Uloga ljudskog citomegalovirusa u tumorigenezi

Vukić, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:744056

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

ULOGA LJUDSKOG CITOMEGALOVIRUSA U TUMORIGENEZI

THE ROLE OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS IN TUMORYGENESIS

Ana Vukić

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc.dr.sc. Petra Korać

Zagreb, 2017.

SADRŽAJ:

1. **UVOD** **1**
2. **PRINCIP DJELOVANJA ONKOMODULACIJE** **4**
3. **LJUDSKI CITOMEGALOVIRUS I KARCINOM DOJKE** **8**
4. **LJUDSKI CITOMEGALOVIRUS I RABDOMIOSARKOM** **10**
5. **POVEZANOST GLIOBLASTOMA I MEDULOBLASTOMA S LJUDSKIM CITOMEGALOVIRUSOM** **12**
6. **UTJECAJ LJUDSKOG CITOMEGALOVIRUSA NA POJAVU KOLOREKTALNOG KARCINOMA** **15**
7. **ZAKLJUČAK** **16**
8. **LITERATURA** **17**
9. **SAŽETAK** **30**
10. **SUMMARY** **30**

1. UVOD

Ljudski herpes virus 5, poznatiji pod imenom citomegalovirus, spada u potporodicu Betaherpesvirinae te ima najveći genom od svih herpes virusa. Ime je dobio zbog činjenice da se stanice zaražene njime znatno povećavaju (grč. *kytos* – stanica, *megale* – velik) zato što se u jezgri stvaraju velike virusne uklopine i takav se proces odvija i *in vivo* i *in vitro* [1].

„Umnožava se u jezgri samo ljudskih stanica (fibroblasti, makrofagi) u kojima se prepisuju neposredno rani, rani i kasni stadij. Virusna ovojnica nastaje tijekom sazrijevanja nukleokapside i njezina pupanja kroz jezgrenu ovojnicu.“ [1]

Procjenjuje se da je u razvijenim zemljama ovim virusom zaraženo 0,5 do 2,5% novorođenčadi i oko 50% odraslih [1].

Može uzrokovati bolesti s jasnim simptomima, ali i latentne infekcije kod kojih se virus čak i doživotno održava u pojedinim organima poput bubrega, stanica limforetikularnog sustava, žlijezda slinovnica i sl. [1].

Moguća je fizikalna i kemijska inaktivacija virusa dok nije u domaćinu. Virus se može inaktivirati zagrijavanjem na 56 ºC 30 minuta, otopinama niske pH vrijednosti, djelovanjem etera, ultraljubičastih zraka i opetovanim zamrzavanjem i odmrzavanjem [1].

Patogeneza infekcije slična je onoj drugih herpes virusa. Virus će se najprije širiti od stanice do stanice u prisutnosti humoralnih antitijela, zatim dolazi do latentne infekcije i reaktivacije infekcije u slučaju smanjenja djelovanja imunološkog sustava. Ono po čemu se razlikuje u odnosu na druge herpes viruse je činjenica da dovodi do kratkotrajne imunosupresije u domaćinu i stvara neprimjetnu infekciju za razliku od infekcije ostalim herpes virusima koja je prepoznatljiva po karakterističnim promjenama na koži ili sluznici pojedinih organa. Ostali herpes virusi inficiraju manji broj različitih tipova stanica, tj. više su lokalizirani. Najprije se širi preko leukocita. U latentnom stanju se može naći u mononuklearnim leukocitima te bubrežnim i srčanim stanicama. Reaktivacija se događa za vrijeme imunosupresije i alogenične stimulacije. Zbog umnožavanja virusa u bubrezima i sekrecijskim žlijezdama dolazi i do njegovog izlučivanja preko mokraće i tjelesnih sekreta. Sama infekcija je imunosupresivna, tj. uspostavlja se latentna infekcija i sprječava pojava imunopatogeneze i

znakova bolesti. Za vrijeme primarne infekcije broj supresorskih limfocita se povećava. Kasnije, tijekom akutne infekcije, dolazi do dodatnog slabljenja uloge limfocita [1].

Virus se može pronaći u uzorcima mokraće, brisa ždrijela, sline, krvi, majčina mlijeka, suza, sjemene tekućine, amnionske tekućine, sekreta rodnice, stolice, tkiva uzetog za transplantaciju. Prenosi se spolnim i oralnim putovima, transplacentarno, transfuzijom krvi i transplantacijom tkiva. Postoji nekoliko različitih načina infekcije [1].

Kongenitalnom infekcijom je do 5% novorođenčadi u SAD-u zaraženo virusom. Najčešće posljedice infekcije su mikrocefalija, intercerebralna kalcifikacija, hepatosplenomegalija, žutica, gubitak sluha i poremećaji u mentalnom razvoju. Majke te djece su tijekom trudnoće imale primarnu infekciju virusom. Plod se može zaraziti preko majčine krvi ili virusom koji se širi uzlazno iz vrata maternice. Kongenitalna infekcija se dokazuje utvrđivanjem virusa u uzorku mokraće tijekom prvog tjedna života novorođenčeta. Novorođenče se može zaraziti i tijekom rađanja tzv. perinatalnom infekcijom kod trudnica koje su bile zaražene citomegalovirusom prije trudnoće, a isti se izlučuje iz vrata maternice tijekom trećeg tromjesječja te dolazi do infekcije novorođenčeta prolaskom kroz zaraženi porođajni kanal. Također, moguća je i zaraza preko majčinog mlijeka. Kod prijevremeno rođene djece moguće je da dođe do pojave bolesti poput hepatitisa ili pneumonije, no kod zdrave, na vrijeme rođene novorođenčadi, nema simptoma bolesti. Kod odraslih, posebice pripadnika slabijeg ekonomskog statusa i stanovnika nerazvijenijih zemalja, moguća je postneonatalna infekcija virusom zbog oskudnih higijenskih uvjeta i slabijeg imunološkog sustava koji je posljedica loše prehrane i zdravstvenog sustava te se javljaju sindromi nalik na infektivnu mononukleozu s blažim faringitisom i limfadenopatijom. Osnovna razlika citomegalovirusa u odnosu na uzročnika mononukleoze Epstein-Barrova virusa jest činjenica da inducira samo tvorbu atipičnih limfocita, ne i tvorbu heterofilnih antitijela. Infekcija se relativno često javlja i kao posljedica transfuzije ili transplantacije. Primjetna infekcija u ovom slučaju uključuje pojavu sindroma infektivne mononukleoze, vrućice, splenomegalije, atipičnih limfocita, ali i hepatitisa i pneumonije. Kod imunokompromitiranih osoba infekcija virusom HHV5 se očituje retinitisom, kolitisom ili egzofagitisom. Kolitis je obično popraćen proljevom, vrućicom, gubitkom tjelesne težine pa i anoreksijom [1].

Histološki se infekcija prepoznaje pojavom karakterističnih citomegaličnih stanica s bazofilnim inkluzijskim tjelešcima u staničnoj jezgri. Inkluzijska tjelešca se otkrivaju postupkom bojenja po Papanicolaou ili hematoksilinom i eozinom. Za dijagnostiku se mogu

koristiti obilježena specifična antitijela, uglavnom monoklonska, i DNA-probe za detekciju HHV5-antigena. Vrlo je bitna i izolacija virusa u staničnoj kulturi. U inokuliranim staničnim kulturama se pretražuju neposredni rani i rani virusni antigeni imunofluorescentnim i imunoenzimskim postupcima. Prilikom dijagnosticiranja infekcije rabe se i serološke metode. Naime, tijekom reaktivacije infekcije u serumima se mogu naći specifična antitijela IgM i IgG, no rezultati ovakvih testova se tumače samo uz poznate kliničke podatke o bolesniku [1].

Kao najčešći lijekovi u suzbijanju infekcije se koriste Ganciclovir i Foscarnet koji inhibira DNA polimerazu. Prevencije u širenju virusa su usmjerene na spolno prenošenje uporabom prezervativa i provjerom donora prilikom transplantacije i transfuzije. Vrlo je teško spriječiti kongenitalne i perinatalne infekcije. Postoje i živa i atenuirana cjepiva, ali trajanje imunosti kao i zaštita od budućih infekcija i onkogeneze nisu poznata. Primarni cilj je zaštititi djecu i seronegativne žene u dobi rađanja, slično cijepljenju protiv rubeole [1].

Citomegalovirus se javlja kod oboljelih od karcinoma dojke, debelog crijeva, prostate, glioblastoma, neuroblastoma, rabdomiosarkoma te tumora žlijezda slinovnica. U preko 90% ovih tumora pronađeni su proteini i/ili nukleinske kiseline virusa [2,3].

Ljudski citomegalovirus nije onkogeni virus, ali sudjeluje u procesu onkomodulacije, tj. inficira tumorske stanice i povećava njihovu malignost. Virus svoje onkomodulacijsko djelovanje ne može potaknuti u normalnim, zdravim stanicama, ali u tumorskim stanicama, u kojima su narušeni signalni putovi, transkripcijski faktori te tumor-supresorski proteini, može. Onkomodulacija može biti posljedica djelovanja regulacijskih proteina ili nekodirajuće RNA virusa koji će dovesti do proliferacije, preživljavanja tumorskih stanica ili proizvodnje angiogenetskih faktora [4-8].

2. PRINCIP DJELOVANJA ONKOMODULACIJE

2.1. Molekularni mehanizam onkomodulacije potaknute citomegalovirusom

Regulacijski proteini virusa HHV5 moraju spriječiti replikaciju domaćinove DNA i omogućiti replikaciju virusne DNA [9,10]. U stanicama inficiranim citomegalovirusom uočena je ekspresija mnogih gena i obilježja S-faze staničnog ciklusa poput ciklina E i kinazne aktivnosti ciklina A, hiperfosforilacije proteina retinoblastoma (pRB), ali i izostanak ekspresije ciklina D1.

Virusni proteini IE1-72, IE2-86, pp71 inaktiviraju proteine pRb, p107 i p130 i na taj način potiču prelazak iz G1 u S-fazu. Također, protein IE2-86 pomoću ATM kinaze aktivira p53 i dovodi do njegovog nakupljanja te zaustavljanja staničnog ciklusa. Važno je naglasiti da IE1-72 ne može inducirati prelazak u S-fazu u stanicama koje imaju divlji tip gena *TP53*, kao što i IE2-86 dovodi do zastoja u prijelazu G1 u S-fazu samo u stanicama s divljim tipom pRb-a. Utjecaj koji će virus imati na stanicu uvelike ovisi o uvjetima u njoj, ali ovisi i o samom virusu. Primijećeno je da virusi u tumorskim stanicama mogu mutirati u kodirajućim sekvencijama za regulacijske proteine koji dovode do zaustavljanja staničnog ciklusa [11-14].

2.2. Uloga u apoptozi

Karcinomske stanice su otporne na apoptozu. Dokazano je da virus HHV5 pomoću proteina IE1-72 i IE2-86 inhibira apoptozu u fibroblastima inficiranim adenovirusom E1A i staničnoj liniji HeLa, također stanicama inficiranim adenovirusom te induciranima tumor-nekroznim faktorom α [15]. Antiapoptotsko djelovanje pomoću proteina IE se ostvaruje i mehanizmom ovisnim i neovisnim o p53. U nekim stanicama, poput onih glatkih mišićnih, IE-86 veže se za p53 i sprječava njegovu transaktivirajuću ulogu u apoptozi [16-20].

Produkt virusnog gena *UL36* stupa u interakciju s prodomenom kaspaze-8 i na taj način inhibira apoptozu, dok je produkt virusnog gena *UL37* odgovoran za mitohondrijsku inhibiciju apoptoze neutraliziranjem proapoptiskih članova porodice BCL-2, BAX i BAK [21-24]. Protein kodiran genom *UL38* sprječava apoptozu stanica uzrokovanu infekcijom adenovirusom ili tapsigarginom te je pokazano da pUL38 stupa u interakciju s tumor-supresorskim proteinima tuberozne skleroze/Bournevilleove bolesti (lat. *sclerosis tuberosa*)

[25,26]. Nekodirajuća virusna RNA sprječava apoptozu stabilizirajući kompleks respiratornog lanca u mitohondrijima stanica glioblastoma [27].

Za sprječavanje apoptoze važna je proteinska kinaza B. Nju aktivira vezanje virusa za receptore, integrine, te se preko fosfatidilinozitol 3-kinaznog signalnog puta sprječava apoptoza. U stanicama glioblastoma pokazano je i da se samo ekspresijom proteina IE1-72 postiže aktivacija proteinske kinaze B. Virusni regulacijski proteini i glikoproteini koji se vežu za receptore faktora rasta nastalim iz trombocita (PDGFR) dovode do aktiviranja različitih signalnih putova koji uključuju proteinske kinaze aktivirane mitogenom (MAPK), proteinsku kinazu aktiviranu mitogenom koja aktivira kinazu MAPK (MEK) i c-Jun NH2-terminalne kinaze (JNK) [4,11,28,29]. Kod stanica neuroblastoma je uočena ekspresija antiapoptotskog proteina BCL-2 i akumulacija izoforme ΔNp73α koja ima negativan utjecaj na apoptozu ovisnu o p73α i p53 [7,30-32].

2.3. Utjecaj na invaziju i migraciju stanica malignih tumora te adheziju na endotel

Stanice neuroblastoma inficirane virusom pokazuju povećanu adheziju za endotel koja je postignuta aktivacijom integrina $\beta_1\alpha_5$ na površini tumorskih stanica što dovodi do fokalnog prekida cjelokupnosti endotelnih stanica koji olakšava transmigraciju samih tumorskih stanica. Ljudski citomegalovirus inhibira ekspresiju molekula potrebnih za adheziju živčanih stanica (NCAM) preko p73. U inficiranim stanicama se suprimira ekspresija p73 koji je odgovoran za transaktivaciju NCAM [32]. U stanicama karcinoma prostate adhezija se postiže ekspresijom β1 integrina, fosforilacijom kinaze fokalne adhezije (FAK) i povećanom ekspresijom kinaza vezanih uz integrine. Kod glioblastoma se adhezija također postiže fosforilacijom FAK na Tyr397. Migracija stanica arterijskih glatkih mišića se postiže pomoću virusnog proteina US28 signalizacijom preko nereceptorskih tirozinskih kinaza Src i fosforilacije FAK [11,33-36].

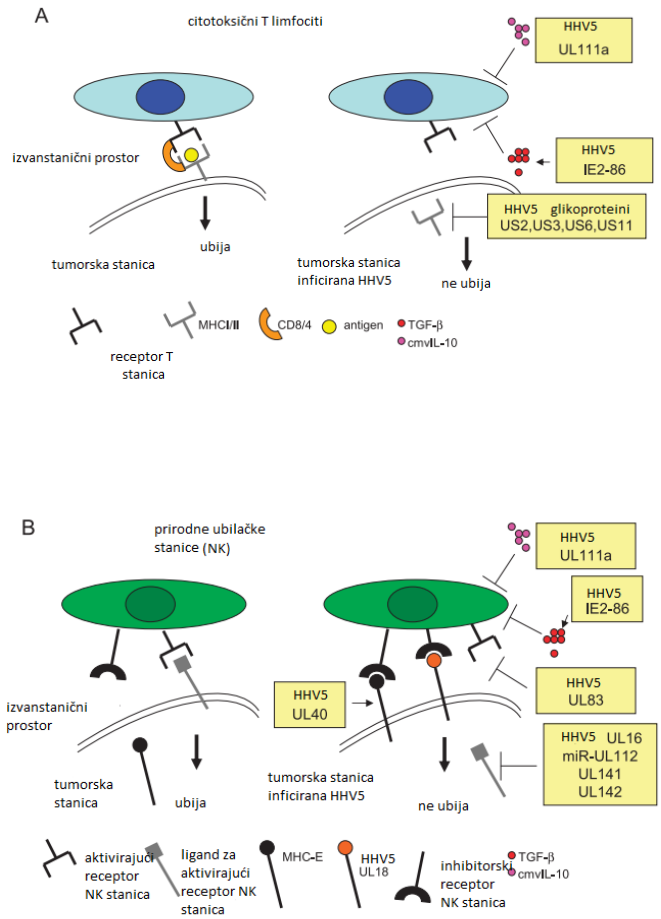
2.4. Utjecaj na angiogenezu

Tumorske stanice stvaraju vlastitu mrežu krvnih žila pomoću kojih se hrane, rastu i šire organizmom, a sam taj proces naziva se angiogeneza. Ljudski citomegalovirus utječe i na angiogenezu tumora i to na nekoliko načina. Uočeno je da kemokinski receptor US28 kodiran virusom potiče stvaranje proangiogenskog fenotipa fibroblasta miša [37]. Kod mutanata u genu *US28* primijećeno je zakašnjelo stvaranje tumora. Također, dokazano je da US28 dovodi

do angiogeneze u stanicama glioblastoma tako što inducira stvaranje vaskularnih endotelnih faktora. Zabilježeno je i da ljudski citomegalovirus potiče ekspresiju interleukina-8, promotora angiogeneze tumora, tako što njegov protein IE1-72 transaktivira IL-8 promotor preko transkripcijskih faktora NF-κB i AP-1. Kod glioblastoma je utvrđeno da citomegalovirus sprječava ekspresiju inhibitora angiogeneze trombospondina 1 i 2. Infekcija endotelnih stanica dovodi do proangiogeneze tako što se virus veže i prenosi signale preko integrina β1, β3 i receptora epidermalnih faktora rasta [38-42].

2.5. Utjecaj na imunogeničnost karcinomskih stanica

Tumorske stanice moraju biti u stanju izbjeći djelovanje imunološkog sustava organizma u kojem tumor nastaje. Proteini US2, US3, US6 i US11 ljudskog citomegalovirusa smanjuju ekspresiju proteina klase I i klase II glavnog kompleksa histokompatibilnosti. Virusna mikroRNA (miR-UL112) sprječava ekspresiju lanca B povezanog s klasom 1 glavnog kompleksa histokompatibilnosti. I lanac B povezan s klasom I glavnog kompleksa histokompatibilnosti i UL16 protein virusa djeluju kao stanični ligandi koji aktiviraju receptor NKG2D u prirodnim ubilačkim stanicama, ɤ/δ T stanicama, CD8+ (citotoksičnim T limfocitima) stanicama. Drugi virusni proteini poput UL18 i UL40 inhibiraju odgovor ubilačkih stanica preko receptora CD94/NKG2A [43-48]. Imunološki odgovor stanice se izbjegava i proizvodnjom imunosupresivnih citokina. Primjerice virusni IL-10 (cmvIL-10) ima slična imunosupresivna svojstva kao i onaj kojeg stvaraju ljudske stanice. Javlja se tijekom latentne infekcije tako što dolazi do alternativnog prekrajanja regije UL111a transkripta. Uočeno je i da ljudski citomegalovirus potiče stvaranje staničnog imunosupresivnog transformirajućeg faktora rasta β1 (TGF-β1) u stanicama glioblastoma, osteosarkoma i akutne limfoblastične leukemije. Sam TGF-β1 stimulira replikaciju virusa u stanicama kulture (Slika 1). Primijećena je i regulacija transkripcije TGF-β1 preko interakcije virusnog IE2-86 proteina s proteinom koji se veže na DNA Egr-1. Aktivacija TGF-β1 se postiže i djelovanjem integrina $\alpha_v\beta_6$, dok se ekspresija samog integrina u endotelnim stanicama inducira virusom. Na taj način se postiže replikacija virusne DNA i utječe na odgovor imunološkog sustava na pojavu tumorskih stanica [49-56].



Slika 1. (A) Utjecaj genskih produkata virusa HHV5 na lizu tumorskih stanica preko T-stanica. (B) Utjecaj genskih produkata i mikroRNA virusa HHV5 na lizu tumorskih stanica preko prirodnih ubilačkih stanica [11].

2.6. Utjecaj virusa na stabilnost kromosoma

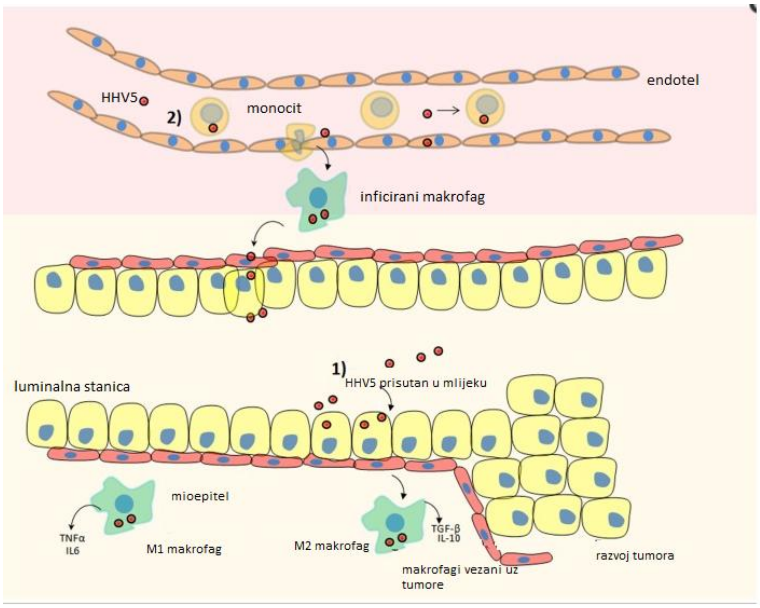
Još od 1972. se zna da infekcija citomegalovirusom dovodi do loma kromosoma te u kombinaciji s citotoksičnim tvarima uzrokuje povećanje genotoksičnog učinka. Lomovi se najčešće događaju u regijama q42 i q21 kromosoma 1. Mjesto cijepanja uključuje lokus *ADPRT* važan za replikaciju i popravak DNA. Smatra se da se gen za supresiju tumora karcinoma dojke nalazi na mjestu 1q21-31 [57-63].

3. LJUDSKI CITOMEGALOVIRUS I KARCINOM DOJKE

Vodeći uzrok smrti kod žena oboljelih od malignih tumora predstavlja karcinom dojke koji nastaje u stanicama koje okružuju kanale za produkciju mlijeka u mliječnim žlijezdama. Riječ je o heterogenoj bolesti. Klasificiraju se u 5 intrinzičnih podtipova: bazalni tip, normalni tip, luminalni karcinom tipa A i B te tip ERBB2+. Karcinomi dojke luminalnog tipa A imaju visoku ekspresiju estrogenskih i progesteronskih receptora, dok su oni luminalnog tipa B pozitivni na ekspresiju estrogenskih receptora, ali imaju visoki histološki gradus i visoki stupanj proliferacije [64-66].

Dugo se pokušavalo pronaći poveznicu između različitih virusa i karcinoma dojke. U uzorcima oboljelih su dosad pronađeni Epstein-Barrov virus, ljudski endogeni adenovirus, ljudski papiloma virus, JC i BK poliomavirusi te ljudski citomegalovirus [67-71]. Primijećena je pozitivna korelacija virusa HHV5, razine antitijela IgG i razvoja karcinoma jer je kod osoba oboljelih od karcinoma dojke evidentirana povećana koncentracija HHV5 IgG [72]. Najveći izvor transmisije virusa kod rodilja je mlijeko [73,74]. Antigeni virusa su pronađeni u epitelu zdravog tkiva dojke kao i karcinomskog. Više studija je pokazalo prisustvo nukleinskih kiselina i proteina virusa HHV5 u tkivu oboljelih, ali su postojala i istraživanja kod kojih nije dokazana povezanost virusa i razvoja karcinoma dojke [75,76].

Monociti i makrofagi su važna spremišta virusa HHV5 u organizmu. Infekcija monocita (M1) virusom može dovesti do njihove polarizacije u upalne makrofage (M2) koji pokazuju osobine imunosupresivnih makrofaga (M3) (Slika 2). Makrofagi M1 luče upalne faktore poput TNFalpha, IL-6, i sintaze 2 dušikova oksida te se sekrecija ovih citokina povezuje s nastankom malignog tumora.



Sika 2. Polarizacija makrofaga djelovanjem HHV5 [77].

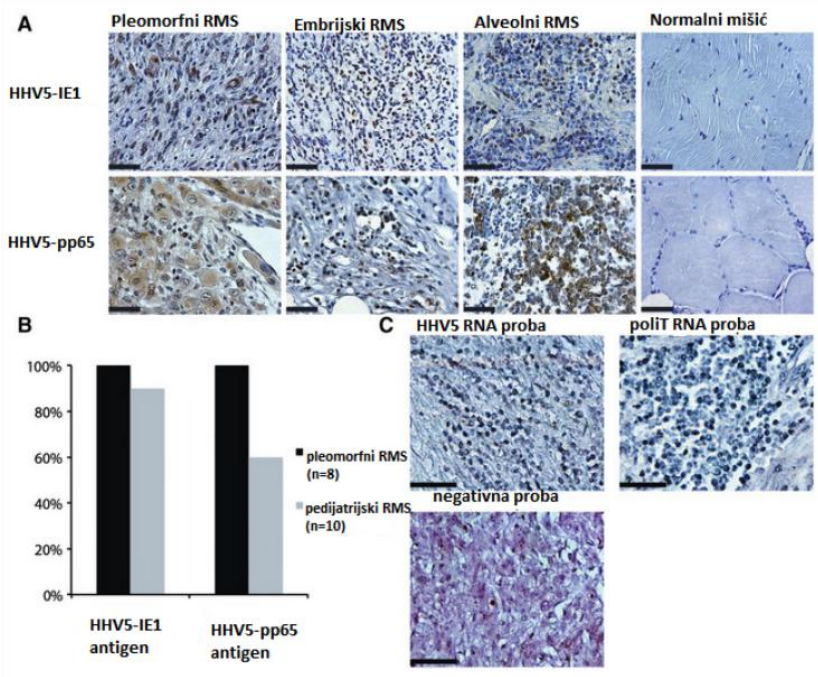
Najveći dio makrofaga vezanih uz tumore čine polarizirani makrofagi M2 koji luče velike količine imunosupresivnih citokina poput IL-10 i TGFβ te vrlo malo proupalnih citokina [78-83].

Postoji nekoliko zajedničkih signalnih putova u djelovanju virusa HHV5 i razvoja karcinoma dojke koji uključuju aktivnost kaskadnih reakcija STAT3, PI3K, NF-κB, MAPK. Jedan od lijekova koji djeluje na ove kaskadne reakcije i koristi se u liječenju karcinoma dojke je Sorafenib. Za Sorafenib se zna i da sprječava replikaciju HHV5 *in vitro* tako što inhibira djelovanje nekoliko tirozinskih proteinskih kinaza kao što su VGFR, PDGFR i slično [84-87].

4. LJUDSKI CITOMEGALOVIRUS I RABDOMIOSARKOM

Rabdomiosarkom je maligni tumor koji se razvija iz embrijskih mezenhimskih stanica s potencijalom da se diferenciraju u poprečno prugaste mišiće. Najčešće se razvija kod djece. Javlja se u tri podtipa: pleomorfni, embrijski (botrioidini) i alveolni. Pleomorfni je jedini podtip koji se češće javlja kod odraslih. Kod oboljelih od ovog podtipa javljaju se velike stanice s velikom jezgrom i nepravilne vakuole u citoplazmi. Učestale su mitoze. Histološki se prepoznaje po poprečnim prugama u citoplazmi stanice. Embrijski podtip se najčešće razvija kod djece do pet godina starosti i to u uretri, rodnici, mokraćnom mjehuru i žučnim vodovima. Nalik je na grozdastu masu, a na histološkom prerezu je bijelosive boje, mekan i drobljiv. Alveolni podtip se može razviti kod djece i mlađih osoba i to najčešće na nadlaktici i podlaktici. Izgleda kao mekan, sivobijeli tumor koji na histološkom prerezu može biti cističan i nekrotičan [88].

U jednom istraživanju utvrđena je prisutnost proteina IE1 ljudskog citomegalovirusa u svim uzorcima pleomorfnog rabdomiosarkoma te u 90% pedijatrijskih rabdomiosarkoma (embrijskih i alveolnih).



Slika 3. (A) Imunohistokemijsko određivanje prisutnosti IE1 i pp65 virusa HHV5 [89].

(B) Prisutnost antigena IE1 i pp65 u pleomorfnim i pedijatrijskim rabdomiosarkomima (C) hibridizacija *in situ* za dokazivanje prisutnosti virusa HHV5 u pleomorfnim rabdomiosarkomima. Poli T RNA, komercijalno dostupna RNA-proba koja prepoznaje rane nespecifične gene virusa HHV5, korištena kao pozitivna kontrola [89].

Lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu dokazana je i ekspresija gena za proteine UL83 i UL146. U svim uzorcima, i pleomorfnim i pedijatrijskim, utvrđena je prisutnost virusne RNA . Zdravo tkivo nije bilo pozitivno ni za proteine ni RNA virusa. Također, u svim pleomorfnim te većini pedijatrijskih rabdomiosarkoma pronađen je protein pp65 koji se javlja tijekom aktivne virusne transkripcije. Pretpostavlja se da citomegalovirus može potaknuti tumorigenezu u organizmima s genetskim aberacijama poput heterozigotnih *Trp53*$^{+/-}$ miševa korištenih u ovom istraživanju (Slika 3) [89].

Dosad su u primijećene česte mutacije *TRP53* kod oboljelih od rabdomiosarkoma. Također, zna se da citomegalovirus utječe na mnoge signalne putove dovodeći do pojave rabdomiosarkoma djelujući na faktore rasta nastale iz trombocita (PDGFR), faktore rasta fibroblasta (FGF), faktore rasta koji nalikuju inzulinu (IGF), ali, virus HHV5 stupa i u interakcije s p53 tako što UL44 inhibira transkripciju p53 [11,90].

U istraživanjima provedenim na miševima heterozigotnim za *Trp53*$^{+/-}$zaraženim s MCMV-om (mišjim citomegalovirusom, eng. *murine cytomegalovirus*) je pokazano da MCMV ubrzava proces stvaranja tumora kao što su limfomi, osteosarkomi, fibrosarkomi, ali i pleomorfni podtip rabdomiosarkoma [89].

5. POVEZANOST GLIOBLASTOMA I MEDULOBLASTOMA S LJUDSKIM CITOMEGALOVIRUSOM

Najčešći maligni tumori koji se javljaju na mozgu su glioblastomi kod odraslih te meduloblastomi kod djece.

Prosječna dob oboljelih od glioblastoma je 64 godine [91,92]. Prema malignosti se svrstavaju u četiri stupnja ili gradusa. Prvi stupanj je benigan, stanice sporo rastu i može se liječiti kiruškim uklanjanjem. Drugi stupanj tzv. difuzni astrocitom češće zahvaća mlade odrasle osobe i može napredovati prema višem stupnju. Čak 82% oboljelih spada u treći, anaplastični astrocitom, ili četvrti, *glioblastoma multiforme*, graduse koji se smatraju najzloćudnijim i pokazuje najmanju stopu preživljavanja [92]. Samo 25-30% pacijenata doživi dvije godine nakon liječenja koje uključuje prilično agresivne metode poput kiruškog odstranjivanja i adjuvantne kemoterapije [93,94].

Dijele se na četiri podtipa. Proneuralni podtip pokazuje najveći stupanj mutacija u tumor-supresorskim genima *IDH1* i *PDGFRA*. Prekomjerna ekspresija *PGDFRA* dovodi do pojačanog rasta i ovaj podtip se najčešće javlja kod mlađih pacijenata. Klasični podtip pokazuje povećanu koncentraciju EGFR, receptorskog proteina za epidermalne faktore rasta koji, kad se faktori rasta vežu, šalje signale stanici da nastavi rasti. Mezenhimski podtip uključuje mutacije u tumor-supresorskom genu *NF1*. Četvrti, neuralni, podtip pokazuje mutacije u prethodno navedenim genima, ali i u nekim neuralnim markerima poput *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* i *SLC12A5* [95].

Meduloblastomi su tumori koji zahvaćaju moždano deblo. Liječenje obuhvaća operacije, kemoterapiju, radijaciju mozga i leđne moždine i transplantaciju matičnih stanica. Veća je stopa preživljavanja u odnosu na glioblastome, ali se često kasnije javljaju problemi u razvoju te neurološki, neuroendokrini i psihosocijalni problemi [96,97].

Kod meduloblastoma je zabilježeno manje mutacija u odnosu na glioblastome. Karakteristične promjene uključuju promjene u signalnim putovima Shh i Wnt, prekomjernu ekspresiju transkripcijskih faktora MYC i MYCN i aktivaciju protoonkogena GFI1 i GFI1B [96,98-100]. Neki meduloblastomi ne pokazuju navedene pojave pa se smatra da je uzrok njihovog nastanka epigenetička promjena. Meduloblastomi se također mogu podijeliti u četiri

podtipa s različitim mjestom nastanka: Wnt (wingless), Shh (Sonic Hedgehog), 3. grupu („klasični“) i 4. grupu (eng. *prototypical medulloblastoma*) [101-103].

I glioblastomi i meduloblastomi pokazuju visoku prisutnost ciklooksigenaze-2 (COX-2). COX-2 je odgovorna za pretvorbu arahidonske kiseline u prostaglandine i eikozanoide i sekreciju prostaglandina E2 koji potiče upalne procese. Štoviše, što je kod glioblastoma bila veća ekspresija COX-2, došlo je i do veće proliferacije te se pretpostavlja da upalni procesi igraju značajnu ulogu u progresiji tumora [104-106].

Uz sve navedene promjene, većina meduloblastoma i glioblastoma je i inficirana citomegalovirusom. Citomegalovirus mora izbjeći odgovore imunološkog sustava domaćina te je stoga samo 45 od 180 njegovih proteina zaduženo za virusnu replikaciju, dok ostali obavljaju druge funkcije [107-112]. Neka novija istraživanja pokazuju da citomegalovirus translatira i veći broj proteina [113,114]. Infekcija citomegalovirusom potiče ekspresiju ciklooksigenaze-2 i 5-lipoksigenaze koje će dovesti do sekrecije prostaglandina E2. Prostaglandin E2 djeluje kao inhibitor apoptoze, potiče staničnu proliferaciju, angiogenezu te stvara upalni mikrookoliš koji pogoduje razvoju tumora [106,115-117].

Citomegalovirus inducira i transformirajući faktor rasta TGFβ koji dovodi do tranzicije epitelnih u mezenhimske stanice stvaranjem prekida kontakta među stanicama i remodeliranjem citoskeleta. U stanicama epitela uzgojenim *in vitro* zaraženim citomegalovirusom pokazano je da virus aktivira TGFβ preko metaloproteinaze-2 (MMP-2). Pretpostavlja se da se indukcija metaloproteinaze-2 vrši preko virusnih proteina CMV IE72 ili IE86 te da sama MMP-2 dovodi do degradacije izvanstaničnog matriksa što u konačnosti može dovesti do pojave metastaza. Također, smatra se da protein CMV-a US28 ulazi u interakcije s kinazom GSK3β koja fosforilira i kontrolira onkogene transkripcijske faktore [118-120].

Dokazano je za transformirajuću regiju II (mtrII) da može promijeniti fibroblaste glodavaca. Riječ je o fragmentu DNA virusa HHV5 velikom 980-bp čiji se protein veže za p53 i inhibira transkripciju gena aktiviranu pomoću p53 [121-125]. Brojna istraživanja su pokazala prisutnost virusne DNA i virusnih proteina u meduloblastomima i glioblastomima. U staničnoj kulturi meduloblastoma je utvrđena ekspresija markera “matičnih” stanica meduloblastoma CD133 i CD15. Riječ je o “nezrelim” stanicama koje slabije proliferiraju, ali su i otpornije na terapije u odnosu na diferencirane karcinomske stanice. Mogu se još pronaći

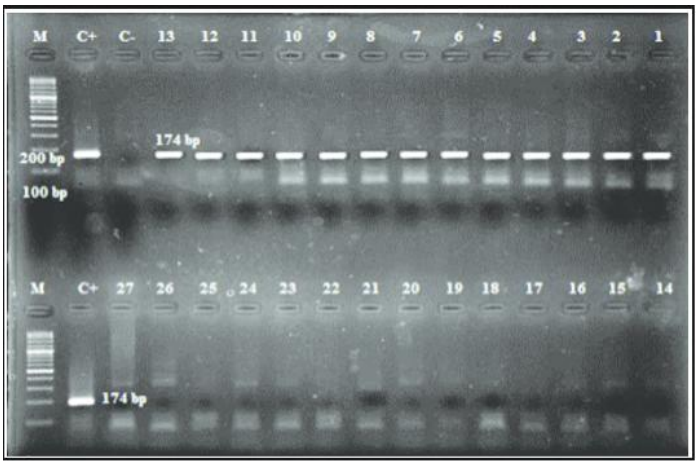
pod nazivom stanice koje iniciraju tumore. Kad se takve stanice zaraze virusom HHV5, mogu se odvojiti i pronaći u cirkulaciji i u krvožilnom i limfnom sustavu [3,126-128].

Virus HHV5 najvjerojatnije potiče ekspresiju COX-2 u meduloblastomima. Inhibitori COX-1 i COX-2 se, u kombinaciji s anti-CMV lijekovima poput Ganciclovira i Valganciclovira, koriste za sprječavanje replikacije virusa. Mnoga istraživanja potvrđuju njihovo sinergistično djelovanje [3,116,129,130]. Nekoliko istraživanja dosad je pokazalo da Aspirin, neselektivni COX inhibitor, znažajno sprječava razvoj karcinoma i metastaza. Aspirin trajno inhibira i COX-1 i COX-2 acetilirajući hidroksilnu skupinu Ser516 u aktivnom mjestu ciklooksigenaze. Ciklooksigenaze umjesto prostaglandina proizvode lipoksine koji ne dovode do upalnih procesa i na taj način se sprječava nastanak i širenje tumora [131-135]. Cidofovir, anti-CMV lijek, se također pokazao uspješnim u sprječavanju rasta tumora glioblastoma. On selektivno inhibira DNA polimerazu virusa. Inhibira i ljudsku, ali u puno manjoj mjeri. Ugrađuje se u virusnu DNA i tako sprječava njezinu sintezu tijekom umnožavanja virusa [136]. Uočena je i mogućnost imunoterapije pomoću T stanica specifičnih na HHV5. Dokazano je da takve stanice mogu uništavati autologne stanice glioblastoma u uvjetima *in vitro*, ali ta metoda se još uvijek istražuje [137,138].

6. UTJECAJ LJUDSKOG CITOMEGALOVIRUSA NA POJAVU KOLOREKTALNOG KARCINOMA

Kolorektalni karcinom je treći najčešći uzročnik smrti kod ljudi oboljelih od malignih bolesti. Na pojavu karcinoma utječu brojni čimbenici kao što su ishrana, način života, okoliš, genske promjene, ali i infekcije patogenima poput bakterije *Haemophilus influenze* ili infekcija različitim virusima. Neki od virusa čija je prisutnost dosad uočena u tkivima kolorektalnog karcinoma su Epstein-Barrov virus, ljudski papiloma virus, herpes virus i ljudski citomegalovirus. Terapija je ili kiruška ili adjuvantna. Histološki je riječ o adenokarcinomu, a u debelom crijevu razlikujemo dva oblika: polipoidni i anularni [139-141].

Pretpostavlja se da se u karcinomskim stanicama reaktivacija virusa iz latentne faze odvija zbog utjecaja polimorfizama gena za citokine. Za razliku od istraživanja na tkivima drugih karcinoma, u adenokarcinomima je prisutnost virusne DNA i proteina znatno varirala, tj. u nekim tkivima adenokarcinoma je utvrđena prisutnost virusa (Slika 4), dok u drugim nije uočena prisutnost ni virusne DNA ni proteina. Razlog tome može biti da su virusni proteini bili mutiranog fenotipa pa se na njih nisu mogla vezati specifična antitijela ili su se tkiva držala u formalinu tijekom pripreme uzorka predugo što je dovelo do razgradnje njihove DNA pa prepoznavanje virusne DNA nije bilo uspješno u usporedbi sa svježim tkivima, a moguće je i da se virus nije detektirao PCR-om jer tkivo nije bilo inficirano virusom [139].



Slika 4. Detekcija virusa HHV5 u tkivu kolorektalnog tumora (1-13); c- negativna kontrola, c+ pozitivna kontrola; M: marker 100 pb; Detekcija virusa HHV5 u netumorskom tkivu (14-27) [139].

Iako su rezultati istraživanja povezanosti virusa HHV5 i kolorektalnog karcinoma bili oprečni, ranije navedeni primjeri utjecaja virusa HHV5 na pojavu drugih tumora upućuju na važnost nastavka istraživanja u smjeru dokazivanja ili opovrgavanja korelacije virusa i kolorektalnog karcinoma.

7. ZAKLJUČAK

Proteini i DNA ljudskog citomegalovirusa pronađeni su u tkivima brojnih malignih tumora te se pretpostavlja da imaju značajnu ulogu u njihovom razvoju i širenju. Neki od mehanizama kojima CMV utječe na transformaciju stanica već su otkriveni i opisani u dosadašnjim istraživanjima, ali je još puno toga vezanog uz njegovu funkciju i princip djelovanja ostalo neistraženo i nepoznato te je važno nastaviti proučavati njegovu ulogu u tumorigenezi. Potrebno je i razvijati terapeutike koji će utjecati na replikaciju virusa jer bi se na taj način vjerojatno moglo utjecati i na napredovanje karcinoma, posebice proučavati sinergistične učinke vise različitih antivirusnih lijekova.

8. LITERATURA

1) Presečki V, Mlinarić-Galinović G, Punda-Polić V, Lukić A, 2002. Virologija. Medicinska naklada, Zagreb
2) Soderberg-Naucler C, Johnsen J, 2015. Cytomegalovirus in human brain tumors: Role in pathogenesis and potential treatment options. *World Journal of Experimental Medicine*, **5** (1), 1-10, doi: 10.5493/wjem.v5.i1.1
3) Baryawno N, Rahbar A, Wolmer-Solberg N, Taher C, Odeberg J, Darabi A, Khan Z, Sveinbjörnsson B, FuskevÅg OM, Segerström L, 2011. Detection of human cytomegalovirus in medulloblastomas reveals a potential therapeutic target. *J Clin Invest* **121**, 4043-4055.
4) Cinatl J, Scholz M, Kotchetkov R, Vogel JU, Doerr HW, 2004. Molecular mechanisms of the modulatory effects of HCMV infection in tumor cell biology. *Trends Mol Med* **10**, 19–23.
5) Cinatl J Jr, Cinatl J, Vogel JU, Rabenau H, Kornhuber B, Doerr HW, 1996. Modulatory effects of human cytomegalovirus infection on malignant properties of cancer cells. *Intervirology* **39**, 259–269.
6) Cinatl J Jr, Vogel JU, Cinatl J, Weber B, Rabenau H, Novak M, Kornhuber B, Doerr HW, 1996. Long-term productive human cytomegalovirus infection of a human neuroblastoma cell line. *Int J Cancer* **65**, 90–96.
7) Cinatl J Jr, Cinatl J, Vogel JU, Kotchetkov R, Driever PH, Kabickova H, Kornhuber B, Schwabe D, Doerr HW, 1998. Persistent human cytomegalovirus infection induces drug resistance and alteration of programmed cell death in human neuroblastoma cells. *Cancer Res* **58**, 367–372.
8) Cinatl J Jr, Vogel JU, Kotchetkov R, Doerr HW, 2004. Oncomodulatory signals by regulatory proteins encoded by human cytomegalovirus: a novel role for viral infection in tumor progression. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 59–77.
9) Castillo JP, Kowalik TF, 2004. HCMV infection: modulating the cell cycle and cell death. *Int Rev Immunol* **23**, 113–139.
10) Sanchez V and Spector DH, 2008. Subversion of cell cycle regulatory pathways. *Curr Top Microbiol Immunol* **325**, 243–262.
11) Michaelis M, Doerr H W, Cinatl Jr. J, 2009. The story of human cytomegalovirus and cancer: Increasing evidence and open questions. *Neoplasia* **11**, 1-9

12) Hume AJ, Finkel JS, Kamil JP, Coen DM, Culbertson MR, Kalejta RF, 2008. Phosphorylation of retinoblastoma protein by viral protein with cyclin dependent kinase function. *Science* **320**, 797–799.

13) Song YJ, Stinski MF, 2005. Inhibition of cell division by the human cytomegalovirus IE86 protein: role of the p53 pathway or cyclin-dependent kinase 1/cyclin B1. *J Virol* **79**, 2597–2603.

14) Hayashi ML, Blankenship C, Shenk T, 2000. Human cytomegalovirus UL69 protein is required for efficient accumulation of infected cells in the G1 phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2692–2696.

15) Zhu H, Shen Y, Shenk T, 1995. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol* **69**, 7960–7970.

16) Hsu CH, Chang MD, Tai KY, Yang YT, Wang PS, Chen CJ, Wang YH, Lee SC, Wu CW, Juan LJ, 2004. HCMV IE2-mediated inhibition of HAT activity downregulates p53 function. *EMBO J* **23**, 2269–2280.

17) Speir E, Modali R, Huang ES, Leon MB, Shawl F, Finkel T, Epstein SE, 1994. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* **265**, 391–394.

18) Tsai HL, Kou GH, Chen SC, Wu CW, Lin YS, 1996. Human cytomegalovirus immediate-early protein IE2 tethers a transcriptional repression domain top53. *J Biol Chem* **271**, 3534–3540.

19) Tanaka K, Zou JP, Takeda K, Ferrans VJ, Sandford GR, Johnson TM, Finkel T, Epstein SE, 1999. Effects of human cytomegalovirus immediate-earlyproteins on p53-mediated apoptosis in coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* **99**, 1656–1659.

20) Lukac DM, Alwine JC, 1999. Effects of human cytomegalovirus majorimmediate-early proteins in controlling the cell cycle and inhibiting apoptosis: studies with ts13 cells. *J Virol* **73**, 2825–2831.

21) Skaletskaya A, Bartle LM, Chittenden T, McCormick AL, Mocarski ES, Goldmacher VS, 2001. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 7829–7834.

22) McCormick AL, Skaletskaya A, Barry PA, Mocarski ES, Goldmacher VS, 2003. Differential function and expression of the viral inhibitor of caspase 8–induced apoptosis (vICA) and the viral mitochondria–localized inhibitor of apoptosis (vMIA) cell death suppressors conserved in primate and rodent cytomegaloviruses. *Virology* **316**, 221–233.

23) Goldmacher VS, Bartle LM, Skaletskaya A, Dionne CA, Kedersha NL, VaterCA, Han JW, Lutz RJ, Watanabe S, Cahir McFarland ED, et al. 1999. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 12536–12541.

24) Norris KL, Youle RJ, 2008. Cytomegalovirus proteins vMIA and m38.5 link mitochondrial morphogenesis to Bcl-2 family proteins. *J Virol* **82**, 6232–6243.

25) Terhune S, Torigoi E, Moorman N, Silva M, Qian Z, Shenk T, Yu D, 2007. Human cytomegalovirus UL38 protein blocks apoptosis. *J Virol* **81**, 3109–3123.

26) Moorman NJ, Cristea IM, Terhune SS, Rout MP, Chait BT, Shenk T, 2008. Human cytomegalovirus protein UL38 inhibits host cell stress responsesby antagonizing the tuberous sclerosis protein complex. *Cell Host Microbe* **3**,253–262.

27) Reeves MB, Davies AA, McSharry BP, Wilkinson GW, Sinclair JH, 2007. Complex I binding by a virally encoded RNA regulates mitochondria-inducedcell death. *Science* **316**, 1345–1348.

28) Cobbs CS, Soroceanu L, Denham S, Zhang W, Kraus MH, 2008. Modulation of oncogenic phenotype in human glioma cells by cytomegalovirus IE1–mediated mitogenicity. *Cancer Res* **68**, 724–730.

29) Soroceanu L, Akhavan A, Cobbs CS, 2008. Platelet-derived growth factor alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature* **455**, 391–395.

30) Harkins L, Volk AL, Samanta M, Mikolaenko I, Britt WJ, Bland KI, Cobbs CS, 2002. Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *Lancet* **360**, 1557–1563.

31) Allart S, Martin H, Detraves C, Terrasson J, Caput D, Davrinche C, 2002. Human cytomegalovirus induces drug resistance and alteration of programmed cell death by accumulation of deltaN-p73alpha. *J Biol Chem* **277**, 29063–29068.

32) Blaheta RA, Beecken WD, Engl T, Jonas D, Oppermann E, Hundemer M, Doerr HW, Scholz M, Cinatl J Jr, 2004. Human cytomegalovirus infection of tumor cells downregulates NCAM (CD56): a novel mechanism forvirus-induced tumor invasiveness. *Neoplasia* **6**, 323–331.

33) Blaheta RA, Weich E, Marian D, Bereiter-Hahn J, Jones J, Jonas D, MichaelisM, Doerr HW, Cinatl J Jr, 2006. Human cytomegalovirus infection alters PC3 prostate carcinoma cell adhesion to endothelial cells and extracellular matrix. *Neoplasia* **8**, 807–816.

34) Cobbs CS, Soroceanu L, Denham S, Zhang W, Britt WJ, Pieper R, Kraus MH, 2007. Human cytomegalovirus induces cellular tyrosine kinase signaling and promotes glioma cell invasiveness. *J Neurooncol* **85**, 271–280.

35) Streblow DN, Soderberg-Naucler C, Vieira J, Smith P, Wakabayashi E, Ruchti F, Mattison K, Altschuler Y, Nelson JA, 1999. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell* **99**, 511–520.

36) Streblow DN, Vomaske J, Smith P, Melnychuk R, Hall L, Pancheva D, Smit M,Casarosa P, Schlaepfer DD, Nelson JA, 2003. Human cytomegalovirus chemokine receptor US28-induced smooth muscle cell migration is mediate by focal adhesion kinase and Src. *J Biol Chem* **278**, 50456–50465.

37) Maussang D, Verzijl D, van Walsum M, Leurs R, Holl J, Pleskoff O, Michel D,van Dongen GA, Smit MJ, 2006. Human cytomegalovirus–encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**,13068–13073.

38) Murayama T, Ohara Y, Obuchi M, Khabar KS, Higashi H, Mukaida N, Matsushima K, 1997. Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1– and NF-kappaB–binding sites of the interleukin-8 gene. *J Virol* **71**,5692–5695.

39) Murayama T, Mukaida N, Sadanari H, Yamaguchi N, Khabar KS, Tanaka J,Matsushima K, Mori S, Eizuru Y, 2000. The immediate early gene 1 product of human cytomegalovirus is sufficient for up-regulation of interleukin-8 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 298–304.

40) Cinatl J Jr, Kotchetkov R, Scholz M, Cinatl J, Vogel JU, Hernáiz Driever P, Doerr HW, 1999. Human cytomegalovirus infection decreases expression of thrombospondin-1 independent of the tumor suppressor protein p53. *Am J Pathol* **155**, 285–292.

41) Lee K, Jeon K, Kim JM, Kim VN, Choi DH, Kim SU, Kim S, 2005. Downregulation of GFAP, TSP-1, and p53 in human glioblastoma cell line ,U373MG, by IE1 protein from human cytomegalovirus. *Glia* **51**, 1–12.

42) Bentz GL, Yurochko AD, 2008. Human CMV infection of endothelial cells induces an angiogenic response through viral binding to EGF receptor and beta1 and beta3 integrins. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 5531–5536.

43) Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM, 2006. Mechanisms of immune evasionby tumors. *Adv Immunol* **90**, 51–81.

44) Nazarenko I, Marhaba R, Reich E, Voronov E, Vitacolonna M, Hildebrand D,Elter E, Rajasagi M, Apte RN, Zöller M, 2008. Tumorigenicity of IL-1alpha– and IL-1beta–deficient fibrosarcoma cells. *Neoplasia* **10**, 549–562.

45) Cinatl J Jr, Scholz M, Doerr HW, 2005. Role of tumor cell immuneescape mechanisms in cytomegalovirus-mediated oncomodulation. *Med Res Rev* **25**, 167-185.

46) Powers C, DeFilippis V, Malouli D, Früh K, 2008. Cytomegalovirus immune evasion. *Curr Top Microbiol Immunol* **325**, 333–359.

47) Nelson JA, 2007. Small RNAs and large DNA viruses. *N Engl J Med* **357**, 2630-2632.

48) Wilkinson GW, Tomasec P, Stanton RJ, Armstrong M, Prod'homme V, AichelerR, McSharry BP, Rickards CR, Cochrane D, Llewellyn-Lacey S, et al. 2008. Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J Clin Virol* **41**,206–212.

49) Kotenko SV, Saccani S, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Pestka S, 2000. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 1695–1700.

50) Spencer JV, Lockridge KM, Barry PA, Lin G, Tsang M, Penfold ME, Schall TJ, 2002. Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J Virol* **76**, 1285–1292.

51) Jenkins C, Garcia W, Godwin MJ, Spencer JV, Stern JL, Abendroth A, Slobedman B, 2008. Immunomodulatory properties of a viral homolog of human interleukin-10 expressed by human cytomegalovirus during the latent phase of infection. *J Virol* **82**, 3736–3750.

52) Michelson S, Alcami J, Kim SJ, Danielpour D, Bachelerie F, Picard L, Bessia C,Paya C, Virelizier JL, 1994. Human cytomegalovirus infection induces transcription and secretion of transforming growth factor beta 1. *J Virol* **68**,5730–5737.

53) Kwon YJ, Kim DJ, Kim JH, Park CG, Cha CY, Hwang ES, 2004. Human cytomegalovirus (HCMV) infection in osteosarcoma cell line suppresses GMCSF production by induction of TGF-beta. *Microbiol Immunol* **48**, 195–199.

54) Alcami J, Paya CV, Virelizier JL, Michelson S, 1993. Antagonistic modulation of human cytomegalovirus replication by transforming growth factor beta and basic fibroblastic growth factor. *J Gen Virol* **74**, 269–274.

55) Yoo YD, Chiou CJ, Choi KS, Yi Y, Michelson S, Kim S, Hayward GS, Kim SJ, 1996. The IE2 regulatory protein of human cytomegalovirus induces expression of the human transforming growth factor beta1 gene through an Egr-1binding site. *J Virol* **70**, 7062–7070.

56) Tabata T, Kawakatsu H, Maidji E, Sakai T, Sakai K, Fang-Hoover J, Aiba M, Sheppard D, Pereira L, 2008. Induction of an epithelial integrin alphavbeta6 in human cytomegalovirus–infected endothelial cells leads to activation of transforming growth factor-beta1 and increased collagen production. *Am J Pathol* **172**,1127–1140.

57) Hartmann M, Brunnemann H, 1972. Chromosome aberrations in cytomegalovirus-infected human diploid cell culture. *Acta Virol* **16**, 176.

58) Deng CZ, AbuBakar S, Fons MP, Boldogh I, Albrecht T 1992. Modulation of the frequency of human cytomegalovirus–induced chromosome aberrations by camptothecin. *Virology* **189**, 397–401.

59) Deng CZ, AbuBakar S, Fons MP, Boldogh I, Hokanson J, Au WW, Albrecht T, 1992. Cytomegalovirus-enhanced induction of chromosome aberrationsin human peripheral blood lymphocytes treated with potent genotoxic agents.*Environ Mol Mutagen* **19**, 304–310.

60) Fortunato EA, Dell'Aquila ML, Spector DH, 2000. Specific chromosome 1 breaks induced by human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 853–858.

61) Baumgartner M, Schneider R, Auer B, Herzog H, Schweiger M, HirschKauffmann M, 1992. Fluorescence in situ mapping of the human nuclear NAD+ ADP-ribosyltransferase gene (ADPRT) and two secondary sites to human chromosomal bands 1q42, 13q34, and 14q24. *Cytogenet Cell Genet* **61**, 172–174.

62) Li YS, Ramsay DA, Fan YS, Armstrong RF, Del Maestro RF, 1995. Cytogenetic evidence that a tumor suppressor gene in the long arm of chromosome 1 contributes to glioma growth. *Cancer Genet Cytogenet* **84**, 46–50.

63) Bièche I, Champème MH, Lidereau R, 1995. Loss and gain of distinct regions of chromosome 1q in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* **1**, 123–127.

64) Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. 2001 Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 10869–74. doi: 10.1073/pnas.191367098

65) Cancer Genome Atlas Network, 2012. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61–70, doi:10.1038/nature11412

66) https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/28244/Rak-dojke.html Pristupljeno 4.7.2017.

67) Gumus M, Yumuk PF, Salepci T, Aliustaoglu M, Dane F, Ekenel M, et al. 2006. HPV DNA frequency and subset analysis in human breast cancer patients' normal and tumoral tissue samples. *J Exp Clin Cancer Res* **25**, 515–21.

68) Wang T, Zeng X, Li W, Zhu H, Wang G, Liu X, et al. 2014. Detection and analysis of human papilloma virus (HPV) DNA in breast cancer patients by an effective method of HPV capture. *PLoS One***9**:e90343. doi:10.1371/journal.pone.0090343

69) Grinstein S, Preciado MV, Gattuso P, Chabay PA, Warren WH, De Matteo E, et al. 2002. Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites. *Cancer Res* **62**, 4876–8.

70) Wang-Johanning F, Frost AR, Johanning GL, Khazaeli MB, LoBuglio AF, Shaw DR, et al. 2001. Expression of human endogenous retrovirus K envelope transcripts in human breast cancer. *Clin Cancer Res* **7**, 1553–60.

71) Hachana M, Amara K, Ziadi S, Gacem RB, Korbi S, Trimeche M, 2012. Investigation of human JC and BK polyomaviruses in breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* **133**, 969–77, doi:10.1007/s10549-011-1876-5

72) Cox B, Richardson A, Graham P, Gislefoss RE, Jellum E, Rollag H, 2010. Breast cancer, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus: a nested case-control study. *Br J Cancer* **102**, 1665–9, doi:10.1038/sj.bjc.6605675

73) Asanuma H, Numazaki K, Nagata N, Hotsubo T, Horino K, Chiba S, 1996. Role of milk whey in the transmission of human cytomegalovirus infection by breast milk. *Microbiol Immunol* **40**, 201–4, doi:10.1111/j.1348-0421.1996.tb03335.x

74) Hamprecht K, Maschmann J, Vochem M, Dietz K, Speer CP, Jahn G, 2001. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet* **357**, 513–8. doi:10.1016/S0140-6736(00)04043-5

75) Antonsson A, Bialasiewicz S, Rockett RJ, Jacob K, Bennett IC, Sloots TP, 2012. Exploring the prevalence of ten polyomaviruses and two herpes viruses in breast cancer. *PLoS One***7**:e39842, doi:10.1371/journal.pone.0039842

76) Lazzeroni M, Serrano D, 2012. Potential use of vaccines in the primary prevention of breast cancer in high-risk patients. *Breast Care (Basel)* **7**, 281–7, doi:10.1159/000342167

77) Herbein G, Kumar A, 2014. The Oncogenic Potential of Human Cytomegalovirus and Breast Cancer. *Front Oncol*, **4**, 230, doi: 10.3389/fonc.2014.00230

78) Chan G, Nogalski MT, Yurochko AD, 2009. Activation of EGFR on monocytes is required for human cytomegalovirus entry and mediates cellular motility. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 22369–74, doi:10.1073/pnas.0908787106

79) Hargett D, Shenk TE, 2010. Experimental human cytomegalovirus latency in CD14+ monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**(46), 20039–44, doi:10.1073/pnas.1014509107

80) Chan G, Bivins-Smith ER, Smith MS, Yurochko AD, 2009. NF-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase activity mediates the HCMV-induced atypical M1/M2 polarization of monocytes. *Virus Res* **144**, 329–33, doi:10.1016/j.virusres.2009.04.026

81) Grivennikov SI, Greten FR, Karin M, 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883–99, doi:10.1016/j.cell.2010.01.025

82) El-Shinawi M, Mohamed HT, El-Ghonaimy EA, Tantawy M, Younis A, Schneider RJ, et al. 2013. Human cytomegalovirus infection enhances NF-κB/p65 signaling in inflammatory breast cancer patients. *PLoS One***8**:e55755, doi:10.1371/journal.pone.0055755

83) Tang X, 2013. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Lett* **332**, 3–10, doi:10.1016/j.canlet.2013.01.024

84) Michaelis M, Paulus C, Löschmann N, Dauth S, Stange E, Doerr HW, et al. 2011. The multi-targeted kinase inhibitor sorafenib inhibits human cytomegalovirus replication. *Cell Mol Life Sci* **68**, 1079–90, doi:10.1007/s00018-010-0510-8

85) Fumarola C, Caffarra C, La Monica S, Galetti M, Alfieri RR, Cavazzoni A, et al. 2013. Effects of sorafenib on energy metabolism in breast cancer cells: role of AMPK-mTORC1 signaling. *Breast Cancer Res Treat* **141**, 67–78, doi:10.1007/s10549-013-2668-x

86) Baselga J, Segalla JG, Roché H, Del Giglio A, Pinczowski H, Ciruelos EM, et al. 2012. Sorafenib in combination with capecitabine: an oral regimen for patients with HER2-negative locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **30**, 1484–91, doi:10.1200/JCO.2011.36.7771

87) Baselga J, Costa F, Gomez H, Hudis CA, Rapoport B, Roche H, et al. 2013. A phase 3 trial comparing capecitabine in combination with sorafenib or placebo for treatment of locally advanced or metastatic HER2-negative breast cancer (the RESILIENCE study): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* **14**, 228, doi:10.1186/1745-6215-14-228

88) http://medicinski.lzmk.hr/rabdomiosarkom/ Pristupljeno 5.4.2017.

89) Price R L, Bingmer K, Harkins L, Iwenofu O H, Kwon C-H, Cook C, Pelloski C, Chiocca E. A, 2012. Cytomegalovirus Infection Leads to Pleomorphic

Rhabdomyosarcomas in *Trp53*$^{+/-}$ Mice. *Cancer Research* **72**(22), 1-6, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2425

90) Kwon Y, Kim M-N, Young Choi E, Heon Kim J, Hwang E-S, Cha C-Y, 2012. Inhibition of p53 transcriptional activity by human cytomegalovirus UL44. *Microbiol Immunol* **56**, 324–31.

91) Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P, 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**, 97-109.

92) Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL, 2014. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **23**, 1985-1996.

93) Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*.**352**, 987-996.

94) Omuro A, DeAngelis LM, 2013. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA* **310**, 1842-1850.

95) Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**, 98-110.

96) Northcott PA, Jones DT, Kool M, Robinson GW, Gilbertson RJ, Cho YJ, Pomeroy SL, Korshunov A, Lichter P, Taylor MD, 2012. Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev Cancer* **12**, 818-834.

97) Mueller S, Chang S, 2009. Pediatric brain tumors: current treatment strategies and future therapeutic approaches. *Neurotherapeutics* **6**, 570-586.

98) Northcott PA, Lee C, Zichner T, Stütz AM, Erkek S, Kawauchi D, Shih DJ, Hovestadt V, Zapatka M, Sturm D, 2014. Enhancer hijacking activates GFI1 family oncogenes in medulloblastoma. *Nature* **511**, 428-434.

99) Baryawno N, Sveinbjörnsson B, Eksborg S, Chen CS, Kogner P, Johnsen JI, 2010. Small-molecule inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling inhibit Wnt/beta-catenin pathway cross-talk and suppress medulloblastoma growth. *Cancer Res* **70**, 266-276.

100) Baryawno N, Sveinbjörnsson B, Kogner P, Johnsen JI, 2010. Medulloblastoma: a disease with disorganized developmental signaling cascades. *Cell Cycle* **9**, 2548-2554.

101) Rao G, Pedone CA, Del Valle L, Reiss K, Holland EC, Fults DW, 2004. Sonic hedgehog and insulin-like growth factor signaling synergize to induce medulloblastoma formation from nestin-expressing neural progenitors in mice. *Oncogene* **23**, 6156-6162.

102) Schüller U, Heine VM, Mao J, Kho AT, Dillon AK, Han YG, Huillard E, Sun T, Ligon AH, Qian Y, 2008. Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell* **14**, 123-134.

103) Taylor M., Northcott P, Korshunov A, Remke M, Cho Y, Clifford S, Eberhart C, Parsons D, Rutkowski S, Gajjar A, Ellison D, Lichter P, Gilbertson R, Pomeroy S, Kool M, Pfister S, 2011. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathologica* **123**(4), 465-472.

104) Joki T, Heese O, Nikas DC, Bello L, Zhang J, Kraeft SK, Seyfried NT, Abe T, Chen LB, Carroll RS, 2000. Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer Res* **60**, 4926-4931.

105) Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF, 2001. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res* **61**, 4375-4381.

106) Baryawno N, Sveinbjörnsson B, Eksborg S, Orrego A, Segerström L, Oqvist CO, Holm S, Gustavsson B, Kågedal B, Kogner P, 2008. Tumor-growth-promoting cyclooxygenase-2 prostaglandin E2 pathway provides medulloblastoma therapeutic targets. *Neuro Oncol* **10**, 661-674.

107) Scheurer ME, Amirian ES, Davlin SL, Rice T, Wrensch M, Bondy ML. 2011. Effects of antihistamine and anti-inflammatory medication use on risk of specific glioma histologies. *Int J Cancer* **129**, 2290-2296.

108) Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F, 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-444.

109) Davison AJ, Dolan A, Akter P, Addison C, Dargan DJ, Alcendor DJ, McGeoch DJ, Hayward GS, 2003. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol* **84**, 17-28.

110) Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Horsnell T, Hutchison CA, Kouzarides T, Martignetti JA, 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* **154**, 125-169.

111) Dunn W, Chou C, Li H, Hai R, Patterson D, Stolc V, Zhu H, Liu F, 2003. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 14223-14228.

112) Murphy E, Yu D, Grimwood J, Schmutz J, Dickson M, Jarvis MA, Hahn G, Nelson JA, Myers RM, Shenk TE, 2003. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 14976-14981.

113) Stern-Ginossar N, Weisburd B, Michalski A, Le VT, Hein MY, Huang SX, Ma M, Shen B, Qian SB, Hengel H, 2012. Decoding human cytomegalovirus. *Science* **338**, 1088-1093.

114) Hanahan D, Weinberg RA, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.

115) Wang D, Dubois RN, 2010. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 181-193.

116) Zhu H, Cong JP, Yu D, Bresnahan WA, Shenk TE, 2002. Inhibition of cyclooxygenase 2 blocks human cytomegalovirus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 3932-3937.

117) Qiu H, Stråat K, Rahbar A, Wan M, Söderberg-Nauclér C, Haeggström JZ, 2008. Human CMV infection induces 5-lipoxygenase expression and leukotriene B4 production in vascular smooth muscle cells. *J Exp Med* **205**, 19-24.

118) Michelson S, Alcami J, Kim SJ, Danielpour D, Bachelerie F, Picard L, Bessia C, Paya C, Virelizier JL, 1994. Human cytomegalovirus infection induces transcription and secretion of transforming growth factor beta 1. *J Virol* **68**, 5730-5737.

119) Shimamura M, Murphy-Ullrich JE, Britt WJ, 2010. Human cytomegalovirus induces TGF-β1 activation in renal tubular epithelial cells after epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS Pathog*. **6**:e1001170.

120) Reinhardt B, Winkler M, Schaarschmidt P, Pretsch R, Zhou S, Vaida B, Schmid-Kotsas A, Michel D, Walther P, Bachem M, 2006. Human cytomegalovirus-induced reduction of extracellular matrix proteins in vascular smooth muscle cell cultures: a pathomechanism in vasculopathies? *J Gen Virol* **87**, 2849-2858.

121) Thompson J, Inamdar A, Jahan N, Doniger J, Rosenthal LJ, 1993. Localization and sequence analysis of morphological transforming region III within human cytomegalovirus strain Towne. *Intervirology* **36**, 121-127.

122) Inamdar A, Thompson J, Kashanchi F, Doniger J, Brady JN, Rosenthal LJ, 1992. Identification of two promoters within human cytomegalovirus morphologic transforming region II. *Intervirology* **34**, 146-153.

123) Razzaque A, Zhu F, Jones C, 1991. Functional analysis of human cytomegalovirus morphological transforming region II (mtrII). *Virology* **181**, 399-402.

124) Nelson JA, Fleckenstein B, Jahn G, Galloway DA, McDougall JK, 1984. Structure of the transforming region of human cytomegalovirus AD169. *J Virol* **49**, 109-115.

125) Kouzarides T, Bankier AT, Barrell BG, 1983. Nucleotide sequence of the transforming region of human cytomegalovirus. *Mol Biol Med* **1**, 47-58.

126) Dirks PB, 2010. Brain tumor stem cells: the cancer stem cell hypothesis writ large. *Mol Oncol* **4**, 420-430.

127) Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA, 2008. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* **40**, 499-507

128) Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN, 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756-760.

129) Wolmer-Solberg N, Baryawno N, Rahbar A, Fuchs D, Odeberg J, Taher C, Wilhelmi V, Milosevic J, Mohammad AA, Martinsson T, 2013. Frequent detection of human cytomegalovirus in neuroblastoma: a novel therapeutic target? *Int J Cancer* **133**, 2351-2361.

130) Speir E, Yu ZX, Ferrans VJ, Huang ES, Epstein SE, 1998. Aspirin attenuates cytomegalovirus infectivity and gene expression mediated by cyclooxygenase-2 in coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res* **83**, 210-216.

131) Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW, 2011. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* **377**, 31-41.

132) Rothwell PM, Price JF, Fowkes FG, Zanchetti A, Roncaglioni MC, Tognoni G, Lee R, Belch JF, Wilson M, Mehta Z, 2012. Short-term effects of daily aspirin on

cancer incidence, mortality, and non-vascular death: analysis of the time course of risks and benefits in 51 randomised controlled trials. *Lancet* **379**, 1602-1612.

133) Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, Norrving B, Algra A, Warlow CP, Meade TW, 2010. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* **376**, 1741-1750.

134) Rothwell PM, Wilson M, Price JF, Belch JF, Meade TW, Mehta Z, 2012. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet* **379**, 1591-1601.

135) Algra AM, Rothwell PM, 2012. Effects of regular aspirin on long-term cancer incidence and metastasis: a systematic comparison of evidence from observational studies versus randomised trials. *Lancet Oncol* **13**, 518-527.

136) Hadaczek P, Ozawa T, Soroceanu L, Yoshida Y, Matlaf L, Singer E, Fiallos E, James CD, Cobbs CS, 2013. Cidofovir: a novel antitumor agent for glioblastoma. *Clin Cancer Res* **19**, 6473-6483.

137) Yamanaka R, 2006. Novel immunotherapeutic approaches to glioma. *Curr Opin Mol Ther* **8**, 46-51.

138) Yamanaka R, 2008. Cell- and peptide-based immunotherapeutic approaches for glioma. *Trends Mol Med* **14**, 228-235.

139) Tafvizi F, Tahmasebi Fard Z, 2014. Detection of Human Cytomegalovirus in patients with Colorectal Cancer by Nested-PCR. *Asian Pac J Cancer Prev* **15** (3), 1453-1457

140) Brkić T, Grgić M, 2006. Kolorektalni karcinomi. *MEDICUS* **15** (1), 89-97

141) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. 2002. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **55**,74-108

9. SAŽETAK

Ljudski citomegalovirus je herpes virus koji uzrokuje latentne infekcije s mogućnošću reaktivacije. Prisutnost njegovih proteina i nukleinskih kiselina je zabilježena u tkivima brojnih malignih tumora poput glioblastoma, meduloblastoma, neuroblastoma, rabdomiosarkoma, karcinoma dojke, kolorektalnog karcinoma, itd. Ne smatra ga se onkogenim virusom, nego virusom koji sudjeluje u procesu "onkomodulacije". Preko svojih proteina i nekodirajućih RNA utječe na proliferaciju, preživljavanje, invaziju, imunogeničnost tumorskih stanica i stvaranje faktora angiogeneze. Usprkos brojnim istraživanjima, sam proces onkomodulacije još uvijek nije u potpunosti definiran. Potrebno je još raditi na standardizaciji metoda detektiranja infekcije virusom, ali je bitan cilj i razviti terapeutike koji će spriječiti replikaciju virusa ili djelovati na njegove regulacijske proteine i nekodirajuće RNA.

10. SUMMARY

Human cytomegalovirus is a herpes virus that causes latent infections with a possibility of reactivation. Viral proteins and HHV5 nucleic acids have been found in tissues of numerous malignant tumors such as glyoblastomas, medulloblastomas, neuroblastomas, rhabdomyosarcomas, breast carcinoma, colorectal carcinoma, etc. HHV5 is not regarded as oncogenic virus, but rather as a virus that takes part in process known as "oncomodulation". Activity of its proteins and noncoding RNAs influence proliferation, survival, invasion and immunogenicity of tumor cells and production of angiogenic factors. Despite the fact that many researches have been done on this topic, the process of oncomodulation is not fully understood. It is necessary to standardize sensitive techniques to detect infection, but one of the central aims remains to be development of therapeutic strategies that will prevent HHV5 replication or target its regulatory proteins and noncoding RNAs.