizikom od CMV infekcije [26]. Maribavir je odobren 2021. godine za liječenje odraslih i djece s post-transplantacijskom CMV infekcijom koja je otporna na uobičajene antivirusne lijekove. Maribavir inhibira pUL97 virusnu kinazu [27]. Međutim, rezistencija na navedene lijekove je već opisana [28–31], zbog čega je ključno nastaviti razvijati nove terapije.

Kao profilaksa su još dostupni hiperimuni imunoglobulini (engl. *hyperimmune immunoglobulins*, CMV-HIG) [32]. CMV-HIG se dobivaju pročišćavanjem imunoglobulinskih produkata iz plazme odraslih ljudi koji pokazuju visoku koncentraciju protu-HCMV protutijela. U SAD-u se koristi Cytogam® kao profilaksa kod transplantacije srca, jetre, pluća, bubrega i gušterače. Cytotect CP® je odobren u Europi kao profilaksa kod pacijenata tretiranih s imunosupresivima i transplantacijom solidnih organa [24].

1.2.3. Razvoj HCMV cjepiva

Cjepiva protiv HCMV-a se još uvijek razvijaju te za sada nije dostupno nijedno licencirano cjepivo. Iako se godinama pokušava proizvesti, točnije od 1970-ih [33], uspješan kandidat još nije razvijen vjerojatno zbog slabog poznavanja imunoloških odgovora potrebnih za zaštitu od HCMV-a [34]. Budući da prirodni imunitet nije uvijek dovoljna zaštita od ponovne infekcije HCMV-om ili kongenitalnog prijenosa, cilj uspješnog HCMV cjepiva biti će potaknuti imunitet koji nadmašuje onaj stečen prirodnom infekcijom [35]. HCMV cjepiva koja su napredovala do kliničkih ispitivanja mogu se kategorizirati kao podjedinična cjepiva (izražavaju genski produkt/e), cjepiva koristeći odgovarajući izvor imunogena (protein, DNA ili RNA) izraženog *de novo* ili u kontekstu vektora ekspresije, ili cjepiva

s cijelim virusom (atenuirani virusi ili replikacijski defektni, DISC virusi – engl. *disabled single cycle*). Većina kandidata za podjedinčna cjepiva usmjerena su na rekombinantni glikoprotein B (gB), glavni virusni fuzogen [36–38], koji je dominantni T-stanični imunogen u kontekstu infekcije [39]. Osim gB-a (označava se još i kao pUL55 za HCMV) koji posreduje ulazak virusa u stanicu fuzioniranjem virusne ovojnice sa staničnom membranom, podjedinčna cjepiva uključuju trimerski kompleks (engl. *trimeric complex*, TC) koji se sastoji od glikoproteina H, L i O (gH, gL, gO) i pentamernog kompleksa (engl. *pentameric complex*, PC) koji sadrži gH/gL zajedno s pUL128, pUL130 i pUL131A. TC i PC su u interakciji s receptorima stanične površine koji započinju membransku fuziju s gB-em [35,40], ali nijedan pristup nije uspio postići krajnju točku u kliničkim ispitivanjima [35]. Nedavni uspjeh strukturalno modificiranih virusnih fuzijskih proteina u razvoju cjepiva protiv RSV-a (respiratorni sincicijski virus) [41] i SARS-CoV-2 [42,43] otkriva važnost dizajniranja cjepiva temeljenog na strukturi HCMV gB-a i njegovih partnera pri ulasku u stanicu [35]. Nekoliko studija o mRNA HCMV cjepivu koje kodira gB/pUL55 i PC su trenutno u trećoj fazi kliničkih ispitivanja, a rezultati se očekuju tijekom 2025. godine [44,45].

1.2.4. Građa citomegalovirusa

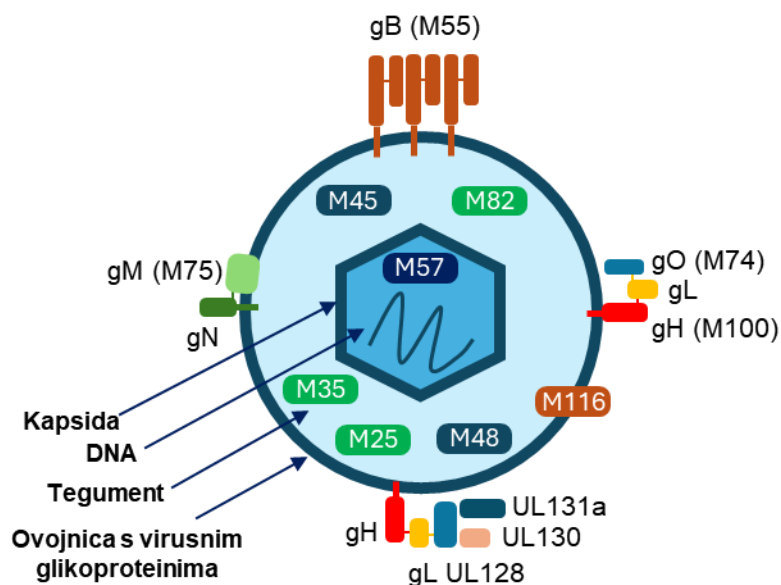
Virion HCMV-a je promjera otprilike 230 nm i sastavljen je od ikosaedarske nukleokapside, okružene tegumentom i lipidnom ovojnicom koja nosi veliki broj glikoproteina kodiranih virusom. Genom HCMV-a sastoji se od linearne, dvolančane molekule DNA (236 kb), spadajući u najveće među ljudskim herpesvirusima [46]. Genom MCMV viriona je velik 230 kb, a njegova građa je vrlo slična HCMV virionu [47,48]. Većina MCMV gena i proteina je označena na temelju njihovih homolga u HCMV [47,49].

HCMV kapsida je sastavljena od četiri vrste proteina (pUL46, pUL80.5, pUL85, pUL104) koji su organizirani u 162 kapsomere (150 heksona, 11 pentona i jedan portalni kompleks) i 320 tripleksa smještenih između kapsomera [50,51]. Portalni kompleks (pUL104) pruža kanal neophodan za isporuku virusnog genoma u unutrašnjost kapside. Kapsida postaje nukleokapsida nakon što je potpuni genom virusa umetnut i odcijepljen, a portal zatvoren [50]. Kapsomere su sačinjene od velikog kapsidnog proteina (engl. *major capsid protein*, MCP) koji je ujedno i najveća komponenta kapside. Drugi najzastupljeniji je mali kapsidni protein (engl. *small capsid protein*, SCP) s 900 molekula po kapsidi koji ukrašava vrhove MCP [3]. SCP je neophodan za beta-herpesviruse tj. HCMV zbog svog utjecaja na MCP, dok za alfa- i gama-herpesviruse nije [52–55]. Sklapanje kapsida započinje u citoplazmi nakon čega slijedi importacija u jezgru posredovana nuklearnim lokalizacijskim signalima u određenim proteinima kapside [52,56,57]. Tijekom sklapanja u jezgri mogu se razlikovati tri vrste kapside (A-, B- i C-tip) koje su karakteristične za replikaciju i fazu u morfogenezi viriona. Kapsidama A-tipa nedostaju potporni proteini (engl. *scaffold proteins*) i virusna DNA, B-tip kapsida sadrži potporne proteine, ali bez virusne DNA. C-kapside sadrže i potporne proteine i DNA te predstavljaju prave nukleokapside za koje

se pretpostavlja da sudjeluju u procesu sazrijevanja [58,59]. Zrele nukleokapside sadrže jednu kopiju dvolančane DNA virusnog genoma [60].

Između kapside i virionske ovojnice nalazi se skup proteina koji se naziva tegument. Tegument od približno 50 nm uključuje otprilike 38 virusnih tegumentnih proteina [3,50,61,62]. Proteini tegumenta su važni za mnoge procese tijekom infekcije, uključujući rastavljanje viriona, regulaciju transkripcije, modulaciju staničnih odgovora i sazrijevanje viriona. Tegumentni protein pUL83 (pp65) je najzastupljeniji protein u HCMV virionu. Iako nije potreban za replikaciju, pp65 je važan za uspostavljanje infekcije jer pojačava aktivaciju glavnog promotora neposredno rane faze i igra ključnu ulogu u regrutiranju proteina tijekom sklapanja. Protein pUL48 je najveći i drugi najzastupljeniji tegumentni protein. On je ključan za replikaciju i sudjeluje u oslobađanju virusne DNA iz kapside. pUL32 (pp150) je treći najzastupljeniji tegumentni protein i neophodan za virusnu replikaciju te stabilizaciju kapsida tijekom sazrijevanja viriona. pUL103 je tegumentni protein niske zastupljenosti koji ima važnu ulogu u kasnoj fazi HCMV infekcije, uključujući biogenezu citoplazmatskog virusnog odjeljka za sklapanje virusnih čestica (engl. *cytoplasmic virion assembly compartment*, cVAC), širenje virusa od stanice do stanice te sazrijevanje viriona [3]. cVAC se često skraćeno označava kao odjeljak za sklapanje viriona (AC) te ga tako nazivamo i ovom radu. Većinski dio tegumentacije se događa u citoplazmi, unutar AC-a, a mali dio tegumenta se stječe u jezgri [63]. U procesu sekundarnog omatanja, tegumentirane kapside se najvećim dijelom obavijaju ovojnicom pupanjem u trans-Golgi mrežu (engl. *trans-Golgi network*, TGN) domaćina ili u blisko povezani stanični odjeljak, čija struktura i podrijetlo još uvijek ostaju nerazjašnjeni. Procjenjuje se da je ova stečena lipidna dvoslojna membrana debela 10 nm i sadržava najmanje devet virusnih glikoproteina: gB (pUL55), gM (pUL75), gH (pUL100), gL (pUL115), gO (pUL74), gN (pUL73), pUL128, pUL130 i pUL131 [61]. Navedeni glikoproteini su prvenstveno potrebni za vezivanje za stanice domaćina, ulazak virusa i u nekim slučajevima izbjegavanje imunološkog sustava sekvestracijom kemokina [64]. Široki stanični tropizam HCMV-a (epitelne/endotelne stanice, fibroblasti, monociti/makrofagi, stanice glatkih mišića, neuroni, stromalne stanice i hepatociti) posljedica je dva glikoproteinska kompleksa odgovornih za interakciju sa specifičnim receptorima stanica domaćina [65,66]. Trimer gH/gL/gO potreban je za infekciju svih tipova stanica i poznato je da se veže za receptor za faktor rasta deriviran od trombocita alfa koji je izražen na fibroblastima [67]. Pentamerni kompleks gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A potreban je za ulazak virusa u epitelne, endotelne i mijeloidne stanice [68,69]. CMV glikoproteinski kompleksi još uključuju gB/pUL55 oligomer i gM/gN dimer [70]. gB, gH i gL su konzervirani u svim herpesvirusima, čine osnovni fuzijski mehanizam i potrebni su za sve korake vezivanja i ulaska virusa u stanicu [71,72]. gB/pUL55 je potreban za ulazak u stanicu putem fuzije i širenje od stanice do stanice [73]. Iako je gM/gN heterodimer najzastupljeniji glikoproteinski kompleks, najmanje je istražen, ali je visoko konzerviran među herpesvirusima što ukazuje na njegovu ulogu u virusnoj patogenezi [1]. Tegument i ovojnica sadrže dodatne, manje zastupljene proteine kodirane virusom i stanicom domaćina, kao i

fosfolipide, poliamine i male RNA [57]. MCMV također sadrži navadne glikoproteine koji su prikazani na slici 2, zajedno s najvažnijim proteinima tegumenta.



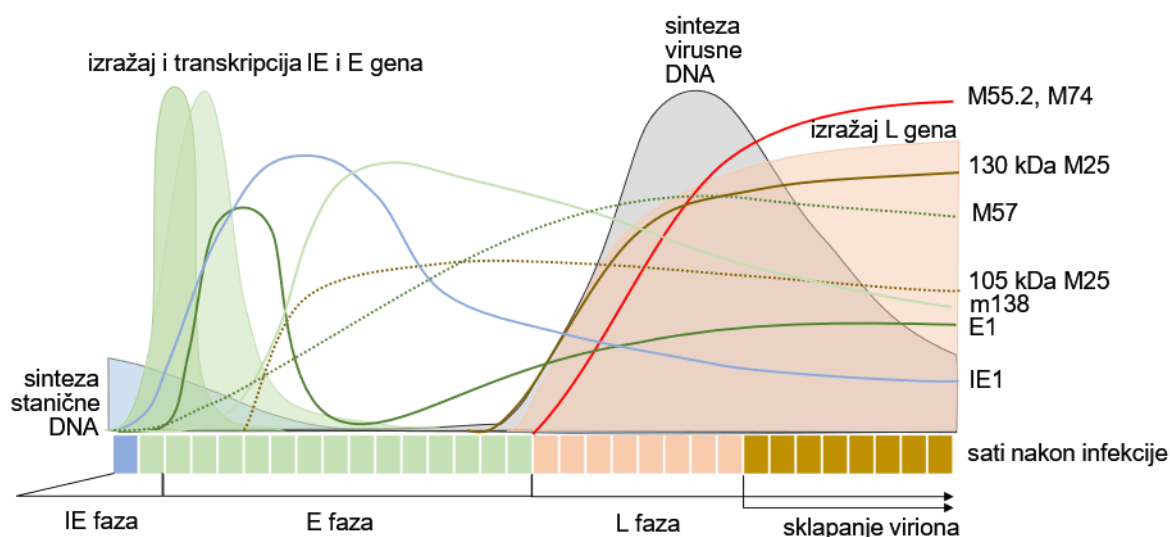
Slika 2. Organizacija MCMV viriona. Proteini kapside sadrže nekoliko proteina uključenih u replikaciju virusne DNA kao što je M57. Kapsida je okružena tegumentom koji sadrži različite proteine i ovojnicom s glikoproteinskim kompleksima. Prikazani proteini su identificirani masenom spektrometrijom izoliranih viriona [74]. Preuzeto iz projektnog prijedloga HRZZ-IP-2019-04-3582 „Sekundarno omatanje i izlazak beta-herpesvirusa iz stanice“ [75].

1.2.5. Replikacijski ciklus

Kod CMV-a razlikujemo litičku replikaciju tijekom koje se proizvode novi infektivni virioni koji se mogu prenijeti na druge stanice, a događa se u epitelnim i endotelnim stanicama. S druge strane virus može uspostaviti latenciju u monocitima tijekom koje se ne proizvode infektivni virioni. Kao odgovor na različite podražaje, virus se može reaktivirati do litičke replikacije u podskupu latentno zaraženih stanica [50,76]. Iako se CMV replicira u velikom broju stanica, replikacijski ciklus uvelike je proučavan u fibroblastima zbog njihove relativne lakoće izolacije i razmnožavanja u kulturi, kao i sposobnosti podržavanja ekspresije virusnih gena i proizvodnje virusnog potomstva. Litička replikacija se može podijeliti u nekoliko faza: ulazak, ekspresija litičkih gena i replikacija genoma, primarno omatanje i izlazak iz jezgre, tegumentacija, sekundarno omatanje, izlazak i oslobađanje viriona [50]. Virusni ulazak se odvija u sedam različitih koraka: (1) vezanje virusnog glikoproteina na heparan sulfat glikozaminoglikane, (2) vezanje posredovano virusnim glikoproteinima na specifične receptore stanične površine, (3) ulazak putem (3a) endocitoze/mikropinocitoze ili (3b) fuzijom glikoproteina B (gB) sa staničnom membranom (engl. *plasma membrane*, PM), (4) oslobađanje kapside u citoplazmu nakon spajanja s (4a) endosomalnom membranom ili (4b) PM, (5) transport kapside prema jezgri posredovan mikrotubulima, (6) pristajanje (engl. *docking*) na nuklearnu poru, i (7) istiskivanje virusnog genoma kroz portal u jezgri [77].

Tijekom replikacijske infekcije *in vitro*, virusni geni se ekspimiraju u vremenskoj kaskadi od tri faze: neposredno-rani (engl. *immediate-early*, IE), rani (engl. *early*, E) i kasni (engl. *late*, L) geni. U ljudskim fibroblastima inficiranim HCMV-om, IE događaji traju od 6-24 sata nakon infekcije (engl. *hours post infection*, hpi), E događaji 12-48 hpi, a L događaji 48-96 hpi, nakon čega slijedi sklapanje i oslobađanje zaraznih viriona od 72-96 hpi [78]. IE1 događaji označavaju prepisivanje IE1 gena za kontrolu ekspresije narednih gena i replikacije virusa. Tijekom E događaja dolazi do reorganizacije staničnih struktura, sinteze proteina koji kontroliraju imunološki odgovor domaćina i sinteze virusne DNA. L događaji označavaju proces proizvodnje strukturnih komponentni viriona i njihovo sklapanje [79]. U fibroblastima zaraženim MCMV-om, ciklus je puno kraći, a prvi virusni potomci nastaju 24-30 hpi [80]. IE1 faza je ograničena od 1-2 hpi, E faza od 2-16. Nakon 16 hpi započinje L faza sa sintezom virusne DNA i transkripcijom velikog broja kasnih gena [81], kao što je prikazano na slici 3.

Iako je uobičajena podjela replikacijskog ciklusa betaherpesvirusa u tri faze (IE, E i L), nedavne analize pojave virusnih transkripata uporabom visoko-protočnih tehnologija pokazuju da se ciklus HCMV-a može podijeliti u sedam [82], a ciklus MCMV-a u šest [48] vremenskih faza.



Slika 3. Organizacija MCMV životnog ciklusa i ekspresija kinetike MCMV gena. U odnosu na HCMV, MCMV ima značajno kraći replikacijski ciklus i koristi se kao modelni sustav. Ciklus možemo podijeliti u tri faze: neposredno ranu (IE), ranu (E) i kasnu (L) fazu. Ekspresija virusnih proteina IE1 faze (pIE1) započinje unutar dva sata od infekcije nakon koje slijedi E faza (pE1, pm138, pM25 105 kDa) te u konačnici L faza (pM57 i pM25 130 kDa) kada započinje i replikacija virusne DNA. Tijekom rane faze se reorganiziraju stanične strukture, a u kasnoj fazi se odvija proces sklapanja viriona. Prilagođeno prema [83].

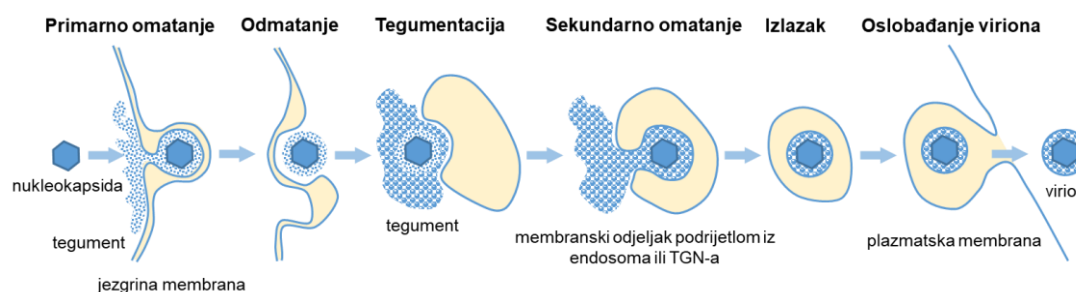
IE geni izražavaju se u prvom satu MCMV infekcije nakon čega slijedi izražaj E gena u najmanje dva transkripcijska vala [83]. Većina proteina rane faze se postepeno nakuplja do početka sinteze virusne DNA. Rani geni imaju važnu ulogu u regulaciji IE i kasne transkripcije, sintezi virusnog genoma, regulaciji staničnog ciklusa i izbjegavanju stečenog imunološkog odgovora. Mnogi IE i E proteini se lokaliziraju u nuklearnim replikacijskim odjeljcima (engl. *replication compartment*, RC) gdje

se nakupljaju DNA i RNA [77]. Poremećaj ranih gena obično rezultira značajnim nedostacima sinteze DNA, ekspresije kasnih gena i produkcije virusa [84,85].

Sinteza DNA HCMV-a događa se u jezgri počevši 14 do 16 sati nakon infekcije *in vitro*. Nakon ulaska u jezgru, linearni dvolančani genom se cirkularizira i lokalizira uz jezgrina tjelešca u kojima se nakuplja protein promijelocitne leukemije (engl. *promyelocytic leukemia protein-nuclear bodies*, PML-NB) [86,87]. Ova mjesta čine prerekuplacijska žarišta gdje se iniciraju virusna transkripcija i sinteza genoma kako bi se formirali RC [88]. U stanicama koje podupiru visoku razinu replikacije, nakupljanje virusnih genoma može u konačnici rezultirati spajanjem nekoliko RC u jedan koji ispunjava jezgru [77,89,90].

Ekspresija kasnih gena dostiže vrhunac nakon početka replikacije virusne DNA. Kasni geni se sastoje od gena sa strukturalnom ulogom u sastavljanju i sazrijevanju viriona. Svi kapsidni proteini su kodirani kasnim genima, a njihova ekspresija je inhibirana ako je sinteza virusne DNA blokirana. Nasuprot tome, otprilike polovina gena koji kodiraju tegument se eksprimiraju s IE, E ili E-L kinetikom, ukazujući na nestrukturalne uloge tegumenta [77,91].

Nakon pakiranja virusne DNA u kapside, slijedi sklapanje virusnih čestica koje se sastoji od primarnog i sekundarnog omatanja (slika 4). U jezgri započinje tegumentacija povezivanjem SCP-a na heksonima i pentonima s pp150 [59]. Smatra se da mrežasti pp150 tegument stabilizira kapside koje sadrže DNA protiv visokog pritiska koji je uzrokovan inkapsidacijom velikog genoma u relativno mali prostor [59,92]. Primarno omatanje je proces tijekom kojeg djelomično tegumentirane kapside stječu ovojnica pupanjem u unutarnju nuklearnu membranu [93,94]. Ova ovojnica se gubi procesom odmatanja koji uključuje fuziju s vanjskom jezgrenom membranom dok kapsida ulazi u citoplazmu. Tegumentacija se nastavlja u citoplazmi gdje se kapside ponovno omataju, ali na citoplazmatskim membranskim organelama unutar odjeljka za sklapanje viriona (sekundarno omatanje) [95–97]. Za translokaciju u AC je odgovoran tegumentni protein pp150 koji stupa u interakciju s različitim proteima [98,99]. Nakon sekundarnog omatanja, novoproducirana čestica je zreli virion koji migrira prema staničnoj membrani te se oslobađa iz stanice za prijenos infekcije [77].



Slika 4. Faze proizvodnje beta-herpesvirusa u zaraženim stanicama. Nakon pakiranja novostvorene virusne DNA u kapside u prostoru jezgre, djelomično tegumentirane izlaze iz jezgre omatanjem s unutarnjom membranom jezgre (primarno omatanje) nakon čega slijedi odmotavanje na vanjskoj membrani jezgre. Kapside migriraju u citoplazmu gdje se ugrađuju u matriks citoplazmatskog tegumenta te se omataju na membranskom odjeljku koji potječe vjerojatno od endosoma ili TGN-a (sekundarno omatanje). Omotani virioni migriraju prema staničnoj membrani te se oslobađaju iz stanice. Prilagođeno prema [100].

Kroz svaku od navedenih faza replikacijskog ciklusa, virusi koriste mnoštvo komponenti stanice domaćina koje modificiraju kako bi sklapanje viriona bilo što učinkovitije. Jedna od njih je remodeliranje membranskog sustava stanice u cilju stvaranja ranije spomenutog AC-a, a ostale uključuju promjenu unutrastaničnog prometovanja i promjene u metaboličkim putevima. Navedene promjene tijekom infekcije se odražavaju na samu morfologiju stanice.

1.3. Citopatogeni učinci virusa

Mnogi virusi, uključujući HCMV, uzrokuju jedinstvene morfološke promjene u zaraženim stanicama, koje su zajednički poznate kao citopatogeni ili citopatski učinci (engl. *cytopathic effects*, CPE). Stanično zaokruživanje najvidljiviji je element CPE-a, iako drugi povezani aspekti uključuju utjecaj na volumen stanice, formiranje citoplazmatskih ili nuklearnih inkluzijskih tijela, fuziju ili agregaciju stanica, gubitak adhezije i lizu stanice [101]. Navedene promjene zaraženih stanica rezultiraju stvaranjem plakova u staničnom monosloju kod *in vitro* uzgoja.

CPE bi mogli biti pasivna nuspojava virusne infekcije koja je posljedica staničnog stresa koji je uzrokovan masovnom proizvodnjom virusnih čestica. Međutim, postojanje necitopatskih virusa (npr. virus bjesnoće) ukazuje na to da replikacija virusa nije nužno povezana s morfološkim promjenama ili citotoksičnošću [101,102]. Ovo sugerira da stvaranje CPE-a predstavlja aktivni proces koji pridonosi dobrobiti virusu. Neki virusi su inherentno necitopatski jer su njihovi replikacijski procesi relativno benigni, dok drugi aktivno održavaju necitopatsko stanje isključivanjem proapoptotičkih mehanizama, aktivacijom antiapoptotičkih mehanizama ili induciranjem alternativne transkripcije koja čuva virusni genom bez proizvodnje viriona [103,104]. S druge strane, neki virusi su pasivno citopatogeni zbog virusnog replikacijskog ciklusa koji oštećuje stanicu zbog visoke ekspresije proteina i sklapanja viriona. Aktivno citopatogeni virusi induciraju ekspresiju proapoptotičkih molekula [105,106].

1.3.1. Povezanost CPE s infektivnošću

CPE su dijagnostičko obilježje pojedinačnog virusa i poznato je da se pojavljuju u staničnim kulturama [107]. CPE mogu predvidjeti klinički ishod *in vivo*. Primjeri uključuju pogoršanje steatoze uzrokovane virusom hepatitisa C, apoptozu u trigeminalnom gangliju uzrokovanu HSV-om ili aseptični meningitis, paralizu, kardiomijelitis i herpanginu uzrokovanu enterovirusima [108–111]. Regulacija staničnog volumena utječe na proliferaciju stanica i apoptozu, a njegova promjena u patologiji pridonosi poremećajima kao što su oslabljena funkcija jetre, dijabetička ketoacidoza, hiperkatabolizam i anemija srpastih stanica [112].

Priroda i opseg CPE ovisi o virusu, tipu stanica, urođenom imunom odgovoru domaćina i progresiji infekcije. Različite razine CPE koreliraju s količinom novo-sintetiziranih virusnih čestica [113]. U stanicama zaraženim adenovirusom, lizirane stanice mogu otpustiti velike količine viriona nakon iskazivanja jakih CPE, dok trajno zaražene stanice proizvode male količine viriona i imaju slabo

iskazane CPE [114,115]. Ipak, opseg CPE-a nije uvijek u korelaciji s produkcijom viriona, jer stanice koje su podvrgnute programiranoj staničnoj smrti imaju snažan CPE pri niskom virusnom titru [116–118].

Unatoč prediktivnoj prirodi CPE za kliničke i biološke infekcije, nedostaju vremenski mapirane 3D analize CPE uzrokovanih virusom. Jedan od radova opisuje korištenje 3D digitalne holotomografske mikroskopije (DHTM) za proučavanje CPE induciranih od strane virusa vakcinije (VACV), herpes simpleks virusa tip 1 i rinovirusa [111]. DHTM omogućava snimanje živih, neobilježenih stanica u stvarnom vremenu mjereći indeks loma (engl. *refractive index*, RI) i izračunavajući njegov gradijent (engl. *refractive index gradient*, RIG) [119–121]. RI je povezan sa staničnom masom i njezinom distribucijom što sugerira da će svaka biofizička promjena stanične morfologije potaknuti promjene u RI vrijednostima stanice [122,123]. Promjene RIG-a pokazale su se specifičnima za vrstu virusa, što ukazuje na to da DHTM može učinkovito razlikovati različite virusne infekcije i njihove pripadajuće citopatske učinke. Ovi rezultati pružaju uvid u mehanizme kojima virusi induciraju citopatske učinke, čije je razumijevanje ključno za razjašnjavanje načina na koji virusi manipuliraju procesima stanica domaćina radi svoje replikacije i širenja [111].

1.3.2. Citopatogeni učinci citomegalovirusne infekcije

Histopatološke promjene karakteristične za citomegalovirus (povećane stanice s intranuklearnim inkluzijama) su prvi put uočene 1881. godine [124,125]. 1904. godine su ponovno opisane CMV inkluzije, ali su pogrešno smatrane protozoama (engl. *protozoan-like cells*) u histološkim presjecima jetre, pluća i bubrega mrtvorodenčeta [126] (slika 5). Goodpasture i Talbot su 1921. godine skovali termin „citomegalija“ kada su opisali slične nalaze kod preminulog novorođenčeta starog šest tjedana nakon obavljene autopsije [127]. Tijekom iste godine, Lipschutz je predložio virusnu etiologiju tih nalaza kada je primijetio sličnost intranuklearnih inkluzija s onima pronađenima kod infekcija herpes virusom [128]. 1950. godine, Wyatt je uveo izraz „citomegalična inkluzijska bolest“ (engl. *cytomegalic inclusion disease*) kako bi opisao generaliziranu kongenitalnu infekciju s citomegaličnim stanicama i tipičnim intranuklearnim inkluzijama pronađenima u više organa [129]. 1956. je Smith izvijestila o uzgoju HCMV-a u ljudskim staničnim kulturama tkiva [130]. 1960. godine je predložen termin „citomegalovirus“ [131] čiji naziv dolazi od grčkih korijena *cyto* i *megalo*, što znači „velike stanice“ i time odražava citopatske učinke virusa [132]. Od tada, opsežna istraživanja svojstava, epidemiologije i serološke dijagnoze CMV-a potvrdila su važnost ovog virusa u kongenitalnim infekcijama [133].

Od CPE kod HCMV infekcije su do sada opisani stanično zaokruživanje, utjecaj na stanični volumen, citoplazmatska i jezgrena nuklearna tjelešca (inkluzije), stanična fuzija ili agregacija, gubitak adhezije te reorganizacija membranskog sustava.



Slika 5. Citomegalične stanice s intranuklearnim inkluzijama. Jesionek i Kiolemenoglou su 1904. opisali inkluzije za koje su tada mislili da predstavljaju parazite. Na slici lijevo su vidljive citomegalične stanice s intranuklearnim i citoplazmatskim inkluzijama, dok je desno prikazana stanica s intranuklearnom inkluzijom. Preuzeto iz [126,134].

1.3.2.1. Nuklearne i citoplazmatske inkluzije

1959. godine su opisani neinficirani fibroblasti u tkivnoj kulturi kao izdužene stanice s relativno oskudnom citoplazmom. Jezgre su bile ovalne, s jednom ili više istaknutih jezgrića. Nuklearni kromatin bio je zrnast i ravnomjerno raspoređen, s jasno povećanom gustoćom u blizini jezgrine membrane. Većina stanica zadržavala je oblik vretena, a promjene su bile minimalne u usporedbi s onima u stanicama izloženima supernatantu iz zaraženih kultura u istom vremenskom razdoblju. Prve abnormalne jezgre s nuklearnim inkluzijama identificirane su dva do tri dana nakon inokulacije. U tom trenutku središnji dio jezgre bio je djelomično ispunjen inkluzijom koja je sadržavala čestice sastavljene od malog gustog središnjeg tijela okruženog blijedom aureolom i vanjske guste membrane [135].

Inkluzijska tjelešca uzrokovana CMV-om se mogu uočiti i u biopsijskim uzorcima endocervikalnih žlijezdanih stanica ili u cervikalnim/endocerviklanim stanicama [136]. Histološko utvrđivanje prisutnosti citomegalijskih stanica je postao zlatni standard za dijagnosticiranje HCMV infekcije kod gastrointestinalnih bolesti [137]. Inkluzijska tijela se još nazivaju „sovinim okom“ (engl. *owl's eye*) zbog svojeg karakterističnog izgleda, a popraćena su i granularnim intracitoplazmatskim tjelešcima [138]. Daljnje studije su pokazale da se citoplazmatske inkluzije formiraju pri izlasku nukleokapsida iz jezgre u citoplazmu i da su sastavljene od agregata lizosoma. Navedeni agregati okružuju virus nakon izlaska iz jezgre [139].

1.3.2.2. Remodeliranje citoskeleta

Postoje brojni dokazi da gotovo svaki virus, uključujući CMV, iskorištava komponente citoskeleta kao što su aktin i mikrotubuli za ulazak u stanicu, posredovanje raznih procesa unutarstaničnog transporta tijekom infekcije, maksimizaciju virusne replikacije kontrolom nuklearnih

aktinskih filamenata koji prostorno odvajaju virusnu DNA od DNA domaćina i za poticanje izlaska viriona iz stanice [88,140–143].

U većini stanica je centrosom mjesto centra za organiziranje mikrotubula (engl. *microtubule-organizing center*, MTOC), ali i ostala mjesta poput Golgija mogu služiti kao MTOC [144]. U stanicama inficiranim HCMV-om, odjeljak za sklapanje viriona djeluje kao MTOC izveden iz Golgija iz kojeg izlaze acetilirani mikrotubuli koji vežu regulatorni protein mikrotubula EB3 (engl. *end-binding protein*, EB) olakšavajući nuklearnu rotaciju i regulaciju produkcije infektivnih viriona [145]. Smatra se da transport tegumentirane čestice do mjesta omatanja ovisi o mikrotubulima budući da inhibicija nukleacije i funkcije mikrotubula smanjuje sklapanje infektivnih viriona [145,146]. Citoskeletni motorni protein dinein doprinosi deformaciji jezgre u bubrežasti oblik zrna graha (engl. *kidney-shaped*) koji je karakterističan za stanice u kasnim fazama CMV infekcije [99,145].

Osim spomenutog regulatornog proteina EB3, HCMV regulira i EB1. Pokazano je da su se virusni titri smanjili nakon utišavanja EB1 i EB3, sugerirajući da su potrebni za učinkovito virusno širenje [145]. Infekcija endotelnih stanica HCMV-om izaziva depolimerizaciju intracelularne aktinske mreže, uzrokujući gubitak aktinskih stresnih vlakana koja održavaju međustanične spojeve stanica endotela. Aktinski filamenti služe kao glavni stup unutarstaničnog prometovanja, a njihova destabilizacija povećava propusnost endotelnog sloja. Ova propusnost endotela izazvana HCMV-om omogućava otpuštanje nastalih viriona u krvotok, gdje se zatim mogu inficirati monociti, olakšavajući širenje virusa u druga tkiva [147,148]. Nuklearni aktin pomaže kretanju virusnih kapsida unutar jezgre [149].

1.3.2.3. Stanično zaokruživanje

Zaokruživanje inficiranih stanica može se dogoditi već šest sati nakon infekcije, znatno prije početka replikacije virusne DNA i oslobađanja prvih viriona. Zaražene stanice iskazuju okrugli oblik najkasnije jedan dan nakon infekcije. Za indukciju zaokruživanja stanica potreban je infektivni virus i ne događa se pri inokulaciji UV inaktiviranim HCMV česticama [150]. Nadalje, sam proces zaokruživanja je osjetljiv na inhibitore sinteze proteina ili transkripcije, ali ne i na inhibitore replikacije virusne DNA, što sugerira da proces nije uzrokovan sastavnim dijelom viriona, već zahtijeva *de novo* sintezu ranih virusnih proteina [151]. Nedavna istraživanja iz 2017. godine su pokazala da su produkti virusnog gena M25 nužni za zaokruživanje stanica tijekom MCMV infekcije [152]. Preuređenje aktinskog citoskeleta, koje se obično opaža u stanicama zaraženim MCMV-om, nije se dogodilo nakon infekcije s Δ M25 mutantom. Iako su ekspresija virusnih gena i replikacija genoma mutanta i divljeg tipa MCMV napredovale usporedivom vremenskom dinamikom, širenje virusa od stanice do stanice i titar virusa oslobođenog iz stanica zaraženih mutantom bili su smanjeni. Transfekcija stanica plazmidima koji kodiraju proteinske vrste M25 dovela je do smanjenja veličine stanica, povezujući ih s morfološkim promjenama, a najupadljivije obilježje Δ M25 mutante bila je nesposobnost izazivanja zaokruživanja zaraženih stanica. Vremenska dinamika zaokruživanja stanica sugerira da je 105 kDa M25 protein

odgovoran za izazivanje ovog učinka u ranoj fazi infekcije, dok ga 130 kDa protein održava u kasnoj fazi [101]. Članovi obitelji gena UL25 beta-herpesvirusa kodiraju strukturne i nestrukturne komponente tegumenta [153–156].

1.3.2.4. Stanična fuzija i agregacija

Stanična fuzija rezultira formiranjem stanica s više jezgara (multinuklearne stanice) [157]. Dokazi fuzije kod CMV inficiranih stanica su prvo uočeni pod fazno-kontrastnim mikroskopom [158]. Kasnije se pokazalo da glikoprotein B HCMV-a osim ulaska virusa u stanice, transmisije infekcije od stanice do stanice, promiče i fuziju inficiranih stanica [159]. Fuzija i spontano stvaranje sincicija su uočeni kod stanica glioblastoma, a formacija je ovisna o gustoći gB/pUL55 na staničnoj membrani [159]. Formacija sincicija je prekinuta nakon deletiranja regije na karboksi kraju gB/pUL55 proteina što znači da je gB/pUL55 dovoljan za stvaranje sincicija [160]. Ulogu u fuziji stanica posredovanoj virusom vjerojatno ima i glikoprotein O (gO). Fuzija je bila inhibirana nakon korištenja specifičnih gO protutijela [161]. Također, kada su su gH i gL koeksprimirani, uočene su višejezgrene stanice. Nisu otkrivene značajne razlike kada su gB/pUL55 i/ili gO bili koeksprimirani s gH/gL [162].

1.4. Reorganizacija membranskog sustava stanice domaćina u CMV infekciji

Citomegalovirusi, kao i drugi herpesvirusi izazivaju opsežno preuređenje membranskog sustava stanice, što uključuje reorganizaciju citoskeleta i unutarstaničnih vezikularnih odjeljaka sekretornog i endosomalnog puta [142,163–165]. Narušavanje staničnih vezikularnih odjeljaka ima utjecaj na herpesvirusnu morfogenezu, patogenezu infekcije, izbjegavanje mašinerije za antigensku prezentaciju i moguće na uspostavu latencije i reaktivacije [164].

Reorganizaciju membranskog sustava pokreću produkti virusnih gena koji ciljaju regulatorne faktore stanice domaćina koji oblikuju membranu i time izravno modeliraju njihovu funkciju [166–170]. Navedeno se također može postići neizravno stimulacijom njihove razgradnje [171] ili pokretanjem signalizacije koja regulira membranski promet [172]. Korištenjem visoko-protočnih metoda se pokazalo da je ekspresija proteina stanica domaćina povezana s membranskim prometom u stanicama zaraženim HCMV-om povećana ili smanjena, što dovodi do neravnoteže koja može biti povezana s tako opsežnom reorganizacijom [91,173,174]. Točnije, HCMV smanjuje ekspresiju više od 900 ljudskih proteina tijekom replikacije virusa i razgrađuje 133 proteina ubrzo nakon infekcije [91,175]. Masenom spektrometrijom je provedena analiza interaktoma 169 označenih, stabilno eksprimiranih proteina u HCMV inficiranim stanicama. Identificirana je mreža više od 3400 interakcija virusa sa stanicom domaćina te više od 150 međusobnih interakcija virusnih proteina [176].

CMV infekcija u potpunosti reorganizira zaražene stanice i dovodi do mnogih složenih citopatskih učinaka, uključujući stvaranje dvije megastrukture, prije spomenutog odjeljka za sklapanje viriona (engl. *assembly compartment*, AC) i nuklearnih replikacijskih centara [79,177,178]. AC

predstavlja samo dio reorganiziranog membranskog sustava zaraženih stanica (engl. *infected cell reorganized membrane system*, ICRMS) [179]. AC je veličine jezgre i mjesto gdje se vjerojatno odvijaju posljednji koraci sklapanja viriona CMV-a [177], a čini se da cijeli ICRMS doprinosi izlasku viriona [177,180].

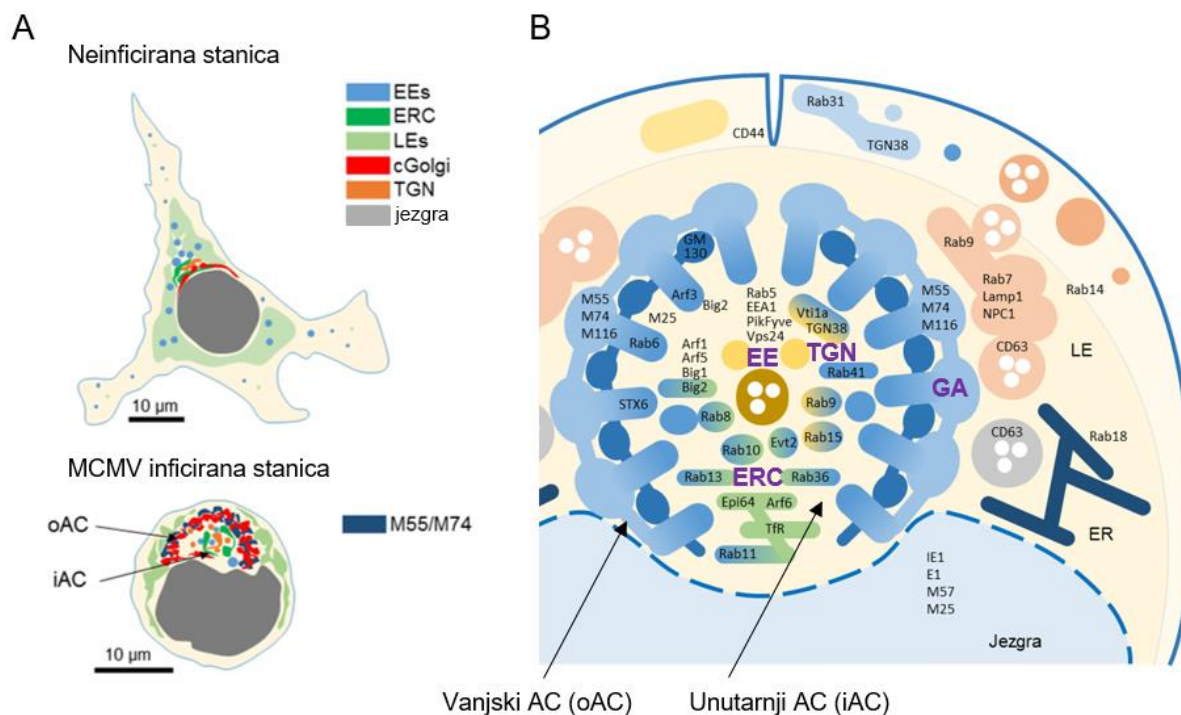
1.4.1. Citoplazmatski odjeljak za sklapanje viriona

Reorganizacija membranskih organela završava formacijom odjeljka za sklapanje viriona [60] (slika 6). Iako replikacija svih herpesvirusa uključuje događaje nuklearnog i citoplazmatskog sazrijevanja, AC je jedinstvena značajka stanica zaraženih beta-herpesvirusima [181]. Virusne čestice skupljaju se u AC tijekom kasne faze infekcije što je u skladu s njegovom važnom ulogom u kontroli konačne tegumentacije, sekundarnog omatanja i izlaska viriona iz stanice [182]. Pokazano je da MCMV inducira sličnu reorganizaciju membranskih organela kao i humani CMV [83,183–185].

Najraniji događaji formiranja MCMV AC su pokazani već 4-6 sati nakon infekcije [186] kada je uočena reorganizacija Golgijevog aparata, kašnjenje sazrijevanja ranih endosoma (engl. *early endosome*, EE) i membranskog protoka na sučelju ranih endosoma, endosomalnog reciklirajućeg odjeljka (engl. *endosomal recycling compartment*, ERC) i *trans*-Golgi mreže (engl. *trans-Golgi network*, TGN) – sučelju EE-ERC-TGN. Preuređenje Golgijeve strukture u ranoj fazi infekcije se označava kao pre-AC (PrAC) [187]. U unutarnjem PrAC je prvo uočena pericentriolarna akumulacija membrana ukrašenih malom GTPazom Rab10 [83,186] te je korištena kao pokazatelj najranijih događaja biogeneze PrAC [179,188–191]. Fenotip PrAC nije nuspojava zaokruživanja stanice u ranoj fazi infekcije. Navedeno se dokazalo korištenjem 19-MCMV rekombinantnog virusa s delecijom M23-M26 gena koji ne uzrokuje značajno zaokruživanje stanica nakon infekcije. Stanice zaražene sa spomenutim virusom se nisu zaokružile na 16 i 30 hpi, ali su pokazale jukstanuklearnu akumulaciju Arf6 i Rab10 na 16 hpi, te Rab36, Evc2, Epi64, Vps24 i BIG2 na 30 hpi [83].

AC možemo podijeliti na **vanjski** (engl. *outer AC*, **oAC**) i **unutarnji** (engl. *inner AC*, **iAC**). Prstenasto područje koje sadrži *cis/medijalni* Golgi i *trans*-Golgi s nakupljenim glikoproteinima virusne ovojnice (M55, M74, M75) i tegumenta (M25) je označeno kao vanjski dok je područje unutar prstena označeno kao unutarnji AC [60,83]. Golgijev aparat u neinficiranim stanicama je organiziran u strukturu cisterni oko jezgre, dok je kod CMV infekcije vakuoliziran i fragmentiran. Infekcija opsežno reorganizira sučelje između ranih endosoma, endosomalnog odjeljka za recikliranje (ERC) i *trans*-Golgi mreže (TGN) što rezultira ekspanzijom raznih EE-ERC-TGN intermedijatora (vakuolarne i tubularne strukture) koji ispunjavaju područje unutarnjeg AC (slika 6B). Ovi intermedijatori prekomjerno regrutiraju faktore stanica domaćina koji kontroliraju membranski protok na EE-ERC-TGN sučelju. U unutarnjem području nema nakupljanja značajne koncentracije virusnih glikoproteina, a kasni endosomi (engl. *late endosome*, LE) ne ulaze u sastav AC [83]. U unutrašnjem dijelu AC se akumuliraju terminalne faze diferencijacije ranih endosoma što označava da se tijekom CMV infekcije usporava izlazak EE, dok se istovremeno proširuju EE-vezane membrane koje imaju potencijal obrnutog

pupanja [83,183]. Deregulacijom sazrijevanja EE nastaju vakuolarni elementi unutar AC. Unutarnje membranske domene AC su visoko tubularne, što je pokazano prekomjernim nakupljanjem nekoliko faktora stanica domaćina koji reguliraju pupanje membrana na EE, ERC i TGN. Ove promjene su povezane s inhibicijom endosomalnog recikliranja i sazrijevanja EE u LE [186,192,193], s posljedicom izbjegavanja imunološkog odgovora [194].



Slika 6. Shematski prikaz MCMV odjeljka za sklapanje viriona. (A) Citoplazmatsko područje neinficirane stanice može se podijeliti u tri zone prema rasporedu membranskih organela: kortikalna, perinuklearna i jukstanuklearna. Tijekom MCMV infekcije dolazi do zaokruživanja stanice i opsežne reorganizacije staničnih organela koja rezultira stvaranjem odjeljka za sklapanje viriona (assembly compartment, AC). (B) Prikaz reorganizacije membranskih organela u inficiranim stanicama te distribucija membranskih biljega i virusnih proteina. AC možemo podijeliti na vanjski (oAC) koji se sačinjava od cis-, trans-Golgija, i dijela TGN-a te unutrašnji dio s reorganiziranim membranama ranih endosoma (EE), endosomalnog reciklirajućeg odjeljka (ERC) i dijela trans-Golgi mreže (TGN). Prilagođeno prema [83] i HRZZ-IP-2019-04-3582 „Sekundarno omatanje i izlazak beta-herpesvirusa iz stanice“ [75].

Pokazalo se da inhibicija morfogeneze AC smanjuje prinos infektivnih čestica i povećava broj defektnih čestica otpuštenih iz stanice što potvrđuje tezu da je glavna uloga AC olakšavanje sazrijevanja viriona [167,182,195]. Pretpostavlja se da je AC mjesto sekundarnog omatanja gdje kapside obavijene tegumentom dobivaju membransku ovojniciu [60].

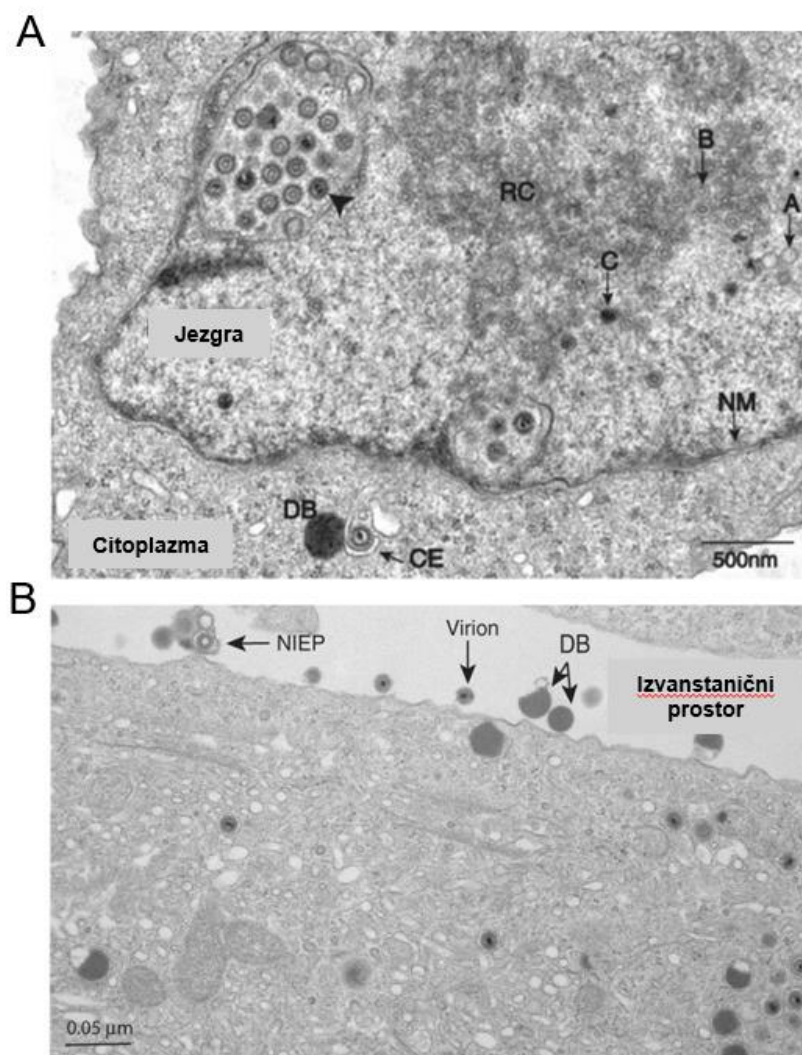
1.4.2. Sekundarno omatanje i izlazak viriona

Prethodna istraživanja elektronske mikroskopije (EM) su pokazala da se sekundarnog omatanje CMV viriona događa unutar AC-a [181,196], ali zbog velike reorganizacije membranskog sustava [83,173,197] i očiglednih promjena u identitetu organela [184,198], precizno mjesto omatanja CMV i dalje je nepoznato. Za nastanak mjesta sekundarnog omatanja, CMV treba stvoriti okoliš za

koncentriranje glikoproteina ovojnice i tegumentnih proteina te obuhvatiti velike tegumentirane virione u membransku organelu. Omotane kapside se mogu primijetiti kao pojedinačni virioni unutar membranske organele ili u obliku nakupljenih viriona unutar velikih vakuolarnih struktura koje podsjećaju na multivezikularna tijela (engl. *multivesicular bodies*, MVB), a potječu iz LE [187,199–202]. U nedavnim istraživanjima se vakuolarne strukture s više viriona nazivaju multiviralna tijela (engl. *multiviral bodies*, MViB) [203,204]. Također, unutar stanice koje su inficirane MCMV-om veći broj kapsida dobiva jednu membransku ovojnicu, što često rezultira opažanjem velikih multikapsidnih viriona [205]. S obzirom da virusni glikoproteini moraju biti ugrađeni u virionsku ovojnicu, mjesto njihova nakupljanja ima ulogu u uspostavljanju mjesta sekundarnog omatanja, a studije navedenih glikoproteina upućuju na *trans*-Golgi [184,206], EE [207–209], i ERC [83,193] kao mjesto omatanja.

Komponente odjeljka uključuju članove obitelji SNARE (engl. *soluble N-ethyl maleimide sensitive factor attachment protein receptor*) i ER šaperon, BiP [184,210]. SNARE je obitelj malih očuvanih eukariotskih proteina koji posreduju membransku fuziju organela sa staničnom membranom [211]. Također su aktivirani brojni signalni proteini koji se relokaliziraju i sekvestriraju u AC, uključujući mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) i EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) [212,213]. Transferin i komponente ESCRT-a (engl. *endosomal sorting complexes required for transport*) se također lokaliziraju u AC [185,214]. ESCRT mašinerija olakšava virusno pupanje jer sadrži svojstva „obrnute topologije“ (engl. *reverse topology*) za savijanje i cijepanje membrana [215]. Pojam obrnuta topologija definira događaje cijepanja membrane kao one u kojima je pupanje usmjereno od citosola [216]. Iako specifične interakcije proteina koje usmjeravaju česticu na mjesto sekundarnog omatanja u AC nisu dobro definirane, istraživanja ukazuju da su uključeni tegumentni proteini UL47 i pp150 [95,195].

Pupanje tegumentiranih čestica u vakuole koje sadrže virusne glikoproteine vjerojatno zahtijeva određenu specifičnost koja se može zaključiti prema interakcijama između citoplazmatskog repa virusnog glikoproteina i proteina tegumenta na sazrijevajućoj čestici, ili alternativno između proteina tegumenta na čestici i membranski vezanog virusnog tegumenta pp28 (UL99) ili pUL71 [169,217]. Postoji i alternativna hipoteza koja govori da je tijekom omatanja HCMV-a pupanje u vakuolu s proteinima ovojnice i sklapanje infektivnih viriona možda potpuno nasumično i može objasniti veliki broj omotanih, ali neinfektivnih čestica koje se oslobađaju iz HCMV zaraženih stanica u kulturi. Dokazi koji podupiru ovu hipotezu su dobiveni kvantitativnim analizama različitih tipova vakuola povezanih s virionima u AC-u korištenjem elektronske mikroskopije. Rezultati ove studije su pokazali da su tegumentirane čestice bile obavijene u svim regijama AC-a, a ne na određenom mjestu unutar AC-a [202]. HCMV inficirane stanice još proizvode subvirusne čestice nazvane gustim tijelima (engl. *dense bodies*, DB) [218] i neinfektivne omotane čestice (engl. *non-infectious enveloped particles*, NIEP) [58]. DB su sferične strukture s ovojnicom koje ne sadrže kapsidu i virusni genom, a sastoje se uglavnom od proteina tegumenta [219], prikazane na slici 7. NIEP su omotane kapside bez virusne DNA [58].



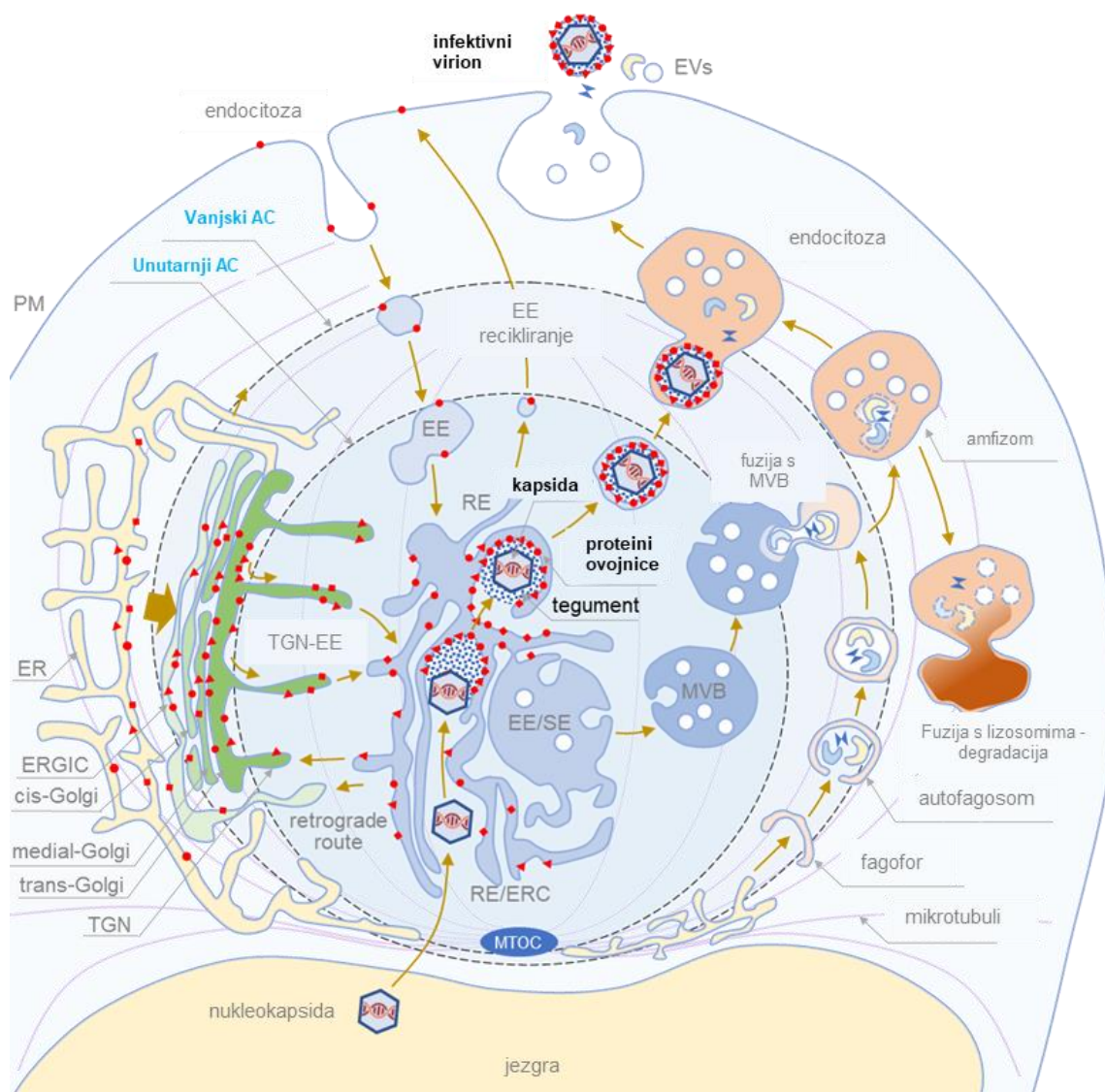
Slika 7. Slike inficiranih ljudskih fibroblasta dobivene elektronskim mikroskopom. Prikaz nukleokapsida i nuklearnog izlaska. Replikacijski centar (RC) označava mjesto inkapsidacije genoma. Kapside A-, B- i C- tipa su prikazane strelicama. Nukleokapside u jezgri s početnim slojem tegumenta su prikazane vrškom strelice. U citoplazmi je prikazana kapsida tijekom sekundarnog omatanja (engl. *cytoplasmic envelopment*, CE), gusto tijelo (engl. *dense body*, DB). NM označava nuklearnu membranu. **(B)** Prikaz unutarstaničnih i izvanstaničnih HCMV viriona, neinfektivnih omotanih čestica (engl. *non-infectious enveloped particles*, NIEP) i gustih tjelešaca. Preuzeto iz [77].

Mehanizmi oslobađanja infektivnih CMV viriona iz zaraženih stanica ostaju nepoznati. Studije na ljudskim fibroblastima s laboratorijskim sojevima HCMV-a su pokazale opsežnu lizu stanica koja bi mogla biti glavni izvor virusa izvan stanica. S druge strane, samo oko 50% ukupnog infektivnog virusa se otpušta u supernatant dok su preostale infektivne čestice povezane sa zaraženom stanicom, odnosno ostaju unutar nje [220].

U nedavnim istraživanjima iz 2022. godine [203,204] je opisano povremeno masovno oslobađanje HCMV čestica koje se pričvrste na plazmatsku membranu prije otpuštanja iz stanice, iako se čini da MVib-ovi koji sadrže virione predstavljaju nekonvecionalni put izlaska. Biogeneza MVib-a

je nejasna i nije poznato mogu li se CMV virioni omotati u zasebne vezikule te osloboditi kao pojedinačni virioni direktnom fuzijom s plazmatskom membranom (PM) [79,221].

Na slici 8 je prikazan predloženi slijed citoplazmatskih događaja tijekom sekundarnog omatanja i put izlaska vezikula koje sadrže virusne čestice, a koji najvjerojatnije ovisi o spajanju s velikim transportnim organelama. Sekretorni amfizomi, degradacijski amfizomi ili sekretorne vezikule koje nastaju iz LE ili TGN-a mogu biti neke od njih. Sekretorni amfizomi su velike multivezikularne organele koje izlučuju autofagijski sadržaj iz stanice, degradacijski amfizomi ih preusmjeravaju prema PM, a sekretorne vezikule su još poznate kao organele povezane s lizosomima (engl. *lysosome-related organelles*, LRO) [222,223]. S obzirom na virusni tropizam, odabir izlazne organele može ovisiti o procesu koji je dominantan za određenu vrstu stanica kao npr. fibroblasta gdje je preferencijalni put sekretorni preko LE, a kod endotelnih autofagosomalni [200,221].



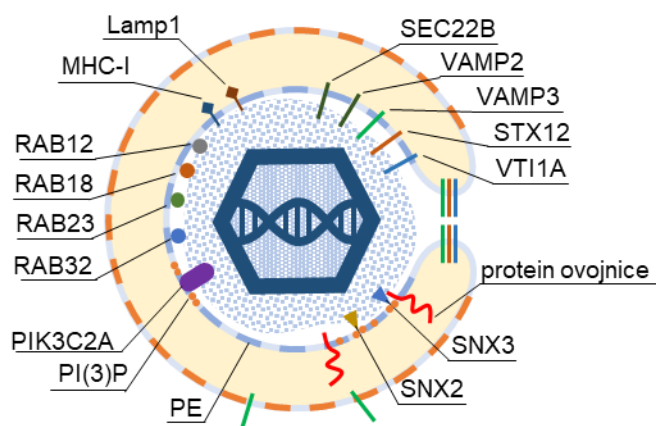
Slika 8. Predloženi slijed citoplazmatskih događaja tijekom konačnog omatanja i izlaska citomegalovirusa.

U reorganiziranom membranskom sustavu zaražene stanice kada se stvara odjeljak za sklapanje viriona (engl. *assembly compartment*, AC), endosomalni protok preusmjerava se na unutarnji AC gdje sazrijevaju EE. CMV infekcija usporava sazrijevanje EE-a i proširuje membranske elemente na sučelju EE-RE / ERC-TGN. Neki EE sazrijevaju u multivezikularna tijela (MVB) i kreću se prema periferiji AC-a kako bi se pridružili putovima sazrijevanja LE. Autofagosomalni procesi unutar AC i fuzija s MVB-ima u obliku amfizoma javljaju se na rubovima AC. Degradativni amfizomi stapaju se s lizosomima, a sekretorni amfizomi izbacuju stanične komponente izvan stanice spajanjem s membranom. Kompleksi za sortiranje i izdvajanje tereta u ranim endosomima izdvajaju glikoproteine virusne ovojnice u membrane s prikladnim sastavom za sekundarno omatanje. Prikladan sastav uključuje proteine koji mijenjaju lipide te lipide i proteine koji potiču zakrivljivanje membrane, a postiže se u završnim koracima sazrijevanja EE u putovima recikliranja na modificiranim membranama sličnim RE-u koje se protežu unutar AC. Tegumentni proteini nakupljaju se u citosolu unutarnjeg AC i tvore biomolekularne kondenzate na membranama koje koncentriraju proteine virusne ovojnice. Virusni kapsidi oslobođeni iz jezgre uklapaju se u tegumentni matriks i pokreću omatanje s membranama koje su nakupile virusne glikoproteine. Membrane se omataju oko materijala koji sadrži kapside, proteine tegumenta i proteine stanica domaćina, u formi koja podsjeća na hobotnicu za stvaranje omotanih viriona. Taj proces omatanja sličan je rastu fagofora. Omotani virioni unutar membranskih organela migriraju i spajaju se sa sekretornim amfizomima, koji skupljaju više viriona i tvore multi-viralna tijela (MViB, engl. *multi viral bodies*). MViB-ovi migriraju na staničnu periferiju i oslobađaju mnoge virione istovremeno, što je poznato kao povremeno masovno oslobađanje (engl. *intermitent bulk release*). Preuzeto iz [180].

1.4.3. Membranske organele uključene u sklapanje viriona

Podaci temeljeni na molekularnim markerima i transmisivskoj elektronskoj mikroskopiji sugeriraju da su endosomalne membrane odgovorne za sekundarno omatanje [181,184,224]. Glavna funkcija staničnog endosomalnog sustava su primanje, odvajanje i sortiranje materijala koji potječe iz plazmatske membrane, a čine ga međusobno povezane vezikule [225]. Nakon ulaska molekula endocitozom, one se usmjeravaju k recikliranju ili degradaciji. Istraživanja alfa-herpesvirusa sugeriraju da se sekundarno omatanje ne događa na mjestu visoke koncentracije virusnih glikoproteina već na endosomalnom odjeljku [226]. S obzirom na dosadašnja saznanja, ovaj odjeljak bi trebao imati nekoliko svojstava za omogućavanje sekundarnog omatanja. Jedno svojstvo je ranije spomenuto „obrnuta topologija“ koja označava mašineriju potrebnu za obrnuto pupanje membrana i njihovu fiziju u ovojnicu viriona [227]. Pupanje zahtijeva PI(3)P (engl. *phosphatidylinositol 3-phosphate*) domene, pretvorbu PI(3)P u PI(3,5)P₂ (engl. *phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate*) pomoću PIKfyve i aktivaciju ESCRT puta [228]. Nadalje, CMV proteine ovojnice treba sortirati mehanizmima za sortiranje tereta putem TGN-EE iz PI(4)P (engl. *phosphatidylinositol-4-phosphate*) bogatih TGN membrana prema membranama permisivnim za obrnuto pupanje [188]. Jedna skupina proteina koja sadrži fosfoinozitudno-vezujuću phox (PX) homologsku domenu su sortirajući neksini (engl. *sorting nexins*, SNXs) [229]. Osim stvaranja tubula na membranama EE, navedeni neksini se odcjepljuju u reciklirajuće vezikule [230] te mogu biti od posebnog interesa za razvoj i održavanje membrana koje se koriste za omotavanje beta-herpesvirusa s obzirom da se tijekom CMV infekcije događa pregrupiranje i tubulacija endosomalnih odjeljaka [83,193]. Omatajuće membrane trebale bi biti obogaćene virusno-kodiranim glikoproteinima koji formiraju virusnu ovojnicu, a njihova koncentracija na membrani trebala bi se temeljiti na principima koncentracije tereta, što je jedna od glavnih funkcija SNX-ova [231].

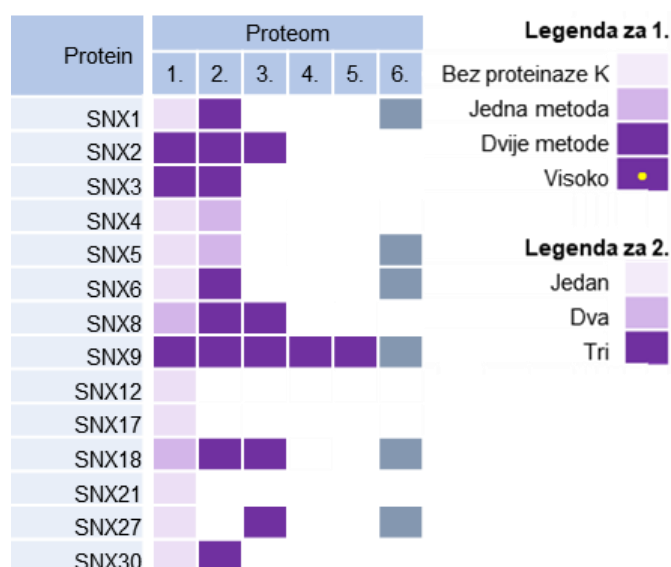
Tijekom procesa omatanja, proteini stanice domaćina koji definiraju identitet i oblik ovih membrana bivaju zarobljeni zajedno s kapsidama, ugrađujući se u virione kao potpisi stanice domaćina (engl. *host cell signatures*). Ova inkorporacija pruža uvid u biogenezu odjeljka za omatanje i funkcionalnosti koje se koriste tijekom omatanja kapsida. U nedavnom radu je objavljena analiza dostupnih proteoma HCMV virusnih pripravaka koji su identificirali veliki broj proteina stanica domaćina [231]. Metode pročišćavanja viriona još nisu dovoljno napredne za razdvajanje svih komponenti izvanstaničnog materijala, uključujući velike količine nevezikularnih izvanstaničnih čestica (engl. *non-vesicular extracellular particles*, NVEPs). NVEP-ovi su heterogeni materijal koji sadrži različite citoplazmske nanočestice zahvaćene autofagosomima i otpuštaju se iz stanica nakon fuzije amfizoma s plazmatskom membranom [232]. U radu su se koristili proteomski podaci velikih i malih izvanstaničnih vezikula (engl. *large and small extracellular vesicles*, IEVs i sEVs) i NVEP-ova za filtriranje staničnih proteina [232,233] identificiranih u virusnim proteomima [203,234–238]. Nakon opsežnog filtriranja proteoma, sužena je identifikacija potpisa stanica domaćina u virionima HCMV-a na prisutnost MHC-I proteina, Rab proteina (Rab12, Rab23 i Rab32), sortirajućih neksina (SNX2 i SNX3), SNARE proteina (VAMP2, VAMP3, STX12 i VT11A) i PI(3)P kinaze PIK3C2A [231] (slika 9). Navedena kompozicija biljega ukazuje da se sekundarno omatanje odvija na membranama endosomalnih reciklirajućih odjeljaka koje pripadaju sustavu reciklirajućih endosoma, poznatom kao tubularni reciklirajući endosomi (TRE, engl. *tubular recycling endosomes*) ili na Arf6/Rab8 podvrsti reciklirajućih membrana unutar endosomalnog reciklirajućeg odjeljka [231]. Rab12, Rab13, Rab23 i Rab32 aktiviraju se nizvodno (engl. *downstream*) na tim odjeljcima i odgovorni su za stvaranje reciklirajućih membrana koje vode u različitim smjerovima [239]. PIK3C2A se aktivira na reciklirajućim membranama i generira lokalno stvaranje PI3P [240], a VAMP3, STX12 i VT11A su SNARE proteini koji karakteriziraju reciklirajuće membrane [241].



Slika 9. Potpisi stanice domaćina u HCMV virionima koji mogu otkriti organelu odgovornu za sekundarno omatanje. Prisutnost MHC-I proteina, Rab proteina (Rab12, Rab23 i Rab32), sortirajućih neksina (SNX2 i SNX3), SNARE proteina (VAMP2, VAMP3, STX12 i VT11A) i PI(3)P kinaze PIK3C2A sugerira da su membrane koje se koriste za omatanje izvedene iz cjevastih (tubularnih) produžetaka EE-a koji recikliraju teret putem reciklirajućeg puta ovisnog o Arf6/Rab8. Preuzeto iz [231].

1.4.4. Sortirajući neksini

Obitelj sortirajućih neksina obuhvaća 34 člana podijeljena u šest potporodica na temelju njihove organizacije domena. Među najvećim potporodicama su SNX-ovi koji sadrže samo PX domenu (PX potporodica) ili PX i BAR domenu (PX-BAR potporodica). Njihova glavna uloga je formiranje kompleksa koji kontroliraju sortiranje tereta, deformaciju membrane te interakciju s citoskeletom i motornim proteinima [242]. SNX-PX domena veže fosfatidilinozitol (engl. *phosphatidylinositol*, PI), najčešće fosfatidilinozitol 3-fosfat (PI3P), stoga je većina SNX-ova vezana uz PI3P-obogaćene rane endosome [243]. S obzirom da se tijekom MCMV infekcije događa pregrupiranje i tubulacija endosomalnih odjeljaka, a SNX-ovi sudjeluju u endosomalnom sortiranju i formiranju tubula, njihova uloga može biti ključna u MCMV replikacijskom ciklusu i stvaranju odjeljka za sklapanje virusnih čestica. Kao što je prikazano na slici 10, proteomskom analizom viriona je detektirano nekoliko SNX-ova.



Slika 10. Identifikacija sortirajućih neksina (engl. *sorting nexins*, SNX) u virionima i NVEP-ovima u pripravcima ekstracelularnih vezikula. Proteini su identificirani u pet HCMV proteoma (proteomi 1-5), proteoma HSV-1 (proteom 6) i NVEP-ova (proteom 7). Proteom 1 [234] prikazuje podatke za HCMV pripravke viriona bez tretmana s proteinazom K i isti pripravak tretiran s proteinazom K. Identifikacija proteina u virionima s proteinazom K je označena različitim bojama ovisno o tome jesu li detektirani jednom ili dvije metode masene spektrometrije. Proteom 2 [235] prikazuje podatke u različitim bojama ovisno o tome je li protein identificiran u jednom, dva ili tri biološka replikata. Proteomi 3 [236], 4 [237], 5 [203] i 6 [238] označavaju je li protein prisutan ili ne. Prilagođeno prema [231].

SNX funkcije povezane su sa staničnom membranom, gdje doprinose endocitozi, ili s endosomima, gdje reguliraju endosomalnu tubulaciju i odvajanje tereta za transport do PM (endosomalno recikliranje), TGN-a (retrogradni transport) ili lizosoma (razgradnja) [244]. Funkcija endosomalne tubulacije povezana je sa svojstvima deformacije membrane, koja su posredovana različitim mehanizmima, ali prvenstveno s SNX-ovima koji sadrže BAR domenu osjetljivu na zakrivljenost membrane (SNX 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 30 i 32) [244,245].

Funkcija odvajanja tereta povezana je s njihovom sposobnošću prepoznavanja različitih signala za sortiranje na citoplazmatskoj domeni teretnog proteina [245,246], što dovodi do usmjeravanja tereta

na određeni dio endosomalne membrane [230,245,247]. Ključni SNX-ovi koji izdvajaju teretne proteine su SNX1/SNX2 kao dio ESCPE-1 (engl. *endosomal sorting complex for promoting exit 1*) kompleksa, SNX3, SNX4, SNX17 i SNX27 kroz četiri izlazna puta iz ranih endosoma [248]. Ovaj proces podržava formiranje proteinskih kompleksa potrebnih za koncentraciju tereta u endosomalnoj mikrodomeni i naziva se odvajanje tereta (engl. *cargo retrieval*) [249,250]. Glavni multiproteinski kompleksi za odvajanje su retromer i retriver, a u određenim slučajevima i CCC (CCDC22, CCDC93 i COMMD) ili WASH (engl. *Wiskott–Aldrich sindrom protein and SCAR Homologue*) kompleksi te razgranati aktin [245,250]. Odvajanje tereta putem ovih kompleksa omogućuje masovni transport prema TGN-u, koji se odvija u vakuolarnoj domeni ranih endosoma (EE) i zahtijeva potporu efektorskih funkcija regrutiranih od strane GTPaze Rab7 [246,250]. Odvajanje tereta u reciklirajuću domenu EE uključuje formiranje tubula u EE mikrodomenama kroz Rab- i Arf-posredovanu kaskadnu regrutaciju efektorskih proteina koji pokreću ukupni proces širenja i cijepanja tubula [245]. SNX-ovi doprinose navedenim procesima olakšavanjem tubulacije i sekvestracije tereta unutar tubula. Štoviše, formiranjem mikrodomena na endosomima, SNX-ovi mogu potaknuti sazrijevanje endosomalnog sustava, što je nedavno pokazano kroz doprinos SNX1/4 u FERARI (engl. *factors for endosome recycling and Rab interactions*) kompleksu koji je potreban za Rab11-ovisnom endosomalnom recikliranju [251].

U kontekstu CMV infekcije, opisana je uloga samo nekoliko članova SNX obitelji kao što su SNX5 [252] i SNX27 [191]. SNX5 je komponenta retromera i retrogradnog transportnog puta te stupa u interakciju s UL35 proteinima tegumenta. Ekspresija proteina divljeg tipa, ali ne i mutanata s nedostatkom vezanja SNX5, rezultirala je staničnom preraspodjelom receptora manoza-6-fosfata neovisnog o kationu (CI-M6PR), što ukazuje da se proteini UL35 vežu i negativno reguliraju SNX5 kako bi modulirali puteve staničnog transporta. Nadalje, vezanje UL35 proteina na SNX5 bilo je potrebno za učinkovitu replikaciju virusa i za transport gB/pUL55 u AC. Ovi rezultati pokazuju da HCMV fosfoproteini (engl. *phosphoprotein*, pp) ppUL35 i ppUL35A kontroliraju lokalizaciju esencijalnog gB/pUL55 kroz regulaciju retrogradnog transportnog puta. Navedeni rad [253] je prvi koji definira molekularnu interakciju između proteina tegumenta i faktora vezikularnog transporta za regulaciju lokalizacije glikoproteina.

Također je pokazano da je tubulacija posredovana SNX27:Retromer:ESCPE-kompleksom ključna za uspostavljanje Rab10-ukrašenog podskupa membrana unutar pre-AC. Supresija SNX27 rezultirala je gotovo deseterostrukim smanjenjem oslobađanja infektivnih viriona. Međutim, ti se učinci ne mogu izravno povezati s doprinosom tubulacije ovisne o SNX27:Retromer:ESCPE-1 tijekom sekundarnog omatanja budući da je supresija ovih komponenti dovela do smanjenja ekspresije proteina MCMV i inhibirala napredovanje ciklusa replikacije već u ranoj fazi [191].

Proteomska analiza viriona otkrila je da su pripravnici viriona bili dosljedno obogaćeni s SNX2, SNX3 i SNX9, ali SNX2 i SNX9 su identificirani u IEVs, sEVs i NVEP-ovima stoga je SNX3 ostao najvažniji pokazatelj koji može pružiti informacije o omatajućoj organeli [231]. Membrane koje sadrže SNX3 snažno su obogaćene u unutarnjem AC području stanica zaraženih MCMV-om [188]. Ovaj SNX

ima samo PX domenu i veže se za membrane putem interakcije s PI(3)P [254], što je ključno za njegovo regrutiranje, jer akutno iscrpljivanje PI(3)P dovodi do potpunog disociranja SNX3 s membrana [83,188]. Iako su PI(3)P membrane nepotrebne za biogenezu AC-a, sam PI(3)P sam je ključan za otpuštanje infektivnih MCMV viriona [188].

SNX3 može djelovati u nekoliko poddomena ranih endosoma i u manjoj mjeri u reciklirajućim endosomima [255]. Njegova funkcija u vakuolarnim EE-ima uglavnom je povezana s retromerom, pri čemu SNX3 doprinosi prepoznavanju strukturnog motiva u citoplazmatskoj domeni teretnih proteina. SNX3 ne sadrži BAR domenu i stoga ne savija membranu samostalno. Međutim, nedavna istraživanja pokazala su da SNX3-retromer može formirati strukturu nalik na luk (engl. *arch like*) na membranama i uzrokovati njezino savijanje [256].

SNX3 također može biti regrutiran na tubularne endosome neovisno o Vps35, komponenti osnovnog retromerskog kompleksa, i samostalno sortirati teret [257] ili stupiti u interakciju s teretom (npr. TfR) zajedno s Vps35 kako bi formirao nekласični retromerski kompleks i na taj način sortirao teret u RE-ove [258]. Prisutnost SNX3 u virionima sugerira omatanje na reciklirajućim tubulima koji potječu iz EE-a [231]. Ovi tubuli mogu pripadati Rab8/Arf6 reciklirajućem putu, jer nedavno istraživanje ukazuje na ključnu ulogu SNX3 u formiranju Arf6-povezanih reciklirajućih tubula i recikliranju nekih CIE (engl. *clathrin-independent endocytic*) teretnih proteina [259].

Analiza SNX-ova u virionima sugerira da beta-herpes virioni mogu sazrijeti na SNX3-pozitivnim membranama koje potječu iz Rab8/Arf6 reciklirajućeg puta te da se mehanizam sortiranja tereta temeljen na SNX3 može koristiti za koncentraciju virusnih glikoproteina ovojnice na omatajućoj membrani.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Identitet organele gdje se odvija sekundarno omatanje citomegalovirusa (CMV) i dalje ostaje nepoznat, a mehanizam izlaska novonastalih viriona nije jasan. Jedan od razloga je iznimna složenost interakcije CMV-a i domaćina te nedovoljno razumijevanje fiziologije membranskog sustava.

Svrha ovoga istraživanja je opisivanje i karakteriziranje citopatogenih učinaka CMV infekcije i citoplazmatskog odjeljka s virionima u živim stanicama koristeći digitalnu holotomografiju te identificirati membranske organele koje su uključene u sklapanje i izlazak novostvorenih viriona iz stanice. Naše polazište temelji se pretpostavkama da membranska organela treba imati sposobnost ekspanzivnog rasta u formi membranskih tubula te aktivirati mehanizme za sortiranje i nakupljanje virusnih glikoproteina (primjerice gB/pM55) koji će se tako ugraditi u novostvorene virione. Sortirajući mehanizmi u endosomalnom sustavu temelje se na novačenju proteinskih kompleksa koji uključuju sortirajuće neksine i retromerske komponente za prepoznavanje sortirajućih sekvenci na proteinima. Virusni glikoproteini posjeduju sekvence koje prepoznaju SNX27, SNX3, te SNX1/2 i SNX5/6 kao komponente kompleksa poznate kao ESCPE-1 no hijerarhijski mehanizam regrutiranja tih komponenti nije jasan. Niz zapažanja upućuju da se sortirajuća događanja odvijaju na pretečama cjevastih (tubularnih) produžetaka EE-a koji prikupljaju proteinske komponente (teret) za transport prema staničnoj membrani reciklirajućim putem ovisnom o Arf6/Rab8. Taj put membranskih tubularnih odjeljaka zadovoljava pretpostavke potrebne za omatanje virusnih kapsida uklopljenih u tegumentni biomolekularni kondenzat, proces kojeg nazivamo sekundarno omatanje.

S obzirom na navedeno smo postavili sljedeće ciljeve:

1. Uspostaviti metodu digitalne holotomografske mikroskopije (DHTM), snimiti virusnu infekciju do 72 hpi i kvantificirati citopatogene promjene stanica.
2. Okarakterizirati citoplazmatski odjeljak s nakupljenim kapsidama (S-SCP) pomoću fluorescentnog S-mCherry-SCP MCMV koristeći DHTM i koloalizacijskom analizom S-SCP s markerima membranskih odjeljaka.
3. Uporabom BioID2 metode kroz detekciju interakcija sa staničnim proteinima membranskih organela identificirati membranske odjeljke u koje putuje virusni gB/pM55 kao nužna sastavnica virusne ovojnice koja se u virione ugrađuje putem membrane na kojima se vrši omatanje te m06 kao kontrolnog virusnog glikoproteina koji ne ulazi u sastav viriona.
4. Analizirati ulogu SNX3 u replikacijskom ciklusu i sklapanju MCMV viriona te njegovu ulogu kao sortirajućeg proteina koji prethodi ili djeluje usporedno sa prethodno identificiranim SNX27:Retromer:ESCPE-1 kompleksima kao ključnim regulatorima izgradnje pre-AC i vjerojatno sortiranja virusnih glikoproteina.
5. Analizirati ulogu četiriju izlaznih puteva iz ranih endosoma u proizvodnji infektivnih viriona kroz depleciju ključnih sortirajućih neksina (SNX3, SNX1/2, SNX4, SNX17 i SNX27) koji izdvajaju teretne proteine.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Kemikalije

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih u ovom radu.

Kemikalija	Proizvođač
2-merkaptetanol (C_2H_6OS)	Sigma Aldrich, SAD
30% akrilamid/bisakrilamid otopina	Carl Roth, Njemačka
agaroz	Sigma Aldrich, SAD
amonijev persulfat (APS)	Sigma Aldrich, SAD
bromfenol modri	Merck, Njemačka
albumin iz goveđeg seruma (engl. <i>bovine serum albumin</i> , BSA)	Sigma Aldrich, SAD
citratna kiselina hidrat ($C_6H_8O_7 \times H_2O$)	Kemig, Hrvatska
DABCO (1,4-Diazabicyclo [2.2.2.] octane, Triethylenediamine)	Sigma Aldrich, Njemačka
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	Thermo Scientific, SAD
dimetilsulfoksid (DMSO)	Merck, Njemačka
di-natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat ($Na_2HPO_4 \times 12H_2O$)	Kemika, Hrvatska
DMEM medij (engl. Dulbecco's modified Eagle's medium)	PAN-Biotech, Njemačka
DMEM medij, bez fenol crveno	PAN-Biotech, Njemačka
etanol	Etil promet d.o.o., Hrvatska
fenilmetanosulfonil fluorid (engl. <i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i> , PMSF)	Sigma Aldrich, Njemačka
fenol crveno (engl. <i>phenol red</i>)	Sigma Aldrich, Njemačka
glicerol	Kemika, Hrvatska
glicin	Carl Roth, Njemačka
HEPES	Carl Roth, Njemačka
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, SAD
kalcijev klorid ($CaCl_2$)	Kemika, Hrvatska
kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4)	Kemika, Hrvatska
kalijev klorid (KCl)	Kemika, Hrvatska
klorovodična kiselina (HCl)	Kemika, Hrvatska
koktel inhibitora proteaza (cOmplete protease inhibitor cocktail tablets)	Roche, Švicarska

L-glutamin	PAN-Biotech, Njemačka
Lipofectamine 3000 transfekcijski reagens	Thermo Scientific, SAD
magnezijev klorid heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Njemačka
magnezijev klorid monohidrat ($\text{MgCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Njemačka
metanol	Kemika, Hrvatska
metil-celuloza	Fluka Biochemika, Švicarska
MEM (10x)	Thermo Scientific, SAD
Mowiol	Sigma Aldrich, SAD
natrijev azid (NaN_3)	Difco, SAD
natrij dodekasulfat (SDS)	Sigma Aldrich, SAD
natrijev dihidrogenfosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Kemika, Hrvatska
natrijev etilendiamintetraacetat (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic-Na2 salt</i>, EDTA)	Carl Roth, Njemačka
natrijev fluorid (NaF)	Kemika, Hrvatska
natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO_3)	Kemika, Hrvatska
natrijev hidroksid (NaOH)	Kemika, Hrvatska
natrijev karbonat (Na_2CO_3)	Kemika, Hrvatska
natrijev klorid (NaCl)	Carl Roth, Njemačka
natrijev ortovanadat (Na_3VO_4)	Sigma Aldrich, SAD
Opti-MEM	Gibco, SAD
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (biljezi veličine proteina za Western blot)	Thermo Fisher Scientific, SAD
paraformaldehid (PFA)	Sigma Aldrich, Njemačka
penicilin 10000 U/mL - streptomycin 10 mg/mL	PAN-Biotech, Njemačka
Ponceau S	Sigma Aldrich, SAD
Power SYBR™ Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, SAD
propidijev jodid	Serva, Njemačka
puromicin	Santa Cruz Biotechnology, SAD
RIPA pufer	Thermo Scientific, SAD
RNA iMAX Lipofectamine	Invitrogen, SAD
RPMI 1640 medij	PAN-Biotech, Njemačka
saharoza	Kemika, Hrvatska
serum fetusa goveda (engl. <i>fetal calf serum</i>, FCS)	PAN-Biotech, Njemačka
SignalFire Elite ECL Reagent (reagens za kemiluminiscenciju)	Cell Signaling, SAD
SignalFire Plus ECL Reagent (reagens za kemiluminiscenciju)	Cell Signaling, SAD
TEMED ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$)	Sigma Aldrich, SAD

tripansko modrilo	Serva, Njemačka
tripsin	Gibco, SAD
tris baza (tris hidroksimetil aminometan)	Boehringer Mannheim, Njemačka
tris-HCl	Carl Roth, Njemačka
Triton X-100	Rhom&Haas, SAD
TRIzol	Thermo Fisher Scientific, SAD
Tween 20 (polioksietilen sorbitan monolaureat)	Sigma Aldrich, Njemačka
UltraPure Glycogen (za PCR)	Thermo Fisher Scientific, SAD
voda bez nukleaze (engl. <i>nuclease-free water</i>)	Thermo Fisher Scientific, SAD
Western blot reagens za blokiranje 10x	Roche, Švicarska

3.1.2. Mediji za uzgoj kultura stanica i puferi

Citratni pufer

135 mM NaCl, 10 mM KCl, 40 mM $C_6H_8O_7 \times H_2O$; pH 3,0

Fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (engl. *phosphate buffered saline, PBS*), pH 7,4

140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$, 1,5 mM KH_2PO_4 , 0,7 mM $CaCl_2$ i 0,7 mM $MgCl_2 \times 6H_2O$

Fiziološka otopina puferirana s tris-bazom (engl. *Tris buffered saline, TBS*) pH 7,6

20 mM Tris baza, 150 mM NaCl

Kompletan DMEM medij za uzgoj mišjih embrionalnih fibroblasta i imortalizirane adherentne stanične linije Balb3T3 i NIH3T3

Medij DMEM, 2mM L-glutamin, 1×10^5 U/L penicilin, 0,1 g/l streptomycin sulfat i 5% (v/v) odnosno 10% (v/v) FBS

Kompletan RPMI 1640 medij

Medij RPMI 1640, 2 mM L-glutamin, 1×10^5 U/L penicilin, 0,1 g/l streptomycin sulfat i 10% (v/v) FCS

Medij za metodu protočne citometrije (engl. *fluorescence-activated cell sorting, FACS*)

PBS, 10 mM EDTA, 20 mM Hepes (pH 7,2), 2% (v/v) FCS i 0,1% (v/v) natrijev azid (NaN_3)

Medij s metil-celulozom

0,022 g/ml metilceluloze, 26 mM $NaHCO_3$, 10X koncentrirani MEM, 3% (v/v) FBS, 1×10^5 U/L penicilin; 0,1 g/l streptomycin sulfat

Medij za smrzavanje stanica

10% (v/v) dimetil sulfoksid (DMSO), 20% (v/v) FBS i 70% (v/v) RPMI medij

Otopina saharoze za centrifugiranje virusa kroz koncentracijski gradijent

5% (w/v) saharoza otopljena u puferiranom PBS-u

Otopina SDS-a

SDS 10% (w/v) u H₂O

Otopina za denaturaciju proteina

0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% SDS (w/v), 0,1% bromfenol modrilo (w/v), 30% glicerol (v/v)

Otopina za razaranje (lizu) stanica

RIPA pufer, 25X Complete inhibitor tableta (w/v), 0,1 M PMSF

Otopine za blokiranje membrana

Western reagens za blokiranje Roche (Roche 1X (v/v) u TBS-u)

Otopina za vizualizaciju proteina na membrani

Ponceau S 0,5% (w/v) u 1% (v/v) octenoj kiselini

Otopina za razrjeđivanje primarnih protutijela (Western blot analiza)

Western reagens za blokiranje Roche (Roche 0,5X (v/v) u TBS-u)

Otopina za razdvajajući gel za SDS-PAGE

30% (v/v) akrilamid/bisakrilamid, 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 10% (v/v) SDS, 10% (v/v) APS, 0,04% (v/v) TEMED

Otopina za sabijajući gel za SDS-PAGE

30% (v/v) akrilamid/bisakrilamid, 1,0 M Tris-HCl (pH 6,8), 10% (v/v) SDS, 10% (v/v) APS, 0,1% (v/v) TEMED

Paraformaldehid

40 g/L paraformaldehid, 0,01 M NaOH

Permeabilizacijski pufer – Tween 20 (0,5%, v/v)

0,5% (v/v) Tween 20 u PBS-u

Permeabilizacijski pufer – Tween 20 (1%, v/v)

1% (v/v) Tween 20 u PBS-u

Permeabilizacijski pufer – Triton X-100 (0,5%, v/v)

0,5% (v/v) Triton X-100 u PBS-u

Pufer za elektroforezu DNA (1X Tris-acetat-EDTA), pH 8,0

40 mM Tris baza, 20 mM octena kiselina, 1 mM EDTA

Pufer za SDS-PAGE

25 mM Tris baza, 192 mM glicin, 0,1% (w/v) SDS

TBS (fiziološka otopina puferirana TRIS-om)

20 mM Tris baza; 0,5 M NaCl; pH 7,5

TBS-T (TBS s Tween-om 20)

TBS s 0,05% (v/v) Tween 20; pH 7,5

Transfer pufer za Western blot

25 mM Tris baza, 192 mM glicin, 20% (v/v) metanol

Trypsin

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄, 1,25 g EDTA, 0,456 g Na₂HPO₄, 1,25 g tripsin, 0,016 g fenol crveno, 1 L destilirane vode

Uklopno sredstvo za fluorescentne mikroskopske preparate (Mowiol)

2,4 g Mowiol, 6 mL glicerol, 0,2 M Tris, 2,5% DABCO

3.1.3. Laboratorijski pribor

Tablica 2. Popis korištenog laboratorijskog pribora.

Laboratorijski pribor	Proizvođač
adhezivni film za PCR ploču (MicroAmp Optical Adhesive Film)	Applied Biosystems, SAD
ampule za smrzavanje stanica	Greiner Bio-One, Austrija
bočice za ultracentrifugiranje	Thermo Scientific, SAD
epruvete od 0,5, 1,5 i 2 mL	Greiner Bio-One, Austrija

epruvete za FACS	Falcon, SAD
epruvete za PCR	Greiner Bio-One, Austrija
filter papir za prijenos proteina u Western blot analizi	Cytiva Amersham, UK
Ibidi 35-mm posude sa staklenim dnom	Ibidi GmbH, Njemačka
mehaničke automatske pipete	Gilson, SAD i Eppendorf, Njemačka
nastavci za pipete 10-1000 µl	Greiner, Frickenhausen, Njemačka
odmjerne menzure i tikvice	Neolab, Njemačka
PCR ploča	
Petrijeve posude za uzgoj kulture stanica (10 cm)	Greiner Bio-One, Austrija
Petrijeve posude za uzgoj kulture stanica (15 cm)	Greiner Bio-One, Austrija
Petrijeve posude za uzgoj kulture stanica (6 cm)	Greiner Bio-One, Austrija i TPP, Švicarska
pipete, sterilne plastične od 10 mL, Greiner Bio-One, Austrija	Greiner Bio-One, Austrija
ploče za kultivaciju bakterija (10 cm)	Greiner Bio-One, Austrija
ploče za uzgoj kulture stanica sa 6 jažica (za adherentne stanične kulture)	Greiner Bio-One, Austrija
ploče za uzgoj kulture stanica s 12 jažica (za adherentne stanične kulture)	Greiner Bio-One, Austrija
ploče za uzgoj kulture stanica s 24 jažica (za adherentne stanične kulture)	Greiner Bio-One, Austrija
ploče za uzgoj kulture stanica s 48 jažica (za adherentne stanične kulture)	Greiner Bio-One, Austrija
ploče za staničnu kulturu u supenziji s 12 jažica	Greiner Bio-One, Austrija
ploče za staničnu kulturu u supenziji s 24 jažica	Greiner Bio-One, Austrija
ploče kompatibilne za PCR s 96 jažica (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode)	Applied Biosystems, SAD
pokrovna stakalca 12 mm	Thermo Scientific, SAD
pokrovna stakalca 18 mm	Thermo Scientific, SAD
predmetna stakalca za mikroskopiju	Deltalab, Španjolska
transfer membrana za prijenos proteina PVDF 0,45 µM	Merck Milipore, Njemačka
staklene boce (100-1000 ml)	Schott, Njemačka
sterilne epruvete od 50 mL,	Greiner Bio-One, Austrija
strugač za stanice	Greiner Bio-One, Austrija

3.1.4. Protutijela

3.1.4.1. Primarna protutijela

Tijekom istraživanja koristili smo različita primarna protutijela (monoklonska ili poliklonska) za obilježavanje i vizualizaciju pojedinih virusnih (MCMV) i staničnih proteina od interesa te sekundarna protutijela. Monoklonska protutijela na MCMV proteine proizvedena su u Centru za proteomiku Sveučilišta u Rijeci. Monoklonsko protutijelo na mišji transferinski receptor (TfR, klon R17 217.1.3; ATCC TIB 219) korišten je kao supernatant hibridomske kulture koji je pročišćen afinitetnom kromatografijom (Zavod za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju, Medicinski fakultet u Rijeci).

Tablica 3. Popis primarnih protutijela koja prepoznaju stanične proteine.

Stanični protein kojeg protutijelo prepoznaje	Organizam u kojem je proizvedeno	Izotip protutijela	Kataloški broj	Proizvođač
ACAP2	miš	IgG ₁	sc-376150	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Aktin	miš	IgG ₁	MAB1501	Millipore, SAD
APPL1	kunić	IgG	3858S	Cell Signaling Technology, SAD
Arf6	kunić	IgG	5740S	Cell Signaling Technology, SAD
Brag2 (GEP-100)	kunić	IgG	orb183807	Biorbyt, UK
CD63 (Lamp3)	štakor	IgG _{2b}	D263-3	MBL, Japan
Cytohesin 1/2	miš	IgG ₁	MA1-062	Thermo Scientific, SAD
Cytohesin 1/2	miš	IgG ₁	sc-166542	Santa Cruz Biotechnology, SAD
EEA1	kunić	IgG	3288	Cell Signaling Technology, SAD
EPI64 (TBC1D10A)	miš	IgG ₁	sc-376991	Santa Cruz Biotechnology, SAD
EPI64 (TBC1D10A)	kunić	IgG	orb313370	Biorbyt, UK
EHD1	kunić	IgG	ab109311	Abcam, UK
GM130	miš	IgG ₁	610823	BD Biosciences, SAD
Golgin-97	kunić	IgG	Ab84340	Abcam, UK
Grasp55	miš	IgG _{2b}	MA5-24642	Invitrogen (BD Biosciences), SAD
Hemaglutinin	kunić	IgG	51064-2-AP	Proteintech, SAD
Hemaglutinin	pilić	IgG	Ab9111	Abcam, UK

HRS	kunić	IgG	15087S	Cell Signaling Technology, SAD
Lamp1 / CD107a	štakor	IgG	553792	BD Biosciences, SAD
LC3	štakor	IgG	PM036	MBL, Japan
Mical-L1	kunić	IgG	orb526405	Biorbyt, UK
p62 (SQSTM1)	miš	IgG _{2a}	H00008878-M01	Abnova, Tajvan
PIKFYVE	kunić	IgG	LS-C119339	LS Bio, SAD
PSD (EFA-6)	miš	IgG ₁	sc-32290	Santa Cruz Biotechnology, SAD
PSD (EFA-6)	kunić	IgG	PA5-31153	Invitrogen (BD Biosciences), SAD
Rab3a	kunić	IgG	3930S	Cell Signaling Technology, SAD
Rab5	kunić	IgG	3547S	Cell Signaling Technology, SAD
Rab6	kunić	IgG	9625S	Cell Signaling Technology, SAD
Rab7	kunić	IgG	9367S	Cell Signaling Technology, SAD
Rab8a	miš	IgG ₁	sc-81909	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Rab9a	kunić	IgG	5118S	Cell Signaling Technology, SAD
Rab10	kunić	IgG	8127S	Cell Signaling Technology, SAD
Rab11	kunić	IgG	5589S	Cell Signaling Technology, SAD
Rab13	kunić	IgG	orb36847	Biorbyt, UK
Rab14	kunić	IgG	NBP1-84720	Novus Biologicals, SAD
Rab15	kunić	IgG	orb326053	Biorbyt, UK
Rab15	kunić	IgG	orb772987	Biorbyt, UK
Rab18	miš	IgG ₁	sc-393168	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Rab22a	kunić	IgG	LS-C112063	LS Bio, SAD
Rab24	miš	IgG ₁	612174	BD Biosciences, SAD
Rab27a	miš	IgG ₁	ab55667	Abcam, UK
Rab27b	kunić	IgG	ABS1026	Millipore, SAD
Rab31	kunić	IgG	LS-C186716	LS Bio, SAD

Rab32	miš	IgG ₁	sc-390178	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Rab35	kunić	IgG	MBP2-20042	Novus Biologicals, SAD
Rab41	kunić	IgG	orb312858	LS Bio, SAD
Rabin8 (Rab3IP)	kunić	IgG	12321-1-1AP	Proteintech, SAD
SNX3	kunić	IgG	10772-1-AP	Proteintech, SAD
Syntaxin 7	kunić	IgG	12323-1-AP	Proteintech, SAD
TGN38	kunić	IgG	NBP1-03495	Novus Biologicals, SAD
TGN38	miš	IgG ₁	NB300-575	Novus Biologicals, SAD
Vt1a	miš	IgG ₁	611220	BD Biosciences, SAD
VPS24	kunić	IgG	LS-C94080	LS Bio, SAD
VPS34	kunić	IgG	4263S	Cell Signaling Technology, SAD
VPS35	kunić	IgG	ab157220	Abcam, UK
VPS35	miš	IgG _{2b}	sc-374372	Santa Cruz Biotechnology, SAD

Tablica 4. Popis primarnih protutijela koja prepoznaju MCMV proteine. Proizvođač klona CROMA101, CROMA103 i CROMA229 je Zavod za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju, Sveučilišta u Rijeci. Proizvođač svih ostalih protutijela je Centar za proteomiku, Sveučilišta u Rijeci.

MCMV protein	Organizam u kojem je proizvedeno	Izotip	Klon hibridoma	Kataloški broj
m123/IE1	miš	IgG ₁	klon CROMA101, supernatant hibridomske kulture	/
m123/IE1	miš	IgG _{2a}	klon IE1.01	HR-MCMV-12
M112M-113/E1	miš	IgG ₁	klon CROMA103, supernatant hibridomske kulture	/
M112-113/E1	miš	IgG ₁	klon CROMA103	HR-MCMV-07
M25	miš	IgG ₁	klon M25C.01	HR-MCMV-03
M57	miš	IgG	klon M57.02	HR-MCMV-06
m06	miš	IgG ₁	klon CROMA229, supernatant hibridomske kulture	/
m06	miš	IgG ₁	klon CROMA229	HR-MCMV-02
M55/gB	miš	IgG _{2a}	klon M55.02	HR-MCMV-14
M55/gB	miš	IgG _{2b}	klon M55.01	HR-MCMV-05
M116	miš	IgG ₁	klon 116.02	HR-MCMV-20

M74	miš	IgG1	klon M74.01	/
-----	-----	------	-------------	---

3.1.4.2. Sekundarna protutijela

Tablica 5. Popis korištenih sekundarnih protutijela.

Sekundarno protutijelo	Konjugat	Kataloški broj	Proizvođač
protu-kunići IgG, kozje protutijelo	Peroksidaza	111-035-003	Jackson Laboratories, SAD
protu-kunići IgG, kozje protutijelo	Alexa Fluor 488	A11008	Invitrogen, SAD
protu-kunići IgG, kozje protutijelo	Alexa Fluor 555	A21429	Invitrogen, SAD
protu-kunići IgG, kozje protutijelo	Alexa Fluor 594	A11012	Invitrogen, SAD
protu-mišji IgG, kozje protutijelo	Peroksidaza	115-035-003	Jackson Laboratories, SAD
protu-mišji IgG1, kozje protutijelo	Alexa Fluor 488	A21121	Invitrogen, SAD
protu-mišji IgG1, kozje protutijelo	Alexa Fluor 555	A21127	Invitrogen, SAD
protu-mišji IgG1, kozje protutijelo	Alexa Fluor 594	A21125	Invitrogen, SAD
protu-mišji IgG1, kozje protutijelo	Alexa Fluor 680	115-627-185	Jackson Laboratories, SAD
protu-mišji IgG2a, kozje protutijelo	Alexa Fluor 488	A21131	Invitrogen, SAD
protu-mišji IgG2a, kozje protutijelo	Alexa Fluor 555	A21137	Invitrogen, SAD
protu-mišji IgG2a, kozje protutijelo	Alexa Fluor 680	115-627-186	Jackson Laboratories, SAD
protu-pilići IgG, kozje protutijelo	Alexa Fluor 488	A11039	Invitrogen, SAD
protu-pilići IgG, kozje protutijelo	Alexa Fluor 555	A21437	Invitrogen, SAD
protu-štakorski IgG, kozje protutijelo	Alexa Fluor 488	A11006	Life Technologies, SAD
protu-štakorski IgG, kozje protutijelo	Alexa Fluor 555	A21434	Life Technologies, SAD
protu-štakorski IgG, kozje protutijelo	Peroksidaza	112-035-003	Jackson Laboratories, SAD

3.1.5. Kratke RNA sekvence (siRNA) za utišavanje proteina

Tablica 6. Popis korištenih siRNA sekvenci.

Specifičnost / siRNA	Kataloški broj	Proizvođač
Nespecifična / negativna kontrolna siRNA (scrambled siRNA)	1022076	Qiagen, Njemačka
Akt1	sc-29196	Santa Cruz Biotechnology, SAD
DENND4a	sc-143002	Santa Cruz Biotechnology, SAD
EHBP1	sc-144602	Santa Cruz Biotechnology, SAD
EHD1	L-040747-01-0005	Dharmacon, SAD
γ 1-Adaptin	sc-29579	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Klatrin (teški lanac)	sc-35066	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Mical-L1	L-049952-00-0005	Dharmacon, SAD
PACIN2	sc-36174	Santa Cruz Biotechnology, SAD
PIK3C2alfa	sc-61341	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Rab8a	sc-41829	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Rab11a	si-1= s100211729	Qiagen, Njemačka
Rab15	sc-152628	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Rab18	sc-76317	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Rab3IP (Rabin8)	sc-152666	Santa Cruz Biotechnology, SAD
SEC22B	sc-153306	Santa Cruz Biotechnology, SAD
SGK3	sc-44853	Santa Cruz Biotechnology, SAD
SNX1	sc-41346	Santa Cruz Biotechnology, SAD
SNX2	sc-41350	Santa Cruz Biotechnology, SAD
SNX3	sc-41352	Santa Cruz Biotechnology, SAD
SNX4	si-1= SI00231798	Qiagen, Njemačka
SNX17	sc-61588	Santa Cruz Biotechnology, SAD
SNX27	si-7= SI04939543	Qiagen, Njemačka
Syntaxin 12 (STX12)	sc-106585	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Vamp2	sc-43520	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Vamp3	sc-41339	Santa Cruz Biotechnology, SAD
VPS35	sc-63219	Santa Cruz Biotechnology, SAD
v-SNARE Vtila	sc-154965	Santa Cruz Biotechnology, SAD
WASHC1	L-054931-01-0005	Dharmacon, SAD

3.1.6. Plazmidi

Tablica 7. Popis korištenih plazmida.

Naziv plazmida	Primjena plazmida	Proizvođač plazmida
kontrolni shRNA plazmid-A	Lentivirusni vektor koji kodira shRNA sekvencu koja neće dovesti do specifične degradacije	Santa Cruz Biotechnology, SAD, sc-108060
SNX3 shRNA plazmid	Skup od tri lentivirusna vektora od kojih svaki kodira ciljno specifične shRNA, dizajnirane za obaranje ekspresije gena	Santa Cruz Biotechnology, SAD, sc-41352-SH

3.1.7. Stanične linije

Istraživačke aktivnosti su provedene na staničnim linijama mišjih fibroblasta tj. na imortaliziranim Balb3T3 (engl. *American Type Culture Collection*, ATCC CCL-163) i NIH3T3 (ATCC CRL-1658) stanicama koje su bile dostupne na Zavodu za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju, Sveučilišta u Rijeci. Za kolokalizacijske analize su korištene NIH3T3 stanične linije s doksiciklin inducibilnom ekspresijom EGFP-mSNX27 (NIH3T3-pEGFP-mSNX27) [191] i EGFP-Rab10 (NIH3T3-pEGFP-Rab10) [179] transgena. Osim toga, koristili smo primarne mišje embrionalne fibroblaste (engl. *murine embryonic fibroblasts*, MEF) koje smo izolirali iz 17 dana starih embrija Balb/c soja miševa za proizvodnju virusa i izvedbu plak eseja.

3.1.8. Mišji citomegalovirus

Korišten je divlji tip MCMV-a (engl. *wild type*, wt) dobiven iz umjetnog bakterijskog kromosoma (engl. *bacterial artificial chromosome*, BAC) koji sadrži genom divljeg tipa MCMV-a (Smith soj). Osim MCMV-wt, korišteni su sljedeći rekombinantni mišji citomegalovirusi: $\Delta m138$ -MCMV (Δ MC95.15), C3X-GFP-MCMV i S-mCherry-SCP MCMV. $\Delta m138$ -MCMV-u je uklonjen fcr1 (m138) gen, stoga ne može vezati Fc fragment imunoglobulina G (IgG). Naime, depletirani m138 virusni gen kodira za virusni protein nalik Fc receptoru što posljedično sprječava nespecifično vezanje protutijela od strane virusa [260]. U virusu C3X-GFP-MCMV gen za GFP (engl. *green fluorescent protein*) je pod kontrolom promotora za virusni protein IE1, stoga je izražaj GFP proteina indikator translacije IE1 [261]. Koristio se za praćenje progresije MCMV infekcije tijekom rane faze protočnom citometrijom. Za praćenje MCMV kapsida tijekom kasne faze infekcije, koristio se S-mCherry-SCP MCMV s fluorescentno obilježenim (mCherry) malim kapsidnim proteinom (engl. *small capsid protein*, SCP) koji je inkorporiran u novonastale nukleokapside tijekom kasne faze infekcije [262]. Popis i kratak opis korištenih virusa naveden je u tablici 8.

Tablica 8. Popis korištenih virusa.

Virus	Opis	Referenca
MCMV-wt	Divlji tip virusa, laboratorijski soj dobiven iz BAC-a pSM3fr	[263]
<i>Δm138</i>-MCMV (<i>ΔMC95.15</i>)	Konstruiran na MCMV-wt VR-194 uklanjanjem virusnog gena m138 koji kodira virusni protein nalik Fc receptoru.	[264]
C3X-GFP-MCMV	Gen za GFP je pod kontrolom promotora za virusni protein IE1. Izražaj GFP proteina je indikator translacije IE1.	[261]
S-mCherry-SCP MCMV	Mali kapsidni protein m48.2 koji se inkorporira u novonastale kapside tijekom kasne faze infekcije je obilježen s mCherry.	[262]

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj staničnih linija

Stanične linije Balb3T3, NIH3T3, NIH3T3-pEGFP-mSNX27, NIH3T3-pEGFP-Rab10 i MEF su uzgajane u plastičnim Petrijevim posudama u hranjivom DMEM-mediju pri temperaturi od 37°C i uz prisutnost 5% CO₂. Medij je prije korištenja nadopunjen s 2 mM L-glutaminom, 1x10⁵ U/L penicilina, 0,1 g/L streptomycin sulfata te 5% (v/v) (MEF) ili 10% (v/v) (ostale stanične linije) fetalnim goveđim serumom. Nakon postizanja konfluentnosti od 80%, fibroblasti su odvojeni od podloge procesom tripsinizacije u nove ploče za daljnje uzgajanje.

3.2.2. Uzgoj hibridomskih linija i proizvodnja monoklonskih protutijela

U potpunom 10% RPMI 1640 mediju u plastičnim bočicama su uzgajane neadherentne stanice hibridoma (CROMA101, CROMA103, CROMA229), na temperaturi od 37°C uz 5% CO₂. U svrhu izlučivanja najveće koncentracije protutijela, hibridomske linije su uzgajane do visoke gustoće (procjena 100% konfluentnosti promatrana pod invertnim mikroskopom) nakon čega su se sakupljali supernatanti koji su se nakon testiranja pohranili pri -20°C do uporabe. Za dugoročno čuvanje, stanice hibridoma su zamrznute u mediju za smrzavanje i pohranjene u tekućem dušiku.

3.2.3. Proizvodnja mišjih embrionalnih fibroblasta

Između 17. i 19. dana trudnoće su žrtvovane ženke Balb/c miševa u atmosferi zasićenoj s CO₂, a fetusi su sterilno izvađeni iz maternice. Uslijedilo je odstranjivanje posteljice, pupčane vrpce i utrobe. Fetusi su usitnjeni protiskivanjem kroz željeznu mrežicu i enzimski razgrađeni tripsinom pri temperaturi od 37°C tijekom 60 minuta, uz neprekidno miješanje na magnetnoj miješalici. Uslijedila je filtracija pokupljenih stanica i tripsina (bez tkiva) uz dodatak hladnog 5% DMEM medija kroz metalnu mrežicu.

Suspenzija se centrifugirala 10 minuta pri 450 x g. Nakon ispiranja taloga u 5% DMEM mediju, naseljeno je 20×10^6 stanica u 15 cm Petrijevu posudu za uzgoj stanica. Za uklanjanje eritrocita i neadherentnih stanica je idućeg dana medij zamijenjen novim 5% DMEM-om. Nakon postizanja potpune konfluentnosti (otprilike tri dana rasta), stanice MEF-a su zamrznute na temperaturu od -80°C , a po alikvotu se smrznulo 5×10^6 stanica [265].

3.2.4. Proizvodnja i određivanje titra virusa

Stanice MEF-a su inficirane MCMV-om u količini od 0,01 PFU/stanici (engl. *plaque forming units*), nakon čega su inkubirane pri 37°C dok se nisu potpuno zaokružile (otprilike pet dana). Nakon zaokruživanja je pokupljen medij u kojem su rasle stanice, centrifugiran na 500 x g tijekom deset minuta, te se dobiveni supernatant dodatno ultracentrifugirao (ultracentrifuga Thermo Fisher Scientific) na 50 000 x g, 90 minuta, na $+4^{\circ}\text{C}$. Dobiveni virusni talog se pročistio od preostalih staničnih ostataka ultracentrifugiranjem nadslojavanjem nad 15% saharozu (70 000 x g, 90 minuta, 4°C) te je potom otopljen u 1 mL sterilnog PBS-a. Dobivena suspenzija se pohranila na temperaturi od -80°C u alikvotima po 25 μl [10]. Titar virusa se određivao testom virusnih plakova.

Na stanicama MEF-a testom virusnih plakova (engl. *viral plaque assay*) se određivao titar virusa [266]. Osnova ovog testa je mjerenje mogućnosti jedne infektivne čestice da stvori čistinu u staničnom monosloju, odnosno plak. Na ploču za staničnu kulturu od 48 jažica su nasadene stanice MEF-a (5×10^4 stanica/jažici). Idući dan je na stanice dodana virusna suspenzija ispitivanog virusa u razrjeđenju od 10^3 do 10^{10} puta u triplikatu. Ploče su centrifugirane na 800 x g, 30 minuta i zatim inkubirane na 37°C pri 5% CO_2 . Nakon minimalno 30 minuta inkubacije, jažice su prelivene viskoznom medijem metil-celuloze u svrhu onemogućavanja širenja virusa kroz medij nakon lize zaražene stanice. Nakon dodatka navedenog medija, ploče su se inkubirale na 37°C pri 5% CO_2 tijekom četiri dana. Pomoću invertnog mikroskopa (Olympus DP50 CKX41, Olympus Optical Company, Japan) smo brojali virusne plakove u jažicama gdje svaki plak odgovara jednoj infektivnoj jedinici virusa, odnosno jednoj virusnoj čestici (PFU) [267]. Koncentracija proizvedenog virusa se odredila s obzirom na razrjeđenje uzorka virusa u kojima su izbrojani virusni plakovi. Titar je izražen u jedinicama PFU po jedinici volumena (PFU/mL).

3.2.5. Infekcija stanica mišjim citomegalovirusom

Jedan dan prije planirane infekcije, stanice su naseljene u odgovarajuće ploče za uzgoj kulture stanica, ovisno o eksperimentu. Medij u kojem su uzgajane stanice je aspiriran, a dodan je hladni kompletni DMEM medij s virusom u koncentraciji 1 PFU/stanici. Ploče su centrifugirane na 800 x g (centrifuge Thermo Scientific Heraeus, SAD, i Hettich Zentrifugen Rotina 420R, Njemačka) tijekom 30 minuta (2 puta po 15 minuta u suprotnim smjerovima), čime se postiglo povećanje učinkovitosti infekcije za oko 10 puta (engl. *multiplicity of infection*, MOI) [10]. Po završetku centrifugiranja, stanice

su vraćene u inkubator na 37°C pri 5% CO₂, a ta vremenska točka se koristila kao početno odnosno nultlo vrijeme kod određivanja trajanja infekcije (engl. *hours post infection*, hpi).

3.2.6. Utišavanje izražaja staničnih proteina pomoću malih interferirajućih RNA

Korištenjem malih interferirajućih RNA sekvenci (engl. *small interfering RNA*, siRNA), utišao se izražaj odabranih staničnih proteina koji su bitni za fiziologiju staničnih odjeljaka u svrhu ispitivanja njihovog značaja tijekom infekcije. Fibroblasti su transficirani s kontrolnom i gen-specifičnom siRNA u odgovarajućim koncentracijama (20, 40 ili 80 nM). Razina utišavanja korištenjem siRNA je testirana western blot analizom. U eksperimentima se koristila obrnuta transfekcija (engl. *reverse transfection*). U ploči za uzgoj stanica s 12 ili 24 jažica je prvo dodan Opti-MEM medij zajedno sa siRNA od interesa ili kontrolnom siRNA koja je mješavina nespecifičnih sekvenci (engl. *scrambled*, Scr). Ploča se ostavlja 10 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega se u svaku jažicu dodaje transfekcijski reagens Lipofectamine RNAiMAX prema uputama proizvođača. Ploča se ponovno ostavlja na sobnoj temperaturi 20 minuta u svrhu stvaranja kompleksa siRNA s lipidnim nosačima. Nakon 20 minuta, na ploču s 12 jažica se dodaje 30 000 stanica, a na ploču s 24 jažice se dodaje 17 000 u 10% DMEM mediju bez antibiotika kap po kap. Stanice su podvrgnute daljnjim analizama 48 sati nakon transfekcije.

3.2.7. Utišavanje izražaja staničnih proteina pomoću RNA sa strukturom ukosnice

Stabilne NIH3T3 stanične linije su pripremljene transfekcijom plazmida koji kodira RNA sekvence sa strukturom ukosnice (engl. *small hairpin RNA*, shRNA). Korišten je kontrolni shRNA plazmid koji kodira nespecifične shRNA sekvence (Scr) za shScr staničnu liniju i transfekcijom SNX3 shRNA plazmida za utišavanje SNX3 (shSNX3 stanična linija) zajedno s reagensom za transfekciju plazmida prema uputama proizvođača. 48 sati nakon transfekcije na ploči sa šest jažica, postojeći medij je zamijenjen sa svježe pripremljenim koji je sadržavao 2,5 µg/mL puromicina u cilju odabiranja stabilno transficiranih stanica. Nakon sedam do deset dana, kolonije su pikirane vrškom nastavka i prenesene na ploču s 96 jažica. Nakon postizanja 90% konfluentnosti, tri stanične linije su dalje kultivirane u ploči s 24 jažice nakon čega su podvrgnute western blot analizi za kvantifikaciju ekspresije SNX3. Onaj klon koji je pokazao najveće utišavanje je kultiviran dalje u mediju s 1 µg/mL puromicina i korišten je u eksperimentima. Razina utišavanja se pratila western blot analizom pri svakom setu pokusa.

3.2.8. Kvantifikacija unutar- i izvanstaničnih virusnih čestica testom virusnih plakova

Proizvodnja unutarstaničnih i izvanstaničnih virusnih čestica je analizirana nakon utišavanja staničnih proteina od interesa. Nakon utišavanja koristeći siRNA ili naseljavanja shSNX3 stanične linije u ploču za kulturu tkiva s 24 jažice, stanice su inficirane virusom Δm138-MCMV-om. Tri sata nakon infekcije stanicama je dodan citratni pufer na tri minute za inaktivaciju izvanstaničnog virusa [268,269]. Stanice su zatim isprane tri puta s 10% DMEM-om. Inkubacija je nastavljena idućih 48 sati nakon čega

su zasebno sakupljeni supernatanti i preostale stanice. Supernatanti su očišćeni od staničnih ostataka kratkim centrifugiranjem na 300 x g, 5 minuta (centrifuga Eppendorf, Njemačka). Preostale stanice su kratko tripsinizirane i resuspendirane u 1 mL svježeg medija. Stanice su lizirane tijekom tri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja u cilju ekstrakcije unutarstaničnih viriona [270–272]. Ponovljen je postupak centrifugiranja kao i kod supernatanta, a na talog je dodan 1 mL 10% DMEM-a. Kvantifikacija virusnih čestica je provedena testom virusnih plakova koji je detaljno opisan u poglavlju 3.2.4. Svaki eksperiment napravljen je u duplikatu i ponovljen minimalno tri puta.

3.2.9. Protočna citometrija

Protočna citometrija je provedena pomoću FACSCalibur protočnog citometra (Becton Dickinson & Co, San Jose, CA, SAD) na 5000 ili 10 000 živih stanica. Mrtve stanice iz uzorka su isključene iz analize na osnovu emisije crvene boje propidijevog jodida (PI) kojeg je dodano 200 µl obzirom da PI obilježava staničnu DNA te može ući jedino u mrtve stanice [273]. Analiza stanica provodila se pomoću programa CellQuestPro, dok je grafička obrada rezultata vršena u programu WinMDI 2.8.

3.2.9.1. Detekcija stanica inficiranih s C3X-GFP-MCMV

U svrhu praćenja progresije rane faze MCMV infekcije, shSNX3 i shScr stanične linije smo uzgojili u pločama s 12 jažica i idući dan ih inficirali rekombinantnim virusom C3X-GFP-MCMV. Odmah po infekciji (0 hpi), kao i 6, odnosno 24 hpi, stanice su odvojene od podloge kratkom tripsinizacijom, centrifugirane 5 min na 300 x g (centrifuga Thermo Scientific Heraeus, SAD ili Hettich Zentrifugen Rotina 420R, Njemačka), isprane u FACS puferu, resuspendirane u 200 µl propidij jodida koncentracije 1 µg/ml i analizirane na protočnom citometru. S obzirom da je u C3X-GFP-MCMV gen za GFP (engl. *green fluorescent protein*) pod kontrolom promotora za virusni protein IE1, izražaj GFP proteina je indikator translacije IE1. Srednji intenzitet fluorescencije (engl. *mean fluorescence intensity*, MFI) GFP-a u određenoj staničnoj populaciji je mjera uspostavljene infekcije. Rezultati su prikazani kao histogrami koji prikazuju učestalost broja stanica prema intenzitetu fluorescencije, odnosno kao grafički prikaz postotka zastupljenosti GFP pozitivnih stanica u određenom vremenskom periodu. Pri računanju je srednji intenzitet fluorescencije bio umanjen za odgovarajuću vrijednost negativne kontrole (rezultat uzorka stanica odmah nakon infekcije, 0 hpi).

3.2.9.2. Površinska ekspresija virusnog glikoproteina B/pM55

U cilju ispitivanja površinskog izražaja virusnog glikoproteina B (pM55), naseljene su shScr i shSNX3 stanične linije na ploče s 12 jažica. Idući dan su stanice sakupljene (neinficirani uzorci) ili inficirane s Δm138-MCMV do 24, 48 i 72 hpi. Neinficirane odnosno inficirane stanice su kratko tripsinizirane, centrifugirane 5 minuta pri 300 x g i isprane u FACS puferu. U 100 µL FACS pufera je

dodano primarno anti-pM55/gB protutijelo (klon M55.02) na 50 minuta, na +4°C. Zatim slijedi ispiranje i dodavanje sekundarnog protu-mišjeg IgG_{2a} protutijela Alexa Fluor 488 (1:300) u FACS puferu na 40 minuta i +4°C. Zadnji korak je ponovno ispiranje stanica i dodavanje 200 µl propidij jodida. Rezultati su prikazani kao što je opisano u prethodnom poglavlju (3.2.9.1.), a kao negativne kontrole su korištene neinficirane stanice i stanice inkubirane samo sa sekundarnim protutijelom.

3.2.10. Imunofluorescentna i konfokalna mikroskopija

Imunofluorescencija na staklu i konfokalna mikroskopija su metode korištene za ispitivanje unutarstaničnog izražaja virusnih i staničnih molekula. Adherentne neinficirane i inficirane stanice su uzgajane na pločama s 24 jažice sa steriliziranim pokrovnim stakalcima. Nakon fiksacije s 4% PFA (paraformaldehid) 20 minuta na sobnoj temperaturi, stanice su permeabilizirane s 1% Tween-om 20 u PBS-u, 20 minuta na 37°C. Primarna protutijela su dodana u 1% Tween-u 20, 90 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, kao i odgovarajuća sekundarna protutijela obilježena fluorokromom, koja su se inkubirala 60 minuta. DAPI razrijeđen u PBS-u (1:1000) je korišten za bojanje jezgre, 5 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Između svakog koraka su stanice isprane tri puta PBS-om. Nakon zadnjeg ispiranja, stanice su uklopljene na predmetna stakalca u Mowiol-u.

Preparati su vizualizirani fluorescencijskim mikroskopom Olympus BX51 (digitalna kamera DP72CCD, povećanje 400x) koristeći UPlanFL N 40x/0,75 objektiv i računalni softver cellSens Standard 1.15 (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan), Olympus Fluoview FV300 konfokalnim mikroskopom opremljenim s Ar 488, He/Ne 543 i He/Ne 633 laserima (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) i invertnim konfokalnim mikroskopom Leica DMI8 (konfokalni dio: TCS SP8; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Njemačka), opremljenim UV laserom (Diode 405 nm), Ar 488 nm, DPSS 561 nm i He/Ne 633 nm laserima. Slike slikane konfokalnim mikroskopom Olympus dobivene su korištenjem računalnog programa Fluoview, verzija 4.3 FV 300 (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan), objektiva PLAPO60xO, odgovarajućih filtera i PMT detektora. Konfokalni otvor postavljen je na 2. Z-serije optičkih presjeka od 0,5 µm snimljene su uzastopno srednjom brzinom skeniranja (1,65 s/sken). Slike uzoraka slikanih Leica DMI8 mikroskopom dobivene su pomoću računalnog programa LAS (Leica Application Suite) X (verzija 3.5.6.21594; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Njemačka), HC PLAPO CS2 objektiva (63 × 1,40 ulje) te 4 detektora (2 PMT i 2 visoke osjetljivosti HyD). Slike (512 x 512 piksela) su slikane na različitim povećanjima (faktor povećanja: 0,75x – 6x) s veličinom piksela od 481,47 nm x 481,47 nm do 60,18 nm x 60,18 nm. Svaki eksperiment je očitavan pod jednakim parametrima, referirajući se na kontrolne preparate, a nasumično je odabrano osam do deset stanica po preparatu te su slike prebačene u format TIFF. Za kvantifikacijske analize je prebrojano deset vidnih polja po preparatu, a rađena su najmanje tri eksperimenta.

3.2.10.1. Analiza slika uzoraka dobivenih konfokalnom mikroskopijom

Koncentrirani imunofluorescentni signal staničnih proteina unutar kuta $\alpha \leq 90^\circ$ ukazuje na prisutnost odjeljka za sklapanje viriona u inficiranim stanicama [190]. Postotak zaraženih stanica s razvijenim odjeljkom za sklapanje viriona određen je izravnim brojanjem najmanje deset vidnih polja po uzorku (200-400 stanica) pod fluorescencijskim mikroskopom Olympus BX51.

Za kolokalizaciju i određivanja intenziteta fluorescencije, slike veličine piksela 120,37 x 120,37 nm analizirane su pomoću FIJI programa (ImageJ 1.54f) (<https://imagej.net/software/fiji/>; pristupljeno 15.12.2024.) i dostupnih proširenja (engl. *plugins*). Crveni, zeleni i plavi kanali su podijeljeni i analizirano je najmanje 10-15 stanica u svakom eksperimentu. Kolokalizacija je kvantificirana izračunavanjem Mandersonovih koeficijenata preklapanja (M1 i M2) i Pearsonovog koeficijenta korelacije u cijeloj z-osi (8-12 konfokalnih rezova) pomoću dodatka BIOP JACoP (<https://github.com/BIOP/ijp-jacop-b>; pristupljeno 15.12.2024.) za 3D analizu [274]. U BIOP JACoP, Intermodos ili Otsu algoritam je korišten kao automatski prag (engl. *threshold*) za segmentaciju slike s definiranom regijom od interesa (engl. *region of interest*, ROI).

Kvantifikacija intenziteta fluorescencije pojedine stanice provedena je kao što je prethodno opisano [188,275]. Ukratko, površina (engl. *area*), integrirana gustoća (engl. *integrated density*) i srednja vrijednost sive (engl. *mean gray value*) su izmjereni nakon odabira ROI. Izračunavala se ukupna korigirana stanična fluorescencija (engl. *total corrected cell fluorescence*, TCCF) prema sljedećoj formuli: TCCF: integrirana gustoća – (površina odabrane stanice x srednja vrijednost fluorescencije pozadine).

3.2.11. Western blot analiza

Stanice su uzgajane na pločama za adherentne kulture s 12 jažica te su dan nakon naseljavanja inficirane. Uzorci su sakupljeni tijekom različitih kinetika (0, 6, 16, 24, 48 hpi) kratkom tripsinizacijom i ispiranjem u PBS-u. Na taloge je dodano 20 μ L po uzorku pufera za lizu (RIPA pufer) uz dodatak inhibitora degradacije proteina PMSF-a i koktela inhibitora. Uzorci su se inkubirali na ledu 45 minuta, uz vorteksiranje svakih 10-15 minuta za dobivanje ukupnog staničnog lizata proteina. Lizati su potom centrifugirani pri maksimalnoj brzini od 13 200 okretaja po minuti (4°C, 15 minuta), a pokupljeni supernatant je denaturiran na 95°C tijekom 10 minuta u otopini za denaturaciju u reducirajućim uvjetima dodatkom 5% 2-merkaptoetanolu.

Poliakrilamidni gelovi su pripremljeni dan ranije koristeći MiniPROTEAN Tetra (Bio-Rad, Hercules, SAD) sustav za izlijevanje gelova prema receptu ovisno o veličini proteina (koncentracija gela od 10-15%). Poliakrilamidnom gel elektroforezom (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) su razdvojeni pripremljeni lizati iz 80 000 NIH3T3 ili Balb3T3 stanica pri električnom naponu od 100V kroz sabijajući (engl. *stacking*) gel i 130V kroz razdvajajući (engl. *running*) gel (Bio-Rad PowerPac Universal, Hercules, USA) u 1x SDS-PAGE puferu. Kao kontrola

putovanja uzoraka kroz gel je korištena obojana mješavina markera proteina poznatih molekularnih masa.

PVDF membrana za blotiranje je aktivirana u metanolu (20 sekundi), isprana u demineraliziranoj vodi (2 minute) i ekvilibrirana u transfer puferu najmanje 10 minuta. Zatim je napravljen transfer u mokrim uvjetima pri konstantnom naponu od 80V u trajanju od 2h.

1x otopina za blokiranje je korištena za blokiranje slobodnih mjesta na PVDF membrani, tijekom jednog sata na sobnoj temperaturi. Membrana je inkubirana sa specifičnim primarnim protutijelima razrijeđenim (1:1000) u 0,5x otopini za blokiranje, preko noći na 4°C. Idući dan su membrane ispirane u otopini 0,05% v/v Tween 20 u TBS-u. Sekundarna protutijela konjugirana hrenovom peroksidazom (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) su razrijeđena (1:1000) u 0,5% otopini za blokiranje te inkubirana 60 minuta na sobnoj temperaturi.

Za detekciju signala je korišten reagens za kemiluminiscenciju i uređaji Transilluminator Alliance 4.7 11 (Uvitec Ltd., UK), ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare, Švedska) ili ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Švedska). Softveri ImageJ 1.53 i ImageQuantT (verzija 10.2., Cytiva) su korišteni za kvantitativnu analizu signala. Kao kontrola nanosa proteina je korišten β -aktin, a sve vrijednosti su normalizirane s obzirom na njegov signal. Faktor normalizacije aktina za pojedini uzorak je određen prema: vrijednost signala aktina pojedinog uzorka / najveći signal aktina na membrani. Normalizirani aktin je korišten za normalizaciju vrijednosti signala uzorka prema: vrijednost signala pojedinog uzorka / vrijednost normaliziranog aktina.

3.2.12. Izolacija RNA i kvantitativna lančana reakcija polimerazom

Pomoću kvantitativne lančane reakcije polimerazom (engl. *quantitative polymerase chain reaction*; *qPCR*) je određena razina transkripta nakon utišavanja SNX3. Ukupna stanična RNA je izolirana uporabom TRIzol-a. RNA se precipitirala izopropanolom, a talog se isprao etanolom. Koncentracija RNA se izmjerila pomoću NanoDrop spektrofotometra nakon čega je RNA prepisana u komplementarnu DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*, *cDNA*) koristeći kit za reverznu transkripciju. cDNA je korištena u reakciji qPCR-a za određivanje razine transkripta uporabom ABI Prism 7300 detekcijskog sustava (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Kao sustav detekcije je korišten Power SYBR™ Green PCR Master Mix, a za normalizaciju je korišten GAPDH. Kao kontrola infekcije je korišten virusni protein M86. Korištene početnice za SNX3, M86 [276] i GAPDH [277] (Metabion, Njemačka) su navedene u Tablici 8. Rezultati su prikazani kao $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrijednosti [278], izračunate kao razlika između $\Delta\Delta C_t$ vrijednosti utišane SNX stanične linije (shSNX3) i negativne kontrolne stanične linije (shScr). Rezultati RT-qPCR-a su prikazani u usporedbi s negativnom kontrolom koja ima vrijednost 1 tj. 100%.

Tablica 9. Popis korištenih početnica za RT-qPCR.

Gen	Početnice
SNX3	SNX3 Fwd: 5'-TGC GGC AGC TTC CTT TTA GA-3' SNX3 Rev: 5'-AGG ATG ACC AGC GAC CTT GT-3'
M86	M86 Fwd: 5'-GGT CGT GGG 349 CAG CTG GTT-3' M86 Rev: 5'-CCT ACA GCA CGG CGG AGA A-3'
GAPDH	GAPDH Fwd: 5'-CCA ATG TGT CCG TCG TGG ATC T-3' GAPDH Rev: 5'-GTT GAA GTC GCA GGA GAC AAC C-3'

3.2.13. Proizvodnja BioID2 fuzijskih rekombinantnih MCMV-a

BioID esej (engl. *proximity-dependent biotin identification assay*) može identificirati slabe i prolazne interakcije među proteinima [197]. Dodatkom biotina u medij za staničnu kulturu, proteini koji kolokaliziraju s konstruktom mogu biti biotinizirani, pročišćeni i analizirani masenom spektrometrijom. U suradnji s Centrom za proteomiku, izv. prof. dr. sc. Berislav Lisnić izradio je dva rekombinantna MCMV-a, u kojima se BioID2 i HA (hemaglutininski privjesak) fuzionirao na C-terminalni dio dva virusna glikoproteina: gB/M55 i m06. gB/M55 se nakuplja u citoplazmatskom odjeljku za sklapanje viriona i ulazi u sastav viriona, a m06 se također nalazi u odjeljku za sklapanje viriona, ali u različitim domenama od M55 i ne ulazi u sastav viriona. Sekvence fuzijski proteina te opis umnažanja i purifikacije rekombinantnih MCMV-a se nalaze u Priritku A.

3.2.14. Promatranje živih stanica upotrebom digitalne holotomografske mikroskopije

Za promatranje živih stanica korišten je digitalno holotomografski mikroskop u kombinaciji s epifluorescencijskim modulom, 3D Cell Explorer-*fluor* (CX-F, Nanolive, Ecublens, Švicarska) sa 60x objektivom pri valnoj duljini $\lambda = 520 \text{ nm}$ i snagom lasera od $0,2 \text{ nW}/\mu\text{m}^2$. DHTM uređaj korišten u ovom radu temelji se na kvantitativnoj faznoj mikroskopiji [279], pri kojoj se kompleksno valno polje objekta kodira u hologram. Lateralna rezolucija (x, y) holotomografije iznosi 200 nm, a aksijalna (z) 400 nm (3D slika). Lateralna rezolucija epifluorescencije iznosi približno 400 nm (2D slika). Pomoću *top-stage* inkubatora (Oko-lab, Pozzuoli, Italija) s grijanim staklenim poklopcem (za izbjegavanje kondenzacije) su održavani fiziološki uvjeti tijekom snimanja živih stanica pri konstantnoj temperaturi od 37°C, 90% relativne vlažnosti zraka i 5% CO₂ koncentracije. Za snimanje i slikanje je naseljeno 50 000 stanica u 35-mm Ibidi posudama sa staklenim dnom, u 10% DMEM mediju bez fenola crveno. Stanice su idući dan snimane ili inficirane virusom S-mCherry-SCP MCMV. Prije početka snimanja su Ibidi posude stavljene u inkubator kako bi se aklimatizirale. Slika indeksa loma je dobivena svakih dvije minute i 30 sekundi, u kombinaciji s epifluorescencijom svakih pet minuta. Parametri svih snimanja fluorescencije su jednaki (*gain* = 40%, *intensity* = 20%). Slike za segmentacijsku analizu su eksportirane u svojem izvornom (engl. *raw*) obliku bez uređivanja, u 2D TIFF *float* formatu (512 x 512 piksela),

koristeći program STEVE (verzija 1.6.3496) koji ujedno i kontrolira 3D Cell Explorer-*fluo*. Slike za vizualizaciju citopatogenih učinaka su uređene automatiziranim alatom unutar programa STEVE (engl. *post processing, auto bonds*) i eksportirane u .png obliku.

Za segmentiranje slika, TIFF datoteke se uvoze u alat temeljen na dubokom učenju (engl. *deep learning*) dizajniran za segmentaciju stanica, Cellpose 2.0 *human-in-the-loop* model (<https://www.cellpose.org/>, pristupljeno 15.02.2025) [280]. Segmentacija koju pruža Cellpose je služila kao početna točka za analizu nakon koje je ručno pregledavana svaka segmentirana stanica kako bismo osigurali točnost. Nakon ispravljanja segmentacije, vraćamo (engl. *feeding*) ispravljene segmentacije natrag u Cellpose model. Ovaj proces pomaže u pročišćavanju i poboljšanju rezultata daljnjih segmentacije jer model uči iz svojih pogrešaka. Nakon završetka segmentacije je stvorena maska za svaku stanicu u cilju jasnog definiranja granica svake stanice unutar slike. Pomoću alata za odabir područja od interesa (engl. *region of interest, ROI*), u ImageJ programu ekstrahiramo kvantitativne podatke iz segmentiranih stanica. Odabrani su sljedeći parametri: površina (engl. *area*), opseg (engl. *perimeter*), kružnost (engl. *circularity*), omjer između duže i kraće stanične osi (engl. *aspect ratio, AR*), elipsoidnost (engl. *roundness*) i solidnost (engl. *solidity*) [281].

Za automatiziranu 3D kvantifikaciju RI je korišten komercijalno dostupan softver EVE Analytics (besplatna *trial* 1.8.0. verzija), a korištene su neobrađene DHTM snimke u .vol formatu.

3.2.15. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka je provedena pomoću Mann-Whitney (U) testa ili Kruskal-Wallis testa s Dunnovim višestrukim usporedbama pomoću programa MedCalc (verzija 19.8.2). Statistička značajnost se određivala prema p vrijednosti, gdje se razlika smatrala značajnom kada je p vrijednost iznosila $< 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Eksperimenti su izvedeni najmanje tri puta, te su podaci izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD), dijagram raspršenosti (engl. *scatter plot*), kutijasti dijagram (engl. *box-and-whisker plot*) ili kao kombinacija posljednja dva pomoću Microsoft Office Excel programa (verzija 2016).

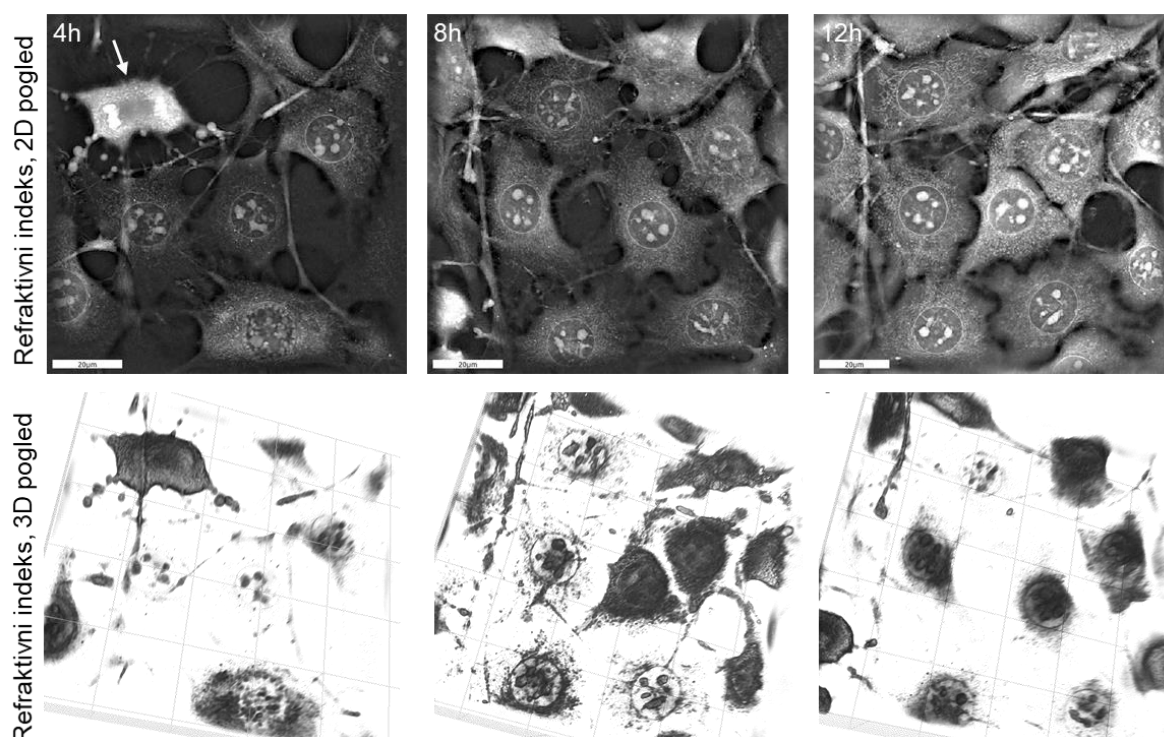
4. REZULTATI

4.1. Analiza citopatogenih učinaka citomegalovirusne infekcije korištenjem digitalne holotomografske mikroskopije (DHTM)

Jedinstvene morfološke promjene u inficiranim stanicama nazivaju se citopatogeni učinci [152]. Jedna od mikroskopija koja omogućava snimanje živih, neobilježenih uzoraka u stvarnom vremenu, ne stvarajući fototoksičnost, naziva se digitalna holotomografska mikroskopija (DHTM). U ovome radu smo koristili 3D holotomografski mikroskop s fluorescentnim modulom u cilju snimanja živih inficiranih stanica kroz dulji vremenski period. Stanice su inficirane virusom S-mCherry-SCP MCMV i snimane do 72. sata infekcije kako bismo kvantificirali promjene morfoloških parametara, karakterizirali stvaranje kapsida u jezgri i vizualizirali njihov izlazak u citoplazmu.

4.1.1. Uspostavljanje tehnologije DHTM

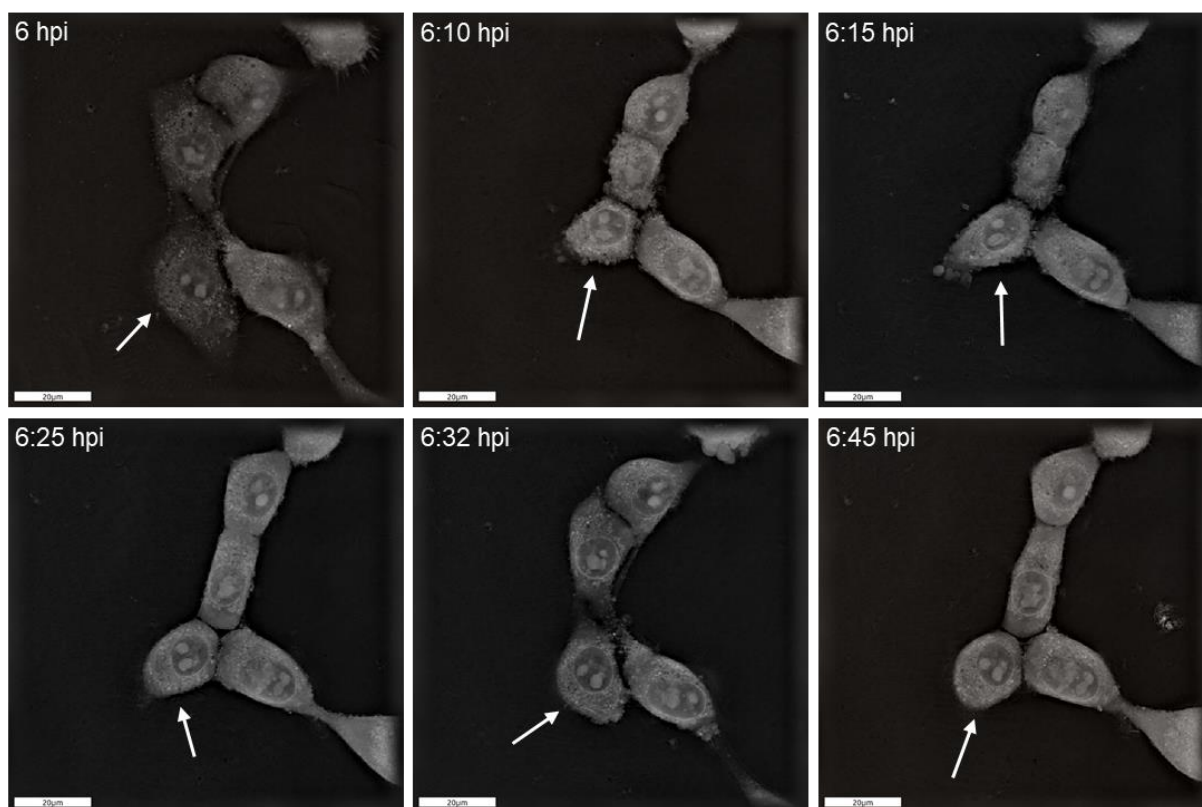
Za uspostavljanje tehnologije DHTM snimane su stanice NIH3T3 kako bi se utvrdili parametri snimanja i eventualni utjecaj sustava na vijabilnost stanica. Tijekom praćenja stanica na 4, 8 i 12 sati nakon početka snimanja, stanice su zadržale početni izgled i nastavile s mitozom te nije uočen nikakav štetan utjecaj na morfologiju i vijabilnost stanica (slika 11). Nakon optimizacije snimanja, uspostavili smo protokol koji uključuje intervalno snimanje stanica po 12 sati. . Učestalost akvizicije neobilježenih stanica, odnosno informacije refraktivnog indeksa (RI) je iznosila dvije minute i 30 sekundi (engl. *frame*) dok je TRITC (engl. *tetramethylrhodamine isothiocyanate*) fluorescencija uslikana svakih pet minuta odnosno svaki drugi *frame* zajedno s RI za vizualizaciju S-mCherry-SCP. Iz dobivenog filma nakon 12 sati snimanja, mogu se izdvojiti slike u željenoj vremenskoj točki.



Slika 11. Vremenski niz neoznačenih i neinficiranih NIH3T3 stanica. NIH3T3 stanice su snimane 12 sati pomoću DHTM-a s učestalošću od jedne slike svake dvije minute i 30 sekundi. Dioba stanica odvijala se normalno, a stanična struktura je ostala netaknuta. Strelicom je prikazana mitoza stanica. Prvi red slika predstavlja 2D prikaz refraktivnog indeksa, drugi red 3D prikaz.

4.1.2. Vizualizacija citopatogenih učinaka

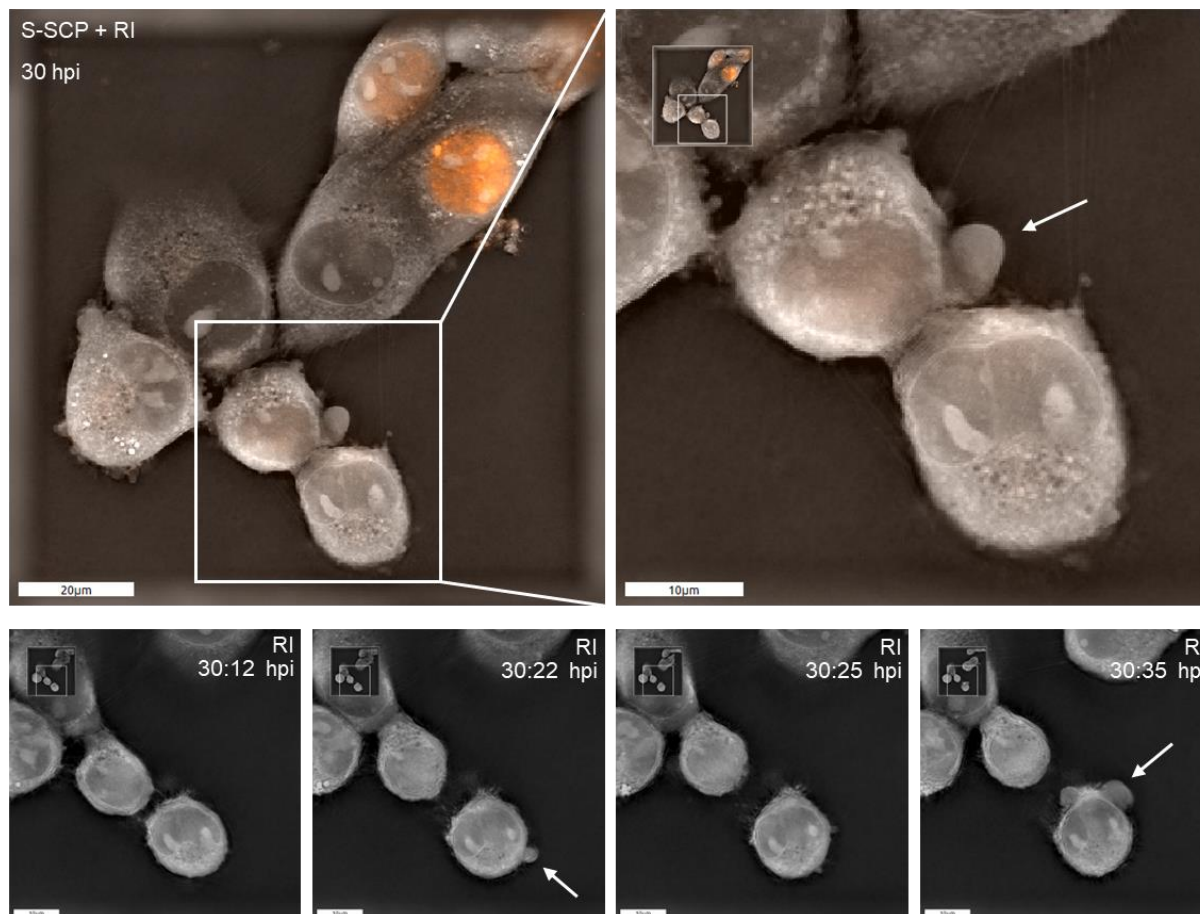
Za vizualizaciju citopatogenih učinaka virusa, inficirali smo NIH3T3 stanice S-mCherry-SCP MCMV i pratili promjene tehnologijom DHTM u razdoblju od 0-72 sata nakon infekcije. DHTM snimanjem smo uočili nekoliko ponavljajućih morfoloških promjena kod MCMV inficiranih stanica koje uključuju stanično zaokruživanje (slika 12), stvaranje mjehurića na plazmatskoj membrani (engl. *blebbing*) (slika 13), fuziju (slika 14) i lizu stanica (slika 15). Za razliku od neinficiranih fibroblasta koji su izduženog, nepravilnog oblika i sadrže ovalnu jezgru, rana faza infekcije uzrokuje zaokruživanje stanice (slika 12). Prikazane su stanice na 6 hpi kada je većina bila već djelomično zaobljena, a stanica označena strelicom se unutar 45 minuta potpuno zaokružila. Većina MCMV inficiranih stanica iskazuje zaokruženi oblik do početka kasne faze [83].



Slika 12. Prikaz zaokruživanja stanica inficiranih MCMV-om pomoću DHTM-a. NIH3T3 stanice su inficirane sa S-mCherry-S-SCP MCMV i kontinuirano snimane do 12 hpi u intervalima od 2.5 min za refraktivni indeks. Prikazan je vremenski period u ranoj fazi infekcije od 6 do 6:45 hpi. Mjerna crta, 20 µm

Nadalje, kroz infekciju, već u ranoj fazi smo uočili stvaranje mjehurića na plazmatskoj membrani stanice (engl. *blebbing*). Na slici 13 je prikazan *blebbing* u kasnoj fazi infekcije, točnije 30 hpi. Mjehurići (engl. *bleb*) plazma membrane su dinamične stanične izbočine regulirane citoskeletom koje su uključene u apoptozu, citokinezu i kretanje stanica [282]. U kontekstu virusne infekcije *blebbing*

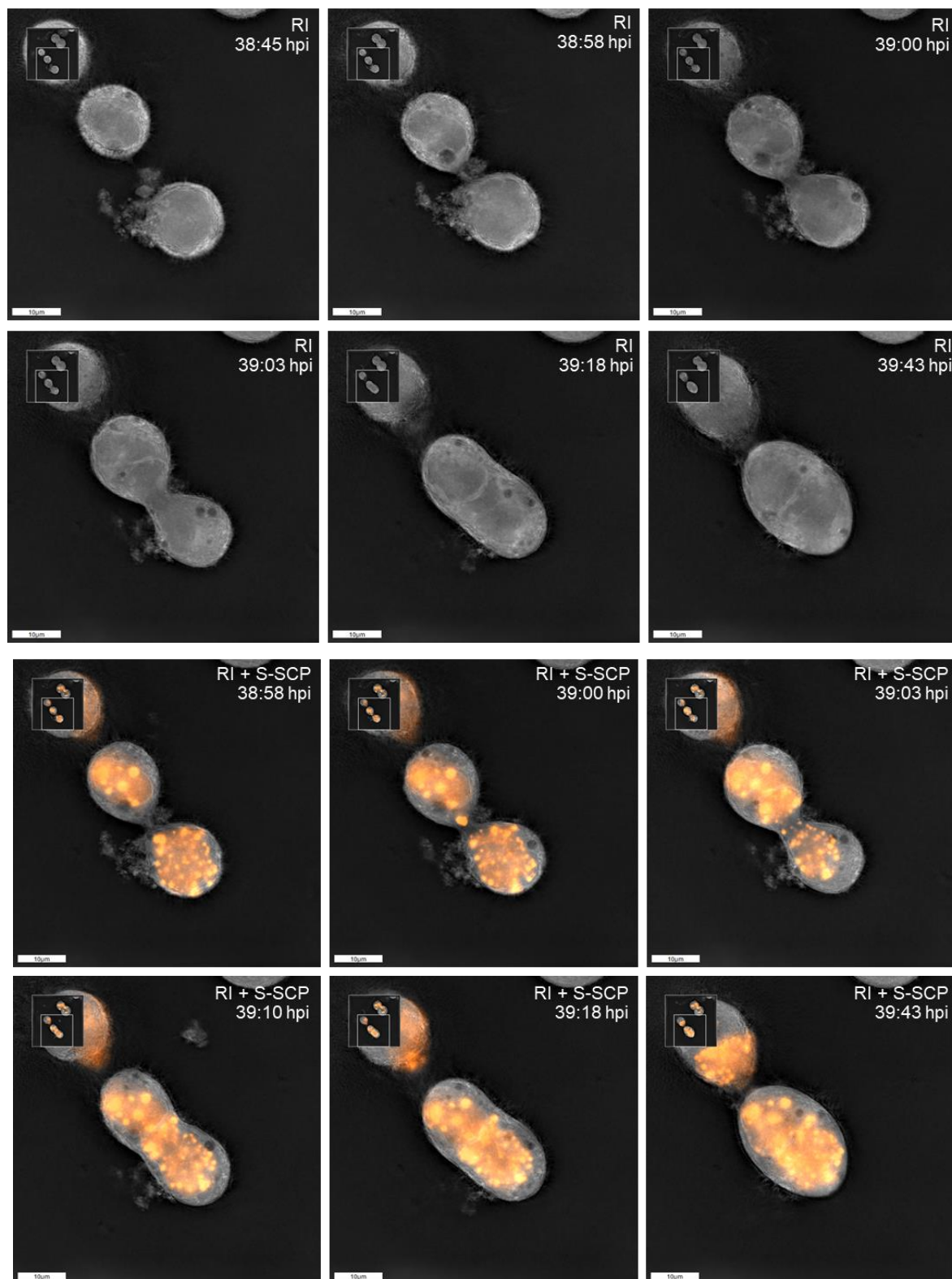
se povezuje uz apoptozu, kada se događaju karakteristične morfološke promjene uključujući smanjivanje stanice, oslobađanje vezikula, kondenzaciju i fragmentaciju kromatina [283]. Međutim, ove stanice nisu ušle u apoptozu jer su se u idućih deset sati fuzionirale i stvorile binuklearnu stanicu (Slika 14).



Slika 13. Prikaz stvaranja mjehurća (engl. *blebbing*) na staničnoj membrani NIH3T3 stanica inficiranih MCMV-om pomoću DHTM-a. NIH3T3 stanice su inficirane sa S-mCherry-S-SCP MCMV i kontinuirano snimane 12 sati u intervalima od 2,5 min za refraktivni indeks (RI) i 5 min za fluorescentni signal. Na slikama s preklopljenim RI i fluorescentnim signalom (gornji panel) su prikazane stanice koje su praćene tijekom procesa *blebbinga* u kasnoj fazi infekcije, od 30 hpi. Slike refraktivnog indeksa (donji panel) prikazuju dinamični procesa stvaranja mjehurića tijekom 35 minuta. Mjerne crte, 10 µm.

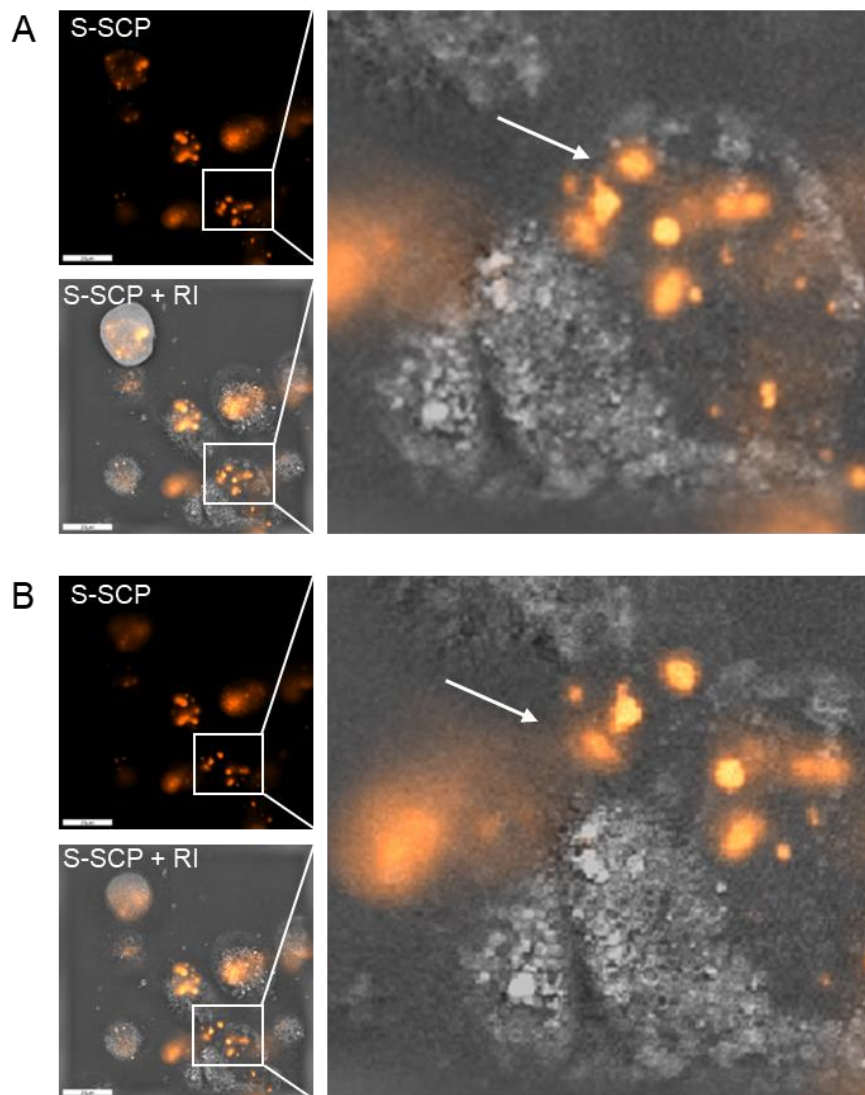
Slika 14 prikazuje nastavak inficiranih stanica s prethodne slike, počevši od 38 sati i 45 minuta infekcije. Prikazan je proces fuzije sa slikama refraktivnog indeksa te preklopa refraktivnog indeksa sa signalom S-SCP s obzirom da su stanice inficirane sa S-mCherry-S-SCP MCMV-om. Fuzija stanica temeljni je i složen proces koji se događa tijekom reprodukcije, rasta organa i tkiva, metastaza raka, imunološkog odgovora i infekcije. Virusni glikoproteini gB/pUL55, gH, gL i gO sudjeluju u fuziji, a smatra se da interakcije između virusnih glikoproteina na površini zaraženih stanica i staničnih receptora na

susjednim stanicama posreduju međustaničnom prijenosu virusa (engl. *cell-cell transmission*) [162]. Na slici 17 možemo vidjeti približavanje stanica i fuzioniranje membrana.



Slika 14. Prikaz stanične fuzije NIH3T3 stanica inficiranih MCMV-om pomoću DHTM-a. NIH3T3 stanice su inficirane sa S-mCherry-SCP MCMV i kontinuirano snimane 12 sati u intervalima od 2,5 min za refraktivni indeks i 5 min za fluorescentni signal. Prikazane su slike refraktivnog indeksa i preklopljenog refraktivnog indeksa s fluorescentnim signalom. Mjerne crte, 10 μm.

Fibroblasti su mjesto litičke replikacije mišjeg citomegalovirusa tijekom koje stanica puca [285], a virioni se ispuštaju u izvanstanični prostor u svrhu daljnjeg inficiranja stanica. Na slici 15 vidimo vjerojatno liziranu, a ne apoptotičku stanicu u kasnoj fazi infekcije. Na slici pod A vidimo kapside unutar stanice, a nakon dvije minute i 30 sekundi su kapside vidljive izvan stanice (Slika B).



Slika 15. Prikaz izlaska MCMV kapsida nakon vjerojatne stanične lize pomoću DHTM-a. Stanice su inficirane sa S-mCherry-S-SCP MCMV i kontinuirano snimane 12 sati u intervalima od 2,5 min za refraktivni indeks i 5 min za fluorescentni signal. Prikazane su slike fluorescentnog signala S-SCP i preklopljenog refraktivnog indeksa s fluorescentnim signalom. **(A)** Prikaz kaspida unutar stanice. **(B)** Prikaz kapsida izvan stanice. Mjerne crte, 20 μm .

4.1.3. Kvantifikacija staničnih morfoloških parametara tijekom replikacijskog ciklusa MCMV

Za kvantifikacije CPE korišteni su programi CellPose i ImageJ. Koristeći Cellpose su stanice segmentirane kroz fokalnu ravninu dok je ImageJ korišten za kvantifikaciju promjena morfoloških parametara tijekom infekcije. Stanice nisu snimane u intervalima od 12 sati, već smo svakih sat vremena slikali preparat sa živim stanicama kako bi postigli reprezentativan broj stanica za svaki sat. Broj stanica po satu je varirao od 60 do 80, što znači da je u svakom satu prosječno segmentirano 70 stanica, a ukupno

više od 4000. Odabrani parametri za kvantifikaciju su površina (engl. *area*), opseg (engl. *perimeter*), kružnost (engl. *circularity*), omjer između duže i kraće stanične osi (engl. *aspect ratio*, AR), elipsoidnost (engl. *roundness*) i solidnost (engl. *solidity*). Kao kontrola su korištene neinficirane (NI) stanice. Možemo primijetiti da se ta početna točka razlikuje od prve iduće vremenske točke odnosno 0 hpi (slika 16) vjerojatno zbog centrifugiranja stanica kao dijela standardnog protokola infekcije za postizanje MOI 10. Do četvrtog sata infekcije su vrijednosti parametara dosegle polovicu početne vrijednosti NI stanica.

Prosječne površine stanica po satu kroz infekciju nalaze se u rasponu od 311 do 571 μm^2 . Kroz infekciju primjećujemo trend porasta površine, iako ni u jednoj vremenskoj točki površina nije bila veća od one kod neinficiranih stanica. U nekoliko točaka (12, 21, 53 hpi) dolazi do pada u prosjeku površine nakon čega su uslijedile faze porasta s vrhuncima u točkama 18, 26, 48 i 63 hpi. Na 48 i 63 hpi je prosječna površina stanica dosegla maksimum (slika 16A).

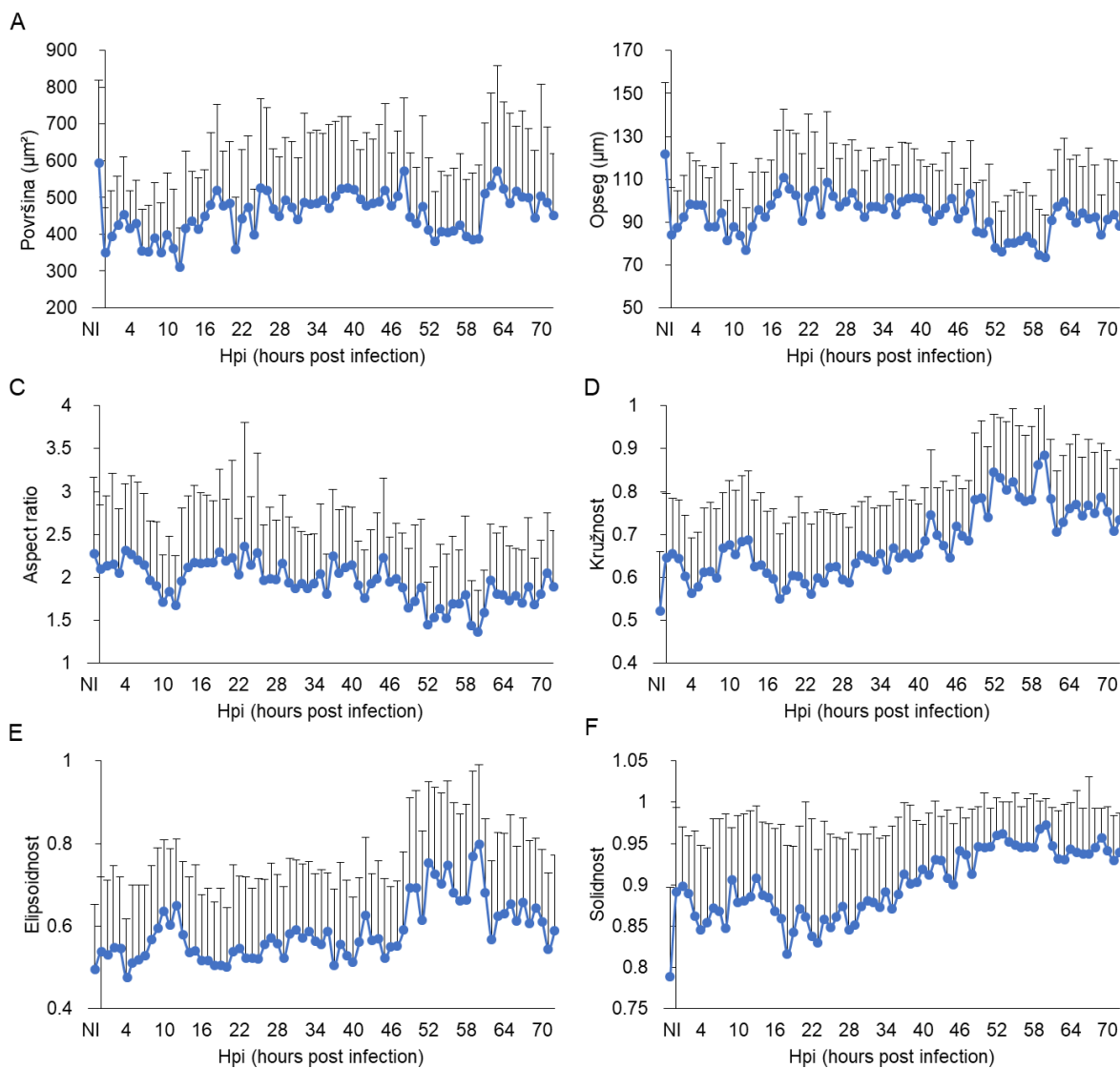
Prosječni opseg stanica nalazi se u rasponu od 73 do 110 μm . Slično površini, opseg stanica se blago povećava tijekom infekcije s povremenim fluktuacijama. Najveće promjene se javljaju nakon 40 hpi. Maksimalni opseg je opažen na početku kasne faze, pri 18 hpi nakon čega je uslijedio stabilan period bez značajnijih promjena sve do 53 hpi. Između 53 i 60 hpi, stanice su dosegle minimalnu vrijednost opsega. 63 hpi je ponovno zabilježen porast i nakon toga blagi pad čija je vrijednost nije jako fluktuirala do kraja ciklusa (slika 16AB).

Aspect ratio (omjer dužine i širine) označava izduženost stanica koja se izračunava odnosom između duže i kraće osi pripadajuće elipse oko stanice. Krug ima AR vrijednost jednak 1, a svaka veća vrijednost označava izduženiji objekt [281]. Tijekom infekcije dolazi do oscilacije omjera dužine i širine. Najniže točke su postignute u ranoj fazi infekcije na 12 hpi i u kasnoj fazi na 60 hpi. Vršne točke se dostižu u 4., 27, 37. i 45. satu infekcije što označava da su u tom periodu stanice bile izduženije (slika 16C).

Parametrom kružnosti (engl. *circularity*) se brojčano izražava odstupanje oblika stanice u odnosu na kružnicu. Vrijednosti parametra se nalaze u rasponu od 0 do 1, gdje 1 označava savršeni krug [281]. Prosječna kružnost stanice se značajno povećavala s vremenom, osobito nakon 40 hpi. Poznato je da se stanice tijekom CMV infekcije zaokružuju, stoga je ova promjena očekivana. Vrhunac je dosegnut 60. sat nakon infekcije kada je vrijednost parametra iznosila 0,88. Do sredine rane faze su stanice bile zaokružnije nakon čega je uslijedio pad do kraja rane faze (slika 16D).

Elipsoidnost (engl. *roundness*) je parametar koji opisuje odstupanje geometrije stanice od pripadajuće elipse. Vrijednost 1 označava geometriju mjerene stanice koja je identična elipsi, što znači da stanica nema nikakvih neravnina [281]. Prosječna elipsoidnost je varirala tijekom infekcije, ali općenito pokazuje porast do 60. sata infekcije kada dostiže svoj maksimum u vrijednosti od 0,79. Nakon te vremenske točke, došlo je do naglog pada vrijednosti koji je održan do kraja ciklusa. Tijekom rane faze između 10. i 12. sata je elipsoidnost porasla nakon čega je uslijedio pad (slika 16E).

Solidity je parametar kojim možemo kvantificirati koliko stanica odstupa od konveksnog zatvaranja i opisati njezinu hrapavost. Raspon parametra može imati vrijednost u rasponu od 0 do 1, gdje 1 označava stanicu čija je geometrija identična njezinom konveksnom zatvaranju [281]. Manja vrijednost parametra označava više neravnina stanice jer se stanica više razlikuje od svojeg konveksnog zatvaranja. Do kraja rane faze pojavljuje se trend blagog pada, nakon čega slijedi trend porasta do 60. sata infekcije kada vrijednost parametra dostiže maksimum. Ovi rezultati označavaju veću kompaktnu staničnu formu i relativno malo neravnina što je sukladno s ostalim rezultatima (slika 16F).



Slika 16. Sistematizacija promjena stanične morfologije tijekom MCMV infekcije. NIH3T3 stanice su inficirane sa S-mCherry-S-SCP MCMV-om i analizirane DHTM-om tijekom 72 sata infekcije. Za segmentaciju stanica je korišten Cellpose model, a za kvantifikaciju ImageJ. Po satu je prosječno segmentirano 70 stanica. Prikazane su prosječne vrijednosti parametara po satu + SD. **(A)** Prosječna površina (μm^2). **(B)** Prosječan opseg (μm). **(C)** *Aspect ratio* (omjer između duže i kraće stanične osi). **(D)** Prosječna kružnost. **(E)** Prosječna elipsoidnost. **(F)** Prosječna solidnost. NI, neinficirane stanice.

Kvantifikacija morfoloških parametara na živim, neobilježenim stanicama nam ukazuje na dinamičnost procesa infekcije. Promjena morfologije nije bila linearna odnosno u konstantnom padu ili porastu, već smo uočili različite epizode povećanja i smanjenja. U usporedbi s neinficiranim stanicama, prosječna površina i opseg stanica nisu rasle kroz infekciju, ali jesu kada uspoređujemo faze virusne replikacije međusobno. Vrijednosti za kružnost, elipsoidnost i hrapavost su se povećavale prema vrijednosti 1 do 60. sata, nakon čega je uslijedio blagi pad koji se održao do kraja analize odnosno 72. sata. U tablici 10 su prikazane točne vrijednosti svih mjerenih parametara NI stanica i stanica u određenim točkama infekcije (0, 16, 24, 48, 72 hpi).

Tablica 10. Vrijednosti mjerenih parametara kroz MCMV replikacijski ciklus. Prikazane su vrijednosti medijana (Mdn), minimalne (Min) i maksimalne (Max) vrijednosti parametara neinficiranih stanica (NI) i stanica tijekom MCMV infekcije (0, 16, 24, 48 i 72 hpi). Povezano sa slikom 19.

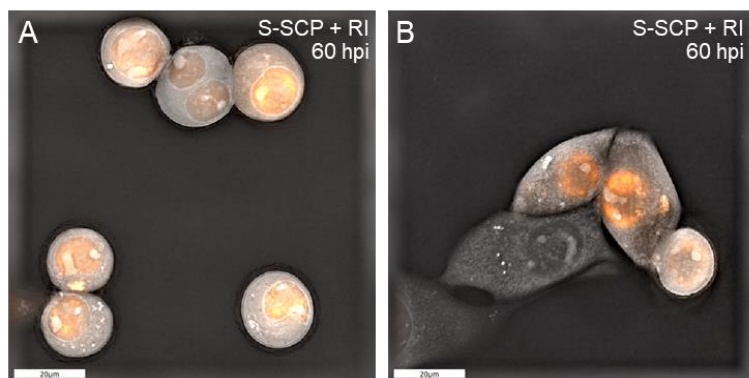
<i>Površina</i>							<i>Opseg</i>						
	NI	0	16	24	48	72		NI	0	16	24	48	72
Mdn	540	342	448	383	530	433	Mdn	117	83	101	91	102	87
Min	252	123	183	159	257	199	Min	74	43	53	55	60	51
Max	1231	812	769	740	1135	925	Max	234	172	149	1556	186	143

<i>Aspect ratio</i>							<i>Kružnost</i>						
	NI	0	16	24	48	72		NI	0	16	24	48	72
Mdn	2,08	1,99	1,99	1,99	1,77	1,76	Mdn	0,53	0,63	0,58	0,62	0,68	0,72
Min	1,15	1,11	1,08	1,12	1,04	1,03	Min	0,18	0,16	0,30	0,21	0,35	0,44
Max	5,35	3,91	4,43	4,39	3,42	4,26	Max	0,77	0,92	0,96	0,86	0,97	0,98

<i>Elipsoidnost</i>							<i>Solidnost</i>						
	NI	0	16	24	48	72		NI	0	16	24	48	72
Mdn	0,48	0,50	0,50	0,50	0,56	0,57	Mdn	0,81	0,92	0,88	0,89	0,95	0,96
Min	0,19	0,26	0,23	0,23	0,29	0,24	Min	0,48	0,37	0,59	0,46	0,59	0,82
Max	0,87	0,90	0,93	0,89	0,96	0,98	Max	0,94	0,98	0,99	0,98	0,99	0,99

Kod svih mjerenih parametara možemo uočiti veliku standardnu devijaciju (slika 16). Vjerojatni razlog je heterogenost stanične populacije koja utječe na tijek infekcije i uzorkuje asinkronost [286]. Slika 17 prikazuje dio stanica na 60 hpi koje su korištene za mjerenje parametara. Možemo uočiti da su na lijevoj slici sve stanice zaokružene i eksprimiraju S-SCP dok su na desnoj slici dvije stanice u procesu zaokruživanja, jedna stanica je u potpunosti zaokružena, a treća je najizduženija i bez S-SCP ekspresije. Kako bi omogućili replikaciju svoje duge dvolančane DNA, citomegalovirusi izazivaju velike promjene u regulaciji staničnog ciklusa. Obilježje kontrole staničnog ciklusa CMV-a je zaustavljanje staničnog ciklusa na prijelazu G1/S faze, koje je karakterizirano prisustvom stimulativnih i inhibitornih aktivnosti staničnog ciklusa [287]. Kada HCMV inficira stanice u S fazi, inicijacija ciklusa replikacije je odgođena

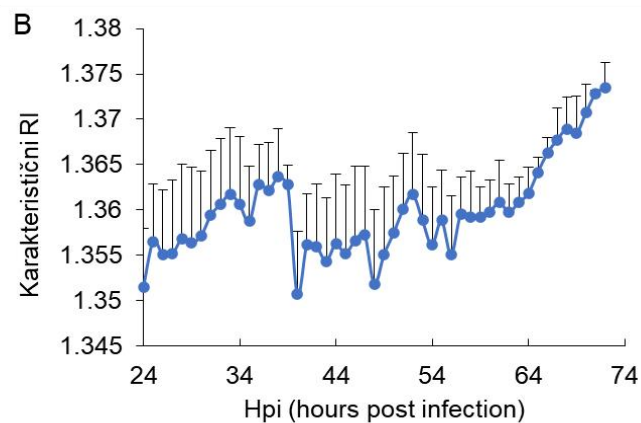
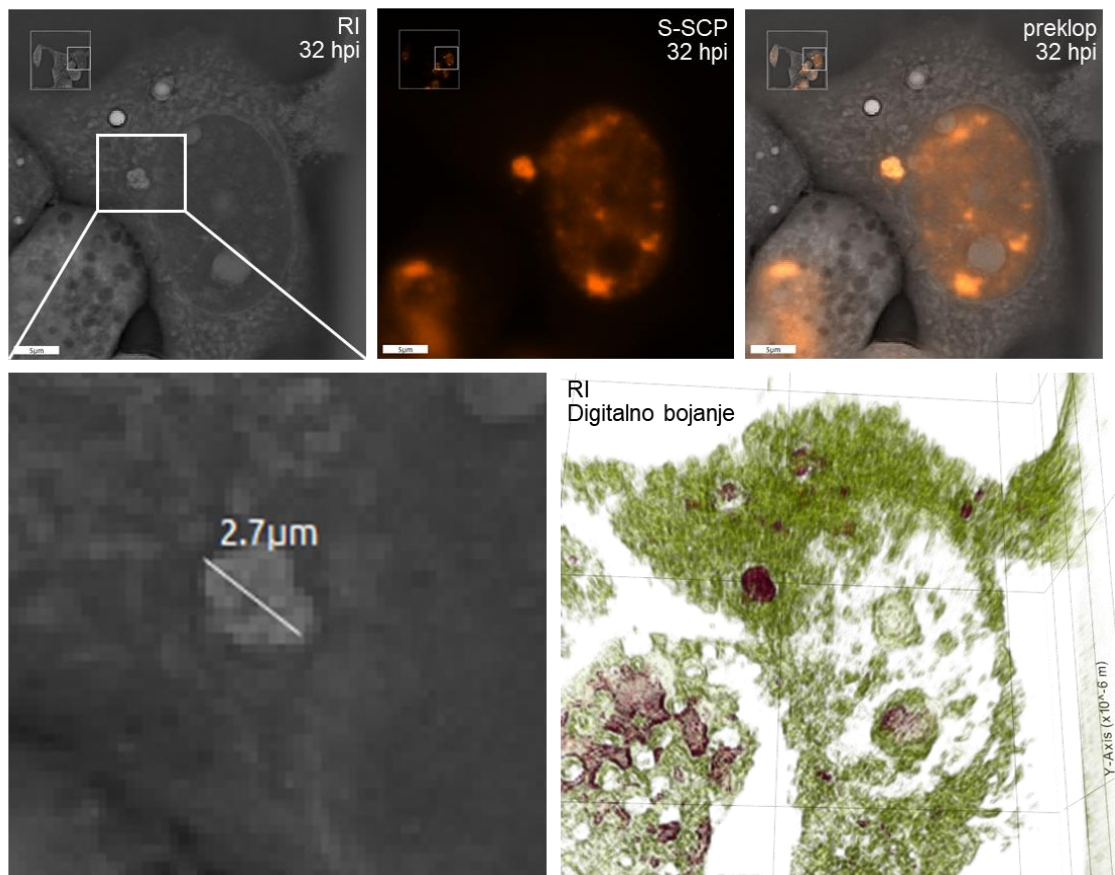
dok stanica ne uđe u G1/G0 fazu [288], a infekcija u mitozu rezultira mitotičkom katastrofom i neuspješno infekcijom [289,290].



Slika 17. Prikaz heterogenosti stanica inficiranih MCMV-om pomoću DHTM-a. Stanice su inficirane sa S-mCherry-S-SCP MCMV i uslikane 60 hpi. Prikazane su slike preklopljenog refraktivnog indeksa s fluorescentnim signalom. **(A)** Prikaz jednolične populacije inficiranih stanica. **(B)** Prikaz heterogene populacije inficiranih stanica. Mjerne crte, 20 μm .

Program STEVE koji kontrolira DHTM mikroskop omogućava 3D rekonstrukciju holograma te digitalno bojanje pojedinih struktura s obzirom na prosječnu vrijednost refraktivnog indeksa. Na slici 18A su prikazane S-mCherry-SCP MCMV inficirane stanice s vizualiziranim citoplazmatskim odjeljkom s nakupljenim kapsidama. Njegova duljina iznosi 2,7 μm . Na desnoj slici je prikazana 3D rekonstrukcija holograma. Zelena boja označava citoplazmu, a crvena sve piksele koji imaju prosječnu vrijednost refraktivnog indeksa citoplazmatskog odjeljka S-SCP. S obzirom da DHTM mjeri refraktivni indeks, analizirali smo prosječan karakterističan RI od 24 do 72 hpi u MCMV infekciji (slika 18B). Koristili smo komercijalno dostupan softver, EVE Analytics (*trial* verzija) koji omogućava automatiziranu analizu snimaka u izvornom .vol formatu dobivenih korištenjem DHTM-a. Po satu je prosječno analizirano 30 stanica. Promjene u mjeri refraktivnog indeksa su osjetljive i označavaju se trećom decimalom. Rezultati su ukazali na porast RI do 40 hpi (1,363) nakon čega je došlo da pada vrijednosti (1,351) u idućem satu. Do završetka ciklusa je vrijednost RI rasla i dosegla svoj maksimum 72 hpi kada je iznosila 1,373 (slika 18B).

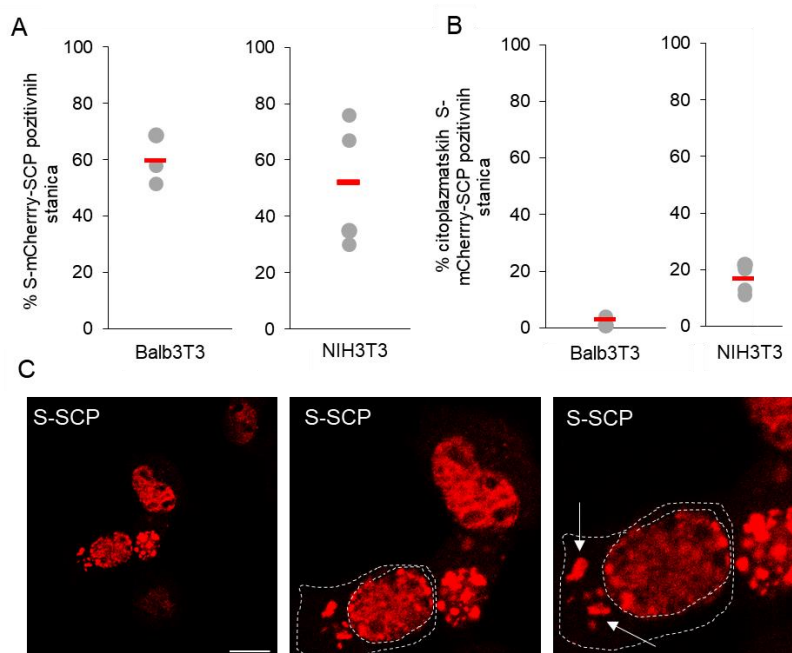
A



Slika 18. MCMV infekcija povećava vrijednost refraktivnog indeksa. Stanice su inficirane sa S-mCherry-S-SCP MCMV i snimane u intervalima od 12 sati, od 24 do 72 hpi. **(A)** Prikazane su slike refraktivnog infeksa, fluorescencije, preklopljeni signali i 3D rekonstrukcija holograma inficirane stanice s citoplazmatskim odjeljkom s nakupljenim S-mCherry-SCP. Mjerne crte, 5 μm . **(B)** Prosječne vrijednosti karakterističnog RI. Snimke su analizirane softverom EVE Analytics.

4.2. Karakterizacija citoplazmatskog odjeljka s nakupljenim kapsidama

U cilju identifikacije citoplazmatskog odjeljka s nakupljenim kapsidama, kombinirali smo praćenje stanica u stvarnom vremenu s konfokalnom mikroskopijom. Stanice smo inficirali rekombinantnim virusom S-mCherry-SCP MCMV-om kako bi pratili izražaj malog kapsidnog proteina (engl. *small capsid protein*, SCP), odnosno m48.2. Navedeni virus eksprimira crveno obilježen (mCherry) SCP koji je kodiran m48.2 otvorenim okvirom čitanja (engl. *open reading frame*, ORF). SCP se ugrađuje u novonastale nukleokapside u kasnoj fazi infekcije i ne razlikuje se u infektivnosti niti u krivulji rasta od divljeg tipa MCMV-a [262]. Nakupljanje fluorescentnog signala SCP se prvo vizualizira u jezgri, a potom u citoplazmi kada novostvorene kapside izlaze iz jezgre i najvjerojatnije predstavlja kapside koje sadrže DNA i prazne kapside bez virusne DNA. Kolokalizacijske analize smo započeli na Balb3T3 stanicama, ali analiza nije bila moguća zbog rijetkog opažanja citoplazmatskih nakupina SCP-a na pripravcima za fluorescentnu analizu iz kulture stanica. Točnije, 48 sati nakon infekcije, prosječno 60% stanica je iskazivalo S-SCP signal, dok je samo 1-2% od tih stanica akumuliralo citoplazmatske nakupine S-SCP. Kod NIH3T3 stanica citoplazmatsko nakupljanje S-SCP-a je prisutno nešto češće, pa smo ih na preparatima za imunofluorescenciju mogli uočiti u 10-15% stanica (slika 19A). Procijenili smo da je taj udio dostatan za DHTM analizu i kolokalizacijsku analizu koju smo proveli 48 sati nakon infekcije. Citoplazmatske nakupine S-SCP u NIH3T3 stanicama (slika 19B) su vjerojatno uočljiva multiviralna tijela (MViB) koje stanice koriste za oslobađanje viriona, što je glavni mehanizam uočen u stanicama inficiranim ljudskim CMV-om [203,291].



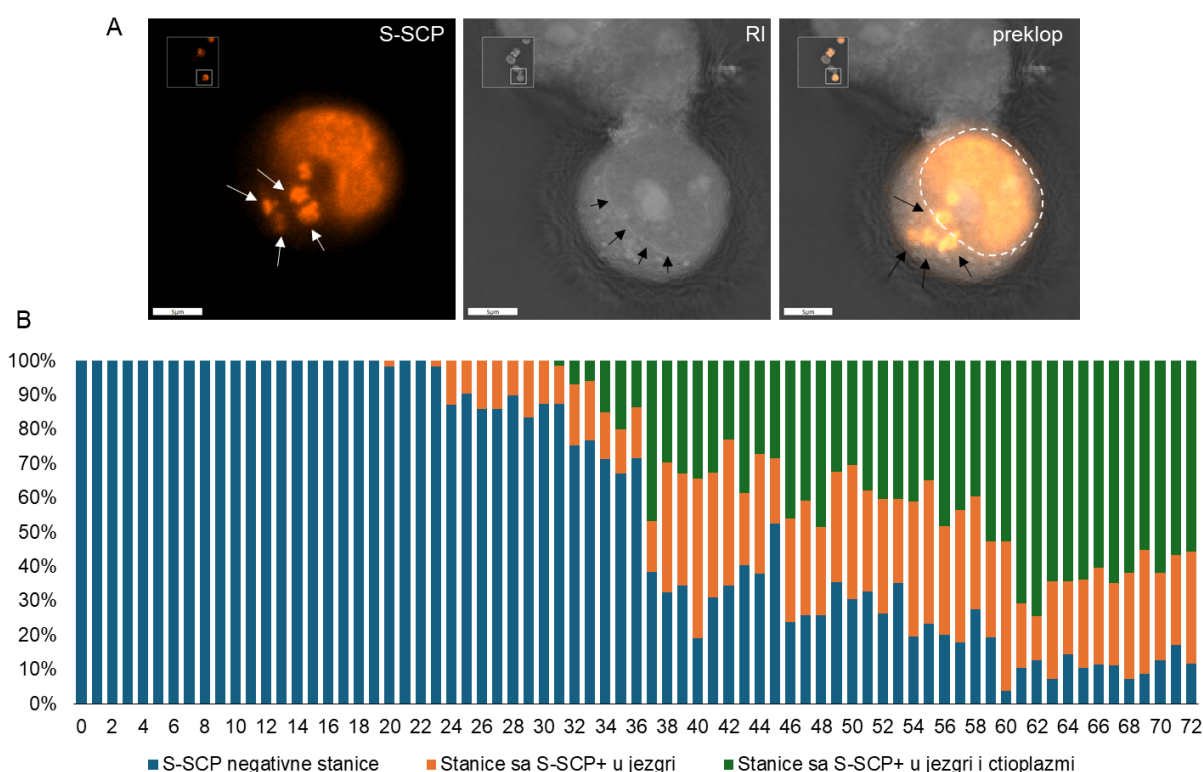
Slika 19. Identifikacija fluorescentnog malog kapsidnog proteina (S-SCP) u jezgri i citoplazmi stanica fibroblasta. (A-C) Stanice su inficirane sa S-SCP-mCherry-MCMV i fiksirane nakon 48 sati infekcije. (A) Postotak Balb3T3 i NIH3T3 stanica koje izražavaju S-SCP u jezgri. **(B)** Postotak Balb3T3 i NIH3T3 stanica s pozitivnim S-SCP-om u jezgri koje iskazuju citoplazmatsku akumulaciju. **(C)** Prikaz nuklearnog i citoplazmatskog nakupljanja S-SCP-a u NIH3T3 stanicama. Prikazane su konfokalne slike kroz fokalnu ravninu. Mjerna crta, 20 μ m.

4.2.1. Praćenje fluorescentno obilježenih virusnih kapsida koristeći DHTM

Opsežnu analizu stvaranja citoplazmatskih odjeljaka u živim stanicama nakon infekcije sa S-mCherry-SCP MCMV u kojima se nakupljaju fluorescentne kapside smo pratili od 2-72 hpi pomoću DHTM mikroskopa. Kako bi vizualizirali nastanak kapsida u jezgri i njihov izlazak u citoplazmu, stanice smo snimali u intervalima od 12 sati. Akvizicija slika refraktivnog indeksa iznosila je svakih dvije minute i 30 sekundi, a fluorescentnog signala svakih pet minuta. Idući cilj je bio kvantifikacija stanica koje iskazuju stvaranje S-SCP signala u jezgri i citoplazmi. Kako bi postigli reprezentativan uzorak, uzorke smo slikali svakih sat vremena (0-72 hpi) koristeći DHTM dok ne dostignemo prosječan broj od 60 stanica po satu.

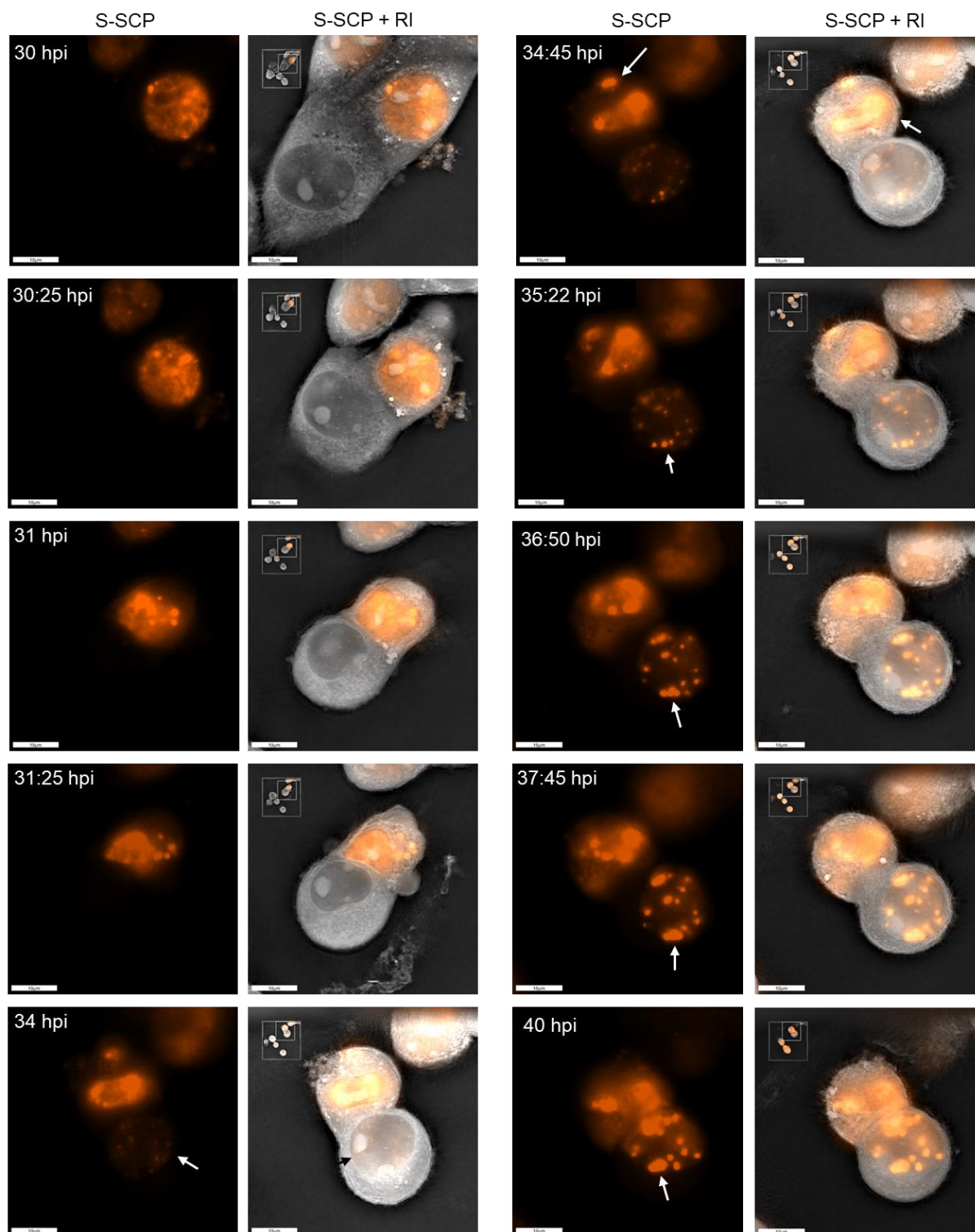
Na slici 20A je prikazan primjer NIH3T3 stanice s pozitivnim S-SCP signalom (S-SCP⁺) u jezgri i citoplazmi u kasnoj fazi infekcije (28 hpi). Slika lijevo prikazuje fluorescentni signal, slika u sredini refraktivni indeks gdje strelice pokazuju jezgrinu membranu, a slika desno prikazuje preklopljen RI i fluorescentni signal s granicom jezgrene membrane na temelju koje se odjeljuje S-SCP signal u citoplazmi od jezgrenog. Citoplazmatski odjeljci s nakupljenim S-mCherry-SCP proteinom sadržavaju kapside.

Slika 20B prikazuje kvantifikaciju kapsida u stanicama kroz infekciju. Plavi stupci označavaju postotak negativnih stanica odnosno stanica koje nisu razvile S-SCP signal. Narančasti stupci označavaju postotak stanica sa S-SCP signalom u jezgri, dok zeleni označavaju postotak S-SCP stanica sa signalom u jezgri i citoplazmi od ukupnog broja stanica. Sumarno, narančasti i zeleni stupci daju ukupan postotak S-SCP⁺ stanica. Prva pojava S-SCP signala u jezgri je zabilježena 20 hpi, iako iduća dva sata nije bilo zabilježene akumulacije u jezgri. Kontinuirani porast pozitivnih stanica je započeo 23 hpi i nastavio se do 36 hpi kada je uočen blagi pad (ukupno 28% pozitivnih stanica). Već idući sat je uočen skok, gdje je 62% stanica bilo S-SCP⁺, a od ukupnog broja je kod 47% stanica uočeno nakupljanje S-SCP-a u citoplazmi. U periodu od 40 do 45 hpi se smanjivao broj S-SCP⁺ stanica nakon čega je postotak pozitivnih ponovno počeo rasti s blagim fluktuacijama do 60 hpi, kada je produkcija ukupnog S-SCP signala dosegla maksimum (96%). Idući sat odnosno na 61 hpi, broj stanica s citoplazmatskim nakupljanjem S-SCP-a je dosegao maksimum (70% od ukupnog broja stanica) nakon čega je uslijedio pad kada je na 72 hpi taj postotak iznosio 56%. Ukupni broj S-SCP⁺ stanica se također smanjio i iznosio je 88%. Sumarno, produkcija kapsida u jezgri je započela 20 hpi, a njihov izlazak u citoplazmu je započeo na 31 hpi i nastavio se do 72 hpi.



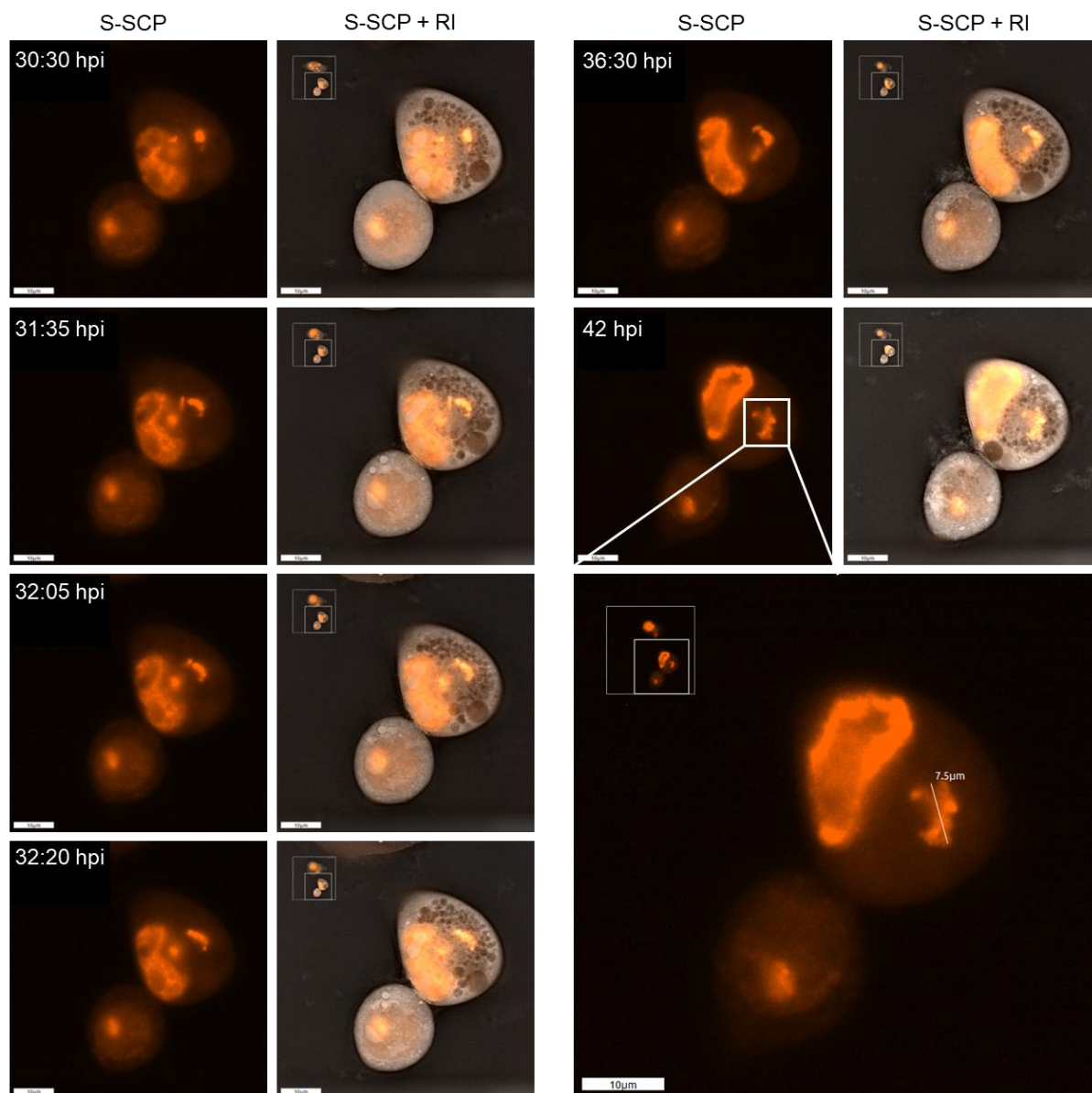
Slika 20. Izražaj S-mCherry-SCP u NIH3T3 stanicama tijekom replikacijskog ciklusa u jezgri i citoplazmi stanica inficiranih sa S-mCherry-SCP MCMV. Stanice su slikane DHTM-om od 0-72 sata infekcije. **(A)** zabilježena je pojava S-mCherry-SCP u jezgri i citoplazmi. Mjerna crta, 5 µm. **(B)** Udio S-mCherry-SCP-pozitivnih stanica. Plavi stupci označavaju postotak negativnih stanica odnosno stanica koje nisu razvile S-SCP signal. Narančasti stupci označavaju postotak stanica sa S-SCP signalom u jezgri, dok zeleni označavaju postotak S-SCP stanica sa signalom u jezgri i citoplazmi od ukupnog broja stanica. Sumarno, narančasti i zeleni stupci daju ukupan postotak S-SCP⁺ stanica.

Na slici 21 prikazan je primjer pojave S-SCP signala u jezgri koji se s vremenom pojačava. Možemo vidjeti nekoliko replikacijskih centara koji se tijekom vremena spajaju. Kod stanice koja je već pozitivna na jezgri S-SCP signal, uočen je izlazak kapsida iz jezgre, njihovo spajanje i migracija do stanične membrane.



Slika 21. Vremenski niz analize S-SCP odjeljaka u jezgri i citoplazmi pomoću DHTM-a. NIH3T3 stanice su inficirane sa S-mCherry-S-SCP MCMV-om i snimane u vremenskom intervalu od 12 h. Prikazane su slike S-SCP fluorescentnog signala i preklopljenog refraktivnog indeksa s fluorescentnim signalom, od 30 do 40 hpi. Strelice označavaju pojavu S-SCP signala u jezgri, njegovo povećanje i S-SCP signal u citoplazmi. Mjerne crte, 10 μm .

Tijekom DHTM snimanja, uočili smo povećavanje S-SCP citoplazmatskog odjeljka s izlaskom novih iz jezgre (slika 22). S-SCP signal se nalazi pri rubu jezgrine membrane na 30h i 30min. U idućoj prikazanoj vremenskoj točki (31h i 35min), S-SCP izlazi iz jezgre i nakon 30 minuta se spaja s MViB u citoplazmi. Proces se nastavio do 42 hpi, kada se dodatni S-SCP pridružio već postojećoj akumulaciji u citoplazmi. Duljina odjeljka na 42 hpi iznosi 7,5 μm .



Slika 22. Vremenski niz analize S-SCP odjeljka u citoplazmi pomoću DHTM-a. NIH3T3 stanice su inficirane sa S-mCherry-S-SCP MCMV-om i snimane u vremenskom intervalu od 12 h. Prikazane su slike S-SCP fluorescentnog signala i preklopljenog refraktivnog indeksa s fluorescentnim signalom, od 29:30 do 42 hpi. Strelice označavaju izlazak MCMV kapsida iz jezgre i pridruživanje postojećem S-SCP citoplazmatskom odjeljku. Mjerne crte, 10 μm .

4.2.2. Rab15 pozitivne membranske organele kao moguće mjesto sekundarnog omatanja i oslobađanja MCMV iz stanica

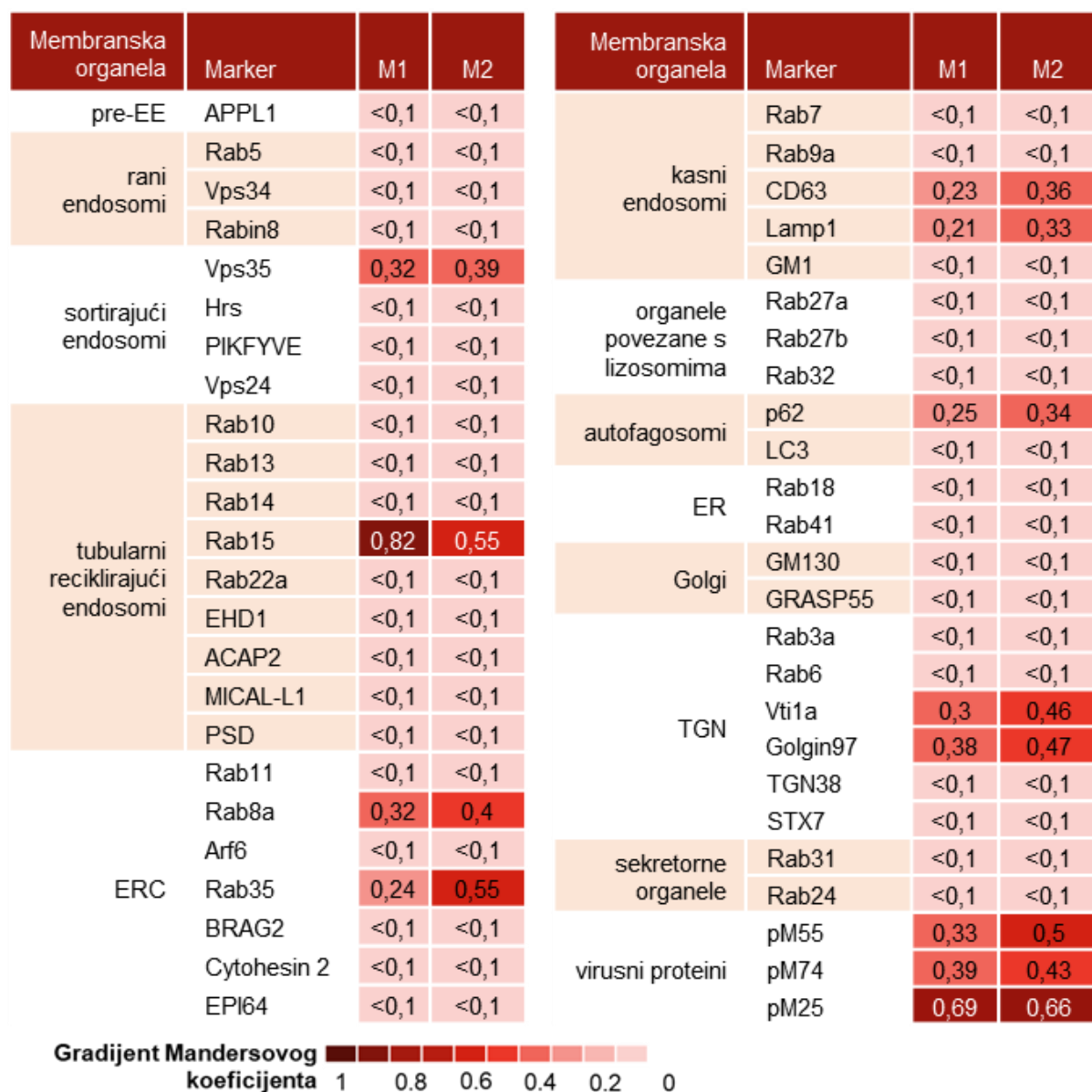
Pomoću konfokalne mikroskopije i S-mCherry-SCP-MCMV napravili smo kolokalizacijsku analizu fluorescentno obilježenih MCMV kapsida s 46 različitih markera membranskih odjeljaka i tri virusna proteina, 48 sati nakon infekcije. Imunofluorescentni preparati su snimani koristeći konfokalni mikroskop, a 15-20 stanica smo podvrgli detaljnoj kolokalizacijskoj analizi uporabom ImageJ i njegova dodatka BIOP JACoP kako bi se izračunao Mandersov koeficijent preklapanja (M1 i M2) unutar cijele z-serije za trodimenzionalnu (3D) analizu kolokalizacije. Analizirane su 3D čestice u citoplazmi koje sadrže S-mCherry-SCP, a sumarni rezultati s M1 i M2 koeficijentima su prikazanu na slici 23. M1 predstavlja stupanj preklapanja imunofluorescencije S-mCherry-SCP s markerom staničnog odjeljka, a M2 stupanj preklapanja markera staničnog odjeljka s S-mCherry-SCP.

Koristili smo APPL1 kao marker **preteče ranih endosoma** (engl. *pre-early endosomes*, pre-EE), markere **ranih endosoma** (Rab5, Vps34, Rabin8), **sortirajućih endosoma** (Vps35, Hrs, PIKFYVE, Vps24), **tubularnih reciklirajućih endosoma** (Rab10, Rab13, Rab14, Rab15, Rab22a, EHD1, ACAP2, MICAL-L1, PSD), **endosomalnog reciklirajućeg odjeljka** (Rab11, Rab8a, Arf6, Rab35, BRAG2, Cytohesin2, EPI64), **kasnih endosoma** (Rab7, Rab9a, CD63, Lamp1, GM1). Još su korišteni markeri za **organele povezane s lizosomima** (Rab27a, Rab27b, Rab32), **autofagosome** (p62, LC3), **endoplazmatski retikulum** (Rab18, Rab41), **Golgijev aparat** (GM130, GRASP55), **trans-Golgijevu mrežu** (Rab3a, Rab6, Vti1a, Golgin97, TGN38, Syntaxin 7) i **sekretorne organele** (Rab31 i Rab24). Od **virusnih proteina** smo koristili pM55 i pM74 (glikoproteini ovojnice) te pM25 (tegumentni protein).

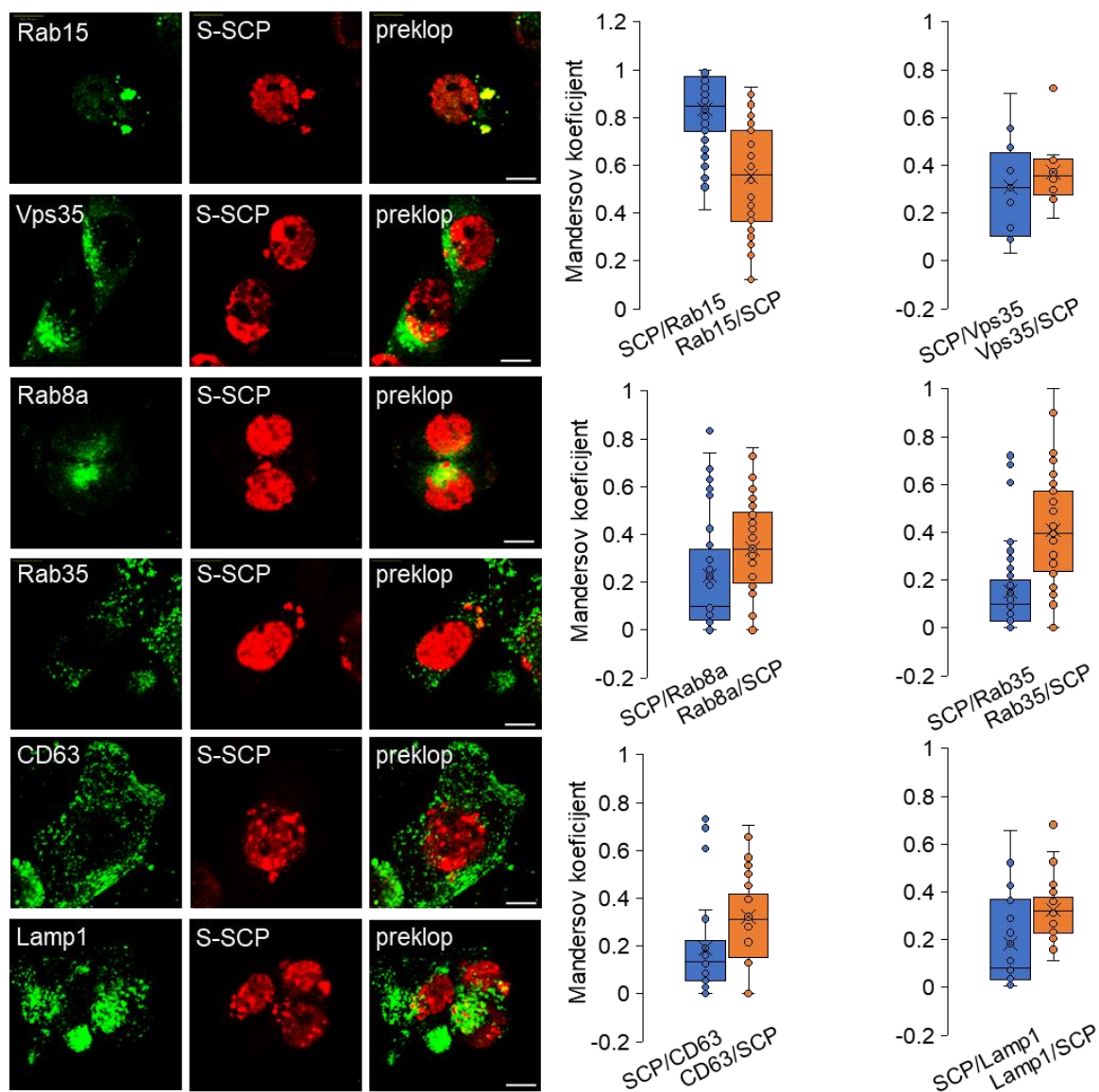
Kolokalizacijska analiza je pokazala iznimno visoko preklapanje citoplazmatskih odjeljaka s Rab15 membranskim markerom (82% se S-SCP preklapa s Rab15 i 55% Rab15 se preklapa sa S-SCP-om). U navedene odjeljke se slijevaju membranske strukture pozitivne na Rab8a, Rab35, p62, CD63, Lamp1, Vps35, Golgin97 i Vti1a. Za navedene markere M1 koeficijent varira od 0,21 do 0,38, a M2 od 0,33 do 0,55. Najveće preklapanje S-SCP-a je bilo s Rab35, markerom ERC-a. S-mCherry-SCP-pozitivni odjeljci sadrže virusne glikoproteine M55 i M74, što potvrđuje da se radi odjeljcima koji sadrže virione. Razina kolokalizacije M55 i M74 s S-mCherry-SCP nije veća od 50%. Detaljna analiza imunofluorescencije citoplazmatskih odjeljaka s nakupljenim kapsidama i membranskih organela koji su pokazali povećanu kolokalizaciju je prikazana na slikama 24, 25 i 26.

Rezultati pokazuju da se Rab15 odjeljci odnosno tubularni reciklirajući endosomi koriste za sekundarno omatanje i oslobađanje MCMV-a iz stanice te da ti odjeljci nastaju u složenom putu sazrijevanja u kojem se isprepliću endosomalni reciklirajući sustav (Rab8a, Rab35), trans-Golgijeva mreža (Vti1a, Golgin97), kasni endosomi (CD63, Lamp1) i autofagosomalni put (p62). Navedeni eksperimenti navode na zaključak da je endosomalni reciklirajući sustav ključan za sekundarno

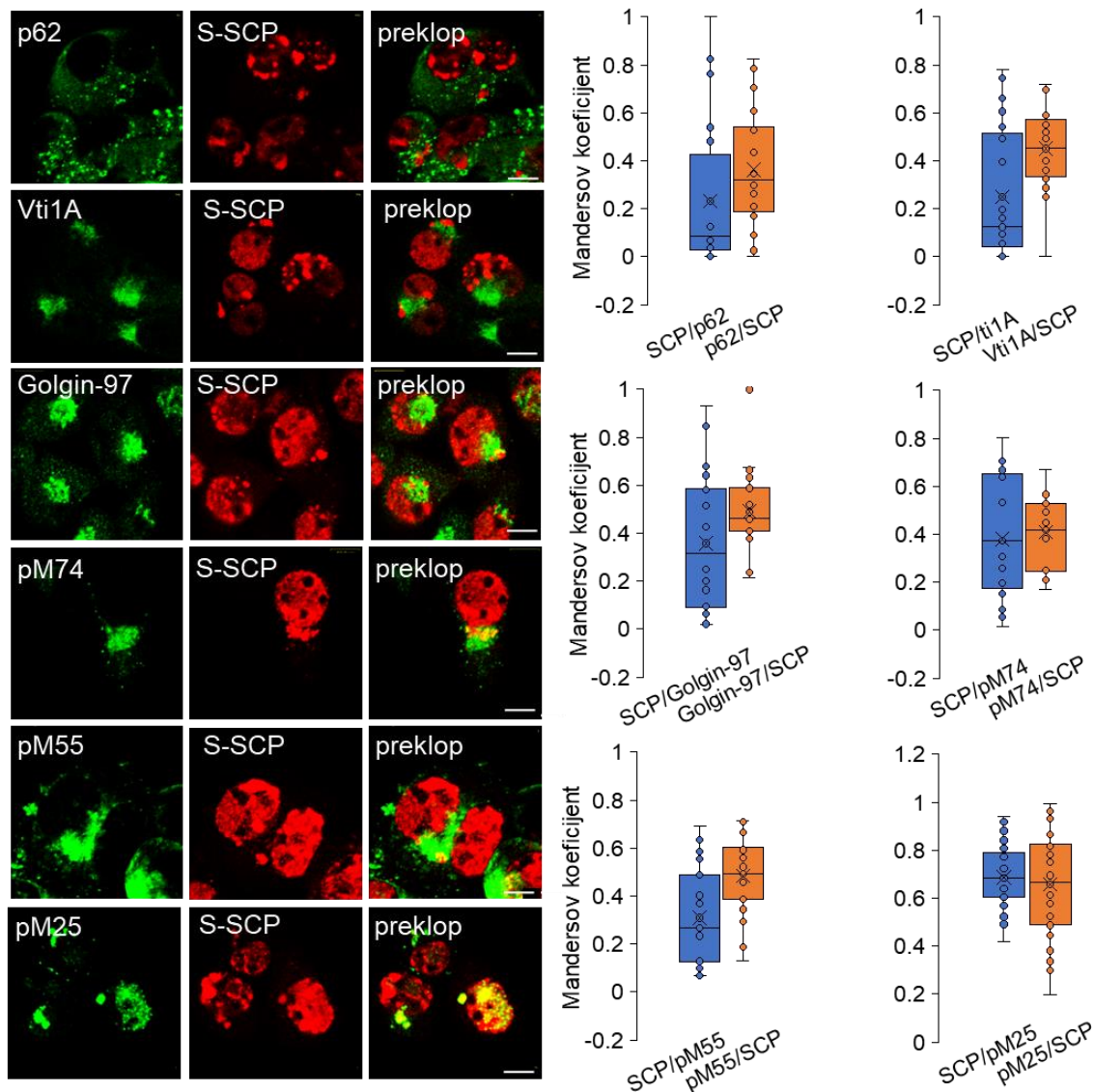
omatanje viriona te da se omotani virioni oslobađaju iz stanice skupljanjem u sekretorne organele koje se isprepliću s autofagosomalnim putom.



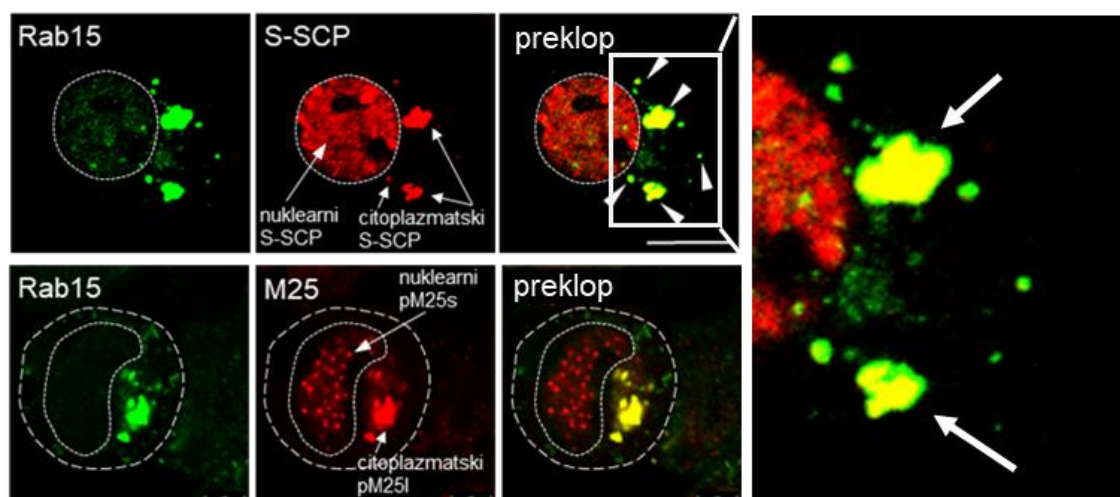
Slika 23. Kolokalizacijska analiza citoplazmatskih odjeljaka koji sadrže S-mCherry-SCP s markerima membranskih organela. NIH3T3 stanice su inficirane sa S-mCherry-SCP MCMV, fiksirane 48 hpi, permeabilizirane i obojene s protutijelima membranskih organela. Provedena je 3D kolokalizacijska analiza S-mCherry-SCP-pozitivnih odjeljaka u citoplazmi uporabom ImageJ programa. Određeni su Mandersovi koeficijenti preklapanja gdje M1 predstavlja stupanj preklapanja imuno-fluorescencije S-mCherry-SCP s markerom staničnog odjeljka, a M2 stupanj preklapanja markera staničnog odjeljka s S-mCherry-SCP. Markeri odjeljaka raspoređeni su prema membranskim organelama prema do sada objavljenim najčešćim lokalizacijama u neinficiranim stanicama. pre-EE, preteče ranih endosoma; ERC, endosomalni reciklirajući odjeljak; ER, endoplazmatski retikulum; TGN, trans-Golgijska mreža.



Slika 24. Detaljna analiza imunofluorescencije citoplazmatskih odjeljaka s nakupljenim kaspidama i membranskih organela. NIH3T3 stanice su inficirane sa S-mCherry-SCP MCMV (crveno), fiksirane 48 hpi, permeabilizirane i obojene s protutijelima za različite membranske organele (zeleno). Lijevi panel slika prikazuje konfokalne slike kroz fokalnu ravninu. Mjerne crte, 10 μ m. Analiza kolokalizacije je prikazana kao stupanj preklapanja (Mandersovi koeficijenti) unutar pojedinog s-mCherry-SCP-pozitivnog odjeljka po stanici. Mjerenje je provedeno kroz cijelu z-os korištenjem Intermodos algoritma. Podaci predstavljaju kutijaste dijagrame i rezultat za pojedinačnu stanicu.



Slika 25. Detaljna analiza imunofluorescence citoplazmatskih odjeljaka s nakupljenim kapsidama, membranskih organela i virusnih proteina. NIH3T3 stanice su inficirane sa S-mCherry-SCP MCMV (crveno), fiksirane 48 hpi, permeabilizirane i obojene s protutjelima za različite membranske organele ili virusne proteine (zeleno). Lijevo prikazuje konfokalne slike kroz fokalnu ravninu. Mjerne crte, 10 μ m. Analiza kolokalizacije je prikazana kao stupanj preklapanja (Mandersovi koeficijenti) unutar pojedinog s-mCherry-SCP-pozitivnog odjeljka po stanici. Mjerenje je provedeno kroz cijelu z-os korištenjem Intermodos algoritma. Podaci predstavljaju kutijaste dijagrame i rezultat za pojedinačnu stanicu.

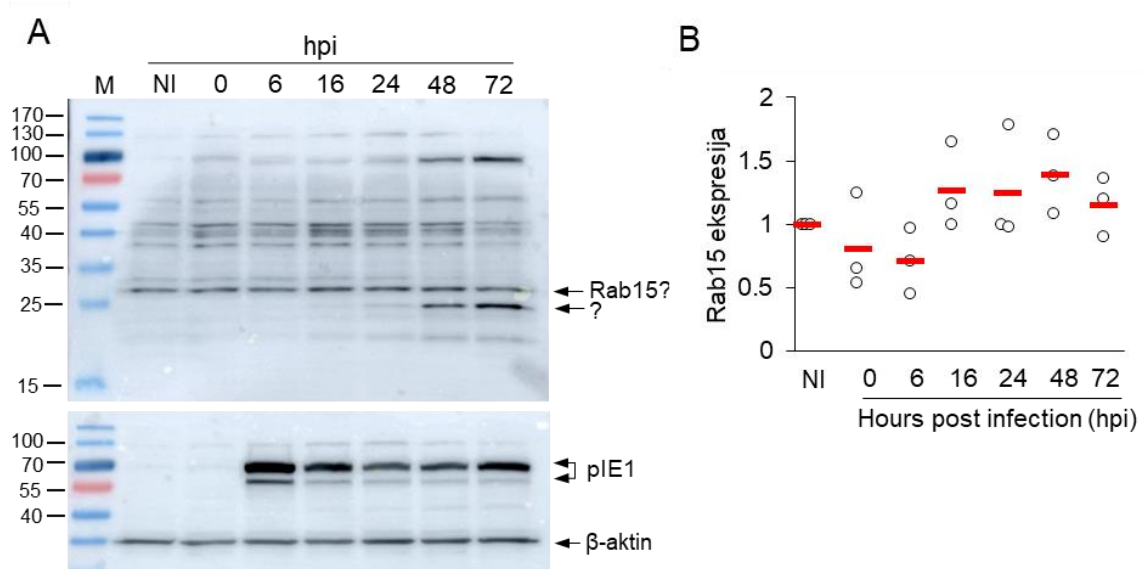


Slika 26. Detaljni prikaz kolokalizacije fluorescentnih kapsida (S-SCP) i virusnog tegumentnog proteina (pM25) s Rab15 citoplazmatskih odjeljcima. NIH3T3 stanice su inficirane, fiksirane 48 hpi, permeabilizirane i obojene s protutijelima. Kod infekcije sa S-mCherry-SCP (crveno), dodana su protutijela protu-Rab15 (zeleno). Kod infekcije s *m138*-MCMV, dodana su protutijela protu-Rab15 (zeleno) i protu-pM25 (crveno). s citoplazmatskim kapsidnim proteinom (S-SCP) i tegumentnim (pM25) proteinom. Mjerna crta, 5 μ m.

4.2.3. Ispitivanje uloge Rab15 u MCMV replikacijskom ciklusu

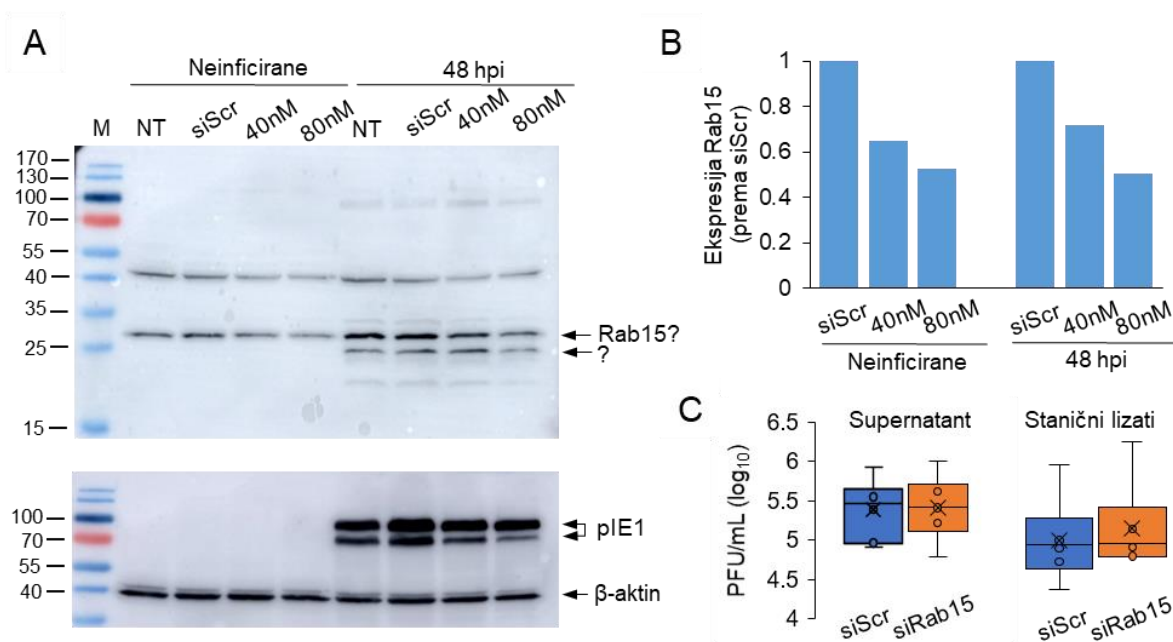
S obzirom na prethodni rezultat koji ukazuje na to da citomegalovirus razvija Rab15 pozitivne membranske organele za sekundarno omatanje i oslobađanje viriona, analizirali smo kinetiku izražaja proteina Rab15 tijekom MCMV infekcije kao i učinak deplecije Rab15 koristeći siRNA na stvaranje novih virusnih čestica.

Kinetiku smo analizirali Western blot metodom, ali korištena protutijela nisu iskazala specifičan signal. Molekulska masa Rab15 iznosi 23 kDa dok se u rezultatima signal na navedenoj veličini eksprimirao tek 24, 48 i 72 hpi (slika 27A). Međutim, uočen je signal na veličini od približno 26 kDa (slika 27A) čija se prosječna ekspresija kroz tri eksperimenta nije značajno mijenjala (slika 27B). Potrebne su daljnje analize za utvrđivanje Rab15 kinetike.



Slika 27. Kinetika izražaja Rab15 tijekom infekcije MCMV-om. (A) Western blot analiza ekspresije Rab15 tijekom E (0, 6 i 16 hpi) i L (24, 48, 72 hpi) faze infekcije. NIH3T3 stanice su inficirane s MCMV-wt. Ekspresija pIE1 i β -aktina u svakom uzorku služila je kao kontrola infekcije i nanosa proteina. (B) Kvantifikacija Rab15 signala od 26 kDa pomoću softvera ImageQuantTL (verzija 10.2). Ekspresija je normalizirana prema neinficiranim stanicama. Prikazani su pojedinačni rezultati (prazni kružići) i prosjek (crvene trake) tri neovisna eksperimenta.

Uzimajući u obzir hipotezu da se na Rab15 pozitivnim membranama događa sekundarno omatanje viriona, testirali smo hoće li će se njegovo utišavanje odraziti na stvaranje viriona. Nakon testiranja koncentracije, koristili smo 80 nM siRNA za Rab15 (slika 28A). Utišavanje 26 kDa signala 48 hpi je bilo umjereno, tek 48%, a nakon 48 sati infekcije je iznosilo 50% (slika 28B). Količina infektivnih viriona transficiranih stanica kontrolnom (siScr) ili Rab15 siRNA određena je 48 hpi standardnim testom virusnih plakova. Na slici 28C možemo uočiti da nema značajne razlike u proizvodnji unutar- i izvanstaničnih viriona. Iako nam ovaj preliminarni rezultat kazuje da supresija Rab15 ekspresije ne prevenira otpuštanje viriona, potrebno ga je detaljnije istražiti zbog nedovoljno utišane ekspresije Rab15. Osim siRNA, korištenjem shRNA ili CRISPR/Cas9 tehnologijom se mogu stvoriti stabilne stanične linije s utišanom ili potpuno izbačenom Rab15 ekspresijom.



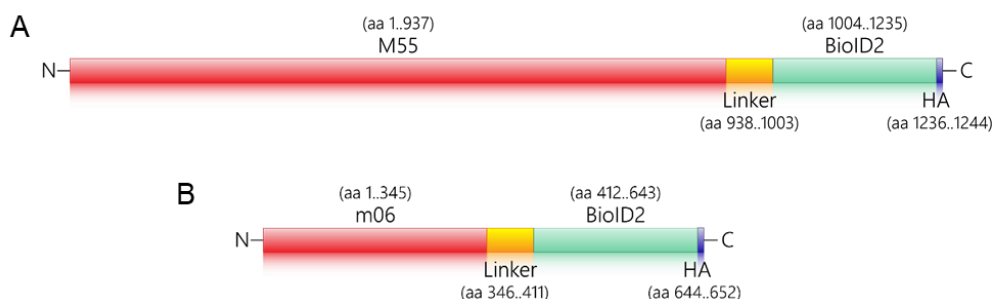
Slika 28. Utišavanje Rab15 proteina siRNA metodom ne utječe stvaranje i oslobađanje infektivnih MCMV viriona. (A) NIH3T3 stanice su transficirane s kontrolnom siRNA (siScr) ili ciljnom siRNA za Rab15 u različitim koncentracijama (40 i 80 nM). Nakon 48 sati transfekcije, dio uzoraka je liziran, a dio inficiran s MCMV-wt do 48 hpi. Izražaj Rab15 proteina je vizualiziran pomoću Western blota. pIE1 je korišten kao marker infekcije, a β -aktin je korišten kao kontrola nanosa proteina. (B) Rezultat Western blota normaliziran prema ekspresiji β -aktina u svakom uzorku, nakon čega je uslijedila normalizacija prema shScr. (C) Kvantifikacija infektivnih viriona oslobođenih u supernatant ili povezanih sa stanicom metodom standardnog testa virusnih plakova. Stanice su nakon 48 sati transfekcije sa siScr i siSNX3 inficirane s MCMV-wt do 48 hpi. Kutijasti dijagrami predstavljaju podatke iz 5 pojedinačnih eksperimenata. NT, netransficirane stanice.

4.3. Detekcija staničnih proteina domaćina potrebnih za sekundarno omatanje i izlazak viriona

Za detekciju staničnih proteina domaćina potrebnih za sekundarno omatanje i izlazak viriona, planirano je identificirati interaktom virusnog glikoproteina B/pM55 i m06 BioID2 metodom. Cilj je bio kroz interakcije proteina gB/pM55 koji je protein virusne ovojnice utvrditi put kojim taj protein prolazi da bi konačno ušao u sastav viriona na mjestu sekundarnog omatanja. U tu svrhu dodana je BioID2 oznaka na citoplazmatski dio proteina gB/pM55 koja bi trebala biotinilirati proteine koji dolaze u kontakt s tim dijelom gB/pM55 tijekom unutarstaničnog putovanja. BioID2 metoda omogućuje identifikaciju slabih odnosno kratkotrajnih interakcija između proteina [292]. Stanični proteini pridruženi virusnom gB/pM55 su se trebali koristiti za identifikaciju membranskih organela u kojima se nalazi gB/pM55, a stanični proteini pridruženi virusnom glikoproteinu m06 za isključivanje membranskih organela ili domena na kojima se ne odvija sekundarno omatanje viriona.

4.3.1. Dodavanje biljega BioID2-HA na C-terminalni dio proteina M55 onemogućuje replikaciju virusa

Konstrukti za oba fuzijska proteina su proizvedeni čija je struktura prikazana na slici 29. Klonirani su u MCMV genom u BAC virusu, no nakon transfekcije s BAC-om koji je sadržavao M55-BioID2-HA u virusnom genomu nije došlo do produkcije virusa. Ovaj rezultat ukazuje na to da je citoplazmatski rep virusnog gB/pM55 esencijalan za virus, a njegovo obilježavanje narušava funkciju samog proteina i onemogućuje replikaciju virusa.

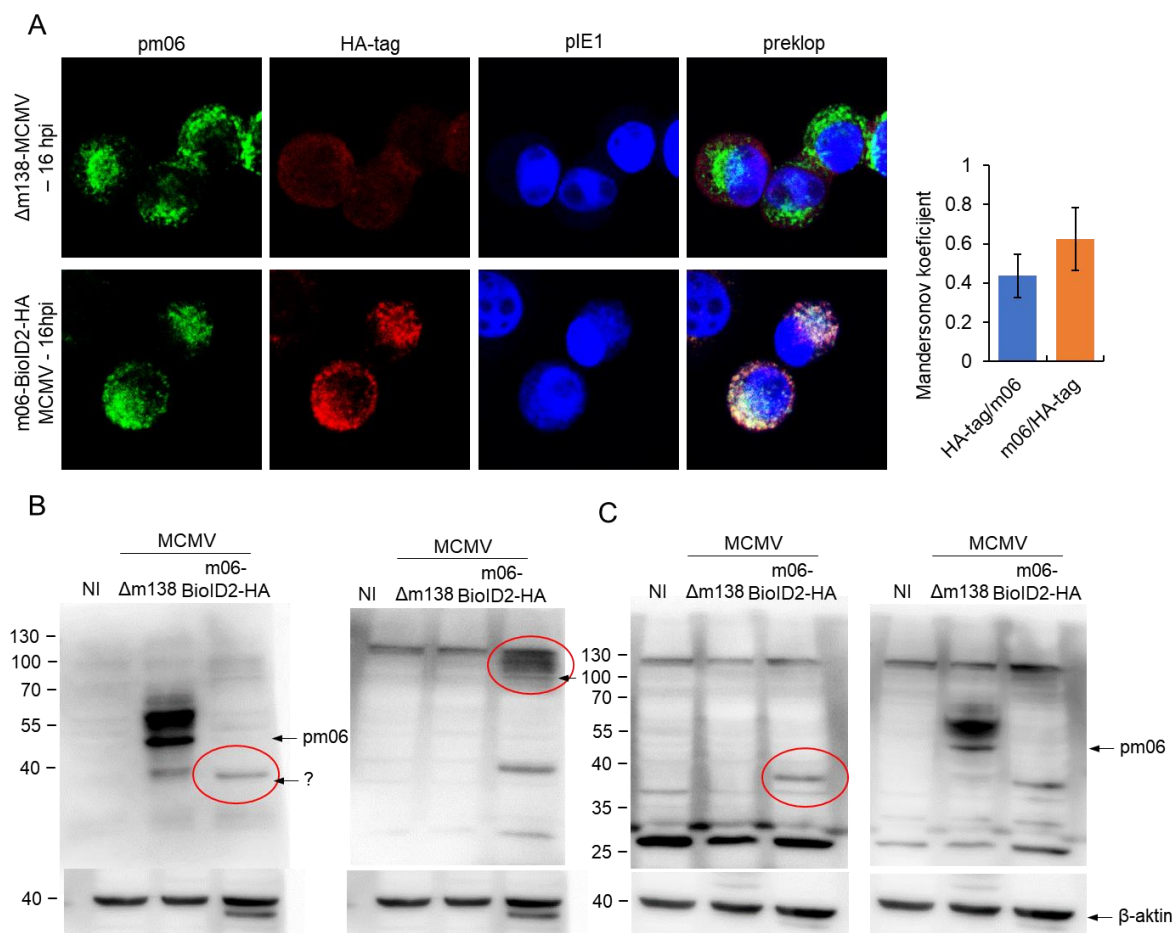


Slika 29. Strukture fuzijskih proteina. (A) M55-linker-BioID2-HA. (B) m06-linker-BioID2-HA.

Nakon transfekcije purificirane MCMV BAC DNA u MEF, potrebno je pratiti pojavu plakova na transficiranom MEF-u kroz 10, a maksimalno 30 dana. Navedeno se nije dogodilo za rekombinirani M55-BioID2-HA MCMV, dok je za m06-BioID2-HA MCMV proces bio uspješan. m06-BioID2-HA MCMV smo pasažirali još pet puta za uklanjanje BAC sekvence iz virusnog genoma. Krajnji korak je purifikacija virusa iz supernatanta i određivanje virusnog titra standardnim testom virusnih plakova.

Balb3T3 stanice smo inficirali s pročišćenim m06-BioID2-HA MCMV-om i nakon 16 sati podvrgnuli imunofluorescentnoj i Western blot analizi (slika 30). Izražaj m06 je bio sličan u usporedbi sa stanicama koje su inficirane sa Δ m138-MCMV (slika 30A). Dodatna potvrda se vršila bojanjem na hemaglutinin (HA), a kolokalizacijska analiza je pokazala preklapanje HA s m06 u razini od 43%, dok

se ukupno 62% m06 preklapalo s HA (slika 30A). Veličina m06 iznosi 48 kDa, a izračunata veličina m06-BioID2-HA iznosi 70 kDa. Western blot analizom smo dobili specifičnu formu od približno 38 kDa nakon infekcije s m06-BioID2-HA MCMV-om (slika 30B). S obzirom da M55-BioID2-HA MCMV nije uspješno inficirao stanice i na moguću nefunkcionalnost m06-BioID2-HA MCMV, nismo nastavili daljnja istraživanja BioID esejem.



Slika 30. Izražaj m06 fuzijskog proteina u NIH3T3 stanicama inficiranim s m06-BioID2-HA MCMV-om. (A) Analiza imunofluorescencije m06, hemaglutinina (HA) i pIE1. NIH3T3 stanice su inficirane s $\Delta m138$ -MCMV ili m06-BioID2-HA MCMV, fiksirane na 16 hpi, permeabilizirane i obojene s protutijelima protu-m06 (zeleno) u kombinaciji s protu-HA (crveno) i protu-pIE1 za kontrolu infekcije (plavo). Prikazane su konfokalne slike kroz fokalnu ravninu. Mjerne crte, 5 μ m. Analiza kolokalizacije prikazana je kao postotak preklapanja (Mandersovi koeficijenti) HA s pm06 (M1) i pm06 s HA (M2). Mjerenje je provedeno kroz cijelu z-os koristeći Otsu algoritam. Prikazane su srednje vrijednosti $\pm$ SD. (B, C) Western blot analiza m06 i hemaglutinina NIH3T3 stanica inficiranih s $\Delta m138$ -MCMV ili m06-BioID2-HA MCMV. Stanice su lizirane nakon 16 hpi ili ostavljene neinficirane (NI). β -aktin je korišten kao kontrola nanosa proteina.

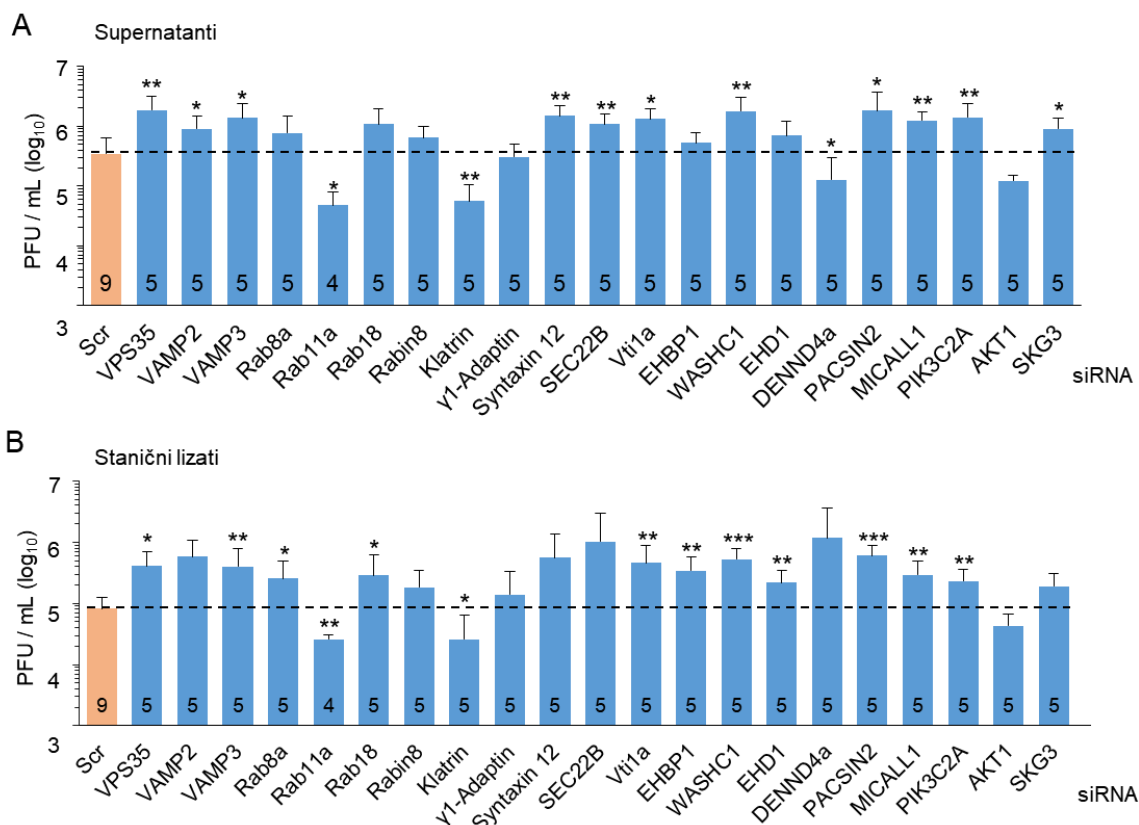
4.3.2. Identifikacija staničnih faktora uključenih u sekundarno omatanje korištenjem siRNA

S obzirom da rekombinatni virus nije bilo moguće proizvesti jer dodavanje biljega BioID2-HA na rep gB/pM55 onemogućuje replikaciju virusa, analizu interaktoma gB/pM55 nismo proveli. Na temelju prethodno objavljene studije naše grupe u kojoj je analizirano pet proteoma pripravaka HCMV viriona [231], napravili smo *screening* depleciju u cilju identifikacije staničnih bjelančevina domaćina potrebnih za sekundarno omatanje i izlazak viriona. Za filtriranje staničnih proteina identificiranih u virusnim proteomima korišteni su proteomski podaci iz velikih i malih izvanstaničnih vezikula (IEVa i sEV) i nevezikularnih ekstracelularnih čestica (NVEP). Pomoću ovih filtera sužena je analiza s 2000 staničnih proteina na 15-20 proteina koje su identificirani kao potpis stanica (engl. *signatures*) domaćina unutar viriona. Ovi potpisi su stanični proteini koji zaostaju u oslobođenim virionima kao biljeg staničnog odjeljka u kojem se vrši sekundarno omatanje viriona [231]. Supresijom njihova izražaja i nekih dodatnih staničnih proteina smo htjeli identificirati proteine koji su ključni za sastavljanje i izlazak MCMV iz stanice. Metodom siRNA utišavanja smo depletirali ekspresiju idućih staničnih proteina: VPS35, VAMP2, VAMP3, Rab8a, Rab11a, Rab18, Rabin8 (Rab3IP), Klatrin (teški lanac), γ 1-Adaptin, Syntaxin 12 (STX12), SECC22B, Vti1a, EHBP1, WASHC1, EHD1, DENND4a, PACSIN2, MICALL1, PIK3C2A (alpha), AKT1 i SGK3.

Eksperiment je koncipiran na način probirne deplecije (engl. *screening*), bez provjere utišavanja navedenih proteina. NIH3T3 stanice su transficirane korištenjem siRNA (80 nM koncentracija) i nakon 48 h inficirane s MCMV-wt. Dva dana nakon infekcije, pokupljeni su supernatanti i stanični lizati za analizu produkcije unutar- i izvanstaničnih infektivnih čestica standardnim testom virusnih plakova.

Uočeno je značajno povećanje izvanstaničnih viriona u supernatantu nakon utišavanja VPS35, VAMP2, VAMP3, Syntaxina 12, SEC22B, Vti1a, WASHC1, DENND4A, PACSIN2, MICALL1, PIK3C2A i SGK3. Povećanje je zabilježeno i nakon utišavanja Rab8a, Rab18, Rabin8, EHBP1 i EHD1, ali ne značajno. Nasuprot tome, značajno smanjenje viriona u supernatantu se dogodilo nakon deplecije Rab11a, klatrina i DENND4A. Smanjeno oslobađanje infektivnih viriona nakon supresije klatrina ukazuje na korištenje klatrin ovisanog puta u potencijalnom sortiranju proteina. Smanjenje nije bilo značajno za AKT1 (slika 31A).

Rezultati za produkciju unutarstaničnih viriona iz staničnih lizata su u velikoj mjeri slijedili rezultate izvanstaničnih čestica, s najvećim odstupanjem za DENND4a koji je sada bio povećan, ali ne značajno. Ostala neznajna povećanja su pokazana nakon utišavanja VAMP2, Rabin8, γ 1-Adaptina, STX12, SEC22B i SGK3. Značajno povećana produkcija infektivnih viriona se dogodila nakon utišavanja VPS35, VAMP3, Rab8a, Rab18, Vti1a, EHBP1, WASHC1, EHD1, PACSIN2, MICALL1 i PIK3C2A. Smanjenje viriona je zabilježeno nakon utišavanja Rab11a, klatrina i AKT1, iako za posljednji protein ono nije bilo statistički značajno. Ukupan rezultat nakon supresije PIK3C2A ukazuje da lokalizirana produkcija PI3P na tubularnim endosomalnim odjeljcima nije ključna za proces oslobađanja viriona (slika 31B).



Slika 31. Učinak supresije staničnih faktora koji djeluju na sučelju EE/RE/ERC na stvaranje i oslobađanje infektivnih MCMV viriona. NIHT3T stanice su tretirane sa siRNA 48 sati, inficirane s MCMV-wt, a količina infektivnih čestica iz staničnih lizata i supernatanta određena je 48 hpi korištenjem standardnog testa virusnih plakova. Rezultati su prikazani kao log₁₀ infektivnih jedinica virusa/mL uzorka. Prikazane su srednje vrijednosti + SD četiri do devet nezavisnih eksperimenata (broj eksperimenata je označen u stupcima). Statistička značajnost određena je Kruskal-Wallisovim testom s Dunnovim post hoc testom (*p < 0,05; ** p < 0,01).

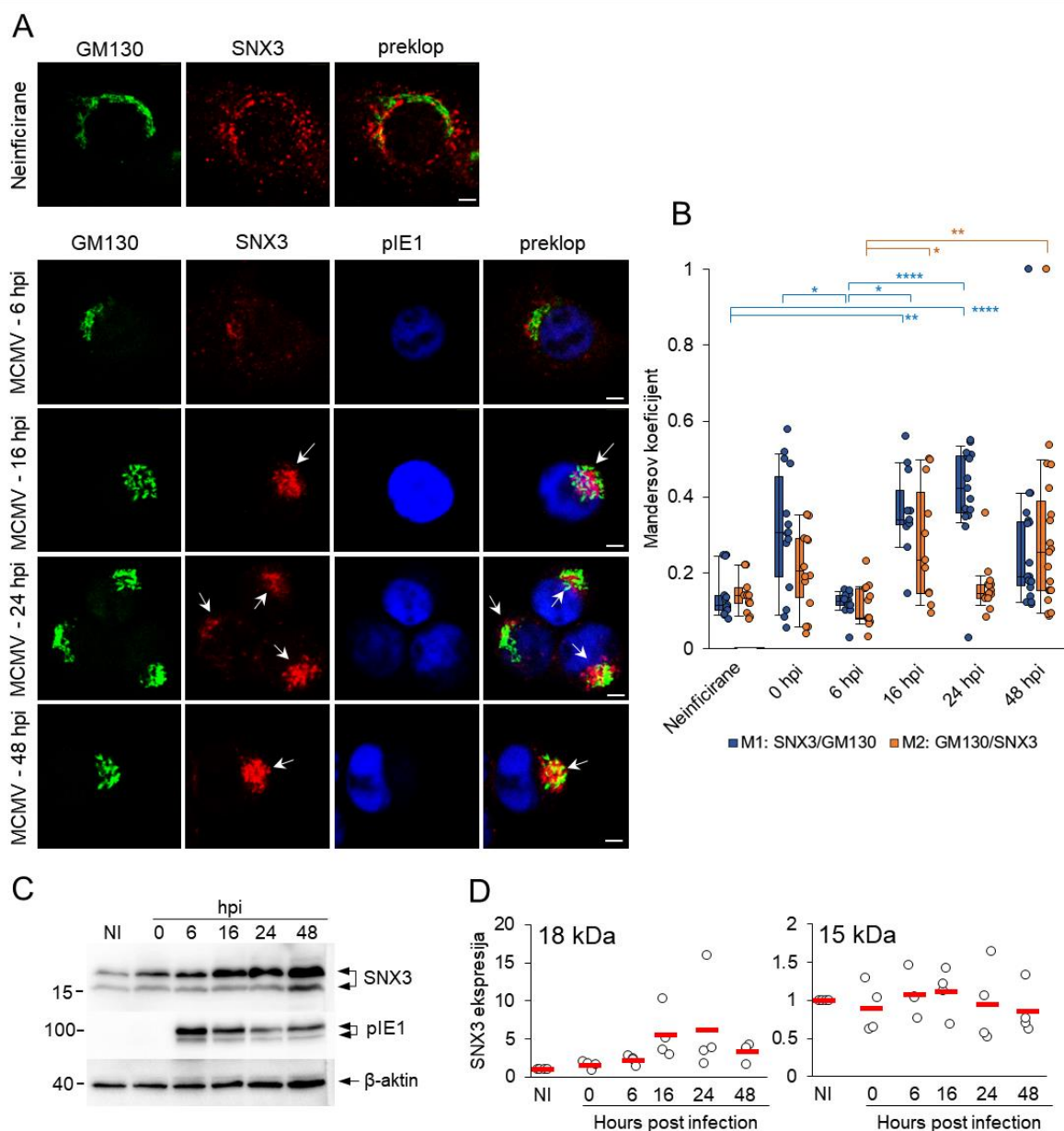
4.4. Ispitivanje uloge SNX3 u replikacijskom ciklusu i sklapanju MCMV viriona

Analiza SNX-ova u virionima sugerira da beta-herpes virioni mogu sazrijeti na SNX3-pozitivnim membranama koje potječu iz Rab8/Arf6 reciklirajućeg puta te da se mehanizam sortiranja tereta temeljen na SNX3 može koristiti za koncentraciju virusnih glikoproteina ovojnice na omatajućoj membrani [231]. S obzirom da SNX3 također doprinosi odvajanju (engl. *retrieval*) CIE tereta i stupa u interakciju sa SNX27 [293], mogao bi doprinijeti ranim događajima u formiranju AC-a. Zbog navedenog smo htjeli istražiti doprinos SNX3-ovisnog puta u širenju Rab10-pozitivnih domena (PD), pre-AC biogenezi i produkciji infektivnih viriona tijekom MCMV infekcije.

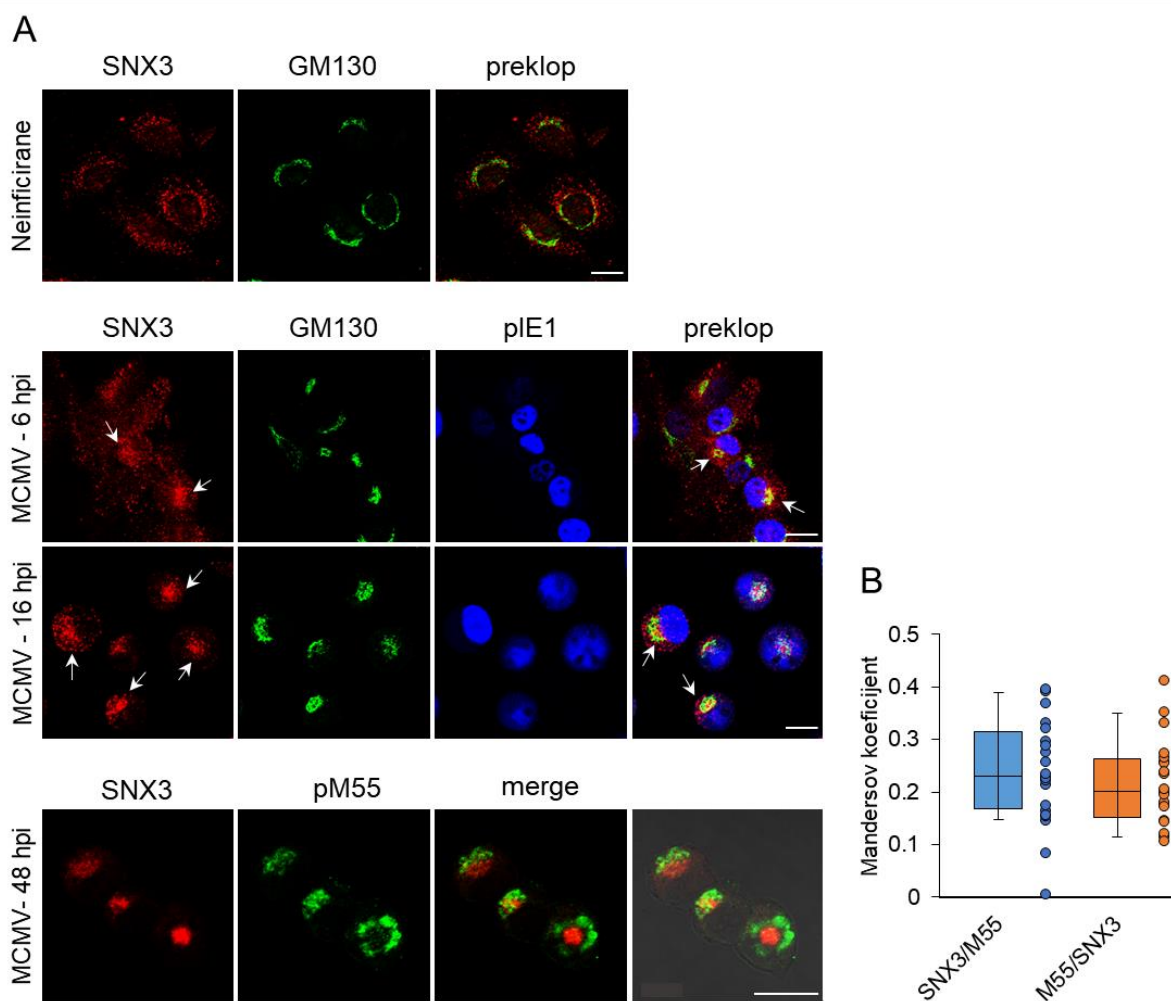
4.4.1. SNX3 se akumulira u unutarnjem pre-AC i perifernom membranskom sustavu inficiranih stanica u E fazi infekcije i u AC tijekom L faze

Povećana regrutacija faktora stanica domaćina koji reguliraju membranski tok i membransku koncentraciju u perinuklearnoj regiji stanica zaraženih MCMV-om je obilježje reorganizacije membranskog sustava karakterističnog za AC [83]. Prvo smo istražili akumulira li se SNX3 u pre-AC tijekom E faze infekcije, što uključuje dislocirane Golgijeve i proširene EE-ERC/ERC-TGN membrane, a u potpuno razvijenom AC nakon replikacije virusne DNA i ekspresije MCMV L gena. U neinficiranim NIH3T3 stanicama, SNX3-pozitivne membranske strukture su bile koncentrirane u perinuklearnom području i na periferiji stanice, dok je Golgi sadržavao tipične spljoštene strukture cisterni koje se šire iz središta stanica oko jezgre (slika 32). U E fazi infekcije (6 i 16 hpi), koncentrirane su SNX3-pozitivne strukture u perinuklearnom području, a nepovezane Golgijeve cisterne su proširene u prstenastu strukturu, tvoreći osnovnu konfiguraciju pre-AC (slika 32A). Zbijanje i ekspanzija je rezultirala povećanom kolokalizacijom SNX3 i Golgijevog markera (slika 32B) GM130, a znatan udio SNX3-pozitivnih organela ostao je izvan AC na periferiji stanice (slika 32A). Također je primijećen isti obrazac distribucije SNX3 u stanicama Balb3T3 (slika 32A), koje pružaju bolju rezoluciju za prostornu analizu kasnije faze infekcije. U L fazi infekcije, na 48 hpi, AC je bio potpuno uspostavljen i sastojao se od proširenih Golgijevih cisterni napunjenih MCMV glikoproteinom gpM55, a SNX3-pozitivne strukture bile su smanjene na periferiji stanice (slika 33A). gB/pM55 je također bio prisutan u točkastim strukturama u unutarnjoj regiji koja se snažno preklapala sa SNX3, iako je ukupna kolokalizacija između ova dva proteina bila je prilično niska, kao što se očekivalo (slika 33B).

Do pojačanog regrutiranja SNX3 na membrane unutarnjeg AC-a bi moglo doći zbog povećane ekspresije gena SNX3, njegove povećane sinteze ili produljenog raspada. Kako bismo to analizirali, proveli smo Western blot analizu ekspresije proteina SNX3 tijekom relevantnih faza ciklusa replikacije MCMV i otkrili da je ekspresija SNX3 bila povećano regulirana (*up-regulirana*) u E fazi infekcije i ustrajala tijekom L faze (slika 32C). Budući da nismo primijetili nikakvu značajnu promjenu u SNX3 transkripciji kada smo analizirali naš prethodno objavljeni transkriptom stanica inficiranih MCMV-om [83], zaključili smo da se SNX3 nakuplja u zaraženim stanicama zbog promjene u stopi njegovog raspadanja. Ovo zapažanje je u skladu s prethodno objavljenim opažanjem smanjene ekspresije EEA1 u stanicama zaraženim MCMV-om [83] i HCMV-om [181], jer se SNX3 natječe s EEA1 za vezanje na PI(3)P u endosomima [257,294].

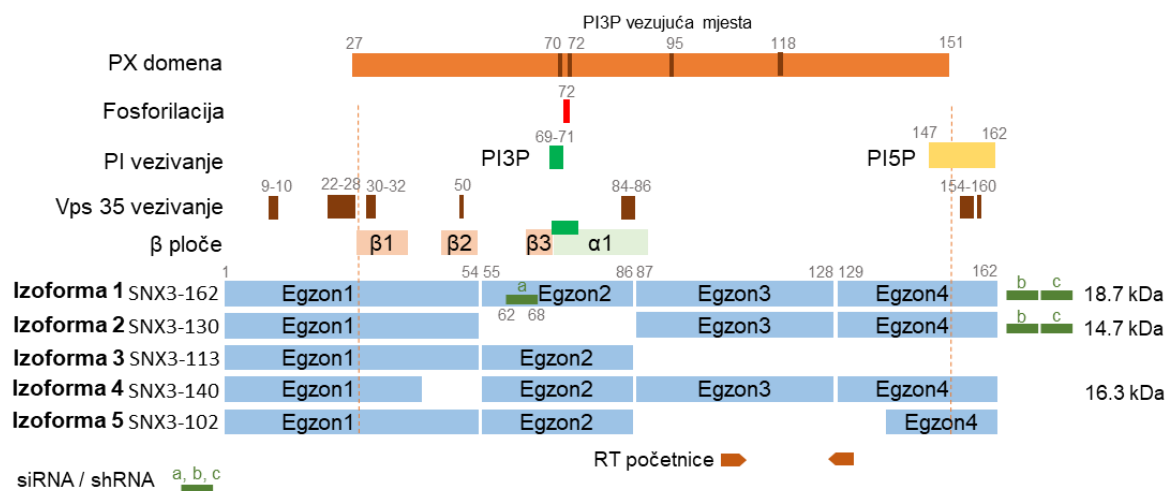


Slika 32. Perinuklearno nakupljanje SNX3 u pre-AC i AC stanica zaraženih s MCMV-om. (A) Analiza imunofluorescencije SNX3 i GM130. NIH3T3 stanice su zaražene s $\Delta m138$ -MCMV (MOI 10) i fiksirane na 6, 16, 24 i 48 hpi ili ostavljene neinficirane, permeabilizirane i obojene s protutijelima anti-SNX3 (crveno) u kombinaciji s protutijelima anti-GM130 (zeleno) i pIE1 za kontrolu infekcije (plavo). Prikazane su konfokalne slike kroz fokalnu ravninu. Strelice pokazuju perinuklearnu akumulaciju u pre-AC. Mjerne crte, 5 μ m. (B) Analiza kolokalizacije prikazana kao postotak preklapanja (Mandersovi koeficijenti) SNX3 s GM130 (M1) i GM130 s SNX3 (M2) po stanici. Mjerenje je provedeno kroz cijelu z-os korištenjem Intermodos algoritma. Podaci predstavljaju kutijaste dijagrame za M1/M2 i rezultat za pojedinačnu stanicu iz tri neovisna eksperimenta. (C) Western blot analiza ekspresije SNX3 tijekom E (6 i 16 hpi) i L (24 i 48 hpi) faze infekcije. Ekspresija pIE1 i β -aktina u svakom uzorku služila je kao kontrola infekcije i nanosa proteina, a izvedena je na istim membranama (Slika S2). (D) Kvantifikacija 18 kDa i 15 kDa SNX3 signala pomoću softvera ImageQuantTL (verzija 10.2). Ekspresija je normalizirana prema neinficiranim stanicama. Prikazani su pojedinačni rezultati (prazni kružići) i prosjek (crvene trake) tri do četiri neovisna eksperimenta (prikazano na slici S3). Statistička značajnost određena je Kruskal-Wallisovim testom s Dunnovim post-hoc testom (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$).



Slika 33. Perinuklearno nakupljanje SNX3 u pre-AC i AC Balb3T3 stanica zaraženih MCMV-om. (A) Analiza imunofluorescencije SNX3, GM130 i pM55 u E (6 i 16 hpi) i L (48 hpi) fazi infekcije. Balb3T3 stanice su zaražene s Δ m138-MCMV (MOI 10) ili su ostavljene neinficirane, fiksirane na 6, 16 i 48 hpi, permeabilizirane i obojene s protutijelima anti-SNX3 (crveno) u kombinaciji s protutijelima anti-GM130 ili pM55 (zeleno) i pIE1 za kontrolu infekcije (plavo). Prikazane su konfokalne slike kroz fokalnu ravninu reprezentativnog eksperimenta. Strelice pokazuju perinuklearnu akumulaciju u pre-AC. Mjerne crte, 20 μ m. (B) Analiza kolokalizacije prikazana je kao postotak preklapanja (Mandersovi koeficijenti) SNX3 s pM55 (M1) i pM55 s SNX3 (M2) po stanici. Mjerenje je provedeno kroz cijelu z-os koristeći Otsu algoritam.

Western blot analizom smo uočili dvije vrste SNX3 proteina veličine od oko 18 kDa i 15 kDa (slika 32C). Ove vrste predstavljaju ekspresiju dvije izoforme SNX3 u NIH3T3 stanicama (slika 34). 18 kDa SNX3 odgovara kanonskoj izoformi 1 (SNX3-162) od 162 aminokiseline (aa), dok forma od 15 kDa možda odgovara izoformi 2 od 130 aa (SNX3-130) ili izoformi 4 od 140 aa (SNX3-140) [50]. Ove izoforme koje kodiraju proteine generiraju se alternativnim prekrajanjem i opisane su za ljudski i mišji SNX3 (slika 34). Vrste s nižom molekularnom težinom činile su približno 35% ukupnih proteina detektriranih WB-om. Za razliku od izoforme s većom molekularnom težinom, ekspresija se nije povećala tijekom ciklusa replikacije MCMV i činio je približno 14-16% ukupnog SNX proteina na 16, 24 i 48 hpi (slika 32D).



Slika 34. Izoforme transkripta SNX3. Pet izoformi SNX3 može se generirati alternativnim prekrajnjem [295,296]. Izoformu 1 generiraju 4 egzona i kodira protein od 162 aminokiseline (aa), koji je poznat kao kanonski protein od 18,7 kDa (SNX3-162) [296]. Izoforma 2 koja kodira protein nastaje isključivanjem egzona 2 i kodira protein od 130 aa (SNX3-130) i 14,7 kDa, dok se izoforma 4 stvara skraćivanjem egzona 1 i kodira protein od 140 aa (SNX3-140) i 16,3 kDa [296]. Sve tri izoforme nalaze se u ljudskim i mišjim stanicama [296]. Izoformi 3 nedostaju egzoni 3 i 4 i predviđa se da će proći besmisleno raspadanje (engl. *nonsense mediated decay*) [297]. Izoforma 5 kodira proteine i opisana je u mišjim stanicama [295]. Nedostaje joj egzon 3 i dio egzona 4 te kodira protein od 102 aa (SNX3-102) koji se ne može vezati na PI3P na EE, ali ima sposobnost vezanja na klatrin na PM i perifernom endosomalnom sustavu [295]. Važna funkcionalna domena SNX3 je phox-homološka domena (PX), koja se proteže između 27. i 151. aa i sadrži tri β -lista (β 1-3) koji su bitni za funkciju SNX3 [298–300]. Mutacija β 2 narušava strukturu proteina i dovodi do njegove degradacije, dok mutacije β 1 i β 3 dovode do gubitka funkcije SNX3 *in vivo* [300]. Povezanost s endosomima posredovana je vezanjem PI3P preko PX domene na četiri bitna mjesta (smeđe trake u shematskom prikazu PX domene), ali studije mutageneze pokazale su da je položaj 69-71 kritičan (zeleno) [294]. Sekvence 147-162 na karboksi kraju dopuštaju preferencijalno vezanje na PI5P [301]. Studije mutageneze otkrile su nekoliko bitnih točaka u strukturi SNX3 za vezanje komponente Vps35 retromera (smeđe crte) [300,302]. Na temelju ovih strukturnih značajki SNX3, izoforma 2 (SNX3-130) koja kodira protein trebala bi se eksprimirati, ali izgubiti sposobnost vezanja na PI3P EE, slično izoformi 5 (SNX3-102) [295], i zadržati sposobnost vezanja na membrane koje nisu EE (npr. PM). Izoforma 4 trebala bi biti osiromašena jer je β 2-list bitan za stabilnost SNX3 [300]. Položaji početnica korištenih za RT-qPCR su prikazani ispod, a položaji siRNA i shRNA koji se nalaze u sekvencama transkripta označeni su zelenim okvirima. Brojevi označavaju granice i položaje aminokiselina.

4.4.2. SNX3 se lokalizira na Rab10-PD koji ovisi o SNX27

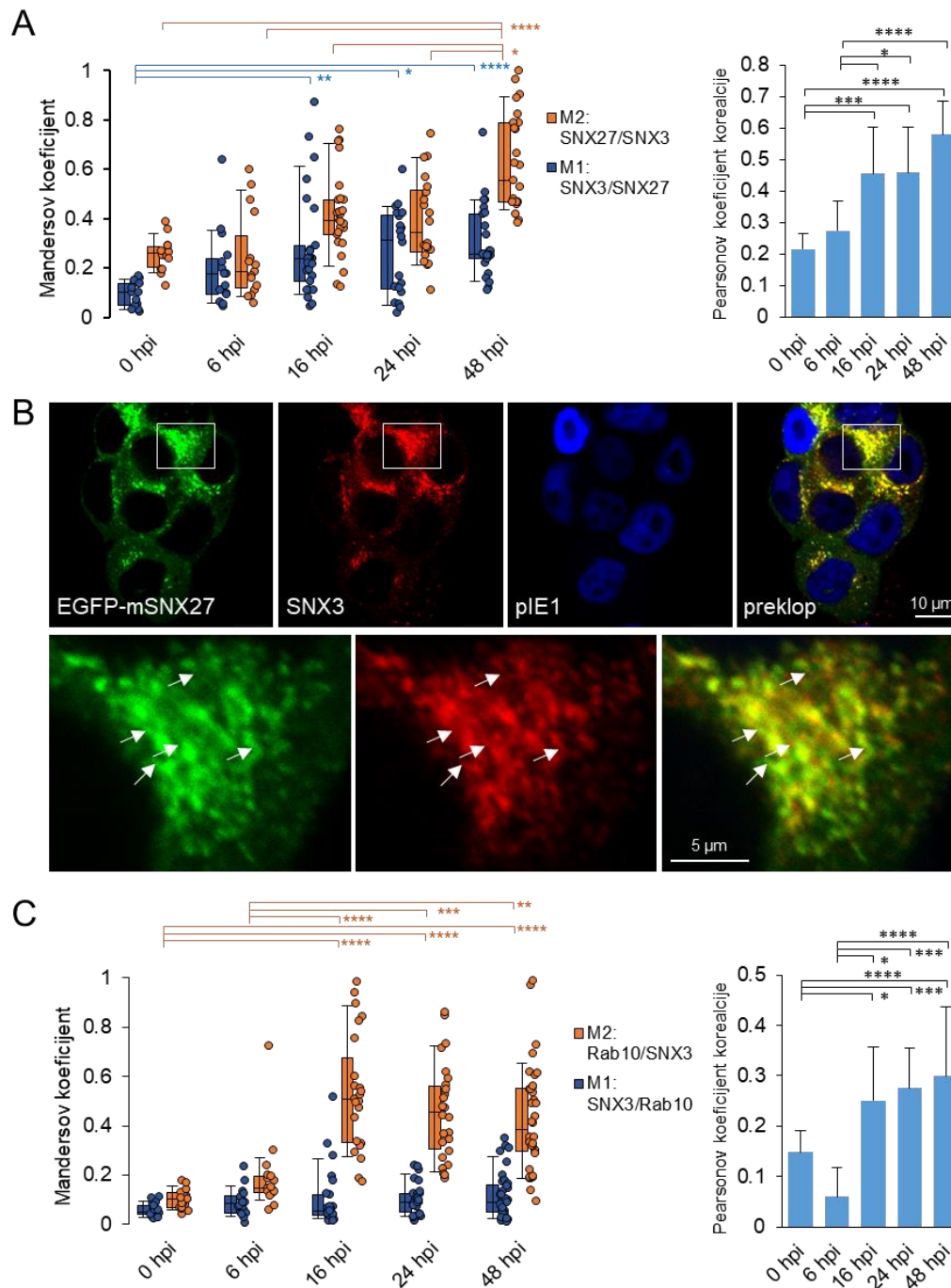
SNX3 se regrutira na EE i može biti uključen u odvajanje tereta u više smjerova, uključujući vraćanje CIE tereta u putanju njegovog recikliranja [257]. Zbog navedenog smo istražili lokalizira li se SNX3 na iste membrane kao SNX27 i Rab10, nizvodni produkt aktivnosti SNX27 u stanicama zaraženim MCMV-om [191]. 3D analizom kolokalizacije smo analizirali je li SNX3 povezan sa SNX27-PD i Rab10-PD. Inficirali smo stabilne stanične linije koje izražavaju inducibilni EGFP-mSNX27 [191] i EGFP-Rab10 [179] te analizirali ekspresiju SNX3 s antitijelima protiv SNX3.

Na 0 hpi (slika 35A), SNX3 i SNX27 preklapaju se u ograničenim područjima stanice, što rezultira niskom kolokalizacijom i ukazuje na njihovu distribuciju u različitim zonama membrane. Na 6 hpi, kolokalizacija SNX3 sa SNX27 se povećala (slika 35A), što ukazuje na reorganizaciju membranskih zona u stanicama zaraženim MCMV-om, u skladu s prethodno opaženim pokretanjem događaja reorganizacije membranskog sustava [83] i pojačanim regrutiranjem SNX27 na membrane unutar

formirajućeg pre-AC [191]. Tijekom E faze, ova se reorganizacija nastavila, a SNX27 je dalje regrutiran na membrane pre-AC, što je rezultiralo povećanjem kolokalizacije SNX27 sa SNX3 sa 6 na 16 hpi (slika 35A). Čini se da je premještanje SNX3-pozitivnih struktura u unutarnji AC bilo popraćeno njegovim dodatnim pojačanim regrutiranjem. Na kraju E faze infekcije, na 16 hpi, SNX27 i SNX3 bili su koncentrirani u istoj vakuolarnoj strukturi i vjerojatno na istim domenama membrane, budući da je kolokalizacija bila značajno veća nego na početku infekcije (slika 35B). I SNX27 i SNX3 pronađeni su na produžecima ovih vakuolarnih struktura, što ukazuje na njihovu distribuciju i u tubularne domene (slika 35B, strelice). Ove su vakuolarne strukture vjerojatno prošireni EE/SE s povećanim kapacitetom tubulacije za stvaranje TRE, u skladu s prethodno objavljenim opažanjem akumulacije i širenja EE/SE unutar pre-AC [83,188,303] i doprinosom SNX27 u stvaranju TRE [191]. Budući da je značajan udio SNX3 ostao izvan SNX27-PD, njegova kolokalizacija sa SNX27 se povećala, iako je značajan udio SNX3-pozitivnih membrana ostao izvan SNX27-PD, posebno u perifernom membranskom sustavu.

S napredovanjem ciklusa replikacije u ranu-kasnu fazu (24 hpi), kada se pre-AC pretvara u AC, i u L fazu kada je AC potpuno razvijen (48 hpi), kolokalizacija SNX27 i SNX3 dodatno se povećala (slika 35A), iako su mnoge membranske domene pozitivne na SNX3 ostale izvan područja s proširenim SNX27-PD. Sve u svemu, ovi podaci sugeriraju produljeno zadržavanje SNX3 i SNX27 na sličnim membranama unutar AC.

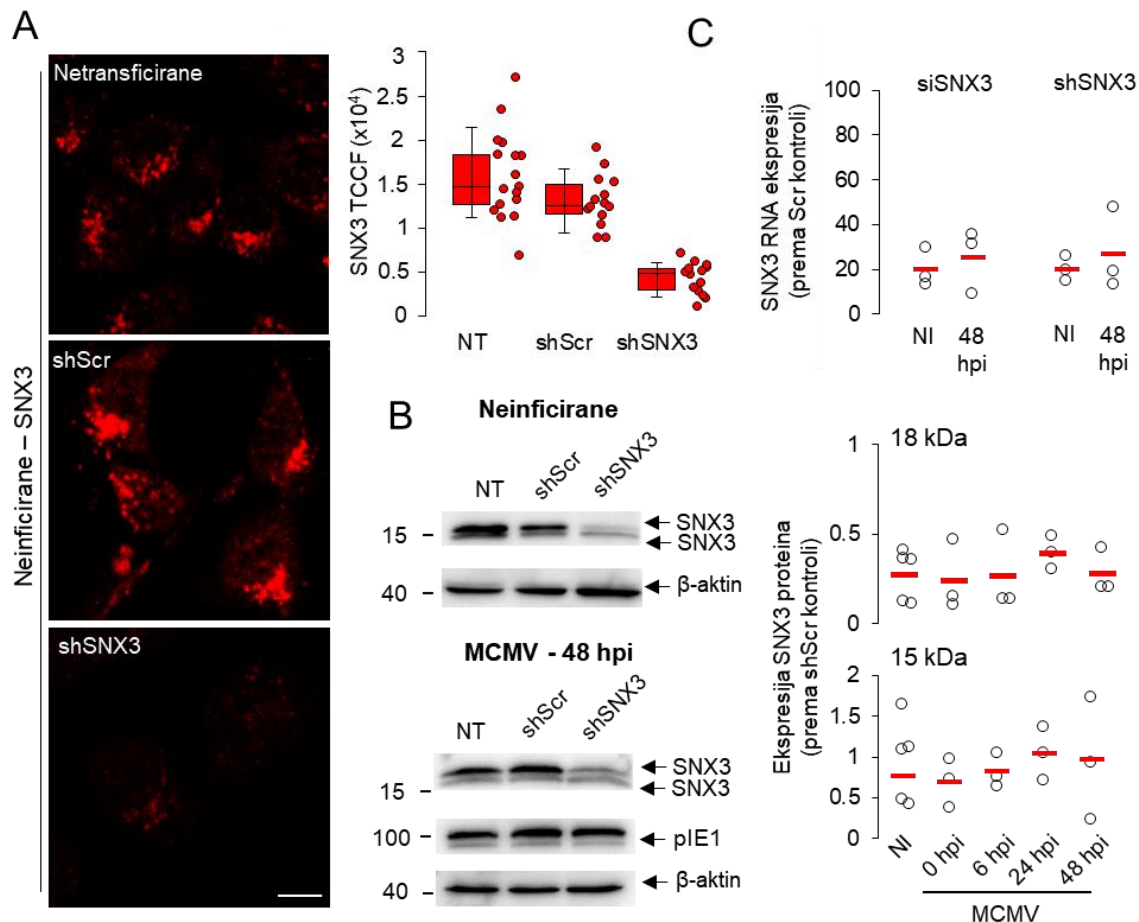
Budući da kompleksi retromer–SNX27–ESCPE-1 posreduju u tubulaciji EE [191] kroz regrutiranje Rab10 ovisno o EHBP1 [179], istražili smo ostaje li SNX3 na Rab10-PD. Kao što se očekivalo, otkrivena je vrlo mala kolokalizacija SNX3 s Rab10 na 0 hpi (slika 35C), ali već na 6 hpi, kolokalizacija Rab10 sa SNX3 se povećala, u skladu s početkom pojačanog regrutiranja Rab10 u EE domenu [179]. U skladu s tim, Rab10-PD se proširio u perinuklearnoj regiji do 16 hpi, što je dokazano povećanim regrutiranjem EGFP-Rab10 u perinuklearnoj regiji koja odgovara pre-AC, a regrutirani Rab10 značajno se preklapao sa SNX3 (slika 35C). Ipak, znatan udio SNX3 ostao je izvan Rab10-PD regije, što je rezultiralo niskim stupnjem kolokalizacije s Rab10. Sličan stupanj kolokalizacije primijećen je na 24 i 48 hpi (slika 35C). Ovi podaci, zajedno s podacima iz analize kolokalizacije sa SNX27, pokazuju da SNX3 ostaje povezan s membranama koje proizvode Rab10-PD.



Slika 35. Analiza kolokalizacije SNX3 sa SNX27 i Rab10. (A-C) NIH3T3 stanice s inducibilnom ekspresijom EGFP-mSNX27 ili EGFP-Rab10 tretirane su doksiciklinom (2 μ g/ml) 24 sata i inficirane s Δ m138-MCMV (MOI od 10). 0, 6, 16, 24 i 48 sati nakon infekcije (hpi) stanice su fiksirane, permeabilizirane i obojene primarnim antitijelima protiv SNX3 i pIE1 nakon čega su slijedila odgovarajuća sekundarna antitijela i analiza konfokalnom mikroskopijom. (A) Analiza kolokalizacije EGFP-mSNX27 sa SNX3, prikazana kao postotak preklapanja (Mandersovi koeficijenti) SNX3 sa SNX27 (M1) i SNX27 sa SNX3 (M2) i Pearsonov koeficijent korelacije po stanici. Mjerenje je provedeno preko cijele z-osi koristeći Intermodos algoritam. Lijevo je prikazan kutijasti dijagram za M1/M2 i rezultat za pojedinačnu stanicu, dok lijevi dijagram prikazuje Pearsonov koeficijent korelacije. Prikazane su srednje vrijednosti $\pm$ SD. (B) Konfokalne slike stanica na 16 hpi. Donji panel slika prikazuje uokvireno područje snimljeno pri većem povećanju. (C) Analiza kolokalizacije EGFP-Rab10 sa SNX3, prikazana kao postotak preklapanja (Mandersovi koeficijenti) i Pearsonov koeficijent korelacije po stanici, kao što je opisano u A. Statistička značajnost određena je Kruskal-Wallisovim testom s Dunnovim post-hoc testom (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).

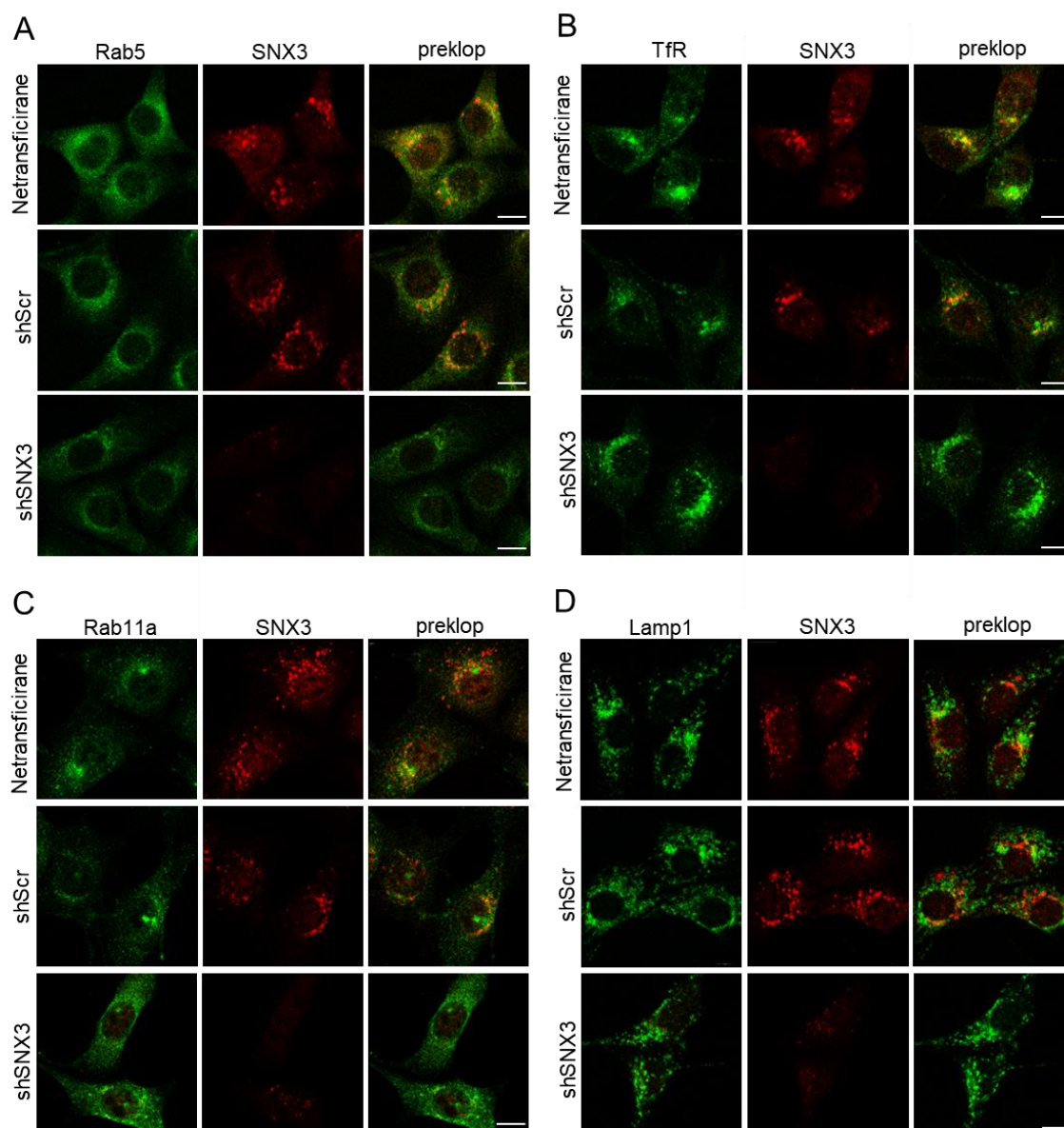
4.4.3. SNX3 doprinosi širenju Rab10-PD

Kako bismo dodatno procijenili doprinos SNX3 napredovanju MCMV infekcije, analizirali smo ključne događaje u ciklusu replikacije MCMV u stanicama sa smanjenom ekspresijom SNX3. Utišali smo SNX3 korištenjem siRNA i stvaranjem staničnih linija sa shRNA (slika 36). Oba su pristupa rezultirala značajnim smanjenjem SNX3 mRNA kako je pokazano koristeći RT-qPCR (slika 36C). Western blot analiza pokazala je značajno smanjenje od 18 kDa SNX3 (prosječno smanjenje bilo je 73% za neinficirane i 48 h inficirane stanice) i umjeren ili nikakav učinak na 15 kDa SNX3 (za neinficirane stanice je prosječno smanjenje bilo 23%, a za 48 hpi, 3%) u stanicama tretiranim shRNA (slika 36B). Signal od 18 kDa odgovara kanonskoj izoformi SNX3-162 (slika 34). Signal od 15 kDa ne odgovara izoformi SNX3-140, jer mutacija domene Snx3- β 2, koja nedostaje izoformi SNX3-140, strukturno narušava njegovu ekspresiju, što dovodi do degradacije [300]. Nadalje, signal od 15 kDa ne odgovara SNX3-113, budući da je ovaj transkript podvrgnut *nonsense* posredovanom putu raspada [297]. Stoga, signal od 15 kDa najvjerojatnije odgovara SNX3-130, kojem nedostaju sekvence egzona 2 (Slika 2) [295–297]. Ova je izoforma vjerojatno otpornija na utjecaj siRNA i shRNA, budući da jedna od tri komplementarne sekvence RNA cilja egzon 2, koji nedostaje u SNX3-130, a druge dvije ciljaju na 3' UTR regiju (slika 34) [297]. Ipak, čini se da je ova izoforma nefunkcionalna u EE jer joj nedostaju ključne sekvence kodirane egzonom 2 (slika 34): β 3 list, koji zajedno s α 1 domenom čini PI(3)P vezni džep [299], ključne aminokiseline 69-71 potrebne za PI(3)P vezanje [257,294], i aa 72, koja je potrebna za fosforilaciju i završetak vezanja PI3P [299]. Unatoč nefunkcionalnoj phox domeni (PX) SNX3-130 na EE, ova izoforma vjerojatno zadržava sposobnost djelovanja na periferiji stanice i PM jer zadržava sekvence vezanja retromera na N-terminusu [300,302] i druge sekvence vezanja fosfoinozitida [npr. PI(5)P] na C-terminusu [301], kao što je opisano za kratku izoformu SNX3-102 koja se veže za klatrin na PM [295]. Sam SNX3-102 mnogo je kraći, nedostaje mu egzon 3 i dio egzona 4, ali sadrži sekvence egzona 2 [295] i stoga bi trebao biti osjetljiv na utišavanje korištenjem siRNA i shRNA kao SNX3-162. Sveukupno, mješavina tri sekvence siRNA i shRNA rezultirala je učinkovitim smanjenjem kanonske izoforme SNX3-162 koja djeluje na EE (slika 34B).

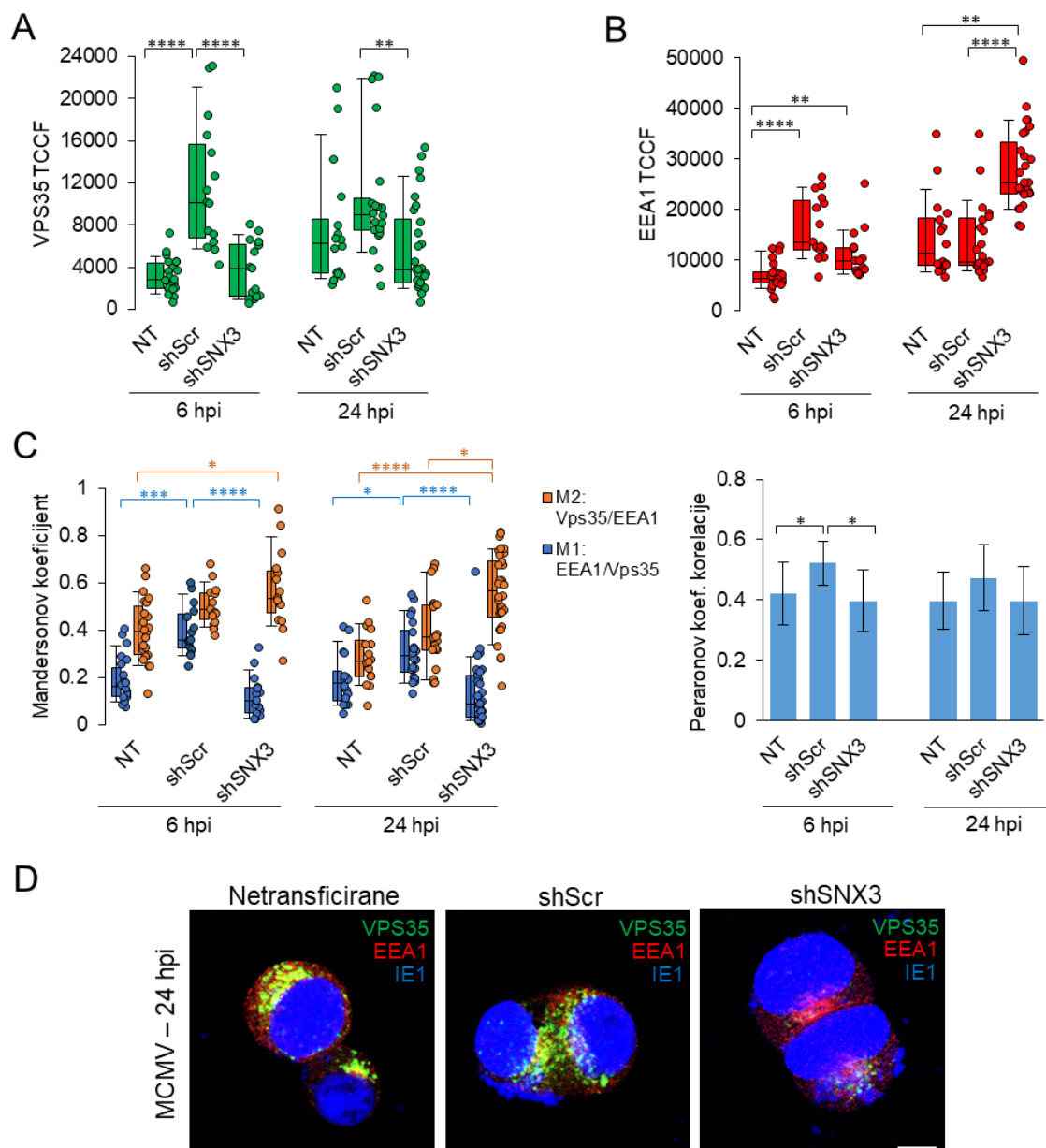


Slika 36. Uspješno proizvedene NIH3T3 stanične linije s ekspresijom shScr i shSNX3. (A) Konfokalne slike neinficiranih staničnih linija, obojene primarnim antitijelima protiv SNX3. Ukupna korigirana stanična fluorescencija (TCCF) za SNX3 pojedinačne stanice kvantificirana ImageJ programom. (B) RT-qPCR kvantifikacija ekspresije SNX3 u neinficiranim i 48 sati inficiranim stanicama tretiranim siSNX3 i stanicama koje ekspresiraju shSNX3. Podaci predstavljaju tri neovisna eksperimenta normalizirana prema si- i shScr kontroli. Crvena linija prikazuje srednju vrijednost. (C) Reprerzentativni Western blotovi koji pokazuju smanjenje SNX3 u neinficiranim i Δm138-MCMV-inficiranim (48 hpi) stanicama. Ekspresija pIE1 je korištena kao kontrola infekcija, a β-aktina kao kontrola nanosa proteina. Podaci s desne strane predstavljaju pojedinačne rezultate Western blotova normalizirane prema ekspresiji β-aktina u svakom uzorku, nakon čega slijedi normalizacija prema shScr. Crvene linije prikazuju srednje vrijednosti.

Kada su ispitane stanice koje ekspresiraju shScr i shSNX3, utišavanje nije rezultirao nikakvom vidljivom promjenom u veličini i distribuciji EE (slika 37A, Rab5), ERC-a (slika 37C, Rab11a) i kasnih endosoma (slika 37D, Lamp1), niti je utjecalo na prometovanje receptora transferina (TfR) (slika 37B, TfR). Primijetili smo povećanje regrutiranja EEA1 u EE u stanicama tretiranim shSNX3 (slika 38A), u skladu s recipročnim odnosom SNX3 i EEA1 na temelju njihove konkurencije za PI3P i mobilizacije u različitim EE zonama [257,294]. Također smo primijetili smanjenje regrutiranja Vps35 (slika 38B), bitne komponente kompleksa retromera [245], i povećanu kolokalizaciju Vps35 s EEA1 (slika 38C), u skladu s gubitkom regrutiranja retromera posredovanog SNX3 u EE i lokalizacijom regrutiranog retromera u EEA1-pozitivnim zonama EE [302]. Ovi podaci sugeriraju da utišavanje 18 kDa SNX3 dovodi do očekivanih promjena u funkciji EE.

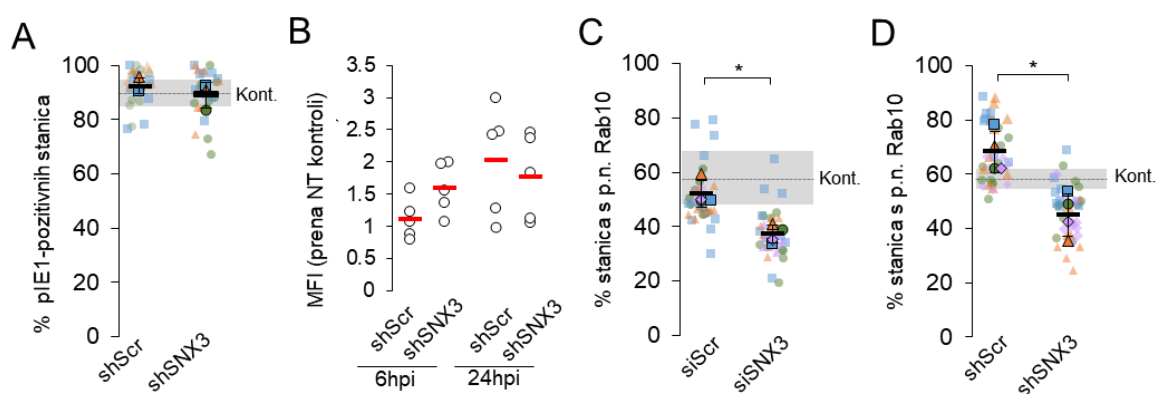


Slika 37. Ekspresija SNX3 shRNA nema učinka na (A) rane endosome, (B) promet receptora transferina, (C) endosomalni odjeljak za recikliranje (Lamp1) i (D) kasne endosome. Analiza imunofluorescencije Rab5, Lamp1 i Rab11a u kombinaciji sa SNX3 provedena je na netransficiranim (NT) NIH3T3 stanicama i staničnoj liniji koja eksprimira shScr i shSNX3. Prometovanje receptora transferina opažen je nakon obilježavanja s anti-TfR (klon R17 217.1.3) na 4°C tijekom 30 minuta, nakon čega je uslijedilo ispiranje i 45 minuta inkubacije na 37°C. Prikazane su konfokalne slike kroz fokalnu ravninu reprezentativnog eksperimenta. Mjerne crte, 10 µm.



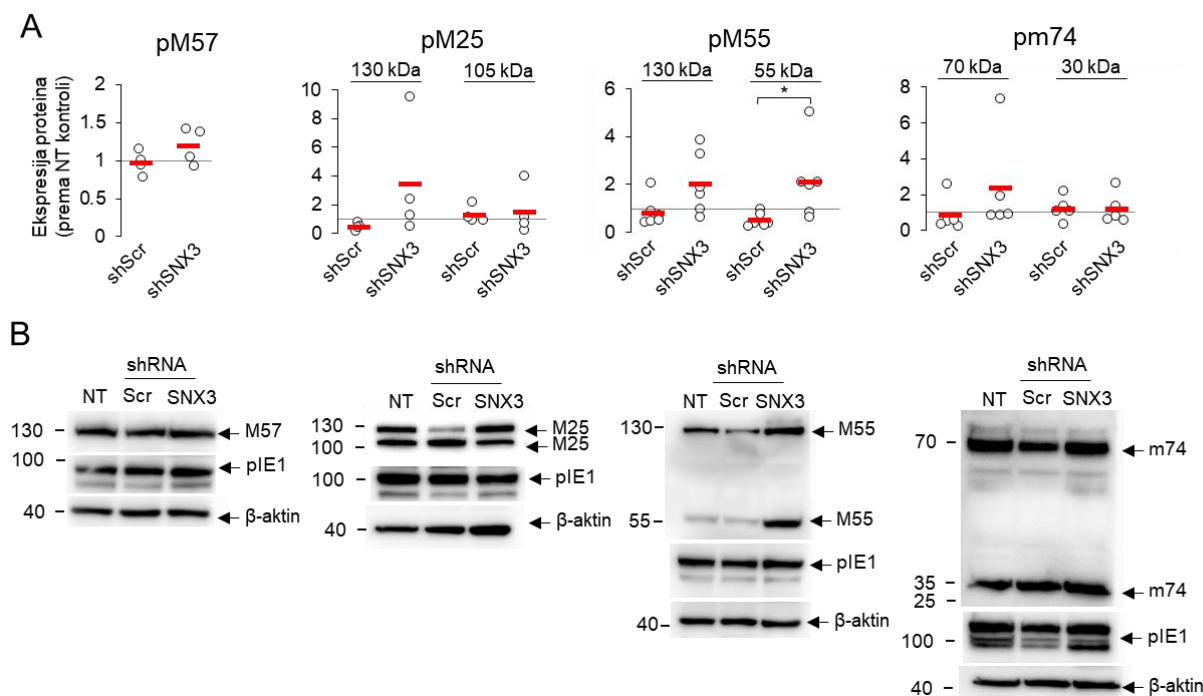
Slika 38. Membranska povezanost retromera, određena pomoću Vps35, i ranog endosomalnog antigena 1 (engl. *early endosomal antigen 1*, EEA1) nakon utišavanja SNX3. Netransficirane (NT), NIH3T3 stanice koje eksprimiraju shScr ili shSNX3 su inficirane s Δ m138-MCMV (MOI od 10). Nakon 6 i 24 hpi, stanice su fiksirane, permeabilizirane i obojene antitijelima protiv Vps35, EEA1 i pIE1 i analizirane konfokalnim mikroskopom. Slike su kvantificirane (**A-B**) za ukupno korigiranu staničnu fluorescenciju (TCCF) i (**C**) za 3D kolokalizaciju Vps35 i EEA1. (**A-B**) TCCF svake stanice je kvantificiran pomoću ImageJ. Podaci prikazuju kutijaste dijagrame i rezultat za svaku stanicu iz tri neovisna eksperimenta. (**C**) 3D analiza kolokalizacije Vps35 s EEA1 prikazana je kao postotak preklapanja (Mandersovi koeficijenti) EEA1 s Vps35 (M1) i Vps35 s EEA1 (M2), te kao Pearsonov koeficijent korelacije (R) po stanici. Mjerenje je provedeno kroz cijelu z-os koristeći Intermodes algoritam. Podaci na lijevoj stranici prikazuju kutijaste dijagrame za M1/M2 i rezultat za svaku stanicu iz tri neovisna eksperimenta, dok podaci na desnoj strani pokazuju srednji Pearsonov koeficijent korelacije za navedene stanice $\pm$ SD. Statistička značajnost određena je Kruskal-Wallisovim testom s Dunnovim post hoc testom (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). (**D**) Reprezentativne konfokalne slike. Mjerna crta, 10 μ m.

Supresija SNX3 pomoću shRNA nije imala učinka na uspostavljanje infekcije, što je utvrđeno ekspresijom pIE1 (slika 39A). Metodom protočne citometrije i kvantifikacije GFP ekspresije u stanicama inficiranim rekombinantnim GFP-MCMV-om, pokazano je da utišavanje nije imalo učinka na progresiju E faze infekcije (slika 39B). Analiza ekspanzije Rab10-PD u stanicama tretiranim siRNA (slika 39C) i stanicama koje eksprimiraju shRNA (slika 39D) pokazala je da su obje metode omogućile ekspanziju Rab10-PD. Udio stanica koje eksprimiraju ekspandirani Rab10-PD bio je umjereno smanjen i to je smanjenje bilo statistički značajno, što sugerira da SNX3 nije neophodan za ekspanziju Rab10-PD, ali doprinosi njenom održavanju.



Slika 39. Učinci deplecije SNX3 na replikaciju MCMV. (A) Postotak stanica koje eksprimiraju shScr i shSNX3 s nuklearnim bojanjem pIE1 na 16 hpi, određeno imunofluorescencijom. Podaci pokazuju pojedinačne eksperimente, srednju vrijednost (crna linija) i SD. Kontrolna (Kont.) linija predstavlja srednju vrijednost $\pm$ SD u netransficiranim stanicama. (B) Ekspresija GFP određena protočnom citometrijom nakon infekcije s GFP-MCMV. (C) Postotak inficiranih (Δ m138-MCMV, pIE1-pozitivnih) stanica tretiranih siScr i siSNX3 ili (D) stanica koje eksprimiraju shScr- i shSNX3 s perinuklearnom (p.n.) akumulacijom Rab10. Podaci predstavljaju pojedinačne eksperimente, srednje vrijednosti (crna linija) i SD. Kont. linija predstavlja srednje vrijednosti $\pm$ SD nakupljanja Rab10 u netransficiranim stanicama.

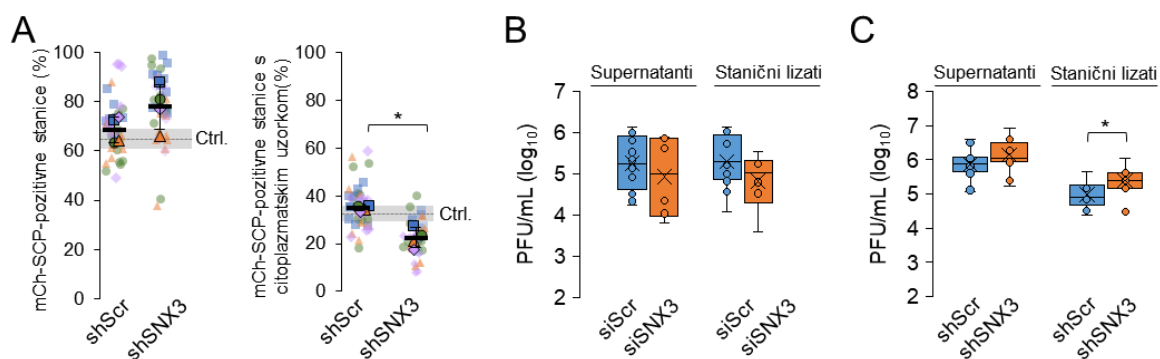
Za razliku od naših prethodno objavljenih opažanja da SNX27–retromer–ESCPE-1-ovisna ekspanzija Rab10-PD doprinosi ekspresiji MCMV proteina [191], smanjenje funkcija povezanih sa SNX3 nije imalo učinka na ekspresiju E proteina (pM57 i 105 kDa pM25), i L proteina, prikazano ekspresijom oba oblika (130 kDa i 55 kDa) pM55 i oblikom pm74 od 70 kDa (slika 40). Međutim, opetovano smo uočavali smanjenje ekspresije L-proteina u stanicama koje eksprimiraju shScr, što sugerira da ovaj postupak smanjuje ekspresiju proteina koji ovise o replikaciji DNA. Dakle, u usporedbi između Scr i SNX3 stanica koje eksprimiraju shRNA, ekspresija 55 kDa oblika pM55 bila je značajno povećana (slika 40). Sumarno, analiza ekspresije MCMV proteina sugerira da deplecija SNX3 ne utječe na sortiranje ovisno o retromer-SNX27-ESCPE-1 u tubularnu domenu Rab10, koje pridonosi kontroli ekspresije virusnih gena.



Slika 40. Učinci deplecije SNX3 na ekspresiju virusnih proteina u kasnoj fazi MCMV infekcije. (A) Ekspresija virusnih proteina pM57, pM25 (130 i 105 kDa), pM55 (130 i 55 kDa) i pM74 (70 i 30 kDa) određena Western blot analizom u netransficiranim (NT) i stanicama s ekspresijom shScr i shSNX3 na 48 hpi (Δ m138-MCMV, MOI 10). Podaci predstavljaju rezultate pojedinačnih Western blotova normaliziranih na ekspresiju β -aktina u svakom uzorku, nakon čega je slijedila normalizacija prema netransficiranoj kontroli. Crvene linije prikazuju srednje vrijednosti. **(B)** Prikaz reprezentativnih Western blotova za svaki virusni protein.

4.4.4. Deplecija SNX3 otežava sastavljanje viriona, ali ne smanjuje prinos virusa

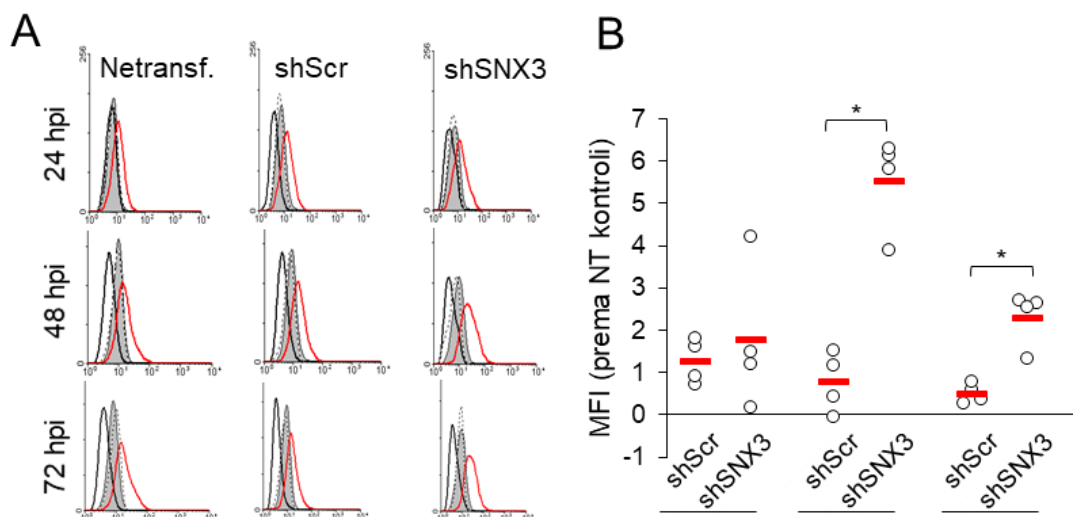
Kako bismo testirali utječe li smanjenje SNX3 na sastavljanje i izlazak viriona, analizirali smo unutarstaničnu distribuciju fluorescentnih kapsida nakon infekcije stanica sa S-mCherry-SCP MCMV. Nakon infekcije ovim virusom, crvena fluorescencija u obliku nuklearnih kondenzata nakupila se u shScr i shSNX3 stanicama, 48 hpi (slika 41A). Postotak stanica koje izražavaju nuklearnu fluorescenciju bio je još veći u stanicama koje izražavaju shSNX3. Od stanica koje izražavaju nuklearnu fluorescenciju, približno 40% stanica koje eksprimiraju shScr pokazalo je citoplazmatsko nakupljanje crvene fluorescencije, što je nešto niže od razina koje su prethodno opažene u netransficiranim stanicama. U stanicama koje eksprimiraju shSNX3, postotak stanica koje pokazuju citoplazmatske nakupine mCherry-SCP značajno je smanjen na 30% stanica (slika 41A). Ovi podaci sugeriraju da bi funkcije povezane sa SNX3 mogle biti potrebne za formiranje citoplazmatskih agregata fluorescentnih viriona. Međutim, kvantifikacija viriona nije pokazala razliku u oslobođenim virionima između stanica koje eksprimiraju shScr i shSNX3, iako se činilo da stanice shSNX3 akumuliraju značajno više viriona povezanih sa stanicom (slika 41B i C), što sugerira da kada su funkcije povezane sa SNX3 smanjene, stanica može proizvoditi i otpuštati infektivne virione.



Slika 41. Učinci deplecije SNX3 na kasnu fazu MCMV infekcije. (A) Postotak stanica s ekspresijom shScr i shSNX3 koje razvijaju nakupljanje SCP nakon infekcije s S-SCP-mCherry-MCMV pri 48 hpi (lijevi dijagram). Desni dijagram prikazuje postotak stanica koje ekspresiraju SCP s razvijenim akumuliranim SCP u citoplazmi. Rezultati predstavljaju kvantifikaciju imunofluorescencijom različitih polja iz četiri neovisna eksperimenta. Prikazane su srednje vrijednosti (crne linije) i prosječne vrijednosti pojedinačnih eksperimenata. Kont. označava srednje vrijednosti $\pm$ SD netransficirane kontrole. (B, C) Kvantifikacija infektivnih viriona u stanicama tretiranim siScr i siSNX3 (B) ili stanicama s ekspresijom shScr i shSNX3 (C) utvrđenih standardnim testom virusnih plakova, 48 sati nakon infekcije s Δ m138-MCMV. Kutijasti dijagrami predstavljaju podatke iz 6-12 pojedinačnih eksperimenata s prikazanim unutarnjim točkama. Statistička značajnost određena je Mann-Whitneyevim testom (* $p < 0,05$).

4.4.5. Deplecija SNX3 korištenjem shRNA relokalizira virusni glikoprotein B

Budući da SNX3 može pridonijeti razvrstavanju tereta na EE, može se pretpostaviti da je njegova funkcija u stanicama zaraženim MCMV-om povezana s kontrolom distribucije virusnog glikoproteina unutar zaražene stanice. Da bismo to istražili, pratili smo ekspresiju pM55, koji tvori homodimerni kompleks gB, i pm74, poznat kao gO, koji tvori kompleks s gH i gL [67], u shSNX3 stanicama. Ova dva glikoproteina imaju različite puteve unutar membranskog sustava stanice. Oba se akumuliraju u vanjskom AC-u i dopiru do membranskih intermedijera unutarnjeg AC-a [83], ali samo se gB/pM55 eksprimira na površini stanice [304,305]. Protočna citometrijska analiza pokazala je značajan porast ekspresije gB/pM55 na površini stanice (slika 42). Ovi su podaci u skladu s povećanom ekspresijom gp55 oblika gB/pM55 (slika 40) koji nastaje proteolitičkom aktivnošću na površini stanice, što sugerira da SNX3 regulira unutarstanični transport gB/pM55.



Slika 42. Deplecija SNX3 povećava razinu pM55 (gB) na staničnoj površini. NIH3T3 stanice koje eksprimiraju shScr ili shSNX3 bile su zaražene s Δ m138-MCMV (MOI 10), a ekspresija pM55 određena je na 24, 48 i 72 hpi pomoću protočne citometrije. **(A)** Prikaz rezultata kao pomak intenziteta zelene fluorescencije reprezentativnog eksperimenta. Crvena linija prikazuje intenzitet pM55. **(B)** Podaci predstavljaju Δ MFI neovisnih eksperimenata normaliziranih prema netransficiranim (NT) stanicama, a crvene linije prikazuju srednje vrijednosti. Statistička značajnost određena je Mann-Whitneyevim testom (* $p < 0,05$).

4.4.6. SNX3 pridonosi mehanizmu koji kontrolira sklapanje i izlazak viriona, zajedno s deplecijom ostalih sortirajućih neksina

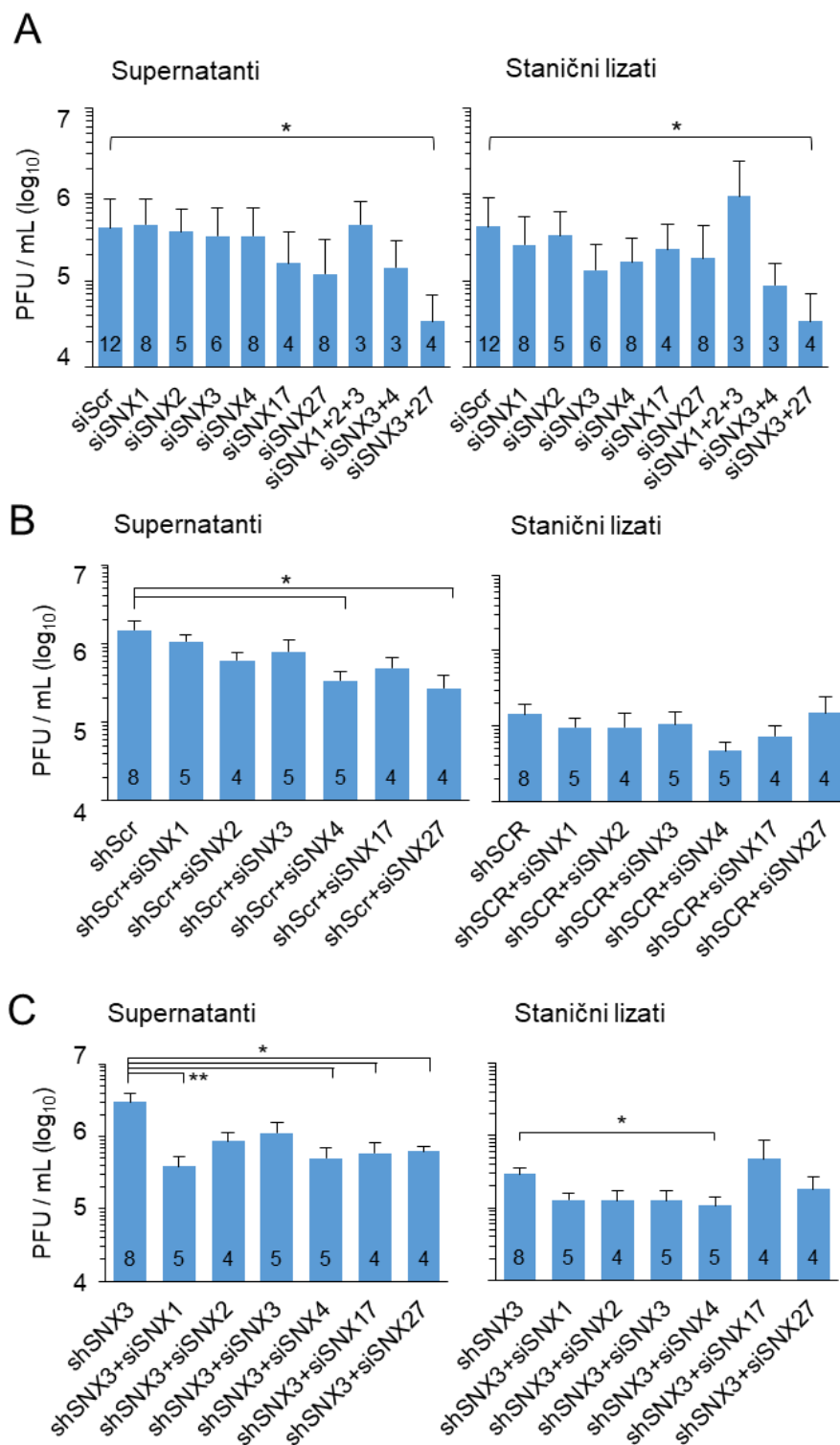
Kako bismo procijenili doprinos SNX3 u sastavljanju i izlasku viriona, utišali smo izražaj svih SNX gena uključenih u odvajanje tereta i savijanje membrane tijekom formiranja tubularnih reciklirajućih EE. Njihov utjecaj je ispitan nakon utišavanja koristeći siRNA u NIH3T3 netransficiranim stanicama i staničnim linijama koje izražavaju shScr ili shSNX3. Stvaranje infektivnih viriona pratilo se standardnim testom virusnih plakova. Ovaj pristup je ograničen zbog dugotrajnog protokola koji uključuje najmanje dva dana transfekcije sa siRNA za dostatnu supresiju razina proteina i dodatna dva do tri dana za formiranje i oslobađanje infektivnih viriona u zaraženim stanicama, što može rezultirati razrjeđivanjem transficirane siRNA.

Supresija SNX1 i SNX2, dvije komponente retromera, SNX4, za koju se zna da je povezana s vraćanjem tereta tijekom endosomalnog recikliranja u PM, i SNX17, za koju se zna da pridonosi sortiranju tereta u TGN [248], nije imala učinka na otpuštanje izvanstaničnih viriona i viriona staničnih lizata (slika 45A). Kombinirana supresija SNX1, SNX2 i SNX3 također nije imala učinka (slika 43A). U skladu s našim prethodno objavljenim opažanjima [191], deplecijom SNX27 se smanjio prinos izvanstaničnih viriona, a čini se da je ovaj učinak pojačan kombiniranim utišavanjem SNX3 (slika 43A). Slični učinci primijećeni su nakon kombinirane supresije SNX3 i SNX4 (slika 43A). Ovi podaci sugeriraju da SNX3 doprinosi endosomalnom putu recikliranja koji se koristi za stvaranje viriona.

Kao što je ranije spomenuto, ekspresija shRNA za SNX3 nije imala utjecaja na proizvodnju i oslobađanje infektivnih viriona. Štoviše, prisutnost kontrolne shRNA dosljedno smanjuje sklapanje

viriona. Transfekcija siRNA za SNX4 i SNX27 u kontrolne stanice koje eksprimiraju shRNA značajno je smanjila prinos izvanstaničnog virusa (slika 43B). Transfekcija siRNA za SNX1, SNX4, SNX17 i SNX27 u stanice koje eksprimiraju shRNA SNX3 značajno je smanjila produkciju izvanstaničnih viriona, a SNX4 je također smanjio virione staničnih lizata (slika 43C). Ovi podaci sugeriraju da funkcije povezane s retromerom, SNX4 i SNX27, doprinose procesima stvaranja i/ili oslobađanja viriona iz zaraženih stanica.

Zaključno, ovi eksperimenti sugeriraju da su procesi sortiranja tereta u endosomalnom putu recikliranja povezanih s CIE sortiranjem tereta, potrebni za sastavljanje viriona i stvaranje virusnog potomstva. Funkcije povezane sa SNX3 nisu ključne, iako SNX3 doprinosi ovim procesima.



Slika 43. Deplecija sortirajućih neksina povezanih s endosomalnim recikliranjem u PM potvrđuje doprinos SNX3 biogenezi viriona MCMV. Utišavanje SNX-ova pomoću siRNA u (A) NIH3T3 stanicama, (B) NIH3T3 stanicama koje eksprimiraju shScr i (C) NIH3T3 stanicama koje eksprimiraju shSNX3. Stanice su tretirane sa siRNA 48 sati, inficirane s Δ m138-MCMV (MOI 10), a količina infektivnih čestica iz staničnih lizata i supernatanta određena je 48 hpi korištenjem standardnog testa virusnih plakova. Rezultati su prikazani kao log₁₀ infektivnih jedinica virusa/mL uzorka. Prikazane su srednje vrijednosti $\pm$ SD četiri do osam nezavisnih eksperimenata (broj eksperimenata je označen u stupcima). Statistička značajnost određena je Kruskal-Wallisovim testom s Dunnovim post hoc testom (*p < 0,05; ** p < 0,01).

5. RASPRAVA

Citomegalovirus je učestali patogen koji pogađa pojedince svih dobi i uspostavlja doživotnu latenciju. Iako je CMV infekcija inače asimptomatska kod zdravih osoba, infekcija imunokompromitiranih osoba ili tijekom trudnoće može uzrokovati tešku bolest. Liječenje je trenutačno ograničeno, a profilaktičko cjepivo nije dostupno [306]. Tijekom produktivne infekcije, stanica domaćina se potpuno preuređuje kako bi se omogućilo uspješno sklapanje i oslobađanje infektivnih viriona. Stvaranje velike strukture poznate kao odjeljak za sklapanje viriona (engl. *assembly compartment*, AC) je najistaknutija promjena u reorganizaciji stanice, bitna za završno omatanje viriona i oslobađanje istih iz stanice [177]. U većini istraživanja preuređivanja stanica nakon betaherpervirusne infekcije korišteni su modeli mišjeg i ljudskog citomegalovirusa (HCMV i MCMV), ali završni koraci u replikacijskom ciklusu se i dalje slabo razumiju. Za bolje razumijevanje biogeneze CMV-a i razvoj antivirusne terapije koja može ciljati faktore stanica domaćina, potrebno je razjasniti ove korake [307].

U ovom radu smo se fokusirali na karakterizaciju i sistematizaciju citopatogenih učinaka tijekom CMV infekcije, identifikaciju staničnih proteina uključenih u završni korak sekundarnog omatanja te detaljnu analizu uloge sortirajućeg neksina 3 (SNX3) u CMV replikaciji, zajedno s odabranim članovima SNX obitelji.

Citopatogene učinke smo opsežno analizirali snimanjem stanica koristeći digitalnu holotomografsku mikroskopiju (DHTM) uz korištenje mikroskopa 3D Cell Explorer-*fluor*. Snimanje omogućuje 4D bilježenje refraktivnog indeksa (RI) te 2D snimanje tri fluorescentne boje. Za kvantifikaciju slika dobivenih DHTM-om, potrebno je provesti proces segmentacije. Segmentacija slika predstavlja izazov u analizi slika jer trenutno ne postoji standardizirani pristup za segmentiranje stanica. Za segmentaciju stanica dobivenih korištenjem mikroskopa 3D Cell Explorer-*fluor* postoji komercijalno dostupan softver (EVE Analytics). Koristili smo njegovu *trial* verziju kako bi kvantificirali 3D promjenu refraktivnog indeksa tijekom infekcije s obzirom da se RI pokazao kao nova dimenzija virusne infekcije [111]. Za 2D kvantifikaciju morfoloških parametara koristili smo javno dostupan segmentacijski model Cellpose [280].

Razvijeni su mnogi fizički modeli i teorijski principi za razumijevanje i proučavanje biofizičkih svojstva stanice, kao što su električna, mehanička i optička svojstva. Biofizička svojstva stanice važne su veze između biologije i fizike, koje se mogu koristiti za analizu i razumijevanje unutarstaničnih organela i dinamike života stanice [308]. Električni parametri kao što su impedancija, elektromotorna sila i vodljivosti vrlo su korisni u proučavanju aktivnosti mozga putem neuronskih mreža u širenju električne sinapse. Mehanička svojstva kao što su brzina, elastičnost i adhezivne sile pomažu u praćenju fiziološkog statusa stanice i kako ona reagira na različite sile. Optička svojstva kao što su kontrast, raspršenje i adsorpcija, određuju koliko svjetlosti se prenosi kroz stanice [309].

Stanični RI je jedan od ključnih biofizikalnih parametara koji se intenzivno proučava, počevši od prosječnog RI stanica u suspenziji, RI pojedinačnih stanica do 2D i 3D distribucije RI organela unutar

stanice [310–312]. Na temelju vrijednosti RI se može odrediti koncentracija krute, suhe i mokre mase stanica, elastičnost i promjene u metaboličkoj aktivnosti stanica tijekom infekcije i različitih faza staničnog ciklusa [122]. Takve promjene mogu biti povezane s abnormalnošću i disfunkcijom stanica, kod različitih bolesti otkrivajući intrinzičnu dinamiku u stanicama i drugim mikroorganizmima. RI abnormalnih stanica se može usporediti s normalnim stanicama kako bi se utvrdile razlike i povezanost s bolestima poput malarije i raka [313,314]. Primjerice, jezgri RI je povećan s 1,542, 1,544 na 1,545 RIU (engl. *refractive indeks unit*) kada se uspoređuju normalne stanice, stanice raka koje su identificirane kao normalne stanice i maligne stanice [315]. Ovaj rastući trend ukazuje da se indeks loma jezgre povećava kako su stanice raka veće stoga RI jezgre može biti značajan čimbenik za ranu dijagnozu raka. Budući da su virusne čestice vrlo male veličine, njihovo mjerenje je mnogo teže. Tehnike mjerenja njihovog indeksa loma su ograničene i uglavnom se temelje na mjerenju u suspenziji [316,317]. Zbog ograničenja mjernih tehnika, u literaturi se ne može pronaći mnogo podataka o mjerenju indeksa loma virusa [309].

Naši rezultati su pokazali da se prosječni RI stanica povećava tijekom CMV infekcije, od 24 do 72 hpi. Ova promjena se u budućnosti treba detaljnije analizirati kako bi se dokazalo da je promjena u RI vrijednosti specifična za CMV infekciju. Promjena u RI može korelirati s citopatogenim učincima infekcije. 2D segmentacijom DHTM slika smo kvantificirali promjenu šest parametara (površina, opseg, omjer duljine i širine stanične osi, kružnost, elipsoidnost i solidnost) kod neinficiranih stanica, i stanica u infekciji (0-72 hpi). Pokazano je da je promjena u morfologiji stanica dinamičan proces koji iskazuje generalni trend pada ili porasta ovisno o parametru, ali s različitim fazama unutar samog ciklusa. Najveća promjena kod svih parametara se pokazala na 60 hpi. U budućnosti se može ispitati korelacija između promjena u vrijednosti parametara i faze virusne replikacije, izlaska i produkcije infektivnih viriona. Dugotrajnim snimanjem stanica rekombinantnim S-mCherry-SCP MCMV-om, koji omogućava vizualizaciju malog kapsidnog proteina u kasnoj fazi, prikazali smo nekoliko citopatogenih promjena: zaokruživanje i fuziju stanica, stvaranje mjehurića na plazmatskoj membrani (engl. *blebbing*), nastanak malog kapsidnog proteina u jezgri i njegov izlazak u citoplazmu. U citoplazmi su uočene akumulacije S-SCP-a koje vjerojatno označavaju multiviralna tijela s nakupljenim nukleokapsidama gdje se vrši sekundarno omatanje. Njihov izlazak je uočen od 31. sata infekcije i nastavio se do kraja snimanja odnosno 72 hpi. Produkcija kapsida u jezgri je započela 20 sati nakon infekcije. Tijekom tog vremena povećavao se ukupni udio S-SCP pozitivnih stanica i udio S-SCP pozitivnih stanica s citoplazmatskim nakupljanjem S-SCP-a. Ovi rezultati ističu potencijal DHTM-a kao snažnog alata za proučavanje promjena uzrokovanih virusima u živim stanicama, pružajući uvid u dinamiku virusnih infekcija i njihov utjecaj na ponašanje stanica.

Nadalje, kolokalizacijskom analizom smo karakterizirali citoplazmatske odjeljke s nakupljenim fluorescencno obilježenim malim kapsidnim proteinom. 3D kolokalizacijsku analizu smo proveli koristeći S-mCherry-SCP-MCMV i 46 markera različitih membranskih odjeljaka metodom konfokalne mikroskopije. Rezultati su ukazali da su ovi odjeljci Rab15 pozitivni zbog visoke razine kolokalizacije

S-SCP s Rab15 odnosno većinskog nakupljanja staničnog Rab15 u njima. Povećana kolokalizacija je još utvrđena s VPS35, Rab8a, Rab35, CD63, Lamp1, p62, Vtila i Golgin97. VPS35 je marker sortirajućih endosoma, Rab8a i Rab35 endosomalnog reciklirajućeg odjeljka, CD63 i Lamp1 kasnih endosoma, p62 autofagosoma, a Vtila i Golgin 97 trans-Golgijske mreže. Osim membranskih organela, proučili smo kolokalizaciju s glikoproteinima virusne ovojnice (pM55 i pm74) i glavnim tegumentnim proteinom (pM25). pM25 se preklapa s S-SCP približno 70%, a pM55 i pm74 od 43-50%. Prisustva malog kapsidnog proteina, glikoproteina i proteina tegumenta potvrđuju virusnu komponentu u odjeljku, a Rab15 komponentu membranske organele.

Rab15 je član RAS onkogene obitelji i Rab8 obitelji zbog slične strukture koji dijeli s Rab8, Rab10 i Rab13 [318]. Za razliku od nekih ostalih Rab proteina, o detaljnijoj ulozi Rab15 se ne zna mnogo. Lokalizira se na ranim endosomima i na ERC-u u stanicama jajnika kineskog hrčka [319]. Aktivira se uz Rab35 na membranama reciklirajućih endosoma koji mobilizira MICAL-L1 u svrhu nakupljanja ostalih Rab proteina (Rab8, Rab13 i Rab36) [320]. Lokalizira se u epitelnim stanicama na reciklirajućim endosomima [321] i na Weibel-Palade tjelešcima (engl. *Weibel–Palade bodies*, WPB) u stanicama endotela [322]. WPB su jedinstvene organele povezane s lizosomima koje se formiraju na trans-Golgi mreži i dalje sazrijevaju primajući materijal iz endo-lizosomalnog sustava iz kojih se izlučuju von-Willebrandov faktor i P-selektin [323]. Na njihovoj membrani su detektirani Rab15, Rab3a, Rab27a, Rab33a i Rab37, a za sazrijevanje su potrebni Rab3, Rab27a i Rab15 koji potiče egzocitozu WPB [322,324].

Prethodna istraživanja su pokazala da se Rab15 slabo vizualizira na membranama neinficiranih stanicama mišjih fibroblasta u perinuklearnom području [83], ali rano nakon infekcije se pojačano eksprimira i regrutira na membrane unutrašnjeg AC-a [83,193]. Analiza pet proteoma HCMV-a je pokazala da Rab15 ne ulazi u sastav izvanstaničnih viriona [231]. Deplecija Rab15 nije pokazala značajne promjene u produkciji izvan- i unutarstaničnih viriona, iako je primijećen blagi porast u otpuštenim virionima i virionima unutar stanice. Iako je ovaj rezultat sukladan s činjenicom da se Rab15 ne nalazi unutar izvanstaničnih viriona jer navedeno označava da Rab15 pozitivne membrane ne sudjeluju izravno u procesu sekundarnog omatanja, treba uzeti u obzir nisku razinu utišavanja proteina Rab15 koja je iznosila 50% dok se prihvatljivom razinom inače smatra barem 80%. Potrebna je daljnja analiza Rab15 odjeljaka i proširenje broja markera kako bi se utvrdilo njihovo podrijetlo i razjašnjavanje kolokalizacije s ostalim markerima.

GeneCards interaktom za Rab15 (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RAB15>, pristupljeno 14.02.2025.) ukazuje na vezanje Rab15 s EXOC1 (Sec3), EXOC2 (Sec5), EXOC4 (Sec8) i EXOC6 (Sec15), komponentama oktamernog kompleksa egzocista. Navedeni kompleks je potreban za transport i fuziju vezikula s plazmatskom membranom [325]. Od ostalih efektor poznati su MICAL1, MICAL3, MICAL-cL, EHBP1 i EHBP1L1 iz obitelji bMERB, Rep15, Munc13-4, Mss4 (RABIF) [318,324,326–329]. Rep15 se selektivno veže za Rab15 u svrhu

reguliranja recikliranja iz ERC-a [328], Munc13-4 je nužan za egzocitozu WPB-a [324], a Mss4 (RABIF) omogućava fuzioniranje sekretornih vezikula s PM-om [329].

Sumarno, rezultati ukazuju na omatanje na reciklirajućim endosomima (Rab8a, Rab35, Vps35 komponenta Retromera) koji maturiraju uz izmjenu materijala s kasnim endosomima (CD63, Lamp1) i trans-Golgi membranama (Vti1a, Golgin97) uz križanje s autofagosomalnim putem (p62) za stvaranje sekretornih organela koje omogućuju izlazak iz stanica. Takav put je sličan putu stvaranja Weibel-Palade tjelešaca, sekretornih organela sličnih lizosomima [323].

U daljnjoj identifikaciji membranske organele uključene u sklapanje viriona, planirano je BioID2 obilježavanje virusnih glikoproteina m06 i pM55 kako bi se biotininirali stanični proteini s kojima dolaze u kontakt. m06 ne ulazi u sastav viriona, dok je pM55 glavni glikoprotein virusne ovojnice. Rekombinantni virusi su proizvedeni, ali samo je m06-BioID2-HA inficirao stanice MEF-a, dok je replikacija virusa bila onemogućena korištenjem M55-BioID2-HA. Navedeno ukazuje da dodavanje biljega na pM55 onemogućuje replikaciju virusa.

Kako bi ostvarili cilj identifikacije membranske organele uključene u sklapanje viriona, analizirali smo utjecaj odabranih staničnih proteina na sučelju EE/RE/ERC koji bi mogli doprinijeti omatanju virusne čestice. Analizom proteoma izvanstaničnih viriona su objavljeni stanični potpisi koji zaostaju u virionima, a mogu ukazivati na mjesto sekundarnog omatanja [231]. Rezultati su pokazali da se omatanje događa najvjerojatnije na membranama reciklirajućih endosoma, stoga smo navedenu studiju koristili kao bazu za odabir siRNA sekvenci u cilju deplecije staničnih proteina. Utišavanje smo proširili na ostale proteine koji oblikuju membransko prometovanje na sučelju EE/RE/ERC. Sveukupno smo ispitali učinak supresije 21 staničnog faktora na oslobađanje infektivnih viriona, 48 sati nakon infekcije. Hipotetizirali smo da proces omatanja viriona zahtijeva tubulacijski endosomalni sustav - supresija proteina koji potiču tubulaciju smanjuje prinos infektivnih viriona, dok će supresija proteina koji sudjeluju u zaustavljanju tubulacije povećati produkciju infektivnih viriona. Primjerice, MICAL-L1 i PACSIN2 mogu regrutirati EHD1 na membrane EE i ERC-a u cilju cijepanja reciklirajućih tubula nakon elongacije [330]. Rezultati su pokazali značajno povećanje unutarstaničnih viriona nakon utišavanja EHD1, MICAL-L1 i PACSIN2 i izvanstaničnih viriona iako za EHD1 to povećanje nije bilo statistički značajno. Navedeni rezultat se slaže s predloženom hipotezom jer se supresijom navedenih faktora nije zaustavila tubulacija što može dovesti do povećanog omatanja viriona i posljedično povećane produkcije istih.

Supresija klatrina smanjuje oslobađanje infektivnih viriona. Klatrin ima strukturnu ulogu sastavljajući se u rešetkastu strukturu poput košare koja iskrivljuje membranu i potiče pupanje vezikula plazmatskoj membrani, endosomima i u sekretornom putu [331]. Smanjena produkcija viriona nakon supresije klatrina može se objasniti pojačanim regrutiranjem klatrina na Arf1 odjeljcima koji povezuju rane endosome i endosomalne reciklirajuće odjeljke, što je razjašnjeno u nedavno objavljenoj studiji [332]. U toj studiji je pokazano da Arf1 odjeljci posreduju vrlo dinamičan transport prema endosomalnim

reciklirajućim odjeljcima tako što regrutiraju klatrin i AP komplekse čime se pokreće intenzivna tubulacija, otpuštanje Arf1 i sazrijevanje odjeljaka u reciklirajuće endosome. Tom studijom su potvrđena zapažanja koja su ukazala da Arf proteini klase I (Arf1 i Arf3) i klase II (Arf4 i Arf5), pored dobro poznate funkcije Arf proteina klase III (Arf6), imaju značajnu ulogu u regulaciji transporta kroz reciklirajuće endosome. Primjerice ranije studije pokazale su da Arf1 i Arf4 proteini reguliraju transport iz reciklirajućih endosoma prema TGN [333], Arf1 i Arf3 proteini iz reciklirajućih endosoma prema plazmatskoj membrani [334], a Arf1 i Arf3 iz ranih endosoma u putu koji je ovisan o Rab4 [335]. U stanicama inficiranim s CMV-om svi članovi porodice Arf ostaju dugo vezani na membrane unutarnjeg AC, kao i klatrin i AP2 kompleksi [83,189] što ukazuje na usporenu dinamiku sazrijevanja tih membrana i pojačanu tubulaciju Arf-ovisnih odjeljaka, koja je vjerojatno potrebna za sekundarno omatanje. Time se može objasniti učinak deplecije klatrina na smanjenu produkciju viriona u kontekstu naše polazišne hipoteze. U tim studijama nismo mogli koristiti depleciju Arf1 proteina jer smo u našim prethodnim istraživanjima [189] utvrdili da deplecija Arf1 i Arf6 proteina sprječava infekciju.

Delecija Akt1 smanjuje ukupan broj proizvedenih i oslobođenih viriona, iako ne značajno, no njegova supresija koči replikaciju virusne DNA što je potvrđeno kemijskim inhibitorima (*Marcelić, neobjavljeno*) stoga se njegova funkcija ne može povezati sa sekundarnim omatanjem.

Kako je Rab11 ključni protein za tubulaciju na ranim endosomima i endosomalnom reciklirajućem odjeljku [248,251,336] ne iznenađuje naš rezultat koji pokazuje da je deplecija Rab11 dovela do značajnog smanjenja infektivnih vitona unutar stanice i u supernatantu. Time se, također potvrđuje naša hipoteza da je tubulacija u endosomalnim reciklirajućim odjeljcima potrebna za sekundarno omatanje CMV viriona.

Deplecija DENND4 smanjuje produkciju viriona, što je također u skladu s očekivanjima u okvirima postavljene hipoteze. Naime, DENND4 regrutira Rab5 na ranim endosomima i potiče aktivaciju Rab10 na membrani endosoma jer je DENND4 protein GEF za Rab10, a Rab10 je neophodan za nastanak tubularnih endosoma [337,338] i pojačano se regrutira na membranama unutarnjeg AC u stanicama inficiranim MCMV-om [83] što rezultira pojačanom tubulacijom membrana ranih endosoma koje vode prema ERC-u [179,191]. Prema tome, smanjenjem regrutacije Rab10 smanjuje se tubulacija, što je također u skladu s našom hipotezom da je tubulacija u endosomalnim reciklirajućim odjeljcima potrebna za sekundarno omatanje CMV viriona.

Naposlijetku smo istražili doprinos SNX3 u širenju Rab10-PD, biogenezi pre-AC i proizvodnji infektivnih viriona tijekom MCMV infekcije te ulogu odabranih sortirajućih neksina u produkciji infektivnih viriona. Sortirajući neksini koji nizvodno reguliraju izlazne putove od EE-a prema PM-u u neinficiranim fibroblastnim NIH3T3 stanicama, kao što je SNX27, prolazno se i vrlo dinamički mobiliziraju na EE membrane, što rezultira njihovim slabim regrutiranjem na membrane [191]. Nasuprot tome, SNX3 ostaje na membranama EE u stabilnom stanju i perifernom membranskom sustavu. Njegovo regrutiranje u stabilnom stanju (engl. *steady state*) na EE u skladu je s njegovim

konstitutivnim vezanjem na PI3P-obogaćene membranske regije EE-a preko PX domene i kompeticije s PI3P-vezujućim proteinima koji sadrže FYVE domenu kao što su EEA1 i Hrs [257,339]. Njegovo regrutiranje u EE povezano je s poznatim funkcijama u sortiranju tereta ovisnom o retromeru u TGN [248] i sortiranju CIE tereta neovisno o retromeru za recikliranje u PM [257], dok je njegovo regrutiranje u organele periferne membrane povezano s njegovom funkcijom u endocitoznim procesima ovisnim o klatrinu [295]. U neinficiranim NIH3T3 stanicama, otkrivene su dvije izoforme SNX3, na temelju strukturnih analiza SNX3) [294,295,298–302]. Izoforma veličine 18 kDa (SNX3-162) vjerojatno je povezana s funkcijama SNX3 u EE, dok je izoforma od 15 kDa (SNX3-130) vjerojatno povezana s funkcijama SNX3 na organelama periferne membrane. Ekspresija mješavine tri siRNA ili shRNA sekvence suprimirala je SNX3-162, ali ne i SNX3-130.

U stanicama zaraženim MCMV-om, EE-ovi ukrašeni SNX3 premješteni su u pericentriolarnu regiju tijekom E faze infekcije, u skladu s njihovim nakupljanjem i širenjem unutar pre-AC. Ekspanzija je povezana s povećanjem ekspresije SNX3-162, što nije povezano s povećanjem transkripcijske aktivnosti, budući da transkript SNX3 nije promijenjen tijekom E faze infekcije. Ovi podaci sugeriraju da CMV infekcija proširuje zonu EE-a ovisnu o SNX3 mehanizmom koji povećava stabilnost i obilje proteina SNX3. Širenje SNX3 zone EE-a povezano je ne samo s povećanom površinom membrane za regrutiranje SNX3, već i s kompeticijom SNX3 s EEA1, čije je regrutiranje smanjeno u stanicama zaraženim MCMV-om [188] i HCMV-om [181]. Uočeno širenje SNX3-pozitivne zone popraćeno je povećanim i produljenim regrutiranjem SNX27 u istoj zoni membrane, što je rezultiralo snažnom kolokalizacijom SNX27 sa SNX3 i sugerira da je SNX27 regrutiran u konstitutivnu SNX3 zonu EE-a. Ovo zapažanje sugerira da SNX3-pozitivna domena doprinosi razvrstavanju CIE tereta za recikliranje u PM, kao što je objavljeno u drugim studijama [179], te da MCMV infekcija posebno proširuje zonu SNX3/SNX27 za razvrstavanje i recikliranje CIE tereta. Ovo područje EE-a nije u izobilju u nezaraženim stanicama, kao što pokazuje niska kolokalizacija SNX3 sa SNX27, vjerojatno zbog njegove vrlo dinamične izmjene (engl. *turn over*). Kako je infekcija napredovala i pre-AC sazrijevao u AC, kolokalizacija SNX27 sa SNX3 dodatno se povećavala, sugerirajući da se područje za recikliranje CIE tereta unutar AC-a kontinuirano širi. Analiza kolokalizacije također je otkrila značajan udio SNX3 izvan EE zone ukrašene SNX27, u skladu s EE regijom ovisnom o SNX3/retromeru za razvrstavanje tereta u TGN i angažmanu SNX3 u perifernom membranskom sustavu [295].

U prethodnim istraživanjima je pokazano da SNX27, zajedno s retromerom (heterotrimer koji sadrži Vps26, Vps29 i Vps35) i ESCPE-1 (heterodimerne kombinacije SNX1 ili SNX2 sa SNX5, SNX6 ili SNX32), tvori funkcionalne proteinske komplekse u proširenim EE zonama unutar pre-AC i AC koji su potrebni za progresiju replikacijskog ciklusa CMV [191]. Poznato je da ovi kompleksi preuzimaju CIE teret i razvrstavaju ga u CIE reciklirajući put prema PM [245,248,340]. Razvrstavanje tereta je popraćeno inicijacijom cjevastih elongacija na EE membranama, nakon čega slijedi regrutiranje mašinerije za tubularne elongacije, produljenje tubula i njihovu brzu fiziju u nosače za recikliranje [245,248]. Tubularna elongacija inicira se regrutiranjem EHBP1 na membrane, popraćeno aktivacijom

Rab10 i izravnim vezanjem Rab10-GTP na EHBP1 [337,341]. Nije jasno kako se EHBP1 regrutira na membranu, ali je vjerojatno da se komponenta SNX5 ESCPE-1 povezuje s PIPKI γ 5, endosomalnom varijantom PIP5K koja stvara PI(4,5)P2 [342], a EHBP1 se veže izravno na PI(4,5)P2 i specifično ponovno aktivira Rab10-GTP [341]. Regrutirani Rab10, koji veže membrane na citoskelet, regrutira motorne proteine i druge proteine potrebne za produljenje membrane i rast tubula [337], što je potrebno za produljenje membrana u tubule. Tubulacija je dodatno podržana Rab10-podržanim regrutiranjem MICAL-L1 [338], poznatog Rab10 interaktora [343], osim ako MICAL-L1 ne formira komplekse s Pacsin2 i EHD1, koji su potrebni za završetak tubulacije cijepanjem tubula [338].

U neinficiranim fibroblastima, vjerojatno je da se proces povezan sa SNX27 odvija brzo, a vrlo malo SNX27 i Rab10 se može detektirati na membranama [83,179,190,191]. Slična promjena u dinamici tubulacije je primijećena u stanicama zaraženim MCMV-om, u koracima ovisnim o SNX27 [191] i EHBP1/Rab10 [179].

Iako se SNX3 i SNX27 lokaliziraju u istu EE zonu stanica zaraženih MCMV-om, funkcije povezane sa SNX3 nisu bitne za ekspanziju TRE, kao što je prikazano pericentriolarnim regrutiranjem Rab10. Ipak, u stanicama osiromašenim SNX3, razvoj Rab10-PD-ova i njihova pericentriolarna akumulacija je smanjena, što sugerira da je platforma za sortiranje temeljena na SNX3 korak koji ograničava brzinu u endosomalnoj tubulaciji u stanicama zaraženim MCMV-om. U interakciji SNX3 i SNX27, čini se da SNX3 djeluje proksimalno u odnosu na SNX27 [294,344], a SNX27 je potreban za stvaranje tubularnih intermedijera koji služe kao signalni znakovi za ekspresiju gena MCMV. U nedostatku SNX3, stvaraju se tubularni međuproizvodi i eksprimiraju se geni MCMV, što sugerira da SNX3 nije potreban za razvrstavanje faktora stanica domaćina potrebnih za kontrolu ekspresije gena MCMV.

SNX3 bi mogao djelovati kao početni mehanizam za razvrstavanje u EE-ovima za sortiranje tereta dalje od degradirajućeg područja EE-ova [245]. Ako nema drugog signala za sortiranje tereta ovisnog o redosljedu (engl. *sequence dependent sorting*), SNX3 može preusmjeriti teret na TGN. U prisutnosti sekvenci sortiranja koje mogu regrutirati SNX27, teret razvrstan sa SNX3 preusmjerava se na specifične regije EE-ova koji generiraju cjevasta proširenja, olakšana nizvodnim regrutiranjem Rab10. Ovo je od posebnog interesa za CMV, budući da se virusni glikoproteini moraju ili razvrstati u cjevaste EE domene koje vraćaju teret u PM prije razgradnje ili preusmjeriti glikoproteine u TGN za recirkulaciju. U nedostatku SNX3, dio glikoproteina gB/pM55 preusmjerava se na PM, što rezultira povećanjem oblika gp55. Poput HCMV gB/UL55, genski produkt M55 eksprimira se na PM [304], akumulira se u TGN [345] i ima motiv kojeg čini klaster kiselih (engl. *acidic cluster motif*) potreban za endocitozni unos [305], iako je dostupno vrlo malo informacija o njegovoj endocitozi [346]. Poput HCMV gB, MCMV gB/M55 ima višestruke motive razvrstavanja koji su potrebni za recikliranje ovisno o redosljedu do PM-a putem CIE puta recikliranja tereta i za kruženje unutar puta EE-to-TGN [245,347]. Ima motiv koji se može prepoznati pomoću PDZ domene SNX27 [191], skupine pozitivno nabijenih ostataka za vezanje ACAP1 i nekoliko hidrofobnih motiva za vezanje ESCPE-1, ali nema

motiva za vezanje sa SNX17. Također ima nekoliko FXL-aromatskih hidrofobnih motiva za prepoznavanje pomoću SNX3:Retromera i nekoliko motiva za vezanje na AP1 i AP3. Na ovaj način, gB/pM55 može kontinuirano prolaziti TGN, PM, EE i RE petljama, tvoreći tipičan stacionarni (engl. *steady state*) uzorak s glavnom lokalizacijom zadržavanja u TGN-u uravnoteženom sortiranjem ovisnim o SNX27 na RE-PM ruti i SNX3:Retromer sortiranjem na dominantnoj RE-TGN ruti. U nedostatku SNX3, ravnoteža recikliranja pomiče se prema RE-PM petlji, što rezultira povećanom izloženošću na PM-u, što zauzvrat dovodi do povećanog stvaranja oblika gp55, koji nastaje proteolitičkim cijepanjem prekursora gp130 kDa na PM-u djelovanjem furin proteaze [348]. Virioni proizvedeni u odsutnosti SNX3 ostaju infektivni, budući da je gB/pM55 vjerojatno potreban za infektivnost. Čini se da proces endocitoze nije oštećen i opskrba gp55 formom na mjestu sekundarnog omatanja, koja se vjerojatno događa u endocitoznom odjeljku [345,349] je dostatna i vjerojatno pojačana u stanicama s depletiranim SNX3.

Sam SNX3 nije potreban za proizvodnju viriona, ali može doprinijeti kontroli prometovanja virusnim glikoproteinom u PM regiju recikliranja EE-a. Ova regija značajno pridonosi proizvodnji viriona MCMV, a smanjenje SNX27, SNX4 i moguće SNX17 smanjuje proizvodnju viriona. Ovi SNX-ovi su ključni u formiranju proteinskih omotača i sortiranju tereta za recikliranje u PM. SNX27 se udružuje s retromerom, a SNX17 s retriverom u cilju recikliranja tereta izravno u PM, dok SNX4 djeluje sam kako bi sortirao teret u RE prije recikliranja u PM [248]. SNX3 s retromerom preusmjerava teret na TGN [58], ali također može sam doprinijeti sortiranju tereta za recikliranje u PM [257]. Stoga, SNX3 i drugi SNX-ovi, posebno SNX27 koji se može mobilizirati pomoću SNX3, mogu djelovati sekvencijalno duž putanje recikliranja. Proksimalni učinak SNX3 u sortiranju tereta neovisnom o retromeru vjerojatno stvara potporu (engl. *scaffold*) za daljnje prikupljanje i sortiranje tereta pomoću SNX27, SNX4 i SNX17. Ovdje pokazujemo da se u uvjetima dugotrajne supresije aktivnosti SNX3 korištenjem staničnih linija koje ekspimiraju shRNA za SNX3, virioni MCMV proizvode i otpuštaju iz stanice. Dodatna supresija ESCPE-1 (SNX1), SNX4, SNX17 i SNX27 rezultirala je smanjenim otpuštanjem viriona, što sugerira da bi ti putevi mogli biti uključeni u biogenezu viriona. Utjecaj SNX3 je aditivan, kao što je prikazano istodobnim smanjenjem SNX3 i SNX27 i smanjenjem SNX27 i SNX4 u stanicama koje ekspimiraju shSNX3. Dodatni učinci SNX17 i SNX27 u proizvodnji viriona prikazani su za druge viruse, kao što je infekcija humanim papiloma virusom [350].

Ovi su učinci praćeni otkrivanjem otpuštanja infektivnih viriona korištenjem standardnog testa plakova koji ukazuje na krajnju točku biogeneze viriona. Međutim, ne može odrediti u kojem je koraku biogeneza oštećena. U prethodnoj studiji pokazano je da je supresija retromera, ESCPE-1 i SNX27 smanjila ekspresiju virusnih gena [191], što sugerira da tubularne membrane CIE puta recikliranja tereta EE također imaju ulogu u regulaciji ciklusa replikacije virusa. Trenutna studija pokazala je da ti procesi ne ovise o aktivnosti SNX3. Glavni nedostatak siRNA eksperimenata u kontekstu infekcije je dugotrajan postupak tijekom kojega učinak transficirane RNA može slabiti i prilagodbom sustava staničnih

membrana, koji je vrlo redundantan. Unatoč tome, eksperimenti sa siRNA i praćenje otpuštanja viriona sugeriraju da nekoliko procesa tubulacije membrana doprinosi biogenezi viriona.

Iako kvantifikacija proizvodnje viriona nije osjetljiv alat za proučavanje faktora stanice domaćina koji pridonose dugotrajnim i složenim procesima reorganizacije stanice domaćina i omotavanja viriona, trenutno je najbolji dostupni test za identifikaciju staničnih mehanizama koji mogu biti uključeni u te procese. Eksperimenti supresije u našoj studiji pokazuju da je endosomalni sustav recikliranja, sustav stanice domaćina koji pridonosi biogenezi viriona i sugerira uključenost više puta recikliranja. Ovi rezultati su u skladu s nekoliko opažanja u stanicama zaraženim MCMV- [180,189,190,231] i HCMV-om [210,234,304,305,346,349,351] sugerirajući da se omatanje viriona događa na endosomalnim membranama. Međutim, naša nedavna studija pokazala je da je utjecaj endosomalnog sustava recikliranja na biogenezu viriona složeniji, budući da SNX27-ovisna endosomalna tubulacija doprinosi kontroli ekspresije virusnih gena [191]. Potrebno je detaljnije istraživanje endosomalnih tubulacijskih putova u stanicama zaraženim CMV-om kako bi se razumjelo ne samo omotavanje i izlazak CMV-a, već i složenost prilagodbe stanice domaćina tijekom infekcije.

6. ZAKLJUČCI

1. DHTM omogućava proučavanje citopatogenih promjena uzrokovanih MCMV virusom u živim stanicama. Praćenje živih stanica inficiranih MCMC-om je ukazalo na dinamičan proces promjene morfologije stanica. Tijekom MCMV infekcije uočen je porast staničnog refraktivnog indeksa (RI).
2. DHTM u kombinaciji s detekcijom fluorescentnog signala omogućuje kombinirano praćenje RI citopatogenih učinaka i specifično obilježenih fluorescentnih biljega u živim stanicama kroz iznimno dugo razdoblje zbog niske fototoksičnosti. U ovom radu pratili smo pojavu citoplazmatskih kapsida nakon infekcije s rekombinantnim virusom koji izražava fluorescentno-obilježeni mali kapsidni protein (mCherry-S-SCP) i tako omogućuje praćenje virusnih kapsida u citoplazmi inficiranih stanica. Snimanjem stanica u razdoblju od 0 do 72 sata nakon infekcije utvrdili smo da se citoplazmatske multikapside stvaraju 31 sat nakon infekcije uz postupan porast broja stanica koje ih stvaraju u kasnijim fazama infekcije.
3. Citoplazmatske odjeljke koji sadrže mCherry-S-SCP obilježene kapside okarakterizirali smo imunofluorescencijskim obilježavanjem markera staničnih organela kako bismo identificirali odjeljak u kojem se vrši sekundarno omatanje. Rezultati analize sugeriraju da se Rab15 pozitivne membranske organele mogu koristiti za sekundarno omatanje i izlazak MCMV-a. Odjeljci nastaju u složenom putu sazrijevanja u kojem se isprepliću endosomalni reciklirajući sustav (Rab8a, Rab35), trans-Golgijska mreža (Vti1a, Golgin97), kasni endosomi (CD63, Lamp1) i autofagosomalni put (p62) virusa.
4. Odjeljak za sekundarno omatanje smo pokušali karakterizirati kroz identifikaciju interaktoma virusnog glikoproteina B (M55) koji mora doći do membranske organele, stupiti u interakciju s proteinima te organele i ugraditi se u virione tijekom sekundarnog omatanja. Interaktom gB/pM55 smo planirali utvrditi konstruiranjem rekombinantnog virusa koji izražava M55-BioID2-HA i biotinizira sve proteine s kojima je u interakciji manjoj od 20 nm. Za kontrolu se trebao koristiti rekombinantni virus s m06-BioID2-HA za kojega ne očekujemo da dolazi do odjeljka za sekundarno omatanje. Inženjering gB/pM55 i m06 smo uspješno proveli i ugradili u rekombinantne viruse, no dodavanjem BioID oznake na C-terminalni dio M55 su u potpunosti prekinuti razvoj produktivne infekcije i sklapanje viriona.
5. Rezultati deplecije staničnih proteina na sučelju EE/RE/ERC ukazuju na potrebitost tubulacije u endosomalnim reciklirajućim odjeljcima za sekundarno omatanje MCMV viriona. Supresija klatrina i Rab11 rezultira značajnim smanjenjem produkcije infektivnih viriona dok deplecija ekspresije EHD1, MICAL-L1 i PACSIN2 uzrokuje značajno povećanje MCMV viriona.
6. SNX3 doprinosi stvaranju pre-AC i sklapanju MCMV viriona. Djeluje sekvencijalno sa SNX27, SNX4 i SNX17 duž puta recikliranja u procesu produkcije i oslobađanja infektivnih viriona, što ukazuje na to da višestruki membranski izvori mogu pridonijeti sekundarnom omatanju MCMV viriona.

7. LITERATURA

- [1] Virology F, Volumes T, August E, Editor NF, Peter M, Diane E, et al. Fields Virology Contents. Antivir Ther 2001.
- [2] Van Lint AL, Knipe DM. Herpesviruses. Encycl Microbiol 2019;565–79. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02509-5>.
- [3] Close WL, Anderson AN, Pellett PE, Close WL, Anderson AN, Pellett · P E. Betaherpesvirus Virion Assembly and Egress n.d. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7_9.
- [4] Jeffery-Smith A, Riddell A. Herpesviruses. Med (United Kingdom) 1996;49:780–4. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2021.09.011>.
- [5] Cohen JL. Herpesvirus latency. J Clin Invest 2020;130:3361–9. <https://doi.org/10.1172/JCI136225>.
- [6] Sehrawat S, Kumar D, Rouse BT. Herpesviruses: Harmonious pathogens but relevant cofactors in other diseases? Front Cell Infect Microbiol 2018;8:1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00177>.
- [7] Adler B, Sattler C, Adler H. Herpesviruses and Their Host Cells: A Successful Liaison. Trends Microbiol 2017;25:229–41. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2016.11.009>.
- [8] Davison AJ. Herpesvirus systematics. Vet Microbiol 2010;143:52–69. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.014>.
- [9] Rybak-Krzyszkowska M, Górecka J, Huras H, Massalska-Wolska M, Staśkiewicz M, Gach A, et al. Cytomegalovirus Infection in Pregnancy Prevention and Treatment Options: A Systematic Review and Meta-Analysis. Viruses 2023;15:2142. <https://doi.org/10.3390/v15112142>.
- [10] Brizić I, Lisnić B, Brune W, Hengel H, Jonjić S. Cytomegalovirus Infection: Mouse Model. Curr Protoc Immunol 2018;122:e51. <https://doi.org/10.1002/CPIM.51>.
- [11] Hamed N, Temsah M-H, Sabr Y, Abdelsamad Y, Alghamdi MA, Yaqoub NS, et al. National survey on Congenital Cytomegalovirus Awareness and Screening Practices among Healthcare Professionals. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2024;186:112150. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2024.112150>.
- [12] Smith A, F W. Infection of a stillborn infant by an amebiform protozoön (Entamoeba mortinatalium, NS). Univ Penn Med Bull 1910;23:1910–1.
- [13] Hill RBJ, Rowlands DTJ, Rifkind D. Infectious Pulmonary Disease in Patients Receiving Immunosuppressive Therapy for Organ Transplantation. N Engl J Med 1964;271:1021–7. <https://doi.org/10.1056/NEJM196411122712001>.
- [14] Atabani SF, Smith C, Atkinson C, Aldridge RW, Rodriguez-Perálvarez M, Rolando N, et al. Cytomegalovirus replication kinetics in solid organ transplant recipients managed by preemptive therapy. Am J Transplant 2012;12:2457–64. <https://doi.org/10.1111/J.1600-6143.2012.04087.X>.
- [15] Cannon MJ, Davis KF. Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic.

- BMC Public Health 2005;5:1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-5-70/FIGURES/3>.
- [16] Boeckh M, Nichols WG. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood* 2004;103:2003–8. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-10-3616>.
 - [17] Deayton JR, Sabin CA, Johnson MA, Emery VC, Wilson P, Griffiths PD. Importance of cytomegalovirus viraemia in risk of disease progression and death in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Lancet* 2004;363:2116–21. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16500-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16500-8).
 - [18] Griffiths P, Reeves M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. *Nat Rev Microbiol* 2021 1912 2021;19:759–73. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00582-z>.
 - [19] Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol* 2015;235:288–97. <https://doi.org/10.1002/PATH.4437>.
 - [20] Ljungman P, Chemaly RF, Khawaya F, Alain S, Avery R, Badshah C, et al. Consensus Definitions of Cytomegalovirus (CMV) Infection and Disease in Transplant Patients Including Resistant and Refractory CMV for Use in Clinical Trials: 2024 Update From the Transplant Associated Virus Infections Forum. *Clin Infect Dis* 2024;79:787–94. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAE321>.
 - [21] Gerna G, Fornara C, Furione M, Lilleri D. Congenital Human Cytomegalovirus Infection: A Narrative Review of Maternal Immune Response and Diagnosis in View of the Development of a Vaccine and Prevention of Primary and Non-Primary Infections in Pregnancy. *Microorganisms* 2021;9:1749. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9081749>.
 - [22] Joseph A, Mahida N, Clark G, Irving W, Soo S. Congenital cytomegalovirus infection. *Paediatr Child Health (Oxford)* 2018;28:277–81. <https://doi.org/10.1016/J.PAED.2018.04.005>.
 - [23] Abdullah AA, Balakrishnan KN, Bala JA, Abdullah FFJ, Nazariah ZA, Abdullah R, et al. Cytomegalovirus Replication Steps and the Actions of Antiviral Drugs. *Anti-Infective Agents* 2018;16:80–95. <https://doi.org/10.2174/2211352516666180619155021>.
 - [24] Gourin C, Alain S, Hantz S. Anti-CMV therapy, what next? A systematic review. *Front Microbiol* 2023;14:1321116. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1321116/PDF>.
 - [25] Verghese PS, Schleiss MR. Letermovir. *Drugs Future* 2013;38:291. <https://doi.org/10.1358/dof.2013.038.05.1946425>.
 - [26] Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, et al. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 2017;377:2433–44. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706640>.
 - [27] Biron KK, Harvey RJ, Chamberlain SC, Good SS, Smith AA, Davis MG, et al. Potent and Selective Inhibition of Human Cytomegalovirus Replication by 1263W94, a Benzimidazole
 -Riboside with a Unique Mode of Action. *Antimicrob Agents Chemother*

- 2002;46:2365–72. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2365-2372.2002>.
- [28] Chou S. Comparison of Cytomegalovirus Terminase Gene Mutations Selected after Exposure to Three Distinct Inhibitor Compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61. <https://doi.org/10.1128/AAC.01325-17>.
- [29] Chemaly RF, Ullmann AJ, Stoelben S, Richard MP, Bornhäuser M, Groth C, et al. Letermovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 2014;370:1781–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1309533>.
- [30] Muller C, Tilloy V, Frobert E, Feghoul L, Garrigue I, Lepiller Q, et al. First clinical description of letermovir resistance mutation in cytomegalovirus UL51 gene and potential impact on the terminase complex structure. *Antiviral Res* 2022;204:105361. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105361>.
- [31] Lischka P, Zhang D, Holder D, Zimmermann H. Impact of glycoprotein B genotype and naturally occurring ORF UL56 polymorphisms upon susceptibility of clinical human cytomegalovirus isolates to letermovir. *Antiviral Res* 2016;132:204–9. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.06.008>.
- [32] Aiba N, Shiraki A, Yajima M, Oyama Y, Yoshida Y, Ohno A, et al. Interaction of Immunoglobulin with Cytomegalovirus-Infected Cells. *Viral Immunol* 2017;30:500–7. <https://doi.org/10.1089/vim.2016.0151>.
- [33] Heineman TC. Human cytomegalovirus vaccines. *Hum Herpesviruses Biol Ther Immunoprophyl* 2007;1274–94. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511545313.072>.
- [34] Schleiss MR. Cytomegalovirus Vaccine Development. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;325:361–82. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_20.
- [35] Permar SR, Schleiss MR, Plotkin SA. A vaccine against cytomegalovirus: how close are we? *J Clin Invest* 2025;135. <https://doi.org/10.1172/JCI182317>.
- [36] Britt WJ, Vugler L, Butfiloski EJ, Stephens EB. Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J Virol* 1990;64:1079–85. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.3.1079-1085.1990>.
- [37] Liu Y, Heim KP, Che Y, Chi X, Qiu X, Han S, et al. Prefusion structure of human cytomegalovirus glycoprotein B and structural basis for membrane fusion. *Sci Adv* 2021;7. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf3178>.
- [38] Reuter N, Kropff B, Schneiderbanger JK, Alt M, Krawczyk A, Sinzger C, et al. Cell Fusion Induced by a Fusion-Active Form of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B (gB) Is Inhibited by Antibodies Directed at Antigenic Domain 5 in the Ectodomain of gB. *J Virol* 2020;94. <https://doi.org/10.1128/JVI.01276-20>.
- [39] Perera MR, Wills MR, Sinclair JH. HCMV Antivirals and Strategies to Target the Latent Reservoir. *Viruses* 2021;13:817. <https://doi.org/10.3390/V13050817>.

- [40] Nguyen CC, Kamil JP. Pathogen at the Gates: Human Cytomegalovirus Entry and Cell Tropism. *Viruses* 2018;10:704. <https://doi.org/10.3390/v10120704>.
- [41] Ruckwardt TJ. The road to approved vaccines for respiratory syncytial virus. *Npj Vaccines* 2023;8:138. <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00734-7>.
- [42] Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med* 2021;384:403–16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>.
- [43] Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 2020;383:2603–15. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>.
- [44] Hu X, Karthigeyan KP, Herbek S, Valencia SM, Jenks JA, Webster H, et al. Human Cytomegalovirus mRNA-1647 Vaccine Candidate Elicits Potent and Broad Neutralization and Higher Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Responses Than the gB/MF59 Vaccine. *J Infect Dis* 2024;230:455–66. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad593>.
- [45] John S, Yuzhakov O, Woods A, Deterling J, Hassett K, Shaw CA, et al. Multi-antigenic human cytomegalovirus mRNA vaccines that elicit potent humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine* 2018;36:1689–99. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.01.029>.
- [46] Howley P, Knipe D. *Fields Virology: DNA Viruses*: 2. 2020.
- [47] Rawlinson WD, Farrell HE, Barrell BG. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol* 1996;70:8833–49. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.12.8833-8849.1996>.
- [48] Lodha M, Muchsin I, Jürges C, Juranic Lisnic V, L'Hernault A, Rutkowski AJ, et al. Decoding murine cytomegalovirus. *PLOS Pathog* 2023;19:e1010992. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010992>.
- [49] Kattenhorn LM, Mills R, Wagner M, Lomsadze A, Makeev V, Borodovsky M, et al. Identification of Proteins Associated with Murine Cytomegalovirus Virions. *J Virol* 2004;78:11187–97. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.11187-11197.2004>.
- [50] Wofford AS, McCusker I, Green JC, Vensko TA, Pellett PE. Betaherpesvirus assembly and egress: Recent advances illuminate the path, 2020, p. 337–92. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.09.003>.
- [51] Britt WJ, Boppana S. Human cytomegalovirus virion proteins. *Hum Immunol* 2004;65:395–402. <https://doi.org/10.1016/J.HUMIMM.2004.02.008>.
- [52] Borst EM, Harmening S, Sanders S, Caragliano E, Wagner K, Lenac Roviš T, et al. A Unique Role of the Human Cytomegalovirus Small Capsid Protein in Capsid Assembly. *MBio* 2022;13. <https://doi.org/10.1128/mbio.01007-22>.
- [53] Borst E-M, Mathys S, Wagner M, Muranyi W, Messerle M. Genetic Evidence of an Essential Role for Cytomegalovirus Small Capsid Protein in Viral Growth. *J Virol* 2001;75:1450–8. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1450-1458.2001>.

- [54] Desai P, DeLuca NA, Person S. Herpes Simplex Virus Type 1 VP26 Is Not Essential for Replication in Cell Culture but Influences Production of Infectious Virus in the Nervous System of Infected Mice. *Virology* 1998;247:115–24. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9230>.
- [55] Dai X, Gong D, Xiao Y, Wu T-T, Sun R, Zhou ZH. CryoEM and mutagenesis reveal that the smallest capsid protein cements and stabilizes Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus capsid. *Proc Natl Acad Sci* 2015;112. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420317112>.
- [56] Britt B. Maturation and egress. *Hum Herpesviruses Biol Ther Immunophyl* 2007;311–23.
- [57] Gibson W. Structure and Formation of the Cytomegalovirus Virion. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;325:187–204. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_11.
- [58] Tandon R, Mocarski ES, Conway JF. The A, B, Cs of herpesvirus capsids. *Viruses* 2015;7:899–914. <https://doi.org/10.3390/v7030899>.
- [59] Yu X, Jih J, Jiang J, Zhou ZH. Atomic structure of the human cytomegalovirus capsid with its securing tegument layer of pp150. *Science* (80-) 2017;356. <https://doi.org/10.1126/science.aam6892>.
- [60] Close WL, Anderson AN, Pellett PE. Betaherpesvirus Virion Assembly and Egress. *Adv Exp Med Biol* 2018;1045:167–207. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7_9.
- [61] Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, Paša-Tolić L, et al. Identification of Proteins in Human Cytomegalovirus (HCMV) Particles: the HCMV Proteome. *J Virol* 2004;78:10960. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.10960-10966.2004>.
- [62] Smith R, Kosuri S, Kerry J. Role of Human Cytomegalovirus Tegument Proteins in Virion Assembly. *Viruses* 2014;6:582–605. <https://doi.org/10.3390/v6020582>.
- [63] Sanchez V, Sztul E, Britt WJ. Human Cytomegalovirus pp28 (UL99) Localizes to a Cytoplasmic Compartment Which Overlaps the Endoplasmic Reticulum-Golgi-Intermediate Compartment. *J Virol* 2000;74:3842–51. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.8.3842-3851.2000>.
- [64] Nicola A, Kamil JP, Ryckman B, Perez L, Foglierini M, Marcandalli J. HCMV Envelope Glycoprotein Diversity Demystified 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01005>.
- [65] Sinzger C, Digel M, Jahn G. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;325:63–83. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_4.
- [66] Gerna G, Kabanova A, Lilleri D. Human Cytomegalovirus Cell Tropism and Host Cell Receptors. *Vaccines* 2019;7:70. <https://doi.org/10.3390/vaccines7030070>.
- [67] Wu Y, Prager A, Boos S, Resch M, Brizic I, Mach M, et al. Human cytomegalovirus glycoprotein complex gH/gL/gO uses PDGFR- α as a key for entry. *PLOS Pathog* 2017;13:e1006281. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006281>.
- [68] Wang D, Shenk T. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:18153–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509201102>.
- [69] Hahn G, Revello MG, Patrone M, Percivalle E, Campanini G, Sarasini A, et al. Human

- Cytomegalovirus UL131-128 Genes Are Indispensable for Virus Growth in Endothelial Cells and Virus Transfer to Leukocytes. *J Virol* 2004;78:10023–33. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.18.10023-10033.2004>.
- [70] Gardner TJ, Tortorella D. Virion Glycoprotein-Mediated Immune Evasion by Human Cytomegalovirus: a Sticky Virus Makes a Slick Getaway. *Microbiol Mol Biol Rev* 2016;80:663–77. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00018-16/ASSET/53B4B5AA-76D1-40DB-9236-DC6EC1A4B250/ASSETS/GRAPHIC/ZMR0031624300004.JPEG>.
- [71] Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky TS, Longnecker R. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:369. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2548>.
- [72] Eisenberg RJ, Atanasiu D, Cairns TM, Gallagher JR, Krummenacher C, Cohen GH. Herpes virus fusion and entry: a story with many characters. *Viruses* 2012;4:800–32. <https://doi.org/10.3390/V4050800>.
- [73] Isaacson MK, Compton T. Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *J Virol* 2009;83:3891–903. <https://doi.org/10.1128/JVI.01251-08>.
- [74] Dumortier J, Streblow DN, Moses A V., Jacobs JM, Kreklywich CN, Camp D, et al. Human Cytomegalovirus Secretome Contains Factors That Induce Angiogenesis and Wound Healing. *J Virol* 2008;82:6524–35. <https://doi.org/10.1128/JVI.00502-08>.
- [75] IP-2019-04-3582, projekt Hrvatske zaklade za znanost “Sekundarno omatanje i izlazak beta-herpesvirusa iz stanice”, voditelj: prof. dr. sc. Pero Lučin n.d.
- [76] Forte E, Zhang Z, Thorp EB, Hummel M. Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00130>.
- [77] Howley PM, Knipe DM. *Fields Virology: DNA Viruses*. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins (LWW); 2022.
- [78] Gurczynski SJ, Das S, Pellett PE. Deletion of the Human Cytomegalovirus US17 Gene Increases the Ratio of Genomes per Infectious Unit and Alters Regulation of Immune and Endoplasmic Reticulum Stress Response Genes at Early and Late Times after Infection. *J Virol* 2014;88:2168–82. <https://doi.org/10.1128/JVI.02704-13>.
- [79] Turner DL, Mathias RA. The human cytomegalovirus decathlon: Ten critical replication events provide opportunities for restriction. *Front Cell Dev Biol* 2022;10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1053139>.
- [80] Shellam GR, Redwood AJ, Smith LM, Gorman S. Murine Cytomegalovirus and other Herpesviruses. *Mouse Biomed Res Hist Wild Mice, Genet Vol 1-4, Second Ed* 2007;1–4:2–35. <https://doi.org/10.1016/B978-012369454-6/50029-7>.
- [81] Marcinowski L, Lidschreiber M, Windhager L, Rieder M, Bosse JB, Rädle B, et al. Real-time

- Transcriptional Profiling of Cellular and Viral Gene Expression during Lytic Cytomegalovirus Infection. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002908. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002908>.
- [82] Rozman B, Nachshon A, Levi Samia R, Lavi M, Schwartz M, Stern-Ginossar N. Temporal dynamics of HCMV gene expression in lytic and latent infections. *Cell Rep* 2022;39:110653. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110653>.
- [83] Lučin P, Jug Vučko N, Karleuša L, Mahmutefendić Lučin H, Blagojević Zagorac G, Lisnić B, et al. Cytomegalovirus Generates Assembly Compartment in the Early Phase of Infection by Perturbation of Host-Cell Factors Recruitment at the Early Endosome/Endosomal Recycling Compartment/Trans-Golgi Interface. *Front Cell Dev Biol* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.563607>.
- [84] Yu D, Silva MC, Shenk T. Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:12396–401. <https://doi.org/10.1073/pnas.1635160100>.
- [85] Dunn W, Chou C, Li H, Hai R, Patterson D, Stole V, et al. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:14223–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.2334032100>.
- [86] Ahn J-H, Jang W-J, Hayward GS. The Human Cytomegalovirus IE2 and UL112-113 Proteins Accumulate in Viral DNA Replication Compartments That Initiate from the Periphery of Promyelocytic Leukemia Protein-Associated Nuclear Bodies (PODs or ND10). *J Virol* 1999;73:10458–71. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.12.10458-10471.1999>.
- [87] Ahn J-H, Hayward GS. Disruption of PML-Associated Nuclear Bodies by IE1 Correlates with Efficient Early Stages of Viral Gene Expression and DNA Replication in Human Cytomegalovirus Infection. *Virology* 2000;274:39–55. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0448>.
- [88] Procter DJ, Furey C, Garza-Gongora AG, Kosak ST, Walsh D. Cytoplasmic control of intranuclear polarity by human cytomegalovirus. *Nature* 2020;587:109–14. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2714-x>.
- [89] Strang BL, Boulant S, Chang L, Knipe DM, Kirchhausen T, Coen DM. Human Cytomegalovirus UL44 Concentrates at the Periphery of Replication Compartments, the Site of Viral DNA Synthesis. *J Virol* 2012;86:2089–95. <https://doi.org/10.1128/JVI.06720-11>.
- [90] Strang BL, Boulant S, Kirchhausen T, Coen DM. Host cell nucleolin is required to maintain the architecture of human cytomegalovirus replication compartments. *MBio* 2012;3. <https://doi.org/10.1128/mBio.00301-11>.
- [91] Weekes MP, Tomasec P, Huttlin EL, Fielding CA, Nusinow D, Stanton RJ, et al. Quantitative Temporal Viromics: An Approach to Investigate Host-Pathogen Interaction. *Cell* 2014;157:1460. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.04.028>.
- [92] Dai X, Yu X, Gong H, Jiang X, Abenes G, Liu H, et al. The Smallest Capsid Protein Mediates Binding of the Essential Tegument Protein pp150 to Stabilize DNA-Containing Capsids in

- Human Cytomegalovirus. PLoS Pathog 2013;9:e1003525. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003525>.
- [93] Lye MF, Sharma M, El Omari K, Filman DJ, Schuermann JP, Hogle JM, et al. Unexpected features and mechanism of heterodimer formation of a herpesvirus nuclear egress complex. *EMBO J* 2015;34:2937–52. <https://doi.org/10.15252/embj.201592651>.
- [94] Walzer SA, Egerer-Sieber C, Sticht H, Sevvana M, Hohl K, Milbradt J, et al. Crystal Structure of the Human Cytomegalovirus pUL50-pUL53 Core Nuclear Egress Complex Provides Insight into a Unique Assembly Scaffold for Virus-Host Protein Interactions. *J Biol Chem* 2015;290:27452–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.C115.686527>.
- [95] Cappadona I, Villinger C, Schutzius G, Mertens T, von Einem J. Human Cytomegalovirus pUL47 Modulates Tegumentation and Capsid Accumulation at the Viral Assembly Complex. *J Virol* 2015;89:7314–28. <https://doi.org/10.1128/JVI.00603-15>.
- [96] Yu X, Shah S, Lee M, Dai W, Lo P, Britt W, et al. Biochemical and structural characterization of the capsid-bound tegument proteins of human cytomegalovirus. *J Struct Biol* 2011;174:451–60. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.03.006>.
- [97] Dai X, Yu X, Gong H, Jiang X, Abenes G, Liu H, et al. The Smallest Capsid Protein Mediates Binding of the Essential Tegument Protein pp150 to Stabilize DNA-Containing Capsids in Human Cytomegalovirus. PLoS Pathog 2013;9:e1003525. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003525>.
- [98] Indran S V., Ballesta ME, Britt WJ. Bicaudal D1-Dependent Trafficking of Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp150 in Virus-Infected Cells. *J Virol* 2010;84:3162–77. <https://doi.org/10.1128/JVI.01776-09>.
- [99] Buchkovich NJ, Maguire TG, Alwine JC. Role of the endoplasmic reticulum chaperone BiP, SUN domain proteins, and dynein in altering nuclear morphology during human cytomegalovirus infection. *J Virol* 2010;84:7005–17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00719-10>.
- [100] Karleusa L. Cytoplasmic virion assembly compartment of betaherpesviruses. *Period Biol* 2020;121–122:97–106. <https://doi.org/10.18054/pb.v121-122i3-4.10757>.
- [101] Kutle I, Sengstake S, Templin C, Glaß M, Kubsch T, Keyser KA, et al. The M25 gene products are critical for the cytopathic effect of mouse cytomegalovirus. *Sci Reports* 2017 71 2017;7:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15783-x>.
- [102] Plesa G, McKenna PM, Schnell MJ, Eisenlohr LC. Immunogenicity of Cytopathic and Noncytopathic Viral Vectors. *J Virol* 2006;80:6259. <https://doi.org/10.1128/JVI.00084-06>.
- [103] Benedict CA, Norris PS, Ware CF. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nat Immunol* 2002 311 2002;3:1013–8. <https://doi.org/10.1038/ni1102-1013>.
- [104] Buchmeier MJ, Welsh RM, Dutko FJ, Oldstone MBA. The Virology and Immunobiology of Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection. *Adv Immunol* 1980;30:275–331. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60197-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60197-2).

- [105] Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 1999;53:577–628. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.53.1.577>.
- [106] Everett H, McFadden G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol* 1999;7:160–5. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01487-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01487-0).
- [107] Agol VI. Cytopathic effects: Virus-modulated manifestations of innate immunity? *Trends Microbiol* 2012;20:570–6. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2012.09.003/ASSET/2B4A5310-FFD9-4EFC-A25D-62014CEDCC9E/MAIN.ASSETS/GR2.JPG>.
- [108] Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, Giostra E, Malé P-J, Mentha G, et al. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol* 2000;33:106–15. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)80166-X](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)80166-X).
- [109] Perng G-C, Jones C, Ciacci-Zanella J, Stone M, Henderson G, Yukht A, et al. Virus-Induced Neuronal Apoptosis Blocked by the Herpes Simplex Virus Latency-Associated Transcript. *Science* (80-) 2000;287:1500–3. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1500>.
- [110] Rhoades RE, Tabor-Godwin JM, Tsueng G, Feuer R. Enterovirus infections of the central nervous system. *Virology* 2011;411:288–305. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.014>.
- [111] Yakimovich A, Witte R, Andriasyan V, Georgi F, Greber UF. Label-Free Digital Holographic Microscopy Reveals Virus-Induced Cytopathic Effects in Live Cells 2018. <https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00599-18>.
- [112] Lang F, Föller M, Lang K, Lang P, Ritter M, Vereninov A, et al. Cell Volume Regulatory Ion Channels in Cell Proliferation and Cell Death, 2007, p. 209–25. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)28011-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)28011-5).
- [113] Heaton NS. Revisiting the concept of a cytopathic viral infection. *PLOS Pathog* 2017;13:e1006409. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006409>.
- [114] Yakimovich A, Gumpert H, Burckhardt CJ, Lütschg VA, Jurgait A, Sbalzarini IF, et al. Cell-Free Transmission of Human Adenovirus by Passive Mass Transfer in Cell Culture Simulated in a Computer Model. *J Virol* 2012;86:10123–37. <https://doi.org/10.1128/JVI.01102-12>.
- [115] Zheng Y, Stamminger T, Hearing P. E2F/Rb Family Proteins Mediate Interferon Induced Repression of Adenovirus Immediate Early Transcription to Promote Persistent Viral Infection. *PLOS Pathog* 2016;12:e1005415. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005415>.
- [116] Thompson CB. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science* (80-) 1995;267:1456–62. <https://doi.org/10.1126/science.7878464>.
- [117] Chiou S-K, White E. Inhibition of ICE-like Proteases Inhibits Apoptosis and Increases Virus Production during Adenovirus Infection. *Virology* 1998;244:108–18. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9077>.
- [118] Wang Z, Xia X, Yang X, Zhang X, Liu Y, Wu D, et al. A picorna-like virus suppresses the N-end rule pathway to inhibit apoptosis. *Elife* 2017;6. <https://doi.org/10.7554/eLife.30590>.
- [119] Cotte Y, Toy MF, Pavillon N, Depeursinge C. Microscopy image resolution improvement by

- deconvolution of complex fields. *Opt Express* 2010;18:19462. <https://doi.org/10.1364/OE.18.019462>.
- [120] Cotte Y, Toy F, Jourdain P, Pavillon N, Boss D, Magistretti P, et al. Marker-free phase nanoscopy. *Nat Photonics* 2013;7:113–7. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.329>.
- [121] Pollaro L, Equis S, Piazza BD, Cotte Y. Stain-free 3D Nanoscopy of Living Cells. *Opt Photonik* 2016;11:38–42. <https://doi.org/10.1002/OPPH.201600008>.
- [122] Gul B, Ashraf S, Khan S, Nisar H, Ahmad I. Cell refractive index: Models, insights, applications and future perspectives. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2021;33:102096. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102096>.
- [123] Hielscher AH, Mourant JR, Bigio IJ. Influence of particle size and concentration on the diffuse backscattering of polarized light from tissue phantoms and biological cell suspensions. *Appl Opt* 1997;36:125. <https://doi.org/10.1364/AO.36.000125>.
- [124] CJ A. Verhandlungen des naturhistorischen Vereines der preussischen Rheinlande und Westfalens. Achtunddreissigter Jahrgang Vierte Folge 8 Jahrgang, Max Cohen Sohn, Bonn 1881:161–2.
- [125] Reddehase MJ. Margaret Gladys Smith, mother of cytomegalovirus: 60th anniversary of cytomegalovirus isolation. *Med Microbiol Immunol* 2015;204:239–41. <https://doi.org/10.1007/s00430-015-0416-z>.
- [126] Jesionek A, Kiolenoglou B. Ueber einen Befund von protozoenartigen Gebilden in den Organen eines hereditär-luetischen Foetus. *Muenchner Med Wochenschr* 1904;51:1905–1907.
- [127] GOODPASTURE EW. CONCERNING THE NATURE OF “PROTOZOAN-LIKE” CELLS IN CERTAIN LESIONS OF INFANCY. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1921;21:415. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1921.01910350002001>.
- [128] Lipschutz B. Untersuchungen über die Ätiologie der Herpesgruppe usw. *Arch f Dermat u Syph* 1921;136.
- [129] Wyatt JP, Saxton J, Lee RS, Pinkerton H. Generalized cytomegalic inclusion disease. *J Pediatr* 1950;36:271–94. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(50\)80097-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(50)80097-5).
- [130] Smith MG. Propagation in Tissue Cultures of a Cytopathogenic Virus from Human Salivary Gland Virus (SGV) Disease. *Exp Biol Med* 1956;92:424–30. <https://doi.org/10.3181/00379727-92-22498>.
- [131] Weller TH, Hanshaw JB, Scott DE. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* 1960;12:130–2. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(60\)90156-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(60)90156-2).
- [132] RILEY HD. History of the Cytomegalovirus. *South Med J* 1997;90:184–90. <https://doi.org/10.1097/00007611-199702000-00004>.
- [133] Trofatter KF. Cytomegalovirus Infections. *Princ Med Ther Pregnancy* 1985:575–9. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2415-7_86.

- [134] Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol* 2007 197:2007;197:65–73. <https://doi.org/10.1007/S00430-007-0066-X>.
- [135] Luse SA, Smith MG. Electron Microscope Studies of Cells Infected With the Salivary Gland Viruses. *Ann N Y Acad Sci* 1959;81:133–44. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1959.tb49302.x>.
- [136] Sekhon HS, Press RD, Schmidt WA, Hawley M, Rader A, Sekhon H. Identification of Cytomegalovirus in a Liquid-Based Gynecologic Sample Using Morphology, Immunohistochemistry, and DNA Real-Time PCR Detection Clinical Report. *Diagn Cytopathol* 2004;30:411–7. <https://doi.org/10.1002/dc.20048>.
- [137] Nakase H, Honzawa Y, Toyonaga T, Yamada S, Minami N, Yoshino T, et al. Diagnosis and Treatment of Ulcerative Colitis with Cytomegalovirus Infection: Importance of Controlling Mucosal Inflammation to Prevent Cytomegalovirus Reactivation. *Intest Res* 2014;12:5. <https://doi.org/10.5217/ir.2014.12.1.5>.
- [138] Ariel I, Singer DB. Placental Pathologies – Intrauterine Infections. *Pathobiol. Hum. Dis.*, Elsevier; 2014, p. 2360–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.05007-3>.
- [139] McGavran MH, Smith MG. Ultrastructural, cytochemical, and microchemical observations on cytomegalovirus (salivary gland virus) infection of human cells in tissue culture. *Exp Mol Pathol* 1965;4:1–10. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(65\)90019-5](https://doi.org/10.1016/0014-4800(65)90019-5).
- [140] Taylor MP, Koyuncu OO, Enquist LW. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nat Rev Microbiol* 2011 9:2011;9:427–39. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2574>.
- [141] Greber UF, Way M. A superhighway to virus infection. *Cell* 2006;124:741–54. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.02.018/ASSET/59F04237-6B74-4EAE-99E4-73C0887694EE/MAIN.ASSETS/GR4.JPG>.
- [142] Radtke K, Döhner K, Sodeik B. Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker’s guide to the cell. *Cell Microbiol* 2006;8:387–400. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2005.00679.X>.
- [143] Lyman MG, Enquist LW. Herpesvirus Interactions with the Host Cytoskeleton. *J Virol* 2009;83:2058–66. <https://doi.org/10.1128/JVI.01718-08>.
- [144] Sanchez AD, Feldman JL. Microtubule-organizing centers: from the centrosome to non-centrosomal sites. *Curr Opin Cell Biol* 2017;44:93–101. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.09.003>.
- [145] Procter DJ, Banerjee A, Nukui M, Kruse K, Gaponenko V, Murphy EA, et al. The HCMV Assembly Compartment Is a Dynamic Golgi-Derived MTOC that Controls Nuclear Rotation and Virus Spread. *Dev Cell* 2018;45:83-100.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.03.010>.
- [146] Indran S V., Ballestas ME, Britt WJ. Bicaudal D1-Dependent Trafficking of Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp150 in Virus-Infected Cells. *J Virol* 2010;84:3162–77. <https://doi.org/10.1128/JVI.01776-09>.
- [147] Bentz GL, Jarquin-Pardo M, Chan G, Smith MS, Sinzger C, Yurochko AD. Human

- Cytomegalovirus (HCMV) Infection of Endothelial Cells Promotes Naïve Monocyte Extravasation and Transfer of Productive Virus To Enhance Hematogenous Dissemination of HCMV. *J Virol* 2006;80:11539–55. <https://doi.org/10.1128/JVI.01016-06>.
- [148] Mosher BS, Kowalik TF, Yurochko AD. Overview of how HCMV manipulation of host cell intracellular trafficking networks can promote productive infection. *Front Virol* 2022;2. <https://doi.org/10.3389/fviro.2022.1026452>.
- [149] Wilkie AR, Lawler JL, Coen DM. A Role for Nuclear F-Actin Induction in Human Cytomegalovirus Nuclear Egress. *MBio* 2016;7. <https://doi.org/10.1128/mBio.01254-16>.
- [150] Hirai K, Maeda F, Watanabe Y. Expression of Early Virus Functions in Human Cytomegalovirus Infected HEL Cells: Effect of Ultraviolet Light-Irradiation of the Virus. *J Gen Virol* 1978;38:121–33. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-38-1-121>.
- [151] Furukawa T, Fioretti A, Plotkin S. Growth Characteristics of Cytomegalovirus in Human Fibroblasts with Demonstration of Protein Synthesis Early in Viral Replication. *J Virol* 1973;11:991–7.
- [152] Kutle I, Sengstake S, Templin C, Glaß M, Kubsch T, Keyser KA, et al. The M25 gene products are critical for the cytopathic effect of mouse cytomegalovirus. *Sci Reports* 2017 71 2017;7:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15783-x>.
- [153] Baldick CJ, Shenk T. Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J Virol* 1996;70:6097–105. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.9.6097-6105.1996>.
- [154] Wang B, Nishimura M, Tang H, Kawabata A, Mahmoud NF, Khanlari Z, et al. Crystal Structure of Human Herpesvirus 6B Tegument Protein U14. *PLOS Pathog* 2016;12:e1005594. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005594>.
- [155] Battista MC, Bergamini G, Boccuni MC, Campanini F, Ripalti A, Landini MP. Expression and Characterization of a Novel Structural Protein of Human Cytomegalovirus, pUL25. *J Virol* 1999;73:3800–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.5.3800-3809.1999>.
- [156] Kutle I, Szymańska-de Wijs KM, Bogdanow B, Cuvalo B, Steinbrück L, Jonjić S, et al. Murine Cytomegalovirus M25 Proteins Sequester the Tumor Suppressor Protein p53 in Nuclear Accumulations. *J Virol* 2020;94. <https://doi.org/10.1128/JVI.00574-20>.
- [157] Hazra S, Kalyan Dinda S, Kumar Mondal N, Hossain SR, Datta P, Yasmin Mondal A, et al. Giant cells: multiple cells unite to survive. *Front Cell Infect Microbiol* 2023;13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1220589>.
- [158] Garnett HM. Fusion of cytomegalovirus infected fibroblasts to form multinucleate giant cells. *J Med Virol* 1979;3:271–4. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890030404>.
- [159] Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. Glycoprotein B of Human Cytomegalovirus Promotes Virion Penetration into Cells, Transmission of Infection from Cell to Cell, and Fusion of Infected Cells. *Virology* 1993;197:143–58. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1575>.

- [160] Tugizov S, Navarro D, Paz P, Wang Y, Qadri I, Pereira L. Function of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B: Syncytium Formation in Cells Constitutively Expressing gB Is Blocked by Virus-Neutralizing Antibodies. *Virology* 1994;201:263–76. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1291>.
- [161] Paterson DA, Dyer AP, Milne RS., Sevilla-Reyes E, Gompels UA. A Role for Human Cytomegalovirus Glycoprotein O (gO) in Cell Fusion and a New Hypervariable Locus. *Virology* 2002;293:281–94. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1274>.
- [162] Kinzler ER, Compton T. Characterization of Human Cytomegalovirus Glycoprotein-Induced Cell-Cell Fusion. *J Virol* 2005;79:7827–37. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7827-7837.2005>.
- [163] Johnson DC, Baines JD. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:382–94. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2559>.
- [164] Henaff D, Radtke K, Lippé R. Herpesviruses Exploit Several Host Compartments for Envelopment. *Traffic* 2012;13:1443–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01399.x>.
- [165] Miller S, Krijnse-Locker J. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:363–74. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1890>.
- [166] Das S, Ortiz DA, Gurczynski SJ, Khan F, Pellett PE. Identification of Human Cytomegalovirus Genes Important for Biogenesis of the Cytoplasmic Virion Assembly Complex. *J Virol* 2014;88:9086–99. <https://doi.org/10.1128/JVI.01141-14>.
- [167] Hook LM, Grey F, Grabski R, Tirabassi R, Doyle T, Hancock M, et al. Cytomegalovirus miRNAs Target Secretory Pathway Genes to Facilitate Formation of the Virion Assembly Compartment and Reduce Cytokine Secretion. *Cell Host Microbe* 2014;15:363–73. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.004>.
- [168] Bughio F, Umashankar M, Wilson J, Goodrum F. Human Cytomegalovirus UL135 and UL136 Genes Are Required for Postentry Tropism in Endothelial Cells. *J Virol* 2015;89:6536–50. <https://doi.org/10.1128/JVI.00284-15>.
- [169] Dietz AN, Villinger C, Becker S, Frick M, von Einem J. A Tyrosine-Based Trafficking Motif of the Tegument Protein pUL71 Is Crucial for Human Cytomegalovirus Secondary Envelopment. *J Virol* 2018;92. <https://doi.org/10.1128/JVI.00907-17>.
- [170] Wu H, Kropff B, Mach M, Britt WJ. Human Cytomegalovirus Envelope Protein gpUL132 Regulates Infectious Virus Production through Formation of the Viral Assembly Compartment. *MBio* 2020;11. <https://doi.org/10.1128/mBio.02044-20>.
- [171] Lin KM, Nightingale K, Soday L, Antrobus R, Weekes MP. Rapid Degradation Pathways of Host Proteins During HCMV Infection Revealed by Quantitative Proteomics. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;10:578259. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.578259/BIBTEX>.
- [172] Cruz L, Buchkovich NJ. Rerouting the traffic from a virus perspective. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2017;22:1845–66. <https://doi.org/10.2741/4575>.
- [173] Jean Beltran PM, Mathias RA, Cristea IM. A Portrait of the Human Organelle Proteome In Space

- and Time during Cytomegalovirus Infection. *Cell Syst* 2016;3:361-373.e6. <https://doi.org/10.1016/J.CELLS.2016.08.012>.
- [174] Jean Beltran PM, Federspiel JD, Sheng X, Cristea IM. Proteomics and integrative omic approaches for understanding host–pathogen interactions and infectious diseases. *Mol Syst Biol* 2017;13. <https://doi.org/10.15252/msb.20167062>.
- [175] Nightingale K, Lin K-M, Ravenhill BJ, Davies C, Nobre L, Fielding CA, et al. High-Definition Analysis of Host Protein Stability during Human Cytomegalovirus Infection Reveals Antiviral Factors and Viral Evasion Mechanisms. *Cell Host Microbe* 2018;24:447-460.e11. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.07.011>.
- [176] Nobre L, Nightingale K, Ravenhill BJ, Antrobus R, Soday L, Nichols J, et al. Human cytomegalovirus interactome analysis identifies degradation hubs, domain associations and viral protein functions. *Elife* 2019;8:e49894. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.49894>.
- [177] Wofford AS, McCusker I, Green JC, Vensko TA, Pellett PE. Betaherpesvirus assembly and egress: Recent advances illuminate the path, 2020, p. 337–92. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.09.003>.
- [178] Sanchez V, Britt W. Human Cytomegalovirus Egress: Overcoming Barriers and Co-Opting Cellular Functions. *Viruses* 2021;14:15. <https://doi.org/10.3390/v14010015>.
- [179] Mahmutefendić Lučin H, Štimac I, Marcelić M, Skočaj M, Lisnić B, Omerović A, et al. Rab10-associated tubulation as an early marker for biogenesis of the assembly compartment in cytomegalovirus-infected cells. *Front Cell Dev Biol* 2025;12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1517236>.
- [180] Lučin P, Mahmutefendić Lučin H, Blagojević Zagorac G. Cytomegaloviruses reorganize endomembrane system to intersect endosomal and amphisome-like egress pathway. *Front Cell Dev Biol* 2023;11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1328751>.
- [181] Das S, VasANJI A, Pellett PE. Three-Dimensional Structure of the Human Cytomegalovirus Cytoplasmic Virion Assembly Complex Includes a Reoriented Secretory Apparatus. *J Virol* 2007;81:11861–9. https://doi.org/10.1128/JVI.01077-07/SUPPL_FILE/SUPP_FIG.ZIP.
- [182] Rebmann GM, Grabski R, Sanchez V, Britt WJ. Phosphorylation of Golgi Peripheral Membrane Protein Grasp65 Is an Integral Step in the Formation of the Human Cytomegalovirus Cytoplasmic Assembly Compartment. *MBio* 2016;7. <https://doi.org/10.1128/mBio.01554-16>.
- [183] Tandon R, Mocarski ES. Viral and host control of cytomegalovirus maturation. *Trends Microbiol* 2012;20:392–401. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.008>.
- [184] Cepeda V, Esteban M, Fraile-Ramos A. Human cytomegalovirus final envelopment on membranes containing both trans -Golgi network and endosomal markers. *Cell Microbiol* 2010;12:386–404. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01405.x>.
- [185] Das S, Pellett PE. Spatial Relationships between Markers for Secretory and Endosomal Machinery in Human Cytomegalovirus-Infected Cells versus Those in Uninfected Cells. *J Virol*

- 2011;85:5864–79. <https://doi.org/10.1128/JVI.00155-11>.
- [186] Karleuša L, Mahmutefendić H, Tomaš MI, Zagorac GB, Lučin P. Landmarks of endosomal remodeling in the early phase of cytomegalovirus infection. *Virology* 2018;515:108–22. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2017.12.001>.
- [187] Taisne C, Lussignol M, Hernandez E, Moris A, Mouna L, Esclatine A. Human cytomegalovirus hijacks the autophagic machinery and LC3 homologs in order to optimize cytoplasmic envelopment of mature infectious particles. *Sci Rep* 2019;9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41029-z>.
- [188] Marcelić M, Mahmutefendić Lučin H, Jurak Begonja A, Blagojević Zagorac G, Juranić Lisnić V, Lučin P. Endosomal phosphatidylinositol-3-phosphate-associated functions are dispensable for establishment of the cytomegalovirus pre-assembly compartment but essential for the virus growth. *Life* 2021;11:859. <https://doi.org/10.3390/LIFE11080859/S1>.
- [189] Pavišić V, Mahmutefendić Lučin H, Blagojević Zagorac G, Lučin P. Arf GTPases Are Required for the Establishment of the Pre-Assembly Compartment in the Early Phase of Cytomegalovirus Infection. *Life* 2021;11:867. <https://doi.org/10.3390/life11080867>.
- [190] Štimac I, Jug Vučko N, Blagojević Zagorac G, Marcelić M, Mahmutefendić Lučin H, Lučin P. Dynamin Inhibitors Prevent the Establishment of the Cytomegalovirus Assembly Compartment in the Early Phase of Infection. *Life* 2021;11:876. <https://doi.org/10.3390/life11090876>.
- [191] Štimac I, Marcelić M, Radić B, Viduka I, Blagojević Zagorac G, Lukanović Jurić S, et al. SNX27:Retromer:ESCPE-1-mediated early endosomal tubulation impacts cytomegalovirus replication. *Front Cell Infect Microbiol* 2024;14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1399761>.
- [192] Tomaš MI, Kučić N, Mahmutefendić H, Blagojević G, Lučin P. Murine Cytomegalovirus Perturbs Endosomal Trafficking of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules in the Early Phase of Infection. *J Virol* 2010;84:11101–12. <https://doi.org/10.1128/JVI.00988-10>.
- [193] Lučin P, Karelůša L, Zagorac GB, Lučin HM, Pavišić V, Vučko NJ, et al. Cytomegaloviruses exploit recycling rab proteins in the sequential establishment of the assembly compartment. *Front Cell Dev Biol* 2018;6:426240. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2018.00165/BIBTEX>.
- [194] Lučin P, Mahmutefendić H, Blagojević Zagorac G, Ilić Tomaš M. Cytomegalovirus immune evasion by perturbation of endosomal trafficking. *Cell Mol Immunol* 2015;12:154–69. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.85>.
- [195] Indran S V., Britt WJ. A Role for the Small GTPase Rab6 in Assembly of Human Cytomegalovirus. *J Virol* 2011;85:5213–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.02605-10>.
- [196] Schauflinger M, Villinger C, Mertens T, Walther P, von Einem J. Analysis of human cytomegalovirus secondary envelopment by advanced electron microscopy. *Cell Microbiol* 2013;15:305–14. <https://doi.org/10.1111/cmi.12077>.
- [197] Cook KC, Cristea IM. Location is everything: protein translocations as a viral infection strategy. *Curr Opin Chem Biol* 2019;48:34. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2018.09.021>.

- [198] Zeltzer S, Zeltzer CA, Igarashi S, Wilson J, Donaldson JG, Goodrum F. Virus Control of Trafficking from Sorting Endosomes. *MBio* 2018;9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00683-18>.
- [199] Maninger S, Bosse JB, Lemnitzer F, Pogoda M, Mohr CA, von Einem J, et al. M94 Is Essential for the Secondary Envelopment of Murine Cytomegalovirus. *J Virol* 2011;85:9254–67. <https://doi.org/10.1128/JVI.00443-11>.
- [200] Momtaz S, Molina B, Mlera L, Goodrum F, Wilson JM. Cell type-specific biogenesis of novel vesicles containing viral products in human cytomegalovirus infection. *J Virol* 2021;95. <https://doi.org/10.1128/JVI.02358-20>.
- [201] Read C, Schauflinger M, Nikolaenko D, Walther P, von Einem J. Regulation of Human Cytomegalovirus Secondary Envelopment by a C-Terminal Tetralysine Motif in pUL71. *J Virol* 2019;93. <https://doi.org/10.1128/JVI.02244-18>.
- [202] Schauflinger M, Villinger C, Mertens T, Walther P, von Einem J. Analysis of human cytomegalovirus secondary envelopment by advanced electron microscopy. *Cell Microbiol* 2013;15:305–14. <https://doi.org/10.1111/cmi.12077>.
- [203] Flomm FJ, Soh TK, Schneider C, Wedemann L, Britt HM, Thalassinou K, et al. Intermittent bulk release of human cytomegalovirus. *PLOS Pathog* 2022;18:e1010575. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010575>.
- [204] Wedemann L, Flomm FJ, Bosse JB. The unconventional way out—Egress of HCMV through multiviral bodies. *Mol Microbiol* 2022;117:1317–23. <https://doi.org/10.1111/mmi.14946>.
- [205] Maninger S, Bosse JB, Lemnitzer F, Pogoda M, Mohr CA, von Einem J, et al. M94 Is Essential for the Secondary Envelopment of Murine Cytomegalovirus. *J Virol* 2011;85:9254–67. <https://doi.org/10.1128/JVI.00443-11>.
- [206] Homman-Loudiyi M, Hultenby K, Britt W, Söderberg-Nauclér C. Envelopment of Human Cytomegalovirus Occurs by Budding into Golgi-Derived Vacuole Compartments Positive for gB, Rab 3, Trans-Golgi Network 46, and Mannosidase II. *J Virol* 2003;77:3191–203. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.5.3191-3203.2003>.
- [207] Fraile-Ramos A, Pelchen-Matthews A, Kledal TN, Browne H, Schwartz TW, Marsh M. Localization of HCMV UL33 and US27 in Endocytic Compartments and Viral Membranes. *Traffic* 2002;3:218–32. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.030307.x>.
- [208] Radsak K, Eickmann M, Mockenhaupt T, Bogner E, Kern H, Eis-Hübinger A, et al. Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol* 1996;141:557–72. <https://doi.org/10.1007/BF01718317>.
- [209] Tooze J, Hollinshead M. Tubular early endosomal networks in AtT20 and other cells. *J Cell Biol* 1991;115:635–53. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.3.635>.
- [210] Krzyzaniak MA, Mach M, Britt WJ. HCMV-encoded glycoprotein M (UL100) interacts with Rab11 effector protein FIP4. *Traffic* 2009;10:1439–57. <https://doi.org/10.1111/j.1600->

0854.2009.00967.x.

- [211] Jahn R, Cafiso DC, Tamm LK. Mechanisms of SNARE proteins in membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2024;25:101–18. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00668-x>.
- [212] Buehler J, Zeltzer S, Reitsma J, Petrucelli A, Umashankar M, Rak M, et al. Opposing Regulation of the EGF Receptor: A Molecular Switch Controlling Cytomegalovirus Latency and Replication. *PLoS Pathog* 2016;12:e1005655. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005655>.
- [213] Clippinger AJ, Maguire TG, Alwine JC. Human cytomegalovirus infection maintains mTOR activity and its perinuclear localization during amino acid deprivation. *J Virol* 2011;85:9369–76. <https://doi.org/10.1128/JVI.05102-11>.
- [214] Krzyzaniak MA, Mach M, Britt WJ. HCMV-encoded glycoprotein M (UL100) interacts with Rab11 effector protein FIP4. *Traffic* 2009;10:1439–57. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00967.x>.
- [215] Votteler J, Sundquist WI. Virus Budding and the ESCRT Pathway. *Cell Host Microbe* 2013;14:232–41. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.08.012>.
- [216] Flower TG, Takahashi Y, Hudait A, Rose K, Tjahjono N, Pak AJ, et al. A helical assembly of human ESCRT-I scaffolds reverse-topology membrane scission. *Nat Struct Mol Biol* 2020;27:570–80. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0426-4>.
- [217] Sanchez V, Sztul E, Britt WJ. Human Cytomegalovirus pp28 (UL99) Localizes to a Cytoplasmic Compartment Which Overlaps the Endoplasmic Reticulum-Golgi-Intermediate Compartment. *J Virol* 2000;74:3842–51. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.8.3842-3851.2000>.
- [218] Penner I, Büscher N, Dejung M, Freiwald A, Butter F, Plachter B. Subviral Dense Bodies of Human Cytomegalovirus Induce an Antiviral Type I Interferon Response. *Cells* 2022;11:4028. <https://doi.org/10.3390/cells11244028>.
- [219] Pepperl S, Münster J, Mach M, Harris JR, Plachter B. Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J Virol* 2000;74:6132–46. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.13.6132-6146.2000>.
- [220] Murrell I, Bedford C, Ladell K, Miners KL, Price DA, Tomasec P, et al. The pentameric complex drives immunologically covert cell–cell transmission of wild-type human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci* 2017;114:6104–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704809114>.
- [221] IP-2024-05, projekt Hrvatske zaklade za znanost “Izlazak citomegalovirusa iz stanice putem Rab15-pozitivnih membranskih odjeljaka”, voditelj: prof. dr. sc. Pero Lučin n.d.
- [222] Ganesan D, Cai Q. Understanding amphisomes. *Biochem J* 2021;478:1959–76. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200917>.
- [223] Delevoye C, Marks MS, Raposo G. Lysosome-related organelles as functional adaptations of the endolysosomal system. *Curr Opin Cell Biol* 2019;59:147–58. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.05.003>.
- [224] Tooze J, Hollinshead M, Reis B, Radsak K, Kern H. Progeny vaccinia and human

- cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol* 1993;60:163–78.
- [225] Burd C, Cullen PJ. Retromer: A Master Conductor of Endosome Sorting. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6:a016774–a016774. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016774>.
- [226] Johns HL, Gonzalez-Lopez C, Sayers CL, Hollinshead M, Elliott G. Rab6 Dependent Post-Golgi Trafficking of HSV1 Envelope Proteins to Sites of Virus Envelopment. *Traffic* 2014;15:157–78. <https://doi.org/10.1111/TRA.12134/FORMAT/PDF>.
- [227] Schöneberg J, Lee I-H, Iwasa JH, Hurley JH. Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;18:5–17. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.121>.
- [228] Votteler J, Sundquist WI. Virus Budding and the ESCRT Pathway. *Cell Host Microbe* 2013;14:232–41. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.08.012>.
- [229] Seet LF, Hong W. The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* 2006;1761:878–96. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2006.04.011>.
- [230] van Weering JRT, Verkade P, Cullen PJ. SNX-BAR-mediated endosome tubulation is coordinated with endosome maturation. *Traffic* 2012;13:94–107. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0854.2011.01297.X>.
- [231] Mahmutefendić Lučin H, Blagojević Zagorac G, Marčelić M, Lučin P. Host Cell Signatures of the Envelopment Site within Beta-Herpes Virions. *Int J Mol Sci* 2022;23:9994. <https://doi.org/10.3390/ijms23179994>.
- [232] Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell* 2019;177:428–445.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029>.
- [233] Zhang Q, Higginbotham JN, Jeppesen DK, Yang Y-P, Li W, McKinley ET, et al. Transfer of Functional Cargo in Exomeres. *Cell Rep* 2019;27:940–954.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.009>.
- [234] Turner DL, Korneev D V, Purdy JG, de Marco A, Mathias RA. The host exosome pathway underpins biogenesis of the human cytomegalovirus virion. *Elife* 2020;9. <https://doi.org/10.7554/eLife.58288>.
- [235] Couté Y, Kraut A, Zimmermann C, Büscher N, Hesse A-M, Bruley C, et al. Mass Spectrometry-Based Characterization of the Virion Proteome, Phosphoproteome, and Associated Kinase Activity of Human Cytomegalovirus. *Microorganisms* 2020;8:820. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060820>.
- [236] Rieder FJJ, Kastner M-T, Hartl M, Puchinger MG, Schneider M, Majdic O, et al. Human cytomegalovirus phosphoproteins are hypophosphorylated and intrinsically disordered. *J Gen Virol* 2017;98:471–85. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000675>.
- [237] Reyda S, Büscher N, Tenzer S, Plachter B. Proteomic Analyses of Human Cytomegalovirus Strain AD169 Derivatives Reveal Highly Conserved Patterns of Viral and Cellular Proteins in

- Infected Fibroblasts. *Viruses* 2014;6:172–88. <https://doi.org/10.3390/v6010172>.
- [238] Birzer A, Kraner ME, Heilingloh CS, Mühl-Zürbes P, Hofmann J, Steinkasserer A, et al. Mass Spectrometric Characterization of HSV-1 L-Particles From Human Dendritic Cells and BHK21 Cells and Analysis of Their Functional Role. *Front Microbiol* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01997>.
- [239] Wandinger-Ness A, Zerial M. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6:a022616. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022616>.
- [240] Margaria JP, Ratto E, Gozzelino L, Li H, Hirsch E. Class II PI3Ks at the Intersection between Signal Transduction and Membrane Trafficking. *Biomolecules* 2019;9:104. <https://doi.org/10.3390/biom9030104>.
- [241] Dingjan I, Linders PTA, Verboogen DRJ, Revelo NH, ter Beest M, van den Bogaart G. Endosomal and Phagosomal SNAREs. *Physiol Rev* 2018;98:1465–92. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2017>.
- [242] Vieira N, Rito T, Correia-Neves M, Sousa N. Sorting Out Sorting Nexins Functions in the Nervous System in Health and Disease. *Mol Neurobiol* 2021;58:4070–106. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02388-9>.
- [243] Gallon M, Cullen PJ. Retromer and sorting nexins in endosomal sorting. *Biochem Soc Trans* 2015;43:33–47. <https://doi.org/10.1042/BST20140290>.
- [244] Vieira N, Rito T, Correia-Neves M, Sousa N. Sorting Out Sorting Nexins Functions in the Nervous System in Health and Disease. *Mol Neurobiol* 2021;58:4070–106. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02388-9>.
- [245] Cullen PJ, Steinberg F. To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* n.d. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0053-7>.
- [246] Yong X, Mao L, Seaman MNJ, Jia D. An evolving understanding of sorting signals for endosomal retrieval. *IScience* 2022;25:104254. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104254>.
- [247] McNally KE, Cullen PJ. Endosomal Retrieval of Cargo: Retromer Is Not Alone. *Trends Cell Biol* 2018;28:807–22. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.06.005>.
- [248] Gopaldass N, Chen K-E, Collins B, Mayer A. Assembly and fission of tubular carriers mediating protein sorting in endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2024;25:765–83. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00746-8>.
- [249] Norris A, Grant BD. Endosomal microdomains: Formation and function. *Curr Opin Cell Biol* 2020;65:86–95. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.02.018>.
- [250] McNally KE, Cullen PJ. Endosomal Retrieval of Cargo: Retromer Is Not Alone. *Trends Cell Biol* 2018;28:807–22. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.06.005>.
- [251] Solinger JA, Rashid H-O, Prescianotto-Baschong C, Spang A. FERARI is required for Rab11-dependent endocytic recycling. *Nat Cell Biol* 2020;22:213–24. <https://doi.org/10.1038/s41556->

019-0456-5.

- [252] Maschkowitz G, Gärtner S, Hofmann-Winkler H, Fickenscher H, Winkler M. Interaction of Human Cytomegalovirus Tegument Proteins ppUL35 and ppUL35A with Sorting Nexin 5 Regulates Glycoprotein B (gpUL55) Localization. *J Virol* 2018;92. <https://doi.org/10.1128/JVI.00013-18>.
- [253] Maschkowitz G, Gärtner S, Hofmann-Winkler H, Fickenscher H, Winkler M. Interaction of Human Cytomegalovirus Tegument Proteins ppUL35 and ppUL35A with Sorting Nexin 5 Regulates Glycoprotein B (gpUL55) Localization. *J Virol* 2018;92. <https://doi.org/10.1128/JVI.00013-18>.
- [254] Chandra M, Collins BM. The Phox Homology (PX) Domain, 2018, p. 1–17. https://doi.org/10.1007/5584_2018_185.
- [255] Xu Y, Hortsman H, Seet L, Wong SH, Hong W. SNX3 regulates endosomal function through its PX-domain-mediated interaction with PtdIns(3)P. *Nat Cell Biol* 2001;3:658–66. <https://doi.org/10.1038/35083051>.
- [256] Leneva N, Kovtun O, Morado DR, Briggs JAG, Owen DJ. Architecture and mechanism of metazoan retromer:SNX3 tubular coat assembly. *Sci Adv* 2021;7. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf8598>.
- [257] Tian Y, Kang Q, Shi X, Wang Y, Zhang N, Ye H, et al. SNX-3 mediates retromer-independent tubular endosomal recycling by opposing EEA-1-facilitated trafficking. *PLoS Genet* 2021;17:e1009607. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009607>.
- [258] Chen C, Garcia-Santos D, Ishikawa Y, Seguin A, Li L, Fegan KH, et al. Snx3 Regulates Recycling of the Transferrin Receptor and Iron Assimilation. *Cell Metab* 2013;17:343–52. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.013>.
- [259] Tian Y, Kang Q, Shi X, Wang Y, Zhang N, Ye H, et al. SNX-3 mediates retromer-independent tubular endosomal recycling by opposing EEA-1-facilitated trafficking. *PLoS Genet* 2021;17:e1009607. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009607>.
- [260] Crnković-Mertens I, Messerle M, Milotić I, Szepan U, Kučić N, Krmpotić A, et al. Virus Attenuation after Deletion of the Cytomegalovirus Fc Receptor Gene Is Not due to Antibody Control. *J Virol* 1998;72:1377–82. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.2.1377-1382.1998>.
- [261] Angulo A, Ghazal P, Messerle M. The Major Immediate-Early Gene ie3 of Mouse Cytomegalovirus Is Essential for Viral Growth. *J Virol* 2000;74:11129–36. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.23.11129-11136.2000>.
- [262] Bosse JB, Bauerfeind R, Popilka L, Marcinowski L, Taeglich M, Jung C, et al. A Beta-Herpesvirus with Fluorescent Capsids to Study Transport in Living Cells. *PLoS One* 2012;7:e40585. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0040585>.
- [263] Jordan S, Krause J, Prager A, Mitrovic M, Jonjic S, Koszinowski UH, et al. Virus Progeny of Murine Cytomegalovirus Bacterial Artificial Chromosome pSM3fr Show Reduced Growth in

- Salivary Glands due to a Fixed Mutation of MCK-2. *J Virol* 2011;85:10346–53. <https://doi.org/10.1128/JVI.00545-11>.
- [264] Crnković-Mertens I, Messerle M, Milotić I, Szepan U, Kučić N, Krmpotić A, et al. Virus Attenuation after Deletion of the Cytomegalovirus Fc Receptor Gene Is Not due to Antibody Control. *J Virol* 1998;72:1377–82. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.2.1377-1382.1998>.
- [265] Durkin M, Qian X, Popescu N, Lowy D. Isolation of Mouse Embryo Fibroblasts. *BIO-PROTOCOL* 2013;3. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.908>.
- [266] Brune W, Hengel H, Koszinowski UH. A Mouse Model for Cytomegalovirus Infection. *Curr Protoc Immunol* 2001;43:19.7.1-19.7.13. <https://doi.org/10.1002/0471142735.IM1907S43>.
- [267] Ravlić S, Brgles M, Hiršl L, Jonjić S, Halassy B. Production- and Purification-Relevant Properties of Human and Murine Cytomegalovirus. *Viruses* 2021;13:2481. <https://doi.org/10.3390/v13122481>.
- [268] Hetzenecker S, Helenius A, Krzyzaniak MA. <scp>HCMV</scp> Induces Macropinocytosis for Host Cell Entry in Fibroblasts. *Traffic* 2016;17:351–68. <https://doi.org/10.1111/tra.12355>.
- [269] Highlander SL, Sutherland SL, Gage PJ, Johnson DC, Levine M, Glorioso JC. Neutralizing monoclonal antibodies specific for herpes simplex virus glycoprotein D inhibit virus penetration. *J Virol* 1987;61:3356–64. <https://doi.org/10.1128/jvi.61.11.3356-3364.1987>.
- [270] Mach M, Osinski K, Kropff B, Schloetzer-Schrehardt U, Krzyzaniak M, Britt W. The Carboxy-Terminal Domain of Glycoprotein N of Human Cytomegalovirus Is Required for Virion Morphogenesis. *J Virol* 2007;81:5212–24. <https://doi.org/10.1128/JVI.01463-06>.
- [271] O'Connor CM, Shenk T. Human Cytomegalovirus pUS27 G Protein-Coupled Receptor Homologue Is Required for Efficient Spread by the Extracellular Route but Not for Direct Cell-to-Cell Spread. *J Virol* 2011;85:3700–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.02442-10>.
- [272] Hierholzer JC, Killington RA, Stokes A. Preparation of antigens. *Virol. Methods Man.*, Elsevier; 1996, p. 47–70. <https://doi.org/10.1016/B978-012465330-6/50004-X>.
- [273] Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 2006;1:1458–61. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>.
- [274] Bolte S, Cordeliers FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 2006;224:213–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>.
- [275] McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* 2014;13:1400–12. <https://doi.org/10.4161/cc.28401>.
- [276] Lemmermann NAW, Podlech J, Seckert CK, Kropp KA, Grzimek NKA, Reddehase MJ, et al. CD8 T-Cell Immunotherapy of Cytomegalovirus Disease in the Murine Model, 2010, p. 369–420. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(10\)37016-4](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(10)37016-4).
- [277] Zhou C-H, Zhang Y-H, Xue F, Xue S-S, Chen Y-C, Gu T, et al. Isoflurane exposure regulates the cell viability and BDNF expression of astrocytes via upregulation of TREK-1. *Mol Med Rep*

- 2017;16:7305–14. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7547>.
- [278] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods* 2001;25:402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [279] Cuche E, Marquet P, Depeursinge C. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms. *Appl Opt* 1999;38:6994. <https://doi.org/10.1364/AO.38.006994>.
- [280] Stringer C, Wang T, Michaelos M, Pachitariu M. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nat Methods* 2021;18:100–6. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01018-x>.
- [281] ImageJ User guide. V Menu commands 30 Analyze. n.d. <https://imagej.net/ij/docs/guide/146-30.html>.
- [282] Fackler OT, Grosse R. Cell motility through plasma membrane blebbing. *J Cell Biol* 2008;181:879–84. <https://doi.org/10.1083/jcb.200802081>.
- [283] Terhune S, Torigoi E, Moorman N, Silva M, Qian Z, Shenk T, et al. Human Cytomegalovirus UL38 Protein Blocks Apoptosis. *J Virol* 2007;81:3109–23. <https://doi.org/10.1128/JVI.02124-06>.
- [284] Tang J, Frascaroli G, Zhou X, Knickmann J, Brune W. Cell Fusion and Syncytium Formation in Betaherpesvirus Infection. *Viruses* 2021;13:1973. <https://doi.org/10.3390/v13101973>.
- [285] Sitnik KM, Krstanović F, Gödecke N, Rand U, Kubsch T, Maaß H, et al. Fibroblasts are a site of murine cytomegalovirus lytic replication and Stat1-dependent latent persistence in vivo. *Nat Commun* 2023;14:3087. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38449-x>.
- [286] Rahimi AM, Cai M, Hoyer-Fender S. Heterogeneity of the NIH3T3 Fibroblast Cell Line. *Cells* 2022;11:2677. <https://doi.org/10.3390/cells11172677>.
- [287] Bogdanow B, Phan QV, Wiebusch L. Emerging Mechanisms of G 1 /S Cell Cycle Control by Human and Mouse Cytomegaloviruses. *MBio* 2021;12. <https://doi.org/10.1128/mBio.02934-21>.
- [288] Fortunato EA, Sanchez V, Yen JY, Spector DH. Infection of Cells with Human Cytomegalovirus during S Phase Results in a Blockade to Immediate-Early Gene Expression That Can Be Overcome by Inhibition of the Proteasome. *J Virol* 2002;76:5369–79. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.11.5369-5379.2002>.
- [289] Weisbach H, Schablowsky C, Vetter B, Gruska I, Hagemeier C, Wiebusch L. Synthetic lethal mutations in the cyclin A interface of human cytomegalovirus. *PLOS Pathog* 2017;13:e1006193. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006193>.
- [290] Hertel L, Chou S, Mocarski ES. Viral and Cell Cycle–Regulated Kinases in Cytomegalovirus–Induced Pseudomitosis and Replication. *PLoS Pathog* 2007;3:e6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030006>.
- [291] Wedemann L, Flomm FJ, Bosse JB. The unconventional way out—Egress of <sc>HCMV</sc> through multiviral bodies. *Mol Microbiol* 2022;117:1317–23.

<https://doi.org/10.1111/mmi.14946>.

- [292] Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol* 2012;196:801–10. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112098>.
- [293] Štimac I, Marcelić M, Radić B, Viduka I, Blagojević Zagorac G, Lukanović Jurić S, et al. SNX27:Retromer:ESCPE-1-mediated early endosomal tubulation impacts cytomegalovirus replication. *Front Cell Infect Microbiol* 2024;14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1399761>.
- [294] Xu Y, Hortsman H, Seet L, Wong SH, Hong W. SNX3 regulates endosomal function through its PX-domain-mediated interaction with PtdIns(3)P. *Nat Cell Biol* 2001;3:658–66. <https://doi.org/10.1038/35083051>.
- [295] Feng S, Streets AJ, Nesin V, Tran U, Nie H, Onopiuk M, et al. The sorting nexin 3 retromer pathway regulates the cell surface localization and activity of a Wnt-activated polycystin channel complex. *J Am Soc Nephrol* 2017;28:2973–84. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016121349>.
- [296] UniProt Three Protein Coding Sequences for Mouse Isoforms n.d. <https://www.uniprot.org/> (accessed January 17, 2025).
- [297] Dyer SC, Austine-Orimoloye O, Azov AG, Barba M, Barnes I, Barrera-Enriquez VP, et al. Ensembl 2025. *Nucleic Acids Res* 2025;53:D948–57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1071>.
- [298] Leneva N, Kovtun O, Morado DR, Briggs JAG, Owen DJ. Architecture and mechanism of metazoan retromer:SNX3 tubular coat assembly. *Sci Adv* 2021;7. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf8598>.
- [299] Lenoir M, Ustunel C, Rajesh S, Kaur J, Moreau D, Gruenberg J, et al. Phosphorylation of conserved phosphoinositide binding pocket regulates sorting nexin membrane targeting. *Nat Commun* 2018;9:993. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03370-1>.
- [300] Harrison MS, Hung C-S, Liu T, Christiano R, Walther TC, Burd CG. A mechanism for retromer endosomal coat complex assembly with cargo. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111:267–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316482111>.
- [301] Mizutani R, Yamauchi J, Kusakawa S, Nakamura K, Sanbe A, Torii T, et al. Sorting nexin 3, a protein upregulated by lithium, contains a novel phosphatidylinositol-binding sequence and mediates neurite outgrowth in N1E-115 cells. *Cell Signal* 2009;21:1586–94. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.06.005>.
- [302] McGough IJ, de Groot REA, Jellett AP, Betist MC, Varandas KC, Danson CM, et al. SNX3-retromer requires an evolutionary conserved MON2:DOPEY2:ATP9A complex to mediate Wntless sorting and Wnt secretion. *Nat Commun* 2018;9:3737. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06114-3>.
- [303] Karleuša L, Mahmutefendić H, Tomaš MI, Zagorac GB, Lučin P. Landmarks of endosomal remodeling in the early phase of cytomegalovirus infection. *Virology* 2018;515:108–22. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2017.12.001>.

- [304] Radsak K, Eickmann M, Mockenhaupt T, Bogner E, Kern H, Eis-Hübinger A, et al. Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol* 1996;141:557–72. <https://doi.org/10.1007/BF01718317>.
- [305] Tugizov S, Maidji E, Xiao J, Pereira L. An Acidic Cluster in the Cytosolic Domain of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Is a Signal for Endocytosis from the Plasma Membrane. *J Virol* 1999;73:8677–88. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.10.8677-8688.1999>.
- [306] Fowler K, Mucha J, Neumann M, Lewandowski W, Kaczanowska M, Grys M, et al. A systematic literature review of the global seroprevalence of cytomegalovirus: possible implications for treatment, screening, and vaccine development. *BMC Public Health* 2022;22:1659. <https://doi.org/10.1186/s12889-022-13971-7>.
- [307] Kumar N, Sharma S, Kumar R, Tripathi BN, Barua S, Ly H, et al. Host-Directed Antiviral Therapy. *Clin Microbiol Rev* 2020;33. <https://doi.org/10.1128/CMR.00168-19>.
- [308] Liu PY, Chin LK, Ser W, Chen HF, Hsieh C-M, Lee C-H, et al. Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: past, present and future. *Lab Chip* 2016;16:634–44. <https://doi.org/10.1039/C5LC01445J>.
- [309] Liu YP. Refractive Index Distribution of Single Cell and Bacterium Using an Optical Diffraction Tomography. Université Paris-Est, 2016.
- [310] Zhang Q, Zhong L, Tang P, Yuan Y, Liu S, Tian J, et al. Quantitative refractive index distribution of single cell by combining phase-shifting interferometry and AFM imaging. *Sci Rep* 2017;7:2532. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02797-8>.
- [311] Sandoz ID PA, Tremblay CI, Gisou van der Goot FI, Frechin MI. Image-based analysis of living mammalian cells using label-free 3D refractive index maps reveals new organelle dynamics and dry mass flux 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000553>.
- [312] Schürmann M, Scholze J, Müller P, Chan CJ, Ekpenyong AE, Chalut KJ, et al. Refractive index measurements of single, spherical cells using digital holographic microscopy, 2015, p. 143–59. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2014.10.016>.
- [313] Park Y, Diez-Silva M, Popescu G, Lykotrafitis G, Choi W, Feld MS, et al. Refractive index maps and membrane dynamics of human red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:13730–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806100105>.
- [314] SURESH S. Biomechanics and biophysics of cancer cells☆. *Acta Biomater* 2007;3:413–38. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.04.002>.
- [315] Choi WJ, Jeon DI, Ahn S-G, Yoon J-H, Kim S, Lee BH. Full-field optical coherence microscopy for identifying live cancer cells by quantitative measurement of refractive index distribution. *Opt Express* 2010;18:23285. <https://doi.org/10.1364/OE.18.023285>.
- [316] Makra I, Terejánszky P, Gyurcsányi RE. A method based on light scattering to estimate the concentration of virus particles without the need for virus particle standards. *MethodsX* 2015;2:91–9. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.02.003>.

- [317] Pang Y, Song H, Cheng W. Using optical trap to measure the refractive index of a single animal virus in culture fluid with high precision. *Biomed Opt Express* 2016;7:1672. <https://doi.org/10.1364/BOE.7.001672>.
- [318] Rai A, Oprisko A, Campos J, Fu Y, Friesse T, Itzen A, et al. bMERB domains are bivalent Rab8 family effectors evolved by gene duplication. *Elife* 2016;5. <https://doi.org/10.7554/eLife.18675>.
- [319] Zuk PA, Elferink LA. Rab15 Mediates an Early Endocytic Event in Chinese Hamster Ovary Cells. *J Biol Chem* 1999;274:22303–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22303>.
- [320] Kobayashi H, Etoh K, Ohbayashi N, Fukuda M. Rab35 promotes the recruitment of Rab8, Rab13 and Rab36 to recycling endosomes through MICAL-L1 during neurite outgrowth. *Biol Open* 2014;3:803–14. <https://doi.org/10.1242/bio.20148771>.
- [321] Sato R, Okura T, Kawahara M, Takizawa N, Momose F, Morikawa Y. Apical Trafficking Pathways of Influenza A Virus HA and NA via Rab17- and Rab23-Positive Compartments. *Front Microbiol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01857>.
- [322] Biesemann A, Gorontzi A, Barr F, Gerke V. Rab35 protein regulates evoked exocytosis of endothelial Weibel–Palade bodies. *J Biol Chem* 2017;292:11631–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.773333>.
- [323] Naß J, Terglane J, Gerke V. Weibel Palade Bodies: Unique Secretory Organelles of Endothelial Cells that Control Blood Vessel Homeostasis. *Front Cell Dev Biol* 2021;9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.813995>.
- [324] Zografou S, Basagiannis D, Papafotika A, Shirakawa R, Horiuchi H, Auerbach D, et al. Rab-genome analysis reveals novel insights in Weibel-Palade body exocytosis. *J Cell Sci* 2012. <https://doi.org/10.1242/jcs.104174>.
- [325] Heider MR, Munson M. Exorcising the Exocyst Complex. *Traffic* 2012;13:898–907. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01353.x>.
- [326] Rai A, Goody RS, Müller MP. Multivalency in Rab effector interactions. *Small GTPases* 2019;10:40–6. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1265700>.
- [327] Rai A, Bleimling N, Vetter IR, Goody RS. The mechanism of activation of the actin binding protein EHBP1 by Rab8 family members. *Nat Commun* 2020;11:4187. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17792-3>.
- [328] Rai A, Singh AK, Bleimling N, Posern G, Vetter IR, Goody RS. Rep15 interacts with several Rab GTPases and has a distinct fold for a Rab effector. *Nat Commun* 2022;13:4262. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31831-1>.
- [329] Strick DJ, Elferink LA. Rab15 Effector Protein: A Novel Protein for Receptor Recycling from the Endocytic Recycling Compartment. *Mol Biol Cell* 2005;16:5699–709. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-03-0204>.
- [330] Giridharan SSP, Cai B, Vitale N, Naslavsky N, Caplan S. Cooperation of MICAL-L1, syndapin2, and phosphatidic acid in tubular recycling endosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 2013;24:1776–

90. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-01-0026>.
- [331] Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018;19:313–26. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132>.
 - [332] Stockhammer A, Adarska P, Natalia V, Heuhsen A, Klemm A, Bregu G, et al. ARF1 compartments direct cargo flow via maturation into recycling endosomes. *Nat Cell Biol* 2024;26:1845–59. <https://doi.org/10.1038/s41556-024-01518-4>.
 - [333] Nakai W, Kondo Y, Saitoh A, Naito T, Nakayama K, Shin H-W. ARF1 and ARF4 regulate recycling endosomal morphology and retrograde transport from endosomes to the Golgi apparatus. *Mol Biol Cell* 2013;24:2570–81. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-04-0197>.
 - [334] Kondo Y, Hanai A, Nakai W, Katoh Y, Nakayama K, Shin H-W. ARF1 and ARF3 Are Required for the Integrity of Recycling Endosomes and the Recycling Pathway. *Cell Struct Funct* 2012;37:141–54. <https://doi.org/10.1247/csf.12015>.
 - [335] D’Souza RS, Semus R, Billings EA, Meyer CB, Conger K, Casanova JE. Rab4 Orchestrates a Small GTPase Cascade for Recruitment of Adaptor Proteins to Early Endosomes. *Curr Biol* 2014;24:1187–98. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.04.003>.
 - [336] Stockhammer A, Adarska P, Natalia V, Heuhsen A, Klemm A, Bregu G, et al. ARF1 compartments direct cargo flow via maturation into recycling endosomes. *Nat Cell Biol* 2024;26:1845–59. <https://doi.org/10.1038/s41556-024-01518-4>.
 - [337] Etoh K, Fukuda M. Rab10 regulates tubular endosome formation through KIF13A/B motors. *J Cell Sci* 2019. <https://doi.org/10.1242/jcs.226977>.
 - [338] Farmer T, Xie S, Naslavsky N, Stöckli J, James DE, Caplan S. Defining the protein and lipid constituents of tubular recycling endosomes. *J Biol Chem* 2021;296:100190. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015992>.
 - [339] Chua RYR, Wong SH. SNX3 recruits to phagosomes and negatively regulates phagocytosis in dendritic cells. *Immunology* 2013;139:30–47. <https://doi.org/10.1111/imm.12051>.
 - [340] van Weering JRT, Verkade P, Cullen PJ. SNX–BAR-Mediated Endosome Tubulation is Coordinated with Endosome Maturation. *Traffic* 2012;13:94–107. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01297.x>.
 - [341] Wang P, Liu H, Wang Y, Liu O, Zhang J, Gleason A, et al. RAB-10 Promotes EHBP-1 Bridging of Filamentous Actin and Tubular Recycling Endosomes. *PLOS Genet* 2016;12:e1006093. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006093>.
 - [342] Tan X, Thapa N, Choi S, Anderson RA. Emerging roles of PtdIns(4,5) P₂ – beyond the plasma membrane. *J Cell Sci* 2015;128:4047–56. <https://doi.org/10.1242/jcs.175208>.
 - [343] Fukuda M, Kanno E, Ishibashi K, Itoh T. Large Scale Screening for Novel Rab Effectors Reveals Unexpected Broad Rab Binding Specificity. *Mol Cell Proteomics* 2008;7:1031–42. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700569-MCP200>.
 - [344] Harterink M, Port F, Lorenowicz MJ, McGough IJ, Silhankova M, Betist MC, et al. A SNX3-

- dependent retromer pathway mediates retrograde transport of the Wnt sorting receptor Wntless and is required for Wnt secretion. *Nat Cell Biol* 2011;13:914–23. <https://doi.org/10.1038/ncb2281>.
- [345] Jarvis MA, Jones TR, Drummond DD, Smith PP, Britt WJ, Nelson JA, et al. Phosphorylation of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B (gB) at the Acidic Cluster Casein Kinase 2 Site (Ser 900) Is Required for Localization of gB to the trans- Golgi Network and Efficient Virus Replication. *J Virol* 2004;78:285–93. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.1.285-293.2004>.
- [346] Kropff B, Koedel Y, Britt W, Mach M. Optimal Replication of Human Cytomegalovirus Correlates with Endocytosis of Glycoprotein gpUL132. *J Virol* 2010;84:7039–52. <https://doi.org/10.1128/JVI.01644-09>.
- [347] Yong X, Zhao L, Deng W, Sun H, Zhou X, Mao L, et al. Mechanism of cargo recognition by retromer-linked SNX-BAR proteins. *PLOS Biol* 2020;18:e3000631. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000631>.
- [348] Thomas G. Furin at the cutting edge: From protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:753–66. <https://doi.org/10.1038/nrm934>.
- [349] Bergner T, Rayas LC, Freimann G, Read C, Einem J von. Secondary Envelopment of Human Cytomegalovirus Is a Fast Process Utilizing the Endocytic Compartment as a Major Membrane Source. *Biomol* 2024, Vol 14, Page 1149 2024;14:1149. <https://doi.org/10.3390/BIOM14091149>.
- [350] Pim D, Broniarczyk J, Bergant M, Playford MP, Banks L. A Novel PDZ Domain Interaction Mediates the Binding between Human Papillomavirus 16 L2 and Sorting Nexin 27 and Modulates Virion Trafficking. *J Virol* 2015;89:10145–55. <https://doi.org/10.1128/JVI.01499-15>.
- [351] Tooze J, Hollinshead M, Reis B, Radsak K, Kern H. Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol* 1993;60:163–78.

ILUSTRACIJE

Popis slika

Slika 1. Građa herpesvirusnog viriona.	1
Slika 2. Organizacija MCMV viriona.	7
Slika 3. Organizacija MCMV životnog ciklusa i ekspresija kinetike MCMV gena.	8
Slika 4. Faze proizvodnje beta-herpesvirusa u zaraženim stanicama.....	9
Slika 5. Citomegalične stanice s intranuklearnim inkluzijama.....	12
Slika 6. Shematski prikaz MCMV odjeljka za sklapanje viriona.....	16
Slika 7. Slike inficiranih ljudskih fibroblasta dobivene elektronskim mikroskopom.	18
Slika 8. Predloženi slijed citoplazmatskih događaja tijekom konačnog omatanja i izlaska citomegalovirusa	20
Slika 9. Potpisi stanice domaćina u HCMV virionima koji mogu otkriti organelu odgovornu za sekundarno omatanje.....	21
Slika 10. Identifikacija sortirajućih neksina (engl. <i>sorting nexins</i> , SNX) u virionima i NVEP-ovima u pripravcima ekstracelularnih vezikula.....	22
Slika 11. Vremenski niz neoznačenih i neinficiranih NIH3T3 stanica. NIH3T3	48
Slika 12. Prikaz zaokruživanja stanica inficiranih MCMV-om pomoću DHTM-a.....	48
Slika 13. Prikaz stvaranja mjehurčica (engl. <i>blebbing</i>) na staničnoj membrani NIH3T3 stanica inficiranih MCMV-om pomoću DHTM-a	49
Slika 14. Prikaz stanične fuzije NIH3T3 stanica inficiranih MCMV-om pomoću DHTM-a.....	50
Slika 15. Prikaz izlaska MCMV kapsida nakon vjerojatne stanične lize pomoću DHTM-a.....	51
Slika 16. Sistematizacija promjena stanične morfologije tijekom MCMV infekcije.	53
Slika 17. Prikaz heterogenosti stanica inficiranih MCMV-om pomoću DHTM-a.....	55
Slika 18. MCMV infekcija povećava vrijednost refraktivnog indeksa.	56
Slika 19. Identifikacija fluorescentnog malog kapsidnog proteina (S-SCP) u jezgri i citoplazmi stanica fibroblasta.....	57
Slika 20. Izražaj S-mCherry-SCP u NIH3T3 stanicama tijekom replikacijskog ciklusa u jezgri i citoplazmi stanica inficiranih sa S-mCherry-SCP MCMV.	59
Slika 21. Vremenski niz analize S-SCP odjeljaka u jezgri i citoplazmi pomoću DHTM-a.	60
Slika 22. Vremenski niz analize S-SCP odjeljak u citoplazmi pomoću DHTM-a	61
Slika 23. Kolokalizacijska analiza citoplazmatskih odjeljaka koji sadrže S-mCherry-SCP s markerima membranskih organela.	63
Slika 24. Detaljna analiza imunofluorescence citoplazmatskih odjeljaka s nakupljenim kapsidama i membranskih organela.	64

Slika 25. Detaljna analiza imunofluorescencije citoplazmatskih odjeljaka s nakupljenim kapsidama, membranskih organela i virusnih proteina.	65
Slika 26. Detaljni prikaz kolokalizacije fluorescentnih kapsida (S-SCP) i virusnog tegumentnog proteina (pM25) s Rab15 citoplazmatskih odjeljcima.	66
Slika 27. Kinetika izražaja Rab15 tijekom infekcije MCMV-om.	67
Slika 28. Utišavanje Rab15 proteina siRNA metodom ne utječe stvaranje i oslobađanje infektivnih MCMV viriona.	67
Slika 29. Strukture fuzijskih proteina.	68
Slika 30. Izražaj m06 fuzijskog proteina u NIH3T3 stanicama inficiranim s m06-BioID2-HA MCMV-om.	69
Slika 31. Učinak supresije staničnih faktora koji djeluju na sučelju EE/RE/ERC na stvaranje i oslobađanje infektivnih MCMV viriona.	71
Slika 32. Perinuklearno nakupljanje SNX3 u pre-AC i AC stanica zaraženih s MCMV-om.	73
Slika 33. Perinuklearno nakupljanje SNX3 u pre-AC i AC Balb3T3 stanica zaraženih MCMV-om.	74
Slika 34. Izoforme transkripta SNX3.	75
Slika 35. Analiza kolokalizacije SNX3 sa SNX27 i Rab10.	77
Slika 36. Uspješno proizvedene NIH3T3 stanične linije s ekspresijom shScr i shSNX3.	79
Slika 37. Ekspresija SNX3 shRNA nema učinka na (A) rane endosome, (B) promet receptora transferina, (C) endosomalni odjeljak za recikliranje (Lamp1) i (D) kasne endosome.	80
Slika 38. Membranska povezanost retromera, određena pomoću Vps35, i ranog endosomalnog antigena 1 (engl. <i>early endosomal antigen 1</i> , EEA1) nakon utišavanja SNX3.	81
Slika 39. Učinci deplecije SNX3 na replikaciju MCMV.	82
Slika 40. Učinci deplecije SNX3 na ekspresiju virusnih proteina u kasnoj fazi MCMV infekcije.	83
Slika 41. Učinci deplecije SNX3 na kasnu fazu MCMV infekcije.	84
Slika 42. Deplecija SNX3 povećava razinu pM55 (gB) na staničnoj površini.	85
Slika 43. Deplecija sortirajućih neksina povezanih s endosomalnim recikliranjem u PM potvrđuje doprinos SNX3 biogenezi viriona MCMV.	87

Popis tablica

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih u ovom radu.	26
Tablica 2. Popis korištenog laboratorijskog pribora.....	30
Tablica 3. Popis primarnih protutijela koja prepoznaju stanične proteine.	32
Tablica 4. Popis primarnih protutijela koja prepoznaju MCMV proteine.....	34
Tablica 5. Popis korištenih sekundarnih protutijela.	35
Tablica 6. Popis korištenih siRNA sekvenci.	36
Tablica 7. Popis korištenih plazmida.....	37
Tablica 8. Popis korištenih virusa.	38
Tablica 9. Popis korištenih početnica za RT-qPCR.	45
Tablica 10. Vrijednosti mjerenih parametara kroz MCMV replikacijski ciklus	54

POPIS POKRATA

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

CIE - klatrin neovisna endocitoza (engl. *clathrin independent endocytosis*)

cCMV - kongenitalna citomegalovirusna infekcija (engl. *congenital cytomegalovirus*)

cDNA - komplementarna DNA (engl. *complementary deoxyribonucleic acid*)

CMV-HIG - hiperimuni imunoglobulini (engl. *hyperimmune immunoglobulins*)

CPE - citopatski učinci (engl. *cytopathic effects*)

cVAC - citoplazmatski odjeljak za sklapanje virusnih čestica (engl. *cytoplasmic virion assembly compartment*)

CMV – citomegalovirus

DB – gusta tijela (engl. *dense bodies*)

DHTM - digitalna holotomografska mikroskopija

DISC - atenuirani virusi ili replikacijski defektni virusi (engl. *disabled single cycle virus*)

E1 - protein rane faze infekcije (engl. *early phase protein*)

E gen – rani gen (engl. *early gene*)

EB - regulatorni proteini mikrotubula (engl. *end-binding proteins*)

EBV - Epstein-Barr virus

EE - rani endosom (engl. *early endosome*)

EEA1 – antigen ranih endosoma 1 (engl. *early endosomal antigen 1*)

EGFR - receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

EM - elektronska mikroskopija

EOD - krajnje oštećenje organa (engl. *end-organ disease*)

ER - endoplazmatska mrežica (engl. *endoplasmatic reticulum*)

ERC - endosomalni reciklirajući odjeljk (engl. *endosomal recycling compartment*)

ESCPE-1 - endosomalni SNX-BAR sortirajući kompleks za poticanje izlaska 1(engl. *endosomal SNX-BAR sorting complex for promoting exit 1*)

ESCRT - endosomalni sortirajući kompleksi potrebni za prometovanje (engl. *endosomal sorting complexes required for transport*)

FDA - Američka agencije za lijekove

GFP - zeleni fluorescentni protein (engl. *green fluorescent protein*)

HCMV - humani citomegalovirus

HHV-6 - humani herpesvirus 6

HHV-7 - humani herpesvirus 7

Hpi - sati nakon infekcije (engl. *hours post infection*)

HSV-1 - herpes simpleks virus tip 1

HSV-2 - herpes simpleks virus tip 2

iAC - unutarnji AC (engl. *inner AC*)

ICRMS - reorganizirani membranski sustav zaraženih stanica (engl. *infected cell reorganized membrane system*)

IE1 - protein neposredno rane faze infekcije (engl. *immediate early phase protein*)

IE gen – neposredno rani gen (engl. *immediate early gene*)

kDa - kilodalton (engl. *kilo Dalton*)

KSHV - hepresvirus povezan s Kaposijevim sarkomom (engl. *Kaposi's sarcoma herpes virus*)

qPCR - kvantitativna lančana reakcije polimerazom (engl. *quantitative polymerase chain reaction*)

L gen – kasni gen (engl. *late gene*)

LE - kasni endosomi (engl. *late endosome*)

IEVs – velike izvanstanične vezikule (engl. *large extracellular vesicles*)

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

MCP - veliki kapsidni protein (engl. *major capsid protein*)

MEF - mišji embrionalni fibroblasti (engl. *murine embryonic fibroblasts*)

MFI - vrijednost srednjeg intenziteta fluorescencije (engl. *mean fluorescence intensity*)

MOI - povećanje učinkovitosti infekcije (engl. *multiplicity of infection*)

MTOC - centar za organiziranje mikrotubula (engl. *microtubule-organizing center*)

mTOR – meta rapamicina u sisavaca (engl. *mammalian target of rapamycin*)

MVB - multivezikularna tijela (engl. *multivesicular bodies*)

MViB - multiviralna tijela (engl. *multiviral bodies*)

NIEPs - neinfektivne omotane čestice (engl. *non-infectious enveloped particles*)

NVEPs - nevezikularne izvanstanične čestice (engl. *non-vesicular extracellular particles*)

oAC - vanjski AC (engl. *outer AC*)

PC - pentamerni kompleks (engl. *pentameric complex*)

PDGFR - receptor faktora rasta podrijetlom iz trombocita (engl. *platelet derived growth factor receptor- α*)

PFA - paraformaldehid (engl. *paraformaldehyde*)

PFU - jedinica za stvaranje virusnog plaka (engl. *plaque forming units*)

PI - fosfatidilinozitol (engl. *phosphatidylinositol*)

PM - stanična membrana (engl. *plasma membrane*)

preAC - preteča odjeljka/ rani odjeljak za sklapanje virusnih čestica (engl. *pre-virion assembly compartment*)

PML-NB - jezgrina tjelešca u kojima se nakuplja protein promijelocitne leukemije (engl. *promyelocytic leukemia protein-nuclear bodies*)

RE - reciklirajući endosomi (engl. *recycling endosomes*)

RI - indeks loma (engl. *refractive index*)

RIG - gradijent indeksa loma (engl. *refractive index gradient*)

RNA - ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

RPM - okretaji po minuti (engl. *revolutions per minute*)

RSV - respiratorni sincicijski virus

sEVs - male izvanstanične vezikule (engl. *small extracellular vesicles*)

SCP - mali kapsidni protein (engl. *small capsid protein*)

SD - standardna devijacija (engl. *standard deviation*)

SDS-PAGE - poliakrilamid gel elektroforeza (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*)

shRNA - RNA sekvence sa strukturom ukosnice (engl. *small hairpin RNA*)

siRNA - mala interferirajuća RNA (engl. *small interfering RNA*)

SNARE - topljivi receptor proteina za vezanje faktora osjetljivog na N-etil maleimid (engl. *soluble N-ethyl maleimide sensitive factor attachment protein receptor*)

TC - trimerski kompleks (engl. *trimeric complex*)

TCCF - ukupna korigirana stanična fluorescencija (engl. *total corrected cell fluorescence*)

TfR – transferinski receptor (engl. *transferrin receptor*)

TGN - trans-Golgijska mreža (engl. *trans-Golgi network*)

(V)AC – odjeljak za sklapanje virusnih čestica (engl. *virion assembly compartment*)

VZV - varicella zoster virus

WASH - engl. *Wiskott–Aldrich sindrom protein and SCAR Homologue*

WPB – Weibel-Palade tjelešca (engl. *Weibel–Palade bodies*)

WT – divlji tip (engl. *wild type*)

PRIVITAK A

Proizvodnja rekombinantnih MCMV-a M55-BioID2-HA i m06-BioID2-HA

Prvi korak je fuzija kodirajuće sekvence promiskuitetne bakterijske biotin-ligaze (E.coli BirA R118G, BioID), u kojoj je deletirana N-terminalna DNA-vezujuća domena (BioID2) s kodirajućom sekvencom gB (M55) ili m06 MCMV-a. Pronađena je humanizirana varijanta sekvencije BioID2-HA (696 bp) u sklopu vektora MCS-BioID2-HA (6112 bp) (donacija dr. Kyle Roux, Addgene plasmid #74224; <http://n2t.net/addgene:74224>; RRID:Addgene_74224). S obzirom da je zadani cilj ekspresija BioID2 u mišjim stanicama, humanizirana sekvencija BioID2 iz gornjeg vektora je kodon-optimizirana za ekspresiju u mišjim stanicama pomoću alata GenSmart™ Codon Optimization (Patent Number: WO2020024917A1), besplatno dostupnog na [GenSmart™ Codon Optimization Tool-GenScript](#). Kodirajuća sekvencija BirA je fuzionirana na 3' kraj gena M55, a ne na njegov 5'-kraj, pa će tako N-terminus BioID2 biti fuzioniran s C-terminusom M55. U SnapGene programu su zatim konstruirane nukleotidne sekvence za dva fuzijska proteina:

(1) **M55-LINKER-BioID2-HA:**

```
atgtcaagaagaacgaaagaggatgtcgtcctcgagctggtagcgatgtcgacggcgtggcggtgacgatctggcgccctcttgctgtaca
agtggagtaatcgccggcgagtagaccaggtactactccgaaagcaaaaactgacacttcgtcagaaccggtccgcagaacagagacgg
cgacttcggcgcgccgaccgaaagaaggaagccacgccgactcaggcctcgaagataacggggaccaccatcgctcccttcgtgaacgaga
cggagaacatggtttctgttgacatagataaatatccttacagagtgtgcatgtctgtgtactgatctcgctcggttcgggaaaagtatagattgatca
atcatccccgaagacgcccgtacaagaggggatcatgatatgttacaacagaatcgtggctcacacgttcgaggtgatcactatcacaaaga
tgcatctttcagagaagtacgctgacacgactactaattatttctggggactagtgtgactaagatggccttccccgtctgggagctggatgaggtg
aacaggaacaacagggtgtactctgccgagtaggatactcaatggagaagtgtatgtcgcttaccacgaggatagctataggaactatactatggt
gcttgtggaggatgattacaggagtaagaacagtaagcgatagtgaccaccaagagtaggtatcataagggcgcttgacgtggagatacaccg
aatcctgtaacatgaactgcgtcgtcgtcgtcacgaaagctaggtccaacccccctacgaattctcgtgctcagctccggggaagtgcgtgagata
tcaccgttttacgacggtgaaaactccgagccctcgaagaggacacgaggaatttctggattcgtgaagaactacacatgaagacgtacttcggtga
actcgccggcaccacaaaaagtagtacctctgatggctttctagagagggaggacatgaccatcggtgggagatcttcccaacagaatgtcacg
tgcgactggaagaatggcagacggttcaagggcgatacgtactgacaccaatactagctatcatttgttccaagagtttaactgctacttttggc
cagtaaacacaaaatagattataactactaccgaaggtaaaaattataacacctccgatgtgttatgatgaatttgtagaagaagtgaatcgtgtgtt
tgaagatgagtacaatgagacgatgtgaaagacggggagcttgaaatgtatagaacaacgggaggtcttattgtattgtggcagggattgaaagc
gaaactactgcataatctgaaaaatcgcgcgtttaaataacgtttctgtagggactgttagccctcctgtaacttctgctactgaaaatggtaccactg
ctgcttctgttctgctcgtcgtcggaacgcagcttgatcatatagatgatgtcgtgactgatcacctatgctcaactgcaattacacgacgtgctc
aaggactacatcaacgatgcgtccgaaacatcatggacgcttggtgtcgcgaccagaaacggacggcgagatgctcaaggagctcagtaaga
tcaatccgtccaacatcttgcggccatctacgagagaccggtcaccgcaaagctggcggcgacgtacgcgatgccgagtggtgtcaaggtcg
atcagagtagtgtgaaggtcctgaaggacatgcggatctccaggacgggaaggtcgtcaactgttattcgagaccgctggctgctttcagttcatc
aactcgacgaagctcgatcgggcccagctgggcgaaaacaacgagattatgctgggaaccttcggacggagaactgtgacacgaacagcagg
aagatcttcgtcgtggggactgtgggctacgagtatcgggactaccgtttcaggaacgtgaccagtttggaacacatccaactgctgacaccctgat
cgggctggacatcgagccctggagaacaccgactcaaggtgctcgagctgtactcgaagggagagctgcgcgcctcgaacgtgttcagcctg
gacgagatcatcgaggagtacaactcgagaagcagcacatccgaccctgagcgccaaagtcaacgacaacacgccctcttatcttgggggtt
ggatactttcatgcaggggctaggggtcgcgggtaaggggatcggggtggccatcggggccgtcggcgggggcgtgtcttcggtgtgaacgcc
gtcacgggcttctgacgaacccgtttggaggtttaccacatctcctggtgatcggcgtgctagccgtgctgtatctcatcttcacgaggcagcg
gtcggccgcccgcgaggccggtcgagtacttctccctacgccaccagaccgctgcagtatgctcctccggcgggcgccacgggggactc
gagagcggggccgcccggagcgcctggtctgcatcggcgctgaacgcggcgagtgacgattcgggtaaggcgtggactagcgataaaaa
gggcttgagaggacctacacgagcaagatgctctattgatactccgcggttaaacagctagacgacagccaacgcaccgagaaagcgcag
cagaaagcgactagactccgacgggcatcttgaccgtctcaaaggtaacgacaccagtggtaccagcgattaccggcgaggactccgattt
cgagtacgggtggaggcgggtctggaggcgggggtagtggcggggggtggaagcgggggtggaggcgggtcgggtggcgaggtagcggag
gcgggtggaagtggaggcgggtggaagtgggtggaggaggttctggtggcgagggtagcgggtggcgagggtagcggaggcgggtggaagtgggtg
```


Umnažanje i purifikacija rekombinantnih MCMV-a

Purificirana BAC DNA je transficirana u MEF koristeći XtremeGene-9 transfekcijski reagens u duplikatu. Transfekcija je napravljena na stanicama konfluentnosti 40-80%. Nakon što se zamiješa DMEM s transfekcijskim reagensom, u suspenziju je dodano 1,5 mikrograma DNA. Nakon 15-30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, suspenzija se dodaje kap po kap na MEF. Jednu minutu kasnije se dodaje DMEM i ploča se inkubirala 1-2 dana u CO₂ inkubatoru. MEF se tripsinizirao i udruženi su duplikati u 10 cm ploče s dodatkom 3% DMEM-a. Idućih 7 do 10 dana se prati pojava plakova na pločama. Nakon infekcije svih stanica, sakupljeni su supernatanti (nulta pasaža) i pohranjeni na -80°C. Ostatak stanica je uklonjen centrifugiranjem na 3100 rpm (10 minuta). Za uklanjanje BAC sekvence iz virusnog genoma potrebno je pasažirati virus još barem pet puta (infekcija MEF-a u 10 cm pločama sa 100 µL supernatanta). Nakon posljednje pasaže, slijedi purifikacija virusa prema protokolu opisanom u 3.2.4.

ŽIVOTOPIS

IVONA VIDUKA

Datum rođenja: 01/03/1996

e-mail: ivona.viduka@uniri.hr / ivona.viduka@gmail.com

Obrazovanje

2021. -

Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij "Biomedicina"
Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

2017. - 2019.

Magistra biotehnologije u medicini
Diplomski sveučilišni studij "Biotehnologija u medicini"
Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

2014. - 2017.

Sveučilišna prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova
Preddiplomski sveučilišni studij "Biotehnologija i istraživanje lijekova"
Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

Radno iskustvo

10.2020. -

Asistent/doktorand
Projekt Hrvatske zaklade za znanost: „Sekundarno omatanje i izlazak beta-herpesvirusa iz stanice“;
Voditelj: prof.dr.sc. Pero Lučin, dr.med.
Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Zavod za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju

2.2020. - 9.2020.

Suradnik za farmakovigilanciju
Izvršavanje zadataka u području Odjela za upravljanje sigurnosnim izvješćima pojedinog slučaja
unutar dogovorenog obujma i vremenskih rokova
PrimeVigilance Zagreb d.o.o.

Nagrade i priznanja

2023.

Nagrada za treći najbolji poster pod naslovom "Bulk release of the MCMV virions is a rare event, as revealed by live-cell tracking of secondary envelopment and egress" - Annual Meeting of the Croatian Immunological Society 2023

2021.

Osvojeno treće mjesto za najbolji projekt "Artistic Style Transfer" - 29th Summer School on Image Processing 2021

2021.

Nagrada za treći najbolji poster pod naslovom "Dynamic microtubules contribute to the establishment

of the cytomegalovirus assembly compartment in the early phase of infection" - 15th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society with International participation 2021

2017.

Nagrada za najbolju usmenu prezentaciju pod nazivom "A study of the photodynamic effect of the amphiphilic porphyrin on Legionella" - 17th Zagreb International Medical Summit

Članstva

2023. -

Hrvatsko Imunološko Društvo

2022. – 2023.

Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju

2021. – 2023.

Hrvatsko društvo fiziologa (HDF)

Znanstvena djelatnost

Znanstveni radovi

2025.

Contribution of Sorting Nexin 3 in the Cytomegalovirus Assembly

Viduka I, Štimac I, Lukanović Jurić S, Gulić T, Lisnić B, Blagojević Zagorac G, Mahmutefendić Lučin H, Lučin P

Biomedicines

Q1/Q2

2025.

Rab10-associated tubulation as an early marker for biogenesis of the assembly compartment in cytomegalovirus-infected cells

Mahmutefendić Lučin H, Štimac I, Marcelić M, Skočaj M, Lisnić B, Omerović A, **Viduka I**, Radić B, Karleuša L, Blagojević Zagorac G, Deželjin M, Jurak Begonja A and Lučin P

Frontiers in Cell and Developmental Biology

Q1

2024.

SNX27:Retromer:ESCPE-1-mediated early endosomal tubulation impacts cytomegalovirus replication

Štimac I, Marcelić M, Radić B, **Viduka I**, Blagojević Zagorac G, Lukanović Jurić S, Rožmanić C, Messerle M, Brizić I, Lučin P, Mahmutefendić Lučin H

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology

Q1

2023.

Mahmutefendić Lučin H, Lukanović Jurić S, Marcelić M, Štimac I, **Viduka I**, Blagojević Zagorac G, Lisnić B, Ruzsics Z, Lučin P

Membraneless Compartmentalization of Nuclear Assembly Sites during Murine Cytomegalovirus Infection

Viruses

Q1

2019.

Viduka I, Begić G, Malatesti N, Gobin I
Fotodinamički učinak porfirina na legionele
Hrvatske vode

Kongresna priopćenja

10.2024.

Cytomegalovirus develops rab15-positive membrane organelle for secondary envelopment and release from infected cells

Viduka I, Omerović A, Karleuša Lj, Blagojević Zagorac G, Mahmutefendić Lučin H, Ruzsics Z, Lučin P

E-poster prezentacija

The 18th Congress of the International Union of Microbiological Societies

Firenca, Italija

09.2024.

Cytomegalovirus secondary envelopment and its release from infected cells is mediated by Rab15-positive membrane organelle

Viduka I, Omerović A, Karleuša Lj, Blagojević Zagorac G, Mahmutefendić Lučin H, Ruzsics Z, Lučin P

Oralna prezentacija

Power of Viruses 2024

Zadar

10.2023.

Live-cell tracking of secondary envelopment and egress of the MCMV virions reveals that bulk release is a rare event

Viduka I, Karleuša Lj, Blagojević Zagorac G, Mahmutefendić Lučin H, Lučin P

Poster prezentacija

12th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School

Trogir

10.2023.

Bulk release of the MCMV virions is a rare event, as revealed by live-cell tracking of secondary envelopment and egress

Viduka I, Karleuša Lj, Gulić T, Blagojević Zagorac G, Mahmutefendić Lučin H, Lučin P

Poster prezentacija

The Annual Meeting of the Croatian Immunological Society 2023

Brijuni

09.2022.

Early Endosomal Sorting Nexins Are Required for Murine Cytomegalovirus Envelopment and Egress

Viduka I, Štimac I, Lukanović Jurić S, Gulić T, Blagojević Zagorac G, Mahmutefendić Lučin H, Lučin P

Poster prezentacija

3rd Regional Congress of Physiological Societies and the 5th Congress of Croatian Physiological Society

Plitvička jezera

07.2022.

Suppression of Early Endosomal Sorting Nexins Affects Murine Cytomegalovirus Envelopment and Egress

Viduka I, Štimac I, Blagojević Zagorac G, Mahmutefendić Lučin H, Lučin P

Poster prezentacija

46th International Herpesvirus Workshop

Virtualno

5.2022.

Digital holotomographic microscopy reveals decreased lipid levels in the early phase of murine cytomegalovirus infection following dynasore treatment

Viduka I, Štimac I, Karleuša Lj, Blagojević Zagorac G, Mahmutefendić Lučin H, Lučin P

Poster prezentacija

1st Biomedicine and Health PhD Students Congress "Science and Us"

Rijeka

9.2021.

Dynamic microtubules contribute to the establishment of the cytomegalovirus assembly compartment in the early phase of infection

Viduka I, Štimac I, Jug Vučko N, Blagojević Zagorac G, Mahmutefendić Lučin H, Lučin P

Poster prezentacija

15th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society with International participation (HDF 2021)

Zagreb

7.2021.

Digital holotomographic and confocal microscopy in cell imaging

Viduka I, Karleuša Lj, Lučin P

Poster prezentacija

29th Summer School on Image Processing (SSIP 2021)

Rijeka

5.2018.

Ispitivanje fotodinamičke aktivnosti amfipatskog porfirina na stafilokoke

Viduka I, Šuvak A, Perin E, Gobin I, Malatesti N

Poster prezentacija

Studentski kongres zaštite zdravlja (SANITAS 2018)

Rijeka

11.2017.

A study of the photodynamic effect of the amphiphilic porphyrin on Legionella

Viduka I, Begić G, Gobin I, Malatesti N

Poster prezentacija

17th Zagreb International Medical Summit (ZIMS 2017)

Zagreb

Znanstveni projekti

2025. –

Izlazak citomegalovirusa iz stanice putem Rab15-pozitivnih membranskih odjeljaka

Suradnik

Hrvatska zaklada za znanost (projekt: IP-2024-05-4995)

2021. –

Sekundarno omatanje i izlazak beta-herpesvirusa iz stanice

Doktorand

Hrvatska zaklada za znanost (projekt: IP-2019-04-3582)

Stručna djelatnost

Stručna aktivnost

25.10.2022. - 27.10.2022.

Sudjelovanje na tečaju transmisijске elektronske mikroskopije

Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet