

UTJECAJ NUKLEOZIDNIH ANALOGA NA GENSKU VARIJABILNOST I INFEKTIVNOST VIRUSA ZAUŠNJAKA

Jurković, Mirna

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:181057>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-13**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MIRNA JURKOVIĆ

**UTJECAJ NUKLEOZIDNIH ANALOGA NA
GENSKU VARIJABILNOST I INFEKTIVNOST
VIRUSA ZAUŠNJAKA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

MIRNA JURKOVIĆ

**INFLUENCE OF NUCLEOSIDE
ANALOGUES ON THE HETEROGENEITY
AND INFECTIVITY OF MUMPS VIRUS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Maje Jagušić, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORICI

Dr. sc. Maja Jagušić završila je diplomski studij biotehnologije, smjer biokemijsko-mikrobiološki, na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu gdje je diplomirala 2008. godine. Iduće godine zaposlila se kao stručni suradnik u Laboratoriju za molekularnu biomedicinu Odjela za istraživanje i razvoj u Imunološkom zavodu d.d. u Zagrebu. Tamo je stekla iskustvo rada u okruženju dobre proizvođačke prakse te sudjelovala kao suradnica i voditeljica na brojnim razvojnim studijama vezanim uz optimizaciju procesa proizvodnje virusnih cjepiva, studijama stabilnosti proizvoda te validacijama metoda kontrole kvalitete. Paralelno s radom, upisala je doktorski studij Biotehnologije i bioprocenog inženjerstva na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu. Svoju doktorsku disertaciju na temu "Ciljana atenuacija virusa mumpsa na temelju virusnih faktora koji moduliraju mehanizme urođene imunosti" izradila je pod mentorstvom dr. sc. Maje Šantak (projekt "Molekularna patogeneza virusa mumpsa", financiralo Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta, 2007.-2014.) i obranila 2017. godine. Od 2013. godine nastavila je svoj rad kao asistent u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu, a 2019. godine postaje znanstvena suradnica. Tijekom svoje karijere, sudjelovala je na nekoliko znanstvenih projekata u području virologije, imunologije i vakcinologije, među kojima se ističe projekt „The influence of viral population diversity on safety and immunogenicity of licensed mumps vaccine strain“ (voditeljica: dr. sc. Jelena Ivančić Jelečki, financirala Europska komisija, program FP7, 2011.-2013.), projekt „Genomika i molekularna epidemiologija humanih paramiksovirusa u Hrvatskoj“ (voditelj: dr. sc. Dubravko Forčić, financirala Hrvatska zaklada za znanost, 2014.-2018.) te projekt "Jačanje kapaciteta CERVirVaca (Centra izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva) za istraživanja u virusnoj imunologiji i vakcinologiji" (voditelj: prof. dr. sc. Stipan Jonjić, financirao Europski fond za regionalni razvoj, 2017.-2023.). U svom radu orijentirana je na istraživanje RNA virusa, posebice virusa zaušnjaka, uključujući bazična istraživanja njegove biologije te strategija za racionalni dizajn novog cjepiva. Njezina istraživanja rezultirala su koautorstvom 14 originalnih znanstvenih publikacija objavljenih u CC časopisima te izlaganjima rezultata na 30 stručnih i znanstvenih skupova. Također, aktivna je članica Hrvatskog mikrobiološkog društva i Hrvatskog imunološkog društva.

ZAHVALE

Hvala mojoj mentorici dr.sc. Maji Jagušić na vodstvu kroz poslijediplomski studij i provedeno istraživanje. Hvala na potpori i razumijevanju koji su mi zaista bili potrebni kako bi ovaj pothvat bio uspješan.

Hvala svim članovima Centra (bivšim i sadašnjim), a posebno dr.sc. Dubravku Forčiću, dr.sc. Jeleni Ivančić-Jelečki, dr.sc. Tanji Košutić Gulija, mag.biol.mol. Dorotei Pali i dr.sc. Maji Šantak.

Još malo posebnije od već posebnoga - veliko hvala mojim mentoricama iz sjene ing. Renati Jug i dr.sc. Anamariji Slović na neizmjernoj pomoći u eksperimentalnom radu, kao i na svim savjetima i razgovorima.

Hvala izv.prof.dr.sc. Snježani Židovec Lepej s Odjela za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti dr. Fran Mihaljević na pomoći i bivanju svijetlom točkom ovog putovanja.

Hvala *Tetama iz Referade* koje su mi toliko puta izašle u susret da sam to već odavno prestala brojati.

Također, hvala prof.dr.sc. Peri Lučinu i svim članovima Zavoda za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci koji su mi omogućili da se u miru posvetim završavanju doktorata.

Za kraj, ali definitivno ne manje važno - hvala mojoj obitelji i svim mojim ljudima (od kojih su neki navedeni i u gornjim retcima) na razumijevanju i pruženoj podršci. Posebno hvala na svim onim trenucima kada me je trebalo (ponovo i ponovo) motivirati i dignuti. Rekla bih da ste to uspješno učinili.

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

UTJECAJ NUKLEOZIDNIH ANALOGA NA GENSKU VARIJABILNOST I INFEKTIVNOST VIRUSA ZAUŠNJAKA

MIRNA JURKOVIĆ

Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji

Sveučilište u Zagrebu

Pojava epidemija uzrokovanih virusom zaušnjaka čak i u procijepljenim populacijama ukazuje na potrebu razvoja učinkovitijih cjepiva i specifične antivirusne terapije. U ovom istraživanju ispitan je potencijal triju nukleozidnih analoga (ribavirina, 5-fluorouracila, 5-azacitidina) za moduliranje genske varijabilnosti ovog virusa u smjeru njegove atenuacije ili ekstinkcije metodama virusne kvantifikacije te analize genoma na temelju rezultata sekvenciranja nove generacije. Pokazano je da sva tri nukleozidna analoga u genom uvode specifične promjene, mijenjaju stopu mutacije i smanjuju titar virusa u staničnoj kulturi. Virusi tretirani 5-azacitidinom razvili su rezistentnost na nukleozidni analog. Tretman virusa koncentracijom ribavirina od 500 μM doveo je do ekstinkcije virusa. Rezultati ovog istraživanja pridonose boljem razumijevanju biologije i evolucije virusa zaušnjaka, naglašavajući potencijal mutageneze kao jednog od mehanizama djelovanja sva tri nukleozidna analoga na ovaj virus.

(136 stranice, 47 slika, 30 tablica, 141 literaturni navod, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: virus zaušnjaka, varijabilnost virusne populacije, nukleozidni analozi, mutageneza

Mentorica: dr. sc. Maja Jagušić, znanstvena suradnica

Ocjenjivači: 1. izv. prof. dr. sc. Snježana Židovec Lepej, znanstvena savjetnica

2. dr. sc. Dubravko Forčić, znanstveni savjetnik

3. izv. prof. dr. sc. Silvija Černi, izvanredni profesor

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

INFLUENCE OF NUCLEOSIDE ANALOGUES ON THE HETEROGENEITY AND INFECTIVITY OF MUMPS VIRUS

MIRNA JURKOVIĆ

Centre for Research and Knowledge Transfer in Biotechnology
University of Zagreb

Intermittent mumps virus outbreaks within vaccinated populations underscore the imperative for advancing more efficacious vaccines and specific antiviral therapy. This study investigates the potential of three nucleoside analogs (ribavirin, 5-fluorouracil, 5-azacytidine) for modulating the genetic variability of this virus towards its attenuation or extinction using virus quantification methods and next-generation sequencing genome analysis. Results show that these analogs induce specific genomic changes, alter mutation rates, and reduce virus titre in cell culture. Notably, viruses treated with 5-azacytidine exhibit resistance to the nucleoside analog. Additionally, a 500 μ M ribavirin concentration leads to virus extinction. The research enhances understanding of mumps virus biology and evolution, emphasizing mutagenesis as a key mechanism for all three nucleoside analogs.

(136 pages, 47 figures, 30 tables, 141 references, original in Croatian)

Keywords: mumps virus, virus population diversity, nucleoside analogues, mutagenesis

Supervisor: dr. sc. Maja Jagušić, Research Associate

Reviewers: 1. Senior Research Scientist Snježana Židovec Lepej, Ph.D

2. Senior Research Scientist Dubravko Forčić, Ph.D

3. Associate Professor Silvija Černi, Ph.D

Sadržaj

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	3
2.1 Patogeneza virusa zaušnjaka	3
2.2 Struktura viriona i organizacija genoma virusa zaušnjaka	4
2.3 Replikacijski ciklus virusa zaušnjaka.....	5
2.4 Evolucija RNA virusa (kvazivirsa)	7
2.4.1 Letalna mutageneza	10
2.4.2 Potencijal promjene prirodne stope mutacija u proizvodnji živih atenuiranih cjepiva..	12
2.4.3 Smanjenje prirodne stope mutacija.....	12
2.4.4 Povećanje prirodne stope mutacija	13
2.5 Nukleozidni analozi.....	15
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1 Materijal	18
3.1.1 Biološki materijal	18
3.1.2 Kemikalije i otopine	19
3.2 Metode.....	21
3.2.1 Uzgoj staničnih kultura.....	21
3.2.2 Test za određivanje metaboličke aktivnosti stanica.....	22
3.2.3 Brojanje stanica	23
3.2.4 Infekcija staničnih kultura	25
3.2.5 Određivanje titra virusa testom plakiranja.....	26
3.2.6 Određivanje učinka koncentracije stanica u sloju na virusnu replikaciju.....	27
3.2.7 Određivanje antivirusnog učinka nukleozidnih analoga.....	28
3.2.8 Kultiviranje virusa u prisustvu nukleozidnih analoga	29
3.2.9 Određivanje rezistencije virusa kultiviranih u prisustvu nukleozidnih analoga	30

3.2.10	Izolacija ukupne virusne RNA.....	30
3.2.11	Reverzna transkripcija	30
3.2.12	Lančana reakcija polimerazom.....	31
3.2.13	Elektroforeza u agaroznom gelu i pročišćavanje produkata lančane reakcije polimerazom	36
3.2.14	Mjerenje koncentracije uzoraka nakon pročišćavanja iz gela	36
3.2.15	Priprema biblioteka pročišćenih produkata lančane reakcije polimerazom i sekvenciranje metodom sekvenciranja nove generacije	36
3.2.16	Analiza rezultata sekvenciranja metodom sekvenciranja nove generacije	37
3.2.17	Razdvajanje virusnih varijanti postupkom plakiranja	39
3.2.18	Priprema uzoraka za sekvenciranje metodom po Sangeru	39
3.2.19	Izračun 50%-tne inhibitorne doze i koeficijenta korelacije	40
3.2.20	Statistička obrada rezultata	40
4.	REZULTATI.....	41
4.1	Određivanje kinetike replikacije virusa zaušnjaka	41
4.2	Određivanje učinka nukleozidnih analoga na stanice	43
4.2.1	Učinak ribavirina na stanice	43
4.2.2	Učinak 5-fluorouracila na stanice.....	46
4.2.3	Učinak 5-azacitidina na stanice	50
4.3	Utjecaj koncentracije stanica u sloju za infekciju na titar virusa	53
4.4	Određivanje antivirusnog učinka nukleozidnih analoga na virusne varijante MuVi-C i ZgA/Cro69	55
4.4.1	Određivanje antivirusnog učinka ribavirina	55
4.4.2	Određivanje antivirusnog učinka 5-fluorouracila	57
4.4.3	Određivanje antivirusnog učinka 5-azacitidina	59
4.5	Uzastupno kultiviranje virusa zaušnjaka u prisustvu nukleozidnih analoga	62
4.5.1	Uzastupno kultiviranje virusa zaušnjaka u prisustvu ribavirina	63
4.5.2	Uzastupno kultiviranje virusa zaušnjaka u prisustvu 5-fluororacila.....	66

4.5.3	Uzastopno kultiviranje virusa zaušnjaka u prisustvu 5-azacitidina	67
4.6	Ispitivanje rezistentnosti virusa zaušnjaka uzastopno kultiviranih u prisustvu nukleozidnih analoga	68
4.6.1	Rezistentnost virusa kultiviranih u prisustvu ribavirina	68
4.6.2	Rezistentnost virusa kultiviranih u prisustvu 5-fluorouracila	69
4.6.3	Rezistentnost virusa kultiviranih u prisustvu 5-azacitidina	70
4.7	Genska karakterizacija virusa zaušnjaka uzastopno kultiviranih u prisustvu nukleozidnih analoga	71
4.7.1	Određivanje greške polimeraze i metode sekvenciranja nove generacije	72
4.7.2	Genska karakterizacija virusa zaušnjaka uzastopno kultiviranih u prisustvu ribavirina.....	73
4.7.3	Genska karakterizacija uzoraka virusne varijante MuVi-C uzastopno kultiviranih u prisustvu 5-fluorouracila.....	90
4.7.4	Genska karakterizacija uzoraka virusne varijante MuVi-C uzastopno kultiviranih u prisustvu 5-azacitidina.....	96
4.8	Korelacija između heterogenosti virusne populacije i titra virusa	103
4.9	Izolacija varijanti virusa 4_A1_p5 i 4_A2_p5 te određivanje njihove rezistentnosti na 5-azacitidin	104
5.	RASPRAVA	109
6.	ZAKLJUČCI.....	120
7.	LITERATURA	121
8.	ŽIVOTOPIS.....	135

1. UVOD

Virus zaušnjaka je RNA virus iz porodice *Paramyxoviridae*, s čovjekom kao jedinim prirodnim domaćinom. Prijenos virusa obično se odvija respiratornim putem, uzrokujući akutnu infekciju najčešće praćenu upalom parotidinih žlijezda. Oko 10% infekcija povezano je s neurološkim komplikacijama poput meningitisa ili rijede encefalitisa zbog neurotropne prirode virusa (1). Cijepljenje protiv zaušnjaka, započeto 60-ih godina 20. stoljeća, uspješno je smanjilo obolijevanje, ali povremene epidemije u procjepljenim populacijama ističu potrebu za razvojem učinkovitijeg cjepiva (2). Također, specifični lijek za bolest uzrokovanu ovim virusom ne postoji. Virusi RNA svijeta, pa tako i virus zaušnjaka, imaju visoku stopu mutacija što im pruža evolucijsku prednost u prilagodljivosti i u izbjegavanju imunosnog odgovora domaćina. Smatra se da je prirodna stopa mutacije RNA virusa uravnotežena na način da omogućuje maksimalnu stopu mutacija koja još uvijek nije negativna za vijabilnost populacije (3). Sva trenutna cjepiva za virus zaušnjaka temelje se na atenuaciji živog virusa, pružajući cjelovit imunološki odgovor, no uz rizik reverzije u virulentni fenotip. Općenito, razvoj novih živih atenuiranih cjepiva usmjeren je na racionalni dizajn s ciljem povećanja sigurnosti i efikasnosti. Istražuje se i mogućnost liječenja virusnih bolesti putem letalne mutageneze, koja povećava mutacijsku stopu virusa do razine koja uzrokuje ekstinkciju virusne populacije. Uvid u prirodnu stopu mutacije virusa te istraživanje mogućnosti njene manipulacije omogućuje bolje shvaćanje same biologije promatranog virusa kao i otkrivanje njegovog potencijala za razvoj novog tipa cjepiva ili antivirusnog lijeka. Potencijal manipulacije virusne populacije zaušnjaka koji bi mogao pružiti osnovu za razvoj novog cjepiva ili antivirusne terapije do sada nije istraživao.

Ciljevi istraživanja

- 1) Ispitati učinak nukleozidnih analoga (ribavirina, 5-fluorouracila i 5-azacitidina) na infektivnost virusa zaušnjaka kultiviranjem virusnih varijanti na različitim staničnim linijama te usporedbom titra kontrolnih i tretiranih virusa u supernatantu inficirane stanične kulture.
- 2) Ispitati učinak nukleozidnih analoga (ribavirin, 5-fluorouracil i 5-azacitidin) na heterogenost populacije virusa zaušnjaka analizom genoma pomoću metode sekvenciranja nove generacije i analizom rezultata dobivenih ovom metodom.

Hipoteze istraživanja

- 1) Nukleozidni analozi imaju antivirusnu aktivnost prema virusu zaušnjaka
- 2) Nukleozidni analozi uvode specifične promjene u genom virusa zaušnjaka
- 3) Nukleozidni analozi mijenjaju stopu mutacija u populaciji virusa zaušnjaka
- 4) Promjena stope mutacija u populaciji virusa mumpsa utječe na njegovu infektivnost *in vitro*

Ovo istraživanje omogućit će bolje razumijevanje genske kompleksnosti i heterogenosti populacija virusa zaušnjaka, antivirusne učinkovitosti nukleozidnih analoga prema virusu zaušnjaka kao i potencijala za moduliranje genske heterogenosti ovog virusa u vidu njegove atenuacije ili ekstinkcije. Mogućnost razvoja rezistentnosti virusa zaušnjaka na ispitivane nukleozidne analoge također će biti istraživana u ovom radu.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1 Patogeneza virusa zaušnjaka

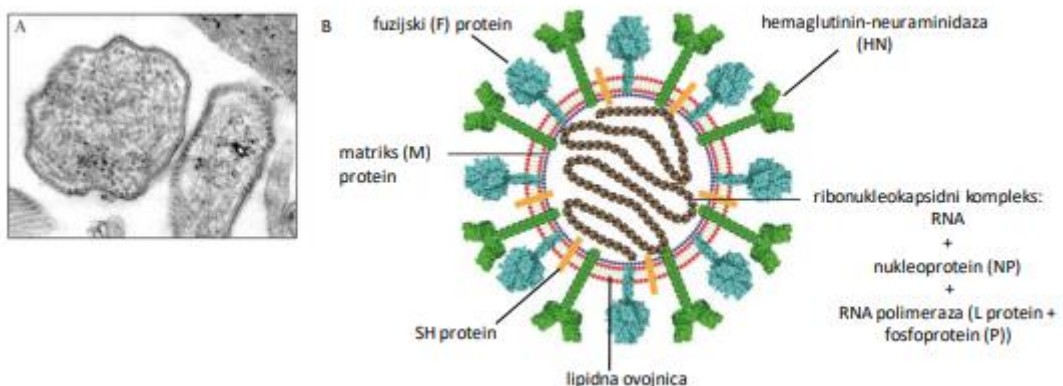
Jedini prirodni domaćin kod kojeg virus zaušnjaka uzrokuje bolest je čovjek. Virus uzrokuje akutnu infekciju čiji simptomi uključuju temperaturu, glavobolju, umor i, za zaušnjake karakteristično, oticanje parotidnih žlijezda (parotitis) iako parotitis nije ni primarni ni nužni korak u infekciji ovim virusom (1). Kod otprilike jedne trećine do polovice slučajeva bolest je asimptomatska (4). Prijenos virusa odvija se respiratornim putem, a virus prvotno inficira epitelne stanice gornjih dišnih puteva. Dalje se prenosi u regionalne limfne čvorove što rezultira viremijom u ranoj akutnoj fazi bolesti. Posljedično, virus inficira epitel različitih organa kao što su gušterača, mokraćni mjehur, jajnici i testisi što može dovesti do ozbiljnijih komplikacija (pankreatitis, orhitis, ooforitis ili privremena gluhoća). Obzirom na svoju neurotropnu prirodu, virus može inficirati i središnji živčani sustav. U manje od 10% slučajeva virus zaušnjaka uzorkuje meningitis te rjeđe encefalitis (manje od 0,5% slučajeva infekcije ovim virusom) (4).

Pedesetih godina prošlog stoljeća proizvedeno je inaktivirano cjepivo u Sjedinjenim Američkim Državama, no ono se s vremenom pokazalo neučinkovitim zbog svoje kratkotrajne imunogeničnosti (5). Nakon otkrića Endersa i suradnika da se kultiviranjem virusa zaušnjaka u embrioniranim kokošjim jajima zadržava imunogeničnost dok se istvremeno gubi infektivnost, započet je rad na živim atenuiranim cjepivima protiv ovog virusa (6). Sva cjepiva protiv zaušnjaka u sebi sadrže živi atenuirani virus i dobivena su kultiviranjem virusa kroz velik broj pasaža u staničnoj kulturi ili u embrioniranim jajima. Neka od tih cjepiva su Jeryl-Lynn, RIT 4385, Leningrad-3, Leningrad-Zagreb, Urabe Am9, S79, Rubini, Hoshino i Torii. Zbog niže stope serokonverzije od ostalih dostupnih cjepiva iz uporabe se povlači cjepivo Rubini. Djelomično se povlači i L-Zagreb (npr. L-Zagreb još uvijek koristi i prodaje Serum Institute of India), te isto tako i ruska i japanska cjepiva zbog veće incidencije neuroloških problema u odnosu na sojeve Jeryl-Lynn i RIT 4385 (7).

Povremene epidemije uzrokovane ovim virusom prisutne unatoč visokoj procjepljenosti populacije (2) te primjena suboptimalno atenuiranih cjepiva (8) ukazuju na njihovu neučinkovitost ili nedovoljnu sigurnost. To naglašava potrebu za istraživanjem molekularne osnove atenuacije ovog virusa i racionalni dizajn cjepiva posebno s obzirom da je prije uvođenja cjepiva za zaušnjake ovaj virus bio vodeći uzrok aseptičnog meningitisa (9).

2.2 Struktura viriona i organizacija genoma virusa zaušnjaka

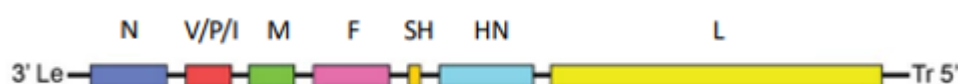
Virus zaušnjaka (*Mumps orthorubulavirus*) spada u red *Mononegavirales*, s obzirom da mu genom čini jednolančana RNA negativnog smisla. Na temelju svojih bioloških karakteristika, morfologije i organizacije genoma svrstan je u rod *Orthorubulavirus*, potporodicu *Rubulavirinae*, porodicu *Paramyxoviridae* (10). Virusne čestice su izrazito pleomorfne, a njihova veličina je u rasponu između 100 i 600 nm (11) (slika 1a). Sastoje se od ribonukleoproteinskog kompleksa (RNP) kojeg čini virusna RNA vezana uz nukleoprotein (N) zajedno s kompleksom virusnog fosfoproteina (eng. *phosphoprotein*, P) i velikog proteina (eng. *large protein*, L). Kompleks ova dva proteina djeluje kao RNA-ovisna RNA polimeraza (eng. *RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp) zadužena za transkripciju i replikaciju genoma virusa. Kompleks RNP je obavljen lipidnom ovojnicom (porijeklom od stanice domaćina) u koju su uklopljeni virusni proteini hemaglutinin-neuraminidaza (HN), fuzijski (F) protein i mali hidrofobni (eng. *small hydrophobic*, SH) protein (Slika 1b) (1).



Slika 1. Struktura čestice virusa zaušnjaka. (a) Presjek čestice snimljen transmisijским elektronskim mikroskopom (4); (b) Shematski prikaz čestice s proteinima N, P, M, F, SH, HN i L, prilagođeno prema (12) (b).

Genom virusa zaušnjaka čini jednolančana molekula RNA negativnog smisla duljine 15384 nukleotida (shematski prikaz na slici 2). Ona se sastoji od sedam gena koji počevši od 3' kraja kodiraju za: N, P/V/I, M, F, SH, HN i L protein (1). Kod svih, osim kod P gena, prepisuje se po jedna mRNA koja se zatim translatira u jedan protein. Procesom kotranskripcijske insercije gvanina s gena P nastaju tri mRNA od kojih nastaju tri različita proteina: P, I i V. Protein V je

kopija samoga gena, dok je protein P rezultat insercije dva gvanina, a protein I insercije četiri gvanina (13). Konzervirane regije duljine 9 nukleotida koje služe kao signal za početak i završetak transkripcije gena nalaze se na oba kraja svakog gena. Sami geni međusobno su odvojeni intergenskim regijama koje se ne prepisuju u mRNA. Između gena P i M, M i F te HN i L ove regije sadrže po jedan nukleotid, između gena N i P dva nukleotida te sedam nukleotida između gena SH i HN. Na 3' kraju virusnog genoma nalazi se nekodirajuća regija duljine 55 nukleotida (eng. *leader*, Le), a na 5' kraju nekodirajuća regija duljine 24 nukleotida (eng. *trailer*, Tr). One su obrnuto komplementarne i imaju ulogu u kapsidaciji, transkripciji te replikaciji virusa.



Slika 2. Shematski prikaz organizacije genoma virusa zaušnjaka.

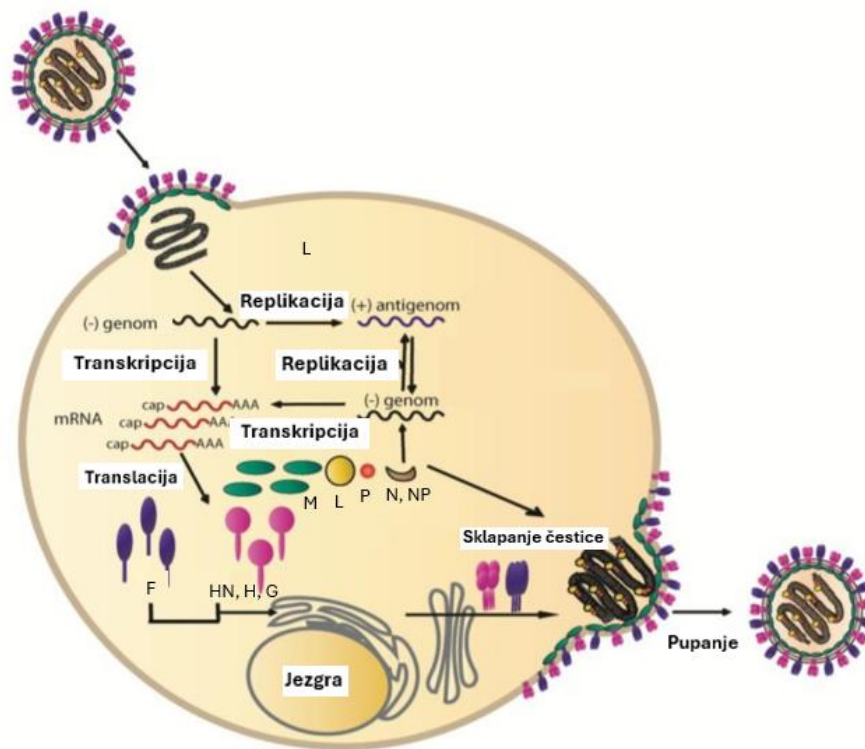
2.3 Replikacijski ciklus virusa zaušnjaka

Virus zaušnjaka započinje svoj replikacijski ciklus (slika 3) vezanjem na staničnu površinu i ulaskom u stanicu (1). Oba procesa pod kontrolom su površinskih glikoproteina HN i F. Protein HN se, zahvaljujući svojoj hemaglutininskoj aktivnosti, veže na stanične glikoproteine ili glikolipide koji sadrže sijaličnu kiselinu. Vezanje proteina HN na stanični receptor dovodi do konformacijskih promjena u samom proteinu i/ili promjena u interakciji proteina HN i F što rezultira aktivacijom proteina F. Ulazak virusne nukleokapside u stanicu omogućen je fuzijom virusne ovojnice i stanične membrane.

Replikacija virusa odvija se u staničnoj citoplazmi. Kao i kod drugih članova reda *Mononegavirales*, kod virusa zaušnjaka gola genomska RNA nije infektivna (1). Ona je vezana cijelom dužinom za protein N u virusnu nukleokapsidu koja predstavlja jedinu biološki aktivnu formu virusne RNA. Virusna nukleokapsida služi kao funkcionalan kalup za sintezu virusne RNA. S obzirom da je genomska RNA virusa reda *Mononegavirales* negativnog smisla, ona ne može izravno poslužiti kao mRNA nego prije mora biti prepisana u RNA pozitivnog smisla (antigenom) pomoću virusne replikaze RNA virusa - RNA-ovisne RNA polimeraze (eng. *RNA-dependant RNA polymerase*, RdRp) koju čini kompleks proteina P i L. Funkcija proteina P je vezanje RdRp na nukleokapsidu te sprečavanje samosklapanja proteina N (14). Aktivnost proteina L je enzimatska

i omogućuje inicijaciju, elongaciju i terminaciju sinteze RNA. Također, protein L dodaje *cap* na 5' kraj i poli(A) sekvenciju na 3' kraj novosintetiziranih mRNA (15).

Transkripcija počinje od 3' kraja genoma, a prepisuju se mRNA za sve virusne proteine. Što je gen udaljeniji od 3' kraja to je manja efikasnost transkripcije čime se stvara količina proteina u točnim omjerima potrebnim za sklapanje virusne čestice (1). Antigenom predstavlja kalup prema kojem se umnožava genomsko RNA. Virusni genom i antigenom se nakon sinteze ne modificiraju dodatkom 5' cap, ali su oboje prekriveni kapsidom od proteina N i tada se nazivaju ribonukleoproteinskim kompleksom. Vezanjem proteina L i P na ribonukleoprotein nastaje nova nukleokapsida.



Slika 3. Replikacijski ciklus paramiksovirusa. Preuzeto i prilagođeno prema (16).

Na staničnoj plazmatskoj membrani odvija se sklapanje virusne čestice (1). U membranu se ugrađuju virusni glikoproteini HN i F, a važnu ulogu u formiranju čestica imaju molekule proteina M koje se agregiraju s unutarnje strane plazmatske membrane. Virusna čestica izlazi iz stanice pupanjem. Neuraminidazna aktivnost proteina HN sprječava vezanje tog proteina sa sijaličnom kiselinom čime je onemogućeno agregiranje novonastalih virusnih čestica. Kako je površina inficirane stanice prekrivena virusnim glikoproteinima, virus se između stanica može širiti fuzijom

staničnih membrana ukoliko u okolini postoji tripsinproteaza potrebna za aktivaciju proteina F. Na taj se način stanice međusobno udružuju u sincicije - velike tvorbe načinjene od više jezgara.

2.4 Evolucija RNA virusa (kvazivirsa)

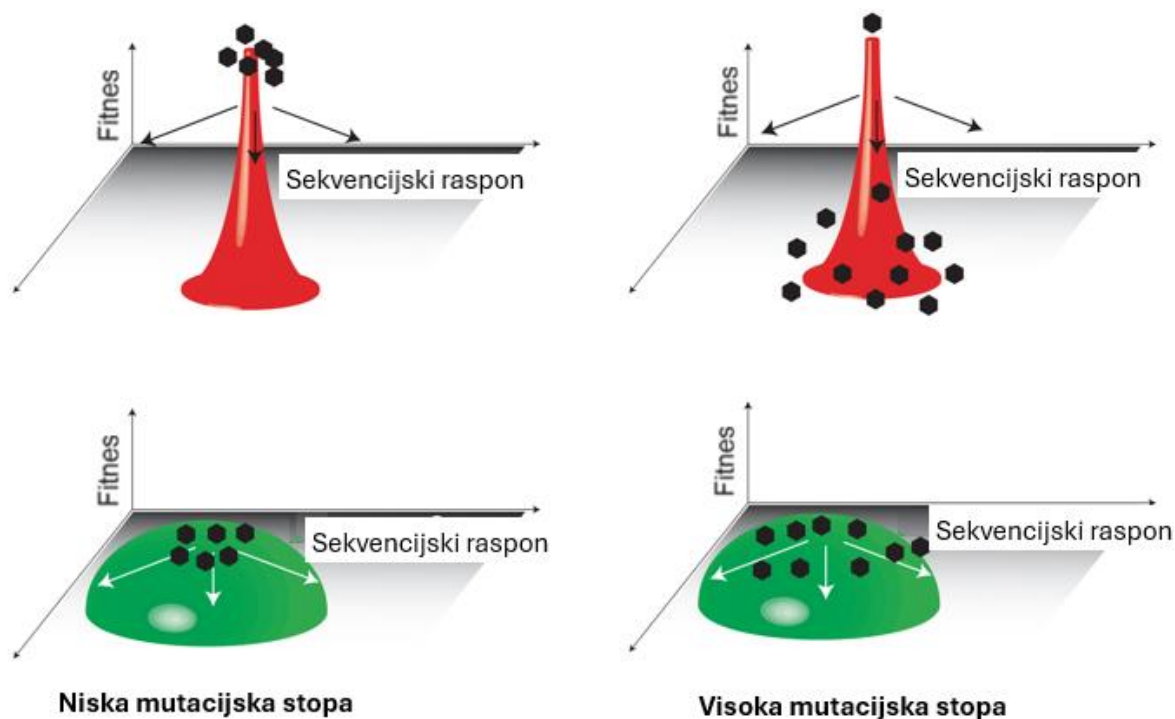
U RNA viruse ubrajaju se i retrovirusi, no kod njih u replikaciji reverznom transkripcijom nastaje DNA međuprodukt. U daljnjem tekstu sintagma RNA virusi odnosi se samo na viruse kod kojih iz postojeće RNA nastaje nova uz pomoć RdRp.

Pojam mutacijska stopa odnosi se na frekvenciju mutacija koje nastaju u određenom vremenskom intervalu (npr. količina mutacija po replikacijskom ciklusu), dok pojam frekvencija mutacija označava količinu mutanata u virusnoj populaciji (izraženu kao prosjek po cijeloj sekvenciji ili po određenoj poziciji u genomu (17)).

Paradigma evolucije je prilagodba jedinke na promjene uvjeta okoliša putem prirodne selekcije. Temelji se na postojanju mutacija koje mogu biti odabrane kao one koje jedinki omogućuju najveći reproduksijski uspjeh. Parameter kojim se kvantitativno opisuje prilagodba jedinke na okoliš je fitnes (od eng. *fitness*) pomoću kojeg je vidljivo kolika je sposobnost jedinke da preživi i ostavi potomstvo (18). Relativni fitnes virusa definiran je kao sposobnost virusa da proizvede infektivne virusne čestice, a kvantificira se u odnosu na referentni virus (17).

Osnovna jedinica evolucije je jedan određeni genotip koji daje fenotip s najvećim fitnesom u trenutnim uvjetima okoliša (3). Prirodna selekcija favorizira taj genotip dok su uvjeti povoljni (slika 5, populacija A), a kada se okoliš promijeni, dolazi do odabira drugih genotipova koji su prilagođeni novim uvjetima. S vremenom, dolazi do dominacije nisko zastupljene mutacije u populaciji koja je prilagođena na nove uvjete ili, u slučaju da takva mutacija ne postoji u populaciji, do izumiranja vrste. U slučaju RNA virusa (slika 5, populacija B), princip evolucije je nešto drugačiji. RNA virusi produciraju ogromne populacije, imaju jako kratak replikacijski ciklus, male genome te izrazito visoku stopu mutacija zbog niske vjernosti transkripcije njihovih replikaza (19). Također, njihove replikaze nemaju mehanizam popravka (20) pri transkripciji s obzirom da im nedostaje 3' – 5' egzozonukleazna domena koja je prisutna u staničnim DNA polimerazama (21). To dodatno pridonosi visokoj frekvenciji mutacija (otprilike 1 mutacija na 10000 nukleotida), najvećoj u usporedbi s DNA virusima i živućim organizmima (19). Za usporedbu, DNA virusi imaju frekvenciju mutacija od otprilike 1 mutacije na 100000000 do 1 mutacije na 1000000 nukleotida (22). Stopa mutacija koja je određena vjerošću transkripcije replikaze određuje raspon genske

varijabilnosti nad kojim prirodna selekcija može djelovati (3). Niska vjernost transkripcije replikaze rezultira genski izrazito raznolikim virusnim populacijama. Takva heterogenost prisutna je u obliku mutacija koje čine razliku između pojedinih virusnih sojeva, ali i u postojanju velikog broja virusnih varijanti unutar iste populacije. Opisana evolucijska strategija RNA virusa odgovara postavkama teorije kvazivrste (3) koju su definirali Eigen i Schuster (23) što je pokazano i u eksperimentalnim sustavima (24–26). Istraživanja provedena na Q β bakteriofagu 1960-ih godina postavila su temelje za teoretska i eksperimentalna istraživanja kvazivrste RNA virusa (27–29).

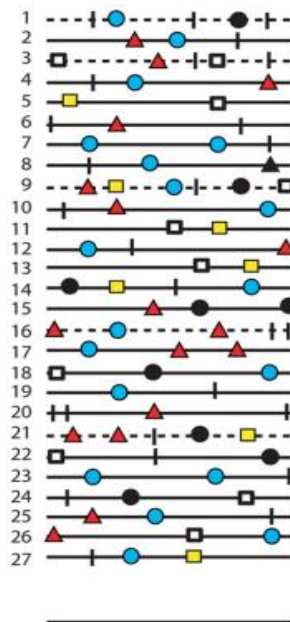


Slika 4. Ponašanje različitih populacija ovisno o stopi mutacije. Populacija A predstavlja poznati živi svijet u kojem je jedna karakteristika pozitivno odabrana kao ona koja u danim okolišnim uvjetima omogućuje najbolje preživljenje. U slučaju populacije B ne odabire se samo jedan genom s najvećim fitnessom u danim uvjetima, već se održava prisutnost populacije s različito mutiranim genomima. Time je omogućena brža prilagodba na nove uvjete okoliša i manji pad fitnessa (desni dio slike). Sekvencijski raspon predstavlja sve teoretski moguće varijacije sekvencija. (3)

Kvazivrrsta je definirana kao distribucija makromolekula s međusobno visoko srodnim sekvencijama koje kooperativno djeluju na funkcionalnoj razini, a u kojima dominira jedna ili više takozvanih *master* sekvencija (eng. *master sequence*). Vanjski faktori uvjetuju odabir najbolje prilagođene distribucije sekvencija, a ne samo jednu određenu sekvenciju (23). Heterogenost

virusne populacije pruža evolucijsku prednost i povećava mogućnost preživljenja virusa s obzirom na izrazito dinamično okruženje u organizmu domaćina kojeg inficiraju (3). Virusnu kvazivrstu čini takozvani *oblak* (eng. *cloud*) sličnih, ali u malom postotku različitih genotipova koji istovremeno postoje u populaciji i zajednički doprinose njenim karakteristikama. Stoga je osnovna evolucijska jedinica kod RNA virusa cijela populacija različitih genotipova, a ne samo jedna sekvencija, tj. jedan genotip.

Svi ti genotipovi prisutni u populaciji u danom trenutku organizirani su oko konsenzus sekvencije (slika 5).



Slika 5. Prikaz teoretskih sekvencija prisutnih u virusnoj populaciji (označene brojevima). Simbolima su naznačene različite mutacije koje oni nose. Na dnu je prikazana konsenzus sekvencija. Preuzeto i priagođeno prema (30).

Konsenzus sekvencija predstavlja najzastupljeniji nukleotid na svakoj pojedinoj poziciji u sekvencijama promatrano za cijelu virusnu populaciju (30). Kao takva, ona ne mora uopće biti prisutna u fizičkom obliku u virusnoj populaciji.

Visoka stopa mutacija omogućuje bržu prilagodbu na dinamički okoliš u kojem se virusi nalaze, ali isto tako visoka stopa mutacija proizvodi i veliku količinu sekvencija koje nemaju replikativni kapacitet ili ne kodiraju za vijabilne virusne čestice (3). Stoga virusna evolucija mora

balansirati između vjernosti transkripcije koja proizvodi dovoljno vijabilnih virusnih čestica i, istodobno, potrebe za velikom stopom mutacija kako bi se virus mogao prilagoditi dinamičkom okruženju domaćina (31). Istraživanja pokazuju da su RNA virusi evoluirali vrlo blizu takozvanog praga pogreške (eng. *error threshold*). Prag pogreške definiran je kao maksimalna stopa mutacija pri kojoj *master* sekvencija još može stabilizirati *oblak* mutanata (32). Ukoliko stopa mutacija prijeđe prag pogreške postojeća *master* sekvencija prestaje dominirati populacijom i dolazi do drifta u sekvencijskom rasponu. Populacija ne može održati genotip s najvećim fitnessom pa dolazi do gubitka genotipa s najvećom prilagodbom u korist drugih genotipova s nižim fitnessom, ali većom otpornošću na mutacije (33). Ukoliko visoka stopa mutacija ne dopušta preživljenje nijednog genotipa, tj. nijedan genotip nema replikativni kapacitet, dolazi do ekstinkcije ukupne virusne populacije.

Ekperimentalno je pokazano (npr. virus vezikularnog stomatitisa, virus dječje paralize, virus limfocitnog koriomeningitisa, HIV, hepatitis B virus i drugi) da povećanje prirodne stope mutacije virusa uz pomoć mutagena dovodi do velikog pada u infektivnosti virusa (3,34). S druge strane, povećanje homogenosti virusne populacije, odnosno smanjenje stope mutacija povećanjem vjernosti replikacije smanjuje mogućnost prilagodbe na promjene uvjeta dinamičkog okoliša virusa i uzrokuje svojevrsnu stabilnost virusne populacije (35,36). Općenito, promjene u prirodnoj stopi mutacija RNA virusa rezultiraju smanjenom infektivnošću virusa, a često i atenuiranim fenotipom virusa *in vitro* i *in vivo* (37,38). Ovaj koncept istražuje se u svrhu racionalnog dizajna atenuiranih živih cjepiva (u kontrastu s empirijskim dizajnom kojim je proizvedena većina danas postojećih cjepiva) te za kliničku primjenu u liječenju virusnih bolesti na principu letalne mutageneze.

2.4.1 Letalna mutageneza

Visoka mutacijska stopa RNA virusa koja njihovim populacijama omogućuje da opstaju na samom rubu praga pogreške pretpostavlja mogućnost povećanja stope mutacije vanjskim faktorima do razine koja će dovesti do nemogućnosti zadržavanja vijabilnih virusnih čestica u populaciji te time izumiranja cijele virusne populacije (39). Načini na koje se frekvencija mutacija može povećati su direktno oštećenje gena, ugradnja nekomplementarnih nukleotida za vrijeme replikacije, ili ugradnja nukleotidnih analoga u genom koji na sebe vežu baze nekomplementarne nukleotidu umjesto kojeg su vezani. Istraživanja provedena na virusima dječje paralize i virusa vezikularnog stomatitisa pokazala su da povećanje u frekvenciji mutacija između 1,1 do 2,8 puta

dovodi do pada u titru virusa za više od 100 puta (40,41). Za usporedbu, za isti učinak kod DNA organizama potrebno je povećati frekvenciju mutacija oko 80000 puta (42). Loeb i suradnici su kasnih 90-ih godina 20. stoljeća pokazali da kultiviranje virusa HIV-1 (koji je retrovirus) u prisustvu mutagena hidroksideoksicitidina nakon 24 uzastopnih pasaža u staničnoj kulturi dovodi do potpunog gubitka titra virusa, tj. letalne mutageneze (43). Letalna mutageneza definirana je kao antiviralna strategija u kojoj se povećava stopa mutacija prilikom replikacije virusa do razine koja dovodi do ekstinkcije virusne populacije uz pomoć mutagena. Mutageni koji se obično koristi u ovim istraživanjima su nukleozidni analozi. Nukleozidni analozi su sintetički spojevi koji su strukturno slični prirodnim nukleozidima koji se nalaze u DNA i RNA. Kao takvi mogu se ugraditi u rastući lanac DNA ili RNA tijekom replikacije ili transkripcije, što dovodi do poremećaja ili inhibicije normalnih staničnih procesa (44). Sekvenciranje virusa iz 23. pasaža, tj. onog koji je prethodio pasažu u kojoj virusni titar HIV-1 nije bio detektibilan pokazala je povećanje frekvencije mutacija A→G (očekivane za ovaj mutagen) za 2,6 do 5 puta. Ovakav rezultat ide u prilog hipotezi da do gubitka virusne populacije dolazi uslijed povećanja frekvencije mutacija iako u obzir treba uzeti i mogućnost dodatnih mehanizama djelovanja korištenog mutagena (34). Pokazatelji kojima se dokazuje da je do ekstinkcije virusne populacije došlo uslijed letalne mutageneze su pozitivna korelacija između povećanja frekvencije mutacija u virusnoj populaciji i gubitka virusnog titra kojem je prethodilo povećanje frekvencije mutacija uslijed djelovanja mutagena te povećanje tipa mutacija specifičnih za korišteni mutagen (39).

U godinama koje su uslijedile provedena su istraživanja letalne mutageneze na različitim RNA virusima s različitim nukleozidnim analogima (34). Istraživanje provedeno na virusu uzročniku bolesti ruku, nogu i usta pokazalo je potencijal ekstinkcije virusne populacije u staničnoj kulturi kombinacijom viralnih inhibitora i povećane stope mutacija korištenjem nukleozidnih analoga (45), dok je istraživanje provedeno na virusu limfocitnog koriomeningitisa pokazalo potencijal primjene letalne mutageneze *in vivo* u pokusima na miševima inficiranim ovim virusom, a tretiranih nukleozidnim analogom 5-fluorouracilom (5-FU) (46). Mogućnost ekstinkcije virusa različitim nukleozidnim analogima za sada je pokazana za različite pozitivne i negativne jednolančane RNA viruse iz porodica *Picornaviridae*, *Calciviridae*, *Flaviviridae*, *Herpeviridae*, *Togaviridae*, *Coronaviridae*, *Virgaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Hantaviridae*, *Phenuiviridae*, *Arenaviridae* i *Filoviridae* korištenjem različitih nukleozidnih analoga (34). Za neke virusne bolesti poput hepatitisa C i COVID-19 koriste se terapeutici (ribavirin (RBV),

favipiravir i molnupiravir) za koje je pokazano da je mehanizam njihovog antivirusnog djelovanja (barem dijelom) rezultat povećanja mutacija u virusnoj populaciji (34).

Unatoč potencijalu koji letalna mutageneza virusa pruža u liječenju virusnih bolesti, potrebno je obratiti pažnju na mogućnost genotoksičnog ili kancerogenog utjecaja nukleozidnih analoga na stanice domaćina (34). Također, povećanje frekvencije mutacija virusa ne smije biti takvo da proizvede kontraefekt prilagodbe virusa na nove uvjete te time pospješi rezistenciju na sam terapeutik te potencijalno dovede do stvaranja klinički opasnijih sojeva virusa (47).

2.4.2 Potencijal promjene prirodne stope mutacija u proizvodnji živih atenuiranih cjepiva

Živa atenuirana cjepiva smanjuju infektivnost virusa, ali on i dalje ostaje vijabilan (48). Ova cjepiva imitiraju prirodnu infekciju, brzo aktiviraju imunološki sustav (49), potiču humoralni i stanični imunosni odgovor, pružaju dugoročnu zaštitu od bolesti te imaju i nespecifično djelovanje protiv drugih patogena (50). Međutim, kod ovakvih cjepiva postoje određeni nedostaci u usporedbi s onima koja u sebi ne sadrže vijabilni virus. Ona mogu izazvati neželjene imunološke reakcije zbog pogrešnog rukovanja cjepivom, a mutacije ili interferencija s drugim virusima mogu dovesti do reverzije virusa ili stvaranja novih sojeva koji mogu uzrokovati bolest (50). Cjepljenje živim atenuiranim cjepivima nije preporučljivo za imunokompromitirane osobe (51). Budući da se cjepni sojevi atenuiranih cjepiva otkrivaju empirijski i često se ne zna molekularna osnova atenuacije, potrebna su opsežna i dugotrajna klinička istraživanja prije njihove masovne primjene (49).

Bolje poznavanje molekularne atenuacije cjepiva omogućilo bi njihov racionalni dizajn te dodatno smanjenje njihovih nedostataka. Jedan od smjerova istraživanja racionalnog dizajna uključuje upravo manipulaciju sastavom virusne populacije promjenom vjernosti transkripcije virusne replikaze čija je posljedica smanjenje ili povećanje stope mutacija virusa. Istraživanja provedena na različitim virusima proučavala su oba pristupa.

2.4.3 Smanjenje prirodne stope mutacija

Povećanjem vjernosti transkripcije smanjuje se heterogenost virusne populacije čime je virusu smanjena sposobnost prilagodbe na dinamički okoliš domaćina (37). Eksperimentalno su ovu teoriju prvi put dokazale dvije zasebne istraživačke skupine za virus dječje paralize (36,52). Ovaj je virus od interesa za istraživanje jer je kod postojećih cjepiva protiv dječje paralize prisutan određeni postotak reverzije cjepnog soja u divlji tip što smanjuje mogućnost eradikacije ove bolesti

iz populacije (53). Virusni mutant s povećanom vjernosti transkripcije nosio je jednu mutaciju na aminokiselinskoj poziciji 64 gdje je glicin prisutan u divljem soju virusa zamijenjen serinom (G64S). Mutant G64S, čija mutacija se nalazi u domeni virusne polimeraze (52), pokazao je manju frekvenciju mutacija i manju stopu inkorporacije nukleozidnih analoga u genom u usporedbi s divljim sojem kada su oba bila kultivirana u njihovom prisustvu (37). Ovaj mutant ima sličnu kinetiku replikacije kao divlji soj, ali proizvodi manje raznoliku virusnu populaciju, što smanjuje njegovu sposobnost prilagodbe i infektivnost (35). U slučaju dječje paralize, mutant G64S je izgubio svoju neurotropnost i patogenost, ali je izazvao snažan imunski odgovor u animalnom modelu. Povećana homogenost virusne populacije bez smanjenja sposobnosti replikacije ne smanjuje ukupnu sposobnost preživljavanja virusa (54). To bi moglo biti korisno za razvoj stabilnih živih atenuiranih cjepiva koja imaju smanjenu mogućnost povratka u divlji tip virusa. Trenutno je to jedan od glavnih izazova u mogućem stavljanju takvih cjepiva u uporabu. Premisa djelovanja mutagena u koncentraciji koja ne dovodi do letalne mutageneze virusa, a ipak dovodi do pada u titru na virusnu populaciju u uzastopnim pasažima pretpostavljala je da će povećanjem prirodne stope mutacija doći do stvaranja velikog broja nevijabilnih čestica. Prirodnom selekcijom doći će do odabira virusnog mutanta koji ima veću replikativnu vjernost jer takav virus neće u svoj genom ugrađivati nukleozidne analoge (36,55). Upravo na ovaj način dobiven je opisani atenuirani mutant virusa dječje paralize. Virusi s većom replikativnom vjernošću dobiveni u pasažima u prisustvu mutagena rezistentni su na djelovanje mutagena pomoću kojeg su dobiveni, kao i na djelovanje drugih mutagena.

2.4.4 Povećanje prirodne stope mutacija

Povećanje prirodne stope mutacije, odnosno heterogenosti populacije također dovodi to smanjenja infektivnosti virusa i mogućnosti njegovog rasprostranjenja (38,56). Razlog tome je nakupljanje velikog broja nevijabilnih virusnih čestice uslijed stope mutacije koja prelazi prag pogreške (57,58). Ukoliko se stopa mutacija virusa poveća toliko da populacija više ne može proizvoditi vijabilne virusne čestice, dolazi do ekstinkcije virusa (59). Istraživanja su pokazala da je uzastupnim pasažima virusa s mutagenom moguće ispoljiti i virus sa smanjenom vjernosti transkripcije (60–63), iako su virusi sa smanjenom vjernosti transkripcije u većini slučajeva dobiveni direktnom mutagenezom nukleotida za koje je poznato da utječu na vjernost transkripcije (38,64–66). Za razliku od virusnih mutanata dobivenih uzastopnim pasažima u prisustvu mutagena

kod kojih dolazi do smanjenja prirodne stope mutacija, virusi sa smanjenom vjernošću transkripcije dobiveni u ovakvim pasažima rezistentni su na djelovanje samo onog mutagena pomoću kojeg su ispoljeni (60–63).

Objekti vrste studija podržavaju hipotezu da se RNA virusi repliciraju unutar evolucijski odabranog raspona vjernosti i da odstupanje izvan tog raspona jako utječe na infektivnost virusa (67).

U godinama koje su uslijedile, istraživačke skupine identificirale su, i nastavljaju identificirati, virusne mutante s promjenjenom vjernosti transkripcije (koja kao takva ima ili višu ili nižu stopu mutacija od divljeg tipa virusa) u virusnim porodicama *Picornaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Caliciviridae*, *Arteriviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Coronaviridae* i *Phenuiviridae* (54). Neki od primjera tih virusnih mutanata su bolesti ruku, nogu i usta (60), coxsackie B3 virus (38), Chikungunya virus (68), virus zapadnog Nila (61), norovirus (69), virus gripe (62), virus groznice doline Rift (70) i drugi. Ova istraživanja pokazala su da mutacije u RdRp mogu povećati ili smanjiti replikativnu vjernost virusa koja kod većine mutanata stvara populacije koje imaju 1,5 – 2 puta veću, odnosno manju mutacijsku stopu od prirodne populacije (54). U većini slučajeva ovakva promjena rezultira smanjenom infektivnošću virusa što daje potencijal za proizvodnju živih atenuiranih cjepiva na ovaj način (71).

Način na koji se vjernost transkripcije polimeraze može promijeniti je direktnom mutagenezom nukleotida koji utječu na vjernost transkripcije (38,72) ili djelovanjem mutagena (obično nukleozidnog analoga) na virus pri čemu se može ispoljiti varijanta virusa rezistentna na mutagen (36,68).

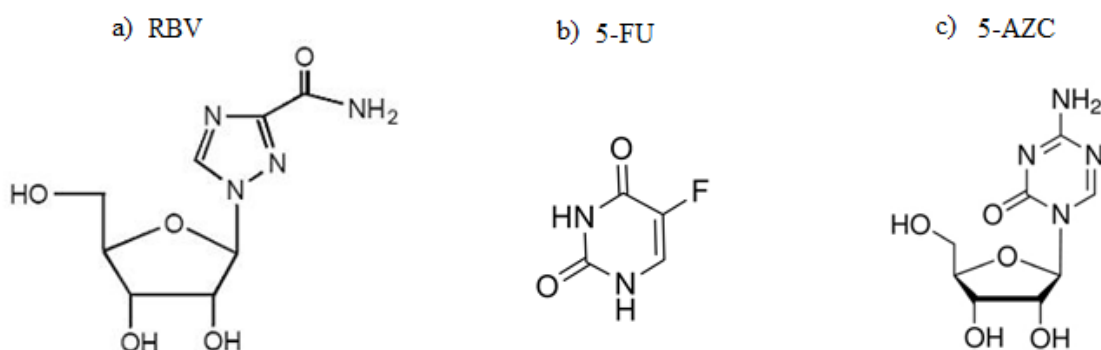
Mutacije koje dovode do promjene vjernosti transkripcije polimeraze nalaze se u samom genu koji je kodira (54) uz rijetke iznimke (73,74). Iako su istraživanja pokazala smanjenu infektivnost i kod virusa s povećanom i sa smanjenom stopom mutacija, povećana vjernost transkripcije čini se kao bolja opcija s obzirom da rezultira većom genskom stabilnošću koja je preduvjet za razvoj dobrog cjepiva (54). Iako promjena sastava virusne populacije ima potencijal za razvoj živih atenuiranih cjepiva, potrebna su dodatna istraživanja koja bi trebala imati poseban naglasak na postizanju stabilnosti takvih virusnih populacija kako bi se što više smanjila mogućnost njihove reverzije u divlji tip virusa.

Zasad nije poznato mogu li se opisani pristupi moduliranja vjernosti transkripcije polimeraze primijeniti za viruse iz porodice *Paramyxoviridae* kojoj pripada i virus zaušnjaka. S obzirom da

kristalna struktura RdRp ovog virusa nije poznata, nije moguće istražiti opcije atenuacije direktnim ciljanjem regija zaslužnih za vjernost transkripcije.

2.5 Nukleozidni analozi

Kao što je već spomenuto, za letalnu mutagenezu kao i za probir genski stabilnih virusnih varijanti koriste se različiti mutageni. U studijama ovog tipa čest izbor mutagena su nukleozidni analozi kao što su npr. ribavirin (RBV), 5-fluorouracil (5-FU), 5-azacitidin (5-AZC), favipiravir i drugi. Nukleozidni analozi su nukleozidi koji sadrže analog baze i šećer (slika 6).



Slika 6. Kemijske strukture nukleozidnih analoga (a) ribavirin (RBV) (b) 5-fluorouracil (5-FU) i (c) 5-azacitidin (5-AZC)

S obzirom na sličnost s prirodnim nukleozidima mogu se umjesto njih ugraditi u lanac nukleinske kiseline pri replikaciji te prekinuti sintezu novog lanca ili povećati stopu mutacija stvaranjem nekomplementarnih nukleotidnih parova (75). Osim mutagenog djelovanja, nukleozidni analozi mogu iskazivati i druge direktne ili indirektne antivirusne učinke. Koriste se u liječenju različitih bolesti, uključujući rak, virusne infekcije i autoimune poremećaje (76).

U genom virusa RBV (slika 6a) se može ugraditi kao bazni analog gvanina, pri čemu se jednako dobro sparuje i s uracilom i citozinom i time inducira tranzicije C→U i G→A u genomu (77) (slika 7a). Unutar stanice RBV se pomoću staničnih kinaza fosforilira u metabolite mono- (RMP), di- (RDP) i trifosfate (RTP). Oblik koji se može ugraditi u rastući DNA ili RNA lanac pri replikaciji i dovesti do terminacije elongacije ili do već spomenutog krivog sparivanja baza je RTP (77). Osim mutagenog, pokazana su i druga djelovanja RBV-a npr. RMP inhibira enzim domaćina inozin monofosfat dehidrogenazu (IMPDH) što dovodi do smanjenja u pričuvu (eng. *pool*) intracelularnog gvanozin trifosfata. Uz navedeno, RBV također blokira sintezu virusa i *capping*

virusne mRNA te je pokazan i njegov imunomodularni efekt – utječe na TH1/TH2 odgovor kao i na indukciju interferonom stimuliranih gena (ISG) (78). Poznato je da RBV ima antivirusni učinak prema virusu zaušnjaka (79,80), međutim točan mehanizam njegovog djelovanja zasad nije poznat. Ovaj nukleozidni analog u kombinaciji s interferonom primarno se koristi u antivirusnoj terapiji hepatitisa C (81) iako se zbog nuspojava koje može prouzrokovati u novije vrijeme istražuju novi načini tretiranja ove bolesti (82). Osim za hepatitis C, RBV se pokazao efikasnim i u tretmanu za druge viruse kao što su respiratorni sincicijalni virus (82), virus Lassa groznice (83), kod tretiranja virusnih hemoragijskih groznica (83), u smanjivanju simptoma gripe kod oboljelih (84), a u istraživanju provedenom 2021. godine (85) pokazan je pozitivan efekt RBV-a u liječenju bolesti COVID-19. S obzirom na svoje mutageno djelovanje, RBV se često koristi u istraživanjima utjecaja promjene stope mutacija na infektivnost virusa. Prvi virusni mutant za kojeg se pokazalo da smanjenje stope mutacije vodi atenuiranom fenotipu bio je G64S mutant virusa dječje paralize dobiven upravo primjenom RBV-a na virus (36). Promjenjena stopa mutacije te smanjena infektivnost virusa nakon tretmana RBV-om pokazana je i za virus slinavke i šapa (86), virus vezikularnog stomatitisa (87) i virus gripe A (88). Na stanice RBV djeluje tako da usporava proliferaciju i brzinu dijeljenja, no sam učinak je ovisan i o samoj vrsti stanica te o korištenim koncentracijama RBV-a (77).

Nukleozidni analog 5-FU (slika 6b) analog je pirimidina. Unutar stanica se uz pomoć staničnih enzima metabolizira u svoje aktivne oblike: mono- (5-FUMP), di- (5-FUDP) i trifosfate (5-FUTP) koji inhibiraju enzime koji su uključeni u sintezu i popravak DNA (89). Koristi se u antitumorskoj terapiji jer na ovaj način zaustavlja diobu stanica te posljedično dovodi do smanjenja rasta tumora. Također, 5-FUTP se može ugraditi u rastući lanac RNA tijekom transkripcije umjesto običnog uridin trifosfata (UTP) što može uzrokovati mutacije povećavajući stopu tranzicija $U \rightarrow C$ i $A \rightarrow G$ (slika 7b) i promjene u strukturi virusne ili stanične RNA (90). Iako se ne koristi u virusnoj terapiji, učinak 5-FU-a se istražuje u vidu utjecaja nukleozidnih analoga na mutagenezu virusa. Povećanje stope mutacija pokazano je za virus vezikularnog stomatitisa kao i virusa dječje paralize (41). Također, uzastupnim kultiviranjem u ovom nukleozidnom analogu izoliran je virusni mutant pačjeg Tembusu virusa (91) s atenuiranim fenotipom. Utjecaj 5-FU na same stanice ovisi o vrsti stanica i korištenim koncentracijama ovog nukleozidnog analoga. Za razliku od RBV-a, osim citostatičkog, pokazan je i citotoksični utjecaj (92).

a) $G \rightarrow A$ $C \rightarrow U$

b) $A \rightarrow G$ $U \rightarrow C$

c) $G \rightarrow C$ $C \rightarrow G$

17

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijal

3.1.1 Biološki materijal

Stanične linije

Korištene su kontinuirane stanične linije porijeklom iz banke stanica ECACC (eng. *European Collection of Authenticated Cell Cultures*).

Stanična linija Vero su fibroblasti normalnog bubrega afričkog zelenog majmuna (*Cercopithecus aethiops*). Kataloški broj u ECACC banci stanica je 84113001. Raspon pasaža u kojima su korištene 4 – 40.

Stanična linija A549 su epitelne stanice adenokarcinoma pluća čovjeka. Kataloški broj u ECACC banci stanica je 86012804. Raspon pasaža u kojima su korištene 4 – 40.

Stanična linija LLC-MK2 su epitelne stanice dobivene iz pulirane suspenzije normalnog tkiva bubrega rezus majmuna (*Macaca mulatta*). Kataloški broj u ECACC banci stanica je 85062804. Raspon pasaža u kojima su korištene 4 – 40.

Virusi

Virusna varijanta MuVi-C izolirana je iz cjepnog soja L-Zagreb (pristupni broj AY685920, NCBI GenBank) koji pripada genotipu N postupkom 3 plak purifikacije na staničnoj liniji Vero. Konsenzusom se razlikuje od L-Zagreba na tri pozicije: A5561C, T9994A i A14332T (virusni genom nije sekvenciran u cjelosti stoga su moguće dodatne razlike u odnosu na L-Zagreb).

Soj virusa zaušnjaka ZgA/Cro69 genotipa D (pristupni broj SAMN22742377, NCBI GenBank) dobiven je višestrukim kultiviranjem izolata u amnionu embrioniranih kokošnjih jaja. Ovako dobiven virus dodatno je kultiviran u staničnoj liniji MRC-5 (porijeklom iz normalnih pluća čovjeka) 15 puta. Izolat je dobiven iz djeteta kojem su dijagnosticirani zaušnjaci 1969. godine.

Plazmid

Plazmid pMRV2 sadrži cijelu antigenomsku sekvenciju cjepnog soja L-Zagreb kloniranu u 286_p107(-)Luc. Sekvencija se razlikuje u devet nukleotidnih pozicija u usporedbi s L-Zagrebom

(cjepni soj, pristupni broj AY685920, NCBI GenBank). Sedam od njih rezultat su uvođenja dodatnih restriksijskih mjesta, dok su dvije nukleotidne promjene u genu L nastale tijekom postupka umnažanja i kloniranja. To su T9660C koja dovodi do aminokiselinske promjene Leu408Pro te sinonimna promjena C11176T.

3.1.2 Kemikalije i otopine

Kemikalije i otopine za održavanje i infekciju staničnih kultura

- Minimalni esencijalni medij (eng. *minimum essential medium*) (MEM) (Capricorn Scientific GmbH)
- Dulbeccov modificirani Eagle medij (eng. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) (DMEM) (Capricorn Scientific GmbH)
- fetalni teleći serum (FTS) (Pan-Biotech)

Mediji za uzgoj i supkultivaciju stanica: MEM + 10% FTS, DMEM + 10% FTS. U medije se dodaje kombinacija otopina penicilin-streptomicina (Capricorn Scientific GmbH) i L-glutamin (Capricorn Scientific GmbH) u konačnim koncentracijama 10 µL/mL.

Medij za infekciju stanica virusom: MEM + 2% FTS, DMEM + 2% FTS. U medije se dodaje kombinacija otopina penicilin-streptomicina (Capricorn Scientific GmbH) i L-glutamin (Capricorn Scientific GmbH) u konačnim koncentracijama 10 µL/mL. U pripremljeni medij dodaje se virusna suspenzija.

Medij za prekrivanje staničnog sloja u testu plakiranja: 2×MEM + 10% FTS, bez fenolnog crvenila s dodatkom neesencijalnih aminokiselina (NEAA, Sigma-Aldrich), L-glutamina i otopine penicilin-streptomicin u konačnim koncentracijama 10 µL/mL.

Nukleozidni analozi i otapala potrebna za njihovu pripremu

Temeljna standardna otopina ribavirina (RBV) (Sigma-Aldrich) (10 mM) priređena je otapanjem 50 mg RBV-a u 20,47 mL sterilne vode. Tako dobivena otopina je profiltrirana kroz 0,22 µm filter, alikvotirana u alikvote od 0,5 mL i pohranjena pri -20 °C.

Temeljna standardna otopina 5-fluorouracila (5-FU) (Sigma-Aldrich) (414 mM) priređena je otapanjem 50 mg 5-FU-a u 1 mL 1M NH₄OH. Otopina je zatim profiltrirana kroz 0,22 µm filter, zamotana parafilmom te pohranjena u foliji pri +4 °C (korištena je tijekom 4 mjeseca).

Temeljna standardna otopina 5-azacitidina (5-AZC) (Sigma-Aldrich) (100 mM) priređena je otapanjem 24,42 mg 5-AZC-a u 1 mL DMSO (Kemika). Otopina je profiltrirana kroz 0,22 µm filter, alikvotirana u alikvote od 20 µL, zamotana parafilmom te pohranjena u foliji pri -20 °C.

Radne otopine nukleozidnih analoga priređivane su dvostrukim razrjeđenjima nukleozidnih analoga u mediju MEM ili DMEM s 2% FTS-a neposredno prije izvođenja pokusa.

Kemikalije i otopine za elektroforezu u agaroznom gelu

- Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (Sigma-Aldrich)
- HCl (Kemika)
- EDTA (Sigma-Aldrich)
- boratna kiselina (Kemika)

1 M Tris-HCl:

60,58 g Tris se otopi u 400 mL destilirane vode, pH otopine se podesi na dodatkom koncentrirane HCl i doda se destilirane vode do volumena od 0,5 L

10×TBE-pufer:

89 mM Tris-HCl

89 mM boratna kiselina

2 mM EDTA

pH 8,3

3.2 Metode

3.2.1 Uzgoj staničnih kultura

Stanične kulture Vero, A549 i LLC-MK2 koje su korištene u ovom istraživanju su adherentne, odnosno rastu prihvaćene na plastičnu površinu T-boca ili ploča sa zdencima u kojima se uzgajaju. Stanične linije uzgajaju se u hranjivom mediju u kontroliranim uvjetima pri 37 °C u atmosferi koja sadrži 95% zraka i 5% CO₂. Sam uzgoj započinje kratkotrajnim stavljanjem ampule stanica (koja je prethodno bila pohranjena u tekućem dušiku) pri 37 °C. Slijedi centrifugiranje stanica pri 150 × g 5 minuta nakon čega se uklanja supernatant. Talog stanica se resuspendira u malom volumenu svježeg medija za uzgoj nakon čega se stanice prenose u T-bocu od 25 cm². U bocu se dodaje 10 mL medija za uzgoj. Mediji za uzgoj, učestalost kultiviranja i omjer stanične suspenzije za supkultivaciju navedeni su u tablici 1.

Supkultivacija je slična za sve korištene stanične kulture. S izrasle stanične kulture uklanja se medij te se stanice ispiru s 0,25%-tnom otopinom tripsin-EDTA (0,25%-tna otopina, Imunološki zavod d.d.). Dodatkom 0,25%-tne otopine tripsin-EDTA (Imunološki zavod d.d.) u volumenu koji prekriva stanični sloj stanice se odvoje od podloge enzimskom digestijom u roku 2-3 minute (tripsinizacija). Stanice se pregledaju mikroskopski kako bi se potvrdilo odvajanje od podloge. U staničnu suspenziju dodaje se medij za uzgoj u omjeru 1:10 pri čemu FTS iz medija inaktivira tripsin. Određeni volumen stanične suspenzije prenese se u novu bocu za uzgoj stanica i na stanice se doda svježi medij za uzgoj stanica u volumenu kojeg određuje površina T-boce (10 mL za bocu od 25 cm², 35 mL za bocu od 75 cm² ili 60 mL za bocu od 150 cm²).

Ukoliko se stanice koriste u testu, one se izbroje u Neubauerovoj komorici za brojanje stanica (W. Schreck Hofheim) i odredi se njihova koncentracija (st/mL). Broj stanica u staničnoj suspenziji podese se prema potrebi testa u kojem će se stanice koristiti te se stanice nasađuju u T-boce ili ploče sa zdencima za uzgoj.

Nasađene stanice se stavljaju u inkubator pri 37 °C u atmosferi koja sadrži 5% CO₂ 24 sata prije nego ih se koristi u daljnjim testovima. Ovaj postupak prisutan je u svim opisanim metodama kod kojih je prvi korak nasađivanje stanica te se to neće posebno naglašavati dalje u tekstu. Također, inkubacija stanica, bilo tretiranih ili netretiranih, izvodi se u inkubatoru u atmosferi koja sadrži 5% CO₂, a medij koji se koristi za uzgoj, kao i za infekcije, uvijek sadrži otopinu penicilin-

streptomycin (Capricorn Scientific GmbH) u koncentraciji 10 $\mu\text{L/mL}$ te se ni ti podaci neće posebno naglašavati u daljnjim opisima postupaka.

Tablica 1. Pregled staničnih linija i uvjeta njihove kultivacije.

stanična linija	medij za uzgoj	supkultivacija (dani)	Omjer stanične suspenzije za supkultivaciju	Maksimalan broj supkultivacija
Vero	MEM + otopina penicilin-streptomicina (10 $\mu\text{L/mL}$) + 10% FTS	3 - 4	1:6-1:10 v/v	40 (od pohranjene stanične banke)
A549	DMEM + otopina penicilin-streptomicina (10 $\mu\text{L/mL}$) + 10% FTS	3 - 4	1:3-1:10 v/v	-
LLC-MK2	MEM + otopina penicilin-streptomicina (10 $\mu\text{L/mL}$)+ 10% FTS	3 - 4	1:3-1:10 v/v	-

3.2.2 Test za određivanje metaboličke aktivnosti stanica

Žive stanice reduciraju topljivi žuti 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolijev bromid (MTT) u ljubičasti netopivi formazan djelovanjem mitohondrijskog enzima sukcinat dehidrogenaze. MTT test je kolorimetrijski test kojim se određuje metabolička aktivnost stanica upravo na tom principu. U testu se dobiveni formazan otapa pomoću otopine za solubilizaciju te se tako dobivenoj otopini mjeri apsorbancija koja ukazuje na količinu živih stanica.

Otopina MTT-a priredi se otapanjem MTT-a (Sigma-Aldrich) u fosfatnom puferu (eng. *phosphate buffered saline* – PBS, Capricorn Scientific GmbH) u konačnoj koncentraciji 5 mg/mL, sterilno profiltrira kroz 0,22 μm filter, alikvotira i pohrani pri -20 °C nakon čega se alikvoti uzimaju po potrebi.

Stanične linije A549, Vero ili LLC-MK2 se nasađuju u mikrotitarske pločice s 96 zdenaca u koncentraciji 15 000 stanica po zdencu u 130 μL DMEM s 10% FTS-a (za stanice A549) ili u 130

μL MEM s 10% FTS-a (za stanične linije Vero i LLC-MK2). Nakon 24 sata medij u kojem su stanice rasle se zamjenjuje s 100 μL medija s 2% FTS-a za stanice koje služe kao kontrola (netretirane stanice) ili s 100 μL određene koncentracije nukleozidnog analoga priređene u mediju s 2% FTS-a. Koncentracije nukleozidnog analoga napravljene su u dvostrukim razrjeđenjima počevši od 1000 μM do 3,9 μM za RBV i 5-FU, te od 250 μM do 0,98 μM za 5-AZC. Netretirane stanice kao i stanice tretirane svakim pojedinim razrjeđenjem nukleozidnog analoga napravljene su u 6 replika. Stanice se potom inkubiraju pri 35 °C narednih 3 dana za staničnu liniju Vero te naredna 4 dana za stanične linije A549 i LLC-MK2. Nakon inkubacije medij se zamjenjuje sa 100 μL svježe pripremljenog medija s 2% FTS-a koji sadrži otopinu MTT-a u konačnoj koncentraciji 0,5 mg/mL. Tako tretirane stanice se inkubiraju 4 sata pri 35 °C nakon čega se uklanja medij, a stanice se otapaju u 200 μL DMSO-a (Kemika) po zdencu, resuspendiraju i inkubiraju 5 minuta na sobnoj temperaturi. Stanice se potom prebacuju u novu mikrotitarsku pločicu. Apsorbancija se očitava na spektrofotometru Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific) pri valnoj duljini 570 nm i 690 nm. Potonja služi kao referentna vrijednost koja se u analizi rezultata oduzima od vrijednosti dobivene mjerenjem pri 570 nm. Služi kako bi se iz rezultata izbacio učinak precipitiranih proteina ili staničnih ostataka koji bi mogao interferirati s rezultatom. U tri zdenca mikrotitarske pločice stavlja se 200 μL DMSO-a (Kemika) te se srednja vrijednost te tri apsorbancije na početku analize oduzima od vrijednosti dobivenih za valnu duljinu 570 nm.

Za izračun živih stanica prvo se odredi srednja vrijednost apsorbancije za svih šest replikata tj. zdenaca koji su prošli isti tretman. Postotak živih stanica po svakom takvom zdencu/replikatu izražava se kao vrijednost apsorbancije dobivene za taj zdenac podijeljene sa srednjom vrijednosti svih replikata, pomnožena s 100:

$$\text{preživljenje po zdencu} = (\text{apsorbancija po zdencu} / \text{srednja vrijednost svih zdenaca}) \times 100\%$$

3.2.3 Brojanje stanica

Stanične linije A549 i Vero su nasadene u ploče za uzgoj s 12 zdenaca u koncentraciji 170 000 stanica po zdencu, a stanična linija LLC-MK2 u koncentraciji 110 000 stanica po zdencu u 1 mL medija za uzgoj stanica te inkubirane pri 37 °C. Nakon 24 sata uklonjen je medij i na stanice je dodan 1 mL medija s 2% FTS-a (netretirane stanice) ili 1 mL određenog razrjeđenja nukleozidnog analoga u mediju s 2% FTS-a. Koncentracije nukleozidnog analoga napravljene su u dvostrukim

razrjeđenjima. Koncentracije korištene za različite kombinacije staničnih linija i nukleozidnih analoga naznačene su u poglavlju Rezultati. Netretirane stanice i stanice tretirane svakom pojedinom koncentracijom napravljene su u triplicatu. Nakon 3 dana za staničnu liniju Vero te 4 dana za stanične linije A549 i LLC-MK2 medij je uklonjen iz zdenaca, stanice su tripsinizirane s 100 μL 0,25%-tne otopine tripsin-EDTA (Imunološki zavod d.d.) te je nakon nekoliko minuta tripsin neutraliziran dodatkom 900 μL medija za uzgoj. U suspenziju stanica dodano je tripansko modrilo te su žive izbrojane u 8 kvadranta Neubauerove komorice za brojanje stanica (Wschreck Hofheim) (tripansko modrilo ulazi u mrtve stanice s obzirom da im je membrana oštećena te se unutar stanice veže za njene proteine rezultirajući vizualno plavim stanicama). Broj živih stanica po mL volumena stanične suspenzije izračunava se prema formuli:

$$N = \text{izbrojano} / 8 \times 10\,000 \times \text{faktor razrjeđenja}$$

s obzirom da volumen kvadranta iznosi 0,1 mm^3 odnosno 10 000 mL^{-1} .

3.2.4 Infekcija staničnih kultura

Infekcija staničnih kultura u svrhu određivanja kinetike replikacije virusa zaušnjaka

Kako bi se 24 sata nakon nasada postigla otprilike 75%-tna konfluentnost sloja, u T-boce od 25 cm² nasađuje se 1 100 000 stanica A549 u 12 mL, a 1 000 000 stanica Vero i LLC-MK2 u 10 mL medija za uzgoj. Nasađene stanice inkubiraju se 24 sata pri 37 °C nakon čega slijedi infekcija. Sa stanične kulture se uklanja medij i stanice se ispiru 2 puta sa PBS-om (Capricorn Scientific GmbH). Na stanični sloj se dodaje virusna suspenzija u željenoj koncentraciji tj. u željenom omjeru infektivnih virusnih čestica i izraslih stanica (eng. *multiplicity of infection*, MOI). Potreban volumen virusne suspenzije računa se prema formuli:

$$V_{vč} = (N_{stan} \times MOI) / \text{titar virusa [PFU/ml]}$$

u kojoj $V_{vč}$ označava volumen virusnih čestica, a N_{stan} broj izraslih stanica.

MOI korišteni u ovom istraživanju navedeni su u poglavlju Rezultati. Inficirane stanice inkubiraju se sat vremena pri 35 °C nakon čega se neadsorbirani virus uklanja. Stanični sloj se zatim ispire dva puta PBS-om (Capricorn Scientific GmbH) te se na njega dodaje svježi medij s 2% FTS-a. Inkubacija stanica se nastavlja pri 35 °C. Od prvog do sedmog dana nakon infekcije iz bočice se uzima 1 mL virusne suspenzije, koji se centrifugira 5 minuta na 177×g te se takav supernatant alikvotira i smrzava na temperaturi pri -60 °C ili niže, nakon čega se titar virusa za svaki uzorak određuje testom plakiranja (opisanim u poglavlju 3.2.5.). U svim metodama koje uključuju sakupljanje virusa koji se nalazi u supernatantu stanične kulture postupak centrifugiranja, alikvotiranja i čuvanja je jednak opisanom.

Infekcija staničnih kultura u prisustvu nukleozidnog analoga

Stanične linije Vero, A549 i LLC-MK2 nasađuju se u mediju za uzgoj u odabrano posuđe. U tablici 2 su navedeni volumeni i koncentracije korišteni ovisno o vrsti posuđa. Nasađene stanice inkubiraju se 24 sata pri 37 °C nakon čega se s njih uklanja medij. Na stanični sloj dodaje se medij s 2% FTS-a ili medij s 2% FTS-a koji sadrži nukleozidni analog u željenoj koncentraciji. Stanice se inkubiraju 2 sata pri 35 °C nakon čega se sa staničnog sloja uklanja medij, stanice se ispiru dva puta PBS-om (Capricorn Scientific GmbH) te inficiraju virusom na način opisan u poglavlju 3.2.3.1. Nakon adsorpcije virusa u trajanju od sat vremena, virus se uklanja sa stanica, stanični sloj

se ispiru dva puta PBS-om (Capricorn Scientific GmbH) te se na stanice dodaje isti medij kakvim su stanice bile tretirane prije infekcije virusom. Slijedi inkubacija pri 35 °C. Vrijeme inkubacije prije sakupljanja supernatanta određeno je rezultatima kinetike replikacije virusa. Nakon inkubacije sakuplja se supernatant sa staničnog sloja po ranijem opisanom postupku nakon čega se titar virusa za svaki uzorak određuje testom plakiranja (opisanim u poglavlju 3.2.5).

Tablica 2. Koncentracije i volumeni za nasađivanje i infekciju za svaku pojedinu staničnu liniju ovisno o korištenom posuđu.

stanična linija	vrsta posuda	koncentracija nasada (broj stanica/zdencu ili boci)	volumen za nasađivanje	volumen za infekciju
Vero	ploča s 6 zdenaca	450 000	2 mL	1 mL
	ploča s 12 zdenaca	170 000	1 mL	0,4 mL
	T-boca od 25 cm ²	1 000 000	10 mL	2,8 mL
A549	ploča s 6 zdenaca	400 000	2 mL	1 mL
	ploča s 12 zdenaca	150 000	1 mL	0,4 mL
	T-boca od 25 cm ²	1 100 000	12 mL	2,8 mL
LLC-MK2	ploča s 6 zdenaca	300 000	2 mL	1 mL
	ploča s 12 zdenaca	110 000	1 mL	0,4 mL
	T-boca od 25 cm ²	1 000 000	10 mL	2,8 mL

3.2.5 Određivanje titra virusa testom plakiranja

Test se temelji na replikaciji infektivnih virusnih čestica u monosloju stanične kulture Vero. Na inficirani monosloj stavlja se polukruti pokrov zbog čega je replikacija virusa moguća samo u inficiranim stanicama te u onima koje su s njima u direktnom kontaktu. Kao rezultat, citopatogeni efekt (CPE) se na staničnom supstratu pojavljuje u obliku čistina tj. plakova. Titar virusa se izražava u jedinicama stvaranja plakova (eng. *plaque forming units*, PFU) po jedinici volumena.

Priredi se suspenzija stanične kulture Vero te se odredi koncentracija stanica na način opisan u poglavlju 3.2.1. Za plakiranje se nasađuju ploče s 6 zdenaca u koncentraciji 1 000 000 stanica u 3 mL medija za uzgoj po zdencu te se ploče odlože u inkubator pri 37 °C. Stanice se inkubiraju 48 sati do postizanja konfluentnog monosloja kojeg definira 100% površine prekriveno stanicama. Pripremi se odgovarajući niz predrazrjeđenja i razrjeđenja virusa u staklenim epruvetama u mediju s 2% FTS (svako razrjeđenje na stanice ide u duplikatu – za svako razrjeđenje virusa potrebna su dva zdenca s nasađenim stanicama). Sa stanica se uklanja supernatant i na stanični sloj se inokulira

1 mL priređenog razrjeđenja virusa ili 1 mL medija s 2% FTS na stanice koje će služiti kao negativna kontrola. Ploče s inficiranim stanicama se inkubiraju 1 sat pri 35 °C. Za to vrijeme pripremi se pokrov za stanice; u jednoj staklenoj tikvici se napravi 1,5% agar (Noble agar, Sigma Aldrich), a u drugu se nalijeva medij za prekrivanje staničnog sloja. Obje tikvice stavljaju se u vodenu kupelj na temperaturu 42 °C do kraja inkubacije virusa na stanicama nakon čega se sadržaji tikvica pomiješaju u omjeru 1:1. Sa stanica se uklanja virus te se stanični monosloj prekriva s 3 mL pokrova. Ploče se ostavljaju u polumraku ili mraku 20 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se pokrov skrutio nakon čega se stavljaju u prozirne, plastične vrećice i inkubiraju 6 dana pri 35 °C. Nakon inkubacije se u svaki zdenac dodaje po 1 mL otopine za bojanje (0,5% neutralno crvenilo (Sigma Aldrich) i PBS (Capricorn Scientific GmbH) u omjeru 1:10). Obojane pločice inkubiraju se 1 sat pri 35 °C nakon čega se uklanja boja iz zdenaca. Slijedi daljnja inkubacija pri 35 °C naredna 4 sata. Broj plakova očitava se makroskopski u svakom zdencu (plakovi se vide kao prozirne ili svjetlije obojane čistine naspram crveno obojanog staničnog monosloja). Titar virusa (PFU/ml) izračunava se za svako razrjeđenje virusa prema formuli:

$$\text{PFU/mL} = \text{srednja vrijednost broja plakova po razrjeđenju} \times \text{recipročna vrijednost razrjeđenja}$$

3.2.6 Određivanje učinka koncentracije stanica u sloju na virusnu replikaciju

Stanične linije Vero, A549 i LLC-MK2 su nasadene u ploče s 12 zdenaca u različitim koncentracijama u triplicatu za svaku koncentraciju u 1 mL odgovarajućeg medija za uzgoj. Odabrane koncentracije rezultiraju s otprilike 75%, 50%, 35% i 25% konfluentnosti za stanične linije Vero i A549 te 75%, 50%, i 25% za staničnu liniju LLC-MK2 nakon inkubacije od 24 sata pri 37 °C (u tablici 3 su navedene odabrane koncentracije stanica za nasadićivanje). Nakon 24 sata sa stanica je uklonjen medij, a stanični sloj je dva puta ispran PBS-om (Capricorn Scientific GmbH) nakon čega su stanice inficirane u mediju s 2% FTS-a - Vero i LLC-MK2 virusnom varijantom MuVi-C, a A549 virusnom varijantom ZgA/Cro69 pri MOI naznačenom u poglavlju Rezultati. Nakon inkubacije pri 35 °C u trajanju od 1 sat, sa stanica je uklonjen virus, stanični sloj je ispran dva puta PBS-om (Capricorn Scientific GmbH) i na stanice je dodan 1 mL medija s 2% FTS-a. Daljnja inkubacija nastavljena je pri 35 °C te je supernatant sa stanica sakupljen nakon 3 dana za

staničnu liniju Vero i nakon 4 dana za stanične linije A549 i LLC-MK2 postupkom opisanim u poglavlju 3.2.4. Titar virusa za sve uzorke određen je testom plakiranja opisanim u poglavlju 3.2.5.

Tablica 3. Pregled koncentracija nasađenih staničnih linija Vero, A549 i LLC-MK2 u testu određivanja učinka koncentracije stanica u sloju na replikaciju virusa.

stanična linija	koncentracija nasada (broj stanica po zdencu)	konfluentnost nakon 24 sata*
Vero	90 000	25%
	110 000	35%
	130 000	50%
	170 000	75%
A549	70 000	25%
	90 000	35%
	110 000	50%
	150 000	75%
LLC-MK2	70 000	25%
	110 000	50%
	150 000	75%

*konfluentnost određena vizualno mikroskopskim pregledom staničnog sloja

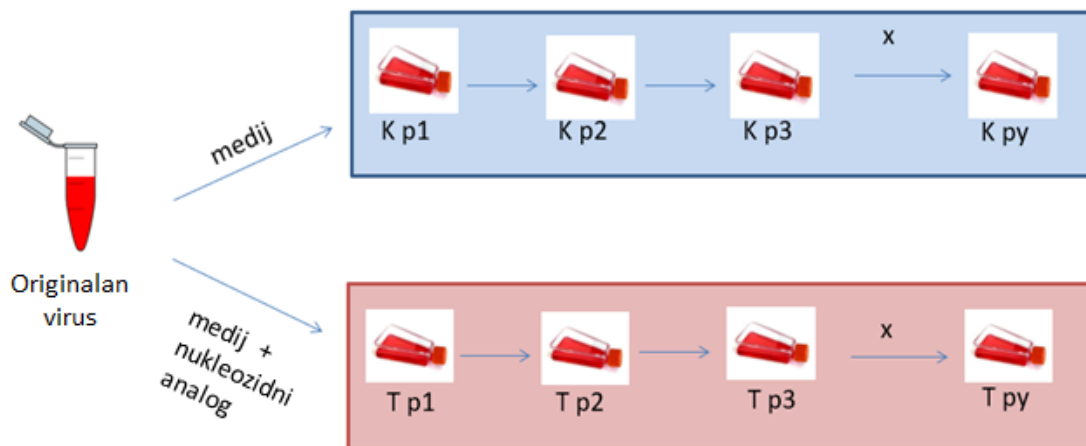
3.2.7 Određivanje antivirusnog učinka nukleozidnih analoga

Stanične linije Vero, A549 i LLC-MK2 nasađene su u ploče s 12 zdenaca u koncentraciji koja rezultira s otprilike 75% konfluentnosti 24 sata nakon nasađivanja (tablica 1) u 1 mL odgovarajućeg medija za uzgoj. Uslijedila je inkubacija u trajanju od 24 sata pri 37 °C. Stanice su zatim ispirane 2 puta PBS-om (Capricorn Scientific GmbH) te inficirane virusom u prisustvu nukleozidnog analoga po postupku opisanom u poglavlju 3.2.4. Za svaku koncentraciju nukleozidnog analoga stanice su inficirane u triplicatu. Također, kao kontrola, u triplicatu su inficirane stanice koje nisu tretirane nukleozidnim analogom. U poglavlju Rezultati navedeni su korišteni virusi, MOI te koncentracije nukleozidnih analoga. Daljnja inkubacija nastavljena je pri 35 °C te je supernatant sa stanica sakupljen nakon 3 dana za staničnu liniju Vero i nakon 4 dana za stanične linije A549 i LLC-MK2

postupkom opisanim u poglavlju 3.2.4. Titar virusa za sve uzorke određen je testom plakiranja opisanim u poglavlju 3.2.5.

3.2.8 Kultiviranje virusa u prisustvu nukleozidnih analoga

Kultiviranje virusa u prisustvu nukleozidnog analoga za stanične linije Vero i LLC-MK2 rađeno je u pločama sa 6 zdenaca, dok je isti postupak za staničnu liniju A549 rađen u T-bocama od 25 cm² (volumeni korišteni u infekcijama ovisno o vrsti korištenog posuđa navedeni su u tablici 1). Infekcija stanica i sakupljanje supernatanta napravljeno je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.4, a titar virusa određen je testom plakiranja opisanim u poglavlju 3.2.5. Postupak kultiviranja prikazan je na slici 8. Stanice su inficirane originalnim virusom u mediju s ili bez nukleozidnog analoga što označava prvi pasaž. Nakon određivanja titra virusa dobivenih u prvom pasažu, ti se virusi koriste za daljnju infekciju stanica pri istom MOI (virus uzgajan na stanicama tretiranim nukleozidnim analogom i u sljedećem se pasažu koristi za infekciju tretiranih stanica, dok se kontrolni virus nastavlja kultivirati na stanicama koje nisu tretirane nukleozidnim analogom). Nakon svakog pasaža uspoređuje se titar kontrolnog virusa i tretiranog virusa iz istog pasaža.



Slika 8. Prikaz kultiviranja virusa u prisustvu nukleozidnog analoga. Originalni virus kultiviran je u mediju bez nukleozidnog analoga (kontrola) ili u mediju s nukleozidnim analogom. Kroz seriju pasaža nastavlja se daljnje kultiviranje kontrolnog i tretiranog virusa. Na slici K označava kontrolni virus, T tretirani virus, a broj uz p označava broj pasaža.

3.2.9 Određivanje rezistencije virusa kultiviranih u prisustvu nukleozidnih analoga

Virusi kultivirani u prisustnosti nukleozidnih analoga kao i njihove kontrole (virusi kultivirani u mediju bez nukleozidnih analoga) korišteni su za infekciju stanica u koncentracijama jednakim onima korištenima za kultiviranje ili višim (koncentracije su navedene su u poglavlju Rezultati). Stanice su inficirane po postupku opisanom u 3.2.4., a titar virusa je određen testom plakiranja opisanim u poglavlju 3.2.5.

3.2.10 Izolacija ukupne virusne RNA

Ukupna virusna RNA izolira se iz 400 μ L supernatanta inficiranih staničnih kultura (dobivenog postupkom opisanom u poglavlju 3.2.4) pomoću kompleta reagensa Quick-RNA ViralTM Kit (Zymo Research) prema uputstvima proizvođača. Virusna RNA se eluira u 11 μ L vode bez DNaza i RNaza.

3.2.11 Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija (RT) predstavlja proces transkripcije RNA u njezinu komplementarnu DNA (cDNA, eng. *complementary DNA*). Pri RT reakciji ukupne virusne RNA koriste se početnice koje se vežu nasumično duž virusne RNA (50 μ M, Invitrogen) i omogućuju reverznu transkripciju segmenata cijelog virusnog genoma. Za ovaj postupak korištena je RNA izolirana postupkom opisanom u poglavlju 3.2.10. U prvom koraku potrebno je denaturirati RNA. Reakcijske komponente se pomiješaju u omjerima opisanim u tablici 4 te se smjesa zagrijava pri 70 °C kroz 10 minuta. Nakon toga slijedi hlađenje na ledu u trajanju od jedne minute nakon čega se u smjesu dodaju preostale komponente (tablica 5). Slijedi RT reakcija pod uvjetima opisanim u tablici 6. Prije zadnjeg koraka reakcija se zaustavlja kako bi se u uzorak dodala RNAza H (Invitrogen) koja uklanja preostalu RNA nakon čega slijedi nastavak reakcije. Dobivena cDNA pohrani se pri -20 °C ili 4 °C ako se koristi u roku 24 sata nakon postupka RT reakcije.

Tablica 4. Komponente i volumeni smjese reakcije koja prethodi reverznoj transkripciji.

Komponenta	Volumen po reakciji
50 μ M nasumične početnice (Invitrogen)	1 μ L
10 mM dNTP (Invitrogen)	1 μ L
izolirana RNA	10 μ L

Tablica 5. Komponente i volumeni smjese za reverznu transkripciju.

Komponenta	Volumen po reakciji
pufer 5 x <i>First-Strand Buffer</i> (<i>SuperscriptTM III</i> , Invitrogen)	4 µL
100 µM ditioneitol (DTT, <i>SuperscriptTM III</i> , Invitrogen)	1 µL
20 U/µL inhibitor RNaze (Invitrogen)	1 µL
reverzna transkriptaza 200 U/µl <i>SuperScriptTM</i> <i>III</i> (<i>SuperscriptTM III</i> , Invitrogen)	1 µL

Tablica 6. Uvjeti reverzne transkripcije.

Temperatura	Vrijeme inkubacije
25°C	5 min
50°C	50 min
70°C	15 min
(dodatak 1 µL 2 U/µL RNaze H (Invitrogen))	
37°C	20 min

3.2.12 Lančana reakcija polimerazom

U svrhu sekvenciranja uzoraka metodom sekvenciranja nove generacije (eng. *next-generation sequencing*, NGS) cDNA dobivene reverznom transkripcijom virusnih RNA umnožene su u preklapajućim fragmentima lančanom reakcijom polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) pomoću termocikličkih amplifikatora Veriti i 2720 (Applied Biosystems). Razlike u odabiru početnica za pojedine uzorke rezultat su nemogućnosti umnažanja njihovih određenih fragmenata po početnoj, teoretskoj shemi umnažanja. Temperature prijanjanja početnica (eng. *temperature of annealing*, T_a) različite su za različite početnice, a vrijeme elongacije (t_e) ovisi o duljini fragmenta. Broj ciklusa ovisi o količini početnog uzorka za umnažanje. Ove su vrijednosti određene eksperimentalno u preliminarnim pokusima.

Umnažanje genoma virusa MRV2 u triplikatu s plazmida u svrhu određivanja greške metode

Kako bi se razlikovale prave virusne varijante niske frekvencije od varijanti uzrokovanih pogreškama unesenim tijekom pripreme uzorka (RT, PCR) ili samog sekvenciranja, genom virusa L-Zagreb ukloniranog u plazmid (pMRV2) je umnožen u 5 preklapajućih fragmenata (tablica 7) u triplikatu. Komponente smjese za PCR reakciju navedene su u tablici 8 kao i uvjeti reakcije po protokolu za DNA polimerazu *Phusion* iz kompleta reagensa *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs). Pripremljeni uzorci, kao i neumnoženi pMRV2 (također u triplikatu) korišteni su za pripremu biblioteke fragmenata za sekvenciranje.

Tablica 7. Specifične početnice (Macrogen) i uvjeti reakcije za umnožavanje genoma iz plazmida pMRV2 te genoma kontrolnih i tretiranih uzoraka virusa zaušnjaka virusne varijante ZgA/Cro69 iz pasaža 8, 17 i 21.

Fragment	Korištene početnice	Veličina fragmenta	Uvjeti reakcije
1	N0 nextera (+) F2 (-)	5121 pb	$T_a = 61\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 3\text{ min } 10\text{ sek}$ broj ciklusa = 40
2	M5 (+) LZ6 (-)	3693 pb	$T_a = 62\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 2\text{ min } 14\text{ sek}$ broj ciklusa = 35
3	LZ9 (+) L12 (-)	4654 pb	$T_a = 63\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 3\text{ min } 10\text{ sek}$ broj ciklusa = 40
4	MR9 (+) L23 (-)	3951 pb	$T_a = 59\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 2\text{ min } 40\text{ sek}$ broj ciklusa = 35
5	L24 (+) L25 nextera (-)	736 pb	$T_a = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 30\text{ sek}$ broj ciklusa = 40

Tablica 8. Komponente i volumeni reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom.

Komponenta	Volumen po reakciji	Uvjeti reakcije prema protokolu za <i>Phusion</i> DNA polimerazu	
pufer 5 × <i>High Fidelity</i> *	10 µL	98 °C	10 min
10 mM dNTP (Invitrogen)	4 µL	98 °C	1 min 30 sek
20 µM uzvodna početnica (Macrogen)	1,25 µL	98 °C	10 sek
20 µM nizvodna početnica (Macrogen)	1,25 µL		
cDNA**	varijabilno	T _a	30 sek
2000 U/mL polimeraza <i>Phusion</i> *	0,5 µL	72 °C	T _e
voda bez RNAza i DNAza	do 50 µL	72 °C	10 min

* komplet reagensa *Phusion*® *High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs)

** Volumen cDNA je varijabilan, ali konačna koncentracija mora biti manja od 250 ng po ukupnom volumenu reakcije.

Umnažanje genoma virusne varijante ZgA/Cro69

Ishodišni uzorak, kontrolni i uzorak tretiran RBV-om u koncentraciji od 62,5 µM iz pasaža 14 umnoženi su u dva fragmenta (tablica 9), dok su kontrolni i uzorci tretirani u ovoj koncentraciji iz pasaža 8, 17 i 21 umnoženi u pet fragmenata (tablica 7). Komponente i volumeni reakcijske smjese, kao i uvjeti reakcije jednaki su kao i pri umnažanju virusnog genoma s plazmida pMRV2 (tablica 8).

Tablica 9. Specifične početnice (Macrogen) i uvjeti reakcije za umnažanje genoma kontrolnih i tretiranih uzorka virusne varijante ZgA/Cro69 iz pasaža 14.

Fragment	Korištene početnice	Veličina fragmenta	Uvjeti reakcije
1	N0 nextera (+) LZ 6 (-)	7794 pb	T _a = 60 °C, t _e = 5 min 10 sek broj ciklusa = 35
2	LZ10 (+) L25 nextera (-)	7722 pb	T _a = 60 °C, t _e = 5 min 10 sek broj ciklusa = 35

Umnažanje genoma virusne varijante MuVi-C

Komponente i volumeni reakcijske smjese, kao i uvjeti reakcije jednaki su kao za virus MRV2 te virusnu varijantu ZgA/Cro69 (tablica 8). Za umnažanje uzoraka ove virusne varijante, osim za uzorke prvog pasaža koji su tretirani 5-FU-om u koncentraciji 200 μ M (200FU p1 pokus 1) i uzorke prvog pasaža tretirane RBV-om u koncentraciji 250 μ M ili 500 μ M iz pokusa 3 (250R p1 pokus 3 i 500R p1 pokus 3), korištene su iste početnice i uvjeti reakcije (tablica 10). Za uzorak 200FU p1 pokus 1, početnice i uvjeti reakcije navedeni su u tablici 11, a za uzorke 250R p1 pokus 3 i 500R p1 pokus 3 u tablici 12.

Tablica 10. Specifične početnice (Macrogen) i uvjeti reakcije za umnažanje genoma kontrolnih i tretiranih uzoraka virusne varijante MuVi-C – ishodišni uzorak te kontrolni i tretirani uzorci iz pokusa kultiviranja virusa u prisustvu ribavirina, 5-fluorouracila i 5-azacitidina s izuzetkom uzoraka 200FU p1 pokus 1 te 250R p1 i 500R p1 iz pokusa 3.

Fragment	Korištene početnice	Veličina fragmenta	Uvjeti reakcije
1	N0 F8	5477 pb	$T_a = 58\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 3\text{ min}$ broj ciklusa = 40
2	F15 LZ14	2657 pb	$T_a = 61\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 1\text{ min } 30\text{ sek}$ broj ciklusa = 40
3	LZ13 L26	2885 pb	$T_a = 58\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 1\text{ min } 30\text{ sek}$ broj ciklusa = 40
4	L9 L25	4835 pb	$T_a = 57\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 2\text{ min } 30\text{ sek}$ broj ciklusa = 35

Tablica 11. Specifične početnice (Macrogen) i uvjeti reakcije za umnažanje virusnog genoma za uzorak 200FU p1 pokus 1. Nedostaje zadnjih 624 pb genoma.

Fragment	Korištene početnice	Veličina fragmenta	Uvjeti reakcije
1	N0 P10rev	2097 pb	T _a = 64 °C, t _e = 1 min 30 sek broj ciklusa = 40
2	Dg4 MR4	3592 pb	T _a = 59 °C, t _e = 2 min 15 sek broj ciklusa = 40
3	F15 LZ14	2657 pb	T _a = 61 °C, t _e = 1 min 30 sek broj ciklusa = 40
4	LZ13 L26	2885 pb	T _a = 58 °C , t _e = 1 min 30 sek broj ciklusa = 40
5	L9 L23	4231 pb	T _a = 58 °C, t _e = 2 min 40 sek broj ciklusa = 35

Tablica 12. Specifične početnice (Macrogen) i uvjeti reakcije za umnažanje virusnih genoma uzoraka 250R p1 i 500R p1 iz pokusa 3. Nedostaje prvih 79 pb genoma.

Fragment	Korištene početnice	Veličina fragmenta	Uvjeti reakcije
1. fragment	Dg2 P10rev	2018 pb	T _a = 64 °C, t _e = 1 min 30 sek broj ciklusa = 40
2. fragment	Dg4 MR4	3592 pb	T _a = 59 °C, t _e = 2 min 15 sek broj ciklusa = 40
3. fragment	F15 LZ14	2657 pb	T _a = 61 °C, t _e = 1 min 30 sek broj ciklusa = 40
4. fragment	LZ13 L26	2885 pb	T _a = 58 °C , t _e = 1 min 30 sek broj ciklusa = 40
5. fragment	L9 L25	4835 pb	T _a = 58 °C, t _e = 2 min 40 sek broj ciklusa = 35

3.2.13 Elektroforeza u agaroznom gelu i pročišćavanje produkata lančane reakcije polimerazom

Pripremi se 1,5% agarozni gel na način da se agaroz (Sigma-Aldrich) i 1xTBE pufer kuhaju dok se agaroz ne rastali. Zatim se otopina ohladi na 50 do 55 °C i doda se 6 µL etidijevog bromida koncentracije 10 mg/ml. Otopina se izlije u kadu za gel u koju se dodaju češljevi za jažice i pričekava se dok se gel ne stvrdne. PCR produkti se miješaju s kombinacijom 0,05% boje bromfenolplavo (Sigma Aldrich) i 30% glicerola (Kemika) u omjeru 1:6 te se nanose na gel. Elektroforeza uzoraka dobivenih lančanom reakcijom polimerazom traje oko 30 min. Postupak se provodi pri sobnoj temperaturi u 1xTBE-puferu na izvoru napajanja pri 100 mV (Hoefer Scientific Instruments). Rezultat se očitava na transiluminatoru UVTM-25 (Hoefer Scientific Instruments). PCR produkti se izrezuju iz agaroznog gela i pročišćavaju pomoću kompleta reagensa NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) prema uputama proizvođača i ispiru s membrane u 20 µL vode bez RNaza i DNaza.

3.2.14 Mjerenje koncentracije uzoraka nakon pročišćavanja iz gela

Uzorci za mjerenje koncentracije pročišćenih produkata PCR reakcije pripremaju se pomoću kompleta reagensa QuantiFluor ONE dsDNA System (Promega) prema uputstvima proizvođača nakon čega se koncentracija DNA po µL mjeri na fluorometru Quantus (Promega).

3.2.15 Priprema biblioteka pročišćenih produkata lančane reakcije polimerazom i sekvenciranje metodom sekvenciranja nove generacije

Uređaj za sekvenciranje nove generacije Illumina MiniSeq (Illumina) koristi tehnologiju sekvenciranja sintezom (eng. *sequencing by synthesis*, SBS). Prvi korak je enzimatsko cijepanje genoma na manje fragmente. Na krajeve tih fragmenata dodaju se adapteri, indeksi i regije komplementarne nukleotidnim slijedovima na protočnoj ćeliji pomoću koje se samo sekvenciranje izvršava. Takav konstrukt čini DNA biblioteku fragmenta. Osim za vezanje na protočnu ćeliju prije samog sekvenciranja, navedene dodatne regije potrebne su kako bi se kasnije u analizi rezultata mogli razlučiti pojedini dijelovi genoma. Nakon vezanja fragmenata slijedi njihovo umnažanje kojim nastaju milijuni identičnih kopija pojedinih fragmenata. Na temelju dobivenih kalupa sintetizira se DNA pomoću nukleotida označenih bojom kako bi se mogli razlučiti pojedini nukleotidi. Rezultat procesa je ogroman broj tako sekvenciranih fragmenata koji se onda

bioinformatičkom analizom obrađuju kako bi se od dobivenog dobila informacija o cijelom genomu.

Biblioteke fragmenata za sekvenciranje priređene su korištenjem kompleta reagensa *Nextera DNA Flex* (Illumina) prema uputstvima proizvođača. Kvaliteta pripremljenih biblioteka okarakterizirana je mjerenjem koncentracije DNA postupkom opisanim u poglavlju 3.2.14 te analizom veličine fragmenata pomoću automatiziranog sustava za elektroforezu (Agilent 2100 Bioanalyzer System) uz pomoć kompleta reagensa *High Sensitivity DNA Reagents* (Agilent) prema uputstvima proizvođača. Uzorci zadovoljavajuće kvalitete sekvencirani metodom sekvenciranja nove generacije (eng. *next-generation sequencing*, NGS) su na uređaju Illumina MiniSeq (Illumina) prema protokolu iz već spomenutog *Nextera DNA Flex* (Illumina) kompleta reagensa.

3.2.16 Analiza rezultata sekvenciranja metodom sekvenciranja nove generacije

Određivanje pogreške metode

Kvaliteta sirovih podataka sekvenciranja određena je pomoću softvera FastQC v0.11.8. Adapteri i nukleotidi s vrijednostima nižim od Q30 kao i očitane sekvencije kraće od 75 parova nukleotida uklonjeni su iz daljnje analize koristeći BBDuk softver. Očitane sekvencije potom su sravnjene s referentnom sekvencijom virusa pomoću softvera Bowtie2 v2.4.2 za sravnjivanje (102), a konsenzus sekvencije su određene pomoću softvera Geneious Prime® 2019.2.3. Kako bi se poboljšalo sravnjivanje, očitane sekvencije ponovno su sravnjene na ovako dobivenu konsenzus sekvenciju pomoću Bowtie2 v2.4.2 programa. Daljnja obrada uključivala je filtriranje očitavanja koja u odnosu na referentnu sekvenciju imaju maksimalno dva pogrešno sparena nukleotida pomoću paketa programa Samtoolsv1.12 (103), a za određivanje raznolikosti virusnih populacija primijenjen je softver V-Phaser 2 (104). S obzirom da se kod uzoraka MRV2 i pMRV2 ne očekuje prirodna varijabilnost na nukleotidnim pozicijama, svaka pronađena nepodudarnost od konsenzusa uzeta je kao greška metode u skladu s metodom opisanom u (105). Maksimalni postotak zastupljenosti varijante u ovim uzorcima uzet je kao granica ispod koje se varijante odbacuju u svim analizama sekvenciranih uzoraka.

Analiza rezultata sekvenciranja za uzorke virusnih varijanti ZgA/Cro69 i MuVi-C

Početna analiza uključuje već opisano u poglavlju 3.2.16 (FastQC v0.11.8, BBDuk softver, Bowtie2 v2.4.2, Geneious Prime® 2019.2.3, Samtools v1.12, V-Phaser 2). Varijante zastupljene u frekvenciji nižoj od one koja se smatra greškom metode odbačene su iz analize primjenom in-house Python skripte koja ujedno odbacuje i varijante pronađene u regijama početnica korištenim za sekvenciranje kao i one koje nisu prisutne u minimalno pet očitavanja u oba smjera. Kao mjere raznolikosti virusnih populacija korištene su nukleotidna raznolikost (Π) i Shannonova entropija (H) (106). Nukleotidna raznolikost genoma izvodi se iz formule koja izražava raznolikost na svakoj pojedinoj poziciji x (R_x):

$$R_x = \sum_{i \neq j} n_i n_j / \frac{1}{2} N(N-1) = (N(N-1) - \sum_i n_i (n_i - 1)) / N(N-1)$$

u kojoj i označava o kojem se nukleotidu radi (A, C, T ili G), n_i označava broj kopija i nukleotida, dok N označava dubinu sekvenciranja na poziciji. Nukleotidna raznolikost za cijeli genom dobiva se po formuli:

$$\Pi = \sum_{x=1}^L R_x / L$$

u kojoj x označava poziciju, a L dužinu genoma. Na ovaj način dobiva se frekvencija mutacija po genomu. Stopa mutacija određivana je kao pad ili porast nukleotidne raznolikosti po pasažu u odnosu na nukleotidnu raznolikost ishodišnog uzorka, odnosno nukleotidnu raznolikost prethodnog analiziranog pasaža.

Shannonova entropija je izvedena iz teorije informacije i označava mjeru kaosa u populaciji, odnosno procjenjuje vjerojatnost varijabilnosti svake pojedine pozicije u vremenu. Za svaku pojedinu poziciju Shannonova entropija se izračunava po formuli:

$$H_x = - \sum_{i=1}^4 p_i \log(p_i)$$

u kojoj p označava frekvenciju nukleotida i na poziciji x .

Shannonova entropija za cijeli genom (H) računa se po formuli:

$$H = \sum_{x=1}^L H_x / L$$

u kojoj x označava poziciju, a L dužinu genoma.

Rezultati sekvenciranja pohranjeni su u NCBI u repozitorij baze Sequence Read Archive (SRA).

3.2.17 Razdvajanje virusnih varijanti postupkom plakiranja

Plakiranje virusa napravljeno je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.5. Dobiveni plakovi, zajedno s okolnim stanicama uzimaju se pomoću pipete nastavkom od 1 mL i stavljaju u bočice za rast stanica površine 25 cm² u koje je 24 h ranije nasadeno 1×10⁶ stanica Vero u 10 mL medija koji sadrži 2% FTS-a. Uzimano je 10 plakova po uzorku. Inficirane stanice praćene su narednih dana kako bi se primijetila pojava CPE-a. Mikroskopski je procijenjeno kada je infekcija dosegla dovoljnu jačinu te je tada sakupljen supernatant stanične kulture, centrifugiran 5 minuta na 177×g, alikvotiran i smrznut pri temperaturi -60 °C ili nižoj.

3.2.18 Priprema uzoraka za sekvenciranje metodom po Sangeru

Odabrani virusni uzorci pripremljeni su prema uputstvu davatelja usluge (MacroGen) pomoću početnica i u uvjetima prikazanim u tablici 13.

Tablica 13. Specifične početnice (MacroGen) i uvjeti reakcije za umnažanje replika uzorka 4Ap5.

Uzorak 4Ap5/1

Fragment	Korištene početnice	Veličina fragmenta	Uvjeti reakcije
1. fragment	N11 P10rev	1166 pb	T _a = 58 °C, t _e = 1 min 30 sek broj ciklusa = 40
2. fragment	LZ9 HNBamHI	1282 pb	T _a = 60 °C, t _e = 1 min 30 sek broj ciklusa = 40
3. fragment	L1 L6	1829 pb	T _a = 52 °C, t _e = 2 min 40 sek broj ciklusa = 40

Uzorak 4Ap5/2

Fragment	Korištene početnice	Veličina fragmenta	Uvjeti reakcije
1. fragment	LZ9 L4	2487 pb	$T_a = 59\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 2\text{ min }45\text{ sek}$ broj ciklusa = 40
2. fragment	L5 L12	2332 pb	$T_a = 57\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 2\text{ min }30\text{ sek}$ broj ciklusa = 40

3.2.19 Izračun 50%-tne inhibitorne doze i koeficijenta korelacije

Za određivanje doze koja uzrokuje 50%-tnu inhibiciju (IC₅₀, eng. *inhibitory concentration*) vijabilnosti stanica korišten je model nelinearne regresije programa Graph Pad Prism 9.1.2. (GraphPad Software Inc.).

Za određivanje IC₅₀, inhibicijske doze koja uzrokuje 50% preživljenja infektivnih virusnih čestica, primijenjena je nelinearna regresija. Korišteni model nelinearne regresije prilagođen je eksperimentalnim rezultatima pomoću programa Excel (Microsoft Office). Korištena je odgovarajuća nelinearna regresijska formula kako bi se modelirala inhibicijska krivulja. IC₅₀ vrijednosti izračunate su na temelju prilagođenog modela.

Kako bismo procijenili korelaciju između heterogenosti i titra virusa primijenjena je analiza korelacije pomoću ugrađenih alata za analizu podataka u Excelu (Microsoft Office) - *Analysis Toolpack*. Dobiveni koeficijent korelacije koristi se za procjenu snage i smjera veze između varijabli.

3.2.20 Statistička obrada rezultata

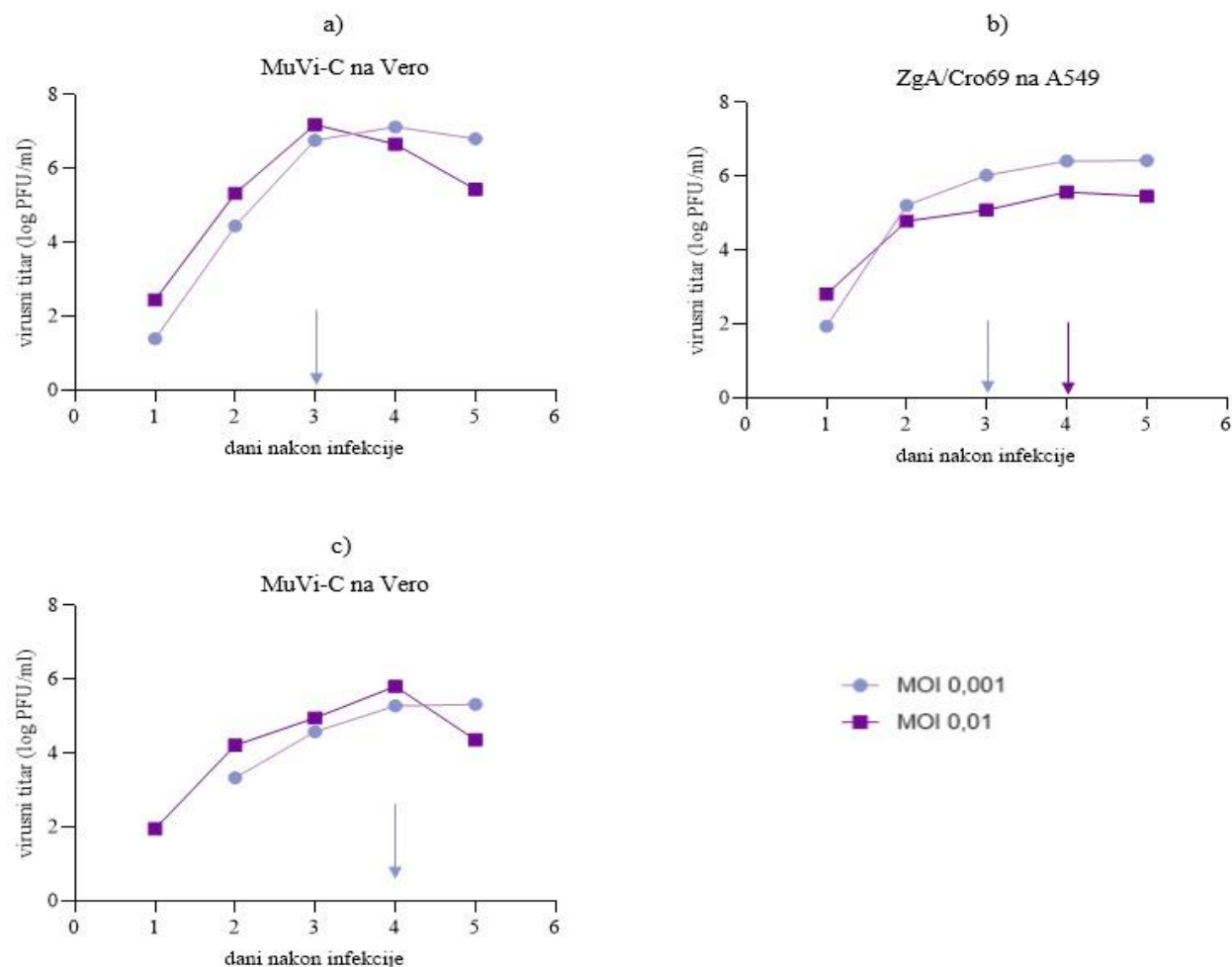
Statistička analiza provedena je pomoću računalnog programa Graph Pad Prism 9.1.2. (Prism Software) i Excela (Microsoft Office). U slučaju normalne distribucije, odnosno sličnih vrijednosti varijanci unutar populacija koje su se uspoređivale, korišten je Studentov t-test kod usporedbe dva uzorka ili *one-way* ANOVA kod usporedbe više različitih grupa u kombinaciji s post-hoc Dunnett-ovim testom za određivanje specifičnih grupa kod kojih postoji statistički značajna razlika. U slučaju populacija koje nisu bile normalno distribuirane odnosno čija vrijednost varijanci između skupina nije bila jednaka, korišten je Kruskal-Wallis test s post-hoc Dunnett-ovim testom za višestruku usporedbu. Kod svih statističkih izračuna za p vrijednost jednaku ili manju od 0,05 podaci su se uzimali kao statistički značajni.

4. REZULTATI

4.1 Određivanje kinetike replikacije virusa zaušnjaka

Supernatant se s inficirane stanične kulture uzimao u piku virusne infekcije, tj. virus postiže najviši mogući titar. U slučaju kada razlika u titru između različitih dana nije bila velika (manje od 0,5 logPFU/ml, proizvoljno određeno) supernatant se uzimao u ranijoj točki kako bi se smanjio negativan utjecaj nukleozidnog analoga na stanice i time njegova interferencija s rezultatima utjecaja nukleozidnog analog na sam virus. U svrhu određivanja tog trenutka, tj. vremena inkubacije stanica nakon infekcije virusom, napravljeno je određivanje kinetike replikacije virusa na odabranim staničnim linijama.

Stanice su nasađene u hranjivom mediju za uzgoj stanica te su nakon 24 sata inficirane virusom pri različitim MOI. Svaki dan nakon infekcije tijekom 5 dana uziman je alikvot supernatanta inficirane stanične kulture te je u njemu određen titar virusa testom plakiranja (slika 9).



Slika 9. Rezultati replikacije virusa zaušnjaka na odabranim staničnim linijama; (a) virusna varijanta MuVi-C na staničnoj liniji Vero (b) virusna varijanta ZgA/Cro69 na staničnoj liniji A549 i (c) virusna varijanta MuVi-C na staničnoj liniji LLC-MK2. Strelicama (boja ovisna o MOI) su naznačeni dani odabrani za sakupljanje supernatanta u daljnjim testovima.

Eksperimentalni uvjeti za infekciju različitih staničnih linija različitim virusnim varijantama zaušnjaka (tablica 14) odabrani su na temelju rezultata replikacije virusa (slika 9).

Tablica 14. Kombinacije staničnih linija, virusnih varijanti, vremena inkubacije nakon infekcije te MOI korištenih u svrhu određivanja utjecaja nukleozidnih analoga na virus zaušnjaka.

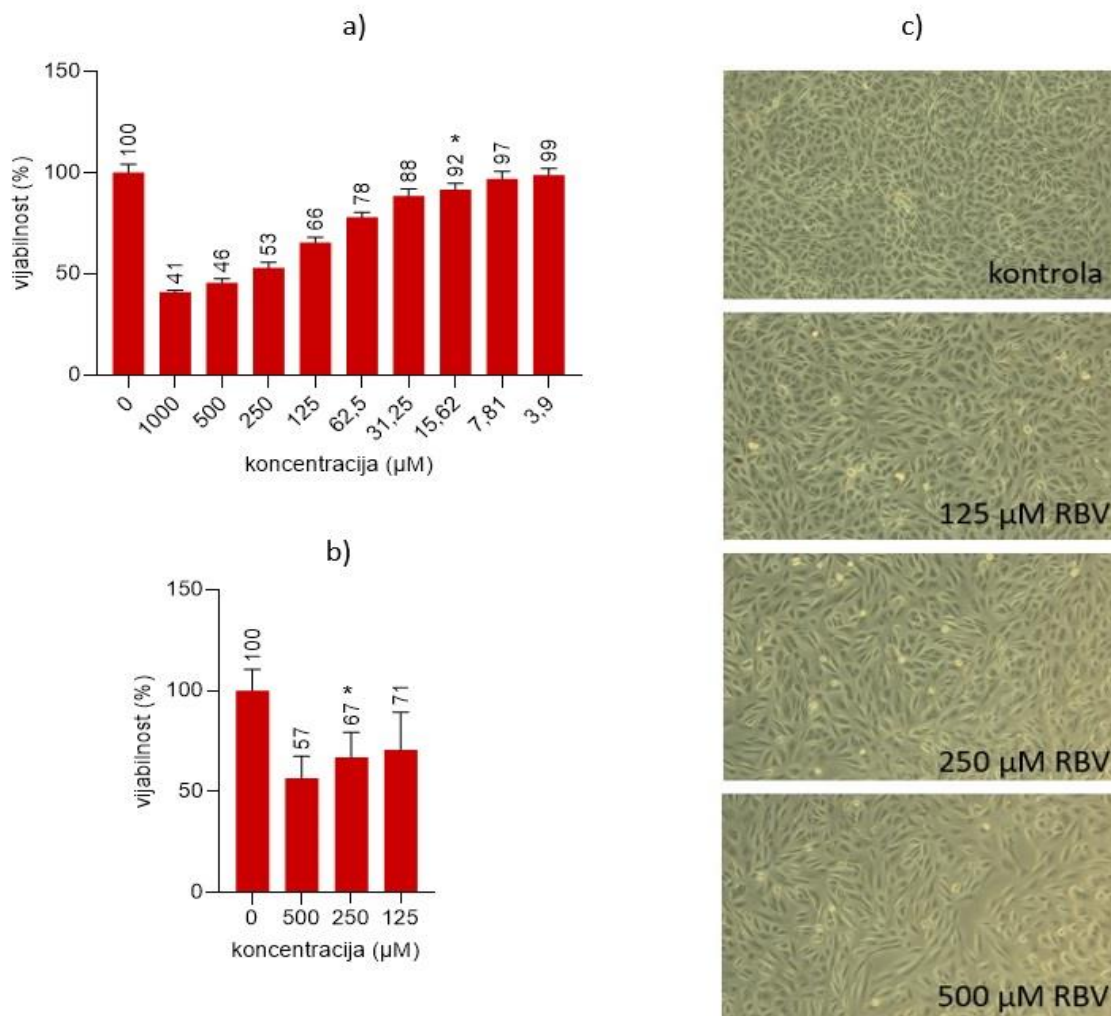
stanična linija	virus	MOI	vrijeme inkubacije do sakupljanja supernatanta (dani)	vrijeme inkubacije do pika infekcije	titar na dan sakupljanja supernatanta (logPFU/ml)	titar u piku infekcije (logPFU/ml)
Vero	MuVi-C	0,001	3	4	6,77	7,13
A549	ZgA/Cro69	0,01	4	4	5,57	5,57
	ZgA/Cro69	0,001	3	4	6,03	6,42
LLC-MK2	MuVi-C	0,001	4	5	5,28	5,32

4.2 Određivanje učinka nukleozidnih analoga na stanice

Učinak nukleozidnih analoga određivan je nakon 3 dana inkubacije za staničnu liniju Vero te nakon 4 dana za stanične linije A549 i LLC-MK2 postupcima opisanim u poglavlju 3.2.2 i 3.2.3. Na temelju rezultata MTT testa je interpolirana vrijednost koncentracije nukleozidnog analoga koja uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju vijabilnosti stanica za svaku pojedinačnu kombinaciju stanica i nukleozidnog analoga (IC₅₀). IC₅₀ vrijednosti prikazane su sumarno u tablici 17.

4.2.1 Učinak ribavirina na stanice

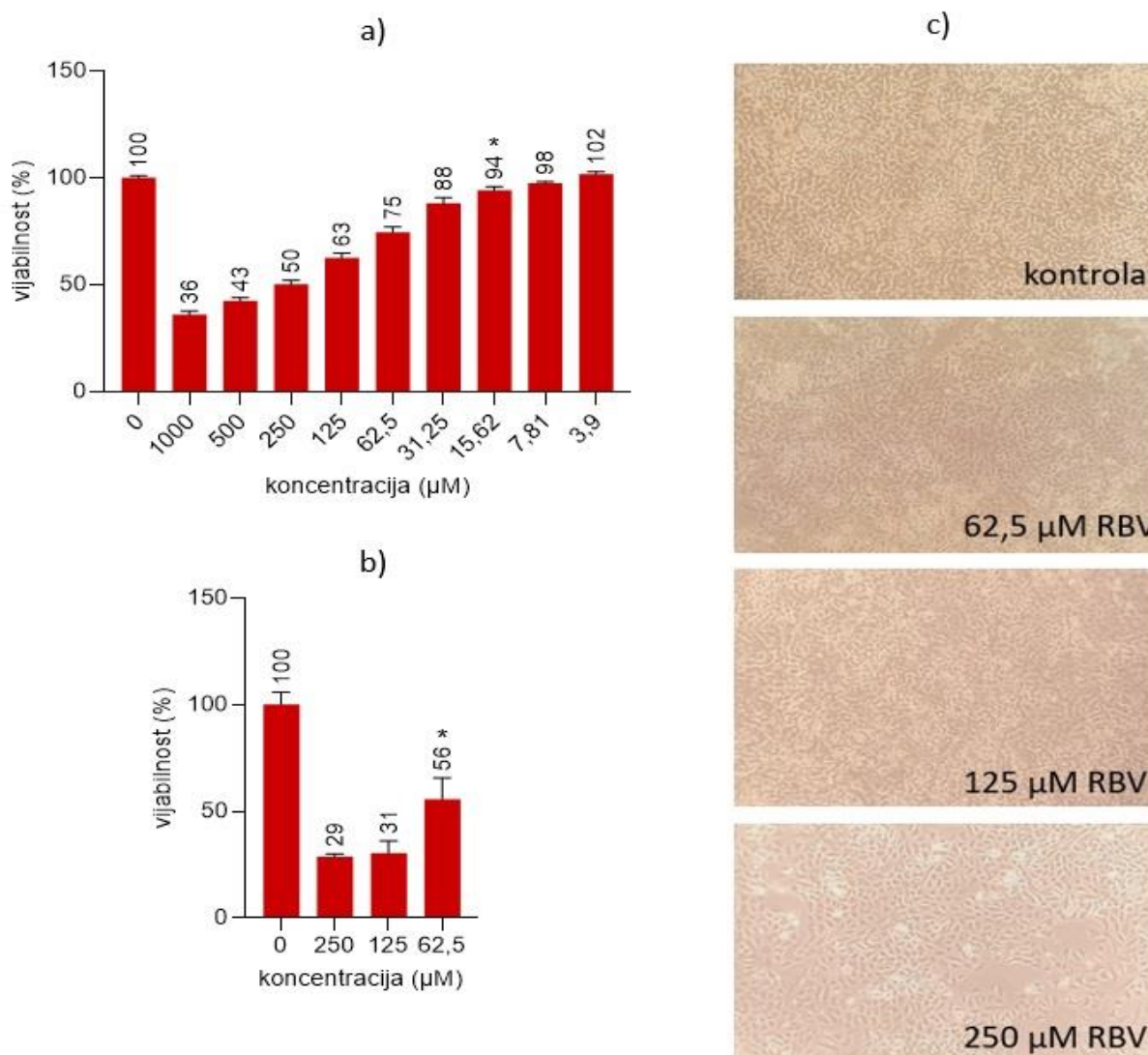
Stanična linija Vero je u MTT testu tretirana dvostrukim razrjeđenjima koncentracija RBV-a počevši od 1000 μ M do 3,9 μ M (slika 10a). Najmanja korištena koncentracija kod koje je prisutna statistički značajno niža vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom (netretirane stanice) je 15,62 μ M. Rezultati brojanja živih stanica (slika 10b) pokazuju veću vijabilnost stanica tretiranih koncentracijama RBV-a od 500, 250 i 125 μ M u usporedbi s rezultatima za iste koncentracije korištene u MTT testu. Ova razlika iznosi otprilike 10%. Pri brojanju stanica udio mrtvih stanica nije bio značajan, a mikroskopski pregled staničnog sloja također ne pokazuje citotoksični učinak RBV-a na stanice. (slika 10c).



Slika 10. Učinak ribavirina (RBV) na staničnu liniju Vero određen (a) MTT testom, (b) brojanjem živih stanica i (c) mikroskopskim pregledom staničnog sloja. Na slikama (a) i (b) su na apscisi navedene koncentracije ribavirina kojima su stanice tretirane, a na ordinati postotak vijabilnih stanica izračunat iz (a) vrijednosti dobivenih apsorbancija ili (b) broja živih stanica. Za svaku koncentraciju prikazana je srednja vrijednost $\pm$ SD ($n=6$) te je naznačena (*) najmanja koncentracija ribavirina kod koje je prisutna statistički značajno niža vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom (*one-way* ANOVA uz post-hoc Dunnetov test, $p < 0,05$).

Stanična linija A549 je u MTT testu tretirana dvostrukim razrjeđenjima koncentracija RBV-a počevši od 1000 μ M do 3,9 μ M (slika 11a). Najmanja korištena koncentracija kod koje je prisutna statistički značajno niža vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom je 15,62 μ M, jednako kao u slučaju stanica Vero. Rezultati brojanja živih stanica (slika 11b) pokazuju manju vijabilnost stanica

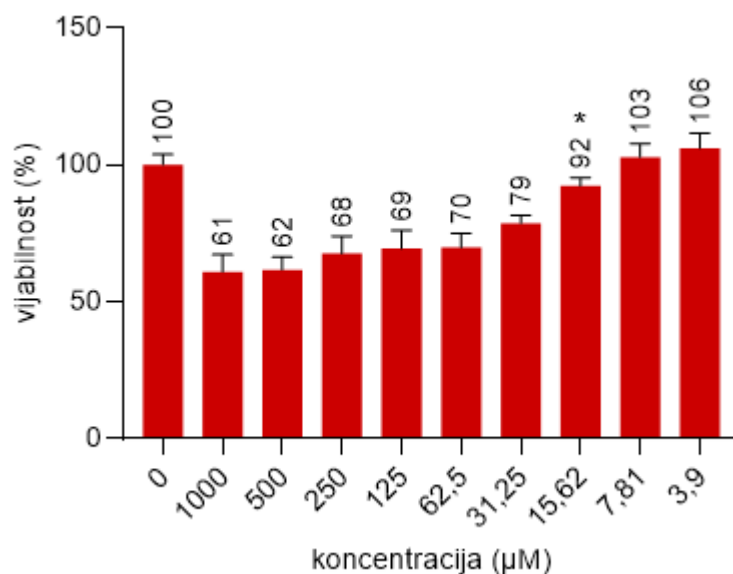
tretiranih koncentracijama RBV-a od 250, 125 i 62,5 μM u usporedbi s rezultatima za iste koncentracije korištene u MTT testu. Najveća razlika prisutna je kod koncentracija od 125 μM u kojoj brojanje hemocitometrom pokazuje 30% manju vijabilnost nego MTT test za istu koncentraciju. Pri brojanju stanica udio mrtvih stanica nije bio značajan, a mikroskopski pregled staničnog sloja također ne pokazuje citotoksični učinak RBV-a na stanice (slika 11c).



Slika 11. Učinak ribavirina (RBV) na staničnu liniju A549 određen (a) MTT testom, (b) brojanjem živih stanica i (c) mikroskopskim pregledom staničnog sloja. Na slikama (a) i (b) su na apscisi navedene koncentracije ribavirina kojima su stanice tretirane, a na ordinati postotak vijabilnih stanica izračunat iz (a) vrijednosti dobivenih apsorbancija ili (b) broja živih stanica. Za svaku koncentraciju prikazana je srednja vrijednost $\pm$ SD (n=6) te je naznačena (*) najmanja

koncentracija ribavirina kod koje je prisutna statistički značajno niža vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom (*one-way* ANOVA uz post-hoc Dunnetov test, $p < 0,05$).

Stanična linija LLC-MK2 je u MTT testu tretirana dvostrukim razrjeđenjima koncentracija RBV-a počevši od 1000 μM do 3,9 μM (slika 12). Najmanja korištena koncentracija kod koje je prisutna statistički značajno niža vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom je 15,62 μM , jednako kao u slučaju staničnih linija Vero i A549. Pri brojanju stanica udio mrtvih stanica nije bio značajan.

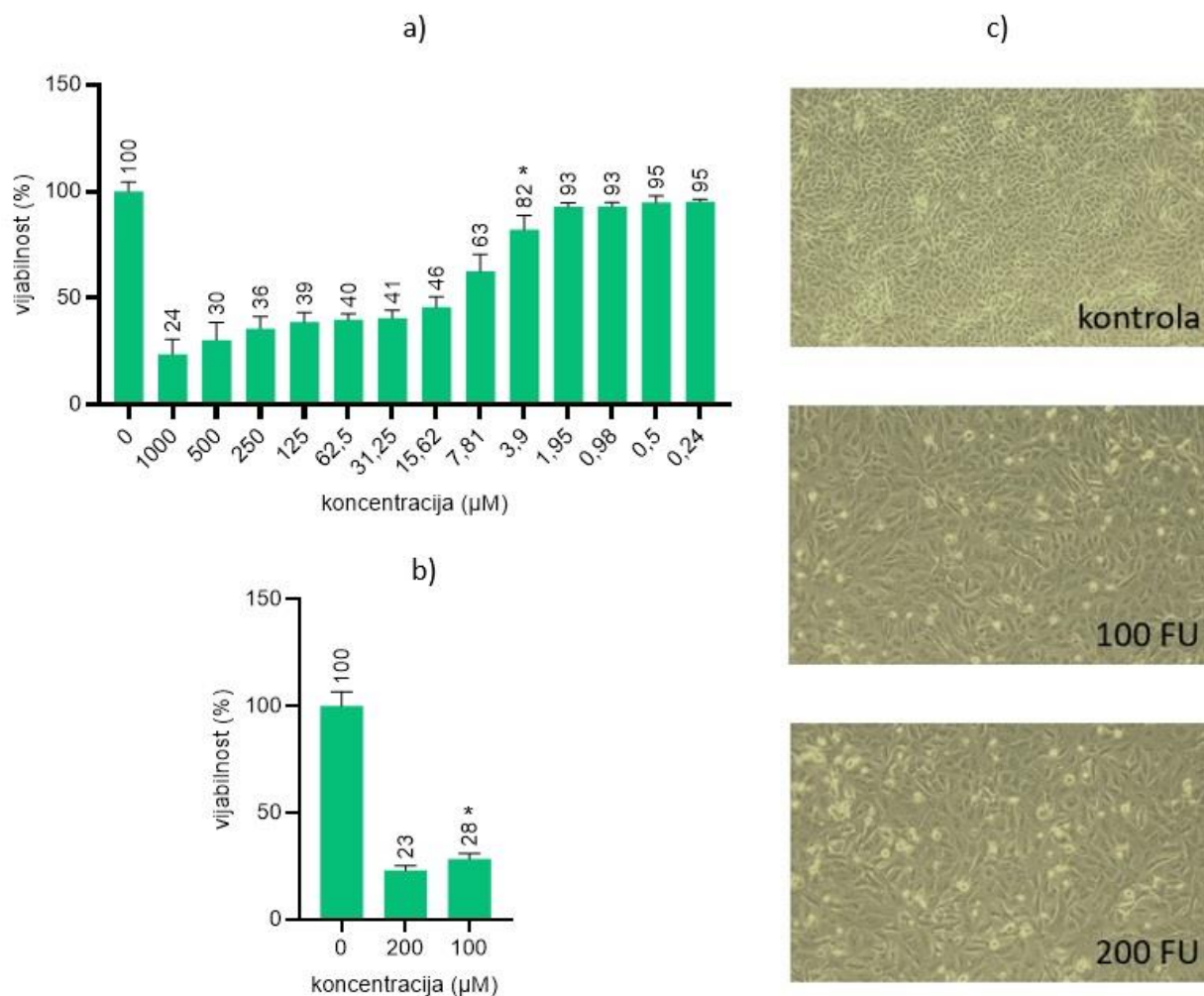


Slika 12. Učinak ribavirina na staničnu liniju LLC-MK2 određen MTT testom. Na apscisi su navedene koncentracije ribavirina kojima su stanice tretirane, a na ordinati postotak preživljenja stanica izračunat iz vrijednosti dobivenih apsorbancija. Za svaku koncentraciju prikazana je srednja vrijednost $\pm$ SD ($n=6$) te je naznačena (*) najmanja koncentracija ribavirina kod koje je prisutna statistički značajno niža vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom (*one-way* ANOVA uz post-hoc Dunnetov test, $p < 0,05$).

4.2.2 Učinak 5-fluorouracila na stanice

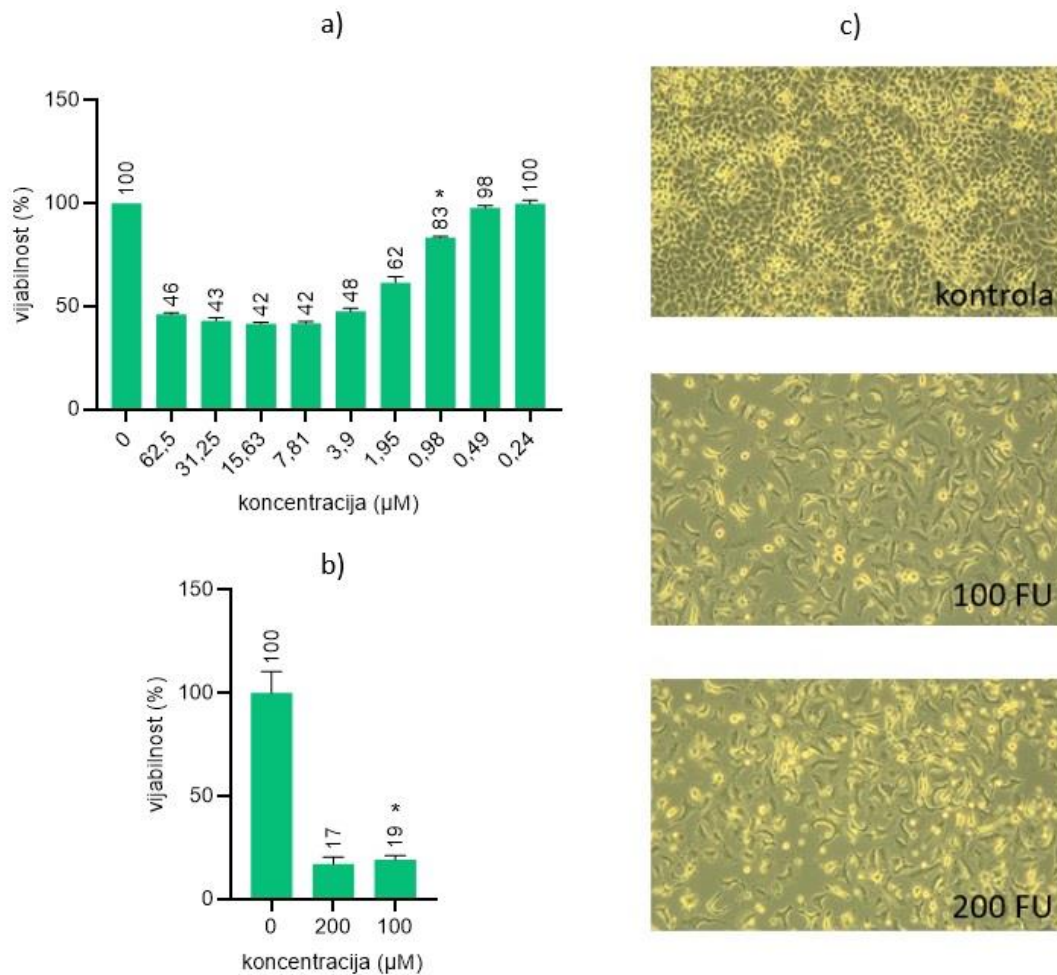
Stanična linija Vero je u MTT testu tretirana dvostrukim razrjeđenjima koncentracija 5-FU-a počevši od 1000 μM do 0,24 μM (slika 13a). Najmanja korištena koncentracija kod koje je prisutna statistički značajno niža vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom je 3,9 μM . Rezultati brojanja živih stanica stanične linije Vero nakon tretmana 5-FU-om u koncentracijama 100 i 200 μM (slika 13b) pokazuju nešto veću osjetljivost stanica od rezultata MTT testa. Ova razlika iznosi otprilike

10%. U brojanju stanica uočene su i mrtve stanice, a mikroskopski pregled staničnog sloja u kojem su vidljive mrtve stanice u supernatantu kulture također upućuje na citotoksični učinak 5-FU-a (slika 13c).



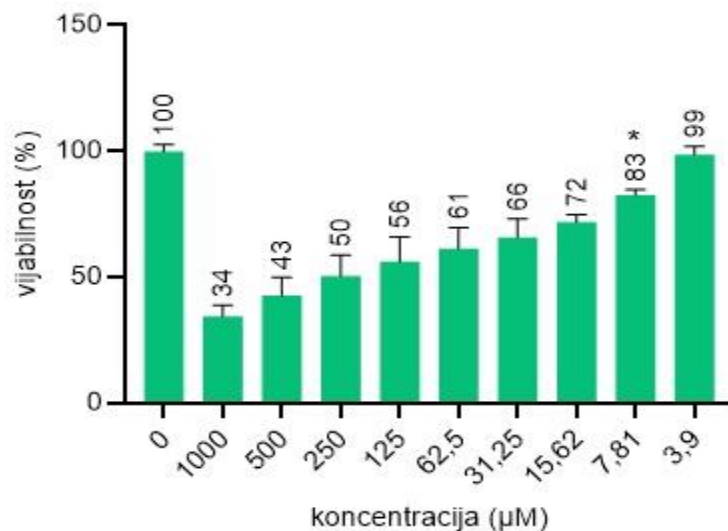
Slika 13. Učinak 5-fluorouracila (FU) na staničnu liniju Vero određen (a) MTT testom, (b) brojanjem živih i mrtvih stanica i (c) mikroskopskim pregledom staničnog sloja. Na slikama (a) i (b) na apscisi su navedene koncentracije 5-fluorouracila kojima su stanice tretirane, a na ordinati postotak vijabilnih stanica izračunat iz (a) vrijednosti dobivenih apsorbancija ili (b) broja živih stanica. Za svaku koncentraciju prikazana je srednja vrijednost $\pm$ SD ($n=6$) te je naznačena (*) najmanja koncentracija 5-fluorouracila kod koje je prisutna statistički značajno niža vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom (*one-way* ANOVA uz post-hoc Dunnetov test, $p < 0,05$).

Stanična linija A549 je u MTT testu tretirane dvostrukim razrjeđenjima koncentracija 5-FU-a počevši od 62,5 μ M do 0,24 μ M (slika 14a). Najmanja korištena koncentracija kod koje je prisutna statistički značajno niža vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom je 0,98 μ M. Rezultati brojanja živih stanica napravljeni su za koncentracije 5-FU-a od 100 μ M i 200 μ M (slika 14b). U istim koncentracijama napravljen je i mikroskopski pregled staničnog sloja (slika 14c). Rezultati pokazuju značajan učinak na vijabilnost stanica (smanjenje vijabilnosti za više od 50%) koji uključuje citotoksični efekt (uočene mrtve stanice pri brojanju kao i u mikroskopskom pregledu staničnog sloja).



Slika 14. Učinak 5-fluorouracila na staničnu liniju A549 određen (a) MTT testom, (b) brojanjem živih stanica i (c) mikroskopskim pregledom staničnog sloja. Na slikama (a) i (b) su na apscisi navedene koncentracije 5-fluorouracila kojima su stanice tretirane, a na ordinati postotak vijabilnih stanica izračunat iz (a) vrijednosti dobivenih apsorbancija ili (b) broja živih stanica. Za svaku koncentraciju prikazana je srednja vrijednost $\pm$ SD ($n=6$) te je naznačena (*) najmanja koncentracija 5-fluorouracila kod koje je prisutna statistički značajno niža vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom (*one-way* ANOVA uz post-hoc Dunnetov test, $p < 0,05$).

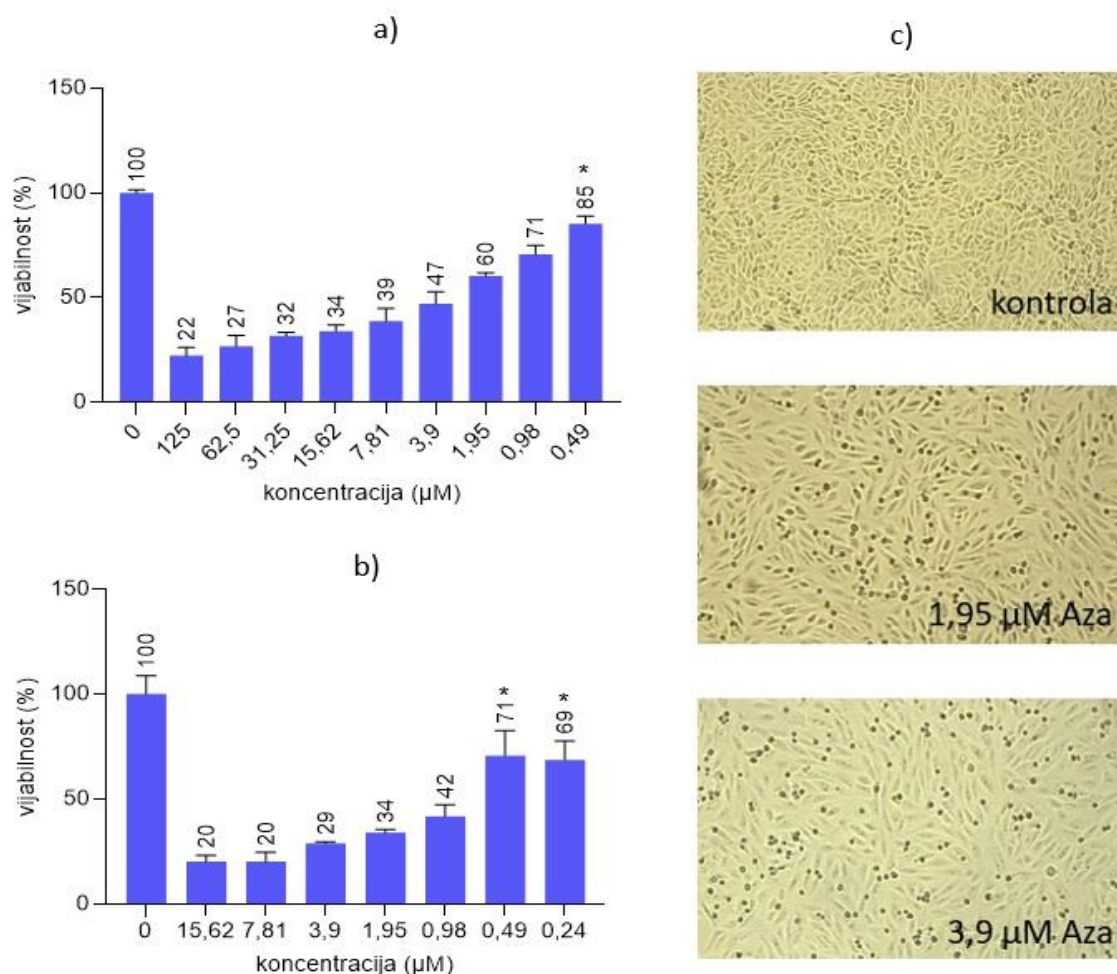
Stanična linija LLC-MK2 je u MTT testu tretirana dvostrukim razrjeđenjima koncentracija 5-FU-a počevši od 1000 μ M do 3,9 μ M (slika 15). Najmanja korištena koncentracija kod koje je prisutna statistički značajno niža vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom je 7,81 μ M.



Slika 15. Učinak 5-fluorouracila na staničnu liniju LLC-MK2 određen MTT testom. Na apscisi su navedene koncentracije 5-fluorouracila kojima su stanice tretirane, a na ordinati postotak preživljenja stanica izračunat iz vrijednosti dobivenih apsorbancija. Za svaku koncentraciju prikazana je srednja vrijednost $\pm$ SD (n=6) te je naznačena (*) najmanja koncentracija 5-fluoruracila kod koje je prisutna statistički značajno niža vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom (*one-way* ANOVA uz post-hoc Dunnetov test, $p < 0,05$).

4.2.3 Učinak 5-azacitidina na stanice

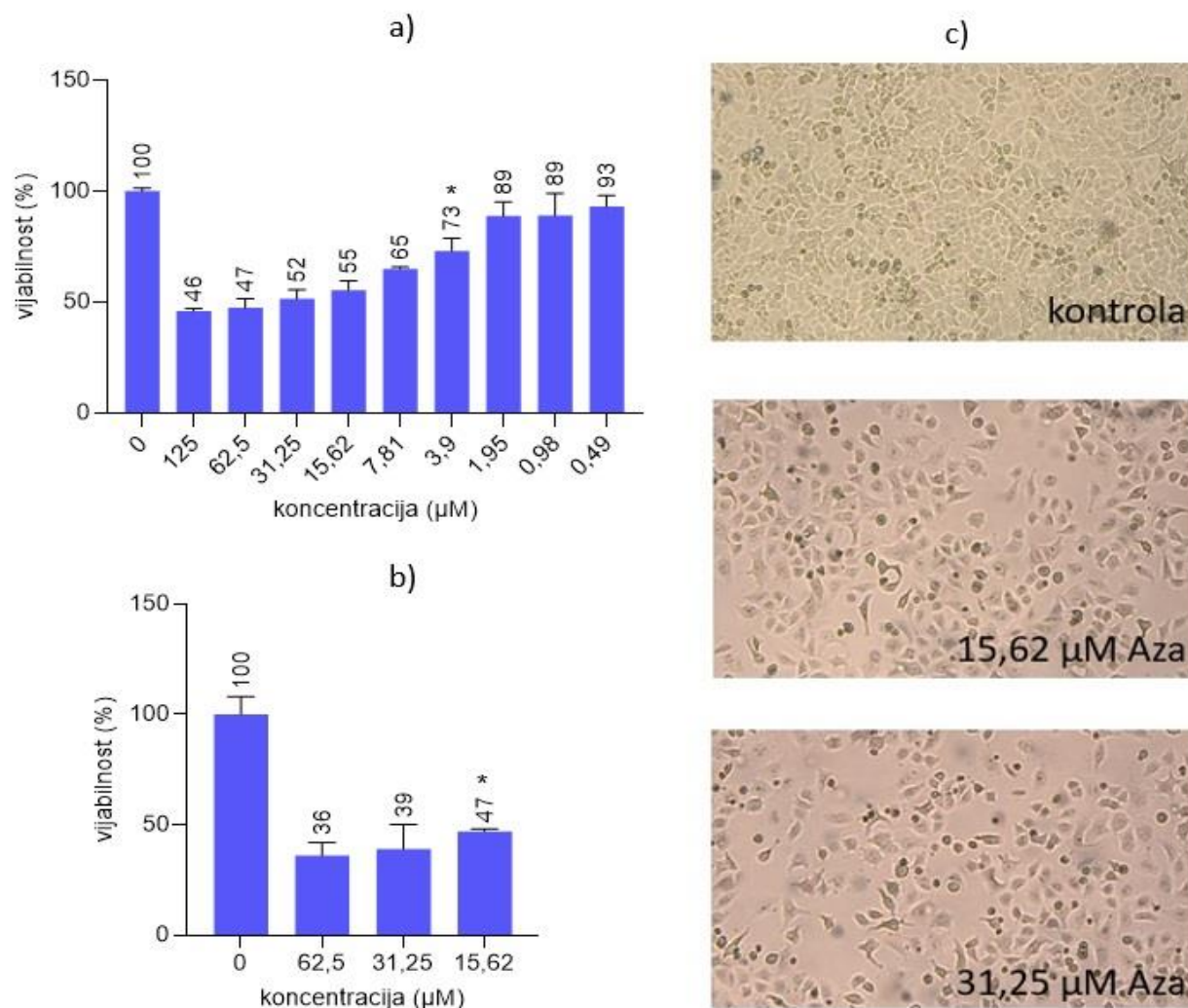
Stanična linija Vero je u MTT testu tretirana dvostrukim razrjeđenjima koncentracija 5-AZC-a počevši od 125 μ M do 0,49 μ M (slika 16a). Najmanja korištena koncentracija kod koje je prisutna statistički značajno niža vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom je 0,49 μ M što je ujedno i najmanja koncentracija kojem su stanice tretirane. Rezultati brojanja živih stanica stanične linije Vero nakon tretmana 5-AZC-om u dvostrukim razrjeđenjima koncentracija počevši od 15,62 μ M do 0,49 μ M (slika 16b) pokazuju nešto veću osjetljivost stanica od rezultata MTT testa za iste koncentracije. Ova razlika iznosi do 26% za koncentraciju 1,95 μ M. Vidljiv je citotoksični efekt 5-AZC-a – uočene su mrtve stanice pri brojanju hemocitometrom kao i u mikroskopskom pregledu staničnog sloja (slika 16c).



Slika 16. Učinak 5-azacitidina na staničnu liniju Vero određen (a) MTT testom, (b) brojanjem živih stanica i (c) mikroskopskim pregledom staničnog sloja. Na slikama (a) i (b) su na apscisi navedene koncentracije 5-azacitidina kojima su stanice tretirane, a na ordinati postotak vijabilnih stanica izračunat iz (a) vrijednosti dobivenih apsorbancija ili (b) broja živih stanica. Za svaku koncentraciju prikazana je srednja vrijednost $\pm$ SD ($n=6$) te je naznačena (*) najmanja koncentracija 5-azacitidina kod koje je prisutna statistički značajno niža vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom (*one-way* ANOVA uz post-hoc Dunnetov test, $p < 0,05$).

Stanična linija A549 je u MTT testu tretirana dvostrukim razrjeđenjima koncentracija 5-AZC-a počevši od 125 μ M do 0,49 μ M (slika 17a). Najmanja korištena koncentracija kod koje je prisutna statistički značajno niža vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom je 3,9 μ M. Rezultati brojanja živih stanica za koncentracije 62,5 μ M, 31,25 μ M i 15,62 μ M (slika 17b) pokazuju nešto veću

osjetljivost na 5-AZC u usporedbi s istim koncentracijama u MTT testu (slika 17a). U koncentracijama 31,25 μM i 15,62 μM napravljen je i mikroskopski pregled sloja (slika 17c) na temelju kojeg je vidljivo da je vijabilnost od kontrole smanjena za otprilike 50% u obje koncentracije. Također, prisutan je i citotoksični učinak 5-AZC-a pokazan brojanjem stanica hemocitometrom te pregledom staničnog sloja.



Slika 17. Učinak 5-azacitidina na staničnu liniju Vero određen (a) MTT testom, (b) brojanjem živih stanica i (c) mikroskopskim pregledom stanica. Na slikama (a) i (b) su na apscisi navedene koncentracije 5-azacitidina kojima su stanice tretirane, a na ordinati postotak vijabilnih stanica izračunat iz (a) vrijednosti dobivenih apsorbancija ili (b) broja živih stanica. Za svaku koncentraciju prikazana je srednja vrijednost $\pm$ SD (n=6) te je naznačena (*) najmanja

koncentracija 5-AZC-a kod koje je prisutna statistički značajno niža vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom (*one-way* ANOVA uz post-hoc Dunnetov test, $p < 0,05$).

Najmanji učinak na vijabilnost stanica od tri korištena nukleozidna analoga na staničnim linijama Vero i A549 pokazan je za RBV. Od testiranih, stanična linija A549 najosjetljivija je na 5-FU, a stanična linija Vero na 5-AZC (ovaj nukleozidni analog nije testiran na stanicama LLC-MK2). Stanična linija LLC-MK2 manje je osjetljiva na učinak RBV-a i 5-FU-a od staničnih linija Vero i A549 (tablica 15).

Tablica 15. Vrijednosti dobivene testom 50% inhibitorne doze za prikazane kombinacije stanica i nukleozidnih analoga. Rezultati su prikazani u μM . RBV = ribavirin, 5-FU = 5-fluorouracil, 5-AZC = 5-azacitidin.

	RBV	5-FU	5-AZC
Vero	399	35	5
A549	423	11	45
LLC-MK2	1394	220	n.o.

*n.o.; nije određivano

4.3 Utjecaj koncentracije stanica u sloju za infekciju na titar virusa

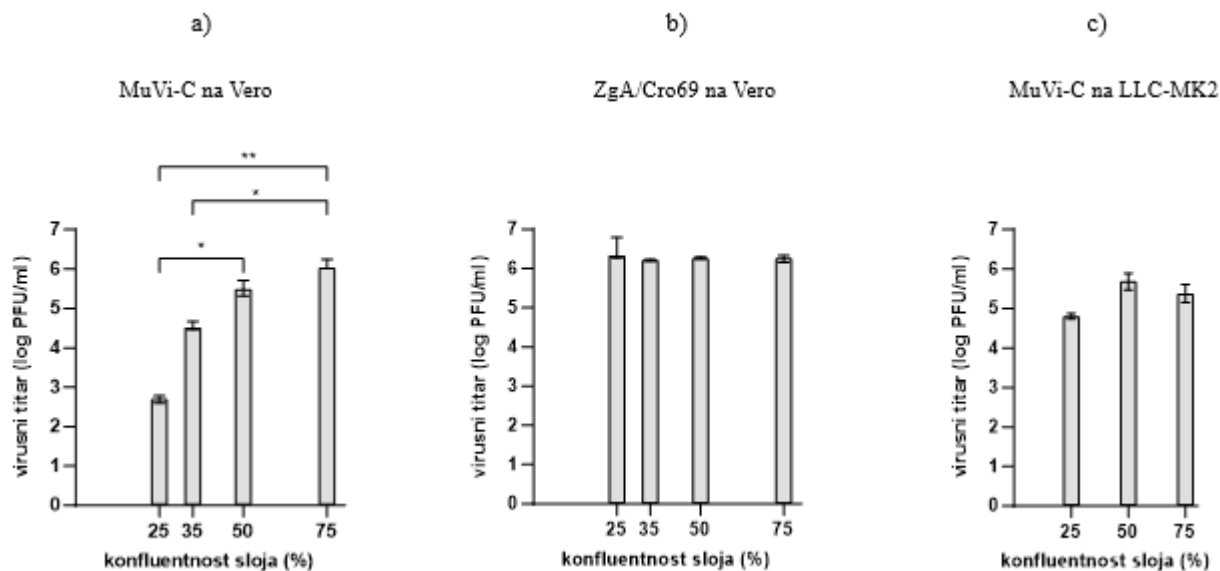
Stanice su nasadene u različitim koncentracijama (tablica 16) i zatim inficirane virusom. Cilj je bio utvrditi razliku u titru ovisno o koncentraciji nasada stanica. Supernatant stanične kulture skupljen je 3. dan za staničnu liniju Vero odnosno 4. dan za stanične linije A549 i LLC-MK2 i u njemu je određen titar virusa testom plakiranja.

Tablica 16. Koncentracije nasađenih stanica te procjenjeni postotak konfluentnosti sloja 24 sata nakon nasađivanja.

stanična linija	koncentracija nasada (broj stanica po zdencu)	konfluentnost nakon 24 sata*
Vero	46 000	25%
	88 000	35%
	130 000	50%
	170 000	75%
A549	46 000	25%
	88 000	35%
	110 000	50%
	150 000	75%
LLC-MK2	40 000	25%
	70 000	50%
	110 000	75%

*konfluentnost određena vizualno mikroskopskim pregledom staničnog sloja

Kod staničnih linija A549 i LLC-MK2 rezultati pokazuju da razlika u koncentraciji stanica u sloju prisutna u trenutku infekcije ne utječe na titar virusa (slika 18b i c). S druge strane, razlika u nasadu kod stanične linije Vero ima značajan utjecaj na virusni titar (slika 18a). Statistički značajna razlika prisutna je u titru ako se inficira sloj u kojem je početni broj stanica iznosio 170 000 i sloj u kojem je početni broj stanica iznosio 88 000. U tom slučaju pada titra iznosi 1,55 logPFU/ml. Još veći pad u titru utvrđen je kada je početni broj stanica u sloju 46 000 u usporedbi s 170 000 gdje razlika iznosi 3,4 logPFU/ml.



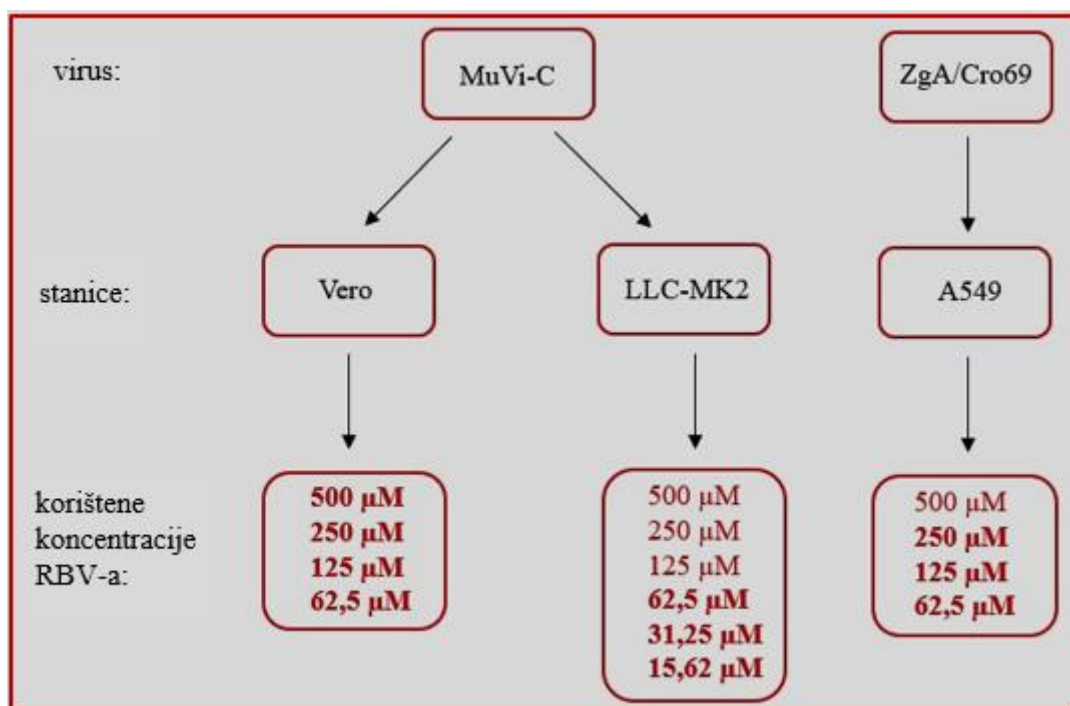
Slika 18. Utjecaj razlike u početnom broju stanica u nasadu za infekciju na titar virusa: (a) virusna varijanta MuVi-C na staničnoj liniji Vero, (b) virusna varijanta ZgA/Cro69 na staničnoj liniji A549 i (c) virusna varijanta MuVi-C na staničnoj liniji LLC-MK2. Prikazan je medijan vrijednosti titra virusa $\pm$ 95% CI (n=3). Statistički značajne razlike među grupama određene su Kruskal-Wallis testom ($p < 0,05$ za * i $p < 0,005$ za **). nz = razlika nije statistički značajna.

4.4 Određivanje antivirusnog učinka nuklozidnih analoga na virusne varijante MuVi-C i ZgA/Cro69

U svrhu određivanja učinka odabranih nukleozidnih analoga na titar virusa zaušnjaka stanice su tretirane različitim koncentracijama istih nakon čega su inficirane virusnom varijantom (MOI i vrijeme inkubacije navedeno u tablici 14, za ZgA/Cro69 odabran MOI 0,001).

4.4.1 Određivanje antivirusnog učinka ribavirina

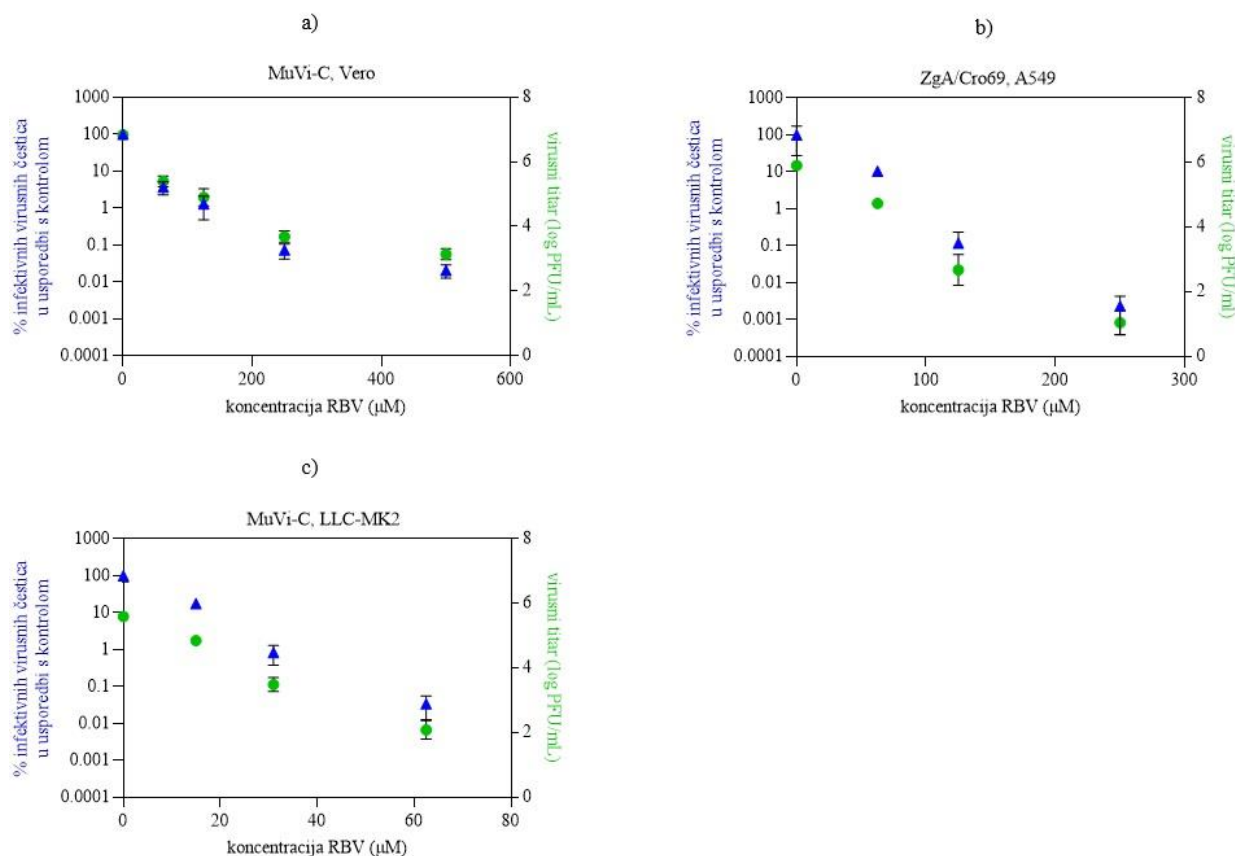
Sve tri kombinacije stanica i virusa tretirane su RBV-om u dvostrukim razrjeđenjima koncentracija počevši od 500 μ M do 62,5 μ M (slika 19). Odabir koncentracija kojima će virusi biti tretirani temeljio se na rezultatima MTT testa. S obzirom da su ove koncentracije RBV-a u slučaju virusne varijante MuVi-C na staničnoj liniji LLC-MK2 rezultirale nedetektibilnim titrom virusa, za ovu kombinaciju pokus je ponovljen s dodatne 2 niže koncentracije (31,25 μ M i 15,62 μ M).



Slika 19. Kombinacije staničnih linija i virusnih varijanti te koncentracije ribavirina korištene za svaku kombinaciju. Podebljane su koncentracije za koje su rezultati antivirusnog učinka prikazani grafički na slici 20. Za ostale navedene koncentracije titar virusa nije bio detektabilan.

U slučaju stanične linije Vero uzeto je u obzir da tretman RBV-om u koncentracijama 250 μ M i 500 μ M uzrokuje smanjenje vijabilnosti za 47% odnosno 54% (slika 10a). Smanjeni broj stanica za infekciju u ovakvom postotku sam po sebi smanjuje titar virusne varijante MuVi-C na staničnoj liniji Vero za 3,4 logPFU/ml (slika 18a). Pad titra pod utjecajem RBV-a iznosi 3,1 logPFU/ml odnosno 3,7 logPFU/ml u slučaju koncentracije od 500 μ M (slika 20a).

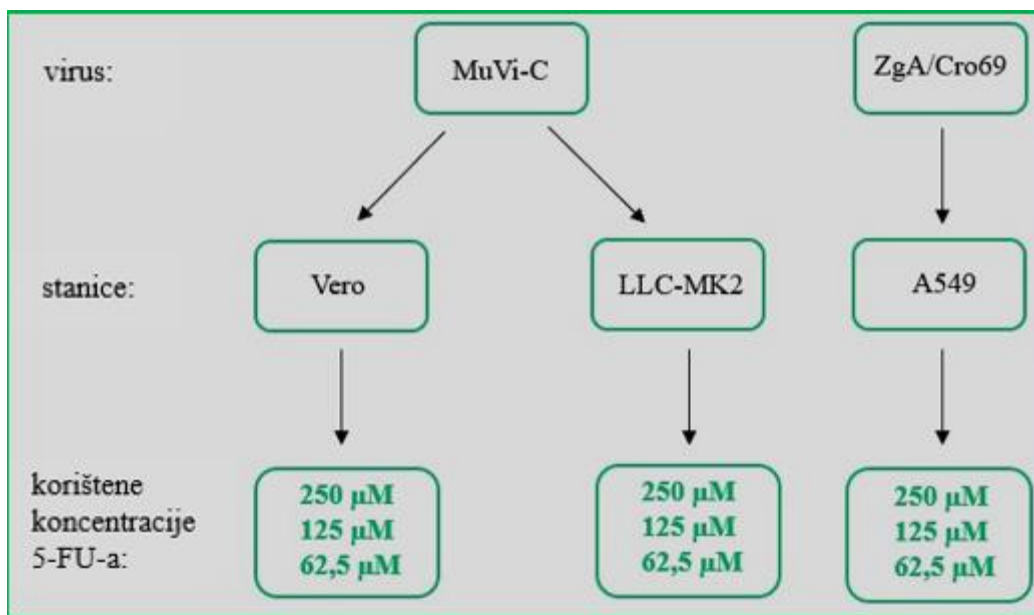
U slučaju virusne varijante ZgA/Cro69 na staničnoj liniji A549 i MuVi-C na LLC-MK2 tretiranih ribavirinom (slika 20b, 20c) koncentracija nasada nema utjecaj na titar virusa (slika 18b, 18c) stoga je pad titra virusa direktan rezultat antivirusnog djelovanja RBV-a.



Slika 20. Učinak ribavirina na virus zaušnjaka: (a) virusna varijanta MuVi-C na staničnoj liniji Vero, (b) virusna varijanta ZgA/Cro69 na staničnoj liniji A549 i (c) virusna varijanta MuVi-C na staničnoj liniji LLC-MK2. Na lijevoj ordinati prikazan je postotak infektivnih virusnih čestica dobiven u slučaju tretmana u odnosu na kontrolu (plavi trokutići), a na desnoj ordinati prikazan je titar virusa (zeleni kružići). Za svaku koncentraciju prikazana je srednja vrijednost $\pm$ SD (n=3).

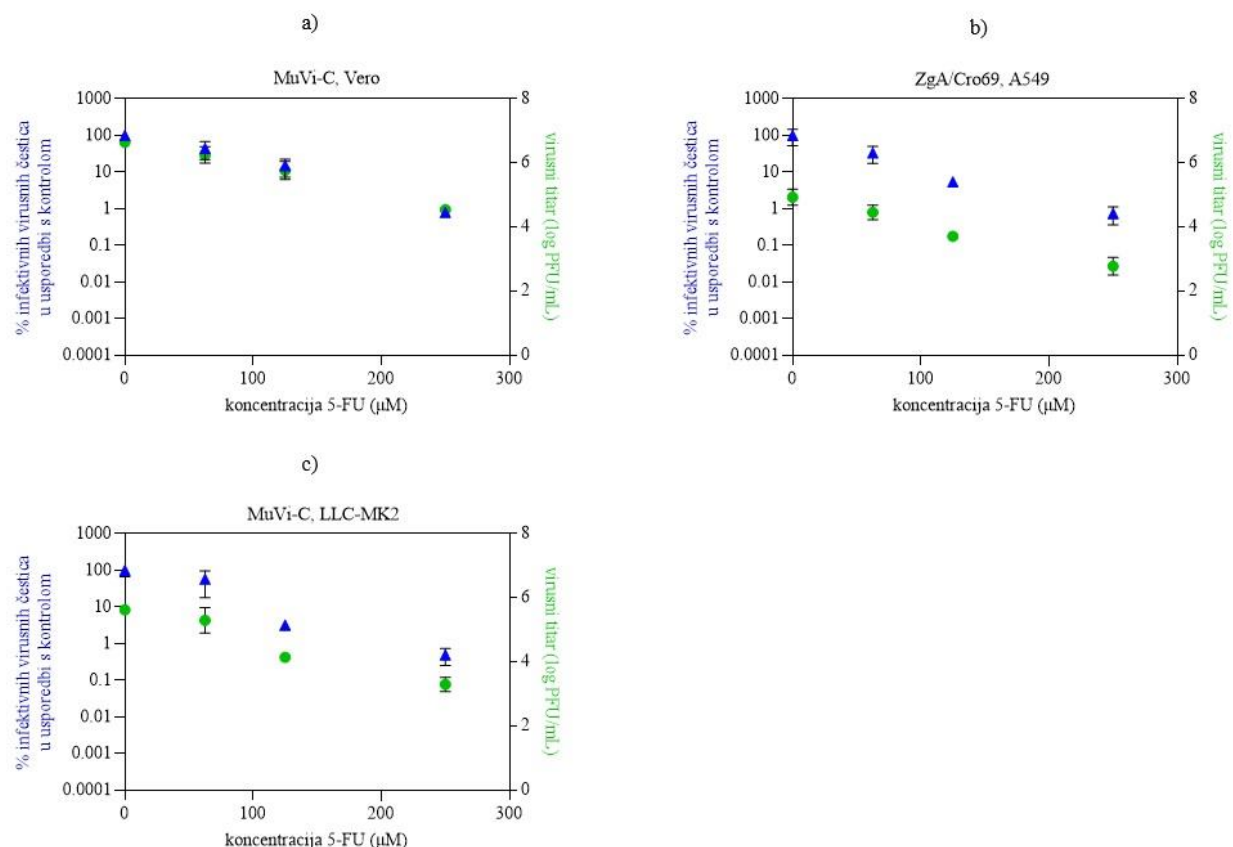
4.4.2 Određivanje antivirusnog učinka 5-fluorouracila

Koncentracije kojima su virusi tretirani 5-FU-om na staničnim linijama Vero i A549 bile su određene ovisno o učinku 5-FU-a na vijabilnost stanica tj. korištene su koncentracije koje ne uzrokuju značajan pad u vijabilnosti stanica (slike 13a-c, 14a-c, 15). Te koncentracije (dvostruka razrjeđenja počevši od 15,62 μ M) nisu pokazala značajan pad u titru za bilo koju kombinaciju virusa i stanica (podaci nisu prikazani). Stoga su odabrane koncentracije 5-FU-a prikazane na slici 21 unatoč velikom utjecaju na vijabilnost staničnih linija Vero i A549 te nešto nižem, ali svejedno značajnom utjecaju na staničnu liniju LLC-MK2.



Slika 21. Kombinacije staničnih linija i virusnih varijanti te koncentracije 5-fluorouracila koje su korištene za određivanje njegovog antivirusnog učinka.

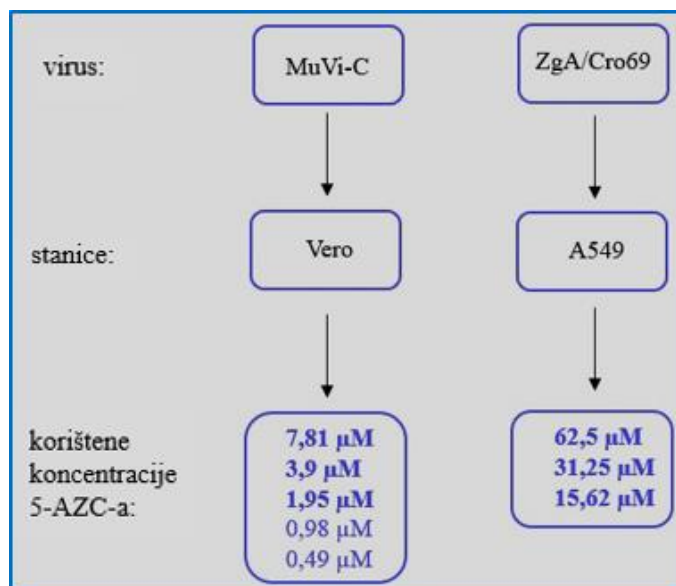
Titar virusne varijante MuVi-C na staničnoj liniji Vero u prisustvu 5-FU-a pokazuje pad od 2 logPFU/ml kod korištenja koncentracije 250 μ M (slika 22a). Koncentracije 5-FU-a od 125 μ M i 250 μ M uzrokuju pad vijabilnosti stanica od 61% odnosno 64% u usporedbi s netretiranom kontrolom (slika 13a). Smanjenje u samom broju stanica za 50% uzrokuje virusni titar koji je za 3,4 logPFU/ml manji od titra virusa koji inficira stanični sloj koji uzrokuje otprilike 75%-tnu konfluentnost (slika 18a). S obzirom na to da je za stanične linije A549 i LLC-MK2 ustanovljeno da smanjenje broja stanica za infekciju nema utjecaj na titar virusa (slika 18b i 18c), rezultati pokazuju antivirusan učinak 5-FU-a prema virusnim varijantama MuVi-C (na LLC-MK2) i ZgA/Cro69 (na A549) koji je ovisan o korištenoj dozi nukleozidnog analoga (slika 22b i 22c).



Slika 22. Učinak 5-fluorouracila na virus zaušnjaka: (a) virusna varijanta MuVi-C na staničnoj liniji Vero, (b) virusna varijanta ZgA/Cro69 na staničnoj liniji A549 i (c) virusna varijanta MuVi-C na staničnoj liniji LLC-MK2. Na lijevoj ordinati prikazan je postotak infektivnih virusnih čestica u odnosu na kontrolu (plavi trokutići), a na desnoj ordinati prikazan je titar virusa (zeleni kružići). Za svaku koncentraciju prikazana je srednja vrijednost $\pm$ SD (n=3).

4.4.3 Određivanje antivirusnog učinka 5-azacitidina

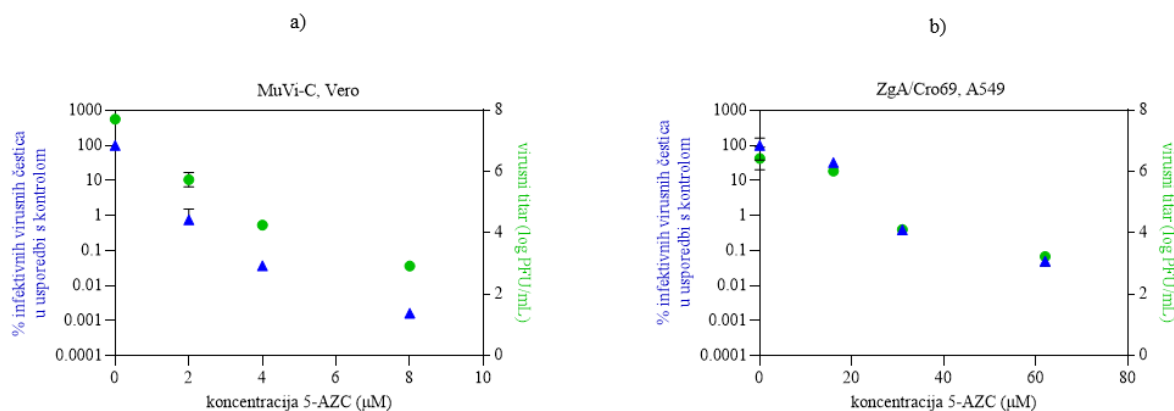
Koncentracije korištene u pokusima bile su određene ovisno o učinku 5-AZC-a na vijabilnost stanica (slike 16a i 17a). S obzirom na to da su koncentracije koje ne uzrokuju značajan pad vijabilnosti u slučaju stanične linije Vero niske, ove su stanice tretirane i koncentracijom od 7,81 μM koja uzrokuje pad vijabilnosti stanica za otprilike 60% kako bi se povećala vjerojatnost uočavanja antivirusnog učinka (slika 23).



Slika 23. Kombinacije staničnih linija i virusnih varijanti te koncentracije 5-azacitidina koje su korištene za svaku navedenu kombinaciju stanica i virusa. Podebljane su koncentracije za koje su rezultati antivirusnog učinka prikazani grafički na slici 16. Za ostale navedene koncentracije titar virusa nije bio značajno različit od titra kontrolnog, netretiranog virusa.

Koncentracije 5-AZC-a od 1,95 i 3,9 μM uzrokuju smanjenje broja stanica stanične linije Vero u sloju od 40% odnosno 53%, a koncentracija 5-AZC-a od 7,81 μM smanjenje od 61% u usporedbi s netretiranom kontrolom (slika 16a). Smanjenje u samom broju stanica za 40% uzrokuje pad titra virusa za 1,5 logPFU/ml, a smanjenje broja stanica za 50% uzrokuje pad titra virusa za 3,4 logPFU/ml (slika 18a). Tretman virusne varijante MuVi-C na staničnoj liniji Vero 5-AZC-om u koncentraciji 1,95 μM uzrokuje pad u titru za 1,98 logPFU/ml, dok koncentracija od 3,9 μM uzrokuje pad od 3,45 logPFU/ml (slika 24a)

S obzirom na to da je za staničnu liniju A549 ustanovljeno da smanjenje broja stanica za infekciju nema utjecaj na titar virusa, rezultati pokazuju jasan utjecaj 5-AZC-a na virusnu varijantu ZgA/Cro69 na ovoj staničnoj liniji koji je ovisan o korištenoj dozi nukleozidnog analoga (slika 24b).



Slika 24. Učinak 5-azacitidina na virus zaušnjaka: (a) virusna varijanta MuVi-C na staničnoj liniji Vero i (b) virusna varijanta ZgA/Cro69 na staničnoj liniji A549. Na lijevoj ordinati prikazan je postotak infektivnih virusnih čestica u odnosu na kontrolu (plavi trokutići), a na desnoj ordinati prikazan je titar virusa (zeleni kružići). Za svaku koncentraciju prikazana je srednja vrijednost $\pm$ SD ($n=3$).

U tablici 17 prikazane su izračunate IC50 vrijednosti za ispitivane kombinacije virusne varijante, stanične linije i nukleozdinog analoga.

Tablica 17. Vrijednosti 50% inhibitorne doze (IC50) za ribavirin (RBV), 5-fluorouracil (5-FU) i 5-azacitidin (5-AZC) dobivene za različite kombinacije virusa i stanica.

	Virusna varijanta	Stanična linija	IC50 (μM)
RBV	MuVi-C	Vero	46,2
	ZgA/Cro69	A549	15,75
	MuVi-C	LLC-MK2	5,33
5-FU	MuVi-C	Vero	34,65
	ZgA/Cro69	A549	34,65
	MuVi-C	LLC-MK2	30,13
5-AZC	MuVi-C	Vero	0,52
	ZgA/Cro69	A549	5,33

4.5 Uzastupno kultiviranje virusa zaušnjaka u prisustvu nukleozidnih analoga

Na temelju rezultata utjecaja nukleozidnih analoga na stanice, replikacije virusnog soja na staničnoj liniji te utjecaja različitih doza nukleozidnog analoga na virus, za uzastupno kultiviranje virusa u prisustvu nukleozidnog analoga odabrane su kombinacije navedene u tablici 18. Cilj je uzastupnog kultiviranja ispitati je li moguće populaciju virusa zaušnjaka dovesti do ekstinkcije odnosno hoće li se ovim postupkom ispoljiti virusna varijanta rezistentna na korišteni nukleozidni analog.

Tablica 18. Kombinacije staničnih linija, virusnih varijanti i nukleozidnih analoga koje su korištene za uzastupno kultiviranje. RBV = ribavirin, 5-FU = 5-flurouracil, 5-AZC = 5-azacitidin.

nukleozidni analog	stanična linija	virusna varijanta	koncentracija nuk. analoga (μM)	MOI
RBV	A549	ZgA/Cro69	62,5	0,01
	Vero	MuVi-C	125; 250; 500	0,001
5-FU	Vero	MuVi-C	125; 250	0,001
5-AZC	Vero	MuVi-C	4; 2	0,001

U tablici 19 navedene su skraćenice za uzorke koje će se koristiti u opisu daljnjih rezultata istraživanja. Kontrolni virus za svaki od navedenih tretiranih virusa označava virus koji je prošao jednaki broj pasaža na istoj staničnoj liniji u istim uvjetima, ali bez prisustva nukleozidnog analoga.

Tablica 19. Koncentraciju (μM) nukleozidnog analoga kojom je pojedini uzorak tretiran naznačena je kod svakog uzorka prvim brojem, dok oznaka R, F ili A označava o kojem se nukleozidnom analogu radi (R = ribavirin, F = 5-fluorouracil, A = 5-azacitidin). Oznaka p je skraćenica za pasaž te će se u daljnjem tekstu nakon nje nalaziti broj pasaža uzorka o kojem je riječ. Kon = kontrolni virus.

ZgA/Cro69 kultiviran na staničnoj liniji A549 u prisustvu ribavirina

koncentracija RBV	pokus 1
62,5 μM	62,5_R_p
$\emptyset$	Kon_R_p

MuVi-C kultiviran na staničnoj liniji Vero u prisustvu ribavirina

koncentracija RBV-a	pokus 1	pokus 2	pokus 3
500 μM		500_R2_p	500_R3_p
250 μM	250_R1_p	250_R2_p	250_R3_p
125 μM	125_R1_p	125_R2_p	125_R3_p
$\emptyset$	Kon_R1_p	Kon_R2_p	Kon_R3_p

MuVi-C kuliviran na staničnoj liniji Vero u prisustvu 5-fluorouracila

koncentracija 5-FU-a	pokus 1	pokus 2
200 μM	200_F1_p	200_F2_p
100 μM	100_F1_p	100_F2_p
$\emptyset$	Kon_F1_p	Kon_F2_p

MuVi-C kultiviran na staničnoj linij Vero u prisustvu 5-azacitidina

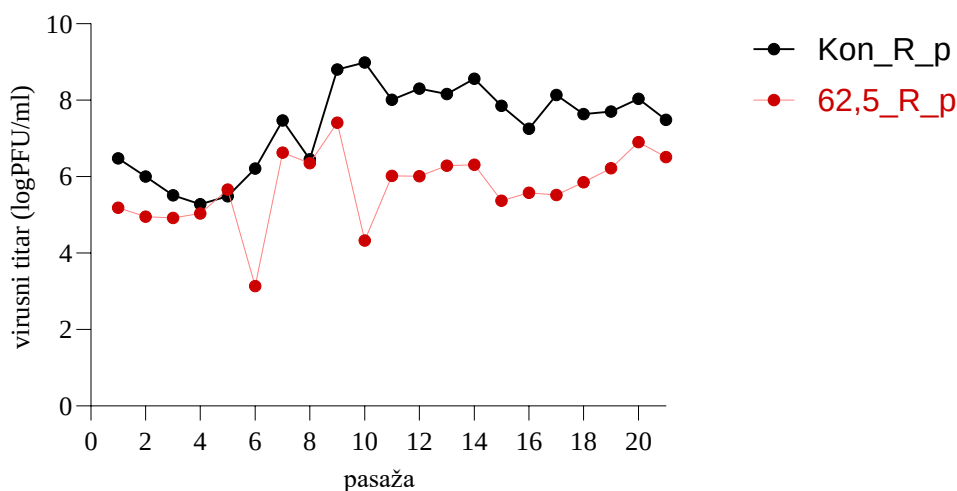
koncentracija 5-AZC-a	pokus 1	pokus 2
4 μM	4_A1_p	4_A2_p
2 μM	2_A1_p	2_A2_p
$\emptyset$	Kon_A1_p	Kon_A2_p

4.5.1 Uzastupno kultiviranje virusa zaušnjaka u prisustvu ribavirina

Za uzastupno kultiviranje virusa zaušnjaka u prisustvu RBV-a odabrane su dvije kombinacije virusnih varijanti i staničnih linija (tablica 18).

Virusna varijanta ZgA/Cro69 kultiviran je na staničnoj liniji A549 pri MOI 0,01 uz dodatak RBV-a u koncentraciji 62,5 μM . Ova koncentracija uzrokuje inicijalno smanjenje virusnog titra za 1,2 logPFU/ml (20b). Tijekom 21 pasaža praćen je virusni titar tretiranog virusa i kontrolnog

virusa (slika 25). Titar kontrolnog i tretiranog virusa izjednačili su se u pasažu 5 i pasažu 8, no ovaj trend se nije zadržao u narednim pasažima; u svim pasažima, osim u navedenim, titar kontrolnog virusa je viši od titra tretiranog virusa (između 0,8 logPFU/ml i 4,7 logPFU/ml ovisno o pasažu) (slika 25).



Slika 25. Titar virusne varijante ZgA/Cro69 tijekom uzastupnog kultiviranja na staničnoj liniji A549 u prisustvu ribavirina u koncentraciji od 62,5 μ M. Crnom bojom označene su vrijednosti titra kontrolnog, netretiranog virusa, a crvenom bojom vrijednosti ribavirinom tretiranog virusa kroz 21 pasažu.

Virusna varijanta MuVi-C na staničnoj liniji Vero tretirana je RBV-om u koncentraciji 125 μ M, 250 μ M i 500 μ M pri MOI 0,001 kroz 8 pasaža (slika 26). Za koncentracije 125 μ M i 250 μ M napravljena su tri, a za koncentraciju 500 μ M napravljena su dva neovisna pokusa.

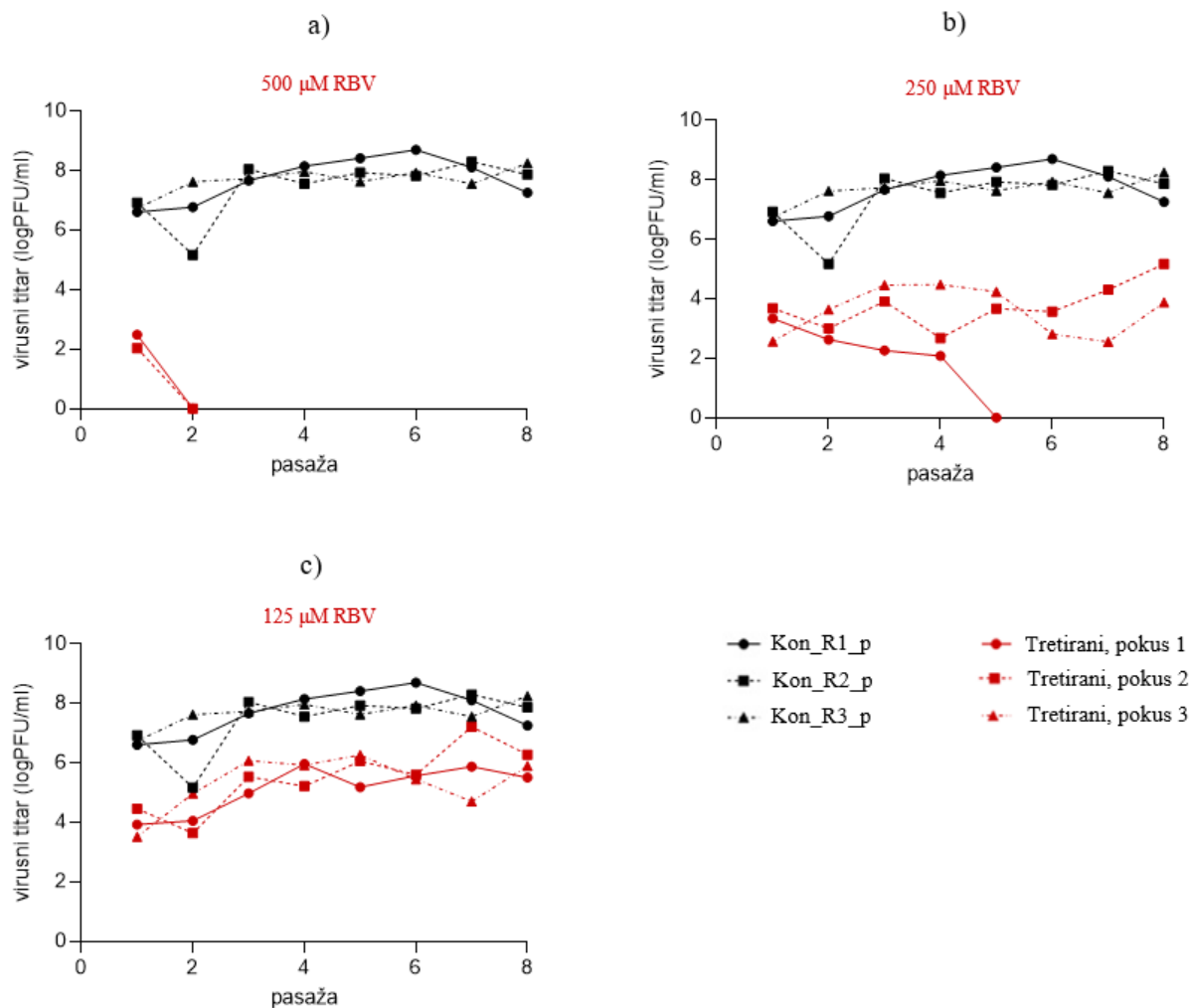
Primjena RBV-a u koncentraciji od 500 μ M u oba pokusa dovodi do inicijalnog pada u titru (razlika od 4,12 logPFU/ml, odnosno od 4,89 logPFU/ml). U oba pokusa titar tretiranog virusa već u pasažu 2 pada ispod granice osjetljivosti testa (slika 26a). Taj virus, tj. takav supernatant sa stanične kulture dodatno je kultiviran u mediju bez nukleozidnog analoga kako bi se utvrdilo je li uistinu došlo do potpune ekstinkcije virusa. U narednih 5 pasaža titar ovako kultiviranog virusa nastavio je biti ispod granice osjetljivosti testa (slika 26a).

Primjena RBV-a u koncentraciji od 250 μ M u sva tri pokusa dovodi do inicijalnog pada u titru (razlika od 3,27 logPFU/ml, odnosno od 3,25 logPFU/ml te 4,18 logPFU/ml) (slika 26b). U

prvom pokusu dolazi do pada virusnog titra ispod osjetljivosti testa u pasažu 5 (slika 26b). Supernatant stanične kulture u kojem nije detektiran titar, dodatno je kultiviran u mediju bez nukleozidnog analoga kroz 5 pasaža. Virusni titar ostao je ispod granice osjetljivosti. U preostala dva pokusa u kojima je virusna varijanta MuVi-C tretirana RBV-om u koncentraciji 250 μ M nije došlo do pada titra virusa ispod granice detekcije testa (slika 26b). U tim slučajevima nakon inicijalnog pada u titru u odnosu na kontrolu u narednim pasažima virusni titar naizmjenice raste i pada ne dosežući visinu kontrolnog titra.

U slučaju tretiranja MuVi-C RBV-om u koncentraciji 125 μ M, nakon inicijalnog pada titra u odnosu na kontrolu (u prvom pokusu razlika iznosi 2,68 logPFU/ml, u drugom 2,47 logPFU/ml, a u trećem 3,22 logPFU/ml), titar u sva tri pokusa raste kroz narednih 8 pasaža u usporedbi sa vrijednošću u prvom pasažu, ali ne doseže vrijednost kontrolnog titra (slika 26c).

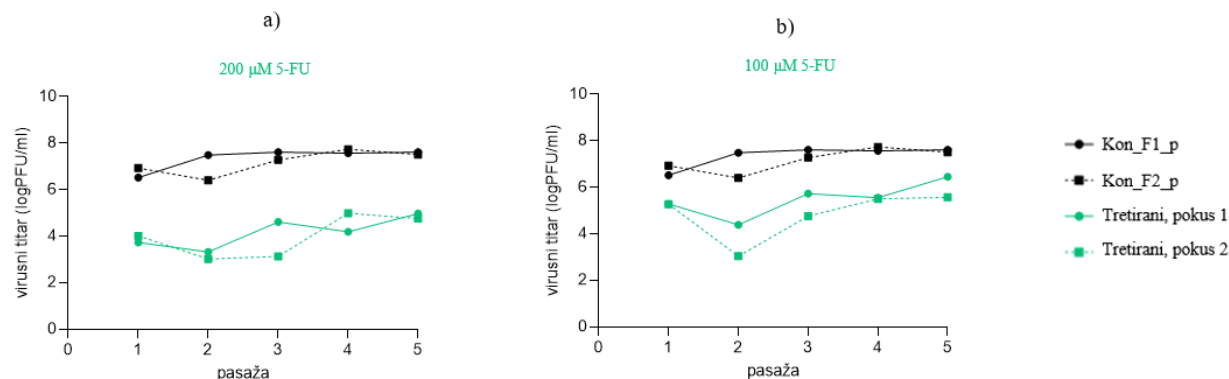
Ovisno o primjenjenoj koncentraciji RBV-a, kultiviranje MuVi-C dovelo je do nedetektabilnog titra (500 μ M), rasta titra tretiranog virusa nakon inicijalnog pada (125 μ M) te do velikog pada u titru (250 μ M) nakon kojeg je titar tretiranog virusa postao nedetektabilan ili je tretirani virus detektiran i u narednim pasažima uz nestalan titar ovisno o pasažu (slika 26).



Slika 26. Titar virusne varijante MuVi-C tijekom uzastupnog kultiviranja na staničnoj liniji Vero u prisustvu ribavirina u koncentraciji (a) 500 µM, (b) 250 µM i (c) 125 µM.

4.5.2 Uzastupno kultiviranje virusa zaušnjaka u prisustvu 5-fluororacila

Virusna varijanta MuVi-C tretirana je 5-FU-om u koncentracijama 100 µM i 200 µM na staničnoj liniji Vero kroz 5 pasaža. Napravljena su dva neovisna pokusa.

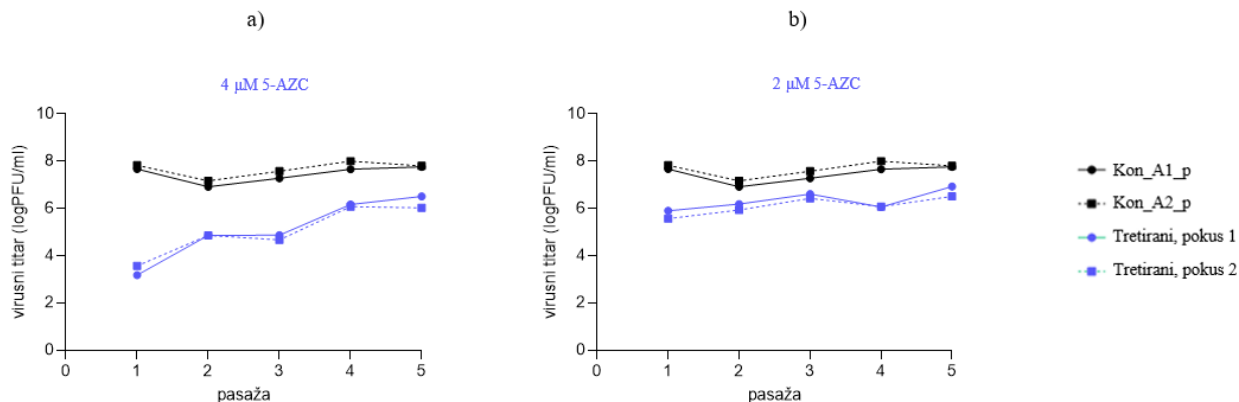


Slika 27. Titar virusne varijante MuVi-C tijekom uzastupnog kultiviranja na staničnoj liniji Vero u prisustvu 5-fluorouracila u koncentraciji (a) 200 µM ili (b) 100 µM.

Tretman virusa 5-FU-om u svim ispitanim slučajevima doveo je do inicijalnog pada u titru (smanjenje od 1,23 logPFU/ml za 100_F1_p1 i 1,65 za 100_F2_p1 te smanjenje od 2,79 logPFU/ml za 200_F1_p1 i 2,92 logPFU/ml za 200_F2_p1). I u slučaju koncentracije 5-FU-a od 100 µM i one od 200 µM, titar tretiranog virusa kroz svih 5 pasaža ostao je niži od titra kontrolnog, netretiranog virusa. Titar tretiranih virusa ne pokazuje kontinuiran rast iz pasaža u pasaž nakon prvotnog pada, osim u slučaju virusa tretiranog koncentracijom 5-FU-a od 100 µM u pokusu 2 (slika 27b).

4.5.3 Uzastupno kultiviranje virusa zaušnjaka u prisustvu 5-azacitidina

Virusna varijanta MuVi-C tretirana je 5-AZC-om u koncentracijama 4 µM i 2 µM na staničnoj liniji Vero kroz 5 pasaža. Napravljena su dva neovisna pokusa. U slučaju tretiranja virusa koncentracijom 5-AZC-a od 4 µM, u prvom je pasažu zabilježen pad titra za 4,49 log PFU/ml odnosno 4,26 log PFU/ml, ovisno o pokusu (slika 28a). U narednim pasažima titar postepeno raste te u petom pasažu razlika između kontrolnog i tretiranog virusa iznosi 1,25 odnosno 1,77 log PFU/ml. U slučaju tretmana virusa 5-AZC-om u koncentraciji od 2 µM (slika 28b), u prvom pasažu razlika između kontrolnog i tretiranog virusa iznosi 1,77 odnosno 2,36 log PFU/ml, dok ta vrijednost u petom pasažu iznosi 0,83 ili 1,29 log PFU/ml. U slučaju tretmana virusa koncentracijom od 2 µM rast titra kroz pasaže nije jasno vidljiv kao u slučaju korištenja koncentracije od 4 µM (slika 28).



Slika 28. Uzastopno kultiviranje virusne varijante MuVi-C na staničnoj liniji Vero u prisustvu 5-azacitidina u koncentraciji (a) 4 µM i (b) 2 µM.

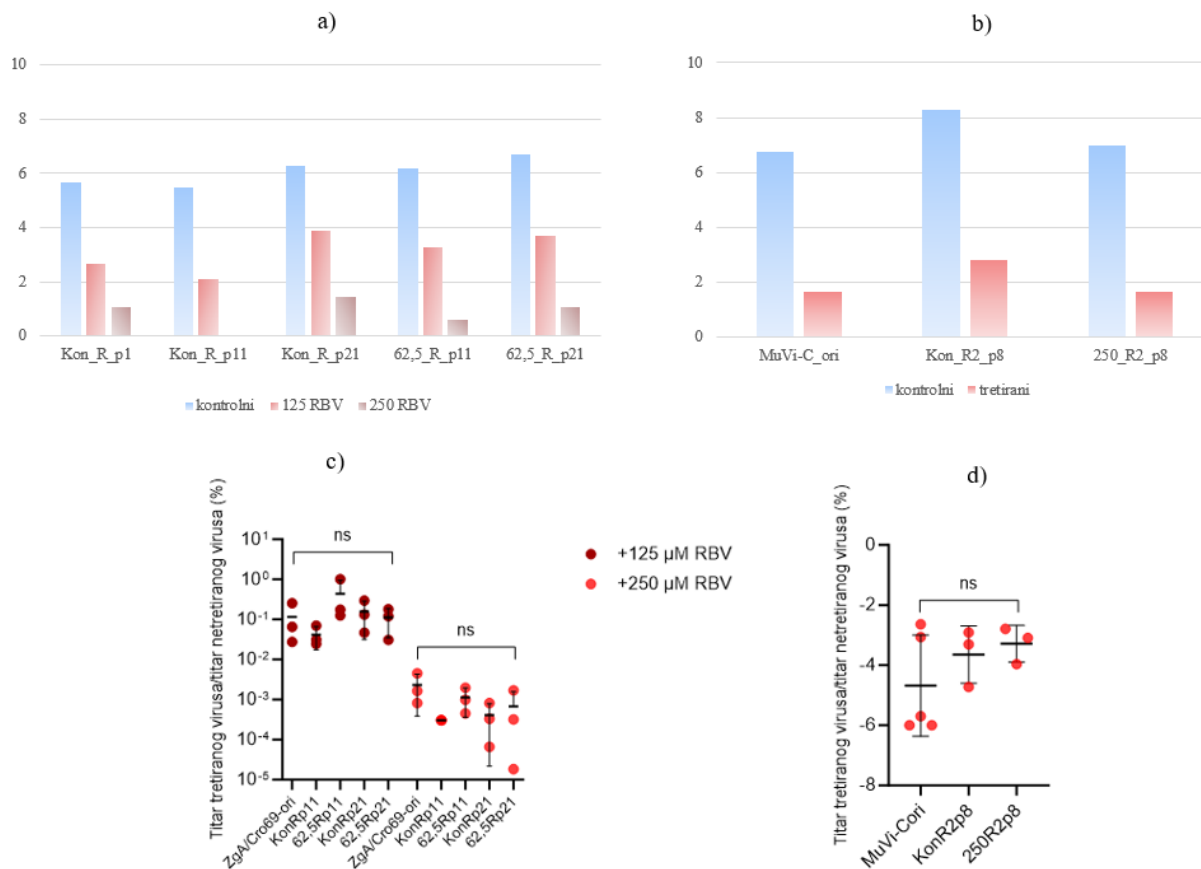
4.6 Ispitivanje rezistentnosti virusa zaušnjaka uzastopno kultiviranih u prisustvu nukleozidnih analoga

Mogućnost razvoja rezistentnosti virusa zaušnjaka na nukleozidne analoge nakon uzastopnih pasaža u staničnoj kulturi određena je usporedbom rezidualne infektivnosti koju postiže tretirani u odnosu na kontrolni i ishodišni virus u prisustvu nukleozidnog analoga. Očekuje se da bi razvoj rezistentnosti trebao rezultirati istim replikativnim kapacitetom tretiranog i kontrolnog ili ishodišnog virusa. Rezistentnost je ispitivana u zadnjem pasažu za svaki virus. U slučaju postojanja neovisnih pokusa odabrani su uzorci iz jednog pokusa osim u slučaju virusa tretiranih s 5-AZC-om.

4.6.1 Rezistentnost virusa kultiviranih u prisustvu ribavirina

U slučaju virusne varijante ZgA/Cro69 nema statistički značajne razlike u rezistentnosti na RBV između ZgA/Cro69_ori, kontrolnih i virusa kultiviranih s RBV-om u koncentraciji 62,5 µM iz pasaža 11 i 21 (slika 29c).

Jednako tako, u slučaju virusne varijante MuVi-C nema statistički značajne razlike u rezistentnosti na RBV između MuVi-C_ori, Kon_R2_p8 i 250_R2_p8 (slika 29d).

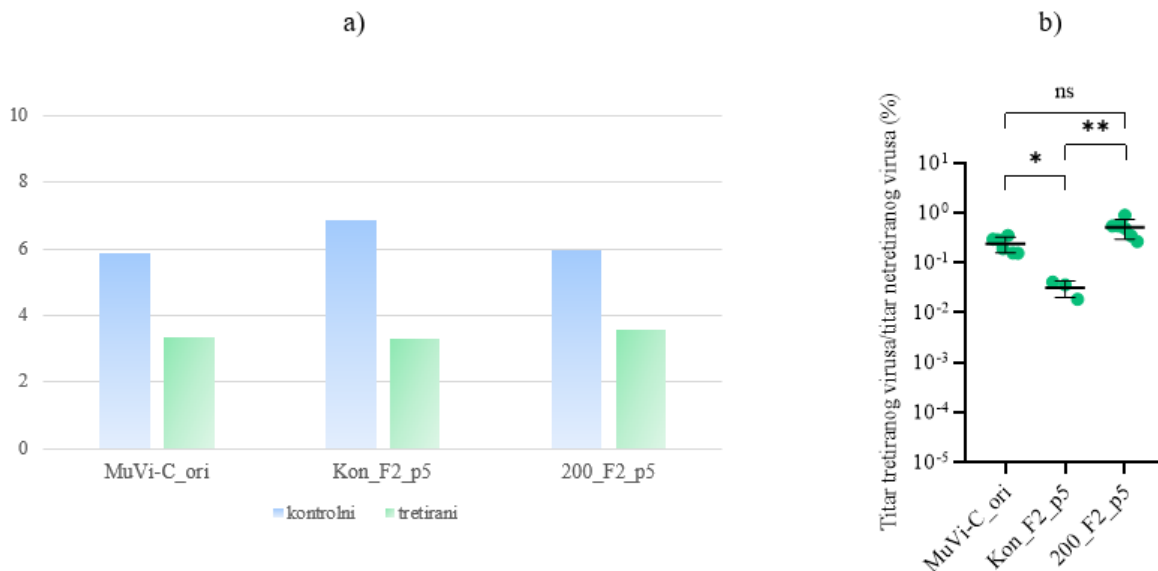


Slika 29. Rezistentnost uzastopno kultiviranih virusa na ribavirin. (a) i (c) stanična linija A549 tretirana je 125 i 250 μ M ribavirinom ili običnim medijem (kontrola), inficirana (MOI 0,01) originalnim virusom (ZgA/Cro69_ori) te kontrolnim (Kon_R_p11 i Kon_R_p21) ili tretiranim virusima iz 11. i 21. pasaža (62,5_R_p11 i 62,5_R_p21) i inkubirana u mediju korištenom za predtretman iduća 4 dana. (b) i (d) stanična linija Vero tretirana je 250 μ M ribavirinom ili običnim medijem (kontrola) te inficirana (MOI 0,001) originalnim virusom (MuVi-C ori) te kontrolnim i tretiranim virusima iz 8. pasaža (Kon_R2_p8 i 250_R2_p8) i inkubirana u mediju korištenom za predtretman iduća 3 dana. (a) i (b) Titar virusa u supernatantima određen testom plakiranja. (c) i (d) Za svaki virus, titar tretiranog i titar netretiranog virusa stavljen je u omjer i izražen kao postotak. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD ($n=3-5$). Vrijednosti među grupama uspoređene su pomoću testa *one-way* ANOVA te Tukey post hoc testa.

4.6.2 Rezistentnost virusa kultiviranih u prisustvu 5-fluorouracila

Virus 200_F2_p5 nema statistički značajno različitu rezistentnost na 5-FU u koncentraciji 200 μ M u odnosu na ishodišni uzorak. Statistički veća rezistentnost prisutna je između 200_F2_p5,

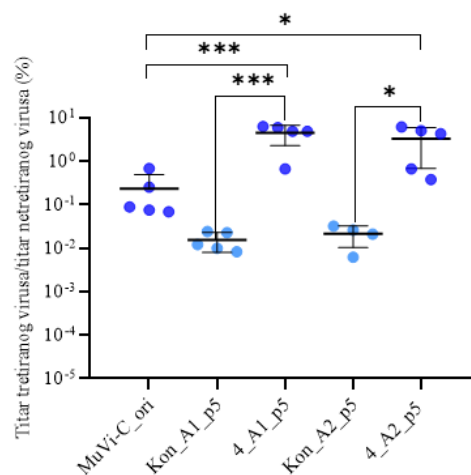
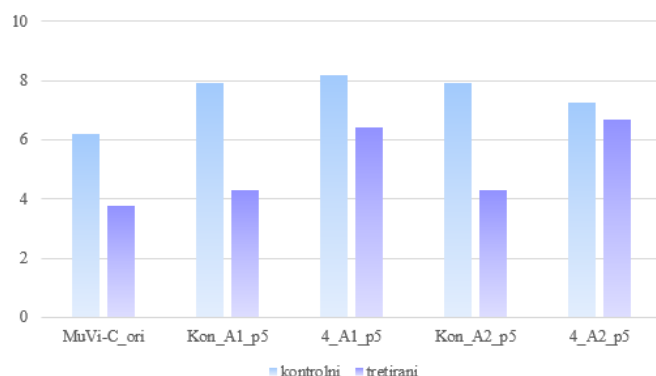
i njegove kontrole, no ta kontrola pokazuje statistički značajno manju rezistentnost na 5-FU od ishodišnog virusa (slika 30).



Slika 30. Rezistentnost uzastopno kultiviranih virusa na 5-fluorouracil. Stanična linija Vero tretirana je 200 μ M 5-fluorouracilom ili običnim medijem (kontrola) te inficirana originalnim virusom (MuVi-C-ori), kontrolnim (Kon_F2_p5) ili 200_F2_p5 (MOI 0,001) i inkubirana u mediju korištenom za predtretman kroz 3 dana. (a) Titar virusa u supernatantima je određen testom plakiranja. (b) Za svaki virus, titar tretiranog i titar netretiranog virusa stavljen je u omjer i izražen kao postotak. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (n=3-5). Vrijednosti među grupama uspoređene su pomoću testa *one-way* ANOVA te Tukey post hoc testa.

4.6.3 Rezistentnost virusa kultiviranih u prisustvu 5-azacitidina

Rezistentnost na 5-AZC ispitana je za viruse kultivirane uz 4 μ M 5-AZC kroz 5 pasaža (4_A1_p5, 4_A2_p5), njihove kontrole te za ishodišni virus. Tretirani virusi iz oba pokusa (4_A1_p5 i 4_A2_p5) pokazali su statističku značajno veću rezistentnost na 5-AZC u koncentraciji 4 μ M u odnosu na ishodišni virus (MuVi-C ori) te u odnosu na svoje kontrole (Kon_A1_p5 i Kon_A2_p5) (slika 31).



Slika 31. Rezistentnost uzastopno kultiviranih virusa na 5-azacitidin. Stanična linija Vero tretirana je 3,9 μ M 5-azacitidinom ili običnim medijem (kontrola) te inficirana originalnim virusom (MuVi-C_ori), kontrolnim (Kon_A1_p5 i Kon_A2_p5) te tretiranim (4_A1_p5 i 4_A2_p5) virusima iz 5. pasaža na istim stanicama (MOI 0,001) i inkubirana u mediju korištenom za predtretman iduća 3 dana. (a) Titar virusa u supernatantima je određen testom plakiranja. (b) Za svaki virus, titar tretiranog i titar netretiranog virusa stavljen je u omjer i izražen kao postotak. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (n=3-5). Vrijednosti među grupama uspoređene su pomoću testa *one-way* ANOVA te Tukey post hoc testa.

4.7 Genska karakterizacija virusa zaušnjaka uzastopno kultiviranih u prisustvu nukleozidnih analoga

Odabrani uzorci su sekvencirani metodom NGS (tablica 20). Kriteriji odabira uzoraka za sekvenciranje navedene su u podpoglavljima ove cjeline. Ovaj postupak omogućuju dubinsku karakterizaciju genoma virusa tj. određivanje heterogenosti svake sekvencirane virusne populacije i zastupljenosti pojedinih nukleotidnih promjena. Promjene u rezultatima su navedene kao promjene u cDNA u koju je virusna RNA prepisana kako bi mogla biti sekvencirana. Navedene promjene time su komplementarne promjenama u virusnoj RNA.

Tablica 20. Popis uzoraka za gensku karakterizaciju metodom sekvenciranja nove generacije.

ZgA/Cro69_ori

MuVi-C_ori

ZgA/Cro69 tretiran RBV-om:

Kon_R_p8	62,5_R_p8
Kon_Rp14	62,5_R_p14
Kon_R_p17	62,5_R_p17
Kon_R_p21	62,5_R_p21

MuVi-C tretiran RBV-om:

Kon_R2_p1	250_R2_p1
Kon_R2_p8	250_R2_p8

Kon_R3_p1	250_R3_p1
Kon_R3_p8	250_R3_p8

500_R3_p1

MuVi-C tretiran 5-FU-om:

Kon_F1_p1	200_F1_p1
Kon_F1_p5	200_F1_p5

Kon_F2_p5	200_F2_p5
-----------	-----------

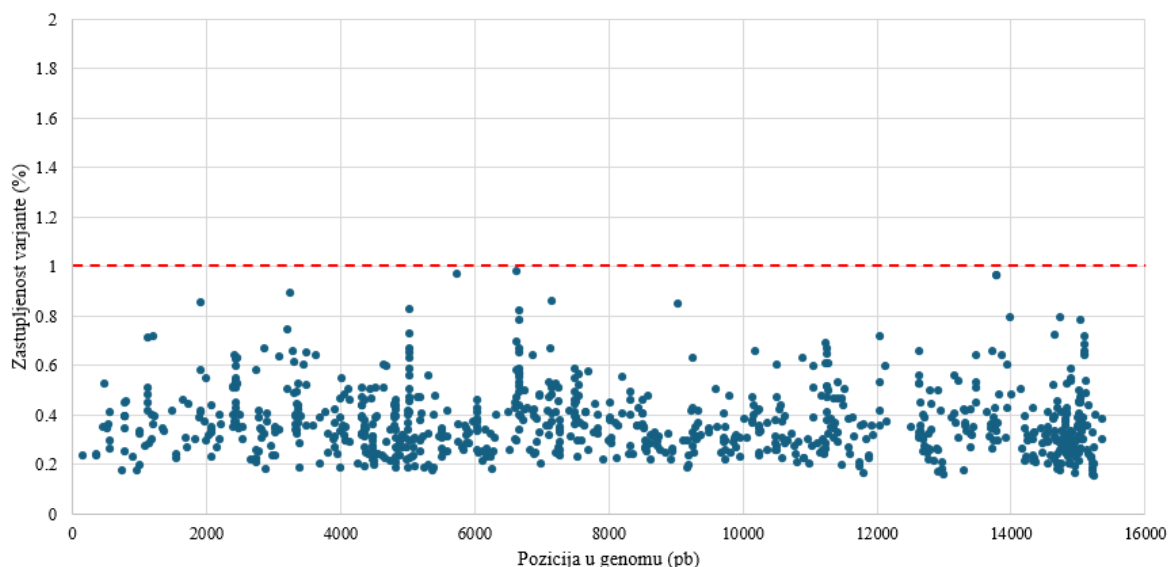
MuVi-C tretiran 5-AZC-om:

Kon_A1_p1	4_A1_p1
Kon_A1_p5	4_A1_p5

Kon_F2_p5	4_A2_p5
-----------	---------

4.7.1 Određivanje greške polimeraze i metode sekvenciranja nove generacije

Analiza triplikata sekvenciranog plazmida i virusnih genoma umnoženih s plazmida pokazala je da najveća frekvencija krivog sparivanja (eng. *mismatch frequency*) (određena prema metodi koju su opisali Orton i sur. (105)) otkrivenih na jednoj poziciji u genomu iznosi 0,99% (slika 32). Na temelju ovog rezultata, postavljen je prag varijabilnosti metode za uzorke virusa na 1% što znači da će se u analizi rezultata sekvenciranja virusnih uzoraka odbacivati varijante zastupljene manje od 1% u virusnoj populaciji (svi rezultati za sekvencirane uzorke odnose se na promjene zastupljene u postotku većem od 1% te se ovaj podatak u daljnjim opisima rezultata neće dodatno naglašavati).

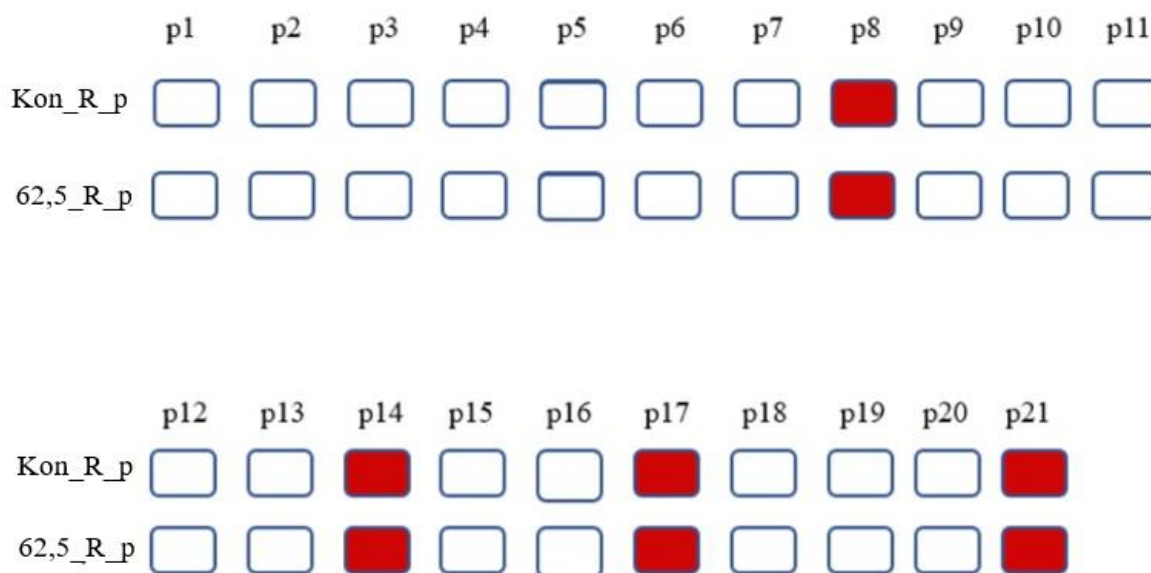


Slika 32. Zastupljenost potencijalno krivo pročitanih baza na pojedinim pozicijama za triplikate sekvenciranog plazmida i virusnih genoma. Crveno isprekidanom linijom naznačen je 1% zastupljenosti.

4.7.2 Genska karakterizacija virusa zaušnjaka uzastopno kultiviranih u prisustvu ribavirina

Analiza sekvenciranih uzoraka virusne varijante ZgA/Cro69 tretiranih ribavirinom

U svrhu molekularne karakterizacije virusne varijante ZgA/Cro69 uzastopno kultivirane na staničnoj liniji A549 uz dodatak 62,5 μ M RBV-a sekvenciran je ZgA/Cro69_ori te kontrolni i tretirani uzorci iz pasaža 8, 14, 17 i 21 (slika 33). Pasaž 8 je odabran jer se u njemu izjednačavaju titar kontrolnog i tretiranog virusa, a ostala tri kako bi se potencijalno mogao odrediti trend koji prati virusna populacija ukoliko takav postoji.



Slika 33. Virusna varijanta ZgA/Cro69 kultivirana na staničnoj liniji A549 u prisustvu 62,5 μ M ribavirina. Crvenom bojom označeni su uzorci odabrani za gensku karakterizaciju pomoću metode sekvenciranja nove generacije. p = pasaž.

Ukupna raznolikost i Shannonova entropija su veće kod uzoraka tretiranih RBV-om u usporedbi s kontrolnim te ZgA/Cro69_ori (tablica 21). Ova razlika iznosi 1,86 do 4,38 puta za ukupnu raznolikost i 1,76 do 4,55 puta za Shannonovu entropiju kada se uspoređuju tretirani uzorci s kontrolom iz istog pasaža. Kon_R_p17 i Kon_R_p21 imaju gotovo jednake vrijednosti kao i ZgA/Cro69_ori za obje mjere raznolikosti. Ukupna raznolikost i Shannonova entropija tretiranih uzoraka pokazuju rastući trend od pasaža 8 do pasaža 17, dok su vrijednosti za 62,5_R_p21 usporedive s vrijednostima 62,5_R_p17.

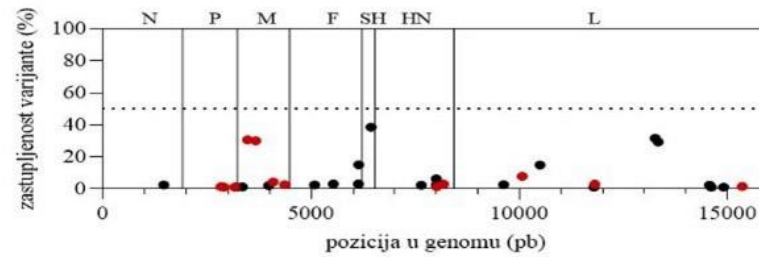
Tablica 21. Ukupna raznolikost i Shannonova entropija virusnih populacija te postotak promjena koje ribavirin (RBV) specifično uvodi u genome virusne varijante ZgA/Cro69 tretirane ribavirinom i odgovarajućih kontrola.

Virusni uzorak	Ukupna raznolikost ($\times 10^{-4}$)	Shannonova entropija ($\times 10^{-4}$)	Postotak promjena u genomu specifičnih za RBV* (%)
ZgA/Cro69_ori	2,6	2,0	36
Kon_R_p8	3,5	2,9	34
Kon_R_p14	2,9	2,5	32
Kon_R_p17	2,6	2,1	36
Kon_R_p21	2,4	2,0	39
62,5_R_p8	6,5	5,1	82
62,5_R_p14	7,8	6,5	80
62,5_R_p17	10,5	9,4	89
62,5_R_p21	10,5	9,1	88

*C→T, G→A

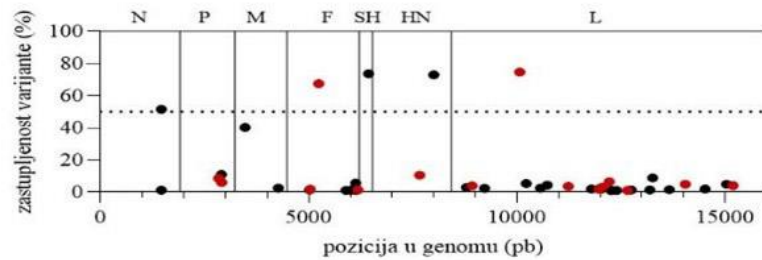
Broj varijabilnih pozicija u genomu veći je kod tretiranih uzoraka (slika 34). Također, postotak promjena C→T i G→A (promjene koje RBV u teoriji unosi u genom) značajno je veći u tretiranim, nego u kontrolnim uzorcima (promjene C→T i G→A analizirane zajedno naspram svih ostalih promjena u uzorku) (pasaž 8: $\chi^2(1, 99) = 23,32$, $p < 0000,1$; pasaž 14: $\chi^2(1, 165) = 38,65$, $p < 00001$; pasaž 17: $\chi^2(1, 202) = 44,01$, $p < 0,00001$; pasaž 21: $\chi^2(1, 183) = 36,97$, $p < 0000,1$) (slika 33, tablica 21) iako ove dvije promjene, uz T→C i A→G, imaju veću učestalost i u samom ZgA/Cro69_ori i kontrolnim uzorcima u usporedbi s ostalim nukleotidnim promjenama (slika 35).

Ishodišni virus

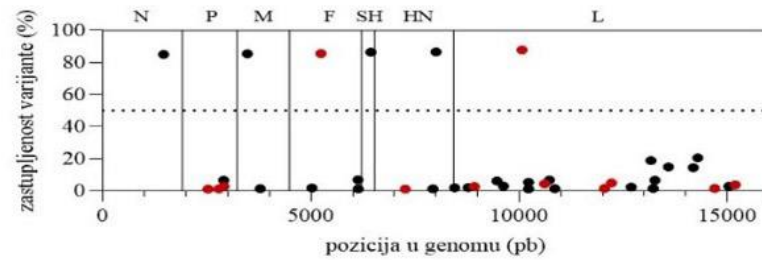


Kontrolni virusi

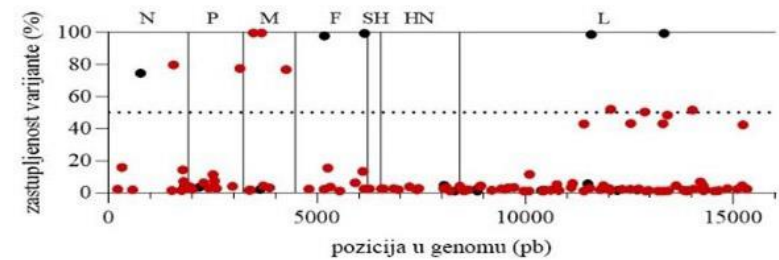
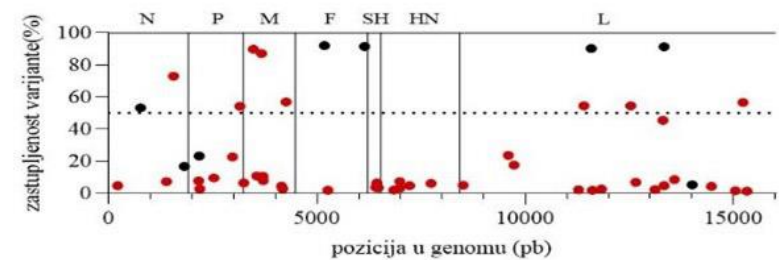
pasaž 8



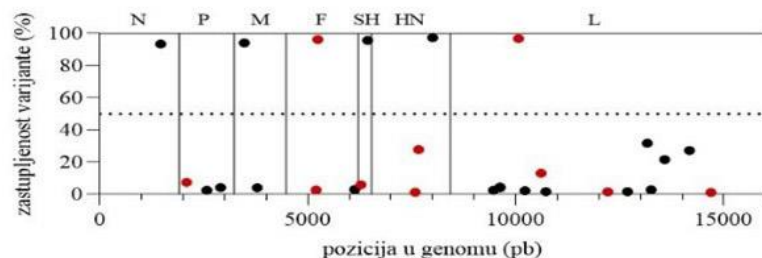
pasaž 14



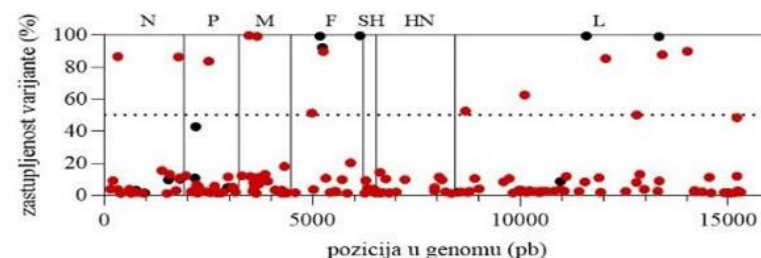
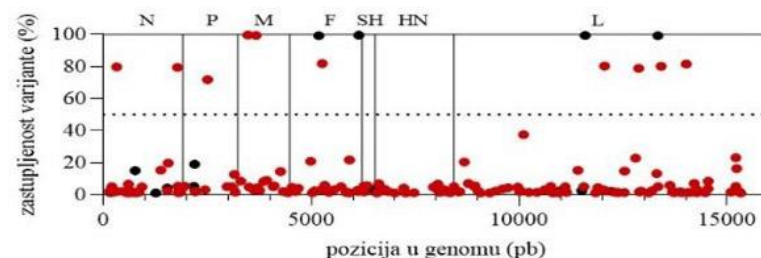
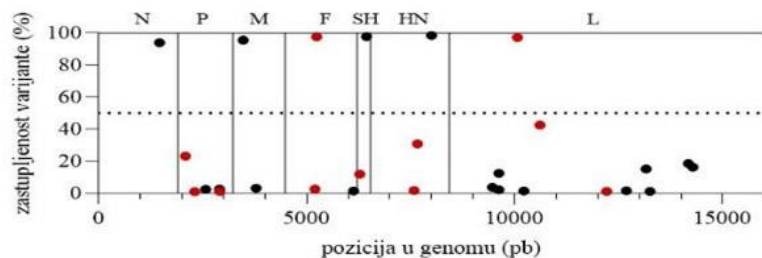
Tretirani virusi (62,5 μ M RBV)



pasaž 17

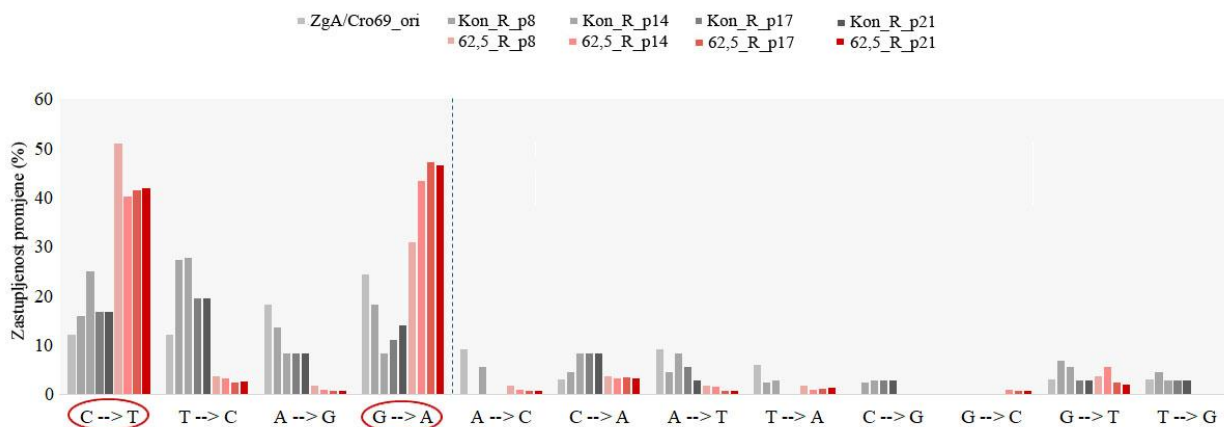


pasaž 21



Slika 34. Genska heterogenost virusne varijante ZgA/Cro69 – ZgA/Cro69_ori te kontrolnih i ribavirinom tretiranih uzoraka pasaža 8, 14, 17 i 21. Na apscisi su prikazane pozicije u genomu izražene u parovima baza, a na ordinati postotak zastupljenosti nukleotidne varijante (u odnosu na konsenzus ZgA/Cro69_ori) na određenoj poziciji. Crvenom bojom označene su promjene koje odgovaraju promjenama specifičnim za ribavirin (C→T, G→A). Označeni su dijelovi genoma ovisno o genskoj regiji kojoj pripadaju (N, P, M, F, SH, HN, L). Isprekinutom linijom naznačena je zastupljenost od 50% (varijante zastupljene iznad 50% postaju promjene konsenzusa za dane pozicije).

U ZgA/Cro69_ori i kontrolnim uzorcima najviše su zastupljene tranzicijske promjene ($C \rightarrow T$, $T \rightarrow C$, $A \rightarrow G$, $G \rightarrow A$) (ukupno zastupljene između 66% i 75% u uzorku ovisno o pasažu), a promjena $G \rightarrow C$ nije prisutna ni u ZgA/Cro69, niti u jednom kontrolnom uzorku (slika 35).



Slika 35. Zastupljenost različitih nukleotidnih promjena u uzorcima virusne varijante ZgA/Cro69 kultiviranih na staničnoj liniji A549 u prisustvu ribavirina te u ZgA/Cro69_ori i kontrolnim virusima. Crveno su zaokružene promjene specifične za ribavirin ($C \rightarrow T$, $G \rightarrow A$). Lijevo od plave isprekidane linije su tranzicije, desno su transverzije.

Tijekom uzastopnog kultiviranja virusa, u kontrolnim i u tretiranim uzorcima došlo je do promjena u odnosu na konsenzus sekvenciju uzorka ZgA/Cro69_ori, međutim te promjene nisu međusobno podudarne (tablice 22 i 23).

Kon_R_p8 ima 5 promjena u odnosu na konsenzus sekvenciju ZgA/Cro69_ori. Uzorci Kon_R_p14, Kon_R_p17, Kon_R_p21 sadrže te iste promjene uz dodatnu promjenu 3472 $C \rightarrow G$ (tablica 22), koja je kod Kon_R_p8 prisutna u postotku od 40%. Svih šest promjena konsenzusa u kontrolnim uzorcima smješteno je u kodirajućem dijelu genoma, pet ih dovodi do promjene aminokiseline, a jedna promjena je sinonimna. Od 6 promjena konsenzus sekvencije kontrolnih uzoraka dvije uopće nisu prisutne kao varijante u ZgA/Cro69_ori (3472 $C \rightarrow G$, 5240 $C \rightarrow T$), tri su zastupljene ispod 10% (1460 $T \rightarrow C$, 8005 $C \rightarrow A$, 10068 $C \rightarrow T$), a jedna (6438 $T \rightarrow C$) je zastupljena 39%.

Tablica 22. Promjene konsenzusa prisutne u Kon_R_p8, Kon_R_p14, Kon_R_p17 i Kon_R_p21. Zvezdicom (*) je naznačena promjena koja nije promjena konsenzusa u Kon_R_p8, ali je prisutna u visokom postotku (40%).

pozicija u genomu	promjena nukleotida	promjena aminokiseline	gen
1460	T→C	Ser→Pro	N
3472*	C→G	Thr→Arg	M
5240	C→T	Thr→Met	F
6438	T→C	Leu (sin.)	SH
8005	C→A	Asn→Lys	HN
10068	C→T	Pro→Leu	L

U RBV-om tretiranim uzorcima postoji 6 promjena konsenzusa koje su prisutne u svim analiziranim pasažima (tablica 23). Sveukupan broj promjena konsenzusa iznosi 14 za 62,5_R_p8 i 62,5_R_p17, 13 za 62,5_R_p14 te 17 za 62,5_R_p21. Promjene konsenzusa prisutne u pasažu 21 prikazane su u tablici 23. Četiri od njih prisutne su kao varijante u ZgA/Cro69: promjena na poziciji 3474 C→T (31%), 3670 C→T (30%), 6138 T→A (15%) te 13332 A→T (29%).

Tablica 23. Promjene konsenzusa prisutne u 62,5_R_p21. Sivom bojom označene su promjene koje ribavirin specifično unosi u genom (C→T, G→A). Podebljano su naznačene promjene koje su prisutne i u uzorcima 62,5_R_p8, 62,5_R_p14 i 62,5_R_p17. Zvezdicom (*) su naznačene promjene konsenzusa koje nisu zabilježene kao promjene konsenzusa u ostalim pasažima. Kratica sin. označava sinonimnu promjenu aminokiseline.

pozicija u genomu	promjena nukleotida	promjena aminokiseline	gen
315	G→A	Arg→Lys	N
1775	G→A	Val→Met	N
2503	C→T	Ser (sin.)	P
3474	C→T	Pro→Ser	M
3670	C→T	Pro→Leu	M
4981*	G→A	Ala→Thr	F
5178	A→G	Leu (sin.)	F
5261	C→T	Thr→Ile	F
6138	T→A	Ser→Arg	F
8683*	C→T	Ser (sin.)	L
10102*	G→A	Lys (sin.)	L
11584	G→T	Glu→Asp	L
12051	G→A	Gly→Glu	L
12800	G→A	Val→Ile	L
13332	A→T	Thr→Ile	L
13417	G→A	Glu (sin.)	L
14018	G→A	Val→Ile	L

Dakle, analiza rezultata opisanih u ovom poglavlju pokazuju veću heterogenost kod virusnih populacija tretiranih RBV-om u koncentraciji od 62,5 µM u odnosu na kontrolne uzorke, kao i na ZgA/Cro69_ori (tablica 21, slika 34). Obje mjere raznolikosti pokazuju rastući trend od pasaža 8 do 17, dok su ove vrijednosti usporedne za pasaže 17 i 21. Najzastupljenije nukleotidne promjene u tretiranim uzorcima su C→T i G→A (slika 35). Promjene konsenzusa prisutne su i u kontrolnim (6 promjena) i u tretiranim uzorcima (13, 14

ili 17 promjena, ovisno o pasažu). Dok su promjene konsenzusa jednake za sve kontrolne uzorke (osim 3472 C→G u pasažu 8 u kojem je ona zastupljena 40%) (tablica 22), u tretiranim uzorcima manji je postotak zajedničkih promjena konsenzusa (tablica 23).

Analiza sekvenciranih uzoraka virusne varijante MuVi-C tretiranih ribavirinom

U svrhu određivanja učinka RBV-a na genski sastav virusne varijante MuVi-C kultivirane na staničnoj liniji Vero, sekvenciran je MuVi-C_ori (ovaj uzorak jednak je ishodišnom i za tretman istog virusa 5-FU-om kao i 5-AZC-om te je sekvenciran jednom), te 250_R2_p1, 250_R3_p1, 250_R2_p8, 250_R3_p8, 500_R3_p1 i njihove kontrole (slika 36). Kod uzoraka 250_Rp3_p1 i 500_R3_p1 nije bilo moguće umnožiti prvih 79 pb genoma. Kod ostalih uzoraka nije zabilježena nijedna promjena u tom dijelu genoma. Ovi uzorci odabrani su za dubinsko sekvenciranje jer je koncentracija RBV-a od 250 μ M u prvom pokusu dovela do nedetektabilnog titra MuVi-C nakon petog pasaža, a u pokusu 2 i 3 virus opstaje, ali s velikim padovima u titru. Uzorak 500_R3_p1, odabran je jer u sljedećem pasažu virus pokazuje nedetektabilan titar.

Pokus 1								
	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p8
Kon_R1_p	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
125_R1_p	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
250_R1_p	☐	☐	☐	☐	X			
Pokus 2								
	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p8
Kon_R2_p	☒	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☒
125_R2_p	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
250_R2_p	☒	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☒
250_R2_p	☐	X						
Pokus 3								
	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p8
Kon_R3_p	☒	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☒
125_R3_p	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
250_R3_p	☒	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☒
500_R3_p	☒	X						

Slika 36. Virusna varijanta MuVi-C kultivirana na staničnoj liniji Vero s ili bez ribavirinaa. Crvenom bojom označeni su uzorci odabrani za gensku karakterizaciju pomoću metode sekvenciranja nove generacije. U lijevom kutu prikazana je koncentracija ribavirina koja je korištena u kultiviranju virusa kroz pasaže. Simbol X označava da je virusni titar bio ispod granice osjetljivosti testa. p = pasaż.

Vrijednosti ukupne raznolikosti i Shannonove entropije veće su kod uzoraka tretiranih RBV-om u usporedbi s kontrolnim uzorcima te uzorkom MuVi-C_ori (tablica 24). Obje mjere raznolikosti 3 puta su veće za uzorke 250_R2_p8, 250_R3_p1 i 500_R3_p1 u

usporedbi s njihovim kontrolama. Najmanje povećanje mjera raznolikosti zabilježeno je kod uzorka 250_R2_p1 u usporedbi s njegovom kontrolom (tablica 24), dok je kod uzorka 250_R3_p8 ukupna raznolikost 21 put, a Shannonova entropija 14,75 puta veća nego kod Kon_R3_p8.

Vrijednosti obaju mjera međusobno su usporedive kod uzoraka 250_R2_p1 i 250_R2_p8. Kod uzorka 250_R3_p8 ove su vrijednosti veće nego kod uzorka 250_R3_p1, dok su općenito u pokusu 3 vrijednosti obaju mjera raznolikosti su veće od onih u pokusu 2. Za uzorak 500_R3_p1 vrijednosti ukupne raznolikosti i Shannonove entropije usporedive su sa uzorkom 250_R3_p1 (tablica 24).

U kontrolnim uzorcima je u oba pokusa u prvom pasažu došlo do povećanja ukupne raznolikosti i Shannonove entropije u odnosu na ishodišni uzorak. U pasažu 8 obje su ove vrijednosti niže u odnosu na prvi pasaž u oba pokusa.

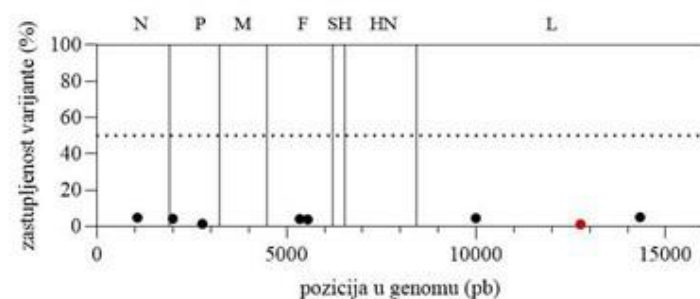
Tablica 24. Ukupna raznolikost i Shannonova entropija virusnih populacija te postotak promjena koje ribavirin (RBV) specifično uvodi u genome virusne varijante MuVi-C tretirane ribavirinom i odgovarajućih kontrola. Radi lakšeg snalaženja uzorci unutar istog pokusa naznačeni su istom pozadinskom bojom redaka.

Virusni uzorak	Ukupna raznolikost ($\times 10^{-4}$)	Shannonova entropija ($\times 10^{-4}$)	Postotak promjena u genomu specifičnih za RBV* (%)
MuVi-C_ori	0,4	0,4	13
Kon_R2_p1	2,1	1,6	18
Kon_R2_p8	0,9	0,9	15
Kon_R3_p1	1,9	1,5	19
Kon_R3_p8	0,4	0,4	12
250_R2_p1	2,5	2,3	55
250_R2_p8	2,9	2,3	73
250_R3_p1	5,7	4,7	66
250_R3_p8	8,4	5,9	67
500_R3_p1	5,9	4,4	65

*C→T, G→A

Na grafičkom prikazu svih varijanti zastupljenih u genomu (slika 37) vidljivo je da je broj varijabilnih pozicija u genomu veći kod uzoraka tretiranih RBV-om u koncentraciji od 250 μ M za oba pokusa u odnosu na kontrolne uzorke i MuVi-C-ori.

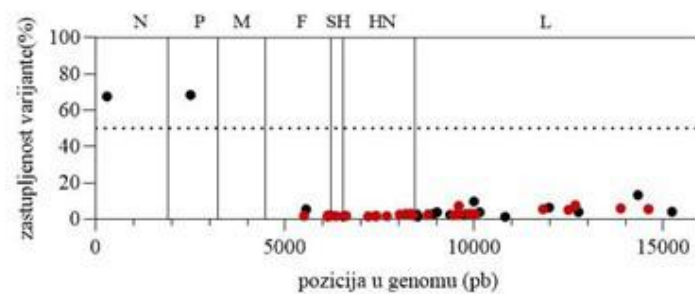
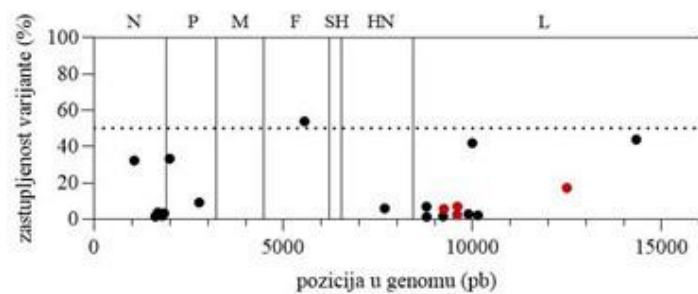
Ishodišni virus



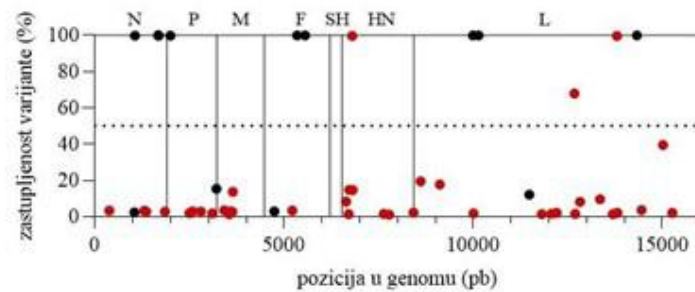
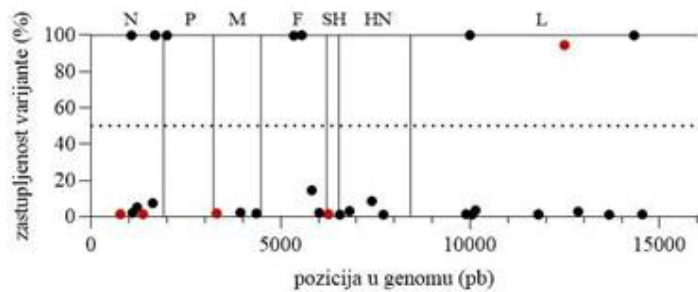
Kontrolni virusi

Tretirani virusi (250 μ M RBV)

pasaj 1

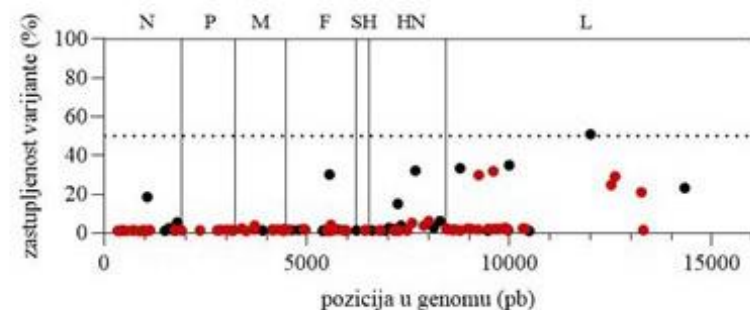
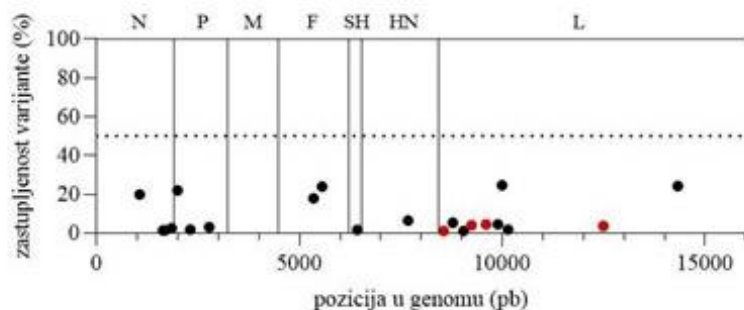


pasaj 8

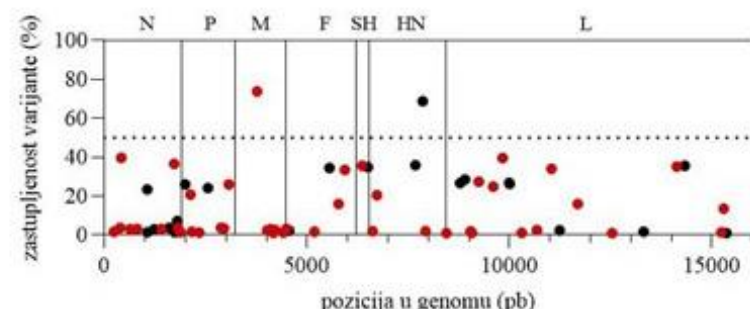
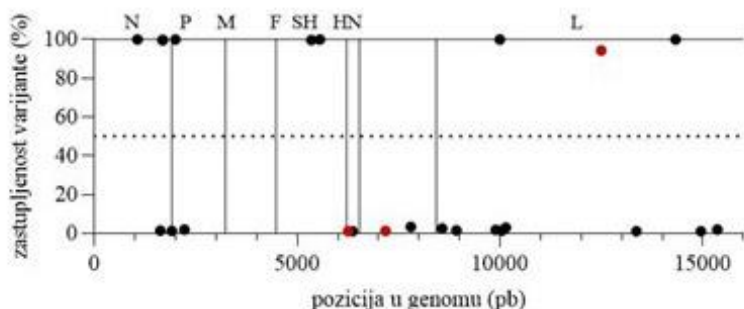


P
O
K
U
S
2

pasaj 1



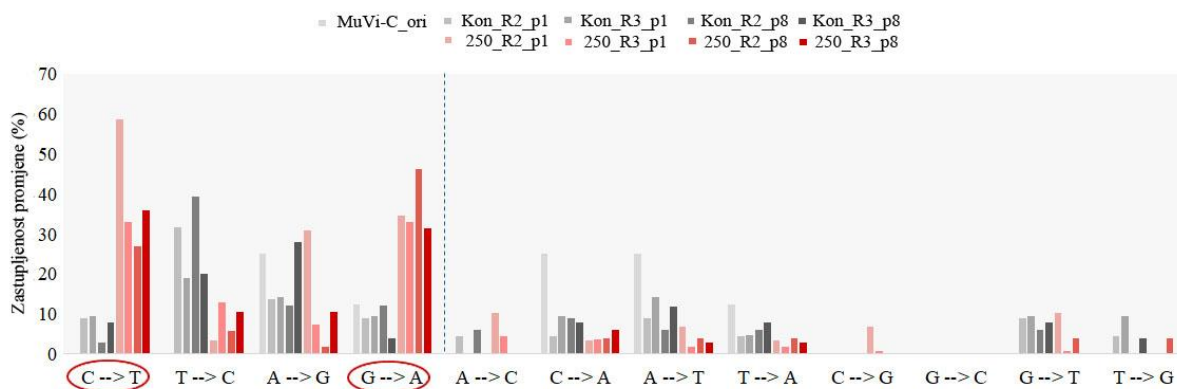
pasaj 8



P
O
K
U
S
3

Slika 37. Genska heterogenost virusne varijante MuVi-C: MuVi-C-ori, 250_R2_p1, 250_R2_p8, 250_R3_p1, 250_R3_p8 i njihovih kontrola. Na apscisi su prikazane pozicije u genomu izražene u parovima baza, a na ordinati postotak zastupljenosti nukleotidne varijante (u odnosu na konsenzus sekvenciju MuVi-C-ori) na određenoj poziciji. Crvenom bojom označene su promjene koje odgovaraju promjenama specifičnim za ribavirin (C→T, G→A). Označeni su dijelovi genoma ovisno o genskoj regiji kojoj pripadaju (N, P, M, F, SH, HN, L). Isprekinutom linijom naznačena je zastupljenost od 50% (varijante zastupljene iznad 50% postaju promjene konsenzusa za dane pozicije).

Postotak promjena $C \rightarrow T$ i $G \rightarrow A$, teoretski specifičnih za RBV, značajno je veći u tretiranim uzorcima, nego u njihovim kontrolama ($C \rightarrow T$ i $G \rightarrow A$ analizirane zajedno naspram svih ostalih promjena u uzorku) (250_R2_p1: $\chi^2(1, 71) = 9,31$, $p = 0,00228$, 250_R3_p1: $\chi^2(1, 130) = 16,02$, $p = 0,000063$; 500_R3_p1: $\chi^2(1, 81) = 13,19$, $p = 0,000282$; 250_R2_p8: $\chi^2(1, 85) = 27,10$, $p < 0,00001$; 250_R3_p8: $\chi^2(1, 92) = 22,20$, $p < 0,00001$) (slika 37, tablica 24). U uzorku MuVi-C_ori najzastupljenije su transverzije $A \rightarrow T$ i $C \rightarrow A$ te tranzicija $A \rightarrow G$ (slika 38). U svim kontrolnim uzorcima (oba pasaža za oba pokusa) u najvećem postotku su prisutne tranzicije $T \rightarrow C$ i $A \rightarrow G$.



Slika 38. Zastupljenost različitih nukleotidnih promjena u uzorcima virusne varijante MuVi-C kultiviranih na staničnoj liniji A549 u prisustvu ribavirina te u MuVi-C_ori i kontrolnim virusima. Crveno su zaokružene promjene teoretski specifične za ribavirin ($C \rightarrow T$, $G \rightarrow A$). Lijevo od plave isprekidane linije su tranzicije, desno su transverzije.

Promjene konsenzusa u odnosu na uzorak MuVi-C_ori postoje i kod kontrolnih i kod uzoraka tretiranih RBV-om u koncentraciji od 250 μM , no nisu iste između uzoraka (tablica 25).

U uzorku Kon_R2_p1 prisutna je jedna promjena konsenzusa (5561 $C \rightarrow A$ sa zastupljenošću od 54%). U uzorku Kon_R3_p1 nema promjene konsenzusa, ali je promjena 5561 $C \rightarrow A$ zastupljena u virusnoj populaciji s 24%. U osmom pasažu kontrolni uzorci iz oba pokusa imaju iste promjene u odnosu na konsenzus sekvenciju, a među njima je i već navedena promjena.

Nijedna od promjena konsenzusa u kontrolnim uzorcima nije prisutna u uzorcima tretiranim RBV-om u koncentraciji od 250 μ M, osim u slučaju 250_R2_p8. Ovaj uzorak ima ukupno 14 promjena konsenzusa, od kojih je 9 prisutno u kontrolnim uzorcima osmog pasaža. Ni u prvom, niti u osmom pasažu nijedna promjena konsenzusa kod tretiranih uzoraka nije zajednička (tablica 25).

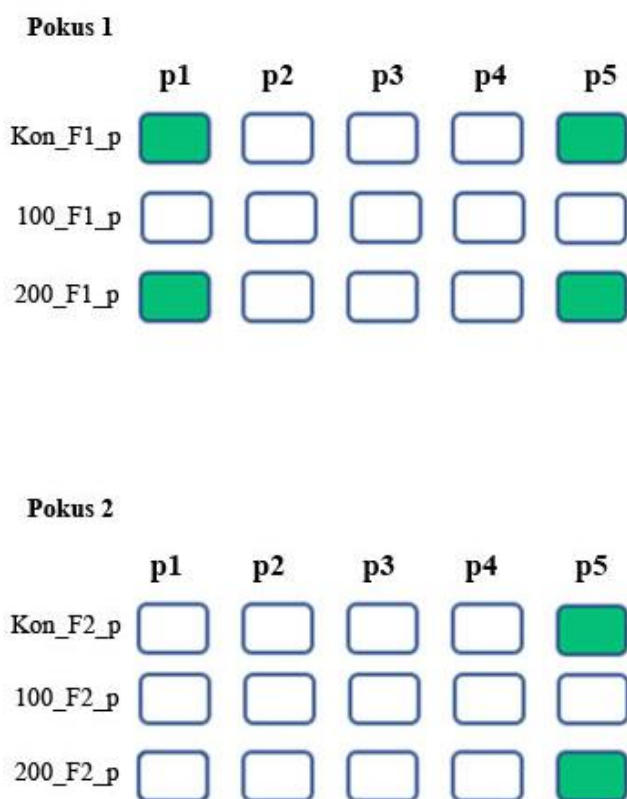
Gledano sumarno, rezultati genskih analiza provedenih za uzorke MuVi-C kultivirane na staničnoj liniji Vero pokazuju da je heterogenost virusnih populacija tretiranih s 250 i 500 μ M RBV-a veća u usporedbi s MuVi-C_ori i kontrolnim uzorcima (tablica 24, slika 37). Najzastupljenije nukleotidne promjene u tretiranim uzorcima su C→T i G→A (slika 38). Promjene konsenzusa prisutne su i u kontrolnim i u tretiranim uzorcima (tablica 25). One su zajedničke kontrolnim uzorcima oba analizirana pokusa (s iznimkom promjene C5561A koja nije promjena konsenzus sekvencije u Kon_R3_p1, ali je zastupljena s 24%). Promjene konsenzus sekvencije tretiranih uzoraka nisu međusobno usporedive.

Tablica 25. Promjene konsenzusa prisutne u kontrolnim ili ribavirinom tretiranim uzorcima virusne varijante MuVi-C u odnosu na ishodišni uzorak. Sivom bojom označene su promjene koje ribavirin specifično unosi u genom (C→T, G→A). Podebljano su naznačene promjene koje su prisutne i kod uzorka 250_R2_p8. Kratica sin. označava sinonimnu promjenu aminokiseline.

uzorak	pozicija u genomu	promjena nukleotida	promjena aminokiseline	gen
Kon_R2_p1	5561	C→A	Ala→Glu	F
Kon_R2_p8 Kon_R3_p8	1059	A→G	Asp→Gly	N
	1676	T→C	Lys (sin.)	N
	1680	T→C	Leu→Ser	N
	1685	T→C	Tyr→His	N
	1996	C→A	Asn→Lys	P
	5348	A→T	Gln→Leu	F
	5561	C→A	Ala→Glu	F
	9994	A→T	Lys→Asn	L
	12492	C→T	Ala→Val	L
	14332	T→A	Phe→Leu	L
250_R2_p1	293	C→A	Gln→Lys	N
	2500	G→A	Glu (sin.)	P
250_R3_p1	11998	T→C	Glu (sin.)	L
250_R2_p8	6802	C→T	Gln (sin.)	HN
	10146	G→T	Arg→Ile	L
	12677	C→T	Leu→Phe	L
	13801	C→T	Ser (sin.)	L
250_R3_p8	3773	C→T	Ile (sin.)	M
	7860	G→A	Arg→Gln	HN

4.7.3 Genska karakterizacija uzoraka virusne varijante MuVi-C uzastopno kultiviranih u prisustvu 5-fluorouracila

Za određivanje učinka 5-FU-a na genom virusne varijante MuVi-C metodom NGS sekvencirani su uzorci 200_F1_p1, 200_F1_p5, 200_F2_p5 i njihove kontrole (slika 39).



Slika 39. Virusna varijanta MuVi-C kultivirana na staničnoj liniji Vero s ili bez 5-fluorouracila. Zelenom bojom označeni su uzorci odabrani za gensku karakterizaciju pomoću metode sekvenciranja nove generacije. U lijevom kutu prikazana je koncentracija 5-fluorouracila koja je korištena u kultiviranju virusa kroz pasaže. p = pasaž.

S obzirom da umnažanje nije bila moguće za zadnji fragment genoma uzorka 200_F1_p1, kod njega je sekvenciran genom bez zadnjih 624 pb. Iz ovog razloga, analiza

ostalnih uzoraka napravljena je bez tog zadnjeg segmenta genoma kako bi rezultati bili usporedivi.

Kod svih uzoraka ukupna raznolikost, kao i Shannonova entropija, veća je između 6,25 i 8,75 puta (ovino o uzorku) od vrijednosti ovih mjera kod uzorka MuVi-C_ori (tablica 26). Uzorci tretirani 5-FU-om imaju 1,59 do 2,33 puta veće vrijednosti ovih mjera u usporedbi s kontrolnim uzorcima (tablica 26). Uzastopnim kultiviranjem kontrolnog i tretiranog virusa, ne povećava se heterogenost populacija.

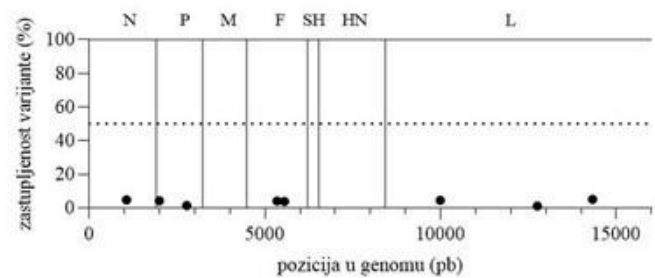
Tablica 26. Ukupna raznolikost i Shannonova entropija virusne populacije te postotak promjena koje 5-fluorouracil (5-FU) specifično uvodi u genome virusne varijante MuVi-C tretirane 5-fluorouracilom i odgovarajućih kontrola.

Virusni uzorak	Ukupna raznolikost ($\times 10^{-4}$)	Shannonova entropija ($\times 10^{-4}$)	Postotak promjena u genomu specifičnih za 5-FU* (%)
MuVi-C_ori	0,4	0,4	25
Kon_F1_p1	2,2	1,6	45
Kon_F1_p5	1,4	1,2	36
Kon_F2_p5	1,3	1,2	42
200_F1_p1	3,5	3,5	74
200_F1_p5	2,6	2,5	77
200_F2_p5	2,8	2,6	81

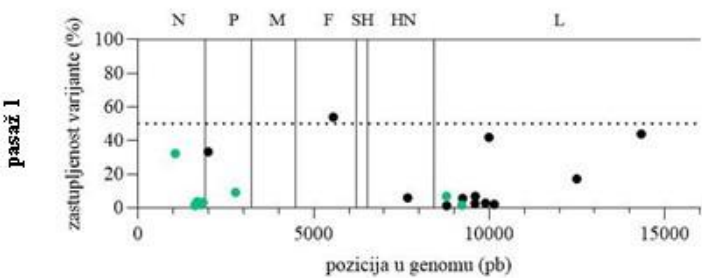
*T→C, A→G

Na grafičkom prikazu varijabilnih pozicija te zastupljenosti svake pojedine promjene za kontrolne te tretirane uzorke iz pasaža 1 i pasaža 5 (slika 40) vidljivo je da tretirani uzorci imaju veći postotak varijabilnih pozicija, kao i da je većina tih promjena prisutna u malom postotku. Iako je postotak promjena koje 5-FU u teoriji specifično unosi u genom (T→C i A→G) visok i kod kontrolnih uzoraka, ovaj postotak je veći za 29 – 41% u tretiranim uzorcima (slika 41, tablica 26).

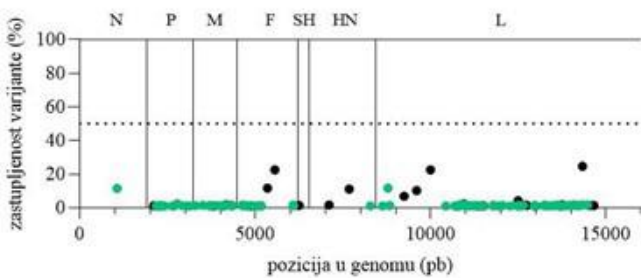
Ishodišni virus



Kontrolni virusi

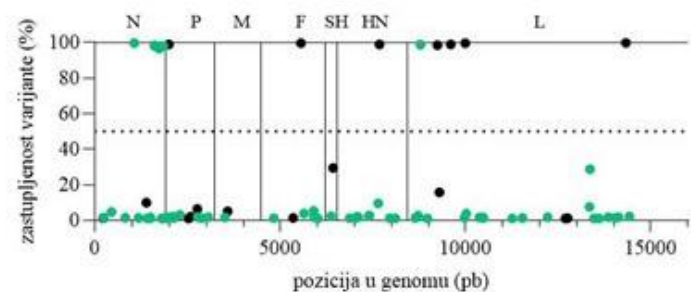
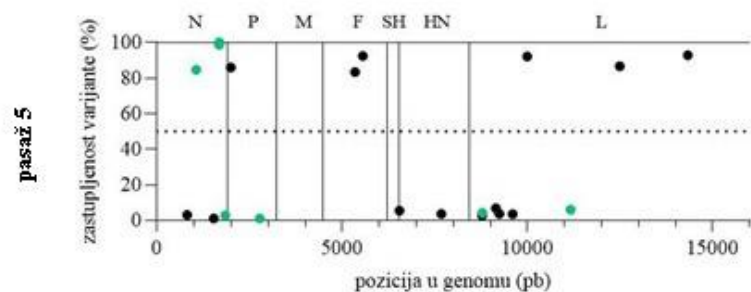


Tretirani virusi (200 µM 5-FU)

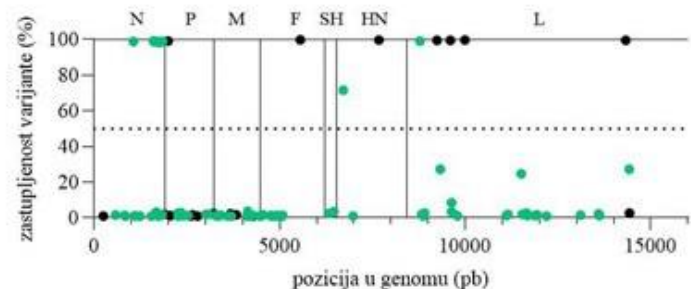
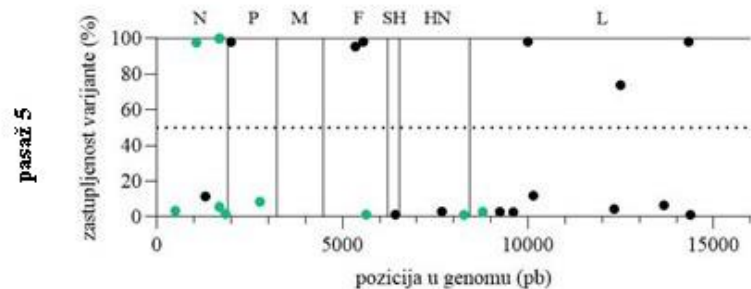


P
O
K
U
S

1



P
O
K
U
S
1

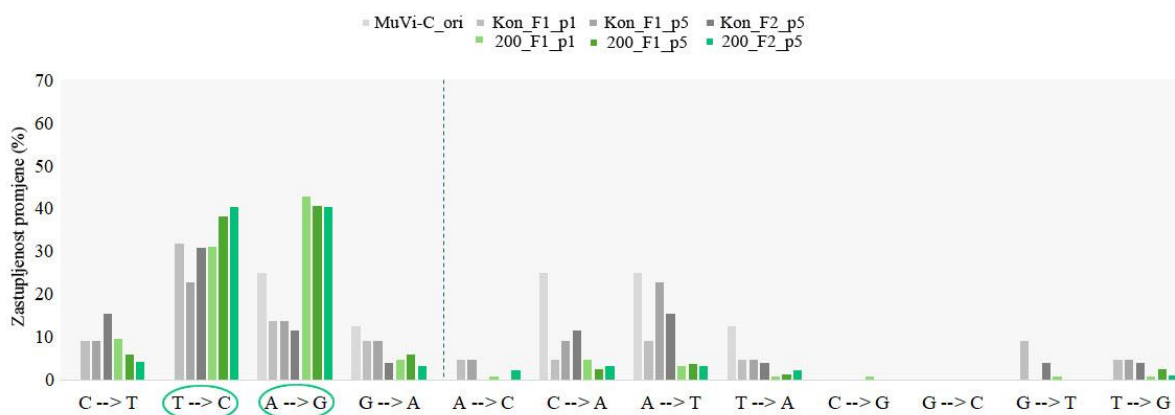


P
O
K
U
S
2

Slika 40. Genska heterogenost virusne varijante MuVi-C: MuVi-C-ori, 200_F1_p1, 200_F1_p5, 200_F2_p5 i njihovih kontrola. Na apscisi su prikazane pozicije u genomu izražene u parovima baza, a na ordinati postotak zastupljenosti virusne varijante (u odnosu na konsenzus sekvenciju MuVi-C-ori) na određenoj poziciji. Zelenom bojom označene su promjene koje odgovaraju promjenama specifičnim za 5-fluorouracil (po literaturi) (T→C, A→G). Označeni su dijelovi genoma ovisno o genskoj regiji kojoj pripadaju (N, P, M, F, SH, HN, L). Isprekinutom linijom naznačena je zastupljenost od 50% (varijante zastupljene iznad 50% postaju promjene konsenzusa za dane pozicije).

U kontrolnim uzorcima najzastupljenija je promjena T→C (u Kon_F1_p5 jednako je zastupljena i promjena A→T) (slika 41). Promjena A→G također je za sve kontrolne uzorke pri vrhu zastupljenosti (među prve četiri za sve uzorke).

U svim uzorcima tretiranim s 200 μM 5-FU statistički je značajnija zastupljenost promjena T→C i A→G u usporedbi s njihovim kontrolama (promjene T→C i A→G analizirane zajedno naspram svih ostalih promjena u uzorku) (200_F1_p1: χ^2 (1, 148) = 7,12, p = 0,007638, 200_F1_p5: χ^2 (1,124) = 15,15, p = 0,000099, χ^2 (1, 111) = 16,33, p = 0,000053) koje zajedno čine preko 70% ukupnih promjena za svaki pojedini uzorak (tablica 26).



Slika 41. Zastupljenost različitih nukleotidnih promjena u uzorcima virusne varijante MuVi-C kultiviranih na staničnoj liniji Vero u prisustvu 5-fluorouracila te u MuVi-C_ori i kontrolnim virusima. Zeleno su zaokružene promjene koje literatura navodi kao specifične za 5-fluorouracil (T→C, A→G). Lijevo od plave isprekidane linije su tranzicije, desno su transverzije.

Promjene konsenzusa prisutne su u prvom pasažu kod kontrolnog, te petom pasažu za kontrolne i tretirane uzorke (tablica 27). Kod 200_F1_p1 nema promjene konsenzusa. Promjene konsenzusa zajedničke su kontrolama petog pasaža za oba pokusa. Od 10 promjena konsenzusa kontrolnih uzoraka, 4 su prisutne kod tretiranih uzoraka u petom pasažu za uzorke oba pokusa. Kod tretiranih uzoraka, osim promjena zajedničkih s kontrolnim

uzorcima, postoji još 14 promjena konsenzusa. Uzorak 200_F2_p5, uz ovih 18 promjena ima i dodatnu promjenu koja nije prisutna u njegovom replikatu (tablica 27).

Tablica 27. Promjene konsenzusa prisutne u kontrolnim ili 5-fluorouracilom tretiranim uzorcima virusne varijante MuVi-C u odnosu na ishodišni uzorak. Sivom bojom označene su promjene koje 5-fluorouracil po literaturi unosi u genom (T→C, A→G). Podebljano su prikazane promjene konsenzusa kontrolnih uzoraka koje su prisutne i kod uzoraka tretiranih 5-fluorouracilom. Kratica sin. označava sinonimnu promjenu aminokiseline. U zadnjem redu je navedena promjena prisutna za tretirani uzorak iz pokusa 2, koja nije prisutna u njegovom replikatu.

uzorak	pozicija u genomu	promjena nukleotida	promjena aminokiseline	gen
Kon_F1_p1	5561	C→A	Ala→Glu	F
Kon_F1_p5 Kon_F2_p5	1059	A→G	Asp→Gly	N
	1676	T→C	Lys (sin.)	N
	1680	T→C	Leu→Ser	N
	1685	T→C	Tyr→His	N
	1996	C→A	Asn→Lys	P
	5348	A→T	Gln→Leu	F
	5561	C→A	Ala→Glu	F
	9994	A→T	Lys→Asn	L
	12492	C→T	Ala→Val	L
	14332	T→A	Phe→Leu	L
200_F1_p5 200_F2_p5	1601	T→C	Tyr→His	N
	1606	T→C	Pro (sin.)	N
	1615	T→C	Ser (sin.)	N
	1639	T→C	His (sin.)	N
	1735	T→C	Asn (sin.)	N
	1739	T→C	Phe→Leu	N

	1753	T→C	Pro (sin.)	N
	1762	T→C	Asn (sin.)	N
	1801	T→C	nije kodirajuća	
	1846	T→C	nije kodirajuća	
	7678	A→T	Gln→His	HN
	8782	A→G	Lys (sin.)	L
	9241	G→A	Lys (sin.)	L
	9602	C→T	Pro→Ser	L
200_F2_p5	6719	T→C	Leu (sin.)	HN

Sumarno, genske analize provedenih za uzorke virusne varijante MuVi-C kultivirane na staničnoj liniji Vero pokazuju da je heterogenost virusnih populacija tretiranih s 200 μ M 5-FU-a veća u usporedbi s MuVi-C_ori i kontrolnim uzorcima (tablica 26, slika 40). Heterogenost virusnih populacija ne povećava se uzastopnim kultiviranjem. Promjene T→C i A→G značajno su zastupljenije u tretiranim, nego u kontrolnim uzorcima (slika 41). Iako je postotak ovih promjena veći u tretiranim uzorcima, promjena T→C najzastupljenija je u kontrolnim uzorcima, a A→G također ima visok postotak pojavnosti. Promjene konsenzusa zajedničke su replikatima i kod kontrolnih i kod tretiranih uzoraka uz iznimku promjene 6719 T→C u uzorku 200_F2_p5, a koja nije uopće prisutna u njegovom replikatu (tablica 27).

4.7.4 Genska karakterizacija uzoraka virusne varijante MuVi-C uzastopno kultiviranih u prisustvu 5-azacitidina

Za određivanje učinka 5-AZC-a na genom virusne varijante MuVi-C metodom NGS sekvencirani su virusi 4_A1_p1, 4_A1_p5, 4_A2_p5 i njihove kontrole, svi uzgajani na staničnoj liniji Vero (slika 42).

Pokus 1					
	p1	p2	p3	p4	p5
Kon_A1_p					
2_A1_p					
4_A1_p					
Pokus 2					
	p1	p2	p3	p4	p5
Kon_A2_p					
2_A2_p					
4_A2_p					

Slika 42. Prikaz odabira uzoraka virusne varijante MuVi-C kultiviranih na staničnoj liniji Vero s ili bez 5-azacitidina za gensku karakterizaciju pomoću metode sekvenciranja novom generacijom (označeni plavom bojom). U lijevom kutu prikazana je koncentracija 5-azacitidina koja je korištena u kultiviranju virusa kroz pasaže. p = pasaż

Najmanje vrijednosti ukupne raznolikosti i Shannonove entropije prisutne su kod MuVi-C_ori te Kon_A2_p5 (tablica 28). Za oba kontrolna uzorka iz pasaža 5 mjere raznolikosti manje su nego u pasažu 1 (tablica 28). I Shannonova entropija i ukupna raznolikost veće su za tretirane uzorke u pasažu 5 od tretiranog uzorka pasaža 1. Ove vrijednosti međusobno su usporedive između jednako tretiranih uzoraka u oba pokusa (tablica 28).

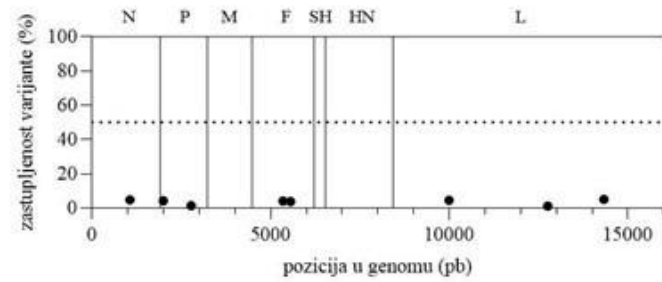
Tablica 28. Ukupna raznolikost i Shannonova entropija virusne populacije te postotak promjena koje 5-azacitidin (5-AZC) specifično uvodi u genome virusne varijante MuVi-C tretirane 5-azacitidinom i odgovarajućih kontrola.

Virusni uzorak	Ukupna raznolikost ($\times 10^{-4}$)	Shannonova entropija ($\times 10^{-4}$)	Postotak promjena u genomu specifičnih za 5- AZC* (%)
Ishodišni	0,4	0,4	0
Kon_A1_p1	2,2	1,7	0
Kon_A1_p5	1,3	1,2	0
Kon_A2_p5	0,3	0,4	0
4_A1_p1	2,0	1,7	8
4_A1_p5	3,0	2,3	12
4_A2_p5	3,2	2,7	8

*C→G, G→C

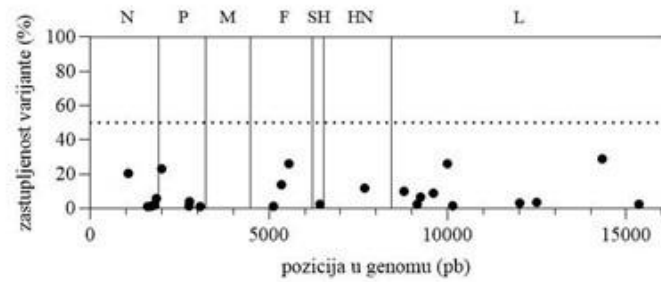
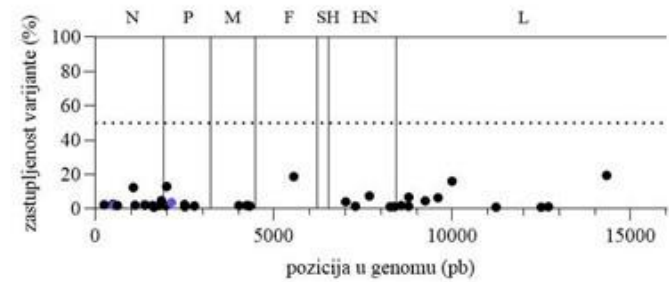
Na grafičkom prikazu pozicija nukleotidnih varijanti te njihove zastupljenosti vidljivo je da je broj varijabilnih pozicija u genomu veći kod uzoraka tretiranih 5-AZC-om u koncentraciji od 4 μ M u odnosu na kontrolne uzorke (slika 43).

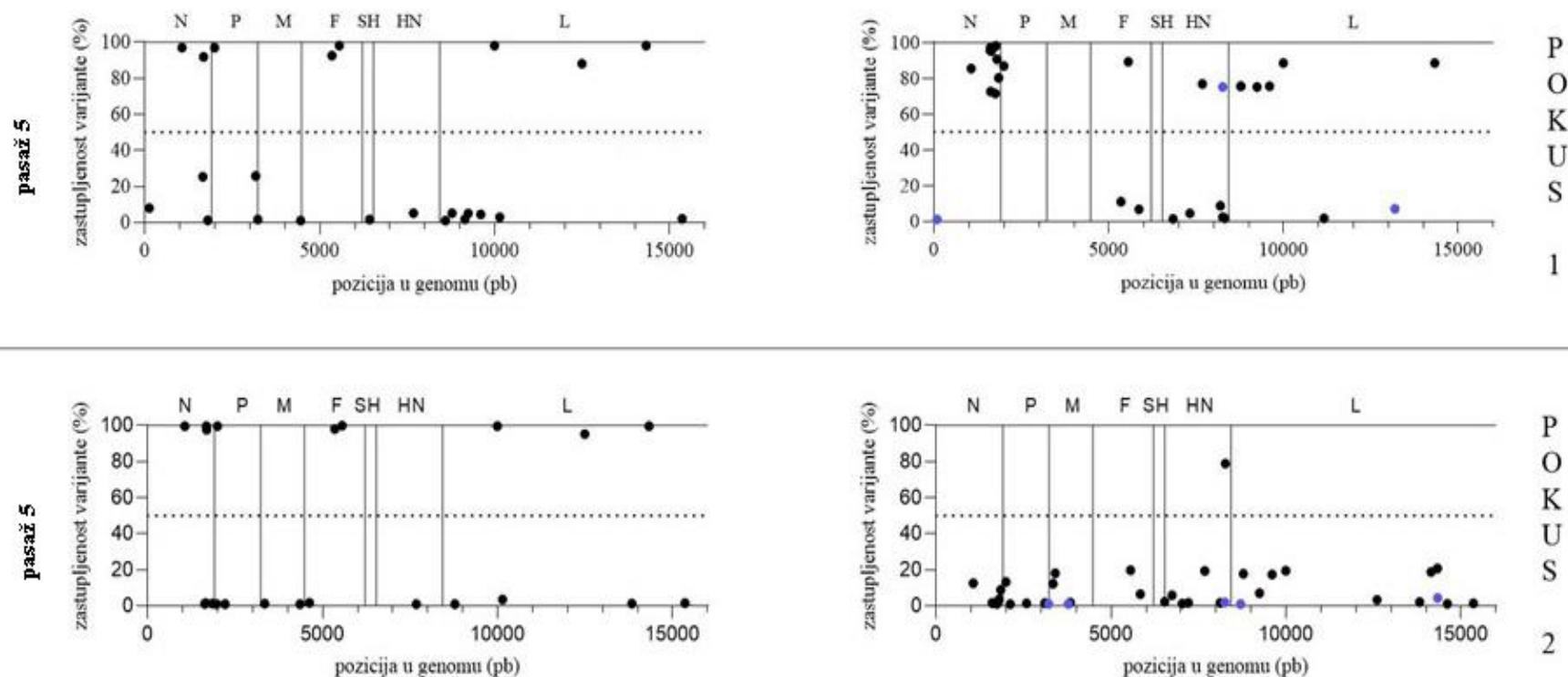
Ishodišni virus



Kontrolni virusi

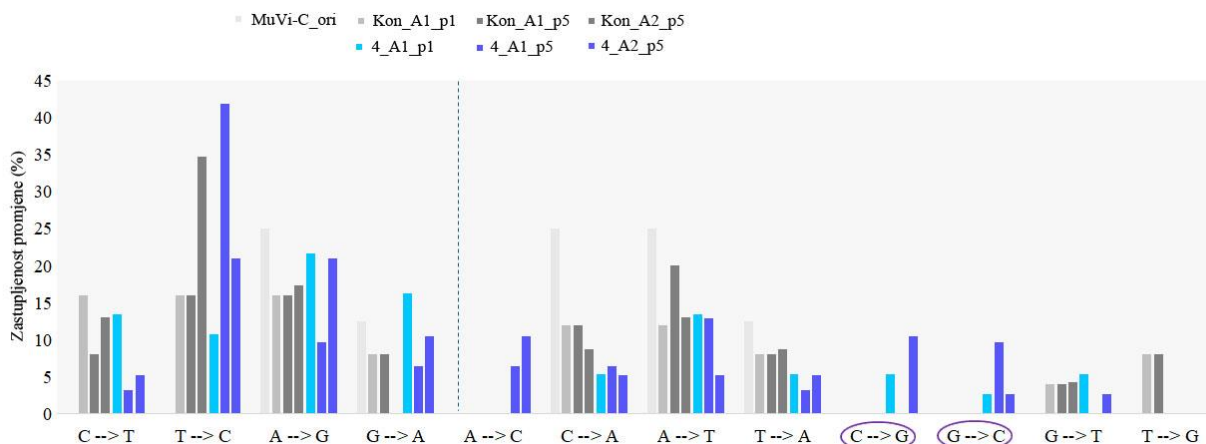
pasaž I

Tretirani virusi (3,9 μ M 5-AZA)P
O
K
U
S
1



Slika 43. Genska heterogenost virusne varijante MuVi-C: MuVi-C ori, 4_A1_p1, 4_A1_p5, 4_A2_p5 i njihovih kontrola. Na apscisi su prikazane pozicije u genomu izražene u parovima baza, a na ordinati postotak zastupljenosti virusne varijante (u odnosu na konsenzus sekvenciju MuVi-C-ori) na određenoj poziciji. Plavom bojom označene su promjene koje odgovaraju promjenama specifičnima za 5-AZC (po literaturi) (C→G, G→C). Označeni su dijelovi genoma ovisno o genskoj regiji kojoj pripadaju (N, P, M, F, SH, HN, L). Isprekinutom linijom naznačena je zastupljenost od 50% (varijante zastupljene iznad 50% postaju promjene konsenzusa za dane pozicije).

Na slici 44 prikazana je zastupljenost svake pojedine vrste promjene za kontrolne i uzorke tretirane 5-AZC-om u koncentraciji od 4 μ M. Kod svih uzoraka osim 4_A1_p1 promjena T→C uvijek je među tri je najzastupljenije promjene u uzorku (za uzorak 4_A1_p1 peta je po zastupljenosti). Osim promjena specifičnih za 5-AZC (prema literaturi; C→G i G→C), promjena koje nema niti u jednom kontrolnom uzorku, a pojavljuje se u tretiranim uzorcima petog pasaža je A→C (slika 44).



Slika 44. Zastupljenost različitih nukleotidnih promjena u uzorcima virusne varijante MuVi-C kultiviranih na staničnoj liniji Vero u prisustvu 5-azacitidina te u MuVi-C_ori i kontrolnim virusima. Plavo su zaokružene promjene koje literatura navodi kao specifične za 5-AZC (C→G, G→C). Lijevo od plave isprekidane linije su tranzicije, desno su transverzije.

Promjene konsenzusa nisu prisutne u prvom pasažu ni kod kontrolnog uzorka niti kod uzorka tretiranog 5-AZC-om u koncentraciji od 4 μ M. U petom pasažu promjene konsenzusa prisutne su i kod kontrolnih i kod uzoraka tretiranih 5-AZC-om (tablica 29). Promjene konsenzusa jednake su za kontrolne uzorke oba pokusa.

U uzorku 4_A1_p5 prisutna je 21 promjena u odnosu na konsenzus sekvenciju MuVi-C-ori, dok je samo jedna promjena prisutna u njegovom replikatu (tablica 29). Ta promjena nije prisutna u uzorku 4_A1_p5.

Tablica 29. Promjene konsenzusa prisutne u kontrolnim ili 5-azacitidinom tretiranim uzorcima virusne varijante MuVi-C u odnosu na MuVi-C-ori. Sivom bojom označene su promjene koje 5-azacitidin specifično unosi u genom (C→G, G→C). Sivom bojom znakova kod 5-azacitidinom tretiranih uzoraka prikazane su promjene konsenzusa koje su prisutne i u kontrolnim uzorcima. Kratica sin. označava sinonimnu promjenu aminokiseline.

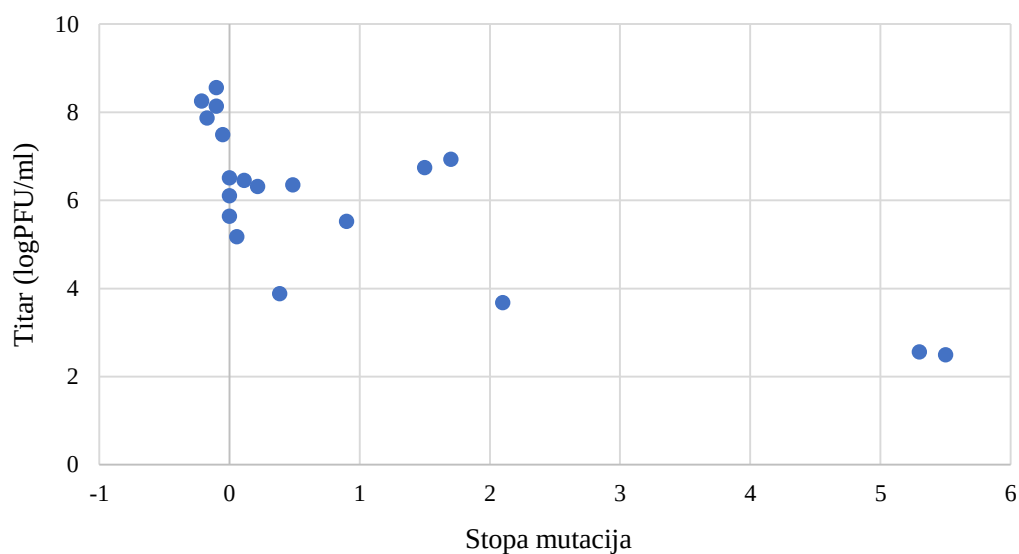
uzorak	pozicija u genomu	promjena nukleotida	promjena aminokiseline	gen
Kon_A1_p5 Kon_A2_p5	1059	A→G	Asp→Gly	N
	1676	T→C	Lys (sin.)	N
	1680	T→C	Leu→Ser	N
	1685	T→C	Tyr→His	N
	1996	C→A	Asn→Lys	P
	5348	A→T	Gln→Leu	F
	5561	C→A	Ala→Glu	F
	9994	A→T	Lys→Asn	L
	12492	C→T	Ala→Val	L
	14332	T→A	Phe→Leu	L
4_A1_p5	1059	A→G	Asp→Gly	N
	1601	T→C	Tyr→His	N
	1606	T→C	Pro (sin.)	N
	1615	T→C	Ser (sin.)	N
	1639	T→C	His (sin.)	N
	1735	T→C	Asn (sin.)	N
	1739	T→C	Phe→Leu	N
	1753	T→C	Pro (sin.)	N
	1762	T→C	Asn (sin.)	N
	1801	T→C	nije kodirajuća	
	1846	T→C	nije kodirajuća	
	1996	C→A	Asn→Lys	P
	5561	C→A	Ala→Glu	F

	7678	A→T	Gln→His	HN
	8262	G→C	Gly→Ala	HN
	8773	A→T	Val (sin.)	L
	8782	A→G	Lys (sin.)	L
	9241	G→A	Lys (sin.)	L
	9602	C→T	Pro→Ser	L
	9994	A→T	Lys→Asn	L
	14332	T→A	Phe→Leu	L
4_A2_p5	8270	A→C	Ser→Arg	HN

Za analizirane uzorke veća heterogenost prisutna je kod virusnih populacija tretiranih 5-AZC-om u odnosu na kontrolne i MuVi-C_ori (tablica 28, slika 43). Dok su kod kontrolnih uzoraka mjere raznolikosti manje u pasažu 5 u odnosu na pasaž 1, situacija je obrnuta u tretiranim uzorcima. Promjene C→G, G→C te A→C prisutne su u tretiranim uzorcima, dok ih u kontrolnima nema (slika 43). Promjene konsenzusa jednake su za replikate kontrolnih uzoraka (tablica 29). Kod tretiranih uzoraka nema zajedničkih promjena konsenzusa (tablica 29).

4.8 Korelacija između heterogenosti virusne populacije i titra virusa

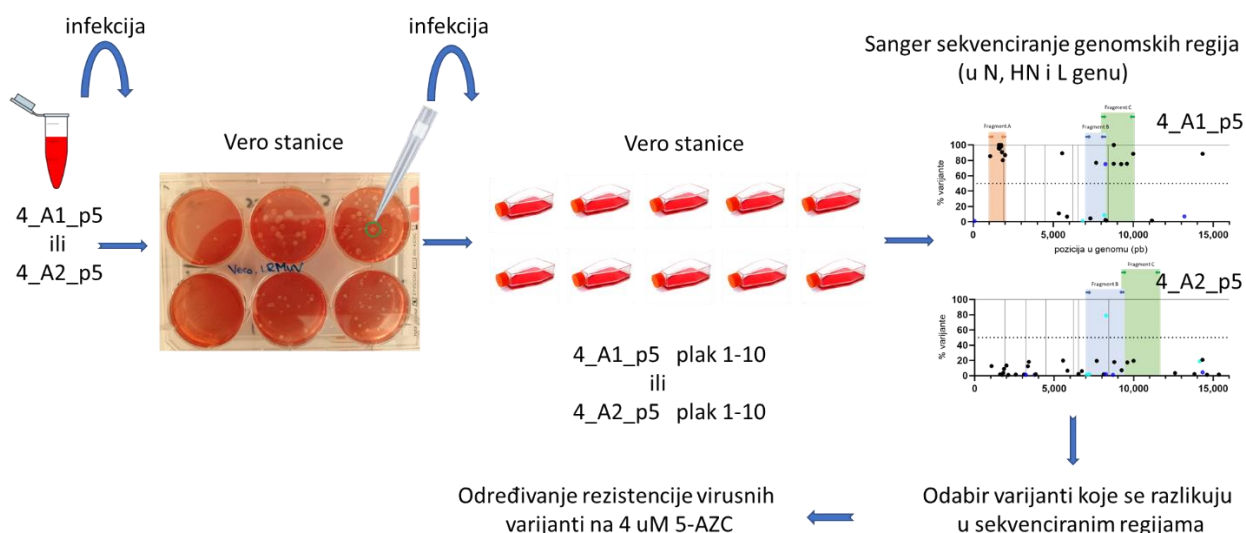
Korelacijski koeficijent između stope mutacija virusnih populacija i njihovog titra (slika 45) za virusne uzorke tretirane RBV-om iz tablice 19 iznosio je -0,8. Ovakav korelacijski indeks upućuje na negativnu korelaciju vrijednosti ovih dviju kategorija.



Slika 45. Korelacija između stope mutacija virusne populacije i titra virusa

4.9 Izolacija varijanti virusa 4_A1_p5 i 4_A2_p5 te određivanje njihove rezistentnosti na 5-azacitidin

S obzirom da su uzorci kultivirani u prisustvu 5-AZC-a u koncentraciji 4 μ M kroz 5 pasaža, za oba pokusa pokazali veću rezistentnost na 5-AZC (slika 31) od MuVi-C_ori i kontrolnih uzoraka, po 10 zasebnih plakova ovih virusa je purificirano metodom plak purifikacije kako bi se izolirale zasebne virusne varijante te utvrdilo je li neka od njih zaslužna za opisanu rezistentnost (slika 46).



Slika 46. Shematski prikaz postupka izolacije i karakterizacije plakova virusa 4_A1_p5 i 4_A2_p5.

Nakon što su zasebni plakovi izolirani (odabir plakova temeljio se na njihovoj različitoj morfologiji) i uzgojeni u staničnoj kulturi Vero, određen im je titar. Jedan plak za 4_A2_p5 nije dao detektabilan titar stoga je u daljnju obradu ušlo njegovih 9 plakova. Za plakove uzorka 4_A1_p5 titar je iznosio između 6,5 i 8,0 logPFU/ml a za plakove uzorka 4_A2_p5 između 6,7 i 7,7 logPFU/ml. Metodom po Sangeru sekvencirane su tri genske regije za svaki plak (unutar N, HN i L gena) koje su prethodno odabrane kao regije u kojima je zabilježena genska varijabilnost na temelju rezultata NGS sekvenciranja virusa 4_A1_p5 (slika 43). Rezultati su prikazani u tablici 30.

Tablica 30. Genska karakterizacija varijanti virusa 4_A1_p5 i 4_A2_p5 na temelju tri regije u genomu (dio N, HN i L gena).

virus	broj plaka	fragment A		fragment B		fragment C	
		pozicija u genomu	promjena nt	pozicija u genomu	promjen a nt	pozicija u genomu	promjena nt
4_A1_p 5	1	1059	G→A	7320	G→A	9994	T→A
		1846	T→C				
		1996	A→C				
	2-6, 9	1601	T→C	7678	A→T	8773	A→T
		1606	T→C				
		1639	T→C				
		1735	T→C			9602	
		1739	T→C				
		1762	T→C				
		1801	T→C				
		1846	T→C				
	7	1059	G→A	7262	C→G	9994	T→A
		1996	A→C				
	8	1059	G→A	7320	G→A	9994	T→A
		1996	A→C				
	10	1680	T→C	8191	A→C		
		1685	T→C				
4_A2_p 5	1	n.o.		8696	G→C	9994	T→A
						10270	A→G
	2-7	n.o.		isto kao MuVi-C ishodišni		9994	T→A
						10270	A→G
	8	n.o.		7678	A→T	9602	C→T
				8782	A→G	10270	A→G
			8897	G→T			

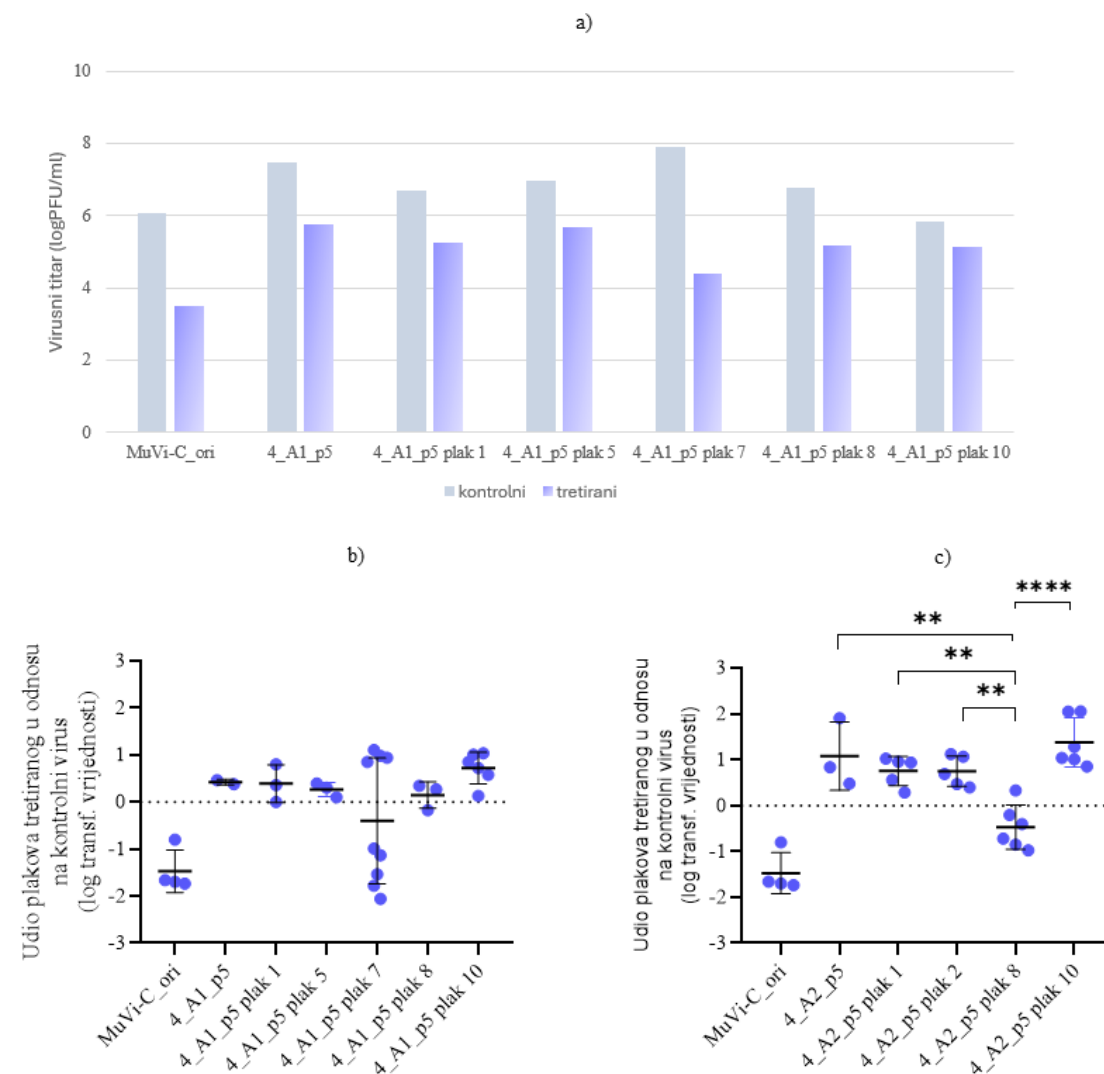
		9241	G→A		
10	n.o.	isto kao MuVi-C ishodišni		9994	T→A

* n.o. = nije određivano

Kod plakova virusa 4_A1_p5, prema analiziranim genskim regijama, definirano je pet zasebnih virusnih varijanti, a kod plakova virusa 4_A2_p5 četiri. Svaka od njih testirana je na rezistentnost na 5-AZC u koncentraciji 4 µM (slika 47).

U slučaju uzorka 4_A1_p5, samo je plak 10 pokazao statistički značajnu razliku u odnosu na MuVi-C_ori, dok je u slučaju uzorka 4_A2_p5 statistički značajna razlika u rezistentnosti u odnosu na ishodišni uzorak prisutna za sve testirane plakove (slika 47).

Iako se izolirane varijante uzorka 4_A2_p5 međusobno razlikuju u rezistentnosti (najveća razlika je prisutna između plaka 8 i plaka 10), ni u slučaju 4_A1_p5, ni 4_A2_p5 virusa, nije pronađen plak koji bi imao statistički značajno veću rezistentnost od odgovarajućeg originalnog virusa, 4_A1_p5 ili 4_A2_p5 (slika 47).



Slika 47. Rezistentnost plakova virusa (a) 4_A1_p5 i (b) 4_A2_p5 na 5-AZC. Stanična linija Vero tretirana je s 4 μ M 5-azacitidinom ili običnim medijem (kontrola) te inficirana (MOI 0,001), virusnom varijantom MuVi-C ori, uzorcima 4_A1_p5 i 4_A2_p5 ili pojedinim plakovima izoliranim iz ovih dvaju uzoraka i inkubirana u mediju korištenom za predtretman kroz 3 dana. Rezultati su izraženi kao udio plakova tretiranog virusnog uzorka u odnosu na kontrolni i prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD ($n=3-9$). Vrijednosti među grupama uspoređivane na temelju log transformiranih vrijednosti (*one-way* ANOVA uz post-hoc Tukey test, $p < 0,05$). Virusna varijanta MuVi-C ori pokazala je statistički manju rezistentnost u odnosu na sve viruse na slici b) (zbog jednostavnosti prikaza nije naznačeno).

5. RASPRAVA

U ovom radu istraživao je utjecaj tri nukleozidna analoga – ribavirina (RBV), 5-fluorouracila (5-FU) i 5-azacitidina (5-AZC) na gensku varijabilnost i infektivnost virusa zaušnjaka kako bi se ispitala mogućnost ispoljavanja polimeraze s promijenjenom vjernosti transkripcije ili potencijal za letalnu mutagenezu kod ovog virusa. Naime, pri replikaciji virusa nukleozidni analozi se mogu vezati na rastući lanac nukleinske kiseline umjesto dušičnih baza čime uzrokuju njihova kriva sparivanja i time promjene u genskom kodu. Manipulacija genskog zapisa na ovaj način može dovesti do ispoljavanja virusne varijante s promijenjenom vjernosti transkripcije polimeraze što može biti osnova za atenuaciju virusa u svrhu dizajna cjepiva. Također, mutacije u genomu koje potiču nukleozidni analozi mogu dovesti do ekstinkcije virusne populacije što ih čini kandidatima za liječenje same virusne bolesti letalnom mutagenezom. U ovom istraživanju kao pokazatelj infektivnosti odabran je titar virusa određivan u supernatantu inficirane kulture stanica.

Za ostvarenje optimalnog sustava *in vitro* za proučavanje utjecaja nukleozidnih analoga na virus potrebno je ispuniti nekoliko različitih uvjeta. Za početak, kombinacija virusnog soja i stanica treba rezultirati relativno visokim titrom virusa s obzirom da se antivirusni učinak nukleozidnog analoga dokazuje smanjenjem titra nakon tretmana. Također, odabrani omjer infektivnih virusnih čestica i izraslih stanica (eng. *multiplicity of infection*, MOI) ne smije dovoditi do stvaranja defektivnih interferirajućih čestica dok visoki titar istovremeno treba biti postignut što ranije u infekciji kako bi se smanjio negativan utjecaj nukleozidnih analoga na same stanice. S obzirom na sporu replikaciju virusa zaušnjaka (107) ispunjavanje ovih uvjeta predstavljalo je određeni izazov.

Odabrane su stanične linije epitela za koje je poznato da podržavaju replikaciju virusa zaušnjaka te dvije različite varijante virusa zaušnjaka, MuVi-C i ZgA/Cro69, kako bi se eliminirala mogućnost da je djelovanje pojedinog nukleozidnog analoga ovisno o samoj virusnoj varijanti. Sva tri nukleozidna analoga (RBV, 5-FU, 5-AZC) imaju dokazane višestruke mehanizme djelovanja na stanice uz pretpostavljene dodatne koji još nisu dokazani.

Kod proučavanja djelovanja nukleozidnih analoga na virus cilj je koristiti stanice koje su optimalno osjetljive na korišteni analog (108). U istraživanjima promjene vjernosti transkripcije polimeraze djelovanjem nukleozidnog analoga na virus, Beaucourt i sur. (108) predlažu da vijabilnost stanica ne bude smanjena za više od 50% u odnosu na kontrolne, netretirane stanice kako ovaj učinak ne bi interferirao s rezultatima. Također, u slučaju primjene nukleozidnog analoga u terapiji, on ne smije biti toksičan za stanice. U ovom istraživanju kao glavni test za određivanje vijabilnosti stanica odabran je MTT za određivanje metaboličke aktivnosti stanica. Literatura navodi stanične linije Vero i A549 kao relativno rezistentne na RBV s obzirom da su neučinkovite u pretvaranju RBV-a u njegove mono- (RMP) i trifosfatne oblike (RTP) (77). Poznato je da ovaj nukleozidni analog ima više različitih mehanizama pomoću kojih utječe na stanice domaćina i sam virus (78). Sposobnost stanične linije LLC-MK2 da fosforilira RBV na njegove mono- i tri-fosfatne metabolite do sada nije istraživana. U ovom istraživanju pokazan je usporediv utjecaj RBV-a između staničnih linija Vero i A549 što je u skladu s istraživanjem Franca i sur. (77) u kojem je 50% inhibitorna doza (eng. *inhibitory concentration*, IC50) za Vero iznosila 266 μ M, a za A549 205,6 μ M nakon 3 dana inkubacije u prisustvu RBV-a. Rezultati dobiveni za staničnu liniju Vero također su u skladu s istraživanjem Shigete i sur. u kojem je IC50 za staničnu liniju Vero iznosio 282 μ M (80). IC50 za staničnu liniju LLC-MK2 iznosio je 266 μ M što nije u skladu s rezultatima ovog istraživanja (1394 μ M) u kojem se stanična linija LLC-MK2 pokazala značajno rezistentnijom na RBV i u usporedbi s Vero i A549. Valja naglasiti da je istraživanje Shigete i sur. (80) jedino u kojem je objavljen utjecaj RBV-a na samu staničnu liniju LLC-MK2, dok većina radova iskazuje utjecaj RBV-a na virus uzgajan na ovoj staničnoj liniji. U njima je pokazan veći utjecaj na virus kultiviran na stanicama LLC-MK2 u usporedbi s utjecajem RBV-a na virus kultiviran na staničnoj liniji Vero (109–111) što odgovara rezultatima dobivenima u ovom radu. Potrebno je provesti dodatna istraživanja utjecaja RBV-a na samu staničnu liniju LLC-MK2 kako bi se utvrdio točan mehanizam kojim ovaj nukleozidni analog smanjuje njihovu vijabilnost. Time bi se potencijalno razjasnila nepodudarnost između niske osjetljivosti samih stanica na RBV, a s druge strane velike osjetljivost virusa kultiviranog na ovim stanicama u prisustvu RBV-a.

Ni pri najvišim korištenim koncentracijama RBV-a (1000 μM) u ovom istraživanju nijepokazan citotoksični učinak na stanične linije Vero, A549 ni LLC-MK2. Umjesto toga, mikroskopski pregled staničnog sloja pokazuje smanjenje proliferacije stanica tj. citostatički učinak što je u skladu s postojećim istraživanjima (77,79,112).

Stanična linija LLC-MK2 pokazala se otpornijom i na 5-FU u odnosu na stanične linije A549 i Vero. U radu Jianga i sur. istraživao je utjecaj 5-FU-a na stanične linije A549 i Vero (113). Pokazan je citotoksičan učinak na obje vrste staničnih linija s postotkom preživljenja oko 20% za obje linije pri koncentraciji od 200 μM što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja ukoliko se u obzir uzmu rezultati brojanja stanica nakon bojanja tripanskim modrilom. Vrijeme inkubacije duže je za 24h, a za kraću inkubaciju mjerenja nisu rađena. S obzirom da su Taskin i sur. (114) pokazali da 5-FU nakon 24h inkubacije smanjuje vijabilnost stanične linije Vero za više od 15% tek kod koncentracija viših od 700 μM može se pretpostaviti da bi duže izlaganje nukleozidnom analogu rezultiralo manjom vijabilnošću stanica. U postojećoj literaturi nema podataka o osjetljivosti stanične linije LLC-MK2 na 5-FU. Mehanizam djelovanja 5-FU-a je inhibicija aktivnosti timidilat sintaze njegovim metabolitima koji nastaju u stanicama čime se smanjuje dostupnost TTP-a u stanicama te povećava ugradnja metabolita 5-FU-a u genom i posljedično krivo sparivanje baza (89). Relativna otpornost stančne linije LLC-MK2 na 5-FU u usporedbi sa staničnim linijama A549 i Vero vjerojatno je posljedica kombinacije različitih čimbenika povezanih s metabolizmom ovog nukleozidnog analoga, kapacitetom popravka DNA i karakteristikama rasta stanica (92) za što bi trebalo provesti dodatna istraživanja.

Osjetljivost stanične linije A549 na 5-AZC pokazala se manjom u usporedbi s rezultatima istraživanja Nguyena i sur. (115) (IC_{50} 26 μM u odnosu na 6,3 μM) za jednako vrijeme inkubacije. Razlog za ovu nepodudarnost mogla bi biti razlika u fazi staničnog ciklusa u kojem su stanice tretirane nukleozidnim analogom. U istraživanju Ma i sur. smanjenje vijabilnosti stanične linije Vero za 50% vidljiva je tek kod koncentracija 5-AZC-a iznad 20 μM (116). Daljnim porastom koncentracija ovog nukleozidnog analoga vijabilnost stanica nije pokazivala daljnji pad. U ovom istraživanju zabilježen je relativno podudaran pad vijabilnosti na koncentraciji 15,62 μM (34% preživljenja), a pad vijabilnosti na većim koncentracijama također nije dramatičan. Veća osjetljivost stanične linije Vero na 5-AZC od

stanične linije A549 mogla bi biti posljedica nekoliko čimbenika, uključujući razlike u staničnom ciklusu i mehanizmima popravka DNA, kao i razlike u samom staničnom metabolizmu, no točno objašnjenje zahtijeva daljnja istraživanja mehanizma ulaska nukleozidnog analoga u stanice i njihovog daljnjeg procesuiranja.

U studijama koje istražuju učinak mutagena ili nekog drugog faktora na virus poželjno je da netretirani virus postiže što viši titar kako bi se jasno mogla utvrditi razlika u titru u usporedbi s tretiranim virusom. Ukoliko je titar netretiranog virusa nizak, djelovanje vanjskog faktora lako može dovesti do pada titra virusa ispod razine detekcije što onemogućuje daljnje istraživanje i karakterizaciju virusa. S obzirom da kod virusa zaušnjaka pri visokom MOI dolazi do stvaranja defektnih inteferirajućih (DI) čestica koje interferiraju s replikacijom infektivnih čestica (117), od interesa za istraživanje odabrani su MOI 0,01 i MOI 0,001. Također, ciljalo se da vrijeme inkubacije bude što kraće s obzirom na negativan učinak nukleozidnih analoga na proliferaciju i vijabilnost stanica. Virusna varijanta MuVi-C dosegala je niski titar kod infekcije stanične linije A549 (maksimalni titar 2,90 logPFU/ml, 5. dan nakon infekcije, MOI 0,1) te su zbog toga kao glavne kombinacije u istraživanju odabrane stanična linija Vero i MuVi-C te A549 i ZgA/Cro69. Na temelju ovih rezultata odabrane kombinacije staničnih linija i virusnih varijanti bile su optimalne za provjeru utjecaja nukleozidnih analoga na virusne varijante zaušnjaka.

Neke od korištenih koncentracija nukleozidnih analoga u ovom istraživanju prema rezultatima MTT testa smanjuju vijabilnost stanica za više od 50% što predstavlja graničnu vrijednost koja se navodi u istraživanjima ovog tipa (108) s obzirom da bi manje stanica za infekciju u sloju moglo utjecati na stupanj replikacije i širenja virusa među stanicama. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da promjene u koncentraciju nasada stanične linije Vero za infekciju utječu na titar virusa, dok to nije slučaj za stanične linije A549 i LLC-MK2. Ovakav rezultat vjerojatno je posljedica više različitih faktora kao npr. interakcije između stanica, brzine njihovog rasta, imunološkog odgovora stanice, a sama gustoća sloja može utjecati na razinu ekspresije receptora za virus na površini stanice (118). Kao posljedica, u interpretaciji rezultata dobivenih za utjecaj nukleozidnih analoga na staničnu liniju Vero uzeto je u obzir da je pad u titru barem djelomično rezultat smanjene vijabilnosti odnosno proliferacije stanica, a ne nužno djelovanja nukleozidnog analoga. Valja naglasiti da je u

pokusima u kojima je ispitivan antivirusni učinak nukleozidnih analoga, početni broj stanica bio jednak i kod kontrolne skupine i kod stanica koje su bile izložene nukleozidnom analogu. S druge strane, u eksperimentima koji su istraživali utjecaj koncentracije stanica u sloju na titar virusa, početni broj inficiranih stanica bio je manji među uzorcima. Stoga je nemoguće točno kvantificirati pad titra uslijed smanjene proliferacije stanica nakon tretmana nukleozidnim analogom. Rezultati za staničnu liniju Vero dobiveni u ovom istraživanju u skladu su s rezultatima Rosena i sur. koji su istraživali utjecaj različitih faktora na potencijalno cjepivo protiv SARS-CoV-2 i pokazali da smanjen broj stanica za infekciju negativno utječe na titar virusa (119). U različitim studijama (120–123) je pokazano da razlike u konfluentnosti staničnog sloja kod različitih virusa mogu utjecati na titar na način da smanjena konfluentnost vodi do manjeg broja stanica koje mogu biti inficirane i otežava prijenos virusa između stanica, dok prevelika konfluentnost dovodi do ograničenja hranjivih tvari, inhibicija putem nusproizvoda ili zaustavljanje staničnog ciklusa pri visokoj gustoći stanica koje umanjuje produktivnost specifičnu za stanicu (118).

Koncentracije RBV-a kojima su tretirani virusi su odabrane na temelju literature (79,80) te imajući na umu učinak RBV-a na vijabilnost stanica (slike 10-12). U slučaju 5-FU i 5-AZC ne postoje literaturni podaci o utjecaju ovih nukleozidnih analoga na virus zaušnjaka stoga su koncentracije odabrane prema rezultatima utjecaja tih nukleozidnih analoga na vijabilnost stanica.

Titar virusnih varijanti ZgA/Cro69 (kultiviranih na staničnoj liniji A549) i MuVi-C (kultiviranih na staničnim linijama Vero i LLC-MK2) smanjen je pod utjecajem RBV-a ovisno o njegovoj koncentraciji. Učinak na virus zaušnjaka ovisan o dozi u skladu je s istraživanjem McCammona i sur. (80). Vrijednost 50%-tne inhibitorne doze (eng. *inhibitory concentration*, IC50) RBV-a za virusnu varijantu MuVi-C na staničnoj liniji Vero (46,2 μM) usporediva je s vrijednošću IC50 za soj virusa zaušnjaka WV-3 na staničnoj liniji Vero (56,9 μM) u istraživanju Shigete i sur. (80) u kojem je pokazano da antivirusni učinak RBV-a ovisi i o virusnoj varijanti (vrijednosti dobivene za četiri različita soja zaušnjaka u tom istraživanju bile su u rasponu od 56,9 do 134,3 μM). U istom istraživanju pokazan je i utjecaj RBV-a na različite sojeve drugih paramiksovirusa. Vrijednost IC50 dobivena u ovom istraživanju za virusnu varijantu MuVi-C na staničnoj liniji Vero usporediva je s učinkom na virus ospica

(35,2 – 273 μM), dok se virus parainfluenze pokazao otpornijim (111,4 – 122,8 μM), a respiratorni sincicijski virus (RSV) osjetljivijim na RBV (vrijednost IC₅₀ ovisno o soju RSV-a nalazi se u rasponu između 6,6 – 14,3 μM). Tretman RBV-om primjenjuje se u liječenju bolesti uzrokovane RSV-om. Kombinacija virusne varijante MuVi-C uzgajane na staničnoj liniji LLC-MK2 pokazala se osjetljivijom na RBV od kombinacije iste virusne varijante i stanične linije Vero ili stanične linije A549 što ukazuje na kompleksno međudjelovanje nukleozidnog analoga na stanice i virus s obzirom da je stanična linija LLC-MK2 sama po sebi otpornija na utjecaj RBV-a od stanične linije Vero. Veća osjetljivost virusa na staničnoj liniji LLC-MK2 u usporedbi sa staničnom linijom Vero u skladu je s drugim istraživanjima (110,124). Opaženo je vjerojatno rezultat djelovanja više različitih faktora – razlike u replikaciji virusa između stanica (u istraživanju je pokazano da se isti virus replicira sporije u LLC-MK2, nego u Vero te postiže niži titar) te u kombinaciji različitih mehanizma djelovanja RBV-a na stanice i virus.

S obzirom da je za stanične linije A549 i LLC-MK2 pokazano da smanjenje broja stanica za infekciju nema utjecaj na titar virusa, rezultati tretmana virusne varijante ZgA/Cro69 na A549 odnosno MuVi-C na staničnoj liniji LLC-MK2 5-FU-om ukazuju na direktan utjecaj na virus koji je ovisan o korištenoj dozi 5-FU-a. Ovi rezultati u skladu su s istraživanjem provedenom na virusu goveđe kuge (125) koji kao i virus zaušnjaka pripada porodici *Paramyxoviridae*. Spomenuti virus uzgajan na staničnoj liniji Vero pokazuje nižu osjetljivost na 5-FU od virus zaušnjaka (IC₅₀ iznosi 3,8 μM u odnosu na 34,65 μM).

Pad titra virusa ovisan o dozi 5-AZC-a u skladu je s istraživanjem provedenom na virusu gripe (97) koja spada u porodicu *Orthomyxoviridae*. U navedenom istraživanju korištena je stanična linija MDCK (epitelne stanice psećeg bubrega), a koncentracije 5-AZC u vrijednosti 5, 10 i 15 μM spuštale su vrijednosti titra virusa za vrijednost jednog, dva, odnosno tri logaritma. Usporedna razina osjetljivosti na ovaj nukleozidni analog pokazana je i u ovom istraživanju. Utjecaj 5-AZC-a na viruse iz porodice *Paramyxoviridae* nije istraživao do sada.

Uzastupno kultiviranje virusa u prisustvu nukleozidnih analoga u različitim kombinacijama provedeno je kako bi se ispitalo je li moguće; a) populaciju virusa zaušnjaka dovesti do ekstinkcije i b) hoće li se ovim postupkom ispoljiti virusna varijanta rezistentna na korišteni nukleozidni analog. U slučaju b) očekuje se da će, nakon početnog pada u titru

tretiranog virusa, uzastupnim kultiviranjem doći do izjednačenja tretiranog virusa s titrom kontrolnog virusa koje će se pokazati stabilnim u narednim pasažima (108).

Ovisno o virusu, obično je potrebno 5-15 pasaža za odabir rezistentnog fenotipa povezanog s vjernošću transkripcije polimeraze (108). Međutim, suprotno opažanjima za mnoge druge RNA viruse koji pokazuju pojavu i nakupljanje rezistentnih varijanti tijekom uzastupnih pasaža u subletalnim koncentracijama RBV-a (126–128) ili 5-FU-a (74,128), pokazalo se da, u uzastupnim pasažima virusne varijante ZgA/Cro69 ili MuVi-C u prisustvu RBV-a te MuVi-C u prisustvu 5-FU-a ne dolazi do izjednačavanja titra tretiranog virusa u odnosu na kontrolni virus koji bi bio stabilan. Ne može se isključiti mogućnost da bi se nastavkom kultiviranja virusa u prisustvu RBV-a ili 5-FU-a s vremenom ispoljio virusni mutant rezistentan na ove nukleozidne analoge, no s obzirom na opaženo te u skladu s rezultatima većine već spomenutih istraživanja to nije za očekivati.

U slučaju tretiranja virusne varijante MuVi-C RBV-om, koncentracija od 500 μM u drugom pasažu dovodi do nedetektabilnog titra virusa, a pri korištenju koncentracije od 125 μM , nakon inicijalnog pada, virusna varijanta postiže titar koji se ne izjednačava s titrom kontrolnog virusa, ali se održava na približno istim vrijednostima iz pasaža u pasaž što je u korelaciji s istraživanjem Feigelstocka i sur. (129) provedenom na virusu hepatitisa C. Koncentracija RBV-a od 250 μM u jednom pokusu nakon petog pasaža vodi do nedetektabilnog titra virusa dok u druga dva pokusa virus opstaje uz velike padove i poraste u titru što upućuje na mogućnost da je upravo ova koncentracija granična za opstanak virusne populacije. U spomenutom istraživanju Feigelstocka i sur. (129) koncentracija od 250 μM smanjivala je titar virusa hepatitisa C u prvih pet pasaža, nakon čega je virus u sljedeća dva pasaža postigao titar kontrolnog. Ovako kultivirani virus pokazao je rezistenciju na RBV. Također, u istraživanju kojeg su proveli Borrego i sur. (130) na virusu groznice doline Rift provedeno je uzastupno kultiviranje virusa u različitim koncentracijama nukleozidnog analoga favipiravira. Kod visokih koncentracija nedetektabilni titar postignut je nakon jednog, dva, tri ili pet pasaža, dok je kod nižih koncentracija održavan stabilni titar, nešto niži od vrijednosti kontrolnog virusa. Virus tretiran najnižom koncentracijom favipiravira kod koje je došlo do pojave nedetektabilnog titra - nakon još tri pasaža u normalnom mediju dosegao je titar kontrolnog virusa. Ovaj virus nalazi se na granici ekstinkcije s obzirom da su virusne

populacije tretirane višim koncentracijama favipiravira otišle u ekstinkciju, a virusne populacije tretirane nižim koncentracijama su do kraja pokusa održavale relativno stabilan titar. Kao takvog, možemo ga usporediti s virusnom varijantom MuVi-C tretiranom 250 μ M RBV-om u pokusu u kojem je došlo do nedetektabilnog titra u petom pasažu. Virusni mutant groznice doline Rift pokazao je rezistentnost na nukleozidni analog kojim je bio tretiran te se kasnije pokazalo da ovakva virusna varijanta ima povećanu vjernost transkripcije polimeraze (70). Za razliku od njega, virusna varijanta MuVi-C tretirana RBV-om u koncentraciji od 250 μ M koja je pokazala nedektabilan titar nakon petog pasaža, nije povratila titar ni nakon dodatnih pet pasaža u normalnom mediju. Ovakvi rezultati upućuju na to da u virusnoj populaciji dobivenoj u ovom istraživanju tretmanom virusne varijante MuVi-C 250 μ M RBV-om ne postoji virusna varijanta koja bi imala mutaciju koja bi uzrokovala rezistenciju na RBV, za razliku od virusnih populacija hepatitisa C i virusa groznice doline Rift u spomenutim israživanjima.

U slučaju virusne varijante MuVi-C tretirane RBV-om u koncentraciji 500 μ M, mehanizam koji dovodi do ekstinkcije virusa nije nužno letalna mutageneza s obzirom da je heterogenost ovog virusa u pasažu prije ekstinkcije jednaka heterogenosti koju pokazuje virusna varijanta tretirana koncentracijom RBV-a od 250 μ M iz istog pokusa, a koja opstaje u daljnjim pasažima. Ekstinkcija virusne varijante uslijed tretmana nukleozidnim analogom bez promjene stope mutacije pokazana je za virus HIV-1 u istraživanju Tapie i sur. (131). U ovom istraživanju sama mutageneza mogla bi biti jedan od mehanizama koji dovodi do ekstinkcije ovog virusa, ali nije nužno jedini, stoga nije moguće sa sigurnošću tvrditi da samo promjena u stopi mutacije zaušnjaka utječe na njegovu infektivnost. U slučaju korištenja druga dva nukleozidna analoga u ovom istraživanju, nije moguće povlačiti paralele između stope mutacije virusa i pada titra virusa s obzirom da je ispitana virusna varijanta uzgajana na staničnoj liniji Vero te se ne može razlučiti utjecaj samog smanjenja broja stanica za infekciju na titar od utjecaja samog nukleozidnog analoga.

Na temelju rezultata sekvenciranja metodom NGS napravljena je genska karakterizacija uzoraka od interesa. Kod svih uzoraka su iz analize izbačene promjene zastupljene ispod 1% kao mogući rezultat greške metode. Valja naglasiti da to ne znači da ovakvih promjena nema

u uzorcima, no ne postoji način na koji bi se moglo razlikovati koje su od ovih promjena uistinu prisutne u virusnoj populaciji, a koje su proizvod pogreške metode.

U kontrolnim uzorcima virusne varijante ZgA/Cro69 kultivirane na staničnoj liniji A549, kao i u kontrolnim uzorcima virusne varijante MuVi-C kultivirane na staničnoj liniji Vero u svim analiziranim pasažima prisutne su iste promjene konsenzusa (promjene nisu podudarne između dvije virusne varijante) što pretpostavlja da su ove promjene rezultat prilagodbe virusa na stanice u skladu s teorijom kvazivrste i postojećih istraživanja (30,132,133).

U slučaju virusne varijante ZgA/Cro69 tretirane RBV-om, postoje promjene konsenzusa koje su zajedničke za različite pasaže virusa, ali nisu nužno postojeane iz pasaža u pasaž. Takav rezultat sugerira da detektirane promjene nisu one koje pridonose otpornosti virusa na RBV s obzirom da bi u suprotnom takve promjene trebale biti odabrane daljnim kultiviranjem u nukleozidnom analogu kako su pokazala postojeća istraživanja u kojima je uspješno izolirana virusna varijanta otporna na nukleozidni analog kojim je tretirana (30,36,37,68,132–134).

Jedan od pokazatelja da u virusnoj populaciji dolazi do selekcije varijante rezistentne na nukleozidni analog je njena smanjena heterogenost (108) koja se može izraziti primjenom različitih mjera raznolikosti od kojih su često korištene upravo Shannonova entropija i ukupna raznolikost određivane u ovom istraživanju (106). U postojećim istraživanjima, heterogenost virusne populacije za virusni mutant kod kojeg je dokazano da je došlo do promjene vjernosti transkripcije polimeraze najčešće je smanjena ili povećana za 1,5 do 2 puta u odnosu na heterogenost divljeg tipa virusa (54). Neovisno o primijenjenom nukleozidnom analogu, heterogenost tretiranih virusnih populacija u ovom istraživanju veća je 2 do 9 puta u odnosu na kontrolne uzorke i ishodišni uzorak (osim u slučaju uzorka 4_A1_p1 koji ima usporedive vrijednosti obaju mjera sa svojom kontrolom) što upućuje na zaključak da nukleozidni analozi djeluju na virus zaušnjaka tako da mu povećavaju stopu mutacija u odnosu na ishodišni uzorak. Ovakvi rezultati u skladu s istraživanjem provedenim na virusu gripe u kojem RBV, 5-FU i 5-AZC povećavaju stopu mutacija u virusu, ali ne dolazi do ispoljavanja varijante otporne na nukleozidni analog (97).

Stopa mutacija izračunata po pasažu pokazala je negativnu korelaciju s titrom virusa što bi značilo da povećanjem stope mutacija opada titar virusa što je u skladu s teorijom kvazivrste (30). Analiza je napravljena samo na uzorcima tretiranim RBV-om s obzirom da kod uzoraka tretiranih 5-FU-om i 5-AZC-om na titar virusa utječe i sam broj stanica u sloju stanične kulture Vero.

Niti kod jednog od uzoraka tretiranih RBV-om ili 5-FU-om nije došlo do pojave rezistentnosti na korišteni nukleozidni analog koja bi upućivala na promjenu vjernosti transkripcije virusne polimeraze, dok je kod uzoraka virusne varijante MuVi-C tretirane 5-AZC-om u koncentraciji od 4 μ M pokazana rezistentnost na 5-AZC kod tretiranih virusa iz petog pasaža. Povećana heterogenost kod ovih uzoraka u usporedbi s uzorkom iz pasaža 1 te u odnosu na svoje kontrole upućuje na to da za ovu rezistentnost nije zaslužna jedna virusna varijanta koja je postala dominantna u populaciji što su pokazali i daljnji eksperimenti u kojima su virusne varijante izolirane plak purifikacijom. Iako je uočena razlika u rezistentnosti između pojedinih plakova, ona ni za jedan plak nije pokazala statistički značajnu razliku u odnosu na početni uzorak iz kojeg su plakovi purificirani. Ovakvi rezultati pretpostavljaju da za pokazanu rezistentnost nije zaslužna jedna određena mutacija u genomu suprotno onome što se pokazalo u mnogim istraživanjima ovog tipa (36,63,134–136). Međudjelovanje velikog broja različitih virusnih varijanti prisutnih u virusnoj populaciji mogla bi uvjetovati rezistentnost na nukleozidni analog kao što je predloženo u istraživanju Bessière i sur. (137) u kojem autori pretpostavljaju da bi jedna virusna varijanta unutar iste populacije mogla pružiti funkciju koja nedostaje drugoj varijanti, što bi rezultiralo njihovom suradnjom i većim fitnessom cijele populacije.

Najzastupljenije promjene koje se javljaju u uzorcima tretiranim RBV-om za virusnu varijantu ZgA/Cro69 na staničnoj liniji A549 i MuVi-C na staničnoj liniji Vero su promjene C→T i G→A koje su utvrđene i u istraživanjima utjecaja RBV-a na druge viruse (97,138).

U skladu s istraživanjima mutagenog djelovanja 5-FU-a na druge RNA viruse (46,139), u uzorcima virusne varijante MuVi-C tretiranim 5-FU-om najzastupljenije su promjene T→C i A→G. U svim kontrolnim uzorcima visoko su zastupljene promjene koje u genom dodatno uvode 5-FU ili RBV. Visoka zastupljenost promjene T→C i A→G kod kontrolnih uzoraka vjerojatno su rezultat djelovanja staničnih proteina ADAR koji su dio prirodne

antivirusne obrane i za koje se pokazalo da povećavaju upravo ove mutacije u genomu virusa (140). Svedjedno, u uzorcima tretiranim 5-FU-om ove promjene su statistički značajno zastupljenije nego kod kontrolnih uzoraka. Zastupljenost tranzicijske promjene C→T u virusnom genomu, također bi djelomično mogao biti rezultat djelovanja obrambenih mehanizama stanice, u ovom slučaju APOBEC enzimom (141).

U uzorcima virusne varijante MuVi-C tretiranih 5-AZC-om javljaju se promjene C→G, G→C te A→C koje su i u drugim istraživanjima opisane kao one čiji postota raste djelovanjem ovog nukleozidnog analoga na virus (96,97). U uzorcima ovog istraživanja one su zastupljene ispod 10%, ali nijedna od ovih promjena nije prisutna u kontrolnim uzorcima. Zaključno, u svim analiziranim uzorcima, značajno je veća zastupljenost promjena koje se smatraju specifičnima za svaki pojedini nukleozidni analog. Svojevrсна rezistentnost na nukleozidni analog razvila se u slučaju tretmana MuVi-C 5-AZC-om koji u genom uvodi promjene (C→G, G→C, A→C) koje se prirodno ne javljaju u virusu zaušnjaka tijekom kultiviranja, dok se rezistentnost nije razvila u slučaju tretmana virusa RBV-om ili 5-FU-om koji u virusa zaušnjaka značajno povećavaju zastupljenost promjena koje se nalaze i u virusima koji su uzastupno kultivirani u mediju bez nukleozidnog analoga. Ovakav rezultat upućuje na mogućnost da je na virus potrebno djelovati na način da se potakne nakupljanje mutacija koje se ne javljaju (ili se javljaju u niskom postotku) pri kultiviranju u normalnom mediju kako bi došlo do određene selekcije na što upućuju i rezultati istraživanja RBV-a, 5-FU-a i 5-AZC-a na virus gripe (97).

Ovo istraživanje potvrdilo je antivirusni učinak RBV-a, te isti taj učinak pokazalo i za 5-FU-a i 5-AZC-a kod dvaju različitih varijanti virusa zaušnjaka, kao i njihovo mutageno djelovanje u smislu uvođenja specifičnih promjena i povećanja heterogenosti populacija.

6. ZAKLJUČCI

- 1) Nukleozidni analozi ribavirin, 5-fluorouracil i 5-azacitidin smanjuju titar virusa zaušnjaka *in vitro*.
- 2) Tijekom uzastopnog kultiviranja virusa zaušnjaka u prisustvu ribavirina, 5-fluorouracila i 5-azacitidina u genomu se nakupljaju promjene specifične za svaki od navedenih nukleozidnih analoga.
- 3) Tijekom kultiviranja virusa zaušnjaka u prisustvu odabranih nukleozidnih analoga mijenja se genska varijabilnost virusne populacije. Ona je uvijek veća u tretiranoj virusnoj populaciji u odnosu na kontrolnu.
- 4) Povećanje stope mutacija u virusnim populacijama tijekom uzastopnog kultiviranja u prisustvu nukleozidnih analoga je u negativnoj korelaciji s titrom virusa.
- 5) Uzastupno kultiviranje u prisustvu nukleozidnih analoga nije dovelo do ispoljavanja virusne varijante rezistentne na nukleozidni analog.
- 6) Kultiviranje virusne varijante MuVi-C u prisustvu ribavirina u koncentraciji 500 μM dovelo je do ekstinkcije virusne populacije, no letalna mutageneza nije mogla biti potvrđena.
- 7) Kultiviranje virusne varijante MuVi-C u prisustvu 5-azacitidina dovodi do rezistencije virusne populacije na ovaj nukleozidni analog.

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju ističu mutagenezu i promjenu heterogenosti virusne populacije kao mehanizme prilagodbe virusa zaušnjaka na djelovanje sva tri ispitana nukleozidna analoga što doprinosi boljem razumijevanju biologije i evolucije ovog virusa.

7. LITERATURA

1. Rubin SA, Sauder CJ, Carbone KM. Mumps Virus. In: Fields Virology, 6th Edition. 2013. str.1024–41.
2. Connell AR, Connell J, Leahy TR, Hassan J. Mumps Outbreaks in Vaccinated Populations—Is It Time to Re-assess the Clinical Efficacy of Vaccines? *Front Immunol.* 2020.
3. Llaure AS, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog.* 2010.
4. Rubin S, Eckhaus M, Rennick LJ, Bamford CGG, Duprex WP. Molecular biology, pathogenesis and pathology of mumps virus. *J Pathol.* 2015.
5. Krugman S, Ward R, Katz SL. Mumps (epidemic parotitis). In: *Infectious Diseases of Children* 6th Edition. 1977. str.181–93.
6. Winterhalter-Matas A. Istraživanje genetskih markera virusa parotitisa. 1986. str.1–80
7. Tešović G. Neurovirulencija cjepnog soja virusa mumpsa L-Zagreb. 2006. str.1–137
8. Ivancic J, Gulija TK, Forcic D, Baricevic M, Jug R, Mesko-Prejac M, et al. Genetic characterization of L-Zagreb mumps vaccine strain. *Virus Res.* 2005.
9. Rubin, S.; Eckhaus, M.; Rennick, L.J.; Bamford, C.G.G.; Duprex WP. Molecular biology, pathogenesis and pathology of mumps virus. *JPathol.* 2015.
10. Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. Virus taxonomy: The database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* 2018.
11. Hilleman MR. History of Vaccine Development. *Hist Vaccine Dev.* 2011;207–18.
12. Chang A, Dutch RE. Paramyxovirus fusion and entry: Multiple Paths to a common end. *Viruses.* 2012.
13. Paterson RG, Lamb RA. RNA editing by G-nucleotide insertion in mumps virus P-gene mRNA transcripts. *J Virol.* 1990.
14. Chen M, Ogino T, Banerjee AK. Interaction of Vesicular Stomatitis Virus P and N Proteins: Identification of Two Overlapping Domains at the N Terminus of P That Are Involved in N 0 -P Complex Formation and Encapsidation of Viral Genome RNA . *J*

Viol. 2007.

15. Lamb RA, Parks GD. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Fields Virology, 6th Edition. 2013. str. 957–95.
16. El Najjar F, Schmitt AP, Dutch RE. Paramyxovirus glycoprotein incorporation, assembly and budding: A three way dance for infectious particle production. Viruses. 2014.
17. Domingo E. Quasispecies. In: Encyclopedia of Virology (Second Edition). 1999. str. 1431–1436.
18. Quiñones-Mateu ME, Arts EJ. Virus fitness: Concept, quantification, and application to HIV population dynamics. Curr Top Microbiol Immunol. 2006.
19. Steinhauer DA, Holland JJ. Rapid evolution of RNA viruses. Annu Rev Microbiol. 1987.
20. Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. Gene. 1992.
21. Bernad A, Blanco L, Lázaro JM, Martín G, Salas M. A conserved 3'→5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. Cell. 1989.
22. Peck KM, Lauring AS. Complexities of Viral Mutation Rates. J Virol. 2018.
23. Eigen M, Schuster P. Emergence of the Hypercycle. The Hypercycle. 1979.
24. Domingo E, Martín V, Perales C, Grande-Pérez A, García-Arriaza J, Arias A. Viruses as quasispecies: Biological implications. Curr Top Microbiol Immunol. 2006.
25. Batschelet E, Domingo E, Weissmann C. The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. Gene. 1976.
26. Diseases- I, Farrar J, Diseases T, Chi H, City M, Han AM, et al. Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans. 2013.
27. Haruna I, Spiegelman S. Recognition of size and sequence by an RNA replicase. PNAS USA. 1965.
28. Haruna I, Spiegelman S. Specific template requirements of RNA replicases. PNAS USA. 1965.
29. Spiegelman S, Haruna I, IB H, Beaudreau G, DR M. The synthesis of a self-propagating and infectious nucleic acid with a purified enzyme. PNAS USA. 1965.

30. Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral Quasispecies Evolution. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012.
31. Holmes EC. Error thresholds and the constraints to RNA virus evolution. *Trends Microbiol.* 2003.
32. Domingo E, Perales C. Viral quasispecies. *PLoS Genet.* 2019;15(10):1–20.
33. Bull JJ, Meyers LA, Lachmann M. Quasispecies made simple. *PLoS Comput Biol.* 2005.
34. Hadj Hassine I, Ben M’Hadheb M, Menéndez-Arias L. Lethal Mutagenesis of RNA Viruses and Approved Drugs with Antiviral Mutagenic Activity. *Viruses.* 2022;14(4).
35. Pfeiffer JK, Kirkegaard K. Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathog.* 2005.
36. Pfeiffer JK, Kirkegaard K. A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003.
37. Vignuzzi M, Wendt E, Andino R. Engineering attenuated virus vaccines by controlling replication fidelity. *Nat Med.* 2008.
38. Gnädig NF, Beaucourt S, Campagnola G, Bordería A V., Sanz-Ramos M, Gong P, et al. Coxsackievirus B3 mutator strains are attenuated in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012.
39. Anderson JP, Daifuku R, Loeb LA. Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides. *Annu Rev Microbiol.* 2004.
40. Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. Rapid evolution of viral RNA genomes. *J Nutr.* 1982.
41. Holland JJ, Domingo E, de la Torre JC, Steinhauer DA. Mutation Frequencies at Defined Single Codon Sites in Vesicular Stomatitis Virus and Poliovirus Can Be Increased Only Slightly by Chemical Mutagenesis. *J Virol.* 1990.
42. Camps M, Naukkarinen J, Johnson BP, Loeb LA. Targeted gene evolution in *Escherichia coli* using a highly error-prone DNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003.
43. Loeb LA, Essigmann JM, Kazazi F, Zhang J, Rose KD, Mullins JI. Lethal mutagenesis

- of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999.
44. Johnson K, Dangerfield T. Mechanisms of inhibition of viral RNA replication by nucleotide analogs. In: *The Enzymes*. Elsevier Inc.; 2021. str. 39–59.
 45. Pariente N, Sierra S, Lowenstein PR, Domingo E. Efficient Virus Extinction by Combinations of a Mutagen and Antiviral Inhibitors. *J Virol*. 2001.
 46. Ruiz-Jarabo CM, Ly C, Domingo E, De La Torre JC. Lethal mutagenesis of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Virology*. 2003.
 47. Perales C, Gallego I, De Ávila AI, Soria ME, Gregori J, Quer J, et al. The increasing impact of lethal mutagenesis of viruses. *Future Med Chem*. 2019.
 48. Badgett MR, Auer A, Carmichael LE, Parrish CR, Bull JJ. Evolutionary Dynamics of Viral Attenuation. *J Virol*. 2002.
 49. Minor, PD. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology*, 2015.
 50. Benedicto-Matambo P, Bines JE, Malamba-Banda C, Shawa IT, Barnes K, Kamng'ona AW, et al. Leveraging Beneficial Off-Target Effects of Live-Attenuated Rotavirus Vaccines. *Vaccines*. 2022.
 51. Yadav DK, Yadav N, Khurana SMP. Vaccines: Present Status and Applications *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*. Elsevier; 2013. str. 491–508 p.
 52. Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. Cooperative Interactions Within a Viral Population. *Biochemistry*. 2006.
 53. Gnanashanmugam D, Falkovitz-Halpern MS, Dodge A, Fang M, Wong LJ, Esparza M, et al. Shedding and reversion of oral polio vaccine type 3 in Mexican vaccinees: Comparison of mutant analysis by PCR and enzyme cleavage to a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2007.
 54. Kautz TF, Forrester NL. RNA virus fidelity mutants: A useful tool for evolutionary biology or a complex challenge? *Viruses*. 2018.
 55. Vignuzzi M, Stone JK, Andino R. Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: Molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Res*. 2005.
 56. Graham RL, Becker MM, Eckerle LD, Bolles M, Denison MR, Baric RS. A live,

impaired-fidelity coronavirus vaccine protects in an aged, immunocompromised mouse model of lethal disease. *Nat Med*. 2012.

57. Drake JW, Holland JJ. Mutation rates among RNA viruses. *PNAS*. 1999.
58. Lee CH, Gilbertson DL, Novella IS, Huerta R, Domingo E, Holland JJ. Negative effects of chemical mutagenesis on the adaptive behavior of vesicular stomatitis virus. *J Virol*. 1997.
59. Perales C, Martín V, Domingo E. Lethal mutagenesis of viruses. *Curr Opin Virol*. 2011.
60. Arias A, Arnold JJ, Sierra M, Smidansky ED, Domingo E, Cameron CE. Determinants of RNA-Dependent RNA Polymerase (In)fidelity Revealed by Kinetic Analysis of the Polymerase Encoded by a Foot-and-Mouth Disease Virus Mutant with Reduced Sensitivity to Ribavirin. *J Virol*. 2008.
61. Van Slyke GA, Arnold JJ, Lugo AJ, Griesemer SB, Moustafa IM, Kramer LD, et al. Sequence-Specific Fidelity Alterations Associated with West Nile Virus Attenuation in Mosquitoes. *PLoS Pathog*. 2015.
62. Pauly MD, Lyons DM, Fitzsimmons WJ, Lauring AS. Epistatic Interactions within the Influenza A Virus Polymerase Complex Mediate Mutagen Resistance and Replication Fidelity. *mSphere*. 2017.
63. Kautz TF, Guerbois M, Khanipov K, Patterson EI, Langsjoen RM, Yun R, et al. Low-fidelity Venezuelan equine encephalitis virus polymerase mutants to improve live-attenuated vaccine safety and efficacy. *Virus Evol*. 2018.
64. Liu X, Yang X, Lee CA, Moustafa IM, Smidansky ED, Lum D, et al. Vaccine-derived mutation in motif D of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase lowers nucleotide incorporation fidelity. *J Biol Chem*. 2013.
65. Meng T, Kwang J. Attenuation of Human Enterovirus 71 High-Replication-Fidelity Variants in AG129 Mice. *J Virol*. 2014.
66. Rozen-Gagnon K, Stapleford KA, Mongelli V, Blanc H, Failloux AB, Kramer LD. Alphavirus Mutator Variants Present Host-Specific Defects and [Internet]. *Alphavirus Mutator Variants Present Host-Specific Defects and*. 2014.
67. Smith CE, Sexton NR, Denison MR. Thinking outside the triangle: replication fidelity

- of the largest RNA viruses. *Annu Rev Virol.* 2014.
68. Coffey LL, Beeharay Y, Bordería A V., Blanc H, Vignuzzi M. Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011.
 69. Arias A, Thorne L, Ghurburrun E, Bailey D, Goodfellow I. Norovirus Polymerase Fidelity Contributes to Viral Transmission In Vivo . *mSphere.* 2016.
 70. Borrego B, Brun A. A hyper-attenuated variant of Rift Valley fever virus generated by a mutagenic drug (favipiravir) unveils potential virulence markers. *Front Microbiol.* 2021.
 71. Smith EC, Case JB, Blanc H, Isakov O, Shomron N, Vignuzzi M, et al. Mutations in Coronavirus Nonstructural Protein 10 Decrease Virus Replication Fidelity. *J Virol.* 2015.
 72. Rai DK, Diaz-San Segundo F, Campagnola G, Keith A, Schafer EA, Kloc A, et al. Attenuation of Foot-and-Mouth Disease Virus by Engineered Viral Polymerase Fidelity. *J Virol.* 2017.
 73. Eckerle LD, Lu X, Sperry SM, Choi L, Denison MR. High Fidelity of Murine Hepatitis Virus Replication Is Decreased in nsp14 Exoribonuclease Mutants. *J Virol.* 2007.
 74. Stapleford KA, Rozen-Gagnon K, Das KP, Saul S, Poirier EZ, Blanc H, et al. Viral Polymerase-Helicase Complexes Regulate Replication Fidelity To Overcome Intracellular Nucleotide Depletion. *J Virol.* 2015.
 75. Kataev VE, Garifullin BF. Antiviral nucleoside analogs. *Chem Heterocycl Compd.* 2021.
 76. Seley-Radtke KL, Yates MK. The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Res [Internet].* 2018.
 77. Franco EJ, Rodriquez JL, Pomeroy JJ, Hanrahan KC, Brown AN. The effectiveness of antiviral agents with broad-spectrum activity against chikungunya virus varies between host cell lines. *Antivir Chem Chemother.* 2018.
 78. Graci JD, Cameron CE. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev Med Virol.* 2006.
 79. McCammon JR, Riesser VW. Effects of ribavirin on BHK-21 cells acutely or

- persistently infected with mumps virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979.
80. Shigeta S, Mori S, Baba M, Ito M, Honzumi K, Nakamura K, et al. Antiviral activities of ribavirin, 5-ethynyl-1- β -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide, and 6'-(R)-6'-C-methylnepanocin A against several ortho- and paramyxoviruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992.
 81. Mathur P, Kottilil S, Wilson E. Use of ribavirin for hepatitis c treatment in the modern direct-acting antiviral era. *J Clin Transl Hepatol.* 2018.
 82. Cornberg M, Manns MP. New approaches and therapeutic modalities for the treatment of patients with chronic hepatitis C. *Ann Hepatol Off J Mex Assoc Hepatol.* 2005.
 83. Eberhardt KA, Mischlinger J, Jordan S, Groger M, Günther S, Ramharther M. Ribavirin for the treatment of Lassa fever: A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2019.
 84. Nguyen JT, Hoopes JD, Le MH, Smee DF, Patick AK, Faix DJ, et al. Triple combination of amantadine, ribavirin, and oseltamivir is highly active and synergistic against drug resistant influenza virus strains in vitro. *PLoS One.* 2010.
 85. Xu Y, Li M, Zhou L, Liu D, He W, Liang W, et al. Ribavirin Treatment for Critically Ill COVID-19 Patients: An Observational Study. *Infect Drug Resist.* 2021.
 86. Zeng J, Wang H, Xie X, Li C, Zhou G, Yang D, et al. Ribavirin-Resistant Variants of Foot-and-Mouth Disease Virus : the Effect of Restricted Quasispecies Diversity on Viral Virulence. 2014.
 87. Shah NR, Sunderland A, Grdzlishvili VZ. Cell type mediated resistance of vesicular stomatitis virus and sendai virus to ribavirin. *PLoS One.* 2010.
 88. Cheung PPH, Watson SJ, Choy K-T, Sia SF, Wong Diana DY, Poon LL, et al. Generation and characterization of influenza A viruses with altered polymerase fidelity. *Nat Commun.* 2015.
 89. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003.
 90. Parker JB, Stivers JT. Dynamics of uracil and 5-fluorouracil in DNA. *Biochemistry.* 2011.
 91. Huang J, Shen H, Wang Z, Huang S, Li Q, Zhou Q, et al. Attenuation of duck Tembusu

virus ZJSBL01 strain following serial passage in BHK-21 cells supplied with 5-Fluorouracil. *Virus Research* 2019.

92. Focaccetti C, Bruno A, Magnani E, Bartolini D, Principi E, Dallaglio K, et al. Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. Vol. 10, *PLoS ONE*. 2015.
93. Rawson JMO, Daly MB, Xie J, Clouser CL, Landman SR, Reilly CS, et al. 5-Azacytidine enhances the mutagenesis of HIV-1 by reduction to 5-aza-2'-deoxycytidine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016.
94. Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: Mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*. 2002.
95. Füller M, Klein M, Schmidt E, Rohde C, Göllner S, Schulze I, et al. 5-azacytidine enhances efficacy of multiple chemotherapy drugs in AML and lung cancer with modulation of CpG methylation. *Int J Oncol*. 2015.
96. Dapp MJ, Clouser CL, Patterson S, Mansky LM. 5-Azacytidine Can Induce Lethal Mutagenesis in Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol*. 2009.
97. Pauly MD, Luring AS. Effective Lethal Mutagenesis of Influenza Virus by Three Nucleoside Analogs. *J Virol*. 2015.
98. Stephanopoulos DE, Kappes JC, Bernstein DI. Enhanced in vitro reactivation of herpes simplex virus type 2 from latency infected guinea-pig neural tissues by 5-azacytidine. *J Gen Virol*. 1988.
99. Estekizadeh A, Landázur N, Bartek J, Brøchner CB, Davoudi B, Broholm H, et al. Increased cytomegalovirus replication by 5-Azacytidine and viral-induced cytoplasmic expression of DNMT-1 in medulloblastoma and endothelial cells. *Int J Oncol*. 2018.
100. Arribas M, Cabanillas L, Lázaro E. Identification of mutations conferring 5-azacytidine resistance in bacteriophage Q β . *Virology*. 2011.
101. Kiziltepe T, Hideshima T, Catley L, Raje N, Yasui H, Shiraishi N, et al. 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib

- against multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther.* 2007.
102. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012.
 103. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009.
 104. Yang X, Charlebois P, Macalalad A, Henn MR, Zody MC. V-Phaser 2: Variant inference for viral populations. *BMC Genomics.* 2013.
 105. Orton RJ, Wright CF, Morelli MJ, King DJ, Paton DJ, King DP, et al. Distinguishing low frequency mutations from RT-PCR and sequence errors in viral deep sequencing data. *BMC Genomics.* 2015.
 106. Zhao L, Illingworth CJR. Measurements of intrahost viral diversity require an unbiased diversity metric. *Virus Evol.* 2019.
 107. Jurković M, Slović A, Forčić D, Ivančić-Jelečki J, Košutić-Gulija T, Jagušić M. Influence of Ribavirin on Mumps Virus Population Diversity. *Viruses.* 2021;13(12).
 108. Beaucourt S, Bordería A V., Coffey LL, Gnädig NF, Sanz-Ramos M, Beeharri Y, et al. Isolation of fidelity variants of RNA viruses and characterization of virus mutation frequency. *J Vis Exp.* 2011.
 109. Adedeji AO, Sarafianos SG. Future treatment strategies for novel Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Future Med Chem.* 2013;5(18):2119–22.
 110. Falzarano D, De Wit E, Martellaro C, Callison J, Munster VJ, Feldmann H. Inhibition of novel β coronavirus replication by a combination of interferon- α 2b and ribavirin. *Sci Rep.* 2013.
 111. Vita E De. Clinical cases. *Psicoter e Sci Um.* 2021.
 112. Huffman JH, Sidwell RW, Khare GP, Witkowski JT, Allen LB, Robins RK. 3-Carboxamide (Virazole , ICN 1229) on Deoxyribonucleic Acid and Ribonucleic Acid Viruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 1973.
 113. Jiang X, Ma K, Hu C, Gao M, Zhang J, Wang Y, et al. Evaluation of 5-fluorouracil-treated lung cancer cells by atomic force microscopy. *Anal Methods.* 2019.
 114. Taskin MH, Kurucay HN, Kadi H, Tamer C, Ozan E, Muftuoglu B, et al. Infectivity and Replication Inhibition Effect of 5-Fluorouracil on Herpes Simplex Virus Type-1

- Associated With Mutations in Thymidine Kinase Gene. *Farmacia*. 2022.
115. Nguyen AN, Hollenbach PW, Richard N, Luna-Moran A, Brady H, Heise C, et al. Azacitidine and decitabine have different mechanisms of action in non-small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer Targets Ther*. 2010.
 116. Ma H, Ma Y, Ma W, Williams DK, Galvin TA, Khan AS. Chemical Induction of Endogenous Retrovirus Particles from the Vero Cell Line of African Green Monkeys. *J Virol*. 2011.
 117. Šantak M, Markušić M, Bališa ML, Kopač SK, Jug R, Örvell C, et al. Accumulation of defective interfering viral particles in only a few passages in Vero cells attenuates mumps virus neurovirulence. *Microbes Infect*. 2015.
 118. Dill V, Ehret J, Zimmer A, Beer M, Eschbaumer M. Cell Density Effects in Different Cell Culture Media. 2019.
 119. Rosen O, Jayson A, Goldvaser M, Dor E, Monash A, Levin L, et al. Optimization of VSV-ΔG-spike production process with the Ambr15 system for a SARS-COV-2 vaccine. *Biotechnol Bioeng*. 2022.
 120. Lindsay DA, Betenbaugh MJ. Quantification of cell culture factors affecting recombinant protein yields in baculovirus-infected insect cells. *Biotechnol Bioeng*. 1992.
 121. Thomassen YE, Rubingh O, Wijffels RH, van der Pol LA, Bakker WAM. Improved poliovirus D-antigen yields by application of different Vero cell cultivation methods. *Vaccine*. 2014.
 122. Bock A, Schulze-Horsel J, Schwarzer J, Rapp E, Genzel Y, Reichl U. High-density microcarrier cell cultures for influenza virus production. *Biotechnol Prog*. 2011.
 123. Perrin P, Madhusudana S, Gontier-Jallet C, Petres S, Tordo N, Merten OW. An experimental rabies vaccine produced with a new BHK-21 suspension cell culture process: use of serum-free medium and perfusion-reactor system. *Vaccine*. 1995.
 124. Beaucourt, Stephanie, Vignuzzi M. Ribavirin: a drug active against many viruses with multiple effects on virus replication and propagation. Molecular basis of ribavirin resistance. *Curr Opin Virol*. 2014.
 125. Ghosh A, Nayak R, Shaila MS. Inhibition of replication of rinderpest virus by 5-

- fluorouracil. *Antiviral Res.* 1996.
126. Sadeghipour S, Bek EJ, McMinin PC. Ribavirin-Resistant Mutants of Human Enterovirus 71 Express a High Replication Fidelity Phenotype during Growth in Cell Culture. *J Virol.* 2013.
 127. Levi LI, Gnädig NF, Beaucourt S, McPherson MJ, Baron B, Arnold JJ, et al. Fidelity Variants of RNA Dependent RNA polymerases uncover an indirect, mutagenic activity of amiloride compounds. *PLoS Pathog.* 2010.
 128. Zeng J, Wang H, Xie X, Yang D, Zhou G, Yu L. An increased replication fidelity mutant of foot-and-mouth disease virus retains fitness in vitro and virulence in vivo. *Antiviral Res.* 2013.
 129. Feigelstock DA, Mihalik KB, Feinstone SM. Selection of hepatitis C virus resistant to ribavirin. *Virol J.* 2011.
 130. Borrego B, De Ávila AI, Domingo E, Brun A. Lethal mutagenesis of Rift Valley fever virus induced by favipiravir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019.
 131. Tapia N, Fernández G, Parera M, Gómez-Mariano G, Clotet B, Quiñones-Mateu M, et al. Combination of a mutagenic agent with a reverse transcriptase inhibitor results in systematic inhibition of HIV-1 infection. *Virology.* 2005.
 132. Chaudhry MZ, Eschke K, Hoffmann M, Grashoff M, Abassi L, Kim Y, et al. Rapid SARS-CoV-2 Adaptation to Available Cellular Proteases. *J Virol.* 2022.
 133. Chung H, Noh JY, Koo BS, Hong JJ, Kim HK. SARS-CoV-2 mutations acquired during serial passage in human cell lines are consistent with several of those found in recent natural SARS-CoV-2 variants. *Comput Struct Biotechnol J.* 2022.
 134. Riemersma KK, Steiner C, Singapuri A, Coffey LL. Chikungunya Virus Fidelity Variants Exhibit Differential Attenuation and Population Diversity in Cell Culture and Adult Mice. *J Virol.* 2019.
 135. Sierra M, Airaksinen A, González-López C, Agudo R, Arias A, Domingo E. Foot-and-Mouth Disease Virus Mutant with Decreased Sensitivity to Ribavirin: Implications for Error Catastrophe. *J Virol.* 2007.
 136. Goldhill DH, Te Velthuis AJW, Fletcher RA, Langat P, Zambon M, et al. The mechanism of resistance to favipiravir in influenza. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018.

137. Bessière P, Volmer R. From one to many: The within-host rise of viral variants. *PLoS Pathog.* 2021.
138. Crotty S, Cameron CE, Andino R. RNA virus error catastrophe: Direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001.
139. Agudo R, Arias A, Domingo E. 5-Fluorouracil in Lethal Mutagenesis of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Future Med Chem.* 2009.
140. Song Y, He X, Yang W, Tang T, Zhang R. ADAR mediated A-to-I RNA editing affects SARS-CoV-2 characteristics and fuels its evolution. *bioRxiv Prepr Serv Biol.* 2021.
141. Simmonds P, Azim Ansari M. Extensive C->U transition biases in the genomes of a wide range of mammalian RNA viruses; potential associations with transcriptional mutations, damage- or host-mediated editing of viral RNA. *PLoS Pathog.* 2021.

POPIS KRATICA

RNA – ribonukleinska kiselina (eng. *ribonucleic acid*)

RBV – ribavirin

5-FU – 5-fluorouracil

5-AZC – 5-azacitidin

RNP – ribonukleoproteinski kompleks

RdRp - RNA-ovisna RNA polimeraza (eng. *RNA-dependent RNA polymerase*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

RMP – ribavirin monofosfat

RDP – ribavirin difosfat

RTP – ribavirin trifosfat

IMPDH - inozin monofosfat dehidrogenaza

5-FUMP – 5-fluorouracil monofosfat

5-FUDP - 5-fluorouracil difosfat

5-FUTP - 5-fluorouracil trifosfat

5-AZC-CTP - 5-azacitidin trifosfat

ECACC – banka staničnih linija (eng. *European Collection of Authenticated Cell Cultures*).

MEM – minimalni esencijalni medij (eng. *minimum essential medium*)

DMEM - Dulbeccov modificirani Eagle medij (eng. *Dulbecco's modified Eagle's medium*)

FTS – fetalni teleći serum

DMSO – dimetil sulfoksid

NEAA – neeasencijalne aminokiseline

PBS – fosfatni pufer (eng. *phosphate buffered saline*)

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolijev bromid

MOI - omjer infektivnih virusnih čestica i izraslih stanica (eng. *multiplicity of infection*)

CPE – citopateogeni efekt

PFU – jedinica stvaranja plakova (eng. *plaque forming unit*, PFU)

dNTP – deoksiribonuleozidni trifosfati

NGS – sekvenciranje nove generacije (eng. *next-generation sequencing*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*)

T_a – temperatura prijanjanja početnica (eng. *temperature of annealing*)

t_e – temperatura elongacije (eng. *temperature of elongation*)

RT – reverzna transkripcija

cDNA – komplementarna DNA (eng. *complementary DNA*)

IC₅₀ – 50%-tna inhibitorna doza (eng. *half-maximal inhibitory concentration*)

8. ŽIVOTOPIS

Mirna Jurković rođena je 15. svibnja 1992. godine u Rijeci, gdje završava osnovnu i srednju školu. Godine 2011. upisuje preddiplomski studij Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu koji završava 2014. godine sa završnim radom „Neuroendokrina kontrola roditeljskog ponašanja“ pod vodstvom prof.dr.sc. Dubravke Hranilović. Iste godine upisuje diplomski studij Eksperimentalne biologije – Fiziologija i imunobiologija koji završava 2017. godine s diplomskim radom „Morfološka analiza i utvrđivanje srodstva Ostrogota s umjetno deformiranim lubanjama“ pod vodstvom akademika prof.dr.sc. Marija Šlausa i izv.prof.dr.sc. Inge Urlić (u to vrijeme Marijanović). Za vrijeme studija volontirala je u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Instituta Ruđer Bošković, u Laboratoriju za neurofiziologiju – *whole cell patch clamp* Zavoda za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu te u Antropološkom centru Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. 2018. godine zapošljava se u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu kao asistent na projektu Centar izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva (CERVirVac) - Jačanje kapaciteta CERVirVac-a za istraživanja u virusnoj imunologiji i vakcinologiji pod vodstvom akademika prof.dr.sc. Stipana Jonjića. Iste godine upisuje doktorski studij Biologije na PMF-u. Koautor je 3 izvorna znanstvena rada indeksirana u bazi Web of Science, a aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova predstavljanjem svojih istraživanja kroz postere ili predavanja. Od 2023. zaposlena je na Zavodu za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

PUBLIKACIJE

1. Ljubin-Sternak S, Slović A, Mijač M, **Jurković M**, Forčić D, Ivković-Jureković I, Tot T, Vraneš, Jasmina (2021) Prevalence and molecular characterization of human bocavirus detected in croatian children with respiratory infection, Viruses.

2. Slović A, Košutić Gulija T, Forčić D, Šantak M, Jagušić M, **Jurković M**, Pali D, Ivančić-Jelečki J (2021) Population Variability Generated during Rescue Process and Passaging of Recombinant Mumps Viruses, Viruses-Basel.

3. **Jurković M**, Slović A, Forčić D, Ivančić-Jelečki J, Košutić Gulija T, Jagušić (2021) Influence of Ribavirin on Mumps Virus Population Diversity, Viruses-Basel.