

STRESZCZENIE***Wybrane markery molekularne zakażeń wrodzonych wirusem cytomegalii: rola polimorfizmu genów kodujących kompleks gCIII wirusa i ekspresja receptorów RIG-I-podobnych***

Ludzki wirus cytomegalii (hCMV, ang. *human cytomegalovirus*) należy do rodziny *Herpesviridae* i jest główną przyczyną wrodzonych zakażeń wirusowych na świecie. Genom hCMV koduje około 65 unikalnych glikoprotein (g, ang. *glycoprotein*), w tym ponad 20 należących do osłonki wirusa. Główne glikoproteiny osłonki hCMV tworzą kompleksy: gCI (gB), gCII (gM/gN) i kompleks gCIII. Kompleks gCIII występuje w dwóch formach: trimeru gH/gL/gO wymaganego w procesie fuzji i pentameru gH/gL/pUL128-pUL131A umożliwiającego wnikanie wirusa do komórek nabłonka i śródbłonka. Kompleks gCIII bierze udział w procesie adsorpcji i wnikania hCMV do komórek gospodarza, uwalniania wirionów, transmisji międzykomórkowej i aktywacji swoistych przeciwciał. Częstość występowania zakażeń wrodzonych hCMV w krajach rozwiniętych wynosi 0,64% żywych urodzeń. W przypadkach 11,0% noworodków z zakażeniem wrodzonym hCMV objawy cytomegalii wykrywane są bezpośrednio po narodzinach i obejmują m.in. zaburzenia neurologiczne, uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego (m.in. małogłowie, zwapnienia śródczaszkowe i zmiany torbielowate w mózgu), ograniczenie wzrostu i niedosłuch czuciowo-nerwowy. Wrodzony układ odpornościowy stanowi pierwszą linię obrony gospodarza przeciwko inwazji patogenów, w której istotną rolę pełnią receptory rozpoznające wzorce (PRR, ang. *pattern recognition receptors*), w tym receptory RIG-I-podobne (RLR, ang. *RIG-I-like receptors*). RLR są rodziną cytoplazmatycznych DExD/H-box RNA helikaz zaangażowanych w rozpoznanie wirusowego kwasu nukleinowego i aktywację odpowiedzi przeciwwirusowej.

Głównym celem badań było określenie wybranych markerów molekularnych zakażeń wrodzonych hCMV, w tym oznaczenie częstości występowania i roli zmienności genetycznej wirusa w zakresie genów kodujących białka kompleksu gCIII u noworodków z zakażeniem wrodzonym hCMV i niemowląt z zakażeniem hCMV nabytym postnatalnie lub niepotwierdzonym zakażeniem wrodzonym, a także ocena ekspresji RLR w łożyskach ludzkich z III trymestru ciąży oraz ich udziału w procesie identyfikacji materiału genetycznego hCMV.

Badania genotypowania hCMV przeprowadzono we krwi pełnej i moczu 30 noworodków z zakażeniem wrodzonym hCMV i 100 niemowląt z zakażeniem hCMV nabytym postnatalnie lub niepotwierdzonym zakażeniem wrodzonym. Amplifikację genów kodujących białka kompleksu gCIII wirusa przeprowadzono metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. *polymerase chain reaction*), przy czym identyfikacja genotypów trimeru gH/gL/gO została wykonana metodą analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, ang. *restriction fragment*

length polymorphism), a genotypów *locus* UL128 - metodą sekwencjonowania produktów PCR. Do oznaczenia liczby kopii DNA hCMV i oceny relatywnej ekspresji genów *DDX58*, *IFIH1*, *DHX58* i *YWHAZ* wykorzystano metodę PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*). Łożyska ludzkie z III trymestru ciąży (38-42 tydzień ciąży) uzyskiwano bezpośrednio po porodzie drogą natury lub cesarskiego cięcia. Zakażenia doświadczalne hCMV, wirusem opryszczki typu 1 (HSV-1, ang. *herpes simplex virus type 1*) i wirusem pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej, szczep Indiana (VSIV, ang. *vesicular stomatitis Indiana virus*) *ex vivo* prowadzono na modelu hodowli narządowych doczesnej i kosmków płodowych. Ekspresję białek w lizatach tkankowych określono metodą immunoenzymatyczną ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) i Western blot. Poziom produkcji wybranych cytokin oszacowano metodą ELISA lub techniką cytometrycznych macierzy kulkowych (CBA, ang. *cytometric bead array*).

Wykazano, że wszystkie genotypy kompleksu gCIII wirusa wykryte u badanych niemowląt ulegały transmisji przezłożyskowej od matki do płodu. Określono częstość występowania genotypów hCMV w zakresie trimeru i pentameru gCIII u noworodków i niemowląt. Nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie genotypów badanych genów, z wyjątkiem wyższej częstości występowania genotypu gL3 w grupie noworodków z zakażeniem wrodzonym hCMV niż u niemowląt z zakażeniem hCMV nabytym postnatalnie lub niepotwierdzonym zakażeniem wrodzonym ($P = 0,008$). Zakażenia mieszane wykryto u 46,9% badanych niemowląt. Stwierdzono, że zakażenia objawowe u noworodków wywołują najczęściej szczepy wirusa o genotypach gL4 w zakresie gCIII oraz G3 *UL128* i G6 *UL130* w przypadku *locus* UL128 hCMV. W grupie niemowląt zakażenia objawowe były związane z występowaniem szczepów wirusa o genotypach gH1 i gL3, jak i genotypach G1 i G4 *UL131A*. Wykazano ponadto, że niektóre genotypy hCMV mogą być związane ze wzrostem ryzyka występowania objawów cytomegalii u niemowląt, np. genotyp G1 *UL131A* wirusa związany był z wyższym ryzykiem występowania nieprawidłowości w ośrodkowym układzie nerwowym.

W terminowym łożysku ludzkim wykazano ekspresję konstytutywną wszystkich genów i białek RLR. Zaobserwowano wzrost ekspresji RLR w warunkach zakażeń doświadczalnych wirusami, w tym wzrost ekspresji RIG-I w odpowiedzi na zakażenie hCMV, HSV-1 i VSIV oraz MDA5 w przypadku zakażeń VSIV. Wzrost ekspresji RIG-I w doczesnych i kosmkach płodowych wykazano zarówno w przypadku zakażenia wirusem VSIV, którego materiał genetyczny stanowi ssRNA, jak również hCMV i HSV-1 należącymi do wirusów DNA. Otrzymane wyniki pozwalają także przypuszczać, że LGP2 może regulować transmisję zakażeń wirusowych w łożysku.

Podsumowując, uzyskane wyniki wykazały, że zmienność genetyczna szczepów hCMV nie ma wpływu na transmisję zakażeń wewnątrzmacicznych. Polimorfizm genów kodujących białka kompleksu gCIII może jednak warunkować patogenność szczepów wirusa i zwiększać

ryzyko występowania niektórych objawów cytomegalii. Receptory RIG-I-podobne w łożysku pełnią prawdopodobnie istotną rolę w rozpoznawaniu zakażeń wirusowych i aktywacji szlaków sygnałowych, prowadzących do indukcji odpowiedzi przeciwwirusowej.