

Molekularna karakterizacija kvazivirsa hrvatskih izolata virusa hepatitisa A

Kuzle, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:891678>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Josipa Kuzle

**Molekularna karakterizacija kvazivrsta hrvatskih izolata
virusa hepatitisa A**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Silvije Černi i dr. sc. Ivane Grgić, znanstvene suradnice s Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije u akademskoj godini 2019./2020.

ZAHVALE

Želim izraziti iskrenu zahvalnost mojoj cijenjenost mentorici doc. dr. sc. Silviji Černi na predloženoj temi, iskazanom razumijevanju, stručnom i savjesnom vodstvu te savjetima i pristupačnosti.

Također, veliko hvala znanstvenoj suradnici dr. sc. Ivani Grgić iz klinike za infektivne bolesti dr. Fran Mihaljević bez koje cijelo istraživanje ne bi bilo omogućeno te na susretljivosti i izdvojenom vremenu.

Posebne zahvale docentu Marinu Ježiću i docentici Ivani Šoli na strpljenju i ustupljenim savjetima, i svim ostalim djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju na ugodnoj radnoj atmosferi i pomoći u laboratorijskom radu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Molekularna karakterizacija kvazivrsta hrvatskih izolata virusa hepatitisa A

Josipa Kuzle

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Virus hepatitisa A (HAV) jednolančani je RNA virus pozitivnog smisla iz porodice *Picornaviridae* i glavni uzročnik akutne bolesti jetre u svijetu. Broj zaraženih u Hrvatskoj porastao je u posljednjih nekoliko godina. Kao i ostali virusi s RNA-genomom, HAV ima tendenciju nakupljanja mutacija zbog brze replikacije i nemogućnosti popravaka pogrešaka enzima RNA-polimeraze ovisne o RNA. Zbog toga virusni izolati sadrže velik broj mutanata/genomskih varijanti, koje zajedno tvore tzv. kvazivrste. Varijante unutar kvazivrste mogu se razlikovati u svom patogenom potencijalu, no rutinske analize ne uključuju njihovu karakterizaciju. Gotovo nema literaturnih podataka o genskoj raznolikosti varijanti virusa HAV unutar pojedinih izolata te o prirodi prisutnih mutacija. Stoga je cilj ovog rada bio molekularno karakterizirati genomske varijante virusa HAV razdvojene kloniranjem, podrijetlom iz 13 pacijenata. Analizom hipervarijabilne regije genoma VP2-2A svakog uzorka obuhvaćeno je po 20 varijanti, koje su identificirane metodom SSCP i sekvencirane. Usporedbom virusnih mutanata s dominantnom populacijskom varijantom svakog uzorka utvrđena je brojnost i priroda mutacijskih događaja. Rezultati ukazuju na česte mutacijske događaje nasumično pozicionirane unutar analizirane regije. Detektiran je i visok postotak nesinonimnih mutacija, što može imati utjecaj na biološke karakteristike virusa. Kod pacijenata koinficiranih virusom HIV zabilježen je manji broj promjena na nukleotidnoj i aminokiselinskoj razini u odnosu na ostale pacijente.

(57 stranica, 11 slika, 20 tablica, 89 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: mutacije, populacijska struktura, sekvenciranje, SSCP

Voditelji: dr. sc. Silvija Černi, docent i dr. sc. Ivana Grgić, znanstvena suradnica

Ocjenitelji: Dr. sc. Silvija Černi, doc.

Dr. sc. Duje Lisičić, doc.

Dr. sc. Jasna Lajtner, izv. prof.

Rad prihvaćen: 16. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

Molecular characterization of Hepatitis A virus quasispecies from Croatian isolates

Josipa Kuzle

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Hepatitis A virus (HAV) is a positive single-stranded RNA virus from *Picornaviridae* family. In Croatia number of people infected with HAV increased in recent years. As other RNA viruses, HAV tends to accumulate mutations due to rapid replication and error-prone nature of RNA-dependent RNA polymerase. Consequently, viral isolates contain large number of genomic variants, which together form so-called quasispecies. Different variants within quasispecies may differ in their pathogenic potential, but their characterization is not a part of routine analysis. There is almost no literature on quasispecies structure of HAV. The aim of this study was to molecularly characterize genomic variants, previously separated by cloning, from 13 patients. The analysis of VP1-2A hypervariable genomic region included 20 variants per sample, which were identified by SSCP method and sequenced. The number and nature of mutational events were determined by comparing nucleotide and amino-acid sequence of mutants with those of dominant population variant from each sample. The results indicate frequent mutations randomly positioned through the analysed region. High percentage of non-synonymous mutations was detected, that can have a significant impact on the virus biology. In comparison to others, in patients co-infected with HIV fewer nucleotide and amino acid changes were detected.

(57 pages, 11 figures, 20 tables, 89 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: mutations, population structure, sequencing, SSCP

Supervisor: Dr. Silvija Černi, Asst. Prof. and Dr. Ivana Grgić, Res. Assoc.

Reviewers: Dr. Silvija Černi, Asst. Prof.

Dr. Dujče Lisičić, Asst. Prof.

Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 16th September, 2020

POPIS KRATICA

cDNA – kružna DNA

eHAV – virus hepatitisa A s ovojnicom (engl. *enveloped hepatitis A virus*)

HAV – virus hepatitisa A (*Hepatitis A virus*)

HBV – virus hepatitisa B (*Hepatitis B virus*)

HCV – virus hepatitisa C (*Hepatitis C virus*)

HIV – virus humane imunodeficijencije (engl. *Human immunodeficiency virus*)

IRES – mjesto vezanja ribosoma (engl. *internal Ribosomal Entry Site*)

jDNA – jednolančana DNA

jRNA – jednolančana RNA

+jRNA – jednolančana RNA pozitivnog smisla

-jRNA – jednolančana RNA negativnog smisla

mRNA – glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

MSM – muškarci koji imaju spolne odnose s muškarcima (engl. *men who have sex with men*)

NCR – nekodirajuća regija (engl. *non-coding region*)

nt – nukleotid

ORF – otvoreni okvir čitanja (engl. *open reading frame*)

PCR – lančana reakcija polimerazom

pb – parovi baza

RT-PCR – lančana reakcija polimerazom uz reverznu transkripciju (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*)

SSCP – analiza polimorfizma konformacije jednolančanih molekula DNA (engl. *single strand conformation polymorphism*)

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Virusni patogeni čovjeka	1
1.2.	Mutacije	3
1.2.1.	Mutacije kod virusa	4
1.3.	RNA virusi	4
1.4.	Virus hepatitisa A	5
1.4.1.	Organizacija genoma	7
1.4.2.	Umnažanje virusa hepatitisa A	8
1.4.3.	Epidemiologija	10
1.4.4.	Detekcija i molekularna karakterizacija	11
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	14
3.	MATERIJALI I METODE	15
3.1.	MATERIJALI	15
3.1.1.	Biološki uzorci	15
3.1.2.	Otopine, puferi i reagensi	15
3.1.2.1.	Korišteni kompleti reagensa	17
3.1.2.2.	Korišteni uređaji	17
3.1.2.3.	Korišteni računalni programi	18
3.2.	METODE	19
3.2.1.	Reverzna transkripcija, lančana reakcija polimerazom (RT-PCR) i ugniježđeni PCR	19
3.2.2.	Reakcija poliadenilacije i ugradnja umnoženih odsječaka DNA u plazmidni vektor	21
3.2.3.	Priređivanje bakterijskih kompetentnih stanica za postupak transformacije	23
3.2.4.	Analiza transformiranih bakterijskih stanica	24
3.2.5.	Analiza polimorfizma konformacije jednolančanih molekula DNA (SSCP) i postupak bojanja srebrom	25
3.2.6.	Odabir virusnih haplotipova za sekvenciranje	26
3.2.7.	Analiza nukleotidnih sljedova	27
4.	REZULTATI	28
4.1.	Umnožavanje hipervarijabilne regije VP1-2A	28
4.2.	Analiza transformiranih bakterijskih stanica	28
4.3.	Identifikacija virusnih varijanti i njihova populacijska struktura unutar pojedinog izolata	29
4.4.	Brojnost i priroda mutacija	33
4.4.1.	Usporedba različitih genomskih varijanti virusa unutar svakog analiziranog izolata	35
4.5.	Utjecaj mutacija na aminokiselinski slijed	39
5.	RASPRAVA	41

6.	ZAKLJUČAK	46
7.	LITERATURA	47
8.	ŽIVOTOPIS	57

1. UVOD

1.1. Virusni patogeni čovjeka

Virusi su submikroskopski obligatni unutarstanični paraziti koji nemaju vlastiti metabolizam, nego koriste stanične mehanizme i energiju domaćina za proizvodnju novih virusnih čestica (Chaitanya, 2019). Genski su vrlo raznoliki, a razvoj novih genotipova, sojeva i vrsta odvija se kontinuirano. Mogu zaraziti sve organizme, pa i čovjeka. Virusni patogeni čovjeka definirani su kao oni za koje postoje dokazi o njihovoj prirodi da izazivaju bolesti u ljudskoj populaciji (Woolhouse i sur., 2012). Građeni su od DNA ili RNA genoma, koji je većinom upakiran u zaštitnu proteinsku ovojniciu tzv. kapsidu, sastavljenu od jednog ili više proteina (Chaitanya, 2019). Kapsida štiti virusni genom od vanjskih utjecaja i ima važnu ulogu u interakciji sa stanicom domaćina te izbjegavanju imunskog odgovora, što virusu olakšava prijenos genoma u citoplazmu stanice domaćina i replikaciju (Stuart i sur., 2018). Kapsida je građena od osnovnih strukturnih jedinica, tzv. protomera, koje su građene od jednog ili više pojedinačnih polipeptida. Svaka polipeptidna podjedinica unutar same protomere povezana je sa svojim susjednim podjedinicama na jednak način, što posljedično uzrokuje simetričnu strukturu kapside. Prema rasporedu podjedinica razlikuje se spiralni, ikozaedralni i kompleksni oblik kapside (Flint i sur., 2015). Zbog ovakve simetrične strukture, virusi koriste mali skup gena za kodiranje potrebne informacije za izgradnju relativno velike kapside (Chaitanya, 2019). Kapsida s nukleinskom kiselinom naziva se nukleokapsida. Osim nukleokapside, neki virusi imaju dodatnu vanjsku lipidnu ovojniciu radi jednostavnije interakcije s domaćinskom stanicom (Banerjee i Mukhopadhyay, 2016). Na njenoj površini nalaze se glikoproteini nužni u prepoznavanju staničnih receptora, fuzioniranju virusa sa staničnom membranom i ulasku virusa u stanicu. Kako bi se učvrstila povezanost nukleokapside i vanjske ovojnice, mnogi virusi s ovojniciu sintetiziraju i unutarnje proteine, tzv. matriks-proteine (Collins i sur., 2012).

Virusni genom sastoji se od dijela koji kodira za strukturne proteine i dijela za nestrukturne proteine (Coffin i sur., 1997). Oni se sastoje od vrlo varijabilnih dijelova i dijelova koji ostaju visoko očuvani, tj. konzervirani, za što je glavni primjer strukturni motivi koji služe kao mjesto vezanja za ribosom (IRES) (Contreras i sur., 2002). Dijelovi genoma u kojima se na različitim položajima pojavljuju različite aminokiseline nazivaju se varijabilnim regijama (Andreis i sur., 2010). Komparativna analiza tih regija pokazala je da svi položaji nisu podjednako varijabilni, već

postoje mjesta koja su izrazito varijabilna, tzv. hipervarijabilne regije te manje varijabilne pozicije koje određuju opću strukturu varijabilnog dijela genoma (Andreis i sur., 2010). Nisu u potpunosti razjašnjene uloge takvih regija, no neki znanstvenici smatraju da hipervarijabilne regije služe za razdvajanje dvaju susjednih domena otvorenog okvira čitanja (ORF) (Koonin i sur., 1992), dok drugi tvrde da one moduliraju replikaciju ili infektivnost virusa (Pudupakam i sur., 2011). Kod nekih virusa, poput virusa humane imunodeficijencije (HIV) i virusa hepatitisa C (HCV), te regije genoma su uključene u "bijeg" od imunskog odgovora domaćina (Smith i sur., 2012). Najvarijabilniji dijelovi virusnog genoma kodiraju za dijelove koji su najizloženi selekcijskom pritisku i promjenama u okolišu, a to su primjerice proteini na virusnoj ovojnici (Bankwitz i sur., 2010). Ravnoteža između konzerviranih i varijabilnih virusnih elemenata od izrazite je važnosti kako bi virusi izbjegli "katastrofu pogreške" čime bi ugrozili održivost i preživljavanje u virusnoj populaciji (Contreras i sur., 2002).

Virusi zbog svoje veličine ne mogu samostalno difundirati kroz staničnu membranu domaćina, već im je nužno pronalaženje odgovarajućeg staničnog receptora. O vrsti receptora ovisi tropizam virusa, tj. sklonost virusa da ulazi u određene vrste stanica (Andreis i sur., 2010). Antigenska determinanta ili epitop je mjesto na površini antigena (u ovom slučaju virusa) koje se specifično veže za paratop antitijela ili staničnog receptora. Antigen može imati više različitih epitopa čime se povećava mogućnost odabira receptora te izbjegavanja imunskog odgovora, što osigurava bolje preživljavanje (Cruse i sur., 2004). Virusni protein kapside ili ovojnice prepoznaje i veže stanični receptor te tako njegov genom ulazi u stanicu. Virusi bez ovojnice te poneki s ovojnicom ulaze u stanicu endocitozom, dok virusi s ovojnicom ulaze fuzioniranjem virusne ovojnice sa staničnom membranom. Ulaskom u citoplazmu dolazi do razgradnje virusne kapside staničnim enzimima pri čemu se oslobodi virusni genom (Flint i sur., 2015). Formiranje novih virusnih čestica kod virusa s ovojnicom odvija se tzv. pupanjem kroz staničnu membranu zaražene stanice na kojoj su ranije locirani virusni glikoproteini (Banerjee i Mukhopadhyay, 2016). Takav način izlaska, virusima s ovojnicom omogućava napuštanje stanice bez da ju pri tome oštete ili ubiju, kao što je slučaj kod virusa bez ovojnice. Novonastale virusne čestice dalje se rasprostranjuju do nezaraženih stanica ili se prenose na novu jedinku specifičnim mehanizmima (Flint i sur., 2015). Svi organizmi mogu biti zaraženi virusima, ali za domaćina određene vrste ili njemu srodnih vrsta specijalizirana je pojedina vrsta virusa. Sposobnost virusa da zarazi pripadnike različitih vrsta u nekim slučajevima ovisi o njegovoj sposobnosti mutiranja, odnosno prilagodljivosti.

1.2. Mutacije

Mutacije su iznenadne nasljedne promjene genetičkog materijala u kojima je izvor svih nasljednih varijabilnosti živih bića (Pavlica, 2012). Jedino one mogu stvoriti varijaciju unutar vrste, a glavna pokretačka sila je prirodna selekcija. Iako se pojam mutacije najčešće veže za njene štetne učinke, mutacije imaju važnu ulogu u evoluciji (Johnston, 2006). Evolucijski napredak vrste ovisi o povremenoj pojavi korisnih mutacija. No, takve su mutacije vrlo rijetke. Štetne mutacije su učestalije.

S obzirom na mjesto nastanka, mutacije mogu biti genske i kromosomske. Genske ili točkaste mutacije nastaju zbog promjena u pojedinačnom genu što rezultira izmijenjenim nukleotidnim slijedom, a time i samom genskom informacijom. Takve mutacije mogu nastati u somatskim i generativnim stanicama supstitucijom, insercijom ili delecijom nukleotida (Panawala, 2017). Supstituciju ili zamjenu jednog nukleotida dijelimo na tranziciju ili transverziju, ovisno kojom dušičnom bazom je zamijenjena primarna baza. Tranzicija je zamjena jednog purina ili pirimidina drugom bazom iste vrste (primjerice purin citozin zamijenjen purinom timinom), dok se u transverziji baza zamjenjuje bazom suprotne vrste (primjerice purin citozin zamijenjen adeninom ili gvaninom) (Stoltfus i Norris, 2015). Takve promjene u nukleotidnom slijedu mogu se različito odraziti na translaciju poliproteina. S obzirom na mjesto pojave supstitucije u kodonu dijelimo ih na sinonimne (istovjetne) i nesinonimne (pogrešne i besmislene) mutacije (Griffiths i sur., 1999). Zamjenom trećeg slova kodona najčešće nemaju utjecaj na redosljed aminokiselina u proteinu pa se takva mutacija naziva istovjetna ili tiha. Kada dođe do supstitucije prvog ili drugog slova kodona nastaju tzv. pogrešne i besmislene mutacije koje mogu ostaviti vrlo ozbiljne posljedice za organizam. Primjerice, kada mutacija promijeni protein koji ima kritičnu ulogu u tijelu, može poremetiti normalan razvoj i ugroziti zdravstveno stanje organizma te dovesti do genskog poremećaja (<https://ghr.nlm.nih.gov/primer/mutationsanddisorders/mutationscausedisease>). Pogrešne mutacije uzrokuju promjenu u slijedu aminokiselina u poliproteinu, odnosno promjenu strukture i funkcije proteina, a besmislenim mutacijama dolazi do prestanka biosinteze proteina (<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/mutations/>). Kod insercije (umetanja) i delecije (gubitka) jednog ili više nukleotida dolazi do pomaka okvira čitanja te ribosom tijekom čitanja poruke zapisane u kodovima krivo prevodi u aminokiselinski slijed (Griffiths i sur., 1999).

Stopom mutacije izražava se učestalost novih mutacija u određenom vremenu. Stope nisu stalne, već ovisе o genskom lokusu i vrsti organizma. Mutacije, kao rezultat utjecaja vanjskih i

unutarnjih čimbenika, nastaju spontano u normalnim uvjetima ili mogu biti inducirane mutagenima (Pierce, 2005). Osim kemijskim agensima ili ionizirajućem zračenjem, mutageneza može biti potaknuta i virusima (Schrader, 2016).

1.2.1. Mutacije kod virusa

Ljudski imunološki sustav koristi mnogobrojne mehanizme u borbi protiv virusnih patogena. Kako bi izbjegao imunosno prepoznavanje, glavna strategija virusa je sinteza mnogobrojnih kopija samog sebe kako bi se što uspješnije rasprostranio na nove domaćine. Pri tome dolazi do stvaranja mnogobrojnih genskih varijanti (<https://www.historyofvaccines.org/content/articles/viruses-and-evolution>). Izvor genetske varijacije u populaciji je mutacija, čime je virusima omogućena brza i učinkovita prilagodba na novog domaćina i nove uvjete okoliša. Mutacije se događaju u genomu DNA i RNA virusa. Neke mutacije nastaju tijekom replikacije genoma zbog pogrešaka enzima polimeraze. Kako je DNA stabilnija molekula od RNA, DNA virusi imaju sposobnost provjere i korekcije pogrešaka koje nastaju replikacijom na način da koriste mehanizme stanice domaćina za ispravljanje vlastitog genoma (Payne, 2017). Međutim, RNA virusi nemaju tu sposobnost pa su mutacije učestale i mogu imati značajne posljedice na njihove domaćine.

1.3. RNA virusi

Većina RNA virusa kao genetički materijal ima jednolančanu RNA (jIRNA), a glavnina ih pripada i skupini patogena čovjeka. Ciklus umnažanja većine RNA virusa odvija se u citoplazmi, gdje se sintetiziraju nove RNA molekule neophodne za stvaranje novih virusnih čestica te sintezu vlastite mRNA molekule. Njena glavna značajka je mogućnost učinkovite translacije koristeći mehanizme domaćinske stanice za sintezu vlastitih proteina. Kod jIRNA virusa za koje kažemo da su pozitivnog smisla (+jIRNA), genom im ujedno služi kao mRNA, koja se ulaskom u citoplazmu direktno veže na stanične ribosome i započinje translaciju. U slučaju virusa negativnog smisla (-jIRNA), genom se prvo mora prepisati u +jIRNA da bi došlo do translacije (Philipson, 1983). Jedan od ključnih enzima nužan za potpun završetak ciklusa umnažanja genoma kod +jIRNA virusa je RNA-polimeraza ovisna o RNA (RNA replikaza) kodirana virusnim genomom. Ona sintetizira -jIRNA iz +jIRNA, koje služe kao kalup za sintezu velikog broja novih virusnih RNA pozitivnog smisla. Za razliku od DNA polimeraze, RNA polimeraza sklona je pogreškama jer nema

sposobnosti provjere i popravka krivo ugrađenih nukleotida (Sanjuan i Domingo-Calap, 2016). Na taj način RNA virusi brže akumuliraju mutacije od virusa s DNA genomom (Elena i Sanjuan, 2005). Stopa mutacije RNA virusa je do milijun puta veća od stope mutacija domaćina kojeg zaražava, što ukazuje na njihovu visoku razinu virulencije te stvaranje tzv. adaptivne genske raznolikosti (Duffy, 2018). Upravo zbog jednostavnije građe i visoke sklonosti mutacijama, RNA virusi dominiraju kod eukariotskih organizama u odnosu na DNA viruse (Kormann, 2020).

Populacije RNA virusa nemaju jedinstveni slijed nukleotida, već pokazuju velik genski polimorfizam. Sačinjeni su od velikog broja genomskih varijanti čija populacijska učestalost varira u vremenu. Ovakve populacije zajedno se nazivaju kvazivrste, a nastaju akumulacijom mutacija tijekom umnažanja virusnog genoma u zaraženim stanicama (Andino i Domingo, 2015). U ovakvim “oblacima” mutanata, ovisno o uvjetima okoliša, određena varijanta virusa u odgovarajućem trenutku prikazuje najbolju prilagođenost, što je važno za uspješnu evoluciju virusa (Andino i Domingo, 2015). Važno je istaknuti da se različite varijante unutar kvazivrste mogu razlikovati i u svom patogenom potencijalu pa tako i nisko zastupljene varijante mogu imati važan utjecaj na virulenciju izolata i simptome bolesti, iako točne uloge u patogenezi bolesti još nisu razjašnjene (Domingo i sur., 2006). Iako se umnažanje RNA virusa događa vrlo brzo s puno grešaka, oni su podvrgnuti istim evolucijskim procesima kao i organizmi s DNA genomom, što se može objasniti na modelu prirode mutacija, genskog pomaka (engl. *genetic drift*) i prirodne selekcije (Moya i sur., 2000). Također, smatra se da navedene karakteristike RNA virusa u konačnici omogućavaju virusu veću šansu za opstanak i veću tendenciju uzrokovanja epidemija poput one ospica, gripe i ebole, uključujući i trenutno aktualnu epidemiju COVID-19 (Kormann, 2020).

1.4. Virus hepatitisa A

Još u antičkim spisima u vrijeme Hipokrata govorilo se o bolesti s opisom koji nalikuje danas poznatoj infekciji virusom hepatitisa A (*Hepatitis A virus*, HAV), gdje su je nazivali “dobročudnom žuticom”. Bolest izazvana ovim virusom i danas je narodu poznata kao zarazna žutica (<https://www.hzjz.hr/aktualnosti/virusni-hepatitisi/>). Značajniji opisi simptoma i karakteristika ove bolesti pojavljuju se tek u 17. stoljeću, a vezani su uz vojne kampove. U vrijeme Drugog svjetskog rata vladala je epidemija hepatitisa od koje je umro veliki broj ljudi, što je potaknulo tadašnje znanstvenike na nova istraživanja. Otkrivena su dva različita oblika virusnog hepatitisa, gdje je jedan od njih imao dugo inkubacijsko razdoblje i prenosio se krvlju, dok je drugi

imao kratko inkubacijsko razdoblje, a prenosio se fekalno–oralnim putem pa je nazvan “infektivnim hepatitisom” (Feinstone, 2018). Navedene bolesti imenovao je MacCallum 1953. godine kao bolesti virusnog hepatitisa tipa B i A. Čestica virusa hepatitisa A detektirana je 20 godina kasnije pomoću imunoelektronske mikroskopije u uzorku fecesa čovjeka (Feinstone i sur., 1973).

Virus hepatitisa A (HAV) je linearni jednolančani RNA virus pozitivnog smisla (+jIRNA), koji pripada rodu *Hepatovirus* unutar porodice *Picornaviridae* (Zell i sur., 2017). Nedavna istraživanja su pokazala evolucijsku razdvojenost virusa HAV od ostalih pripadnika porodice *Picornaviridae*, zbog razlika u nukleotidnoj sekvenci njegovog genoma i različite strukture njegove kapside (Stuart i sur., 2018). Njegov genom, veličine oko 7500 nukleotida, smješten je unutar proteinske kapside, koja je ikozaedrnog oblika i promjera oko 30 nm (Slika 1). Virion može, ali ne mora, imati i ovojnicu (Jiang i sur., 2014).

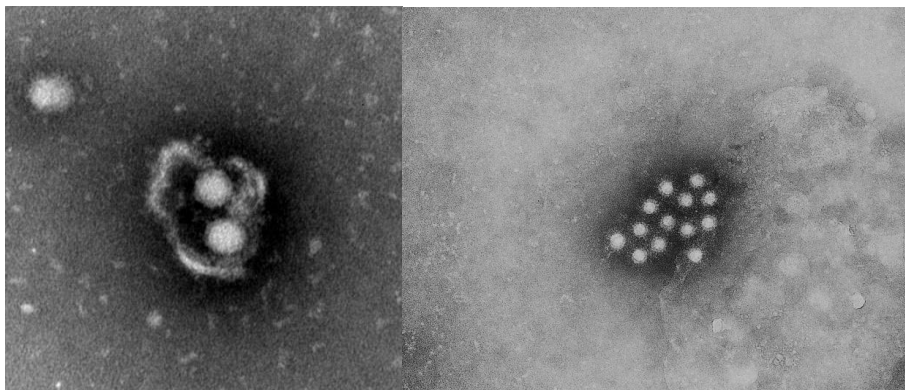


Slika 1. Ikozaedralni oblik kapside virusa hepatitisa A koja je građena od strukturnih proteina VP1, VP2 i VP3, udruženih u 12 pentamera.

Virus HAV može egzistirati u dva različita oblika, što mu omogućuje iznimnu prilagodbu na različite uvjete okoliša (Feng i sur., 2013). Primarni oblik su tzv. zrele „gole“ virusne čestice, a sekundarni čestica s lipidnom ovojnicom (eHAV) (Slika 2). U nedavnim istraživanjima objavljeno je da su oba oblika podjednako zarazna (Rowlands, 2015), ali jedino virusne čestice s ovojnicom mogu cirkulirati krvlju tijekom infekcije, dok se zrele “gole” čestice isključivo lociraju u probavnom sustavu i fecesu (Feng i sur., 2014).

Kapsida se sastoji od 60 protomera koje su građene od strukturnih podjedinica VP1, VP2 i VP3 na jednak način kao i kod ostalih predstavnika porodice *Picornaviridae*. Protomeri se udružuju u pentamere i heksamere, njih ukupno 12, koji daju ikozaedralni oblik same čestice (Jiang i sur., 2014).

Zahvaljujući iznimnoj stabilnosti kapside, virus HAV otporan je na kiseline i deterdžente, organska otapala te visoke temperature do čak 80 °C. Može egzistirati u svježoj i slanoj vodi te u sedimentu više od nekoliko mjeseci. Osjetljiv je na otopine klora i formalina, a može se inaktivirati autoklaviranjem pri 120 °C (Sattar i sur., 2000).



Slika 2. Elektromikroskopske snimke virusa hepatitisa A s lipidnom ovojnicom (A) (preuzeto iz Davis, 2013) i zrelih „golih“ virusnih čestica (B) (preuzeto iz <http://www.medical-labs.net/hepatitis-a-virus-hav-structure-2263/>).

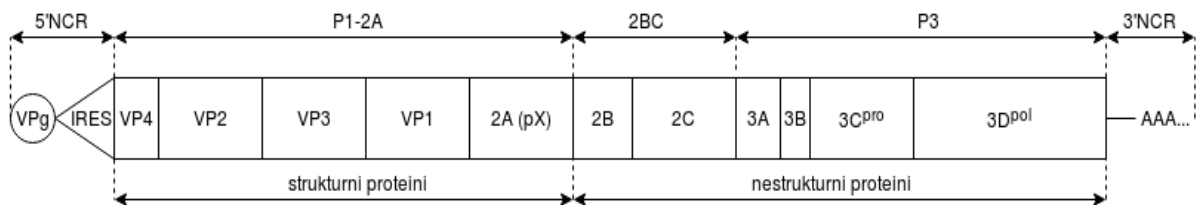
1.4.1. Organizacija genoma

Usporedbom sekvence genoma, razlikuje se šest različitih genotipova virusa hepatitisa A. Genotipovi koji inficiraju čovjeka su I, II i III, a većina ih pripada genotipu I, koji je podijeljen u podtipove A i B, od kojih je podtip A učestaliji od podtipa IB (Kaddoura i sur., 2020).

Kao i kod ostalih predstavnika porodice *Picornaviridae*, genom virusa hepatitisa A ima tri karakteristične regije (Slika 3): dvije krajnje nekodirajuće regije (NCR), tj. 5' i 3' krajevi genoma i središnje kodirajuće regije, koja obuhvaća najveći dio genoma (6681 pb) i čini otvoreni okvir čitanja (ORF). Sastoji se od dijela koji kodira za strukturne proteine i dijela koji kodira za nestrukturne proteine. Ovi dijelovi podijeljeni su u 3 domene: P1-2A, 2BC i P3. P1-2A regija sadrži tri glavna proteina kapside (VP2, VP3 i VP1) te protein (VP4) koji ima važnu ulogu u sastavljanju samog viriona i stvaranju pora na stanici domaćina. U regijama 2BC i P3 nalaze se geni koji kodiraju za replikacijske proteine i proteine vezane za promjene na membranama stanica

domaćina (McKnight i Lemon, 2018). Za proučavanje genske raznolikosti virusa i sekvenciranje, najznačajnija je hipervarijabilna regija VP1-2A duljine 1080 pb, koja se nalazi unutar domene P1-2A, odnosno dijelu genoma koji kodira za proteine kapside. Analiza nukleotidnih polimorfizama u VP1-2A regiji može ukazivati na prisutnost različitih virusnih varijanti prisutnih unutar nekog izolata (Wang i sur., 2013).

Glavna uloga otvorenog okvira čitanja je kodiranje za veliki poliprotein od približno 2230 aminokiselina, koji se zatim proteolitički cijepa u 10 cjelovitih i zrelih proteina pomoću virusnog enzima cisteinske proteinaze 3C^{pro} (McKnight i Lemon, 2018). Na regiju 5' NCR, duljine 735 pb, kovalentno je vezan mali protein, tzv. VPg, koji služi kao proteinska početnica pri sintezi nestrukturnih proteina, poput enzima RNA-polimeraze ovisne o RNA, nužnog enzima za umnažanje genoma. U 5' regiji također se nalaze karakteristični strukturni elementi koji služe kao mjesto vezanja ribosoma (IRES), što je mjesto inicijacije translacije. 3' NCR regija završava repom poli(A), što je karakteristika i stanične mRNA. Rep poli(A) je dugačak 63 pb i bogat sekundarnim strukturama RNA, koje nisu detaljno istražene. Njegova uloga je u inicijaciji umnažanja genoma i vezanju specifičnih proteina domaćina i/ili virusa koji su uključeni u nastajanje -jIRNA (McKnight i Lemon, 2018).

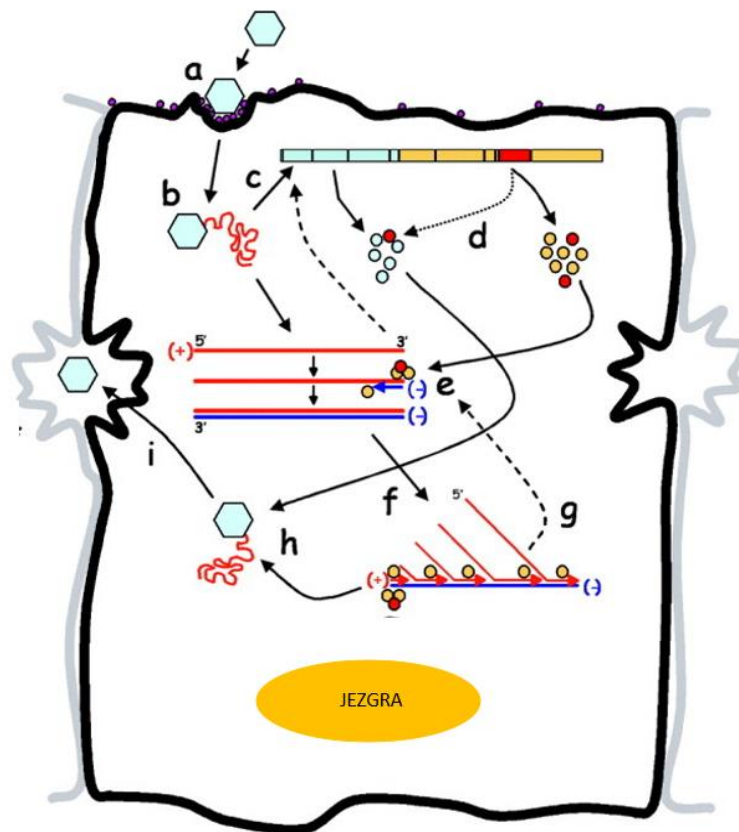


Slika 3. Organizacija i ekspresija genoma virusa hepatitisa A. Genom virusa HAV uključuje 5' i 3' nekodirajuće regije (NCR) i otvoren okvir čitanja (ORF). Regija ORF podijeljena je na P1-2A domenu unutar koje se nalazi hipervarijabilna regija VP1-2A te domene 2BC i P3.

1.4.2. Umnažanje virusa hepatitisa A

Virus hepatitisa A rasprostranjuje se konzumacijom kontaminirane hrane i vode, krvlju ili izravnim kontaktom zaražene osobe (Lugoboni i sur., 2012). Prije pojave simptoma može ga se detektirati u krvi, jetri ili slini (Feng i sur., 2014). Radi jednostavnijeg pregleda, ciklus umnožavanja virusa HAV može se podijeliti u 8 glavnih koraka (a-i; Slika 4). Prije same replikacije virusa koja se isključivo odvija u citoplazmi stanica jetre, kako bi ušao u stanicu, HAV se veže pomoću specifičnog proteina kapside za membranski receptor hepatocita HAVCR1 (Slika 4, a).

Međutim, osim navedenog receptora, postoji receptor na CD4+ T limfocita koji ima sličnu ulogu kao receptor na hepatocitima (Silberstein i sur., 2003). Vezanje HAV-a za receptor T limfocita inducira privremeno isključivanje T limfocita i utišavanje imunskog odgovora domaćina (Manangeeswaran i sur., 2012), što omogućuje virusu slobodan ulazak u citoplazmu hepatocita. Nije potpuno razjašnjen mehanizam ulaska obavijenog oblika čestice (eHAV) koji je krvlju donesen do stanica jetre, ali znanstvenici smatraju da se ovaj proces odvija putem endocitoze posredovane klatrinom, na način da se lipidna ovojnica razgradi lizosomskim enzimima što omogućava oslobađanje kapside od ovojnice i pristup specifičnom staničnom receptoru (Lemon i sur., 2018). Nakon specifičnog vezanja za receptor, samu penetraciju kroz membranu omogućuje mu virusni protein VP4, tako da uzrokuje nastajanje pora u membrani stanice kroz koje se neobavijeni oblik virusne čestice može transportirati u citoplazmu (McKnight i Lemon, 2018). Nakon ulaska dolazi do razgradnje kapside proteolitičkim enzimima i oslobađanja virusnog genoma (Slika 4, b). Struktura IRES omogućava početak translacije (Slika 4, c), što je sinteza virusnog poliproteina (Slika 4, d). Iz jednog velikog poliproteina proteolitičkim cijepanjem pomoću virusnog enzima proteinaze 3C^{pro} nastaju strukturni proteini i proteini uključeni u umnažanje genoma (Sadahiro i sur., 2018) (Slika 4, e). Replikacijski proteini se međusobno sklapaju u funkcionalni enzim i započinju sintezu negativnog lanca virusnog genoma. Ti negativni lanci kasnije služe kao kalup za sintezu brojnih kopija +jIRNA (Slika 4, f). Neke od novosintetiziranih +jIRNA služe kao kalup iz kojih se ponovno sintetiziraju nove -jIRNA (Slika 4, g), a preostale +jIRNA se pakiraju u nove virusne čestice (Slika 4, h). Prilikom oslobađanja iz stanica jetre pupanjem, nove virusne čestice stječu ovojnicu (Feng i sur., 2014) (Slika 4, i). Takve virusne čestice s ovojnicom (eHAV) preko žučnog kanala odlaze do probavnog sustava, gdje se oslobode ovojnice te kao zrele virusne čestice izlaze van iz organizma (McKnight i Lemon, 2018).



Slika 4. Ciklus umnožavanja virusa hepatitisa A može se podijeliti u 8 koraka: a) prepoznavanje i vezanje na specifične membranske receptore; b) penetracija endocitozom u stanicu domaćina, razgradnja kapside i oslobađanje genoma u citoplazmu; c) početak translacije virusnog poliproteina d) translacija virusnog poliproteina; e) sinteza strukturalnih i nestrukturalnih virusnih proteina; f) sinteza -jRNA koja služi kao kalup za sintezu novih kopija +jRNA; g) neke od novosintetiziranih +jRNA ponovno se koristi za sintezu -jRNA; h) sklapanje virusnih dijelova u nove virusne čestice; te i) oslobađanje virusa iz stanice (preuzeto i prilagođeno prema Martin i Lemon, 2006)

1.4.3. Epidemiologija

Osim fekalno-oralnim putem, kao glavnog načina rasprostranjivanja, virus hepatitisa A može se prenijeti i spolnim putem, pretežito kod muške homoseksualne populacije (MSM) (Ndumbi i sur., 2018). Smatra se da je HAV glavni uzročnik akutne bolesti jetre u svijetu i jedini hepatotropni virus koji se može kultivirati *in vitro* (Provost i sur., 1981). Bolest se manifestira asimptomatski ili simptomatski, a upalno stanje obično je akutno te se ponekad može razviti u kronično (Setyowati i sur., 2019). Zaražena osoba virus može prenositi čak dva tjedna prije pojave simptoma bolesti, a pojavom simptoma smanjuje se mogućnost zaraze zbog utjecaja specifičnih antitijela na HAV (Feng i sur., 2014). Inkubacijski period virusa traje prosječno 28 dana (15-50

dana), dok sama bolest obično ne traje dulje od dva mjeseca. Bolest obično naglo počinje pojavom vrućice, slabosti, anoreksije, mučnine i nelagode u trbuhu, praćena tamnim urinom te žuticom (<https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hepa.html>). Virus HAV ne uzrokuje značajan citopatski efekt, a pacijenti se uglavnom spontano oporavljaju od bolesti uzrokovane ovim virusom (Lanini i sur., 2017). Iz navedenog razloga, glavne mjere zaštite protiv ove bolesti su održavanje osnovnih higijenskih uvjeta i odgovorno spolno ponašanje, a ponekad ako je potrebno i cijepljenje (<https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/epidemija-hepatitisa-a-u-europskim-zemljama/>).

Broj oboljelih od hepatitisa A u Hrvatskoj bitno se smanjio u posljednjih 50 godina, čemu su znatno pridonijeli poboljšani uvjeti života i podizanje higijenskih navika. Međutim, u 2017. i 2018. zabilježen je porast broja oboljelih osoba, pretežito u populaciji muškarca koji imaju spolne odnose s muškarcima, a kao posljedica “međunarodne epidemije hepatitisa A” od kojih je oko polovica bila pozitivna i na virus humane imunodeficijencije (HIV). Sekvenciranje dijela virusnog genoma hrvatskih izolata, potvrdilo je infekciju dvama sojevima: UK/Spain (VRD_521_2016) i Europride (RIVM-HAV-069), koji se povezuju uz povorke ponosa za koje se smatra da su bile žarišta epidemije (Petrovčić, 2017). Vrhunac epidemije u Europi zabilježen je u ožujku 2017. godine, dok je u Hrvatskoj evidentiran godinu dana kasnije (<https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-hepatitis-outbreak-eueea-mostly-affecting-men-who-have-sex-men-2>).

1.4.4. Detekcija i molekularna karakterizacija

Najjednostavniji princip detektiranja bolesti uzrokovane virusom HAV temelji se na serološkoj prisutnosti specifičnih antitijela u serumu ili na direktnoj detekciji virusa nekom od molekularnih metoda (<https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/hepatitis-a>). Molekularnim testovima, poput lančane reakcije polimerazom uz reverznu transkripciju (RT-PCR) detektiraju se virusni geni koji se kasnije mogu detaljnije molekularno karakterizirati u svrhu genotipizacije izolata (Nainan i sur., 2006). Lančana reakcija polimerazom (PCR) je metoda, koju je patentirao Kary Mullis 1984. godine. Iz početnog malog uzorka, u prisustvu termostabilnog enzima, umnožava veliki broj identičnih sekvenci, koje se kasnije mogu koristiti u daljnjoj analizi (Hutin i sur., 1999). Pomoću enzima reverzne transkriptaze se prevodi u DNA. Nakon metode RT-PCR često se radi tzv. ugniježđeni PCR, uz korištenje specifičnih

početnica za kraću regiju unutar izvornog amplikona kako bi se povećala specifičnost umnožavanja i postigla što veća količina umnoženog produkta.

Pri molekularnoj karakterizaciji virusa HAV najčešće se koristi hipervarijabilna regija VP1-2A (Coudray-Meunier i sur., 2014). Za potrebe identifikacije i karakterizacije virusnih varijanti prisutnih unutar pojedinog izolata, nužno je odrediti nukleotidni slijed virusnog genoma. Nadalje, iz poznate nukleotidne sekvence moguće je odrediti aminokiselinski slijed, čime se mogu detektirati promjene na proteinskoj razini. Iako postoje različite metode sekvenciranja DNA nove generacije, najjeftinija i najčešće korištena metoda je Sangerova metoda sekvenciranja. Utvrđivanje nukleotidnog slijeda i detektiranje mutanata, odnosno različitih virusnih varijanti unutar pojedinog uzorka od velike je važnosti prilikom određivanja selekcijskog pritiska na virus, analiziranja ponašanja virusne populacije u promijenjenim uvjetima okoliša te praćenja puta rasprostranjivanja virusa u populaciji (Hussain i sur., 2005).

Rutinska dijagnostika virusa HAV podrazumijeva genotipizaciju izolata, odnosno njegove konsenzus sekvence, ali ne i molekularnu karakterizaciju virusnih varijanti unutar kvazivrste. Za ovakvu analizu nužno je razdvojiti različite virusne varijante umnožene metodom PCR, postupkom TA-kloniranja te analizirati njihove pojedinačne sekvence bez ili s prethodnom identifikacijom (Zhou i Gomez-Sanchez, 2000). Ključan preduvjet za TA-kloniranje je dodatak tzv. poli A repova na 3' krajeve DNA fragmenata pomoću enzima *Taq* polimeraze tijekom umnažanja. U ovom načinu kloniranja koriste se komercijalno dostupni T vektori, najčešće plazmidi, koji na svojim 3' krajevima sadrže poli T repove. Zbog komplementarnosti T repova s poli A repovima PCR produkta dolazi do ugradnje umnoženih fragmenata DNA u plazmidni vektor. Ovakvim plazmidom transformiraju se bakterijske stanice, pri čemu svaka bakterija i njena kolonija sadrže samo jedan plazmid s ugrađenom jednom virusnom varijantom (Zhou i Gomez-Sanchez, 2000). Radi jednostavnosti i smanjenja troškova sekvenciranja velikog broja sekvenci dobivenih iz plazmida transformiranih bakterija, različite inserte umnožene metodom PCR moguće je identificirati metodom analize polimorfizma konformacije jednolančanih molekula DNA (metoda SSCP) (Thermo Scientific, 2010), a zatim ih vizualizirati postupkom tzv. bojanja srebrom. Metoda SSCP vrlo je jednostavna i ekonomična metoda koja omogućuje otkrivanje malih razlika u slijedu nukleotida. Ovisno o razlikama u nukleotidnom slijedu, molekule j1DNA zauzimaju različite konformacijske oblike koji se posljedično razlikuju u elektroforetskoj pokretljivosti. Na temelju navedenoga, ovom metodom mogu se jednostavno identificirati molekule jednake duljine, a različitog nukleotidnog slijeda. Međutim, ova metoda ne daje nikakve detalje o prirodi mutacija stoga je nužno za karakterizaciju sekvenci utvrditi nukleotidni slijed metodom sekvenciranja

(Thermo Scientific, 2010). Korištenjem računalnih analiza nukleotidnih sljedova, može se detaljno odrediti priroda mutacija i njihov biološki značaj unutar različitih virusnih varijanti kvazivrste.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Kao posljedica međunarodne epidemije hepatitisa A, u Hrvatskoj je u periodu od 2017. do 2019. godine zabilježen povećan broj osoba zaraženih virusom hepatitisa A. Uzorci su uzeti u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, a dijagnostičkom obradom utvrđeno je da virusni izolati pripadaju genotipu IA. U sklopu prethodnog istraživanja za izradu rada za Rektorovu nagradu (Emanuela Adrović i Josipa Kuzle) analizirane su populacije 13 virusnih izolata te je utvrđena njihova kompleksna struktura. Izolati su sadržavali dominantan virusni genotip te različiti broj mutanata koje su bile manje ili više srodne dominantnoj varijanti.

Kako promjene u virusnom genomu mogu rezultirati promjenama u antigenim svojstvima virusa, cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi brojnost i prirodu mutacija kod svih analiziranih genomskih varijanti, njih ukupno 68, navedenih 13 uzoraka.

Specifični ciljevi:

- 1) Metodom TA-kloniranja genomske regije VP1-2A razdvojiti različite genomske varijante virusa hepatitisa A prisutne u populacijama virusnih izolata iz 13 pacijenata
- 2) Metodom analize polimorfizma konformacije jednolančanih molekula DNA (SSCP) identificirati i kvantificirati različite virusne varijante te ih odabrati za sekvenciranje
- 3) Analizom sekvenci identificirati mutacijske događaje, utvrditi njihovu brojnost i prirodu mutacija
- 4) Translacijom nukleotidnih sljedova utvrditi značaj zabilježenih mutacija na proteinskoj razini

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biološki uzorci

U istraživanje je uključeno 13 uzoraka iz pacijenata s detektiranom akutnom infekcijom hepatitisa A 2017., 2018. i 2019. godine, tijekom trajanja europske epidemije. Pet od navedenih pacijenata imalo je i dokazanu koinfekciju virusom HIV. Uzorci su uzeti i genotipizirani u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. Popis analiziranih uzoraka i njihove karakteristike navedene su u tablici 1.

Tablica 1. Prikaz analiziranih uzoraka inficiranih virusom hepatitisa A i njihovih karakteristika

Oznaka uzorka	Soj uzorka	Koinfekcija s virusom HIV
17 001	UK/Spain	NE
17 002	UK/Spain	NE
17 003	UK/Spain	DA
17 004	UK/Spain	DA
17 006	UK/Spain	NE
17 007	UK/Spain	NE
17 009	UK/Spain	DA
17 011	UK/Spain	DA
18 001	UK/Spain	NE
18 003	UK/Spain	DA
18 008	Europride	NE
18 011	UK/Spain	NE
19 019	Europride	NE

U navedenoj nomenklaturi uzoraka prvi broj označava godinu uzorkovanja, a preostale tri znamenke šifre pojedinog pacijenta.

3.1.2. Otopine, puferi i reagensi

Radi bolje preglednosti, popis svih korištenih otopina, pufera i reagensa korištenih u ovom istraživanju, navela sam u tablici 2, a zatim sam od najvažnijih objasnila i razlog primjene u poglavlju „Metode“.

Tablica 2. Popis priređenih otopina, pufera i reagensa te njihov sastav

Naziv reakcijske smjese	Sastojci reakcijske smjese	Molarna koncentracija sastojaka	Konačni volumen reakcijske smjese
Agarozni gel (1%)	TBE pufer Agaroz	1X	30 ml (mali gel) ili 80 ml (veliki gel)
TBE pufer	TRIS Boratna kiselina EDTA	90 mM 90 mM 1 mM, pH 8,3	100 ml
LB tekući medij	Bakto-tripton Kvasčev ekstrakt Natrijev klorid Sterilna voda	10 mg/ml 5 mg/ml 5 mg/ml	250 ml
LB kruti medij	Bakto-agar LB tekući medij	15 mg/ml	250 ml
Otopina ampicilina	Ampicilin Sterilna voda	50 mg/ml	1 ml
Otopina izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozida	IPTG Sterilna voda	100 mM	1 ml
Otopina 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozida	X-Gal N,N- dimetilformamid	20 mg/ml 99,98%	1 ml
Pufer za denaturaciju dvolančane DNA	Formamid EDTA Bromfenol plavo	95% 0,5 M, pH 8	1 ml
Poliakrilamidni gel (5%)	TBE pufer Akrilamid Bisakrilamid Amonijev persulfat TEMED Sterilna voda	1X 40% 2% 10%	10 ml
Octena kiselina (10%)	Octena kiselina Sterilna voda	99,5%	250 ml
Nitratna kiselina (1%)	Nitratna kiselina Sterilna voda	65%	250 ml
Otopina srebrovog nitrata	Srebrov nitrat Formaldehid Sterilna voda	2 mg/ml 36%; 1,63 ml/l	250 ml
Otopina natrijevog tiosulfata pentahidrata	Natrijev tiosulfat pentahidrat Sterilna voda	2 mg/ml	12 ml
Otopina za razvijanje	Natrijev karbonat Formaldehid Otopina natrijevog tiosulfata pentahidrata Sterilna voda	60 mg/ml 1,63 ml/l 4 mg/l	250 ml

Sve početnice koje sam koristila u ovom istraživanju navela sam u tablici 3, uključujući njihov točan položaj vezanja za genom te nukleotidni sastav.

Tablica 3. Prikaz sekvenci oligonukleotidnih početnica korištenih tijekom postupka lančane reakcije polimerazom

Naziv početnice	Pozicija u genomu	Sekvenca (5'-3')
VP1f1 homologna	2167-2192nt	GTTTTGCTTTCCTTTATCATGCTATG
VP1r1 komplementarna	3384-3363nt	CATTTATCTCAAGAGTTACAC
VP1Nf2 homologna	2181-2200nt	TATCATGCTATGGATGTTAC
VP1Nr2 komplementarna	3286-3267nt	TTCATTATTTTCATGCTTTC
M13/pUC homologna	lacZ	CGTTAGGGTTTTTTCAGTCCACGAC
M13/pUC komplementarna	lacZ	CAGGAAACAGCTATGAC

3.1.2.1. Korišteni kompleti reagensa

Applied Biosystems™ GeneAmp™ RNA PCR Core Kit (Fisher Scientific, SAD), komplet za reverznu transkripciju (RT) i reakciju poliadenilacije

Q5 High-Fidelity PCR Kit (New England BioLabs, USA), komplet za lančanu reakciju polimerazom (PCR) i ugniježđeni PCR

SYBR™ Safe DNA Gel Stain, (Invitrogen, SAD), boja za vizualizaciju DNA tijekom elektroforeze

100bp DNA Ladder (New England BioLabs, SAD, molekularni marker za određivanje veličine fragmenata

InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, SAD), komplet za postupak ligacije u plazmidni vektor i transformaciju bakterijskih stanica

GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, USA), komplet za analizu rekombinantnih početnica i PCR s M13/pUC

3.1.2.2. Korišteni uređaji

PCR uređaj *Thermal Cycler 2720 Applied Biosystems*

UV-transiluminator *Sigma T2202, Sigma*, za vizualizaciju dobivenih fragmenata

Centrifuga 5430 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

Uređaji za elektroforezu na agaroznom gelu (*Bio-Rad, SAD*)

Uređaj za vertikalnu elektroforezu na poliakrilamidnom gelu *Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoreses Cell* (Bio-Rad, SAD)

Uređaj za sušenje toplim zrakom *GelAir Drying Frame Assembly Procedure* (Bio-Rad, SAD)

3.1.2.3. Korišteni računalni programi

Za detaljnu analizu dobivenih sekvenci, koristila sam računalne programe koje sam navela u tablici 11.

Tablica 4. Prikaz računalnih programa i primjena u analizi nukleotidnih sljedova

Računalni program	Autor	Kratki opis
Sequencher, verzija 5.4	Gene Codes Corporation, SAD, 2016	Analiza dobivenih kromatograma
Clustal X, verzija 1.2.2	Univeristy College Dublin, Ireland, 2016	Sravnjivanje sekvenci
BioEdit Sequence Alignment Editor, verzija 7.2.5	Thomas A. Hall, 2013	Uređivanje i pregledavanje sravnjenih sekvenci
MEGA X (Molecular Evolutionary Genetic Analysis), verzija 10.1.8	Institute for Genomics and Evolutionary Medicine, PA, SAD, 2018	Translacija nukleotidnih sekvenci; filogenetske i evolucijske analize upotrebom različitih metoda
PDFTRON, (PDF Measuring Tool)	British Columbia, Canada, 2020	Mjerenje udaljenosti između vrpce unutar SSCP-profila https://www.pdftron.com/pdf-tools/pdf-measurement/

3.2. METODE

3.2.1. Reverzna transkripcija, lančana reakcija polimerazom (RT-PCR) i ugniježđeni PCR

Umnažanje hipervarijabilne regije VP1-2A provodila sam u tri zasebna koraka: i) reverzna transkripcija (RT); ii) lančana reakcija polimerazom (PCR); iii) ugniježđeni PCR. Za postupak reverzne transkripcije RNA u cDNA koristila sam reakcijsku smjesu volumena 20 μ l (Tablica 5). Reakcija je provedena uz korištenje nasumičnih heksamera kao početnica prema uputama proizvođača. Za ograničenu količinu početnog uzorka, ova metoda je vrlo učinkovita i specifična. Koristila sam enzim reverznu transkriptazu, odnosno RNA – ovisnu DNA polimerazu, podrijetlom iz virusa mišje leukemije (engl. *Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, MuLV). Reakciju reverzne transkripcije provodila sam prema tablici 6.

Tablica 5. Komponente reakcijske smjese za postupak reverzne transkripcije

Komponenta reakcijske smjese	Količina (μ l)
PCR pufer II (10X)	2
MgCl ₂ (25 mM)	4
Smjesa PCR nukleotida (10 mM)	2
Nasumični heksameri (50 μ l)	1
Inhibitor RNaze (20 U/ μ l)	1
MuLV reverzna transkriptaza (50 U/ μ l)	1
Izolirana RNA	5
Voda osolobodena nukleaza	4
Konačni volumen	20

Tablica 6. Prikaz reakcijskog ciklusa reverzne transkripcije genoma virusa hepatitisa A

Reakcijski ciklus	Inkubacija	Reverzna transkripcija	Zaustavljanje reakcije
Broj ciklusa		1 ciklus	
Vrijeme	10 min	20 min	5 min
Temperatura	Sobna temperatura	42 °C	99 °C

Nakon reakcije reverzne transkripcije zasebno sam obavila lančanu reakciju polimerazom (RT-PCR). Reakcijsku smjesu iz reverzne transkripcije dodala sam novoj smjesi pri čemu je konačni volumen druge smjese iznosio 25 μ l (Tablica 7). Za drugu smjesu sam koristila polimerazu, koja ima sposobnost ispravljanja krivo ugrađenih nukleotida, čime se povećava točnost

umnažanja genoma. Koristila sam specifične početnice VP1f1 i VP1r1 za dio regije VP1-2A genoma virusa (Tablica 3). Korištena negativna kontrola služila je kao indikator potencijalne kontaminacije, a sadržavala je sterilnu vodu umjesto kalupa. Postupak reakcijskih ciklusa prikazani su u tablici 8.

Tablica 7. Komponente reakcijske smjese za postupak lančane reakcije polimerazom

Komponenta reakcijske smjese	Količina (μl)
Smjesa Q5 (2X)	12,5
VP1f1 početnica (200 nM)	0,25
VP1r1 početnica (200 nM)	0,25
cDNA	1
Voda oslobođena nukleaza	11
Konačni volumen	25

Tablica 8. Prikaz reakcijskog ciklusa lančane reakcije polimerazom pri umnožavanju dijela VP1-2A regije genoma virusa hepatitisa A

Reakcijski ciklus	Denaturacija	Razdvajanje lanaca	Sparivanje početnica i kalupa	Produljenje lanaca	Završna elongacija
Broj ciklusa	1 ciklus		45 ciklusa		1 ciklus
Vrijeme	2 min	0.5 min	0.5 min	1.5 min	7 min
Temperatura	94 °C	94 °C	58 °C	72 °C	72 °C

Radi postizanja što veće koncentracije i specifičnosti amplifikacije, nakon RT-PCR reakcije, dobivene produkte sam umnožila metodom ugniježdene lančane reakcije polimerazom uz upotrebu početnica VP1Nf2 i VP1Nr2 (Tablica 3) specifičnih za VP1-2A regiju genoma virusa HAV. Konačni volumen smjese također je bio 25 μl , a korišteni kompleti reagensa su isti kao i za RT-PCR s nešto drugačijim omjerom pojedinih sastojaka smjese (Tablica 9). Ugniježdjeni PCR također se provodi u 45 ciklusa kako je prikazano u tablici 10. Nakon završetka reakcije PCR, s ciljem detekcije umnoženih fragmenata odgovarajuće veličine, provodila sam elektroforezu na 1%-tnom agaroznom gelu uz upotrebu 1X TBE pufera. Elektroforeza se odvijala pri naponu od 110 V tijekom 45 min na sobnoj temperaturi u uređajima za elektroforezu koji imaju veličinu gelova 7 x 10 cm i 15 x 10 cm. Za veći uređaj sam napravila 80 ml agaroznog gela uz dodatak 2 μl boje za vizualizaciju DNA, a za manji 30 ml gela s 0,7 μl iste boje. Volumen PCR produkta u jažicama je iznosio 5 μl . Za određivanje veličine fragmenata koristila sam molekularni marker *100bp DNA Ladder* koji ima raspon fragmenata između 100 pb i 1517 pb priređen prema uputi proizvođača.

Tablica 9. Komponente reakcijske smjese za postupak ugniježdene lančane reakcije polimerazom

Komponenta reakcijske smjese	Količina (μ l)
Smjesa Q5 (2X)	12,5
VP1Nf2 početnica (200 nM)	0,2
VP1Nr2 početnica (200 nM)	0,2
PCR produkt	0,5
Voda oslobođena nukleaza	11,6
Konačni volumen	25

Tablica 10. Prikaz reakcijskog ciklusa ugniježdene lančane reakcije polimerazom pri umnožavanju dijela VP1-2A regije genoma virusa hepatitisa A

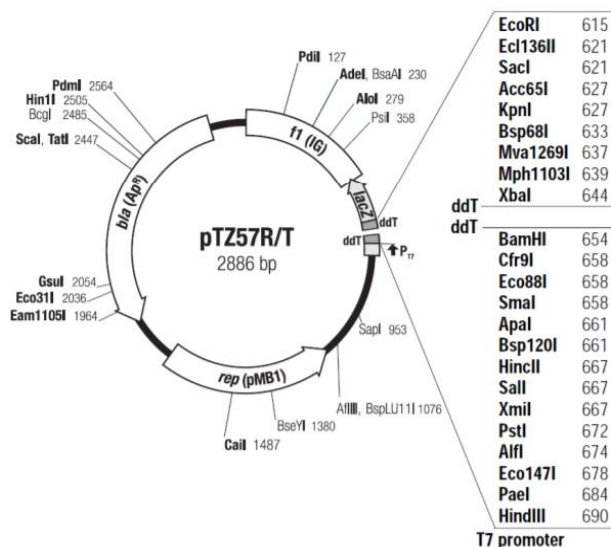
Reakcijski ciklus	Denaturacija	Razdvajanje lanaca	Sparivanje početnica i kalupa	Produljenje lanaca	Završna elongacija
Broj ciklusa	1 ciklus		45 ciklusa		1 ciklus
Vrijeme	2 min	0.5 min	0.5 min	1 min	7 min
Temperatura	94 °C	94 °C	58 °C	72 °C	72 °C

3.2.2. Reakcija poliadenilacije i ugradnja umnoženih odsječaka DNA u plazmidni vektor

Prije ugradnje umnoženih PCR produkata u plazmidni vektor, potrebno im je sintetizirati poli A repove na 3' kraj novosintetiziranih lanaca budući da korištena polimeraza, koja ispravljajući krivo ugrađene nukleotide ne sintetizira poli A repove. Reakcijska smjesa je rađena prema tablici 11, a konačni volumen smjese iznosio je 10,2 μ l. Smjesu sam inkubirala u PCR uređaju 30 minuta pri 72°C. TA-kloniranjem razdvajaju se različite virusne varijante iz populacije mutanata umnožene PCR metodom pri čemu se ampliconi ugrađuju u plazmidni vektor pTZ57R/T, na način da se umnoženi odsječci DNA komplementarno vežu sintetiziranim poli A repovima na 3'-ddT-krajeve vektora. Linearizirani plazmidni vektor pTZ57R/T dobiven je cijepanjem pomoću restriktivnog enzima *Eco321* i tretiran terminalnom deoksinukleotidil – transferazom, čime su mu na krajeve dodani 3'-ddT-repovi (Slika 5).

Tablica 11. Komponente reakcijske smjese za postupak poliadenilacije

Komponenta reakcijske smjese	Količina (μ l)
PCR pufer (5X)	2
MgCl ₂ (25 mM)	1
dATP (10 mM)	0,2
PCR produkt	6
Konačni volumen	10,2



Slika 5. Mapa restrikcijskih mjesta u vektoru pTZ57R/T korištenog za ligaciju s istaknutim mjestom za ugradnju željenog inserta (preuzeto iz uputa kompleta reagensa *InsTAclone PCR Cloning Kit*, Thermo Scientific, SAD)

Kako bih odredila koncentraciju analiziranih fragmenata usporedila sam ih s koncentracijom fragmenata molekularnog markera. Maksimalna količina korištenog PCR produkta potrebna za reakciju ligacije iznosi 4 μ l. Konačni volumen reakcijske smjese ligacije je 30 μ l (Tablica 12). Smjesu sam inkubirala 1 h na sobnoj temperaturi, a zatim preko noći u hladnjaku pri 4 °C. Kao kontrolu ligacije koristila sam kontrolni PCR fragment, koji sadrži pročišćeni amplicon veličine 953 pb umnožen enzimom DNA polimerazom, koja dodaje nukleotide na 3' – kraj PCR-produkta.

Tablica 12. Komponente reakcijske smjese za postupak ligacije

Komponenta reakcijske smjese	Količina (μl)
Plazmidni vektor pTZ57R/T (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	3
Ligacijski pufer (5X)	6
T4 DNA ligaza (5 U/ μl)	1
PCR produkt	4
Voda oslobođena nukleaza	16
Konačni volumen	30

3.2.3. Priređivanje bakterijskih kompetentnih stanica za postupak transformacije

Prije postupka transformacije uzela sam koloniju bakterije *E. coli* soja XL1 – Blue, koja je rasla preko noći na LB krutom mediju u inkubatoru na 37 °C i prenijela je u 1,5 ml pregrijanog TransformAid™ C-medija, koji je izrazito hranjiv i potiče brzi rast kolonija. Inkubacija kolonija se odvijala na termostatskoj treskalici 2 h pri 37 °C uz stalnu trešnju na 200 rpm, u epruvetama većeg volumena radi veće dostupnosti zraka. Nakon inkubacije, umnožene sam bakterije centrifugirala 1 minutu na 10000 x g. Nastali supernatant sam odlila, a talog s bakterijama otopila u 300 μl otopine TransformAid™ T priređene prema tablici 13 i inkubirala na ledu 5 minuta. Zatim sam ponovila postupak centrifugiranja, a novonastali talog otopila u 120 μl T-otopine i ponovila inkubaciju na ledu 5 minuta. Nakon ove procedure kompetentne bakterijske stanice su spremne za postupak transformacije.

Tablica 13. Komponente priređene T otopine

Komponente T otopine	Količina (μl)
TransformAid™ A otopina	250
TransformAid™ B otopina	250
Konačni volumen	500

Za postupak transformacije kompetentnih stanica s ranije priređenim plazmidima u kojima je ugrađen željeni insert, u priređenu otopinu kompetentnih stanica (50 μl) dodala sam 2,5 μl ligacijskog produkta prethodno izvađenog iz hladnjaka i inkubiranog 2 minute na ledu, uključujući i kontrolni plazmid s insertom, koji je služio kao kontrola transformacije. Inkubacija transformiranih stanica je trajala 5 minuta na ledu.

Prije razmazivanja transformiranih kolonija s ugrađenim insertom na LB kruti medij, u razliveni LB medij dodala sam ampicilin koncentracije 50 mg/ml, a nakon skrućivanja razmazala

po 40 μ l izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG) koncentracije 100 mM i 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozida (X-Gal) koncentracije 20 mg/ml kako bih ostvarila postupak plavo bijele selekcije. Na tako priređene podloge, razmazivala sam 25 μ l smjese kompetentnih bakterijskih kolonija s ugrađenim insertom. Petrijeve zdjelice s razmazima sam inkubirala preko noći na 37 °C.

3.2.4. Analiza transformiranih bakterijskih stanica

Iz preko noćne bakterijske kulture identificirala sam bakterije transformirane plazmidom pTZ57R/T kao bijele kolonije. Naime, ugradnja inserta u plazmid inaktivira *lacZ* gen koji kodira za β -galaktozidazu, kojoj IPTG služi kao induktor. Uloga β -galaktozidaze je razgradnja šećera X-Gal analoga laktoze, stoga kolonije koje nemaju ugrađeni insert mogu razgraditi X-Gal pri čemu nastaje plavo obojenje kolonija, dok one s insertom to ne mogu te ostaju neobojene (bijele).

Radi dodatne provjere da uistinu transformirane bakterije sadrže željeni insert te dobivanja većeg broja virusnih varijanti, iz svake sam petrijeve zdjelice odabrala oko 25 nasumično izabranih bijelih kolonija, koje sam koristila kao kalup za reakciju PCR uz upotrebu istih početnica kao i kod priređivanja inserta (Tablica 3). U reakcijsku smjesu konačnog volumena od 25 μ l (Tablica 14) dodala sam malu količinu bijelih kolonija, uzetih pomoću sterilnog nastavka za pipetu. Radi velikog broja reakcija, iz financijskih sam razloga za umnožavanje koristila *Taq* polimerazu. Reakcijski ciklusi su se odvijali prema protokolu za navedenu metodu (Tablica 15). U svaku reakciju sam uključila i negativnu kontrolu (sterilnu vodu) radi provjere točnosti PCR reakcije. Kao u slučaju prethodno provedenih PCR reakcija, prisutnost amplikona sam provjerila elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu po istom principu. Za analizu SSCP uzela sam po 20 pozitivnih PCR produkata svakog izolata.

Tablica 14. Komponente reakcijske smjese za postupak metode PCR pri detekciji željenog inserta u transformiranim bakterijama

Komponenta reakcijske smjese	Količina (μ l)
PCR pufer (5X)	5
MgCl ₂ (25 mM)	2
Smjesa PCR nukleotida (10 mM)	0,5
VP1Nf2 početnica (200 nM)	0,25
VP1Nr2 početnica (200 nM)	0,25
Taq polimeraza (5 U/ μ l)	0,125
Voda oslobođena nukleaza	16,875
Konačni volumen	25

Tablica 15. Prikaz reakcijskog ciklusa lančane reakcije polimerazom pri detekciji željenog inserta u transformiranim bakterijama

Reakcijski ciklus	Denaturacija	Razdvajanje lanaca	Sparivanje početnica i kalupa	Produljenje lanaca	Završna elongacija
Broj ciklusa	1 ciklus		30 ciklusa		1 ciklus
Vrijeme	5 min	0.5 min	0.5 min	0.75 min	5 min
Temperatura	94 °C	92 °C	52 °C	72 °C	72 °C

3.2.5. Analiza polimorfizma konformacije jednolančanih molekula DNA (SSCP) i postupak bojanja srebrom

Koristila sam metodu analize polimorfizma konformacije jednolančanih molekula DNA (SSCP) s ciljem identifikacije i kvantifikacije različitih varijanti prisutnih u populaciji pojedinog uzorka. Na temelju razlika u dobivenim SSCP profilima, moguće je utvrditi razlike u nukleotidnom slijedu umnoženog gena. Prije vertikalne elektroforeze na poliakrilamidnom gelu, ampikone je potrebno denaturirati u puferu za denaturaciju (Tablica 2). U 2 μ l PCR-produkta dodala sam 8 μ l denuracijskog pufera. Denaturacija se odvijala u PCR uređaju 5 minuta na 92 °C, a zatim inkubacija 5 minuta na ledu. Vertikalnu elektroforezu sam provodila 3 h na naponu od 200 V u hladnjaku uz dodatak TBE pufera. Za vizualizaciju dobivenih SSCP-profila, gelove sam bojala srebrom. Cijeli postupak bojanja odvijao se na treskalici pri sobnoj temperaturi. Nakon elektroforeze, kako bih fiksirala gelove, uronila sam ih u svježe pripremljenu 10%-tnu otopinu octene kiseline u trajanju od minimalno 20 minuta. Zatim sam ih ispirala 3 puta po tri minute u sterilnoj vodi. Nakon ispiranja, gelove sam prebacila u 1%-tnu otopinu nitrata kiseline i inkubirala tri minute te ponovila postupak ispiranja vodom kao u prethodnom slučaju. Isprane sam gelove inkubirala 30 minuta u otopini srebrovog nitrata (priređenoj prema tablici 2) u mraku kako srebro ne bi promijenio svojstva na svjetlu. Nakon još jednog ispiranja u trajanju od četiri minute, gelovi se inkubiraju u otopini razvijača do pojave obojenja. Zaustavila sam reakciju ponovnom inkubacijom gelova 5 minuta u 10%-tnoj otopini octene kiseline. Kako bih se izgubio miris octene kiseline ponovila sam postupak ispiranja sterilnom vodom (3 puta po 3 minute). Gelove sam sušila toplim zrakom u uređaju prema protokolu proizvođača.

3.2.6. Odabir virusnih haplotipova za sekvenciranje

Na osušenim gelovima svakog uzorka usporedila sam dobivene SSCP-profile i pomoću *PDFTRON* programa izmjerila razmake između vrpki kako bih što preciznije odredila razliku među haplotipovima. Produkte PCR SSCP-profila uzoraka za koje sam pretpostavila da su drugačiji od ostalih, pripremila sam za slanje na sekvenciranje, tako da sam ponovno uzela bakterijske kolonije koje su dale pozitivan rezultat i izravno provela PCR s univerzalnim početnicama M13/pUC (Tablica 3). Ove početnice se specifično vežu za regiju plazmida, gdje je umnoženi fragment veći od ugrađenog inserta pa je time osigurano sekvenciranje čitavog slijeda nukleotida željenog inserta. Volumen PCR smjese iznosi 50 μ l prema uputama prikazanim u tablici 16, dok su reakcijski ciklusi umnažanja prikazani u tablici 17. Provjerila sam uspješnost PCR metode elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu i poslala na sekvenciranje po Sangeru u tvrtku *Macrogen EU* (Nizozemska). Nakon sekvenciranja, sljedove nukleotida sam utvrdila i analizirala pomoću programa *Sequencher 5.4*. (Tablica 4).

Tablica 16. Komponente reakcijske smjese za postupak lančane reakcije polimerazom korištenjem M13/pUC početnica

Komponenta reakcijske smjese	Količina (μ l)
PCR pufer (5X)	10
MgCl ₂ (25 mM)	3
Smjesa PCR nukleotida (10 mM)	4
M13/pUC-f početnica (200 nM)	1,5
M13/pUC-r početnica (200 nM)	1,5
Taq polimeraza (5 U/ μ l)	0,25
Voda oslobođena nukleaza	29,75
Konačni volumen	50

Tablica 17. Prikaz reakcijskog ciklusa lančane reakcije polimerazom uz upotrebu M13/pUC početnica

Reakcijski ciklus	Denaturacija	Razdvajanje lanaca	Sparivanje početnica i kalupa	Produljenje lanaca	Završna elongacija
Broj ciklusa	1 ciklus		30 ciklusa		1 ciklus
Vrijeme	5 min	0.5 min	0.5 min	0.75 min	5 min
Temperatura	94 °C	92 °C	52 °C	72 °C	72 °C

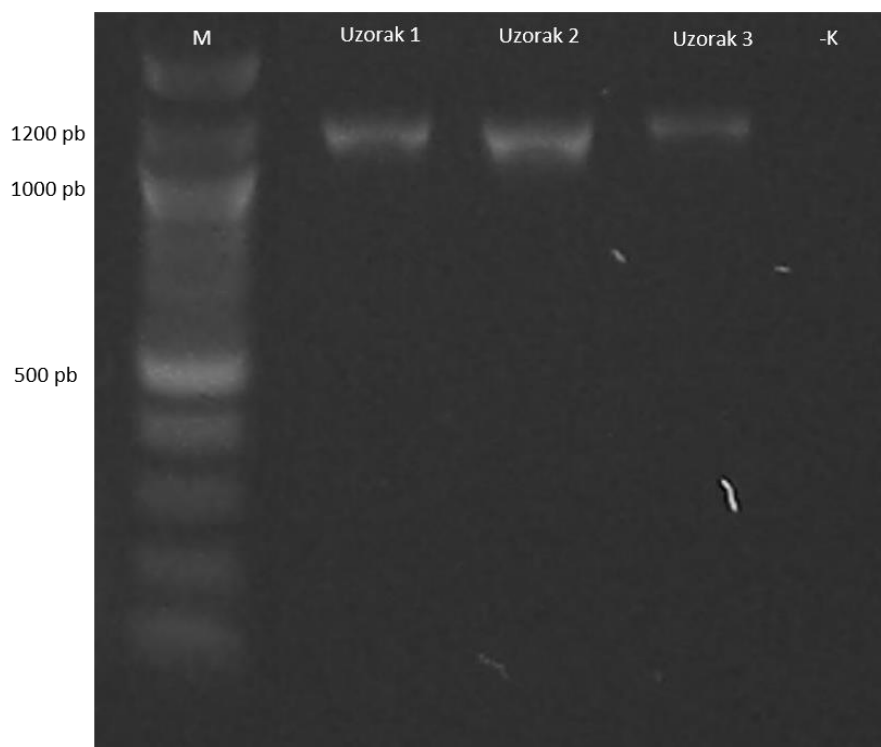
3.2.7. Analiza nukleotidnih sljedova

Pri računalnim analizama dobivenih sekvenci koristila sam programe opisane u tablici 4. Sekvenciranje nukleotidnog slijeda svakog lanca napravljeno je u oba smjera, odnosno neovisno jedan od drugoga, stoga sam za određivanje nukleotidnih sljedova iz oba dobivena kromatograma svakog klona koristila računalni program *Sequencher 5.4* prema protokolu Gene Codes Corporation (Gene Codes Corporation, *Sequencher 5.4*, 2017). Za višestruko sravnjivanje sekvenci međusobno te sa sekvencom čitavog genoma (LC435031.1), koristila sam program *ClustalX 1.2.2* (Thompson i sur., 1997). Kako su sekvence bile nejednake duljine, usporedba dobivenih sekvenci s referentnom sekvencom čitavog genoma omogućila mi je određivanje točnih položaja mutacija u genomu. Isto tako, u analiziranim sam sekvencama mogla utvrditi pravilan okvir čitanja (ORF) jer se u referentnoj sekvenci može točno odrediti mjesto početka ORF regije genoma. Za uređivanje sravnjenih sekvenci i ujednačavanje njihovih duljina te međusobno uspoređivanje koristila sam program *BioEdit 7.2.5*. (Hall, 1999). Također, pomoću tog programa sam detektirala i identificirala mutacije za svaku sekvencu zasebno, a potom odredila i potencijalna mjesta čestih pojavljivanja mutacija, na način da sam sva mjesta na kojima su se dogodile mutacije pojedinih sekvenci usporedila s mjestima sekvence čitavog genoma i utvrdila o kojim mutacijama je riječ. S obzirom na vrstu promjene u nukleotidnom slijedu analiziranih sekvenci, mutacije sam podijelila na supstitucije, delecije i insercije. Kod insercije (umetanje) i delecije (gubitka) jednog ili više nukleotida dolazi do pomaka okvira čitanja te ribosom tijekom čitanja poruke zapisane u kodovima krivo prevodi u aminokiselinski slijed (Griffiths i sur., 1999). Ovisno o vrsti zamjene dvaju nukleotida, supstitucije sam podijelila na tranzicije (zamjena jedne baze drugom iste vrste) i transverzije (zamjene jedne baze drugom različite vrste), koje mogu (nesinonimne), ali i ne moraju utjecati (sinonimne) na promjenu u aminokiselinskom slijedu (Stoltfus i Norris, 2015). Genska raznolikost (engl. *sequence diversity*) definira stupanj genskog polimorfizma analizirane populacije sekvenci na način da se odredi prosječan broj razlika u nukleotidnom slijedu genoma. Izračune prosječne nukleotidne raznolikosti varijanti (engl. *overall mean distance*) napravila sam u programu *MEGA X* (Kumar i sur., 2018). Taj program sam koristila i u svrhu provjere utjecaja mutacija na proteinskoj razini, translirajući sravnjene sekvence u aminokiselinski slijed, pritom vodeći računa o ispravnosti okvira čitanja. Kako bih točno utvrdila koja je promjena u nukleotidnom slijedu uzrokovala promjenu u aminokiselini, svim sam sekvencama odrezala prvih 733 nt koji su pripadali 5' nekodirajućem kraju (NCR) te podijelila s brojem 3 jer tri uzastopna nukleotida određuju jednu aminokiselinu.

4. REZULTATI

4.1. Umnožavanje hipervarijabilne regije VP1-2A

Cilj je bio utvrditi varijabilnost virusa hepatitisa A kod 13 izolata. Virusne sekvence RNA su prevedene reverznom transkripcijom u DNA i umnožene metodom PCR pomoću početnica VP1f1 i VP1r1 specifičnih za hipervarijabilnu regiju genoma. Umnoženi fragment imao je duljinu 1080 pb koja je provjerena elektroforetski na 1%-tnom agaroznom gelu. Elektroforezom sam vizualizirala fragmente (Slika 6) koji odgovaraju veličini ciljne regije. Negativna kontrola se nalazi u posljednjoj jažici.

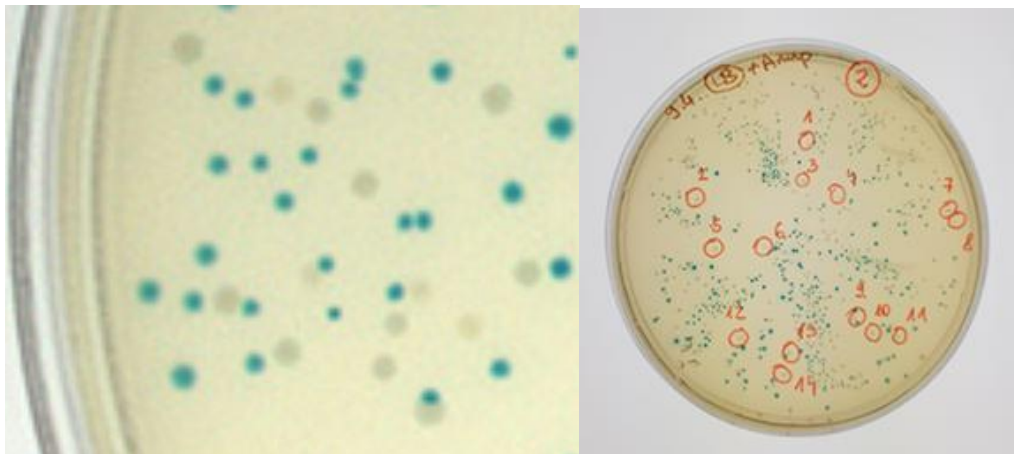


Slika 6. Prikaz rezultata elektroforeze u 1%-tnom agaroznom gelu umnožene regije VP1-2A genoma virusa hepatitisa A reakcijom RT-PCR. Dobiveni fragmenti su umnoženi specifičnim početnicama VP1f1 i VP1r1 iz ekstrakta ukupne RNA, a njihova duljina iznosi 1080 pb.; M- molekularni standard *100bp DNA Ladder* (New England BioLabs, SAD) s rasponom fragmenata od 100 pb do 1517 pb, K - negativna kontrola.

4.2. Analiza transformiranih bakterijskih stanica

Sekvence DNA dobivene reverznom transkripcijom virusne RNA ugrađene su u plazmide metodom TA-kloniranja. Plazmidi s ugrađenim sekvencama selektirani su metodom plavo-bijele

selekcije. U kontrolnim reakcijama prilikom korištenja kontrolnog inserta (kontrola ligacije) te kompetentnih stanica s plazmidom koji ima već ugrađeni insert (kontrola transformacije) izrasle su brojne bijele kolonije. Pomoću navedenih kontrola potvrdila sam uspješnost provedbe postupka ligacija i transformacije. Tehnikom tzv. plavo-bijele selekcije uspješno sam odredila one bakterije koje u sebi sadrže plazmid s ugrađenim insertom (Slika 7 A), odnosno koje pokazuju bijelo obojenje. Prisutnost željenog inserta kod svakog sam uzorka provjerila metodom PCR u minimalno 20 nasumično odabranih bijelih kolonija (Slika 7 B), a zatim sam one, koje su se pokazale ispravnima, bakteriološkom ušicom precijepila na novu hranjivu podlogu i koristila za daljnju analizu. Kod nekoliko uzoraka nisam dobila dovoljan broj transformiranih bakterija pa sam ponovila postupak kako bih uvrstila jednak broj klonova svih uzoraka za daljnje analize.

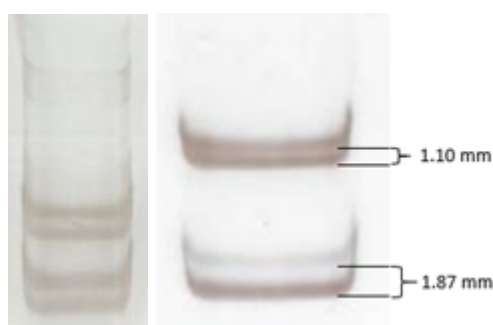


Slika 7. A) Prikaz transformiranih bakterija izraslih na krutom LB-mediju. B) Zaokružene bijele kolonije s plazmidom koji ima ugrađeni insert odabrane su za daljnju analizu.

4.3. Identifikacija virusnih varijanti i njihova populacijska struktura unutar pojedinog izolata

Umnožene željene inserte virusnih sekvenci dobivene iz 20 bijelih kolonija svakog izolata, kojima sam prethodno potvrdila prisutnost u kolonijama metodom PCR, podvrgnula sam analizi SSCP u svrhu određivanja različitih varijanti genoma prisutnih unutar kvazivrste svakog izolata. Nakon bojanja srebrom, na poliakrilamidnim gelovima identificirala sam različite SSCP-profile koji su sadržavali četiri elektroforetske vrpce (Slika 8 A), što ukazuje na postojanje dvije jednako stabilne konformacije svakog lanca analizirane DNA. Svaka vrpca odgovara jednom lancu, a zbog komplementarnosti dvaju lanaca, prisutne su najmanje po dvije vrpce na SSCP-profilima. Radi što preciznijeg određivanja različitih virusnih haplotipova, osim vizualnog pregleda, koristila sam računalni program *PDFTRON*, pomoću kojeg sam na skeniranim gelovima izmjerila udaljenosti

između elektroforetskih vrpce (Slika 8 B). Kod većine uzoraka uočila sam po tri različita SSCP-profila (uzorci 17 002, 17 006, 18 001 i 18 011) što upućuje na pojavu tri različite varijante virusnog genoma, dok kod dva uzorka (17 009 i 19 019) nije bilo više od jedne varijante, a jedino u uzorku 18 008 sam zabilježila pet različitih varijanti. Prosječan broj različitih varijanti po uzorku iznosio 2,85. Promatrajući odvojene izolate iz pacijenata koinficiranih virusom HIV, prosječan broj varijanti bio je nešto manji (2,6) u odnosu na izolate HIV-negativnih pacijenata (3,0).



Slika 8. A) Reprezentativni prikaz SSCP-profila s četiri elektroforetske vrpce. B) Mjerenje udaljenosti između elektroforetskih vrpce i identifikacije virusnih varijanti pomoću programa *PDFTRON*.

Nakon identifikacije, za sve različite varijante sam izračunala populacijsku učestalost i njihovu prosječnu nukleotidnu raznolikost (Tablica 18). Raspon učestalosti dominantnog SSCP-profila/haplotipa varirao je od minimalno 60% (uzorci 17 007 i 18 003) pa do 100% (uzorci 17 009 i 19 019) s prosječnom zastupljenošću 84,6%. Učestalost manje zastupljenih haplotipova kod virusa HAV bila je 5 do 40% s prosječnom zastupljenošću 15,3%.

Tablica 18. Prikaz učestalosti identificiranih virusnih haplotipova kod analiziranih uzoraka.

Oznaka uzorka	Soj uzorka	Broj različitih haplotipova	Prosječna nukleotidna raznolikost varijanti	Učestalost dominantnog haplotipa (%)	Učestalost manje zastupljenih haplotipova (%)	Koinfekcija s virusom HIV
17 001	UK/Spain	2	0,003	95	5	NE
17 002	UK/Spain	3	0,006	90	10	NE
17 003	UK/Spain	4	0,002	85	15	DA
17 004	UK/Spain	2	0,001	95	5	DA
17 006	UK/Spain	3	0,003	80	20	NE
17 007	UK/Spain	4	0,004	60	40	NE
17 009	UK/Spain	1	0	100	0	DA
17 011	UK/Spain	2	0,008	95	5	DA
18 001	UK/Spain	3	0,002	90	10	NE
18 003	UK/Spain	4	0,002	60	40	DA
18 008	Europride	5	0,002	75	15	NE
18 011	UK/Spain	3	0,015	75	25	NE
19 019	Europride	1	0	100	0	NE

Iz svakog sam uzorka sve varijante koje su pokazale različite SSCP-profile odabrala za sekvenciranje. U svrhu evaluacije same metode uzela sam nekoliko klonova istog uzorka (po pet klonova uzoraka 17 003 i 17 009 i četiri klona uzorka 17 004) koji su pokazali identičan dominantan haplotip. Rezultati sekvenciranja potvrdili su identičnost nukleotidnog slijeda svih klonova uzoraka 17 004 i 17 009, dok se kod uzorka 17 003 samo se jedan od pet klonova razlikovao u jednom nukleotidu (gvanin umjesto adenina na 2530. nukleotidu). Sekvenciranje nukleotidnog slijeda svakog lanca napravljeno je u oba smjera, odnosno neovisno jedan od drugoga, stoga sam za sastavljanje i uređivanje cjelokupnog slijeda koristila računalni program *Sequencher 5.4*. Iz 13 sam uzoraka utvrdila nukleotidne sljedove analizirane regije genoma ukupno 68 varijanti (Tablica 19). Kvaliteta većine dobivenih sekvenci bila je vrlo dobra. Jedino kod nekih varijanti rubne regije dale su nešto lošije rezultate ili su imale pouzdanu sekvencu dobivenu iz samo jednog smjera te sam takve slučajeve izuzela iz analize, odnosno skratila nepouz dane dijelove. Korištenjem programa *ClustalX* napravila sam višestruko sravnjivanje dobivenih nukleotidnih sljedova u svrhu usporedbe sekvenci svakog pojedinog izolata te detekcije i analize, njihovih mutacija.

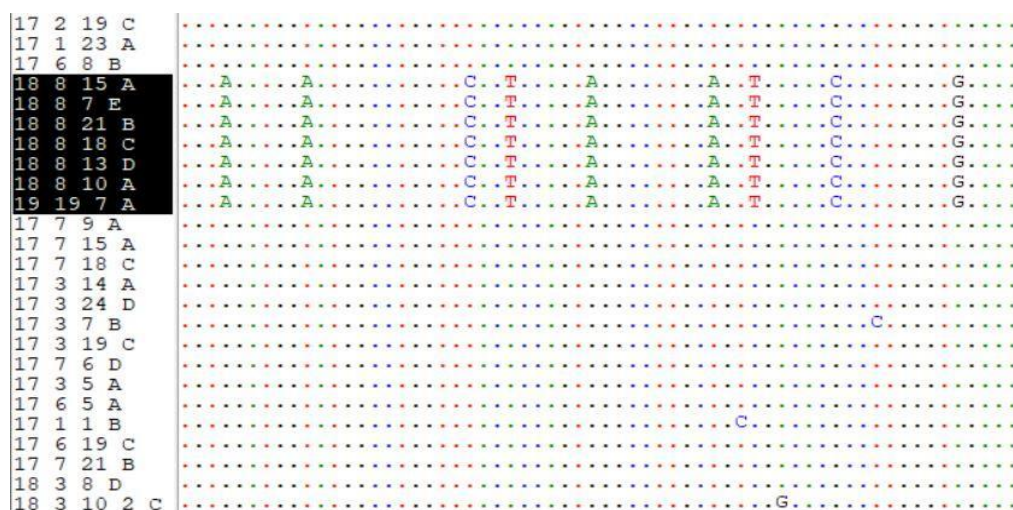
Tablica 19. Popis analiziranih nukleotidnih sekvenci virusa hepatitisa A s oznakom identificiranog haplotipa

Oznaka uzorka	Oznaka klona	Oznaka haplotipa	Oznaka uzorka	Oznaka klona	Oznaka haplotipa
17 001	2.2	A	17 011	6	A
	18			7	
	23			23	
	24	25			
	1	B		24	B
17 002	10	A	18 001	6	A
	12			19	
	14			20	
	23				
	11	B		23	B
	19	C	14	C	
17 003	5	A	18 003	9	A
	10			11.2	
	14				
	16				
	21				
	7	B		10	B
	19	C		10.2	C
24	D	8	D		
17 004	3	A	18 008	10	A
	9			15	
	17				
	18				
	25	B	21	B	
17 006	5	A		18	C
	17				
	22				
	8	B		13	D
	19	C	7	E	
17 007	9	A	18 011	7	A
	15			12	
	21	B		9	B
	18	C		6	C
	6	D			
17 009	8	A	19 019	5	A
	16			7	
	18			25	
	20				
	31				

Što je veća vrijednost genske raznolikosti to je veći stupanj populacijskog polimorfizma navedenog uzorka. Najveći polimorfizam zabilježen je kod uzorka 18 011 (0,015), a najmanji kod uzorka 17 009 i 19 019 (0), dok je prosječna vrijednost bila 0,0038. Također, uočila sam razliku u populacijskoj varijabilnosti usporedivši vrijednosti HIV-inficiranih i HIV-neinficiranih pacijenata. Dok je prosječna vrijednost kod HIV-negativnih pacijenata iznosila 0,0043, ona kod HIV-pozitivnih bila je nešto niža, odnosno 0,0026.

4.4. Brojnost i priroda mutacija

Sve dobivene sekvence različitih genomskih varijanti virusa hepatitisa A iz 13 izolata te sekvencu čitavog virusnog genoma sravnila sam u programu *ClustalX*. Koristeći računalni program *BioEdit* međusobno sam usporedila sravnjene sekvence svakog izolata te zabilježila nukleotidne promjene kod svih manje zastupljenih haplotipova u odnosu na dominantan haplotip. Prvo sam detektirala i zabilježila prirodu mutacije za svaku sekvencu zasebno, a potom odredila mjesta čestih pojavljivanja mutacija usporedivši međusobno sve sekvence (Slika 9). Pri utvrđivanju točnog položaja detektiranih mutacija vodila sam se sekvencom čitavog genoma. U prethodnom istraživanju potvrđeno je grupiranje uzoraka u dva soja: UK/Spain i Europride. Soju Europride pripadale su sekvence uzoraka 18 008 i 19 019, dok su sve ostale (17 001, 17 002, 17 003, 17 004, 17 006, 17 007, 17 009, 17 011, 18 001, 18 003 i 18 011) pripadale soju UK/Spain. Uspoređujući sekvence tih dvaju sojeva, analizom fragmenta duljine 1200 nukleotida odredila sam 59 međusobnih razlika koje su bile prisutne u svim sekvencama soja Europride (Slika 9). Samo četiri sekvence tri izolata soja UK/Spain imale su po jedan nukleotid identičan sekvencama soja Europride, ali svaki izolat na različitom položaju. Uzorak 17 003 klon 24D na položaju 2608, uzorak 18 001 klonovi 6A i 23B na položaju 2485 te uzorak 18 011 klon 9B na položaju 2836. U svim se navedenim slučajevima radilo o supstituciji citozina u timin. Kao najvarijabilniji dio umnožene regije identificirala sam onaj između 2200. i 2400. nukleotida, dok se najviše delecija dogodilo između 2900. i 3100. nukleotida. Također, 3' krajevi umnožene regije (od 3200. nukleotida nadalje) u nekim su sekvencama bili iznimno raznoliki.



Slika 9. Prikaz nukleotidnih razlika između sekvenci soja Europride i sekvenci soja UK/Spain u programu BioEdit.

Analizom svih sekvenci, utvrdila sam mutacije na ukupno 129 položaja u genomu. Detektirane mutacije uglavnom su bile tipa supstitucije s prosječnom učestalošću od 93%, dok su se delecije pojavljivale u prosječno 7% slučajeva. Nisam zabilježila niti jedan slučaj insercije. Od supstitucija, češće su bile tranzicije (62%), a najčešća je bila ona gvanina u adenin s 24,1% svih tranzicija te adenina u gvanin s 21%. Najzastupljenija transverzija koju sam detektirala bila je ona adenin u citozin s 12,5% svih transverzija. Kod 10 analiziranih uzoraka (17 001, 17 002, 17 003, 17 004, 17 006, 17 007, 18 001, 18 003, 18 008 i 18 011) učestalost tranzicije je bila veća od učestalosti transverzije. Dva uzorka (17 009 i 19 019) nisu imale nikakve mutacije, dok je uzorak 17 011 jedini koji imao zabilježenu veću učestalost transverzija u odnosu na tranzicije. Učestalost mutacija, odnosno njihovu stopu sam izračunala na način da sam sumirala svaki zasebno tip mutacije i podijelila s ukupnom količinom mutacija koju sam detektirala (129), dok sam učestalost pojedine tranzicije, odnosno transverzije gledala prema broju supstitucija (120).

Delecije sam detektirala u četiri uzorka 17 002, 18 003, 18 008 i 18 011. Najveća delecija zabilježena je kod uzorka 18 008 klon 7E od čak 14 nukleotida (Slika 10) te klona 18C istog uzorka od 12 nukleotida. Slijedi uzorak 17 002 klon 11B s delecijom od 9 nukleotida, dok su ostale sekvence imale deleciju od po jednog nukleotida: 17 002 klon 12A; 18 003 klonovi 9A i 10B; 18 008 klon 21B s dvije delecije te 18 011 klon 6C.



Slika 10. Prikaz delecije od 14 nukleotida kod klona 7E uzorka 18 008.

Usporedbom učestalosti mutacija između sekvenci virusa izoliranog iz HIV-inficiranih i HIV-neinficiranih pacijenata uočila sam određenu razliku. Dok je prosječna učestalost mutacija kod HIV-negativnih pacijenata iznosila 52,7%, ona kod HIV-pozitivnih bila je nešto niža i iznosila

je 47,3%. U sekvencama HIV-pozitivnih i HIV-negativnih pacijenata prisutna su oba tipa supstitucija s većom učestalošću tranzicije te delecije.

4.4.1. Usporedba različitih genomskih varijanti virusa unutar svakog analiziranog izolata

Kod svakog izolata usporedbom sekvenci manje zastupljenih haplotipova s dominantnima, zabilježila sam položaj i prirodu uočenih mutacija. Radi lakše preglednosti, rezultati su prikazani tablično, a za svaku mutaciju naznačila sam i eventualnu promjenu na aminokiselinskoj razini uočenu nakon translacije nukleotidnog slijeda u pravilnom okviru čitanja (Tablica 20).

Tablica 20. Prikaz detektiranih mutacija s položajem u genomu i utjecajem na aminokiselinski slijed za analizirane varijante genomske virusa hepatitisa A.

Oznaka uzorka	Oznaka haplotipa	Oznaka klona	Tip mutacije				Položaj u genomu (nt)	Promjena na razini aminokiselina	
			Supstitucija (tranzicija)	Supstitucija (transverzija)	Delecija	Insercija			
17 001	A	2.2							
		18	A u G				3071	D u G	
		23		A u T				2295	D u V
				A u T				2302	K u N
				A u T				2344	Q u H
	24		G u T				3104	E u STOP	
	B	1		T u C				2613	L u P
			T u C				2703	V u A	
			T u C				2761	-	

Oznaka uzorka	Oznaka haplotipa	Oznaka klona	Tip mutacije				Položaj u genomu (nt)	Promjena na razini aminokiselina
			Supstitucija (tranzicija)	Supstitucija (transverzija)	Delecija	Insercija		
17 002	A	10	A u G				2391	K u R
			A u G				3080	R u G
		12	C u T		A		2790	T u I
							3287	POMAK OKVIRA ČITANJA
	14	A u G					3046	-
	23	T u C					2842	-
	25							
B	11				TGTC'TTTA	2934-2942	NEMA POMAKA OKVIRA ČITANJA	
C	19	A u G					2365	-

Oznaka uzorka	Oznaka haplotipa	Oznaka klona	Tip mutacije				Položaj u genomu (nt)	Promjena na razini aminokiselina	
			Supstitucija (tranzicija)	Supstitucija (transverzija)	Delecija	Insercija			
17 003	A	5							
		10							
		14	A u G					2530	-
			G u A					3316	R u I
		16							
	21								
	B	7		T u C				2713	-
				G u A				3316	R u I
	C	19		T u C				2314	-
				G u A				3316	R u I
	D	24		C u T				2608	-
				G u A				2756	A u T
				G u A				3316	R u I

Oznaka uzorka	Oznaka haplotipa	Oznaka klona	Tip mutacije				Položaj u genomu (nt)	Promjena na razini aminokiselina
			Supstitucija (tranzicija)	Supstitucija (transverzija)	Delecija	Insercija		
17 004	A	3 9 17 18						
	B	25	G u A				3098	R u G

Oznaka uzorka	Oznaka haplotipa	Oznaka klona	Tip mutacije				Položaj u genomu (nt)	Promjena na razini aminokiselina
			Supstitucija (tranzicija)	Supstitucija (transverzija)	Delecija	Insercija		
17 006	A	5 17 22						
	B	8	G u A				3068	V u M
	C	19	G u A				2277	G u D
			T u C				2761	-
			T u C			2816	W u R	

Oznaka uzorka	Oznaka haplotipa	Oznaka klona	Tip mutacije				Položaj u genomu (nt)	Promjena na razini aminokiselina	
			Supstitucija (tranzicija)	Supstitucija (transverzija)	Delecija	Insercija			
17 007	A	9 15		A u C			2395	K u N	
			A u G				2530	-	
			G u A				3316	R u I	
	B	21		A u G	G u C			2211	G u A
								2217	D u G
				G u A	C u G			2252	Q u E
								3316	R u I
	C	18		C u T				2296	-
				A u G				2507	N u D
				A u G				2530	-
				A u G				2753	T u A
				A u G				3052	-
				G u A				3316	R u I
	D	6		A u G				3215	R u G
				G u A				3316	R u I

Oznaka uzorka	Oznaka haplotipa	Oznaka klona	Tip mutacije				Položaj u genomu (nt)	Promjena na razini aminokiselina	
			Supstitucija (tranzicija)	Supstitucija (transverzija)	Delecija	Insercija			
17 011	A	6		T u A			2998	-	
				G u T			3096	R u I	
				G u T			3226	K u N	
				A u C			3240	Q u P	
					A u C			2221	-
					G u T			2222	G u W
					T u A			2227	F u L
					C u A			2230	-
				A u G				2233	-
				C u T				2238	-
					A u C			2239	T u I
					A u C			2246	-
				C u T				2247	T u L
				A u G				2285	T u A
					G u T			2474	G u STOP
					A u T			2998	L u F
					A u T			3000	-
				T u C				3001	N u I
				C u T				3003	-
				A u G				3004	S u L
					A u C			3005	-
					T u A			3007	N u Q
					G u T			3008	-
				C u G			3009	A u C	
			T u C				3017	-	
				A u C			3020	P u S	
				C u A			3021	-	
			T u C				3022	T u H	
			G u A				3023	-	
			A u G				3024	E u R	
			C u T				3027	S u F	
			A u G				3029	M u S	
				A u T			3125	K u STOP	
			23	A u G			2285	T u A	
					A u T		2998	L u F	
			25						
				A u G			2285	T u A	
					A u T		2998	L u F	
				T u C			3001	-	
				G u T			3008	A u S	
		B	24	T u C			3017	S u P	
					A u C		3020	T u P	
				T u C			3022	E u K	
				G u A			3023	-	
					A u T		3125	K u STOP	
	<hr/>								
	Oznaka uzorka	Oznaka haplotipa	Oznaka klona	Tip mutacije				Položaj u genomu (nt)	Promjena na razini aminokiselina
				Supstitucija (tranzicija)	Supstitucija (transverzija)	Delecija	Insercija		
	18 001	A	6	G u A				3316	R u I
			19						
20									
B		23	G u A				3376	-	
C	14			T u G			2350	-	
			A u G				2390	K u E	

Oznaka uzorka	Oznaka haplotipa	Oznaka klona	Tip mutacije				Položaj u genomu (nt)	Promjena na razini aminokiselina
			Supstitucija (tranzicija)	Supstitucija (transverzija)	Delecija	Insercija		
18 003	A	9	G u A		T		2351	V u M
							3236	POMAK OKVIRA ČITANJA
		11.2	T u C				2409	F u S
	B	10	A u G		T		2446	-
				T u C			2492	C u R
							3236	POMAK OKVIRA ČITANJA
C		10.2	A u G				2706	D u G
D		8						

Oznaka uzorka	Oznaka haplotipa	Oznaka klona	Tip mutacije				Položaj u genomu (nt)	Promjena na razini aminokiselina				
			Supstitucija (tranzicija)	Supstitucija (transverzija)	Delecija	Insercija						
18 008	A	10	G u A		T		3232	L u V				
				A u G			3316	R u E				
							2600	N u D				
		15		A u C			3232	L u V				
				A u C			3312	Q u P				
				G u A			3316	R u E				
	B	21	G u A		A		2345	A u T				
							2385	POMAK OKVIRA ČITANJA				
				T u C			2602	-				
				A u C			3232	L u V				
							3312	POMAK OKVIRA ČITANJA				
							3316	R u E				
	C	15	T u C		TTAATTCAAATA		2260	-				
							2505-2518	NEMA POMAKA OKVIRA ČITANJA				
				A u C			3232	L u V				
				G u A			3316	R u E				
			D	13			G u A		A u C		2990	A u T
											3232	L u V
	G u A	3316			R u E							
E	7	AGTAGAATTGCAGCT		A u C		3035-3049	POMAK OKVIRA ČITANJA					
			G u A					3232	L u V			
						3316	R u E					

Oznaka uzorka	Oznaka haplotipa	Oznaka klona	Tip mutacije				Položaj u genomu (nt)	Promjena na razini aminokiselina
			Supstitucija (tranzicija)	Supstitucija (transverzija)	Delecija	Insercija		
18 011	A	7	G u A				3316	R u I
				G u A			2839	-
				C u T			2836	-
	B	9	A u G				2853	D u G
				G u A			3316	R u K
				G u A			3081	R u K
C		6			T		3315	POMAK OKVIRA ČITANJA

Analiza 20 klonova po uzorku pokazala je prisutnost samo jedne virusne varijante u uzorcima 17 009 i 19 019, stoga nisu prikazani tablično. Kod uzoraka 17 003, 17 004 i 17 006 sve supstitucije pripadale su tranzicijama, dok ostali tipovi mutacija nisu zabilježeni. U uzorcima 17 002, 18 003 i 18 011 također su sve supstitucije bile transverzije, ali zabilježene su i delecije. Uzorci 17 002 i 18 003 imaju po dvije delecije, dok je u uzorku 18 011 zabilježena jedna delecija. Uzorci 17 007, 18 001 i 18 008 pokazuju oba tipa supstitucije s većom učestalošću tranzicije (17 007 80%;

18 001 75%; 18 008 61%). Dok u uzorcima 17 007 i 18 001 nema zabilježenih ostalih tipova mutacije, u uzorku 18 008 evidentirane su i četiri delecije. Jedini tip mutacije koji je zabilježen u uzorku 17 001 jest supstitucija s jednakom učestalošću tranzicija i transverzija (50%). Za razliku od ostalih uzoraka, u uzorku 17 011 zabilježena je manja učestalost tranzicija (43%) u odnosu na transverzije (57%).

4.5. Utjecaj mutacija na aminokiselinski slijed

Kako bih provjerila jesu li detektirane mutacije sinonimne ili nesinonimne, odnosno utječu li na promjenu u aminokiselinskom slijedu, sravnjene sekvence translatirala *in silico* sam pomoću programa MEGA X (Slika 11). Usporedbom aminokiselinskih slijedova manje zastupljenih virusnih varijanti svakog izolata s dominantnom, utvrdila sam da je većina detektiranih mutacija nesinonimna, odnosno da je 72,8% mutacija rezultirao promjenom u aminokiselinskom slijedu analiziranih varijanti. Identificirala sam čak 94 promjene u aminokiselinskom slijedu. 57% promjena dogodilo se posljedicom tranzicije, a 33% posljedicom transverzije. Preostalih 10% promjena, odnosno gubitaka je uzrokovano delecijama. U slučajevima gdje se dogodila tranzicija, najčešće su se pozitivno nabijene aminokiseline (arginin i lizin) zamjenjivale hidrofobnima (izoleucin, valin, alanin i leucin) u 18,5% slučajeva, dok su se kod transverzije hidrofobne (leucin i alanin) zamjenjivale drugim hidrofobnim aminokiselinama (fenilalanin, valin) s 32,3% pojavljivanja. Također, posljedicom transverzije zabilježena su četiri slučaja gdje aminokiselina prelazi u STOP kodon. Kod uzoraka 17 001 klon 23A i 17 011 klon 23B zabilježena je po jedna promjena aminokiseline u STOP kodon, dok kod 17 011 klon 7A zabilježene su čak dvije takve promjene. Delecije u nukleotidnom slijedu (9) utjecale su i gubitkom aminokiseline (9) te je došlo do pomaka okvira čitanja kod sekvenci koje nisu izgubile tri ili njegov višekratnik nukleotida. Pojavnost gubitka aminokiseline bila je u 9,6% slučajeva, a dogodile su se u uzorcima 17 002, 18 003, 18 008 i 18 011. Najveći gubitak dogodio se u uzorku 18 008 u klonovima 18C i 7E, gdje je izgubljeno pet aminokiseline posljedicom delecije 14, odnosno 12 nukleotida, a zatim slijedi gubitak četiriju aminokiseline posljedicom 9 nukleotida kod uzorka 17 002 klona 11B te po jedna aminokiselina zbog gubitka jednog nukleotida u ostalih uzoraka (17 002 klon 12A, 18 003 klonovi 9A i 10B, 18 008 klon 21B na dva različita mjesta te 18 011 klon 6C).

Prosječan broj promjena u slijedu aminokiseline po sekvenci iznosio je 2,4. Najviše zabilježenih aminokiselinskih promjena zabilježila sam u uzorku 17 011 klon 7A, a iznosio je 17, dok je najmanja zapažena promjena bila u samo jednoj aminokiselini, a zabilježena je u čak 15 analiziranih sekvenci. Gledajući broj promjena na proteinskoj razini sumarno unutar svakog

pojednog izolata, u uzorku 17 004 zabilježena je tek jedna promjena, dok u uzorku 17 011 bilo njih čak 29.

Usporedba virusnih varijanti izolata iz HIV-inficiranih i HIV-neinficiranih pacijenata pokazala je da je prosječna učestalost promjena u slijedu aminokiselina kod HIV-neinficiranih pacijenata 56,4%, a ona kod HIV-inficiranih pacijenata bila je 43,6%.

✓ Name	R	G	K	M	D	V	S	G	V	Q	A	P	V	G	A	I	T	T	I	E	D	P	V	L	A	K	K	V	P	E	T	F	P	E	L	K	P	G	E	S	R	H	T	S	D														
✓ 15. 18 11 7 A									
✓ 16. 17 9 16 A								
✓ 17. 17 2 19 C								
✓ 18. 17 1 23 A	H									
✓ 19. 17 6 8 B								
✓ 20. 17 7 9 A								
✓ 21. 17 7 15 A							
✓ 22. 17 7 18 C						
✓ 23. 17 3 14 A						
✓ 24. 17 3 24 D						
✓ 25. 17 3 7 B					
✓ 26. 17 3 19 C					
✓ 27. 17 7 6 D				
✓ 28. 17 3 5 A				
✓ 29. 17 6 5 A			
✓ 30. 17 1 1 B			
✓ 31. 17 6 19 C			
✓ 32. 17 7 21 B			
✓ 33. 18 3 8 D		
✓ 34. 18 3 10 2 C			
✓ 35. 18 3 11 2 A		
✓ 36. 18 3 9 A	M			
✓ 37. 18 3 10 B		
✓ 38. 18 1 23 B	
✓ 39. 18 1 6 A
✓ 40. 18 1 14 C
✓ 41. 18 8 15 A
✓ 42. 18 8 7 E
✓ 43. 18 8 21 B	T

Slika 11. Prikaz usporedbe aminokiselinskih sljedova analiziranih izolata virusa hepatitisa A koristeći računalni program MEGA X.

5. RASPRAVA

Virus hepatitisa A (HAV) je glavni uzročnik akutne upale jetre u svijetu. Rasprostranjuje se uglavnom fekalno-oralnim putem te krvlju (Ndumbi i sur., 2018). Virus HAV umnaža se u stanicama jetre, a može se detektirati u krvi i fecesu zaraženih osoba. Kao i ostali virusi s RNA genomom, HAV je zbog brzog umnažanja i nemogućnosti popravaka pogrešaka enzima RNA-polimeraze ovisne o RNA sklon nakupljanju mutacija. Posljedično, virusni izolati pokazuju velik genetski polimorfizam. Oni sadrže tzv. oblake mutanata, odnosno genomskih varijanti, koje se zajedno nazivaju kvazivrste. Evolucijski napredak vrste ovisi o povremenoj pojavi korisnih mutacija pa ovisno o uvjetima okoliša, određena mutanta virusa u odgovarajućem trenutku prikazuje najbolju prilagođenost (Andino i Domingo, 2015). Važno je istaknuti da se različite varijante unutar kvazivrste mogu razlikovati i u svom patogenom potencijalu pa tako i nisko zastupljene varijante mogu imati važan utjecaj na virulenciju izolata (Domingo i sur., 2006). Najbolji način zaštite od ove bolesti, osim cijepljenjem, je održavanje osnovnih higijenskih uvjeta i odgovorno spolno ponašanje (<https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/epidemija-hepatitisa-a-u-europskim-zemljama/>). Stopa incidencije infekcije u određenim dijelovima Europe, a među njima i Hrvatske, u padu je zahvaljujući dobrim higijenskim uvjetima. Pojava bolesti na tim područjima vezana je uz kretanje migranata, putovanja u visoko endemična područja ili konzumacijom kontaminirane hrane uvezene iz takvih područja (<https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/epidemija-hepatitisa-a-u-europskim-zemljama/>), a javlja se samo kod visoko rizičnih skupina ljudi, među kojima je i muška homoseksualna populacija (MSM) (D'Andrea i sur., 2015). Epidemija hepatitisa A, koja je pretežito zahvatila populaciju MSM u Europi započela je sredinom 2016. godine. U Hrvatskoj je također zabilježen porast broja oboljelih od ovog virusa tijekom 2017. i 2018. godine od kojih je oko polovica oboljelih bila pozitivna i na virus HIV (<https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/epidemija-hepatitisa-a-u-europskim-zemljama/>). Prema rezultatima genotipizacije virusnih izolata unutar populacije MSM u Hrvatskoj, utvrđeno je prevladavanje dva soja virusa: soj UK/Spain i soj Europride (Ujević, 2019), a povezuju se s povorkama ponosa za koje se pretpostavlja da su bila žarišta epidemije (Petrovčić, 2017). Vrhunac epidemije u Europi zabilježen je u ožujku 2017. godine, dok se u Hrvatskoj dogodio godinu dana kasnije. (<https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-hepatitis-outbreak-eueea-mostly-affecting-men-who-have-sex-men-2>).

Za istraživanje genotipizacije i evolucije RNA virusa najčešće se analizira hipervarijabilna regija virusnog genoma (Smith i sur., 2012). Kao i kod drugih hepatotropnih virusa (McAllister i sur., 1998; Smith i sur., 2012), svi genotipovi virusa hepatitisa A definirani su na temelju analize hipervarijabilne regije kapsidnog proteina (Costa-Mattioli i sur., 2002; Graff i sur., 1999), koja se kod virusa HAV naziva VP1-2A. S obzirom na ranije korištenje ove regije za analizu drugih hepatotropnih virusa (Martell i sur., 1999; Černi i sur., 2015), pretpostavila sam i kasnije potvrdila da je pogodna i za analizu pri identifikaciji različitih virusnih varijanti unutar pojedinih izolata hepatitisa A te karakterizaciji učestalosti i prirode mutacija.

Tijekom umnožavanja željenog fragmenta regije VP1-2A genoma pomoću metoda RT-PCR i ugniježđenog PCR-a, koristila sam tzv. *proofreading* polimerazu, koja ima sposobnost ispravljanja pogrešaka koje se javljaju prilikom umnažanja, što nije slučaj s klasičnom *Taq* polimerazom. Međutim, uslijed umnažanja inserata ugrađenih u plazmide, kako se radilo o velikom broju uzoraka, iz financijskih sam razloga koristila *Taq* polimerazu (New England BioLabs inc., 2020), što potencijalno objašnjenje nekih nedosljednosti zabilježenih između nukleotidnih sljedova i SSCP-profila, odnosno detektiranih nukleotidnih razlika sekvenci koje su pokazivale identične SSCP-profile. Također, moguće su i pogreške nastale kao posljedica sekvenciranja. Najveća uočena razlika između sekvenci identičnih SSCP-profila bila je od dva nukleotida. Izračunom pogreške korištene polimeraze koja je iznosila 2,13 nt (duljina fragmenta: 1080 nt, broj ciklusa u reakciji PCR: 45, stopa pogreške polimeraze $4,4 \times 10^{-7}$), zaključila sam da se radi o očekivanom broju pogrešaka jer je u okvirima dobivenih rezultata. Sekvencirajući veći broj varijanti istog uzorka identičnih SSCP-profila, kada god je to bilo moguće, smanjila sam utjecaj očekivanih pogrešaka.

Populacije RNA virusa pokazuju velik genski polimorfizam zbog brojnih mutacija te su sačinjene od velikog broja genomskih varijanti među kojima je najčešće jedna dominantna, i to ona najbolje prilagođena, dok su ostale varijante/mutante prisutne u različitom broju i uglavnom u manjem postotku (Nigam i sur., 2020). Genska heterogenost virusa, osim na evoluciju, ima važan utjecaj i na njihovu patogenost i epidemiologiju (Duarte i sur., 1994). Prema dobivenim rezultatima, većina analiziranih uzoraka kod hepatitisa A imala je kompleksnu populacijsku strukturu sastavljenu od većeg broja varijanti, pri čemu je jedna uvijek bila dominantna u odnosu na ostale. Kod većine uzoraka uočila sam po tri različite varijante (17 002, 17 006, 18 001 i 18 011), dok kod dva uzorka (17 009 i 19 019) nije bilo više od jedne varijante, a najveći broj različitih genomskih varijanti zabilježen je kod uzorka 18 008 (pet varijanti). Kompleksna populacijska struktura sastavljena od velikog broja virusnih varijanti unutar jednog domaćina zabilježena je i

kod drugih virusa s RNA genomom, poput virusa HIV, virusa gripe, Ebole i dr. (Martinez i sur., 2012).

Proučavanjem prirode mutacija svih analiziranih sekvenci svakog uzorka zasebno, utvrdila sam ukupno 129 mutacijskih događaja, od kojih su supstitucije bile najučestalije, činile su čak 93%. Ovaj rezultat usporediv je s prijašnjim istraživanjima mutacija kod virusa, gdje je navedeno da je supstitucija kao tip mutacije u prosjeku 4x češći od delecija ili insercija (Sanjuan i sur., 2010). Također, smatra se da su delecije i insercije najčešće nastale kao posljedica prirodne selekcije i da nemaju pravilnosti u pojavljivanju, kao što je slučaj kod supstitucijskih mutacija (Wood i sur., 2009). U ovom istraživanju, insercije nisam zabilježila, dok su delecije bile puno manje učestale od supstitucija. Govoreći o supstitucijama, dokazano je da se transverzije pojavljuju puno rjeđe od tranzicija (Lyons i Lauring, 2017). Razlog tome je veći utjecaj transverzija na promjenu u aminokiselinskom slijedu, a time i veći evolucijski značaj. Kod 10 analiziranih uzoraka (17 001, 17 002, 17 003, 17 004, 17 006, 17 007, 18 001, 18 003, 18 008 i 18 011) učestalost tranzicija bila je veća od učestalosti transverzija. Dva uzorka (17 009 i 19 019) nisu imali zabilježene mutacije, dok je uzorak 17 011 jedini sa zabilježenom većom učestalosti transverzije u odnosu na tranziciju, što je moguće objasniti lošijom kvalitetom sekvenci kod ovog uzorka. U samo pet od 13 analiziranih uzoraka (17 001, 17 007, 17 011, 18 001 i 18 008) detektirala sam oba tipa supstitucije, a tri su uzorka (17 003, 17 004 i 17 006) imala detektirane jedino tranzicijske supstitucije bez ostalih tipova mutacija. Teško je predvidjeti koja će od mutacija u danom trenutku imati evolucijski značaj, a koja će varijanta iščeznuti iz populacije. Kako se u nekoliko slučajeva (17 001 klon 23A; 17 011 klonovi 7A i 23B) radi o transverzijama koje su uzrokovale promjenu u STOP kodone, nije izgledno da će ove varijante biti sposobne izgraditi funkcionalnu virusnu česticu i osigurati svoj opstanak. S druge strane, one varijante kod kojih je delecija uzrokovala pomak okvira čitanja imaju veću vjerojatnost formiranja funkcionalnih virusnih čestica i eventualne promjene svojih antigena, što može u određenom trenutku biti evolucijska prednost.

Uspoređujući sekvence dvaju sojeva Europride i UK/Spain, odredila sam 59 međusobnih razlika u nukleotidima analizirane hipervarijabilne regije VP1-2A. Sve sekvence koje pripadaju istom soju imale su karakteristične nukleotide na određenim mjestima, čime se pokazala pravilnost i međusobne razlike navedenih sojeva. Ranije rađene analize razlika među sojevima virusa hepatitisa A potvrdile su 624 nukleotidne razlike u čitavom sekvenciranom genomu (Cohen i sur., 1987), što s obzirom na broj u analiziranoj regiji, koja predstavlja 14,6% genoma, potvrđuje varijabilnost te regije. Kod nekih sekvenci soja UK/Spain (uzorci 17 003 klon 24D, 18 001 klonovi 6A i 23B i 18 011 klon 9B) detektiran je po jedan nukleotid identičan sekvencama soja Europride, a radilo se o supstituciji citozina u timin. Kako su se navedene mutacije dogodile na različitim

položajima u svakoj sekvenci, pretpostavila sam da je riječ o slučajnom događaju. Izuzev pojavljivanja pravilnosti u pozicijama mutacija kod usporedbe dvaju sojeva ovog virusa, nisam pronašla pozicije ili regije u kojima bi mutacije bile učestalije.

Usporedbom nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova, utvrdila sam da je većina detektiranih mutacija nesinonimna, odnosno da nastale mutacije imaju velikog utjecaja na aminokiselinski sastav analiziranih varijanti. U svih identificiranih mutanata svakog uzorka zabilježena je barem jedna nesinonimna mutacija koja bi mogla biti od biološke važnosti. Prosječan broj promjena u aminokiselinskom slijedu po pojedinoj sekvenci iznosio je 2,4. Najveći broj promjena zabilježen je u uzorku 17 011 klon 7A, a iznosio je 17 aminokiselina, dok je po jedna promjena zabilježena u čak 15 sekvenci. Također, u sekvencama uzoraka iz 2018. godine (6 sekvenci), češće se pojavljuje pomak okvira čitanja uzrokovan delecijama u nukleotidnom slijedu, od onih iz 2017. godine gdje se pojavio u samo jednoj sekvenci (uzorak 17 002 klon 12A). Iako je analizom nukleotidne sekvence kod uzoraka 17 006 i 18 001 identificirano postojanje po dvije mutante u odnosu na dominantnu, samo je jedna od njih kod oba uzorka pokazivala promjenu i na aminokiselinskoj razini, odnosno potencijalni biološki značaj. Ostale mutacije, iako za sada nisu rezultirale promjenom na razini aminokiselina, nakupljanjem novih mutacija uslijed brzog umnažanja virusa mogu vremenom dovesti do biološki značajnih promjena. Omjer nesinonimnih i sinonimnih mutacija bio je veći od 1, što sugerira na pozitivni selekcijski pritisak, odnosno da je izražena stalna tendencija nastanka populacija različitih genotipova što omogućuje virusu bolju prilagodbu na promjenjive uvjete okoliša. Dosad nema obavljenih istraživanja koji se bave karakterizacijom učestalosti i prirode mutacija virusa hepatitisa A. Iz tog razloga, vrlo je teško usporediti dobivene rezultate s prethodnim istraživanjima vezanih za ovaj virus. Broj nesinonimnih mutacija u analiziranoj VP1-2A regiji bio je relativno velik što se može potencijalno odraziti na biologiju virusa.

Kako je pet od 13 pacijenata istovremeno bilo pozitivno i na virus HIV, bilo mi je zanimljivo napraviti usporednu analizu između izolata ovih pacijenata i izolata HIV-negativnih pacijenata. Osim razlike u prosječnom broju varijanti, učestalost mutacija kod HIV-inficiranih pacijenata pokazala se nižom u odnosu na HIV-neinficirane pacijente. Prosječna učestalost mutacija kod HIV-negativnih pacijenata iznosila 52,7%, od kojih je 56,4% bilo nesinonimo. U slučaju HIV-pozitivnih pacijenata, učestalost mutacija bila je nešto niža i iznosila je 47,3%, a 43,6% ih je bilo nesinonimno, odnosno imalo utjecaj na promjenu slijeda aminokiselina. U sekvencama HIV-pozitivnih i HIV-negativnih pacijenata prisutne su delecije te oba tipa supstitucija s većom učestalošću tranzicije. Kako je analiza rađena na relativno malom broju uzoraka (pet) s HIV-koinfekcijom, svakako bi bilo poželjno istražiti navedeni problem na većem broju uzoraka.

Također, kako su HIV-pozitivni pacijenti bili pod stalnom tzv. antiretrovirusnom terapijom, pretpostavila sam da terapija na neki način ima utjecaj na brzinu umnažanja te posljedično manji broj mutacija i kod virusa HAV. Sukladno tome, istraživanja ukazuju da određene terapije imaju negativni učinak na replikaciju virusa hepatitisa B kod pacijenata kojima je dokazana koinfekcija virusom HIV-a (Healy i sur., 2013). Budući da je primjenjivana terapija individualizirana i sastoji se od više različitih antivirusnih agenasa, bilo bi zanimljivo doći do tih podataka i detaljnije istražiti eventualni učinak anti-HIV terapije na HAV po mogućnosti na većem broju pacijenata.

Poznato je da mnogobrojne antivirusne terapije predstavljaju selekcijski pritisak kako bi se iz oblaka mutanata selektirale varijante koje su spontanim mutacijama stekle rezistenciju (Pellerin i sur., 2004). Hepatitis A je samoeliminatorna bolest i nema specifične terapije pa je selektivni pritisak uglavnom ograničen na imunosni odgovor domaćina. Prema dobivenim rezultatima velik broj detektiranih mutacijskih događaja koji su uzrokovali promjene u slijedu aminokiselina, pogotovo onih koje su uzrokovale pomak okvira čitanja u sekvencama s analiziranim regijama VP1-2A, mogu biti značajne u promjeni antigenih svojstava virusa, što u određenim uvjetima može predstavljati prednost s evolucijskog aspekta.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati dobiveni provedenim istraživanjem ukazuju na sljedeće:

- 1) Kod svih 13 izolata virusa hepatitisa A dobivenih iz seruma pacijenata, uspješno sam umnožila hipervarijabilnu regiju VP1-2A virusa hepatitisa A te metodom TA-kloniranja razdvojila različite genomske varijante
- 2) Analizom po 20 rekombinantnih bakterijskih klonova svakog izolata metodom SSCP identificirala sam i kvantificirala različite genomske varijante dobivene kloniranjem, što potvrđuje hipotezu o kompleksnoj populacijskog strukturi virusa HAV.
- 3) Analizom virusnih varijanti podrijetlom iz 13 uzoraka, identificirala sam ukupno 129 mutacijskih događaja, što je prosječno 3.2 mutacije po genomskoj varijanti. Najzastupljenije mutacije bile su tranzicijske supstitucije, a njihova distribucija unutar analizirane regije bila je potpuno nasumična. Jasne nukleotidne razlike zabilježene su samo između virusnih varijanti različitih sojeva. Uz supstitucije, zabilježene su i delecije, ali nije zabilježena niti jedna insercija. Broj mutacijskih događaja bio je nešto manji (47,3%) kod HIV-koinficiranih pacijenata u odnosu na HIV-negativne pacijente.
- 4) Od 129 detektiranih mutacija, njih čak 94 rezultiralo je nesinonimnom promjenom aminokiselinskog slijeda, u četiri slučaja mutacije su uzrokovale terminaciju translacije. Kod HIV-koinficiranih pacijenata zabilježena je i manja učestalost nesinonimnih mutacija (43,6%) u odnosu na HIV-negativne pacijente (56,4%).

7. LITERATURA

Andino R. i Domingo E., 2015. Viral quasispecies, *Virology*, **479-480**, 46-51.

Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D. i sur., 2010. Imunologija, Poglavlje 16: Imunost na infekcije, , sedmo izdanje, 270-287.

Applied biosystems by life technologies, 2010. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis on Applied Biosystems 3130 and 3130xl Capillary Electrophoresis Systems, http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_083566.pdf (pristupljeno 23. srpnja 2020).

Banerjee N. i Mukhopadhyay, S., 2016. Viral glycoproteins: biological role and application in diagnosis, *Virus Disease*, **27(1)**, 1-11.

Bankwitz D., Steinmann E., Bitzegeio J., Ciesek S., Friesland M., Herrmann E., Zeisel M., Baumert T., Keck Z., Fong S., Pécheur E. i Pietschmann T., 2010. Hepatitis C Virus Hypervariable Region 1 Modulates Receptor Interactions, Conceals the CD81 Binding Site, and Protects Conserved Neutralizing Epitopes. *Journal of Virology*, **84(11)**, 5751-5763.

Chaitanya K. V., 2019. Structure and Organization of Virus Genomes, *Genome and Genomics*, 1-30.

Coffin J. M., Hughes S. H. i Varmus H. E., 1997. Retroviruses, Cold Spring Harbor (NY), *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Cohen J. I., Ticehurst J. R., Purcell R. H., Buckler-White A. i Baroudy B. M., 1987. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses, *Journal of Virology*, **61(1)**, 50-59.

Collins R., Holz, R. i Zimmerberg, J., 2012. 5.14 The Biophysics of Membrane Fusion, *Comprehensive Biophysics.*, **5**, 273–289.

Contreras A., Hiasa Y., He W., Terella A., Schmidt E. i Chung R., 2002. Viral RNA Mutations Are Region Specific and Increased by Ribavirin in a Full-Length Hepatitis C Virus Replication System. *Journal of Virology*, **76(17)**, 8505-8517.

Costa-Mattioli M., Cristina J., Romero H., i sur., 2002. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein, *Journal of Virology*, **76(18)**, 9516-9525.

Coudray-Meunier C., Fraisse A., Mokhtari C., Martin-Latil S., Roque-Afonso A. M. i Perelle S., 2014. Hepatitis A virus subgenotyping based on RT-qPCR assays, *BMC Microbiology*, **14(1)**, 1-11.

Cruse J. M., Lewis R. E. i Wang H., 2004. Antigens, Immunogens, Vaccines, and Immunization, *Immunology Guidebook*, 17-45.

Černi S., Prpić J., Jemeršić L., Škorić D., 2015. The application of single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis in determining Hepatitis E virus intra- host diversity, *Journal of Virological Methods*, **221**, 46-50.

D'Andrea L., Pérez-Rodríguez F., de Castellarnau M., Manzanares S., Lite J., Guix S., Pintó R. i sur., 2015. Hepatitis A Virus Genotype Distribution during a Decade of Universal Vaccination of Preadolescents, *International Journal of Molecular Sciences*, **16(12)**, 6842-6854.

Domingo E., Martin V., Perales C., Grande-Perez A., Garcia-Arriaza J., Arias A., 2006. Viruses as Quasispecies: Biological Implications, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **299**, 51-82.

Duarte E. A., Novella I. S., Weaver S. C. i sur., 1994. RNA virus quasispecies: significance for viral disease and epidemiology, *Infectious Agents and Disease*, **3(4)**, 201-214.

Duffy S., 2018. Why are RNA virus mutation rates so damn high?, *PLOS Biology*, **16(8)**.

Elena S. i Sanjuan R., 2005. Adaptive Value of High Mutation Rates of RNA Viruses: Separating Causes from Consequences, *Journal of Virology*, **79(18)**, 11555-11558.

Feinstone S. M., Kapikian A. Z., Purceli R. H., 1973. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness, *Science*, **7**, 1026-1028.

Feinstone S. M., 2018. History of the Discovery of Hepatitis A Virus, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, **9(5)**, 1-15.

Feng Z., Hensley L., McKnight K. L., Hu F., Madden V., Ping L., i sur., 2013. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes, *Nature*, **496**, 367–371.

Feng Z., Hirai-Yuki A., McKnight K. L., Lemon S. M., 2014. Naked Viruses That Aren't Always Naked: Quasi-Enveloped Agents of Acute Hepatitis. *Annual Review of Virology*, **1**, 539–560.

Flint S. J., Racaniello V., Rall G. F., Skalka A. M. i Enquist L. W., 2015. Principles of Virology, četvrto izdanje.

Graff J., Richards O. C., Swiderek K. M., i sur., 1999. Hepatitis A virus capsid protein VP1 has a heterogeneous C terminus, *Journal of Virology*, **73(7)**, 6015-6023.

Griffiths A. J. F., Gelbart W. M., Miller J. H. i sur., 1999. Modern Genetic Analysis, Chapter 7: The Molecular Basis of Mutation, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21322/> (pristupljeno 24. kolovoza 2020).

Hall T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acid*, **41**, 95-98.

Healy S. A., Gupta S., Melvin A. J., 2013. HIV/HBV coinfection in children and antiviral therapy, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, **11**, 251–263.

Hussain Z., Das B. C., Husain S. A., Asim M., Chattopadhyay S., Malik A., Poovorawan Y., Theamboonlers A., Kar P., 2005. Hepatitis A viral genotypes and clinical relevance: Clinical and molecular characterization of hepatitis A virus isolates from northern India, *Hepatology research*, **32**, 16-24.

Hutin Y. J., Pool V., Cramer E. H., Nainan O. V., Weth J., Williams I. T., Goldstein S. T., Gensheimer K. F., Bell B. P., Shapiro C. N., Alter M. J., Margolis H. S. i sur., 1999. Acute viral hepatitis (A-SEN), *Hepatology Textbook and Atlas*, 419-471 https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-540-76839-5_22 (pristupljeno 30 srpnja 2020).

Jiang P., Liu Y., Ma H. C., Paul A. V. i Wimmer E., 2014. Picornavirus Morphogenesis, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **78**, 418–437.

Johnston M. O., 2006. Encyclopedia of life sciences, Mutations and New Variation: Overview, 1-10.

Kaddoura M., Allaham R., Abubakar A., Ezzeddine A., Barakat A., Mala P. i Zaraket H., 2020. Hepatitis A Virus Genotype IB Outbreak among Internally Displaced Persons, Syria. *Emerging Infectious Diseases*, **26(2)**, 369-371.

Koonin E. V., Gorbalenya A. E., Purdy M. A., Rozanov M. N., Reyes G. R. i Bradley D. W., 1992. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **89(17)**, 8259–8263.

Kormann C., 2020. From bats to human lungs, the evolution of a coronavirus, *The New Yorker*, 1-12.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. i Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms, *Molecular Biology and Evolution*, **35**,1547-1549.

Lanini S., Minosse C., Vairo F., Garbuglia A., Di Bari V., Agresta A., 2017. A large ongoing outbreak of hepatitis A predominantly affecting young males in Lazio, Italy; August 2016 - March 2017. *PLoS One*, **12(11)**, 1–14.

Lemon S. M., Ott J. J., Van Damme P., Shouval D., 2018. Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention, *Journal of Hepatology*, **68**, 167-184.

- Lugoboni F., Pajusco B., Albiero A., Quaglio G., 2012. Hepatitis A virus among drug users and the role of vaccination: A review, *Frontiers in Psychiatry*, **2(79)**, 1–9.
- Lyons D. M. i Lauring A. S., 2017. Evidence for the Selective Basis of Transition-to-Transversion Substitution Bias in Two RNA Viruses, *Molecular Biology and Evolution*, **34(12)**, 3205-3215.
- Manangeeswaran M., Jacques J., Tami C., Konduru K., Amharref N., Perrella O., Kaplan G. G., 2012. Binding of Hepatitis A Virus to Its Cellular Receptor 1 Inhibits T-Regulatory Cell Functions in Humans, *Gastroenterology*, **142(7)**, 1516–1525.
- Martell M., Gómez J., Esteban J. I., Sauleda S., Quer J., Cabot B., Esteban R. i Guardia J., 1999. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA, *Journal of Clinical Microbiology*, **37(2)**, 327-332.
- Martin A. i Lemon S. M., 2006. Hepatitis A virus: From discovery to vaccines, *Hepatology*, **43**, 164-172.
- Martinez M. A., Martrus G., Capel E., Parera M., Franco S., Nevot M., 2012. Quasispecies Dynamics of RNA Viruses, *Viruses: Essential Agents of Life*, 21-42.
- McAllister J., Casino C., Davidson F., Power J., Lawlor E., Lee Yap P., Simmonds P. i Smith D. B., 1998. Long-Term Evolution of the Hypervariable Region of Hepatitis C Virus in a Common-Source-Infected Cohort, *Journal of Virology*, **72(6)**, 4893-4905.
- McKnight K. L., Lemon S. M., 2018. Hepatitis A Virus Genome Organization and Replication Strategy, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, **8(12)**, 1-19.
- Moya A., Elena S. F., Bracho A., Miralles R., Barrio E., 2000. The evolution of RNA viruses: A population genetics view, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97(13)**, 6967-6973.

Nainan O. V., Xia G., Vaughan G., Margolis H. S., 2006. Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach, *Clinical Microbiology Reviews*, **19(1)**, 63-79.

Ndumbi P., Freidl G. S., Williams C. J., Mårdh O., Varela C., Avellón A., 2018. Hepatitis A outbreak disproportionately affecting men who have sex with men (MSM) in the European Union and European Economic Area, June 2016 to May 2017, *Euro Surveillance*, **23(33)**, 1-12.

New England BioLabs inc., 2020. Anatomy of a Polymerase – How Function and Structure are Related, <https://international.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/anatomy-of-a-polymerase-how-structure-effects-function> (pristupljeno 23. srpnja 2020.)

Nigam D., LaTourrette K. i Garcia-Ruiz H., 2020. Mutations in virus-derived small RNAs, *Scientific Reports*, **10(1)**.

Panawala L., 2017. Difference Between Chromosome and Gene, *Pediaa the Biology Blog*, 1-8. https://www.researchgate.net/publication/313838942_Difference_Between_Chromosome_and_Gene (pristupljeno 26. kolovoza 2020).

Pavlica M., 2012. Genske mutacije, Mrežni udžbenik iz genetike, prvo izdanje, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu.

Payne S., 2017. Viruses, Chapter 8: Virus Evolution and Genetics, 81–86.

Pellerin M., Lopez-Aguirre Y., Penin F., Dhumeaux D., Pawlotsky J. M., 2004. Hepatitis C Virus Quasispecies Variability Modulates Nonstructural Protein 5A Transcriptional Activation, Pointing to Cellular Compartmentalization of Virus-Host Interactions, *Journal of Virology*, **78(9)**, 4617-4627.

Petrović D., 2017. Hepatitis A u Europi i Hrvatskoj, *Zavod za javno zdravstvo „Sveti Rok“*, <http://www.zzjzvpz.hr/index.php?sadrzaj=novosti&novtxt=356> (pristupljeno 10 kolovoza 2020).

Pierce, B., 2020. Genetics A Conceptual Approach, sedmo izdanje, *W. H. Freeman and Company New York*.

Philipson L., 1983. Replication, transcription and translation of RNA viruses, *Textbook of Medical Virology*, 57-71.

Provost P., Giesa P., McAleer W. i Hilleman M., 1981. Isolation of Hepatitis A Virus in Vitro in Cell Culture Directly from Human Specimens, *Experimental Biology and Medicine*, **167(2)**, 201-206.

Pudupakam R., Kenney S., Cordoba L., Huang Y., Dryman B., LeRoith T., Pierson F. i Meng X., 2011. Mutational Analysis of the Hypervariable Region of Hepatitis E Virus Reveals Its Involvement in the Efficiency of Viral RNA Replication. *Journal of Virology*, **85(19)**, 10031-10040.

Rowlands D., 2015. Human hepatitis A virus is united with a host of relations, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112(49)**, 15010-15011.

Sadahiro A., Fukao A., Kosaka M., Funakami Y., Takizawa N., Takeuchi O., 2018. Translation of hepatitis A virus IRES is upregulated by a hepatic cell-specific factor. *Frontiers in Genetics*, **9**, 1–10.

Sanjuan R., Nebot M. R., Chirico N., Mansky L. M. i Belshaw R., 2010. Viral Mutation Rates, *Journal of Virology*, **84(19)**, 9733-9748.

Sanjuan R. i Domingo-Calap P., 2016. Mechanisms of viral mutation, *Cellular and Molecular Life Science*, **73(23)**, 4433-4448.

Sattar S. A., Jason T., Bidawid S., Farber J., 2000. Foodborne spread of hepatitis A: Recent studies on virus survival, transfer and inactivation, *The Canadian Journal of Infectious Diseases*, **11(3)**, 159-163.

Schrader, T. J., 2016. Encyclopedia of Food and Health, Mutagens, 20–28.

Setyowati D., Mubawadi T., Mirasa Y. A., Purwanto D., Amin M., Utsumi T., Soetjipto S., Juniastuti J., Lusida M. I., 2019. Molecular epidemiology of hepatitis A outbreaks in two districts in Indonesia in 2018: Same subtype, but different strains, *Biomedical reports*, **12**, 51-58.

Silberstein E., Xing L., van de Beek W., Lu J., Cheng H. i Kaplan G., 2003. Alteration of Hepatitis A Virus (HAV) Particles by a Soluble Form of HAV Cellular Receptor 1 Containing the Immunoglobulin- and Mucin-Like Regions, *Journal of Virology*, **77(16)**, 8765-8774.

Smith D. B., Vanek J., Ramalingam S., Johannessen I., Templeton K., Simmonds P., 2012. Evolution of the hepatitis E virus hypervariable region, *Journal of General Virology*, **93(11)**, 2408-2418.

Stoltfus A. i Norris R. W., 2015. On the causes of evolutionary transition:transversion bias, *Molecular Biology and Evolution*, 1-30.

Stuart D., Ren J., Wang X., Rao Z. i Fry E., 2018. Hepatitis A Virus Capsid Structure, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **9(5)**, 1-14.

Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F. Jeanmougin F. Higgins D. G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids*, **25(24)**, 4876-4882.

Ujević J., 2019. Genotipizacija izolata virusa hepatitisa A iz epidemije u Hrvatskoj 2017., Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 1-54.

Wang H., Zheng H., Cao J., Zhou W., Yi Y., Jia Z., Bi S., 2013. Genetic Diversity of Hepatitis A Virus in China: VP3-VP1-2A Genes and Evidence of Quasispecies Distribution in the Isolates, *PLoS One*, **8(9)**.

Wood N., Bhattacharya T., Keele B., Giorgi E., Liu M., Gaschen B., Daniels M., Ferrari G., Haynes B., McMichael A., Shaw G., Hahn B., Korber B. i Seoighe C., 2009. HIV Evolution in Early Infection: Selection Pressures, Patterns of Insertion and Deletion, and the Impact of APOBEC, *PLoS Pathogens*, **5(5)**.

Woolhouse M., Scott F., Hudson Z., Howey R. i Chase-Topping M., 2012. Human viruses: discovery and emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **367(1604)**, 2864-2871.

Zell R., Delwart E., Gorbalenya A. E., Hovi T., King A. M. Q., Knowles N. J., Lindberg A. M., Pallansch M. A., Palmenberg A. C., Reuter G., Simmonds P., Skern T., Stanway G., Yamashita T., 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Picornaviridae*, *Journal of General Virology*, **98**, 2421-2422.

Zhou M. i Gomez-Sanchez C., 2000. Universal TA Cloning, *Current Issues in Molecular Biology*, **2(1)**, 1-7.

Korišteni mrežni izvori:

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2019. Hepatitis A, Epidemiology Of Vaccine Preventable Diseases, *Pinbook*, 1-14. <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hepa.html> (pristupljeno 3. rujna 2020).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2020. Hepatitis A, Travelers' Health, *Chapter 4 - 2020 Yellow Book*, <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/hepatitis-a> (pristupljeno 25 travnja 2020).

Courses lumenlearning.com, 2020. Mutations, Microbiology, *Pressbooks*, <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/mutations/> (pristupljeno 30. kolovoza 2020).

Davis W., 2013. Hepatitis A virus discovered to cloak itself in membranes hijacked from infected cells, *Unc health talk*, <https://healthtalk.unchealthcare.org/hepatitis-a/> (pristupljeno 25 ožujka 2020).

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2018. Epidemiological update: Hepatitis A outbreak in the EU/EEA mostly affecting men who have sex with men. <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-hepatitis-outbreak-eueea-mostly-affecting-men-who-have-sex-men-2> (pristupljeno 4. rujna 2020).

Genetic Home Reference (GHR), How can gene mutations affect health and development? 2020. <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/mutationsanddisorders/mutationscausedisease> (pristupljeno 25. kolovoza 2020).

Hrvatski zavod za javno zdravstvo (HZJZ), 2020. Virusni hepatitis, <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/virusni-hepatitisi/> (pristupljeno 10 kolovoza 2020).

Hrvatski zavod za javno zdravstvo (HZJZ), 2020. Epidemija hepatitisa A u europskim zemljama, <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/epidemija-hepatitisa-a-u-europskim-zemljama/> (pristupljeno 25 travnja 2020).

Medical Lab portal, 2014. Hepatitis A Virus (HAV) Structure, <http://www.medical-labs.net/hepatitis-a-virus-hav-structure-2263/> (pristupljeno 25 ožujka 2020).

The history of Vaccines, 2020. Viruses and evolution, *The college of physicians of Philadelphia*, <https://www.historyofvaccines.org/content/articles/viruses-and-evolution> (pristupljeno 26. kolovoza 2020).

Thermo Scientific InsTAclone PCR Cloning Kit, Fisher scientific, SAD, 2016. <https://www.fishersci.com/shop/products/instaclone-pcr-cloning-kit/ferk1214> (pristupljeno 10 kolovoza 2020).

8. ŽIVOTOPIS

Osobne informacije:

Ime i prezime: Josipa Kuzle

Datum i mjesto rođenja: 31. kolovoza 1995. u Zagrebu

E-adresa: josipa.kuzle@gmail.com

Obrazovanje i osposobljavanje:

2017.-2020. Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu

2020. Rad za rektorovu nagradu na temu Populacijska struktura i molekularna epidemiologija virusa hepatitisa A iz epidemije u Hrvatskoj 2017. - 2019. pod voditeljstvom doc. dr. sc. Silvije Černi

ožujak/2018.-kolovoz/2018. Erasmus razmjena studenata u Düsseldorfu u Njemačkoj, Master modul Hormone and Stress na sveučilištu Heinrich-Heine Universität

2014.-2017. Preddiplomski sveučilišni studij Znanosti o okolišu, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu

2015.-2017. Demonstratorica u bakteriološkom praktikumu na Zavodu za mikrobiologiju (5 semestara) na tri bakteriološka predmeta

2017. Laboratorijska stručna praksa na Zavodu za mikrobiologiju (1 semestar), gdje sam sudjelovala u istraživanju na međunarodnom projektu Metasub

2010.-2014. V. gimnazija

Radno iskustvo:

rujan/2018.-lipanj/2019. Stručna praksa u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo pod voditeljstvom dr. sc. Blaženke Hunjak, dr. med.

2017. PathCon Laboratories EU pod voditeljstvom dr. sc. Roberte Sauerborn Klobučar

Članstva i ostale vještine:

2016.-2020. Aktivni član udruge studenata biologije „BIUS“, gdje sam od rujna 2018. voditeljica Mikrobiološke sekcije.

Govorim engleski i njemački jezik.

Vozač sam B kategorije.