



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

DOROTEA PALI

**BIOLOŠKE OSOBITOSTI KIMERNIH VIRUSA
TEMELJENIH NA VIRUSU ZAUŠNJAKA S
UGRAĐENIM GENIMA ZA POVRŠINSKE
PROTEINE VIRUSA HEPATITISA C**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

DOROTEA PALI

**BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF
CHIMERIC VIRUSES BASED ON MUMPS
VIRUS WITH INSERTED GENES FOR
SURFACE PROTEINS OF HEPATITIS C
VIRUS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025.

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

Istraživanje je provedeno u okviru projekata „Jačanje kapaciteta CerVirVac-a za istraživanja u virusnoj imunologiji i vakcinologiji”, KK.01.1.1.01.0006, i „Znanstveni centar izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva“. Oba projekta sufinancirani su sredstvima Europskog fonda za regionalni razvoj.

INFORMACIJE O MENTORICI

Dr. sc. Jelena Ivančić Jelečki završila je 2000. godine diplomski studij biologije, smjer molekularna biologija, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Iduće godine zaposlila se kao asistentica 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 je sudjelovala kao suradnica na više znanstvenih i tehnologijskih projekata. Poslijediplomski studij pohađala je na Sveučilištu u Zagrebu, a doktorsku disertaciju pod naslovom „Osobitosti pročišćavanja genomske DNA iz složenih bioloških suspenzija na metakrilatnim monolitnim kromatografskim nosačima” obranila je 2010. godine. Mentor joj je bio dr. sc. Dubravko Forčić.

Od 2013. nastavila je svoj rad kao znanstvena suradnica u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu, a 2019. je postala viša znanstvena suradnica. U razdoblju 2011.-2013. bila je voditeljica projekta „The influence of viral population diversity on safety and immunogenicity of licensed mumps vaccine strain“ kojeg je financirala Europska komisija, kao dio kolaborativnog infrastrukturnog projekta TRANSVAC iz programa FP7. Od 2019. do 2022. bila je voditeljica na partnerskoj instituciji za projekt „Robusne i adaptabilne biološke platforme za nova cjepiva” financiranog od Europskog fonda za regionalni razvoj. Od drugih projekata na kojima je sudjelovala ističu se „Genomika i molekularna epidemiologija humanih paramiksovirusa u Hrvatskoj“ (voditelj dr. sc. Dubravko Forčić, financirala Hrvatska zaklada za znanost, 2014.-2018.) te „Jačanje kapaciteta CerVirVaca za istraživanja u virusnoj imunologiji i vakcinologiji“ (voditelj prof. dr. sc. Stipan Jonjić, financirao Europski fond za regionalni razvoj, 2017.-2023.).

U svom radu je orijentirana na istraživanje RNA virusa, posebice virusa zaušnjaka i ospica. Bavi se istraživanjem virusne genomike, genomske osnove atenuacije te racionalnim dizajnom novih cjepiva. Njezina istraživanja rezultirala su koautorstvom na 32 originalna znanstvena rada objavljena u časopisima citiranim u bazi Web of Science i s više od 30 prezentacija na međunarodnim konferencijama i seminarima. Od 2016. suradnica je Svjetske zdravstvene organizacije u sklopu Nacionalnog laboratorija za ospice/rubelu. Kao gost predavač sudjeluje na kolegijima „Mikrobiologija patogena“ na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te „Eksperimentalni razvoj vakcina“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci.

ZAHVALE

Za početak, htjela bih se najviše zahvaliti svojoj mentorici, dr. sc. Jeleni Ivančić Jelečki na ukazanom povjerenju tijekom ovih nekoliko godina suradnje. Hvala Vam na vodstvu koje ste mi pružili u mom istraživačkom radu, za nova znanja i korisne savjete koje ste mi prenijeli te za potporu u trenucima kada su svi rezultati bili negativni. Vi ste me naučili da u istraživačkom poslu stvari često ne idu kako smo si zamislili, ali da upravo to svaki uspjeh čini vrijednim truda.

Zahvaljujem i svojim kolegicama, dr. sc. Tanji Košutić Guliji, dr. sc. Maji Jagušić, dr. sc. Anamariji Slović i dr. sc. Mirni Jurković, za svaki savjet u laboratoriju, za svaku novu ideju koju bih dobila u razgovoru s njima te za druženja koja su radnu svakodnevnicu učinila manje zahtjevnom.

Hvala svim bivšim i sadašnjim članovima Centra na ugodnoj radnoj atmosferi, a posebna hvala ing. Renati Jug i Višnji Šaronji za svu nesebičnu pomoć koju su mi pružile u eksperimentalnom radu. Hvala vam što ste mogle uskočiti kada god je to bilo potrebno, bez vas procesi kloniranja i rada sa staničnim kulturama bi trajali znatno dulje od predviđenoga.

Velike zahvale tetema iz referade koje su mi nebrojeno puta izašle u susret te su imale razumijevanja, volje i želje riješiti svaki problem na putu.

Zahvaljujem i svojim kolegama iz tvrtke Makpharm d.o.o. koji su imali razumijevanja i omogućili mi da se posvetim završetku ove disertacije.

Hvala svim prijateljima koji su bili uz mene tijekom izrade ovog rada, slušali sve moje jadikovke o neuspjelim eksperimentima i problematičnim statističkim analizama te su imali razumijevanja za manjak vremena koje sam imala za njih. Velika hvala mojim curama, Katarini i Pauli, koje su cijelo ovo putovanje odradile skupa sa mnom i bile moj oslonac, one najbolje razumiju koliki je ovo uspjeh.

I za kraj, željela bih zahvaliti svojoj obitelji i Marku na podršci koju su mi pružili tijekom ovih nekoliko godina doktorata, ali i tijekom cijelog studiranja. Vi ste ti koji ste vidjeli svaki osmijeh i svaku suzu – bez vaše pomoći ovaj uspjeh se ne bi mogao ostvariti!

BIOLOŠKE OSOBITOSTI KIMERNIH VIRUSA TEMELJENIH NA VIRUSU ZAUŠNJAKA S UGRAĐENIM GENIMA ZA POVRŠINSKE PROTEINE VIRUSA HEPATITISA C

DOROTEA PALI

Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu

Rekombinantni virusi bazirani na atenuiranim sojevima virusa zaušnjaka jedna su od bioloških platformi za vektorska cjepiva. Tijekom njihova razvoja nužno je istražiti gensku stabilnost proizvedenih kimernih virusa jer mutacije i promjene u strukturi virusne kvazivirte mogu utjecati na atenuacijski i imunosni profil cijepnog soja. U ovom istraživanju su dizajnirana i proizvedena dva kimerna virusa temeljena na konsenzus sekvenciji soja L-Zagreb s ugrađenim genima za površinske proteine virusa hepatitisa C (HCV). Virus su dobiveni u visokom titru, no tijekom kultivacije na dvije vrste stanica za proizvodnju cjepiva uočene su genske promjene koje su uzrokovale smanjenje ekspresije gena HCV-a. Za virus koji je imao veću gensku stabilnost su ispitane imunogeničnost i neškodljivost u animalnim modelima. Rezultati su pokazali da virus nije dovoljno neuroatenuiran i da ne inducira snažne imunosne odgovore na HCV. Istraživanje naglašava potrebu za strogom kontrolom genske stabilnosti tijekom razvoja cjepiva.

215 stranica, 42 slike, 25 tablica, 5 tablica u prilogu, 210 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski

Ključne riječi: virus zaušnjaka, tehnologija reverzne genetike, rekombinantna vektorska cjepiva, RNA virusi, varijabilnost virusne populacije, hepatitis C

Mentor: dr. sc. Jelena Ivančić Jelečki, viši znanstveni suradnik

Ocjenjivači: dr. sc. Tanja Košutić Gulija, znanstveni suradnik
izv. prof. dr. sc. Silvija Černi
dr. sc. Dragomira Majhen, znanstveni savjetnik

**BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF CHIMERIC VIRUSES BASED ON MUMPS VIRUS
WITH INSERTED GENES FOR SURFACE PROTEINS OF HEPATITIS C VIRUS**

DOROTEA PALI

Centre for Research and Knowledge Transfer in Biotechnology of University of Zagreb

Recombinant viruses based on attenuated mumps strains are one of biological platforms for vector vaccines. During their development, it is necessary to investigate the genetic stability of produced chimeric viruses because mutations and changes in viral quasispecies structure can influence attenuation and immune profile of vaccine strain. In this study, two chimeric viruses were designed and produced using consensus sequence of L-Zagreb, with genes encoding hepatitis C virus (HCV) surface proteins inserted. Viruses were obtained in high titers; however, genetic changes leading to reduced HCV gene expression were observed during cultivation in two cell types suitable for vaccine production. The virus showing higher genetic stability was evaluated for immunogenicity and safety in animal models. It was insufficiently neuroattenuated and failed to induce strong immune responses to HCV. This study highlights the need for strict control of genetic stability during vaccine development.

215 pages, 42 figures, 25 tables, 5 supplementary tables, 210 references, original in Croatian

Keywords: mumps virus, reverse genetics technology, recombinant vector vaccines, RNA viruses, virus population diversity, hepatitis C

Supervisor: Senior Research Associate Jelena Ivančić Jelečki, PhD

Reviewers: Research Associate Tanja Košutić Gulija, PhD

Associate Professor Silvija Černi, PhD

Scientific Advisor Dragomira Majhen, PhD

Sadržaj

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Bolest zaušnjaka; značajke i prevencija.....	4
2.1.1. Patogeneza i klinička manifestacija	4
2.1.2. Živa atenuirana cjepiva protiv zaušnjaka.....	4
2.1.3. Testiranje neurovirulentnosti cjepiva protiv zaušnjaka	5
2.2. Virus zaušnjaka.....	6
2.2.1. Struktura viriona i organizacija genoma	6
2.2.2. Replikacija, transkripcija i virusni ciklus.....	9
2.2.3. Specifičan imunosni odgovor na infekciju	12
2.3. Heterogeni sastav populacija RNA virusa	13
2.4. Replikacijsko-kompetentni rekombinantni RNA virusi	15
2.4.1. Tehnologija reverzne genetike	15
2.4.2. Proizvodnja rekombinantnih nesegmentiranih negativnih RNA virusa	19
2.4.2.1. Svojstva nesegmentiranih negativnih RNA virusa kao vektora	19
2.4.2.2. Čimbenici koji utječu na uspješnost proizvodnje	20
2.4.2.3. Genska stabilnost insertiranih sekvencija	21
2.4.3. Pregled vektorskih cjepiva baziranih na nesegmentiranim negativnim RNA virusima	23
2.4.4. Rekombinantni virusi temeljeni na genomu virusa zaušnjaka.....	26
2.5. Vektorska cjepiva protiv virusa hepatitisa C	27
2.5.1. Virus hepatitisa C.....	27
2.5.2. Teret bolesti i postojeća terapija	28
2.5.3. Razvoj profilaktičkog cjepiva	29
2.5.4. Proteini E1 i E2 u dizajnu vektorskih cjepiva.....	30

3. MATERIJALI I METODE	34
3.1. Materijali.....	34
3.1.1. Biološki materijali.....	34
3.1.1.1. Plazmidi	34
3.1.1.2. Bakterijski sojevi	35
3.1.1.3. Stanične linije.....	36
3.1.1.4. Virusi.....	36
3.1.1.5. Rekombinantni proteini	38
3.1.1.6. Antitijela	38
3.1.1.7. Laboratorijske životinje	39
3.1.2. Početnice, kemikalije, kompleti reagensa, enzimi i otopine.....	39
3.1.2.1. Početnice	39
3.1.2.2. Kemikalije.....	40
3.1.2.3. Kompleti reagensa	43
3.1.2.4. Enzimi	44
3.1.2.5. Otopine, puferi i mediji.....	45
3.1.3. Oprema.....	47
3.1.4. Računalni programi i alati.....	49
3.1.5. Potrošni materijali.....	50
3.2. Metode	51
3.2.1. Dizajn sintetskih sljedova DNA koji kodiraju površinske glikoproteine virusa hepatitisa C.....	51
3.2.2. Umnažanja lančanom reakcijom polimerazom.....	54
3.2.2.1. Umnažanje fragmenata za kloniranje u pMRV2	55
3.2.2.2. Umnažanje čitavih genoma kimernih virusa.....	56
3.2.2.3. Umnažanje dijelova genoma kimernih virusa.....	58

3.2.3. Elektroforeza u agaroznom gelu, pročišćavanje produkata lančane reakcije polimerazom i određivanje koncentracije DNA	59
3.2.4. Kloniranje produkata lančane reakcije polimerazom u plazmidni vektor	60
3.2.5. Priprema kompetentnih bakterija <i>E. coli</i> soja DH5 α	61
3.2.6. Transformacija bakterija <i>E. coli</i> plazmidnim vektorom	61
3.2.7. Izolacija plazmidne DNA	62
3.2.8. Uzgoj staničnih kultura	63
3.2.9. <i>De novo</i> proizvodnja kimernih virusa postupkom reverzne genetike.....	64
3.2.10. Infekcija staničnih kultura.....	66
3.2.11. Određivanje virusnog titra	68
3.2.11.1. Određivanje virusnog titra testom određivanja 50%-tne infektivne doze virusa u kulturi stanica procjenom citopatogenog efekta	68
3.2.11.2. Određivanje virusnog titra testom plakiranja.....	69
3.2.12. Razdvajanje virusnih varijanti postupkom plakiranja.....	70
3.2.13. Izolacija ukupne virusne RNA.....	70
3.2.14. Reverzna transkripcija	70
3.2.15. Priprema biblioteka DNA i sekvenciranje metodom nove generacije.....	71
3.2.16. Obrada očitavanja dobivenih sekvenciranjem metodom nove generacije.....	72
3.2.17. Genska karakterizacija virusa	73
3.2.18. Priprema staničnog lizata i određivanje koncentracije proteina	74
3.2.19. Westernska metoda otiska.....	75
3.2.19.1. Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima...	75
3.2.19.2. Prijenos proteina na membranu	75
3.2.19.3. Imunodetekcija proteina na membrani.....	76
3.2.20. Imunizacija zamorčića i obrada uzoraka za analize imunosnih odgovora.....	76

3.2.21. Enzimski imunotest na čvrstoj fazi za određivanje titra antitijela IgG specifičnih za virus zaušnjaka.....	77
3.2.22. Kapljična analiza proteina.....	78
3.2.23. Test neurovirulencije <i>in vivo</i> na novookoćenim štakorima	80
3.2.24. Statistička obrada rezultata	81
3.2.25. Prikupljanje podataka.....	81
3.2.25.1. Podaci dobivenih sekvenciranjem metodom nove generacije	81
3.2.25.2. Podaci za analizu alatom BLAST	82
3.2.26. Pregled korištenih metoda.....	82
4. REZULTATI.....	85
4.1. Dizajn i priprema rekombinantnih plazmida i provjera njihovih sekvencija.....	85
4.2. Dobivanje i karakterizacija kimernih virusa	86
4.2.1. Umnažanje kimernih virusa na staničnoj liniji Vero	87
4.2.2. Genska karakterizacija pred-matičnih i matičnih serija kimernih virusa.....	87
4.2.3. Kinetika replikacije i morfološka karakterizacija citopatogenog efekta kimernih virusa	93
4.3. Genska karakterizacija virusa uzastopno kultiviranih na stanicama Vero.....	95
4.3.1. Genska stabilnost virusnih populacija tijekom uzastopnog kultiviranja.....	98
4.3.1.1. Mjere raznolikosti virusnih populacija	98
4.3.1.2. Frekvencija heterogenih mjesta po genima.....	102
4.3.1.3. Konsenzusne promjene	104
4.3.1.4. Heterogena mjesta u dodatnim transkripcijskim jedinicama	108
4.3.1.5. Distribucija heterogenih mjesta u kodirajućim i nekodirajućim regijama.....	110
4.3.2. Selekcija zajedničkih varijabilnih pozicija	114
4.3.2.1. Supstitucija Pro408Leu u proteinu L	114
4.3.2.2. Zajedničke promjene u genomima kimernih virusa.....	115

4.3.2.3. Ispitivanje podrijetla zajedničkih promjena u kimernim virusima	119
4.3.3. Delecije u dodatnim transkripcijskim jedinicama u genomima kimernih virusa	119
4.4. Ekspresija gena virusa hepatitisa C u stanicama inficiranim virusnim populacijama iz 10. pasaža na stanicama Vero	121
4.5. Izolacija varijanti virusa vCE1E2-HCV-MRV2 postupkom plakiranja i njihova karakterizacija	124
4.5.1. Razdvajanje varijanti virusa vCE1E2-HCV-MRV2	124
4.5.2. Genska karakterizacija virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4	124
4.5.3. Određivanje kinetike replikacije virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4	126
4.6. Ispitivanje imunogeničnosti i neurovirulentnog potencijala virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4	127
4.6.1. Genska karakterizacija serija virusa korištenih u pokusima <i>in vivo</i>	128
4.6.2. Analiza imunogeničnosti virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4S <i>in vivo</i>	132
4.6.2.1. Lokalna imunost u dišnim putevima	133
4.6.2.2. Humoralni odgovor specifičan za virus zaušnjaka	134
4.6.2.3. Određivanje prisustva specifičnih antitijela na virus hepatitisa C u serumu	136
4.6.3. Procjena neurovirulentnog potencijala virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4 u testu neurovirulencije <i>in vivo</i>	138
4.7. Genska karakterizacija virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4 uzastopno kultiviranog na fibroblastima pilećih embrija	140
4.7.1. Mjere raznolikosti virusnih populacija	141
4.7.2. Frekvencija heterogenih mjesta po genima	143
4.7.3. Konsenzusne promjene	144
4.7.4. Heterogena mjesta u dodatnim transkripcijskim jedinicama	147
4.7.5. Distribucija heterogenih mjesta u kodirajućim i nekodirajućim regijama	147
4.7.6. Selekcija zajedničkih varijabilnih pozicija	148
5. RASPRAVA	152

5.1. Osnovna biološka svojstva kimernih virusa	154
5.2. Genska stabilnost kimernih virusa tijekom uzastopnog kultiviranja na kontinuiranoj staničnoj liniji za proizvodnju cjepiva	156
5.3. Selekcija cijepnog kandidata s niskom razinom heterogenosti.....	162
5.4. Reproducibilnost cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 p4 pri kultiviranju.....	163
5.5. Određivanje imunosnog profila i neurovirulentnog potencijala cijepnog kandidata <i>in vivo</i>	164
5.6. Genska stabilnost cijepnog kandidata tijekom uzastopnog kultiviranja na primarnoj staničnoj kulturi za proizvodnju cjepiva	167
6. ZAKLJUČCI.....	170
7. POPIS LITERATURE	172
8. PRILOZI	192
9. ŽIVOTOPIS.....	213

1. UVOD

Živa atenuirana virusna cjepiva djeluju na način da uzrokuju ograničenu infekciju i replikaciju virusa u domaćinu, inducirajući pritom snažne stanične i humoralne imunosne odgovore. Nadovezujući se na njihov uspjeh, razvijaju se replikacijsko-kompetentna rekombinantna vektorska cjepiva temeljena na dobro poznatim atenuiranim virusnim sojevima, kod kojih su geni virusa od interesa smješteni unutar genoma atenuiranog virusa.

Povijesno gledano, cjepivo protiv ospica, zaušnjaka i rubele (*measles, mumps, rubella*; MMR), koje sadrži tri živa atenuirana soja RNA virusa, je jedno od najučinkovitijih cjepiva za ljude (Amantha i Slifka, 2020). Tijekom godina, rekombinantni virusi bazirani na genomu virusa ospica bili su predmet brojnih istraživanja kao potencijalni bivalentni cijepni kandidati (revijalni prikaz u Ebenig i sur., 2022) ili kao terapijski agensi u liječenju tumora (revijalni prikaz u (Mühlebach, 2020). Mogućnost korištenja virusa zaušnjaka u ovom pogledu je znatno manje istraživana, premda postoje radovi koji ukazuju na njegov potencijal u oba područja (Ammayappan i sur., 2016; Bamford i sur., 2019; Beaty i sur., 2017; Xu i sur., 2009; Zhang i sur., 2022; Zhou i sur., 2019a).

Virus zaušnjaka, kao i virus ospica, pripada porodici *Paramyxoviridae*. Njegov genom čini nesegmentirana, jednolančana RNA negativnog smisla duljine 15384 nukleotida koja sadrži sedam gena (Elango i sur., 1988; Paterson i Lamb, 1990). Sve populacije RNA virusa postoje u obliku kvazivirte, distribucije neidentičnih varijanti genoma koje su međusobno povezane mutacijama. Čak i populacije koje potječu iz klonalnih izvora, poput izolata plakova ili cDNA, su heterogene (Steinhauer i Holland, 1987), zbog toga što visoke stope pogreške virusnih polimeraza i stanični urođeni imunosni faktori uzrokuju mutacije u virusnom genomu. Usprkos brojnim obećavajućim rezultatima u prekliničkim i kliničkim fazama razvoja profilaktičkih kimernih cjepiva temeljenih na raznim paramiksovirusnim vektorima (DiNapoli i sur., 2007; Liang i sur., 2020; Ponce-de-León i sur., 2023; Reisinger i sur., 2019; Scaggs Huang i sur., 2021; Tschismarov i sur., 2023), niti jedno takvo cjepivo još nije dospjelo na tržište. Nema mnogo objavljenih informacija zašto je tome tako, no dostupni podaci upućuju da je genska nestabilnost jedan od razloga (Frantz i sur., 2021; C. F. Yang i sur., 2013).

Svrha ovog istraživanja je bila razviti bivalentne cijepe kandidata virusa zaušnjaka s ugrađenim genima za površinske proteine virusa hepatitisa C (HCV) i provesti biološku karakterizaciju dobivenih sojeva. Infekcije HCV-om predstavljaju globalni zdravstveni problem, a procjene pokazuju da se oko 1,5 milijuna novih slučajeva zaraze javlja svake godine (Svjetska zdravstvena organizacija, 2023). Akutne infekcije, koje su često subkliničke, nerijetko prelaze u kroničnu bolest. Iako je uvođenje direktno djelujućih antivirusnih lijekova poboljšalo liječenje kroničnih bolesnika (Dietz i Maasoumy, 2022), razvoj profilaktičkog cjepiva je nužan za kontrolu transmisije virusa (Sepulveda-Crespo i sur., 2020). Unatoč opsežnim istraživanjima koja uključuju brojne pristupe (Rzymiski i sur., 2024), trenutno još uvijek ne postoji licencirano cjepivo protiv HCV-a.

Obzirom da se većina infekcija HCV-om događa tijekom zlouporabe droga ili spolnih praksi koje dovode do izlaganja krvi, imunizacija primijenjena u djetinjstvu bi mogla spriječiti značajan broj infekcija. Ovo je razlog zašto je poželjno da se cjepivo protiv HCV-a kombinira s cjepivom protiv nekog uzročnika dječjih bolesti, idealno s onim koje je već uključeno u kalendare cijepljenja. Tijekom 2023. godine, cijepljenje protiv zaušnjaka kod djece provedeno je na nacionalnoj razini u 124 države (Svjetska zdravstvena organizacija, 2024a), uključujući i one kod kojih je HCV značajan javnozdravstveni problem. Nadalje, cjepivo bazirano na virusu zaušnjaka, koji je odabran kao vektor u ovom radu, bi se moglo kombinirati s cjepivom baziranom na virusu ospica, koje bi se dizajniralo po sličnom principu (primjeri pokušaja dizajna takvog cjepiva već postoje (Kasama i sur., 2011; Reyes-del Valle i sur., 2012)). Razlog za to je što korištenje heterolognih imunizacijskih shema često rezultira boljim imunosnim odgovorima na dodane antigene u odnosu na imunizaciju sa samo jednim vektorom (Espejo i sur., 2023; Happe i sur., 2024; Xu i sur., 2009).

Ciljevi istraživanja:

- 1) Dizajnirati kimerne viruse temeljene na genskoj konsenzus sekvenciji cijepnog soja zaušnjaka L-Zagreb s ugrađenim genima za površinske proteine HCV-a.
- 2) Ispitati biološka svojstva dobivenih virusa u svrhu početne karakterizacije cijepnih kandidata.

Hipoteze istraživanja:

- 1) Replikacijska sposobnost kimernih virusa slična je rekombinantnom virusu zaušnjaka koji u sebi nema dodatne transkripcijske jedinice.
- 2) Strukture populacija kimernih virusa su genski stabilne tijekom uzastopnog kultiviranja *in vitro*.
- 3) Dodatne transkripcijske jedinice za površinske antigene HCV-a se učinkovito eksprimiraju u inficiranim stanicama.
- 4) Kimerni virusi su neuroatenuirani.
- 5) Životinje imunizirane kimernim virusima razvijaju imunosne odgovore na površinske antigene HCV-a i na virus zaušnjaka.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Bolest zaušnjaka; značajke i prevencija

2.1.1. Patogeneza i klinička manifestacija

Jedini prirodni domaćin virusa zaušnjaka je čovjek. Virus zaušnjaka u pravilu izaziva blage respiratorne infekcije koje se klinički najčešće manifestiraju temperaturom, umorom, glavoboljom i oticanjem parotidnih žlijezdi te se u većini slučajeva prebole bez težih posljedica. U čak 30% slučajeva, infekcije uzrokovane ovim virusom su asimptomatske (Rubin i sur., 2015). Virus inicijalno inficira epitelne stanice gornjih dišnih puteva (Katoh i sur., 2015), odakle se može prenijeti u regionalne limfne čvorove, što rezultira pojavom viremije u ranoj akutnoj fazi bolesti (Rubin i sur., 2015). Nakon sistemskog širenja, virus inficira različite organe i uzrokuje široki spektar upalnih procesa, poput orhitisa, miokarditisa, pankreatitisa i nefritisa (Rubin i sur., 2013). Zbog svoje neurotropne prirode, može inficirati i središnji živčani sustav; meningitis se javlja u otprilike 5-10% slučajeva, a encefalitis u manje od 0,5% slučajeva. Prije uvođenja rutinskog cijepljenja, virus zaušnjaka je bio glavni uzročnik virusnog meningitisa i encefalitisa. U necijepljenim populacijama, virus zaušnjaka i dalje je vodeći uzrok ovih stanja (Rubin i sur., 2015).

2.1.2. Živa atenuirana cjepiva protiv zaušnjaka

Enders i Levens su 1950-ih godina pokazali da uzastopno kultiviranje kliničkog izolata virusa zaušnjaka u embrioniranim kokošjim jajima dovodi do njegove atenuacije, što je poslužilo kao osnova za daljnji razvoj živih atenuiranih cjepiva (Rubin i Plotkin, 2013). Sva cjepiva protiv zaušnjaka koja su danas u upotrebi sadrže živi virus, koji je atenuiran kultivacijom u embrioniranim kokošjim jajima, primarnim kulturama stanica i staničnim linijama.

Živa atenuirana cjepiva protiv virusa zaušnjaka ušla su u rutinsku upotrebu 1960-ih godina, a prvi sojevi koji su se koristili u masovnim imunizacijama su bili Jeryl Lynn (JL) i Leningrad-3 (Su i sur., 2020). Soj JL je dobiven atenuacijom divljeg tipa virusa u embrioniranim kokošjim jajima i stanicama pilećih fibroblasta. Cjepivo se sastoji od dva različita soja, JL2 i JL5

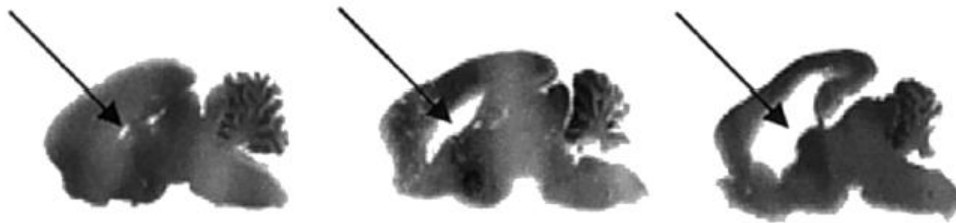
(Almansour, 2020; Rubin i Plotkin, 2013). Ovo cjepivo ima visoku efikasnost i dobar sigurnosni profil (Su i sur., 2020). Soj Leningrad-3 je dobiven miješanjem nekoliko izolata divljeg tipa virusa iz iste epidemije te kultivacijom takvog uzorka na stanicama bubrega zamoraca te stanicama embrija japanske prepelice (Beck i sur., 1989; Rubin i Plotkin, 2013). Dodatnom atenuacijom soja Leningrad-3 u fibroblastima pilećih embrija je u Imunološkom zavodu d.d. proizveden soj L-Zagreb (Beck i sur., 1989). Osim prethodno spomenutih sojeva, tijekom godina su u upotrebi bili i drugi cijepni sojevi, uključujući Urabe AM9, Rubini, RIT 4385 (dobiven iz soja JL), S79, Hoshino i Tori (Almansour, 2020). Zbog slabe efikasnosti, iz upotrebe je povučen soj Rubini, a zbog pojave aseptičnog meningitisa povezanog s cijepljenjem, povučena je i većina cjepiva baziranih na soju Urabe AM9 (Rubin i Plotkin, 2013).

Danas se cjepiva protiv virusa zaušnjaka najčešće primjenjuju u obliku trovalentnog cjepiva MMR u jednoj ili dvije doze (Svjetska zdravstvena organizacija, 2024b). Zaključno s 2023., cjepiva protiv zaušnjaka su uvedena u nacionalne programe imunizacije u 124 države (Svjetska zdravstvena organizacija, 2024a), a od njegova uvođenja, incidencija zaušnjaka se smanjila za više od 97% u zemljama koje provode programe cijepljenja s dvije doze (Galazka i sur., 1999). Trenutno su samo tri soja cjepiva protiv zaušnjaka odobrena od strane Svjetske zdravstvene organizacije, JL, RIT 4385 i L-Zagreb (Svjetska zdravstvena organizacija, 2024b).

2.1.3. Testiranje neurovirulentnosti cjepiva protiv zaušnjaka

Obzirom na neurotropnu prirodu virusa zaušnjaka, sva cjepiva bazirana na živim atenuiranim sojevima ovog virusa moraju tijekom pretkliničke faze ispitivanja proći procjenu razine neurovirulencije (Ph. Eur. 01/2020:1356.). Za tu svrhu se dugo vremena koristio test *in vivo* koji se temelji na intracerebralnoj inokulaciji ispitivanog uzorka u majmune vrste *Macaca mulatta*. Međutim, pojedina istraživanja su pokazala da virusom inducirane neuropatološke promjene u majmunima nisu dobar pokazatelj atenuacijskog fenotipa virusa za ljude, odnosno, da se s ovim modelom ne može pouzdano utvrditi razlika između divljih i atenuiranih sojeva. To objašnjava zašto su se pojedini cijepni sojevi pokazali škodljivima za cijepljenike uzrokujući aseptični meningitis unatoč prolaznim rezultatima na testovima na majmunima (Rubin i Afzal, 2011). Otkriće da se virus zaušnjaka efikasno replicira u mozgu štakora ukoliko se intracerebralno inokulira unutar prvih 24 h od okota je potaknulo ideju o korištenju novookoćenih štakora za

ispitivanje neurovirulencije. Glavni neuropatološki simptom kod novookočenih štakora inokuliranih neurovirulentnim virusom je razvoj hidrocefalusa u trećem i dvama lateralnim ventrikulima mozga, čiji intenzitet, odnosno ukupna zahvaćena površina, pozitivno koreliraju s jačinom neurovirulentnog potencijala virusa kod ljudi (Rubin i sur., 1998). Robusnost i reproducibilnost *in vivo* testa neurovirulencije na novookočenim štakorima ispitana je u internacionalnoj kolaborativnoj studiji, u kojoj je potvrđeno da se ovim testom sa statističkom značajnošću mogu utvrditi razlike između divljih tipova virusa i cijepnih sojeva, a isto tako i razlike između atenuiranih i djelomično atenuiranih virusa (Rubin i sur., 2005) (slika 1).



Slika 1. Reprezentativni presjeci mozga štakora inokuliranih atenuiranim cijepnim sojem (Jeryl Lynn, lijevo), djelomično atenuiranim cijepnim sojem (Urabe AM9, sredina) i divljim sojem virusa zaušnjaka (88-1961, desno) dobiveni u *in vivo* testu neurovirulencije na novookočenim štakorima. Strelice prikazuju lateralne ventrikule u mozgu. Preuzeto od: Rubin i sur., 2005.

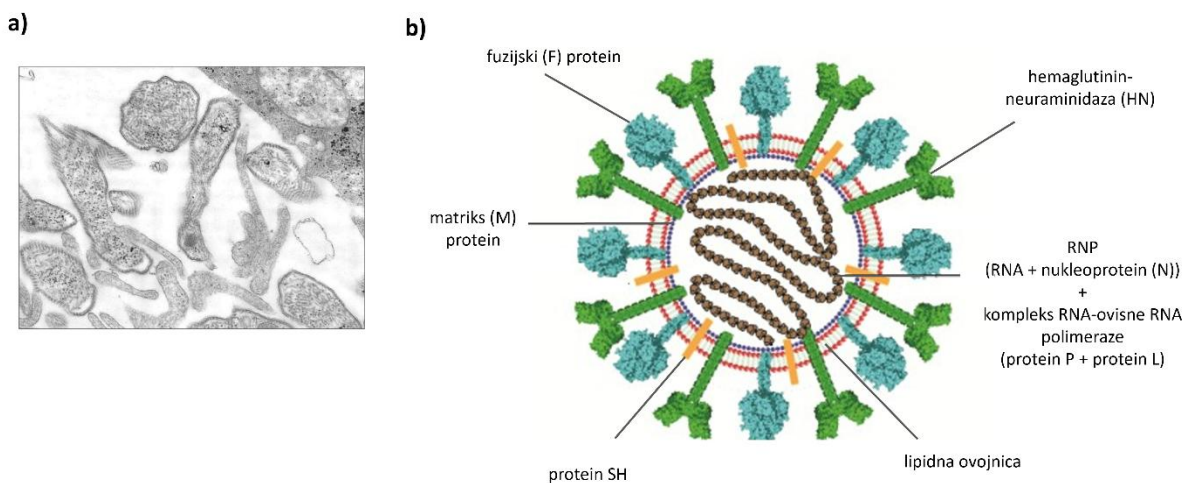
2.2. Virus zaušnjaka

Virus zaušnjaka (*Orthorubulavirus parotitidis*) pripada rodu *Orthorubulavirus*, porodici *Paramyxoviridae* i redu *Mononegavirales* (ICTV, 2023). Dijeli se u 12 genotipova (označeni slovima A-N, bez E i M) koji svi pripadaju istom serotipu (Svjetska zdravstvena organizacija, 2012).

2.2.1. Struktura viriona i organizacija genoma

Virioni zaušnjaka su pleomorfnog oblika veličine između 100 i 600 nm, a sastoje se od helikalnog ribonukleoproteinskog (*ribonucleoprotein*, RNP) kompleksa okruženog lipidnom

ovojnicom (Rubin i sur., 2013) (slika 2a). Kompleks RNP je građen od jednolančane virusne RNA obložene polimeriziranim nukleoproteinom (N). Za njega je vezan kompleks RNA-ovisne RNA polimeraze (*RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp), građen od fosfoproteina (*phosphoprotein*, P) i velikog proteina (*large protein*, L), koji je zadužen za replikaciju i transkripciju virusnog genoma. Lipidna ovojnica koja okružuje RNP podrijetlom je od stanice domaćina te sadrži uklopljene virusne proteine: hemagglutinin-neuraminidazu (HN), fuzijski (F) i mali hidrofobni (*small hydrophobic*, SH) protein. Unutrašnja strana lipidne ovojnice je s RNP-om povezana pomoću matriks (M) proteina (Rubin i sur., 2015) (slika 2b).



Slika 2. Građa čestice virusa zaušnjaka. (a) Pleomorfni virioni na stanicama Vero snimljeni transmisijskim elektronskim mikroskopom. Preuzeto od: Hviid i sur., 2008. (b) Shematski prikaz viriona građenog od ribonukleoproteinskog kompleksa (RNP) i lipidne ovojnice, s prikazanim proteinima N, P, M, F, SH, HN i L. Preuzeto i prilagođeno od: Chang i Dutch, 2012.

Genom virusa čini nesegmentirana, jednolančana molekula RNA negativnog smisla duljine 15384 nukleotida. Ona sadrži sedam transkripcijskih jedinica (gena) koje kodiraju za ukupno devet proteina: N, V/P/I, M, F, SH, HN i L (Rubin i sur., 2013) (slika 3). Geni na svojim krajevima imaju kratke konzervirane regije duljine 9-12 nukleotida koje služe kao signali za početak (*gene start*, GS) i završetak (*gene end*, GE) transkripcije te su međusobno odvojeni intergenskim (IG) regijama. Takve IG regije se ne prepisuju, a duljina im varira: mogu biti duge jedan (između gena P i M, M i F te HN i L), dva (između gena N i P te SH i HN) ili sedam (između gena F i SH)

nukleotida (Elango i sur., 1988). Na 3' i 5' krajevima genoma nalaze se nekodirajuće sekvencije duljine 55 nukleotida (*leader*, Le), odnosno, 24 nukleotida (*trailer*, Tr), koje su u prvih 15 nukleotida obrnuto komplementarne i važne su za procese transkripcije, replikacije i enkapsidacije virusa (Rubin i sur., 2013).

Svaki gen, uz iznimku gena P, kodira za samo jedan protein. S gena P se, kao rezultat kotranskripcijske insercije gvanozina u regiji editiranja genoma (između pozicija 461 i 466), prepisuju tri različite molekule mRNA. Vjernom transkripcijom gena nastaje protein V, dok insercija dvaju gvanozina rezultira nastankom mRNA koja kodira za protein P, a insercija jednog ili četiri gvanozina rezultira nastankom mRNA koja kodira za protein I (Paterson i Lamb, 1990).



Slika 3. Shematski prikaz organizacije genoma virusa zaušnjaka. Genom se sastoji od sedam gena koji kodiraju za ukupno devet proteina: N, V/P/I, M, F, SH, HN i L. Na 3' i 5' krajevima genoma se nalaze nekodirajuće sekvencije *leader* (Le) i *trailer* (Tr) koje su važne za procese transkripcije, replikacije i enkapsidacije virusa. Preuzeto i prilagođeno od: Cox i Plemper, 2015.

Genomi virusa zaušnjaka prate tzv. „pravilo broja šest“ (*rule of six*) (Calain i Roux, 1993) i održavaju ispravan N-fazni kontekst (Kolakofsky i sur., 1998). Važna karakteristika paramiksovirusa je ta da je kompleks RNP, a ne sama genomska RNA, funkcionalan kalup za sintezu virusne RNA, tj. za replikaciju i transkripciju (Lamb i Parks, 2013). Budući da je kod paramiksovirusa RNP organiziran na način da je svaka podjedinica proteina N vezana na točno šest nukleotida (Egelman i sur., 1989), njihovi genomi se mogu efikasno replicirati samo u slučaju kada im je duljina višekratnik broja šest, što se naziva „pravilom broja šest“ (Calain i Roux, 1993). Spomenuti fenomen utječe i na regulaciju transkripcije ovih virusa jer je pokazano da su pozicije signala GS svih gena konzervirane u odnosu na fazni kontekst kojeg proteini N stvaraju prilikom vezanja na genomsku RNA (Kolakofsky i sur., 1998).

2.2.2. Replikacija, transkripcija i virusni ciklus

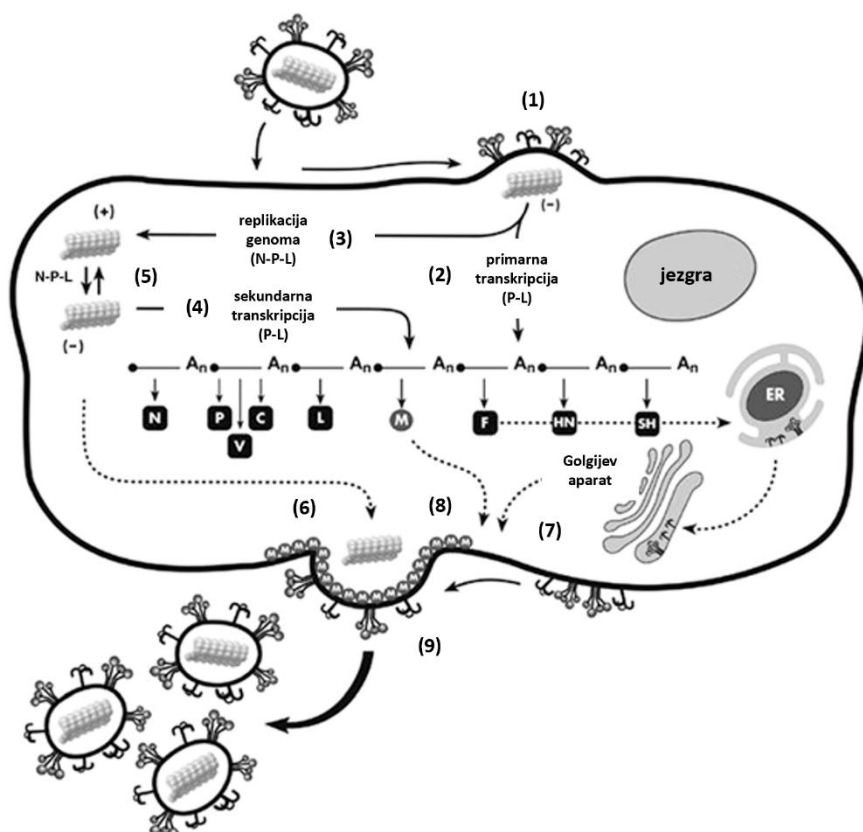
Infekcija stanice virusom zaušnjaka (slika 4) započinje vezanjem viriona na receptore na površini stanice i ulaskom u stanicu, što omogućuju površinski glikoproteini HN i F. Vezanjem proteina HN za sijaličnu kiselinu dolazi do konformacijskih promjena u proteinu HN koje dovode do strukturnih promjena u proteinu F, što rezultira aktivacijom proteina F. Time se omogućuje fuzija virusne ovojnice sa staničnom membranom i ulazak RNP-a u stanicu domaćina (Kubota i Hashiguchi, 2021).

Procesi transkripcije i replikacije se odvijaju u staničnoj citoplazmi djelovanjem kompleksa RdRp. Visokofosforilirani protein P ima ulogu u vezanju kompleksa RdRp na RNP i sprječavanju agregacije proteina N (Chen i sur., 2007), dok protein L ima katalitičke funkcije. Protein L, u suradnji sa *cis*-djelujućim elementima virusnog genoma (signali GE i GS te IG regije), omogućuje inicijaciju, elongaciju i terminaciju sinteze RNA te dodaje metiliranu gvanozinsku kapu na 5' kraj, odnosno, poliadenilacijski signal na 3' kraj mRNA (Lamb i Parks, 2013).

U prvoj fazi infekcije se odvija tzv. primarna transkripcija, gdje (-) genomska RNA služi kao kalup za prepisivanje mRNA potrebnih za sintezu svih virusnih proteina. Transkripcija započinje na 3' kraju genoma. Virusna RdRp se po kalupu pomiče u smjeru 3'-5' i vrši transkripciju sekvencijskim „stop-start“ mehanizmom, prepoznajući pritom *cis*-djelujuće elemente. Zbog toga što virusna RdRp nema savršenu mogućnost reinicijacije, efikasnost sinteze mRNA pada s obzirom na udaljenost gena od 3' kraja genomske RNA, što omogućuje sintezu virusnih proteina u točno određenim omjerima (Lamb i Parks, 2013).

U drugoj fazi infekcije se odvija replikacija virusnog genoma. Tijekom procesa replikacije, (-) genomska RNA služi kao kalup za sintezu (+) antigenomskih RNA, a one zatim služe kao kalupi za sintezu novih (-) genomskih RNA. Prelazak s transkripcije na replikaciju zahtjeva da kompleks RdRp previdi signale GE na krajevima gena te signale na granici između sekvencije Le i gena N, što se događa kao posljedica akumulacije proteina N u dovoljnoj količini da se može vezati na novosintetizirane antigenome i genome. Sinteza virusnih antigenoma i genoma se odvija usporedno s njihovom enkapsidacijom, a reguliraju ju promotori koji se nalaze na 3' krajevima tih molekula (Lamb i Parks, 2013). Tako nastali novosintetizirani genomi mogu se dalje koristiti u sekundarnoj transkripciji, dodatnoj replikaciji, ili ugradnji u nove virusne čestice.

Sklapanje virusnih čestica se odvija na staničnoj membrani. To zahtijeva kolokalizaciju virusnih komponenti, uključujući virusne glikoproteine koji se nakon glikozilacije transportiraju do membrane egzocitozom te prethodno sastavljene komplekse RNP-RdRp. Važnu ulogu u sastavljanju virusnih čestica ima protein M koji se agregira s unutrašnje strane stanične membrane i osigurava interakciju između citoplazmatskih repova virusnih glikoproteina i kompleksa RNP-RdRp (Lamb i Parks, 2013). Virusne čestice se od stanične membrane odvajaju pupanjem. Virus se između stanica može širiti i fuzijom staničnih membrana. To omogućuje aktivnost proteina F i HN koji su prisutni na membranama inficiranih stanica. Time nastaju velike višejezgrene tvorbe međusobno povezanih stanica (sinciciji) koji služe kao jedna od indikacija citopatogenog efekta (CPE) virusa u inficiranim stanicama.



Slika 4. Replikativni ciklus paramiksovirusa. Infekcija započinje (1) vezanjem viriona na receptore na površini stanice, fuzijom virusne ovojnice sa staničnom membranom i ulaskom ribonukleoproteinskog kompleksa u stanicu domaćina. Potom se odvija (2) primarna transkripcija, gdje (-) genomska RNA služi kao kalup za prepisivanje mRNA potrebnih za sintezu svih virusnih proteina. Zatim se odvija (3) replikacija virusnog genoma, gdje (-) genomska RNA služi kao kalup za sintezu (+) antigenomskih RNA, a one potom služe kao kalupi za sintezu novih (-) genomskih RNA. Genomi se mogu dalje koristiti u (4) sekundarnoj transkripciji, (5) dodatnoj replikaciji, ili (6) ugradnji u nove virusne čestice. Sklapanje virusnih čestica se odvija na staničnoj membrani, što zahtijeva kolokalizaciju virusnih komponenti, uključujući (6) genome, (7) virusne glikoproteine koji se nakon glikozilacije transportiraju do membrane egzocitozom i (8) protein M koji se agregira s unutrašnje strane stanične membrane. Virusne čestice se od stanične membrane odvajaju pupanjem. Preuzeto i prilagođeno od: Lamb i Parks, 2013.

2.2.3. Specifičan imunosni odgovor na infekciju

Tijekom prirodne infekcije, ali i nakon cijepljenja, virus zaušnjaka inducira oba tipa specifične imunosti, humoralnu i staničnu imunost. Virus-specifični mukozni imunoglobulini (Ig) u slini su prvi tipovi antitijela koji se sintetiziraju u organizmu domaćina (Rubin i sur., 2013). Budući da razina sekrecije virusa u slini negativno korelira s količinom sintetiziranog antitijela IgA, mukozna neutralizacijska antitijela potencijalno imaju važnu ulogu u sprečavanju replikacije i transmisije virusa putem sline (Chiba i sur., 1973).

Odgovor induciran cijepljenjem je sličan prirodnom imunom odgovoru; primarni odgovor karakterizira porast serumskih antitijela IgM i IgG, dok administracija druge doze cjepiva većinom inducira porast serumskih antitijela IgG (Flynn i Mahon, 2003). Serumski antitijela IgG specifična za proteine virusa zaušnjaka mogu dugo vremena ostati u organizmu domaćina i omogućuju zaštitu tijekom sekundarnog izlaganja virusu (Rubin i sur., 2013). Titar serumskih antitijela koja se sintetiziraju kao odgovor na cijepljenje je u pravilu niži od onoga zabilježenog kod prirodnih infekcija (Flynn i Mahon, 2003). Za vrijeme infekcije dolazi i do stvaranja memorijskih B stanica koje imaju ulogu proizvodnje antitijela kod reinfekcija, ali je ta vrsta humoralnog odgovora kod zaušnjaka relativno slaba (Latner i sur., 2011).

Smatra se da bi neutralizacijska antitijela specifična za virus zaušnjaka trebala biti indikacija zaštitne imunosti (Svjetska zdravstvena organizacija, 2024b), ali njihova razina u ljudi koja bi osiguravala zaštitu od bolesti uzrokovane ovim virusom zasad nije definirana. Ovaj tip antitijela može se detektirati u organizmu inficiranih osoba i desetljećima nakon izlaganja virusu (Rubin i sur., 2013). Glavni neutralizacijski antigen virusa zaušnjaka je protein HN (Rubin i sur., 2012), međutim, većina antitijela sintetiziranih nakon prirodne infekcije ili cijepljenja nije specifična za protein HN, već za protein N (Latner i sur., 2017; Matsubara i sur., 2012). Veliki broj B staničnih epitopa je detektiran kod ovog proteina, ali usprkos tome, koncentracija N-specifičnih antitijela ne korelira s neutralizacijskim kapacitetom seruma cijepljenih osoba (Latner i sur., 2017) ili osoba s evidentiranom povijesti bolesti (Matsubara i sur., 2012).

Stanična imunost specifična za virus zaušnjaka je manje istražena. Ova vrsta imunskog odgovora se razvija još za vrijeme perioda inkubacije, što potvrđuje detekcija mononuklearnih stanica u inficiranim tkivima za vrijeme pojave simptoma (Rubin i sur., 2013). Staničnim

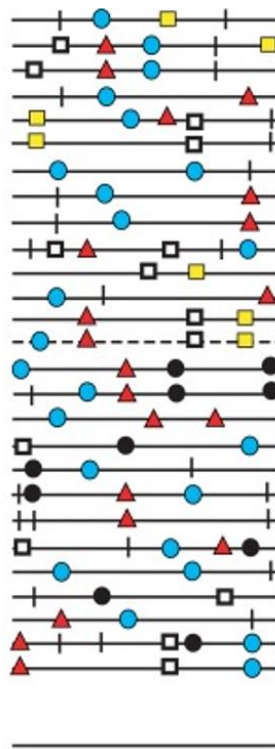
odgovorima kod prirodno inficiranih osoba dominiraju CD8⁺ T limfociti koji godinama zadržavaju svoj citotoksični fenotip i polifunkcionalnost (mogućnost sekrecije većeg broja funkcionalnih markera), dok kod cijepljenika dominiraju prirodno-ubilačke (*natural killer*, NK) stanice (de Wit i sur., 2018). Manji dio staničnog odgovora čine CD4⁺ T pomoćnički limfociti, međutim, pokazano je da su i kod cijepljenih i prirodno inficiranih osoba, CD4⁺ T limfociti s memorijskim fenotipom zabilježeni godinama nakon izlaganja antigenu (de Wit i sur., 2018; Hanna-Wakim i sur., 2008). Dodatna potvrda da virus zaušnjaka inducira dugotrajne stanične odgovore je činjenica da su kod odraslih osoba, cijepljenih ili prirodno inficiranih tijekom djetinjstva, zabilježeni značajni virus-specifični *in vitro* limfoproliferativni odgovori te interferon (IFN)- γ i interleukin (IL)-10 odgovori (Hanna-Wakim i sur., 2008; Jokinen i sur., 2007). Razvoj stanične imunosti je vjerojatno neovisan o humoralnoj imunosti, budući da ne postoji značajna korelacija između ovih dvaju vrsti odgovora, niti netom nakon cijepljenja niti dugoročno (Gans i sur., 2001; Jokinen i sur., 2007).

2.3. Heterogeni sastav populacija RNA virusa

Dinamika evolucije RNA virusa je izuzetno kompleksna (Lauring i Andino, 2010). Osim malih genoma i brze replikacijske kinetike, ovi virusi imaju visoku stopu mutacija koja je posljedica slabe vjernosti prepisivanja njihovih RNA polimeraza (Lauring i Andino, 2010; Steinhauer i Holland, 1987). RNA polimeraze većine virusa nemaju mogućnost popravka krivo sparenih baza tijekom sinteze (Steinhauer i sur., 1992), jer im nedostaje 3'-5' egzonukleazna aktivnost koja je prisutna kod DNA polimeraza (Bernad i sur., 1989). Zato su stope mutacija RNA virusa, izražene kao broj supstitucija po nukleotidu po inficiranoj stanici, u rasponu 10⁻⁶-10⁻⁴, dok su stope mutacija DNA virusa u rasponu 10⁻⁸-10⁻⁶ (Sanjuán i sur., 2010).

Stopa pogreške, odnosno, vjernost polimeraze, određuje stopu mutacije samog virusa i raspon genske varijacije na koju prirodna selekcija može djelovati (Lauring i Andino, 2010). Zbog niske vjernosti prepisivanja virusnih RNA polimeraza te djelovanja okolišnih čimbenika, sve populacije RNA virusa postoje u obliku kvazivrsti. To je skup genski srodnih virusnih sekvencija (varijanti) koje su podložne varijacijama, kompeticiji i selekciji, međusobno interagiraju te zajedno doprinose značajkama populacije (Lauring i Andino, 2010).

Genska struktura kvazivirte se pojednostavljeno predstavlja kao skup svih varijanti koje zajedno zauzimaju tzv. „sekvencijski prostor“ (*sequence space*). Zbog visokih mutacijskih stopa, frekvencija pojedine varijante nije definirana samo njenom mogućnošću reprodukcije i preživljenja u određenom okolišu – fitnessom, već i vjerojatnošću da će ona nastati mutacijom *de novo* iz susjednih sekvencija (Lauring i Andino, 2010). Sve varijante koje su prisutne u populaciji u svakom trenutku daju konsenzus sekvenciju. Ona je definirana kao sekvencija koja predstavlja najučestaliji nukleotid na svakoj pojedinoj poziciji genoma u cijeloj virusnoj populaciji i ne mora biti fizički prisutna u populaciji (Domingo i sur., 2012) (slika 5).



Slika 5. Prikaz teoretskih sekvencija u virusnoj populaciji kvazivirte. Svaka sekvencija je prikazana linijom, a simbolima su označene različite mutacije koje su u njoj prisutne. Konsenzus sekvencija koja predstavlja najučestaliji nukleotid na svakoj pojedinoj poziciji genoma u cijeloj populaciji je prikazana na dnu praznom linijom. Preuzeto i prilagođeno od: Domingo i sur., 2012.

Heterogenost virusnih populacija omogućuje evolucijsku prednost i povećava mogućnost preživljenja virusa u dinamičnom okruženju organizma domaćina (Lauring i Andino, 2010).

Osnovna evolucijska jedinica kod RNA virusa je cijela populacija povezanih virusnih varijanti. Ovdje prirodna selekcija ne djeluje na način da favorizira samo jednu varijantu koja ima najveći fitness u danim uvjetima, već rezultira odabirom skupa varijanti, koje možda pojedinačno imaju manji prosječni fitness, ali okupiraju širi sekvencijski prostor. Takav koncept, nazvan *survival of the flattest*, osigurava mutacijsku robusnost, što znači da je populacija manje osjetljiva na mutacije i zadržava bolji prosječni fitness tijekom prilagodbi na nove okolišne uvjete (Lauring i Andino, 2010).

Brza evolucija RNA virusa ima negativni utjecaj na kontrolu virusnih epidemija, ali i na dizajn cjepiva i razvoj antivirusnih lijekova (Domingo, 2020; Lauring i Andino, 2010). Već samo jedna aminokiselinska supstitucija na B i T staničnim epitopima virusnih proteina je često dovoljna da se izbjegne neutralizacija s odgovarajućim antitijelom ili prepoznavanje od strane klonalne populacije citotoksičnih CD8⁺ T limfocita. Tako nastale mutante koje izbjegavaju imunosti odgovor (*escape mutants*) mogu rezultirati smanjenjem efikasnosti cjepiva, perzistencijom virusne infekcije i pojavom virusne evolucije inducirane cijepljenjem (Domingo, 2020).

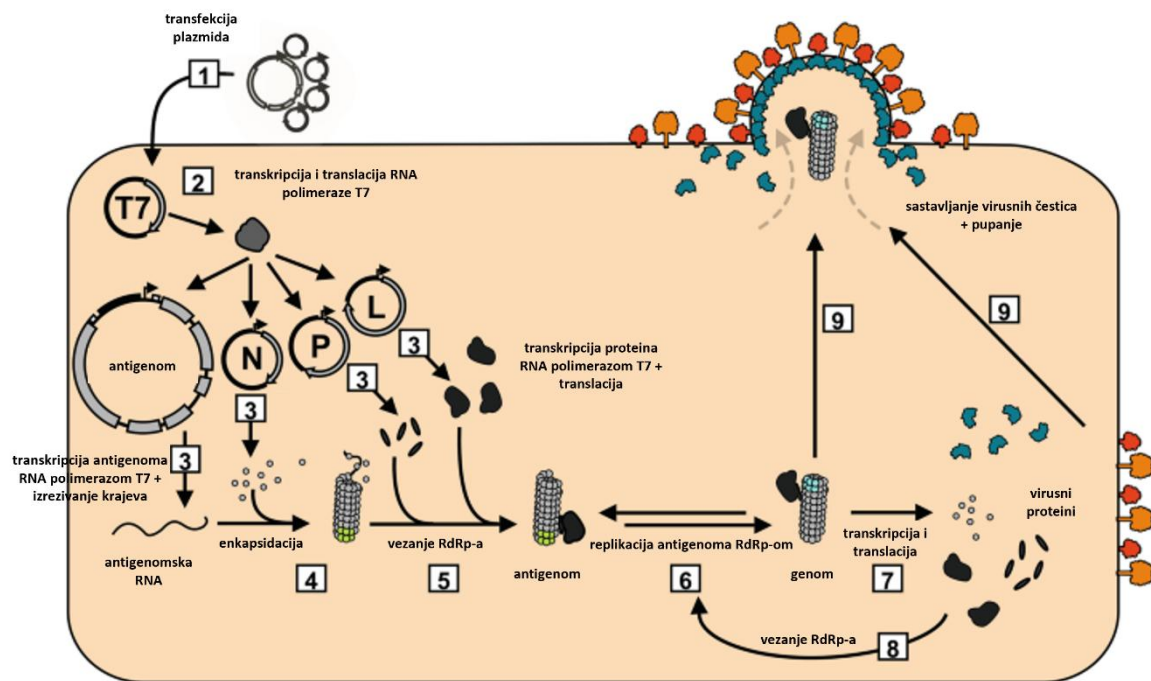
2.4. Replikacijsko-kompetentni rekombinantni RNA virusi

2.4.1. Tehnologija reverzne genetike

Tehnologija reverzne genetike omogućuje *de novo* proizvodnju (*rescue*) infektivnih, replikacijsko-kompetentnih RNA virusa iz plazmida koji sadrže čitave virusne genomske ili antigenomske cDNA. Tehnologija se bazira na principu da se u stanici osigura prisutnost faktora koji oponašaju uvjete pod kojima se odvija inicijacija replikacije virusa kod prirodne infekcije. Za razliku od pozitivnih RNA virusa koji imaju infektivnu genomsku RNA i mogu koristiti staničnu mašineriju za inicijaciju virusnog ciklusa (Walpita i Flick, 2005), reverzna genetika negativnih RNA virusa je nešto kompleksnija. Ona zahtijeva da se u obzir uzmu dva osnovna parametra: (a) genomski i antigenomski RNA postoje u obliku RNP-a te (b) virusna RdRp je nužna za transkripciju i replikaciju (Pekosz i sur., 1999; Walpita i Flick, 2005).

Prvi uspješni sustav reverzne genetike za nesegmentirane negativne (NSN) RNA viruse uspostavili su Schnell i sur. (1994) za virus bjesnoće. Uskoro je uslijedio razvoj platformi koje su

omogućile proizvodnju brojnih drugih NSN RNA virusa, poput virusa vezikularnog stomatitisa (VSV) (Lawson i sur., 1995; Whelan i sur., 1995), virusa ospica (Radecke i sur., 1995), ljudskog respiratornog sincicijskog virusa (hRSV) (Collins i sur., 1995), ljudskog virusa parainfluence 3 (hPIV3) (Durbin i sur., 1997; Hoffman i Banerjee, 1997) te virusa zaušnjaka (Clarke i sur., 2000). Općenita shema sustava reverzne genetike NSN RNA virusa, pokazana na primjeru paramiksovirusa, prikazana je na slici 6.

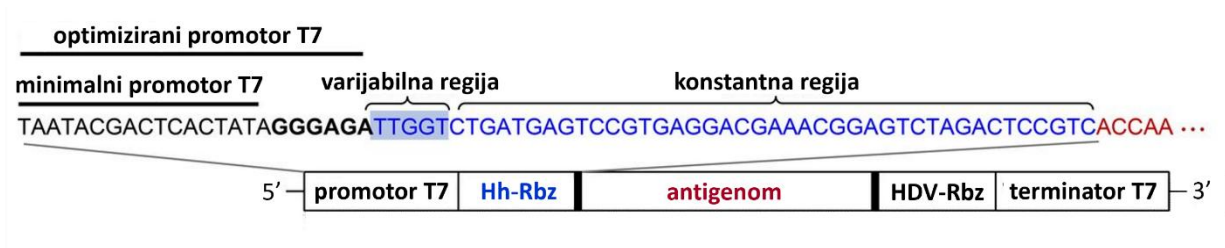


Slika 6. Dobivanje infektivnih replikacijsko-kompetentnih paramiksovirusa pomoću plazmidnog sustava reverzne genetike. (1) Plazmidi s virusnim antigenomom, genima za proteine N, P i L i RNA polimerazu bakteriofaga T7 se transfeciraju u stanice. Zatim dolazi do (2) transkripcije i translacije RNA polimeraze T7 koja (3) omogućuje stvaranje antigenomske RNA (funkcionalni 5' i 3' krajevi se dobivaju djelovanjem ribozima) te mRNA za proteine N, P i L (koje se potom transliraju). (4) Antigenomska RNA se enkapsidira i (5) za nju se veže kompleks RNA-ovisne RNA polimeraze (RdRp). (6) Kompleks RdRp vrši replikaciju virusnog antigenoma čime nastaju virusni genomi koji (7) dalje služe kao kalupi za transkripciju i translaciju virusnih proteina. (8) Nakupljanje virusnih proteina N, P i L omogućuje stvaranje virusnih genoma. (9) Genomi se, skupa s proteinima, nakupljaju blizu membrane, a djelovanjem proteina M dolazi do sastavljanja virusnih čestica koja se odvajaju pupanjem. Preuzeto i prilagođeno od: Haas i Lee, 2024.

Za dobivanje virusne RNA se najčešće koriste sustavi bazirani na plazmidu s virusnim antigenomom, zato što su se takvi sustavi pokazali efikasniji za proizvodnju NSN RNA virusa u odnosu na one koji koriste virusni genom (revijalni prikazi u Pfaller i sur., 2015; Walpita i Flick, 2005). Plazmid s virusnim antigenomom se obično dizajnira na način da na 5' kraju sadrži sekvenciju promotora RNA polimeraze bakteriofaga T7, a na 3' kraju sekvenciju autokatalitičkog enzima. Molekule cDNA koje sadrže sekvencije proteina N, P i L (i po potrebi drugih proteina) se kloniraju iza istog promotora u ekspresijskim (pomoćničkim) plazmidima. Svi plazmidi se zatim koriste za transfekciju odgovarajućih stanica koje eksprimiraju RNA polimerazu bakteriofaga T7, bilo konstitutivno, ekspresijom s rekombinantnog vakcinija virusa, ili s dodatnog plazmida. Transkripcija pomoću RNA polimeraze T7 rezultira stvaranjem genomske RNA koja sadrži funkcionalne 5' i 3' krajeve te sintezom mRNA za sve virusne proteine potrebne za sklapanje RNP-a i funkcionalnost kompleksa RdRp. Virusna RdRp potom vrši replikaciju i transkripciju čime dolazi do nastanka infektivnog virusa (Haas i Lee, 2024; Rubin i sur., 2013).

Vezano uz paramiksovirus, niska efikasnost i nedostatak robusnosti sustava reverzne genetike su u početku predstavljali barijeru za proizvodnju rekombinantnih virusa (Beatty i sur., 2017). Zato su tijekom godina razvijena brojna rješenja koja su omogućila prevladavanje tih poteškoća. Otkriveno je da pomoćnički plazmidi moraju biti prisutni u točno odgovarajućim omjerima (najčešće $N > P > L$) kako bi se uspješno proizveli infektivni virusi (Conzelmann, 2004). Osmišljena je stanična linija BSR T7/5, kontinuirana linija fibroblasta bubrega mladog hrčka (*Baby Hamster Kidney*, BHK) sa stabilnom ekspresijom RNA polimeraze T7 (Buchholz i sur., 1999). Dizajniran je optimizirani promotor T7, dobiven dodatkom triju gvanina na 3' kraj minimalnog promotora T7, koji povećava procesivnost polimeraze i razinu transkripcije (Martin i sur., 1988). Ovaj promotor u početku nije bio dobro rješenje za paramiksovirus, jer se dodani gvanini tijekom transkripcije ugrađuju u 5' kraj antigenoma. To kod ovih virusa interferira s „pravilom broja šest“ te ometa precizno izrezivanje i enkapsidaciju krajeva genoma, koji su važni u procesima replikacije i pakiranja novih virusnih čestica (Beatty i sur., 2017; Haas i Lee, 2024). Zato je kod paramiksovirusa dobro primijeniti dizajn u kojem se sekvencija ribozima *hammerhead* smješta između optimiziranog promotora T7 i 5' kraja antigenoma (Combredet i sur., 2003). U kombinaciji sa sekvencijom ribozima virusa hepatitisa delta i sekvencijom za terminaciju transkripcije RNA polimerazom T7 smještenim na 3' kraju antigenoma, ovakav dizajn osigurava

precizno izrezivanje krajeva genoma i povećava efikasnost transkripcije (Beaty i sur., 2017; Haas i Lee, 2024) (slika 7).



Slika 7. Optimalni dizajn plazmida s virusnim antigenomom za reverznu genetiku paramiksovirusa koji osigurava precizno izrezivanje krajeva antigenoma. Sekvencije minimalnog promotora T7 i optimiziranog promotora T7 su prikazane crnim tekstom. Optimizirani promotor T7 sadrži tri gvanina koja povećavaju procesivnost polimeraze i razinu transkripcije te tri dodatna nukleotida za održavanje „pravila broja šest“. Između promotora T7 i 5' kraja antigenoma (crveni tekst) nalazi se sekvencija ribozima *hammerhead* (Hh-Rbz; plavi tekst). Ona se sastoji od varijabilne regije, koja je reverzni komplement početka antigenoma, i konstantne regije, koja je fiksna neovisno o virusu. Na 3' kraju antigenoma se nalaze sekvencija ribozima virusa hepatitisa delta (HDV-Rbz) i sekvencija za terminaciju transkripcije RNA polimerazom T7. Preuzeto i prilagođeno od: Beaty i sur., 2017.

Ova tehnologija, u kombinaciji s molekularnim alatima poput genskih modifikacija, sintetske biologije i metoda optimizacije kodona, omogućuje dizajn virusa sa specifičnim genskim i fenotipskim svojstvima te predstavlja izuzetno moćan alat u virološkim istraživanjima (Chen i sur., 2022). Studije na virusima s promijenjenim genima i virusima koji eksprimiraju fluorescentne proteine provode se kako bi se saznalo nešto više o virusnoj biologiji i replikativnom ciklusu, funkciji pojedinih proteina te faktorima virulencije i patogeneze. Budući da je u genome virusa moguće dodati gene stranog podrijetla, ovakvi sustavi imaju svoju primjenu i u analizama probira antivirusnih lijekova, istraživanjima visoko patogenih virusa, genskoj terapiji i terapiji tumora (revijalni prikazi u Chen i sur., 2022; Pfaller i sur., 2015; Walpita i Flick, 2005). Tehnologija reverzne genetike ima svoju primjenu i u razvoju novih strategija za prevenciju i kontrolu virusnih

bolesti, jer omogućuje racionalni dizajn atenuiranih cjepiva te proizvodnju rekombinantnih vektorskih cjepiva.

Strategije koje uključuju ugradnju gena stranog podrijetla obično zahtijevaju da se dodatna transkripcijska jedinica (*additional transcription unit*, ATU) konstruira u obliku molekule cDNA, u kojoj je otvoreni okvir čitanja gena od interesa okružen s vektor specifičnim signalima GS i GE. Takav ATU se dodaje u genom NSN RNA vektora između dvaju IG regija, čime se osigurava da se u proizvedenom rekombinantnom virusu gen od interesa može transkribirati u obliku zasebne molekule mRNA (Bukreyev i sur., 2006).

2.4.2. Proizvodnja rekombinantnih nesegmentiranih negativnih RNA virusa

2.4.2.1. Svojstva nesegmentiranih negativnih RNA virusa kao vektora

Virusi iz skupine NSN RNA virusa imaju nekoliko karakteristika koje ih čine dobrim kandidatima za dizajn vektorskih platformi. Modularna priroda njihovih genoma, koji se sastoje od odvojenih transkripcijskih jedinica i imaju jasno definirane signale GS i GE, omogućuje jednostavno dodavanje stranih gena (Willemsen i Zwart, 2019). Helikalni RNP kompleksi NSN RNA virusa stvaraju strukture koje ne nameću ograničenja vezana uz veličinu inserta karakteristična za ikozaedralnu simetriju većine pozitivnih RNA virusa (Pfaller i sur., 2015), što znači da je veličina inserta koji se može ugraditi ograničena samo limitom pakiranja virusa (Willemsen i Zwart, 2019). Zabilježeno je da se u genome NSN RNA virusa mogu ugraditi inserti veličine preko 6000 nukleotida (Billeter i sur., 2009). Eliminacija insertiranih sekvencija putem homologne rekombinacije je malo vjerojatna zbog toga što je genomska RNA NSN RNA virusa uvijek enkapsidirana (Pfaller i sur., 2015; Walpita i Flick, 2005). Ovakvi vektori nemaju popratni rizik od neželjenih kromosomskih integracija jer se replikativni ciklus NSN RNA virusa u potpunosti odvija u citoplazmi (Suryanarayana i sur., 2010; Walpita i Flick, 2005).

Osim svega prethodno navedenog, NSN RNA virusi imaju i brojne druge karakteristike koje ih čine dobrim kandidatima za proizvodnju vektorskih cjepiva. Virus koji se najčešće koristi u tu svrhu se obično antigenski razlikuje od uobičajenih ljudskih patogena ili se radi o atenuiranim sojevima koji su se pokazali sigurnima za ljude (npr. cijepni sojevi virusa ospica) (Suryanarayana

i sur., 2010; Walpita i Flick, 2005). Atenuirani virusi imaju mogućnost replikacije u organizmu domaćina, što znači da mogu inducirati jake sistemske humoralne i stanične odgovore. Zbog svog prirodnog puta infekcije, moguće ih je administrirati i intranazalnim putem, što može pomoći u aktivaciji lokalne imunosti (Suryanarayana i sur., 2010). Činjenica koja dodatno olakšava proizvodnju cjepiva je da se NSN RNA virusi koji imaju vektorski potencijal mogu učinkovito replicirati u dobro karakteriziranim staničnim linijama odobrenim za primjenu na ljudima, poput stanica Vero (Suryanarayana i sur., 2010).

2.4.2.2. Čimbenici koji utječu na uspješnost proizvodnje

Tijekom dizajna rekombinantnih NSN RNA virusa, važno je voditi računa o nekoliko čimbenika koji utječu na uspješnost proizvodnje virusa, a to su: (a) pozicija u genomu za ugradnju inserta, (b) duljina insertiranih sekvencija, (c) potencijalni toksični učinci proteina eksprimiranih s dodanih gena i (d) genska stabilnost inserta (detaljnije razrađeno u sljedećem poglavlju).

Strani geni se mogu ugraditi na bilo koju poziciju u genomu NSN RNA virusa pazeći da se tijekom ugradnje ne naruši funkcionalna organizacija genoma vektora. Pritom se, zbog gradijenta sinteze molekula mRNA, efikasnost ekspresije tih gena može kontrolirati odabirom odgovarajućeg mjesta insercije (Roberts i sur., 2004; Tokusumi i sur., 2002). Međutim, ugradnja stranih gena na pozicije koje su blizu 3' kraju genoma u pojedinim situacijama može imati negativan učinak na virusnu replikaciju, kao što je pokazano kod VSV-a (Wertz i sur., 2002) i virusa newcastleske bolesti (NDV) (Zhao i Peeters, 2003). U slučaju ova dva vektora, insercije između gena N i P su imale veći negativni učinak na virusnu replikaciju od insercija na drugim pozicijama, što je vjerojatno bila posljedica promjena u molarnom odnosu između tih dvaju proteina te smanjene transkripcije većeg broja nizvodnih gena. Slović i sur. (2021) su pokazali da je kod proizvodnje rekombinantnih virusa zaušnjaka pozicija između gena N i P bila dobar odabir za ugradnju stranih gena.

Ugradnja stranog gena u genome NSN RNA virusa povećava njihovu duljinu, što može imati negativan učinak na replikaciju virusa. Sakai i sur. (1999) su pokazali da virus Sendai (SeV) može efikasno eksprimirati gen veličine do 3200 nukleotida te da povećanje duljine inserta dovodi do proporcionalnog smanjenja virusnog titra u uvjetima *in vitro*. Ovisnost virusne replikacije o

duljini inserta je pokazana i kod hPIV3 u studiji od Skiadopoulos i sur. (2000). Virus hPIV3 je u uvjetima *in vitro* zadržao sposobnost replikacije kod ugradnje inserata veličine do 3900 nukleotida, dok je u uvjetima *in vivo*, ugradnja inserata duljih od 3000 nukleotida rezultirala povećanjem temperaturne osjetljivosti virusa. Dodatni čimbenik o kojem treba voditi računa tijekom ugradnje, a vezan je uz duljinu genoma, jest „pravilo broja šest“ koje postoji kod paramiksovirusa. Virusi koji nisu dizajnirani u skladu s tim pravilom mogu spontano uvoditi mutacije s ciljem njegova postizanja (Skiadopoulos i sur., 2002), a ovisno o tome u kojim regijama genoma se te mutacije uvedu, one mogu imati različite učinke na virusnu replikaciju.

U pojedinim slučajevima, proteini eksprimirani s ugrađenih gena mogu imati toksični učinak na replikaciju samog vektora. Tijekom rasta u uvjetima *in vitro*, takvi geni obično nakupljaju veliki broj mutacija, što može rezultirati sintezom promijenjenih proteina, smanjenjem ili potpunim gubitkom ekspresije stranih gena (Bukreyev i sur., 2006). Dobar primjer za to je hPIV3 u koji je ugrađen gen HN virusa hPIV1. Ova kombinacija je vjerojatno imala inhibitorni učinak na virusnu replikaciju zato što se strani protein mogao ugrađivati u virusne čestice i potencijalno utjecati na ugradnju njemu sličnog proteina HN virusa hPIV3 (Skiadopoulos i sur., 2002). Slično je dobiveno i za virus ospica u čiji je genom dodan gen F virusa zaušnjaka (Wang i sur., 2001) i za VSV u čiji je genom dodan gen F virusa ospica (Quiñones-Kochs i sur., 2001). U oba slučaja je inhibitorni učinak na virusnu replikaciju vjerojatno bio posljedica fuzogene prirode stranih proteina ili njihove interferencije s vektorskim proteinima tijekom sastavljanja virusnih čestica.

2.4.2.3. Genska stabilnost insertiranih sekvencija

Važan čimbenik o kojem treba voditi računa tijekom proizvodnje replikacijsko-kompetentnih RNA virusa, posebno onih koji se namjeravaju koristiti kao cjepiva, je genska stabilnost insertiranih sekvencija. To često predstavlja veliki izazov kod virusa koji imaju dodatne površinske proteine, jer oni nisu neophodni za virusni ciklus i ne postoji selekcijski pritisak da se održi njihov integritet (Bukreyev i sur., 2006). Stabilnost insertiranih sekvencija se obično određuje tijekom postupka uzastopne kultivacije virusa u određenoj staničnoj liniji, a metode koje se za to koriste su: sekvenciranje (Malczyk i sur., 2015; Schnell i sur., 1996; Viktorova i sur., 2018; Zuniga i sur., 2013), umnažanje s kalupa cDNA (Mebatsion i sur., 1996), određivanje ekspresije

westernskom metodom otiska (Frantz i sur., 2021), analiza enzimske aktivnosti (Mebatsion i sur., 1996; Schnell i sur., 1996), imunofluorescencija (Schnell i sur., 1996; Zuniga i sur., 2013) i fluorescencijska mikroskopija (Hu i sur., 2014).

Genska stabilnost inseriranih sekvencija kod NSN RNA virusa je u pravilu veća u odnosu na inserirane sekvencije kod pozitivnih RNA virusa. Dok su inserti kod pozitivnih RNA virusa podložni djelomičnim ili potpunim delecijama (revijalni prikaz u Willemsen i Zwart, 2019), inserti kod NSN RNA virusa znatno sporije i rjeđe nakupljaju točkaste mutacije i delecije.

To, između ostalog, potvrđuju primjeri NDV-a (Krishnamurthy i sur., 2000), VSV-a (Schnell i sur., 1996) i virusa bjesnoće (Mebatsion i sur., 1996) s ugrađenim genom za reporterski protein kloramfenikol acetiltransferazu veličine cca. 700 nukleotida. Ova tri rekombinantna virusa su nakon uzastopne kultivacije u trajanju od 8, 15, odnosno 25 pasaža, uspješno zadržala funkcionalnu ekspresiju ugrađenog enzima. Dodatno, na kraju kultiviranja rekombinantnog VSV-a, u dva od ukupno šest analiziranih plakova je detektirana po samo jedna nukleotidna substitucija, a nijedna od njih nije imala značajniji učinak na aktivnost ugrađenog enzima (Schnell i sur., 1996). Mogućnost stabilne ugradnje reporterskog gena je pokazana i na primjeru gena za pojačani zeleni fluorescentni protein (*enhanced green fluorescent protein*, EGFP). Tako su hRSV i virus zaušnjaka s ugrađenim EGFP-om tijekom uzastopne kultivacije u svakom od 9, odnosno 15 testiranih pasaža, pokazali usporedivu razinu fluorescencije (Hu i sur., 2014; Zhou i sur., 2019a).

Što se tiče vektorskih cjepiva, genska stabilnost inserata u takvim konstruktima se najčešće ispituje na staničnim linijama koje su odobrene za proizvodnju cjepiva, poput stanica Vero, MRC-5, MDCK te fibroblasta pilećih embrija (Perdue i sur., 2011; Rodrigues i sur., 2015). Većina dosad objavljenih studija je pokazala da takvi konstrukti imaju mogućnost funkcionalne ekspresije stranog gena i dobru razinu genske stabilnosti. Tako je pokazano da tijekom kultiviranja od 10 pasaža na stanicama Vero, virusi ospica koji ekspimiraju protein šiljka (*spike*, S) virusa MERS-CoV s različitih pozicija u genomu nisu nakupili značajnije mutacije ili delecije u tom antigenkodirajućem genu (Malczyk i sur., 2015). Slično je dobiveno i za virus ospica koji ekspimirira gen Env virusa ljudske imunodeficijencije-1 (HIV-1). Ovaj cijepni kandidat je tijekom 10 pasaža na stanicama MRC-5 zadržao stabilnost inserta, što je potvrđeno analizom sekvencija iz pojedinačnih sincicija u svakom pasažu tog virusa (Zuniga i sur., 2013). Očuvanje identiteta ugrađenih sekvencija je pokazano i na primjeru NDV-a s ugrađenim genom GP virusa ebole (NDV/GP)

(DiNapoli i sur., 2010) te s ugrađenim genom za kapsidni protein i genom za proteazu poliovirusa tipa 1 (NDV-polio) (Viktorova i sur., 2018). Sekvenciranje cijepnih kandidata NDV/GP i NDV-polio je pokazalo da, nakon 4 pasaža na stanicama DF-1, odnosno 10 pasaža u embrioniranim kokošnjim jajima, u insertiranim sekvencijama nisu uočene delecije ili značajnije mutacije (DiNapoli i sur., 2010; Viktorova i sur., 2018).

Važan primjer vezan uz gensku stabilnost insertiranih sekvencija je MEDI-534, cijepni kandidat baziran na goveđem virusu parainfluence 3 u kojeg su ugrađeni glikoproteini virusa hPIV3 (b/hPIV3) i koji eksprimira nativni oblik proteina F hRSV-a. Genska stabilnost ovog cijepnog kandidata je testirana u pretkliničkim istraživanjima kada je virus kultiviran 10 puta na stanicama Vero te je potvrđeno da se dodani gen stabilno održava tijekom kultiviranja (Tang i sur., 2003). Međutim, usprkos ohrabrujućim rezultatima u inicijalnim istraživanjima (Tang i sur., 2008), cijepni kandidat MEDI-534 je u fazi I kliničkog ispitivanja inducirao seroodgovor na protein F hRSV-a u samo 50% seronegativne djece (Bernstein i sur., 2012). Sekvenciranje virusa iz ispirka nosne šupljine cijepljenika je pokazalo da je više od polovina testiranih uzoraka imala promjene u sastavu virusnih populacija koje su se povezivale sa smanjenom ekspresijom proteina F hRSV-a (C. F. Yang i sur., 2013). Genska stabilnost ovog cijepnog kandidata je bila narušena u uvjetima *in vivo*, iako je u početnom cijepnom pripravku detektirano samo 2,5% varijanti koje nisu ekspimirale dodani gen (C. F. Yang i sur., 2013). Iako je razvoj MEDI-534 zaustavljen zbog gubitka imunogeničnosti (C. F. Yang i sur., 2013), slične platforme bazirane na b/hPIV3 se razvijaju i danas. Ovakvi primjeri potvrđuju važnost detaljnog praćenja vektorskih cjepiva tijekom cijelog proizvodnog procesa, kako bi se osigurao integritet insertiranih sekvencija te efikasnost dobivenih pripravaka.

2.4.3. Pregled vektorskih cjepiva baziranih na nesegmentiranim negativnim RNA virusima

Vektorska cjepiva bazirana na NSN RNA virusima se najčešće razvijaju za suzbijanje emergentnih virusnih bolesti s mogućim epidemijskim i pandemijskim potencijalom. Tako je, primjerice, konstruiran virus ospica koji eksprimira strukturne proteine virusa Chikungunya (CHIKV). Ovaj cijepni kandidat je u fazi II kliničkog ispitivanja pokazao zadovoljavajući sigurnosni profil i imunogeničnost neovisnu o postojećoj imunosti na virus ospica (Reisinger i sur., 2019). Cijepni kandidati bazirani na virusu ospica se razvijaju i za virus Nipah (Yoneda i sur.,

2013), virus Zika (NCT04033068) i virus Lassa groznice (LASV) (Tschismarov i sur., 2023), a potonji je u fazi I kliničkog ispitivanja dao obećavajuće rezultate što se tiče sigurnosti i imunogeničnosti (Tschismarov i sur., 2023). Virus VSV se također razmatra kao vektor za dobivanje cijeptog kandidata protiv LASV-a (Safronetz i sur., 2015), ali i protiv brojnih drugih virusa koji uzrokuju hemoragijske groznice, između ostalog i virusa krimsko-kongoanske hemoragijske groznice (Rodriguez i sur., 2019), virusa Marburg (Mire i sur., 2014) te virusa Andes (Prescott i sur., 2014). Vjerojatno najpoznatiji primjer cjepiva baziranog na VSV-u je cjepivo protiv virusa ebole, ERVEBO[®], koje umjesto glikoproteina G VSV-a eksprimira glikoprotein GP virusa ebole (Monath i sur., 2019). Cjepivo ERVEBO[®] je odobreno od strane Europske agencije za lijekove (EMA) i Američke uprave za hranu i lijekove (FDA) za primjenu na ljudima (EMA, 2024; FDA, 2023). Brojna klinička ispitivanja su pokazala da je ovo cjepivo sigurno i visoko imunogenično u širokom rasponu doza (revijalni prikaz u Monath i sur., 2019), a njegova efikasnost je potvrđena tijekom epidemije u Gvineji na skupinama kontakata oboljelih osoba cijepljenih odmah ili s odgodom od tri tjedna (Henao-Restrepo i sur., 2017). Do sredine 2024. godine, cjepivo ERVEBO[®] je bilo jedino ljudsko živo cjepivo bazirano na NSN RNA virusima koje je stavljeno na tržište.

Važnost cjepiva koje štite od emergentnih virusnih bolesti je nedavno pokazana na primjeru virusa SARS-CoV-2. Još prije pandemije, velika pozornost je bila usmjerena na razvoj cjepiva za zaštitu od koronavirusa SARS-CoV i MERS-CoV, a cijeptni kandidati bazirani na NDV-u i VSV-u koji sadrže gene za ekspresiju proteina S tih virusa su pokazivali obećavajuće rezultate (DiNapoli i sur., 2007; Liu i sur., 2018). Od 2020. godine, kada je počela pandemija SARS-CoV-2, razvijen je veliki broj cijeptnih kandidata baziranih na NSN RNA virusima, ali nijedan od tih kandidata još uvijek nije odobren za upotrebu. Dva kandidata čiji razvoj je najdalje došao su bila V591, koji je kao vektor koristio virus ospica i BRILIFE, koji je kao vektor koristio VSV. Razvoj V591 je stao u fazi I kliničkih ispitivanja jer je pokazano da cijeptni kandidat nije bio dovoljno imunogeničan. Točan razlog smanjene imunogeničnosti nije poznat, ali pretpostavlja se da bi mogao biti povezan s antigenskim dizajnom (korišten je stabilizirani prefuzijski protein S), ili vjerojatnije, s postojećom imunitetom na virus ospica (Vanhoutte i sur., 2022). Cijeptni kandidat BRILIFE je u pretkliničkim istraživanjima pokazao odlične rezultate što se tiče sigurnosti i imunogeničnosti (Madar-Balakirski i sur., 2022), ali je zaustavljen u fazi IIb/III kliničkih ispitivanja zbog povlačenja stranke odgovorne za njegovu komercijalizaciju (NCT04990466). Što

se tiče aktualnih istraživanja, u tijeku je faza I kliničkog ispitivanja pedijatrijskog intranazalnog cijeptnog kandidata, virusa b/hPIV3 koji eksprimira optimalno stabilizirani prefuzijski protein S (preS-6P) virusa SARS-CoV-2 (NCT06026514). Cijeptni kandidat baziran na NDV-u koji eksprimira preS-6P je također u fazi I kliničkih ispitivanja, a rezultati koji su dosad objavljeni pokazuju da ovaj kandidat ima dobar sigurnosni profil te da inducira značajne imunosne odgovore, slične onima detektiranim u konvalescenata (Ponce-de-León i sur., 2023).

Virusi iz skupine NSN RNA virusa se koriste i za razvoj cjeptiva protiv kroničnih virusnih bolesti, neovisno o tome postoje li već za njih cjeptiva. Atenuirani VSV vektor N4CT1 koji eksprimira glikoprotein MHB virusa hepatitisa B istražuje se kao kandidat za prevenciju akutnih infekcija, ali i za kontrolu kroničnih infekcija tim virusom (Moshkani i sur., 2019). Kandidati za cjeptivo protiv HIV-a, bazirani na SeV-u i atenuiranom VSV-u, su završili s fazom I kliničkih ispitivanja. Oba ta kandidata su testirana u heterolognim sustavima imunizacije, gdje se NSN RNA virus koji kodira za protein Gag virusa HIV-1 kombinirao s nereplicirajućim virusom (Nyombayire i sur., 2017) ili plazmidnim DNA cjeptivom (Li i sur., 2017). Dok je cijeptni kandidat baziran na SeV-u pokazao nedovoljnu imunogeničnost za daljnji nastavak istraživanja (Nyombayire i sur., 2017), cijeptni kandidat baziran na VSV-u je inducirao slabe humoralne, ali dugotrajne i polifunkcionalne stanične odgovore, što ukazuje da bi VSV mogao biti dio rješenja za dizajn cjeptiva protiv HIV-a (Li i sur., 2017).

Cijeptni kandidati bazirani na NSN RNA virusima razvijaju se i za brojne druge viruse koji predstavljaju opasnost po zdravlje čovjeka, poput virusa influence, hRSV-a i ljudskog metapneumovirusa (hMPV). Zbog pojave sezonskih globalnih epidemija gripe, važno je dizajnirati cjeptiva koja štite protiv različitih sojeva bolesti. Jedna od takvih platformi, u kojoj se koristi heterologna imunizacija s virusima VSV koji ekspimiraju kimerne hemaglutinine raznih virusa influence, je zadnje zabilježena u pretkliničkoj fazi razvoja (Ryder i sur., 2016). Od uzročnika akutnih pedijatrijskih respiratornih bolesti, virus hRSV se vjerojatno najviše istražuje. Istraživanja na cijeptnom kandidatu MEDI-534 su pokazala da je b/hPIV3 dobar odabir za ekspresiju proteina F hRSV-a jer ima zadovoljavajući sigurnosni profil i željenu razinu atenuacije (Bernstein i sur., 2012). Nastavno na iskustvo s MEDI-534, drugi autori su gensku nestabilnost i smanjenu imunogeničnost nastojali izbjeći upotrebom optimalnog dizajna proteina F hRSV-a, a takav sustav je u istraživanjima na majmunima pokazao obećavajući potencijal za primjenu u docjepljivanju ili

za primarnu imunizaciju u prisustvu pasivnih neutralizacijskih antitijela (Liang i sur., 2020). Vektorska cjepiva koja ekspimiraju protein F hRSV-a razvijaju se i pomoću drugih vektora, kao što je primjerice SeV (SeVRSV) (Scaggs Huang i sur., 2021). Cijepni kandidat SeVRSV se istražuje u kontekstu intranazalnog bivalentnog cjepiva za primjenu kod dojenčadi te je u fazi I kliničkih ispitivanja pokazao dobar sigurnosni profil na seropozitivnim pojedincima (Scaggs Huang i sur., 2021). SeV se koristi i kao vektor za razvitak intranazalnog cjepiva protiv hMPV-a. Cijepni kandidat baziran na SeV-u koji sadrži skraćeni gen F hMPV-a je u početnim fazama istraživanja na štakorima pokazao zadovoljavajuće odgovore humoralne imunosti i mogućnost zaštite od virusa (Russell i sur., 2017).

2.4.4. Rekombinantni virusi temeljeni na genomu virusa zaušnjaka

Otkriće tehnologije reverzne genetike je omogućilo i proizvodnju rekombinantnih virusa baziranih na genomu virusa zaušnjaka. Tako su tijekom godina rekombinantni virusi zaušnjaka dizajnirani s ciljem detaljnijeg istraživanja biologije ovog virusa (Malik i sur., 2019; Xu i sur., 2011), optimizacije postojećih cjepiva (Zhou i sur., 2019b) te tumorske terapije (Ammayappan i sur., 2016). Mogućnost primjene atenuiranog virusa zaušnjaka u proizvodnji vektorskih cjepiva je potvrđena u nedavno provedenim studijama.

Tako je primjerice pokazano da je cijepni soj virusa zaušnjaka JL, u heterolognom sustavu imunizacije s atenuiranim VSV vektorom N4CT1, omogućio značajno pojačanje staničnih odgovora specifičnih za dodani protein Gag virusa HIV-1 (Xu i sur., 2009). Obećavajući rezultati su dobiveni i za cijepnog kandidata za SARS-CoV-2, virus JL2 s ugrađenim genom za preS-6P, koji je u animalnim modelima bio jako imunogeničan i omogućio zaštitu od raznih varijanti virusa (Zhang i sur., 2022). Ista skupina autora je nedavno pokazala mogućnost manipulacije virusom zaušnjaka unutar trovalentne platforme, cjepiva MMR, kada su njegove komponente (sojevi virusa zaušnjaka JL1 i JL2 te soj virusa ospica) modificirane tako da ekspimiraju preS-6P virusa SARS-CoV-2 podrijetlom od triju varijanti (Xu i sur., 2023).

Što se tiče genske stabilnosti, molekularno-epidemiološke studije divljih sojeva virusa zaušnjaka su pokazale da stopa evolucijske promjene, mjerena kao prosjek broja nukleotidnih

supstitucija u konsenzusnoj sekvenciji po mjestu po godini dana, za virus zaušnjaka iznosi $9,168 \times 10^{-4}$ (Pomeroy i sur., 2008), što ga svrstava među genski stabilne RNA viruse.

Tijekom posljednjih godina, sustavi reverzne genetike za proizvodnju rekombinantnih virusa zaušnjaka razvijeni su za brojne sojeve, uključujući divlje tipove virusa: MuV/New York.USA/2009 [G], 88-1961 i MuV/Iowa.US/2006 (Bamford i sur., 2019; Malik i sur., 2019; Xu i sur., 2011) i cijepne sojeve: Urabe, JL5, JL2 i S79 (Ammayappan i sur., 2016; Beaty i sur., 2017; Xu i sur., 2009; Zhang i sur., 2022; Zhou i sur., 2019b). U Laboratoriju za molekularnu biomedicinu Centra za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji u Zagrebu je nedavno uspostavljen sustav za proizvodnju rekombinantnih virusa zaušnjaka baziran na konsenzus sekvenciji cijepnog soja L-Zagreb (Slović i sur., 2021). Soj L-Zagreb odobren je za upotrebu 1972. godine (Beck i sur., 1989), od kada se kontinuirano koristi za proizvodnju monovalentnih i multivalentnih živih atenuiranih cjepiva. Ovaj soj ima prednost u odnosu na ostale, jer u područjima gdje je korišten u imunizacijama nisu zabilježene epidemije zaušnjaka, za razliku od široko primjenjivanog soja JL (Connell i sur., 2020). Podaci prikupljeni tijekom više od 50 godina upotrebe širom svijeta pokazuju da cijepljenje sojem L-Zagreb inducira visoke stope serokonverzije i omogućuje dobru razinu zaštite (Svjetska zdravstvena organizacija, 2024b). Što se tiče njegove sigurnosti, istraživanje provedeno 2002. u Brazilu je zabilježilo porast u broju slučajeva aseptičnog meningitisa nakon masovne imunizacije u usporedbi s povijesnom incidencijom (da Silveira i sur., 2002). Međutim, velika prospektivna studija u Egiptu koja je 2009. godine provedena na više od 450000 djece nije pokazala tu povezanost (Sharma i sur., 2010). Soj L-Zagreb odobren je od strane Svjetske zdravstvene organizacije, a kada se koristi u masovnim imunizacijama, obično se primjenjuju odgovarajuće strategije za pojačanje nadzora i komunikaciju o rizicima (Svjetska zdravstvena organizacija, 2024b).

2.5. Vektorska cjepiva protiv virusa hepatitisa C

2.5.1. Virus hepatitisa C

Virus HCV pripada rodu *Hepacivirus* iz porodice *Flaviviridae*. Od 2016. godine, Međunarodni odbor za taksonomiju virusa (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) kao ime ove virusne vrste navodi *Hepacivirus C*, no u znanstvenoj zajednici je zadržan

općeprihvaćen naziv „virus hepatitisa C“. Genom HCV-a čini nesegmentirana, jednolančana molekula RNA pozitivnog smisla duljine oko 9600 nukleotida koja se u stanici domaćina translatira u jedan veliki poliprotein. On se djelovanjem staničnih i virusnih proteaza procesira u ukupno 10 proteina, od kojih su tri strukturna: protein jezgre (*core*, C) i proteini ovojnice (*envelope*) E1 i E2 te sedam nestrukturnih (NS) proteina: p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B zaduženih za replikaciju i sastavljanje virusnih čestica (Lindenbach i sur., 2013). Virus HCV ima visoku razinu genske raznolikosti te se klasificira u 8 genotipova (30-35% razlika u nukleotidnoj sekvenciji) i 105 subtipova (20-25% razlika u nukleotidnoj sekvenciji), od čega je genotip 1 globalno najzastupljeniji (Martinez i Franco, 2020). Genska raznolikost je prisutna i na intra-domaćinskoj razini zbog kvazivirsne strukture populacije (1-3% razlika u nukleotidnoj sekvenciji), a najveća raznolikost je zabilježena kod strukturnih proteina E1 i E2 koji su najizloženiji imunom sustavu i selekcijskim pritiscima domaćina (Martinez i Franco, 2020).

2.5.2. Teret bolesti i postojeća terapija

Virus HCV se prenosi kontaktom s krvlju zaražene osobe, a u inficiranih pojedinaca uzrokuje akutnu i kroničnu upalnu bolest jetre, hepatitis C. Akutne infekcije su najčešće asimptomatske te u većini slučajeva ne uzrokuju po život opasna stanja (Svjetska zdravstvena organizacija, 2023). Kronične infekcije su slabo progresivne i mogu dovesti do fibroze i ciroze jetre, a u težim slučajevima, i dekompenzirane ciroze, hepatocelularnog karcinoma i terminalne bolesti jetre (Martinez i Franco, 2020). Procjene Svjetske zdravstvene organizacije su pokazale da oko 58 milijuna ljudi (1% populacije) živi s kroničnim hepatitisom C, dok se oko 1,5 milijuna novih slučajeva infekcije javlja svaku godinu (Svjetska zdravstvena organizacija, 2023).

Standardno liječenje danas uključuje upotrebu direktno djelujućih antivirusnih lijekova koji specifično inhibiraju proteine NS nužne za proteaznu aktivnost ili replikaciju virusa (Dietz i Maasoumy, 2022). Ovakvi lijekovi su sigurniji i imaju veći pangenotipni potencijal u odnosu na pegilirani IFN- α i ribavirin koji su korišteni ranije (Dietz i Maasoumy, 2022). Ograničenja direktno djelujućih antivirusnih lijekova uključuju visoku cijenu tretmana, mogućnost razvitka rezistentnih virusnih varijanti te činjenice da nemaju 100%-tnu učinkovitost i da ne štite od ponovnih infekcija. Dodatni problem predstavlja i česta asimptomatska priroda akutne bolesti zbog koje je onemogućena njena rana dijagnostika, što rezultira velikim brojem nedijagnosticiranih pojedinaca

koji ostaju glavnim izvorom transmisije virusa (Sepulveda-Crespo i sur., 2020). Shodno svemu navedenom, primjena profilaktičkog cjepiva bila bi dobro rješenje za kontrolu transmisije virusa i smanjenje broja oboljelih.

2.5.3. Razvoj profilaktičkog cjepiva

Usprkos činjenici da HCV predstavlja globalni zdravstveni problem, trenutno još uvijek ne postoji cjepivo protiv ovog virusa (Svjetska zdravstvena organizacija, 2023). Glavne prepreke u razvoju učinkovitih cjepiva protiv HCV-a uključuju veliku gensku heterogenost virusa, mogućnost izbjegavanja imunosnih odgovora u inficiranom domaćinu, nedostatak prikladnih sustava za validaciju cijepnih kandidata (sustavi *in vitro* i mali imunokompetentni animalni modeli), poteškoće u dizajnu kliničkih ispitivanja te nedostatak dobro definiranih imunosnih markera koji predviđaju razinu zaštite od infekcije (Duncan i sur., 2020; Echeverría i sur., 2021).

Oko 20-40% inficiranih pojedinaca može spontano razriješiti infekciju (Svjetska zdravstvena organizacija, 2023) i razviti imunosne odgovore, koji ne omogućuju sterilizirajuću imunost, ali mogu pomoći kod reinfekcija (Duncan i sur., 2020). Ta činjenica sugerira da bi profilaktičko cjepivo koje može inducirati slične imunosne odgovore moglo biti korisno u borbi protiv infekcije HCV-om (Duncan i sur., 2020; Echeverría i sur., 2021). Spontano razrješenje infekcije se povezuje s aktivacijom obje grane specifične imunosti, staničnom i humoralnom. Stanični odgovori su obično usmjereni na epitope na raznim virusnim proteinima, a humoralni su većinom usmjereni na epitope na površinskim proteinima E1 i E2 (Echeverría i sur., 2021). Važnost širokog i perzistentnog staničnog odgovora se očituje u djelovanju CD4⁺ T limfocita, koji inhibiraju virusnu replikaciju i reguliraju ostale imunosne odgovore te CD8⁺ T limfocita, koji uklanjaju inficirane stanice i induciraju antivirusno stanje. Gubitak CD4⁺ T limfocita vodi ka ponovnoj uspostavi virusne replikacije i pojavi CD8⁺ T limfocita s „iscrpljenim“ fenotipom uslijed produljenog izlaganja antigenu. Stanice s „iscrpljenim“ fenotipom imaju smanjenu mogućnost proliferacije, citotoksične aktivnosti i proizvodnje citokina te su karakterističan pokazatelj ulaska u stanje kronične infekcije (Chigbu i sur., 2019; Duncan i sur., 2020). Važnost humoralnog odgovora se očituje kroz sintezu neutralizacijskih antitijela koja štite od različitih sojeva virusa (*broadly neutralizing antibodies*, bnAbs). Odgođena sinteza antitijela bnAbs dovodi do razvoja

kronične infekcije, tijekom koje se antitijela bnAbs i dalje sintetiziraju, ali ju ne mogu adekvatno kontrolirati (Guo i sur., 2018; Sepulveda-Crespo i sur., 2020).

S obzirom na sve prethodno navedeno, idealno profilaktičko cjepivo protiv HCV-a bi trebalo inducirati visoki titar antitijela bnAbs protiv proteina E1 i E2 te aktivirati odgovore stanične imunosti, što je između ostalog, karakteristika vektorskih cjepiva koja se baziraju na živim atenuiranim sojevima. Trenutni cilj u razvoju cjepiva nije postizanje sterilizirajuće imunosti, već smanjenje titra virusa i indukcija zaštitnih odgovora, što bi trebalo biti dovoljno da se značajno ograniči transmisija virusa i spriječi virusna perzistencija (Duncan i sur., 2020; Sepulveda-Crespo i sur., 2020).

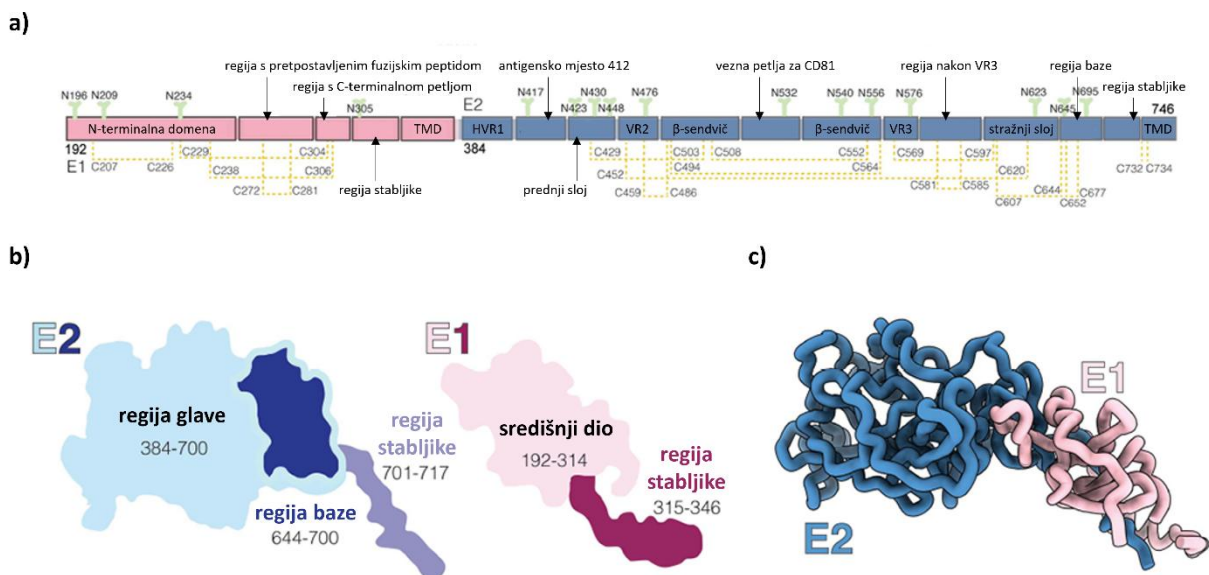
2.5.4. Proteini E1 i E2 u dizajnu vektorskih cjepiva

Dva antigena HCV-a, proteini E1 i E2, su trenutno glavni kandidati za dizajn profilaktičkog cjepiva protiv ovog virusa (Toth i sur., 2021). Ovi glikoproteini pripadaju skupini transmembranskih proteina tipa-I te sadrže N-terminalnu ektodomenu i C-terminalnu hidrofobnu domenu kojom su vezani za membranu (Sepulveda-Crespo i sur., 2020). Oba proteina se (kao dio poliproteina) procesiraju i smataju u endoplazmatskom retikulumu (ER) u međusobno ovisnom procesu, čime nastaju glikozilirani nekovalentni heterodimeri E1-E2, koji na površini virusnih čestica vjerojatno poprimaju trimernu strukturu (Ströh i Krey, 2020; Toth i sur., 2021). Osnovna funkcija heterodimera je da omogući ulazak virusa u hepatocite. Virusne čestice se prihvaćaju za površinu stanica interakcijama s LDL receptorom i glikozaminoglikanima, a u stanice ulaze interakcijama heterodimera E1-E2 s molekulama CD81 i ljudskim čistačkim receptorom B tipa 1 te djelovanjem dodatnih faktora koji omogućuju ulazak poput kladina-1 i okladina (Lindenbach i Rice, 2013).

Protein E1 ima 192 aminokiseline, a struktura mu je podijeljena na tri osnovna dijela, središnji dio (*core region*), regiju stabljike (*stem region*) i transmembransku domenu (TMD) (Torrents de la Peña i sur., 2022) (slika 8a-b). Ovaj protein sadrži četiri do pet konzerviranih N-vezanih glikozilacijskih mjesta (Ströh i Krey, 2020; Toth i sur., 2021) i dvije konzervirane aminokiselinske regije u sekvenciji poliproteina koje su identificirane kao vezna mjesta antitijela

bnAbs: 192-202 i 313-324 (Sepulveda-Crespo i sur., 2020; Ströh i Krey, 2020). Ostale navedene aminokiselinske regije u nastavku ovog odlomka se također odnose na sekvenciju poliproteina.

Protein E2 je najvarijabilniji protein HCV-a i sadrži glavne antigenske determinante ovog virusa (Sepulveda-Crespo i sur., 2020). Ovaj protein ima 363 aminokiseline i 9 do 11 konzerviranih N-vezanih glikozilacijskih mjesta (Toth i sur., 2021). Struktura proteina E2 je podijeljena na tri osnovna dijela, regiju glave (*head region*), regiju stabljike i TMD (slika 8a-b). Većina varijabilnih mjesta na proteinu E2 je koncentrirana u tri varijabilne regije (VR): hipervarijabilnoj regiji 1 (HVR1), VR2 i VR3 (Torrents de la Peña i sur., 2022). Regija HVR1 je imunodominantna regija locirana na N-terminalnom dijelu proteina koja tijekom infekcije značajno mutira i dovodi do stvaranja mutanata koje izbjegavaju neutralizacijski odgovor (Sepulveda-Crespo i sur., 2020). Vezna mjesta antitijela bnAbs na proteinu E2 se pretežno poklapaju s konzerviranim mjestom vezanja receptora CD81, a uključuju: (a) epitop I/domenu E u N-terminalnoj regiji (412-423), (b) epitop II/domenu D u prednjem sloju (*front layer*; 428-446) i (c) epitop III/domenu B u veznoj petlji za CD81 (*CD81 binding loop*; 518-542) (Sepulveda-Crespo i sur., 2020; Ströh i Krey, 2020). Dio veznih mjesta se nalazi na spoju proteina E2 s proteinom E1 (antigenske regije 4 i 5), a vezanje antitijela bnAbs u tom slučaju zahtijeva prisustvo heterodimera E1-E2 (Sepulveda-Crespo i sur., 2020; Toth i sur., 2023). Struktura heterodimera E1-E2 je otkrivena nedavno kada je predložen i model vezanja ovih dvaju proteina, prema kojem se ektodomena proteina E1 omotava oko regije stabljike proteina E2 i ostvaruje interakcije s regijom baze (*base region*) tog proteina (Torrents de la Peña i sur., 2022) (slika 8c).



Slika 8. Struktura proteina ovojnice E1 i E2 virusa hepatitisa C. (a) Linearni dijagram proteina E1 i E2. Protein E1 je podijeljen na strukturne komponente: N-terminalnu domenu, regiju s pretpostavljenim fuzijskim peptidom (*pFP-containing region*), regiju s C-terminalnom petljom (*C-terminal loop region*), regiju stabljike (*stem region*) i transmembransku domenu (TMD). Protein E2 je podijeljen na strukturne komponente: tri varijabilne regije (VR) (hipervarijabilna regija 1 (HVR1), VR2 i VR3), antigensko mjesto 412 (*antigenic site 412*), prednji sloj (*front layer*), dvije regije β -sendviča, veznu petlju za CD81 (*CD81 binding loop*), stražnji sloj (*back layer*), regiju baze (*base region*), regiju stabljike i TMD. N-vezana glikozilacijska mjesta su prikazana zelenim oznakama, a disulfidne veze žutim oznakama. (b) Shematski prikaz osnovnih strukturnih dijelova ektodomena proteina E1 (središnji dio (*core region*) i regija stabljike) i E2 (regija glave (*head region*) s pripadajućom regijom baze i regija stabljike). (c) Model strukture heterodimera E1-E2 dobiven krio-elektronskom mikroskopijom. Preuzeto i prilagođeno od: Torrents de la Peña i sur., 2022.

Veliki broj istraživanja koja se bave razvojem profilaktičkog cjepiva protiv HCV-a je vezan uz rekombinantna vektorska cjepiva. Virusni vektori su zanimljivi kandidati za proizvodnju cjepiva protiv HCV-a, jer omogućuju prezentaciju antigena u prirodnoj formi (sa cijelim spektrom B i T epitopa) ili u formi modificiranoj na točno određeni način, te stimulaciju jakih humoralnih i perzistentnih $CD4^+$ i $CD8^+$ T staničnih odgovora (Guo i sur., 2018; Schlotthauer i sur., 2021).

Dosad su proizvedeni razni rekombinantni virusi koji eksprimiraju gene E1 i E2, a baziraju se na replikacijsko-defektnim vektorima poput adenovirusa (Chmielewska i sur., 2014) i adeno-pridruženog virusa (Zhu i sur., 2019) te replikacijsko-kompetentnim vektorima poput VSV-a (Buonocore i sur., 2002; Ezelle i sur., 2002; Tani i sur., 2007) i virusa ospica (Kasama i sur., 2011; Reyes-del Valle i sur., 2012). Dio tih replikacijsko-kompetentnih virusa je pokazao obećavajuće rezultate što se tiče aktivacije HCV-specifične imunosti. Tako je pokazano da VSV, koji sadrži cjelovite proteine C, E1 i E2 HCV-a, može inducirati efikasne stanične i humoralne imunosne odgovore protiv HCV-a (Ezelle i sur., 2002). Dva cijepljena kandidata bazirana na virusu ospica, jedan koji sadrži cjelovite proteine C, E1 i E2 HCV-a i drugi koji sadrži ektodomene proteina E1 i E2 HCV-a vezane na transmembransku i citoplazmatsku domenu (TMD/CD) proteina F virusa ospica, ispitana su u radu od Reyes-del Valle i sur. (2012). Oba ta kandidata su pokazala mogućnost aktivacije HCV-specifičnih neutralizacijskih odgovora protiv pseudočestica HCV-a, kimernih čestica baziranih na virusu HIV-1 koje sadrže glikoproteine HCV-a podrijetlom od istog soja HCV-a. Docjepljivanje s E2 proteinom istog soja HCV-a je kod oba kandidata povećalo razinu antitijela nAbs protiv iste vrste pseudočestica HCV-a, dok je kod kandidata koji sadrži cjelovite proteine omogućilo i sintezu antitijela nAbs protiv infektivnih kimernih HCV-a koji eksprimiraju strukturne proteine dvaju različitih sojeva HCV-a (Reyes-del Valle i sur., 2012).

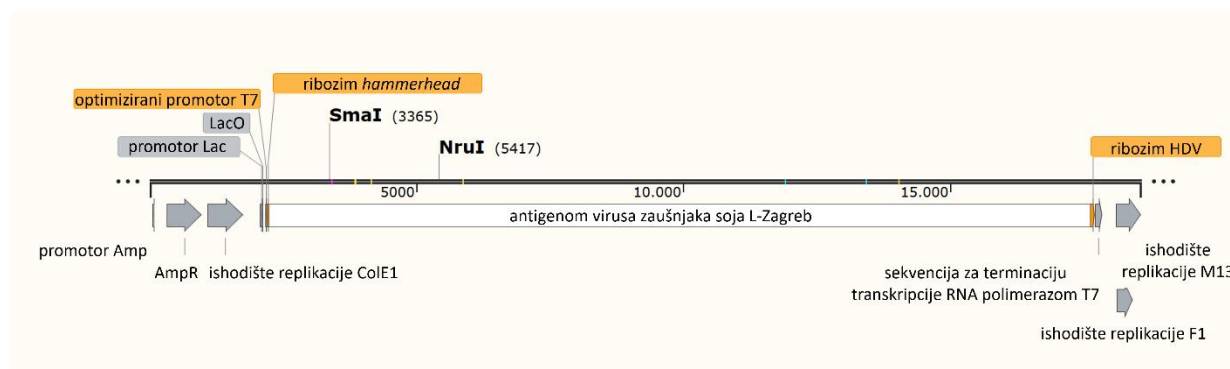
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Biološki materijali

3.1.1.1. Plazmidi

Plazmid pMRV2 (pristupni broj u bazi *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) *GenBank* MZ964863) sadrži čitavu antigenomsku konsenzus sekvenciju virusa zaušnjaka, baziranu na cijepnom soju L-Zagreb (pristupni broj u bazi NCBI *GenBank* AY685920). Osnovicu plazmida čini 286_p107(-)Luc, plazmid dobiven od dr. sc. Branke Horvat i dr. sc. Dennisa Gerliera iz *Centre International de Recherche en Infectiologie*, Lyon, Francuska. Dobivanje pMRV2 je opisano u radu od Slović i sur. (2021). Virusni antigenom je u pMRV2 ugrađen između sekvencije optimiziranog promotora T7 i sekvencije ribozima *hammerhead* smještenih uzvodno te sekvencije ribozima virusa hepatitisa delta smještenog nizvodno od mjesta ugradnje (slika 9). Sekvencija pMRV2 razlikuje se u devet nukleotidnih pozicija od konsenzus sekvencije soja L-Zagreb, od kojih je sedam uvedeno namjerno tijekom procesa kloniranja s ciljem dodatka novih restriksijskih mjesta. Dvije promjene u kodirajućoj regiji (*coding sequence*, CDS) gena L su nastale nehotice tijekom kloniranja: T9660C, koja dovodi do aminokiselinske promjene Leu408Pro te sinonimna supstitucija C11176T (Slović i sur., 2021). U ovaj plazmid sam ugrađivala sekvencije ATU koje kodiraju za površinske antigene HCV-a. Dodane gene C, E1 i E2 za plazmid pCE1E2-HCV-MRV2 te E1TMD i E2TMD za plazmid pE1E2TMD-HCV-MRV2 sam ugrađivala između restriksijskih mjesta *SmaI* i *NruI* tehnikom kloniranja *In-Fusion*.



Slika 9. Shematski prikaz vektorske mape plazmida pMRV2 dugog 18563 parova baza s restriktivnim mjestima enzima *SmaI* i *NruI*. Antigenomska sekvencija virusa zaušnjaka soja L-Zagreb omeđena je uzvodno s optimiziranim promotorom T7 i sekvencijom ribozima *hammerhead*, a nizvodno sa sekvencijom ribozima virusa hepatitisa delta (HDV). Plazmid sadrži i sekvenciju za terminaciju transkripcije RNA polimerazom T7, tri ishodišta replikacije (ColE1, F1 i M13) te gene AmpR i LacO za selekciju transformanata.

Pomoćne ekspresijske plazmide pSG5-N, pSG5-P i pSG5-L sam koristila tijekom proizvodnje kimernih virusa u postupku transfekcije stanica BSR T7/5, fibroblasta bubrega mladog hrčka (BHK) sa stabilnom ekspresijom RNA polimeraze T7 (Buchholz i sur., 1999). Dobivanje plazmida pSG5-N, pSG5-P i pSG5-L je opisano u radu od Slović i sur. (2021). Plazmidi su dobiveni ugradnjom 5' nekodirajućih regija (*noncoding region*, NCR) i cijelih regija CDS gena N, P i L virusa zaušnjaka (nukleotidne pozicije cDNA virusa zaušnjaka 56-1795, 1909-3152 i 8430-15223) iza promotora T7 u plazmidu pSG5 (Agilent Technologies). Plazmid pSG5-P je dodatno modificiran ugradnjom dvaju gvanozina u regiju editiranja genoma virusa zaušnjaka (nukleotidne pozicije cDNA virusa zaušnjaka 2439-2444).

3.1.1.2. Bakterijski sojevi

Pri postupku kloniranja *In-Fusion* sam koristila kompetentne bakterije *E. coli* soj HST08 (Stellar) (Takara Bio). Za umnažanja plazmida sam koristila kompetentne bakterije *E. coli* soj DH5αmcraB (Life Technologies). Bakterije sam uzgajala na krutom ili u tekućem mediju Luria Bertani (LB) s dodatkom ampicilina pri 37 °C.

3.1.1.3. Stanične linije

Linija BSR T7/5 je kontinuirana stanična linija BHK sa stabilnom ekspresijom RNA polimeraze T7 pod kontrolom citomegalovirusnog promotora i gena za rezistenciju na neomicin (Buchholz i sur., 1999). Ovu liniju sam koristila u postupku transfekcije za dobivanje kimernih virusa. Dobivena je od prof. dr. sc. Klausa Conzelmanna iz *Gene Center, Ludwig Maximilian University of Munich*, München, Njemačka.

Vero je kontinuirana stanična linija fibroblasta iz bubrega afričkog zelenog majmuna (*Cercopithecus aethiops*). Koristila sam ju u svrhe uzgoja i karakterizacije kimernih virusa. Ova linija je kupljena iz banke stanica *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC), kat. br. 84113001.

Primarna stanična kultura fibroblasta pilećih embrija dobivena je iz podružnice farmaceutske tvrtke Dechra iz Zagreba, gdje je pripremljena izolacijom stanica iz embrioniranih jaja. Za genske karakterizacije populacija kimernih virusa sam koristila uvijek prvi pasaž fibroblasta pilećih embrija.

3.1.1.4. Virusi

Pri biološkim karakterizacijama kimernih virusa dobivenih u ovom istraživanju, vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2, za usporedbe sam koristila dva rekombinantna virusa priređena postupkom reverzne genetike (Slović i sur., 2021). To su bili kontrolni virusi: (a) vMRV2, virus zaušnjaka proizveden iz plazmida pMRV2 (duljina i struktura genoma ovog virusa jednaka je prirodnim virusima zaušnjaka) i (b) vMRV3, virus zaušnjaka proizveden iz plazmida pMRV3, dobivenog ugradnjom gena za EGFP između gena N i P u plazmidu pMRV2 (još jedan kimerni virus zaušnjaka koji na istoj poziciji ima znatno kraći ATU).

Dobivanje kontrolnih virusa vMRV2 i vMRV3 i proizvodnja njihovih matičnih serija opisani su u radu od Slović i sur. (2021). Virusi vMRV2 i vMRV3 su dobiveni na stanicama BSR T7/5 postupkom reverzne genetike sličnim onom koji je korišten za viruse vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 (opisano u poglavlju 3.2.9.). Virus vMRV2 je prilagođen na stanice Vero kultiviranjem kroz jedan pasaž. Zbog slabo detektabilnog CPE-a na stanicama Vero, virus

vMRV3 je nakon dva pasaža na tim stanicama kultiviran jednim dodatnim pasažem na stanicama BSR T7/5 te je prilagođen na stanice Vero kultiviranjem kroz jedan pasaž. Matične serije ovih dvaju kontrolnih virusa priređene su na stanicama Vero po protokolu opisanom za viruse vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 (opisano u poglavlju 3.2.10.).

Varijabilnost populacija virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 tijekom uzastopne kultivacije na stanicama Vero sam uspoređivala s varijabilnošću populacija kontrolnih virusa vMRV2 i vMRV3 koji su u ranijem pokusu unutar laboratorija prošli sličan kultivacijski protokol u trajanju od 10 pasaža (Slović i sur., 2021). Matične serije kontrolnih virusa nasade su pri multiplacitetu infekcije (*multiplicity of infection*, MOI) 10^{-3} za vMRV2, odnosno, $MOI\ 2 \times 10^{-2}$ za vMRV3 te su kultivirane u obliku jedne replike prenošenjem 1 mL od 10 mL virusnog supernatanta iz svakog prethodnog pasaža za vMRV2, odnosno, prenošenjem 100 μ L od 10 mL virusnog supernatanta iz svakog prethodnog pasaža za vMRV3.

Varijabilnost populacija virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4 tijekom uzastopne kultivacije na fibroblastima pilećih embrija sam uspoređivala s varijabilnošću populacija kontrolnog virusa vMRV2 koji je u ranijem pokusu unutar laboratorija prošao sličan kultivacijski period u trajanju od 10 pasaža. Budući da je uzorak vMRV2 MS od početka pokazivao jaki CPE na ovim stanicama, on je nasaden pri $MOI\ 10^{-3}$ i kultiviran u obliku tri replike prenošenjem 1 μ L od ukupno 10 mL virusnog supernatanta iz svakog prethodnog pasaža.

U testovima određivanja virusnog titra koristila sam laboratorijski standard za cjepivo protiv zaušnjaka (soj Urabe) priređen u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu od izvornog uzorka prvog internacionalnog standarda za virus zaušnjaka kupljenog od agencije *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC), kat. br. 90/534.

Za određivanje koncentracije antitijela IgG specifičnih za virus zaušnjaka u serumima imuniziranih zamorčića koristila sam ultracentrifugirani cijepni soj virusa zaušnjaka L-Zagreb (UC L-Zagreb) koji je za tu svrhu pripremljen na stanicama Vero u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.1.5. Rekombinantni proteini

Za detekciju antitijela specifičnih za protein E2 HCV-a u serumima imuniziranih zamorčica koristila sam rekombinantni protein E2 (rE2), podrijetlom od subtipa 1b (R&D Systems, kat. br. 9146-HC). Liofilizirani protein sam razrijedila u fiziološkoj otopini s fosfatnim puferom (*phosphate buffered saline*, PBS) (Capricorn Scientific) u koncentraciji 200 µg/mL, razdijelila ga i pohranila pri -20 °C.

3.1.1.6. Antitijela

Za detekciju proteina HCV-a sam koristila: 1) primarno mišje monoklonsko antitijelo AP33 koje prepoznaje konzervirane aminokiseline 412-423 u proteinu E2 (dobiveno od prof. dr. sc. Arvinda H. Patela iz *Centre for Virus Research, University of Glasgow*, Glasgow, Ujedinjeno Kraljevstvo), te 2) primarno mišje monoklonsko antitijelo koje prepoznaje konzervirane aminokiseline 21-40 u proteinu C, subtipa 1b (Abcam, kat. br. ab2740). Oba ta proteina sam detektirala sekundarnim kozjim anti-mišjim antitijelom IgG-AP (Santa Cruz Biotechnology, kat. br. sc-2008), dok sam u slučaju proteina E2 koristila i sekundarno kuniće anti-mišje antitijelo IgG-HRP (Cappel, kat. br. 55556).

Za detekciju proteina N virusa zaušnjaka sam koristila primarno štakorsko poliklonsko antitijelo (proizvedeno u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu) te sekundarna antitijela: kozje anti-štakorsko antitijelo IgG-AP (Santa Cruz Biotechnology, kat. br. sc-2021) ili kuniće anti-štakorsko antitijelo IgG-HRP (Sigma-Aldrich, kat. br. A5795).

Za detekciju β-aktina sam koristila primarno kuniće poliklonsko antitijelo (Abcam, kat. br. ab8227) te sekundarno kozje anti-kuniće antitijelo IgG-AP (Santa Cruz Biotechnology, kat. br. sc-2007).

Za određivanje koncentracije antitijela IgG specifičnih za virus zaušnjaka u serumima imuniziranih zamorčica sam koristila serum neimuniziranog zamorčica te serum zamorčica imuniziranog virusom UC L-Zagreb (oboje proizvedeno u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu). Za detekciju antitijela IgG specifičnih za virus zaušnjaka

i antitijela specifičnih za HCV u zamoračkim serumima sam koristila sekundarno kuniće anti-zamoračko antitijelo IgG-HRP (Sigma-Aldrich, kat. br. A5545).

3.1.1.7. Laboratorijske životinje

Za testiranje neurovirulentnog potencijala virusa koristila sam novookočene štakore soja LEW/Crl (Charles River Laboratories), mužjake i ženke, uzgojene u Imunološkom zavodu u Zagrebu na Odjelu za proizvodnju antiseruma i uzgoj pokusnih životinja. U analizi humoralnih imunskih odgovora nakon imunizacije virusima, koristila sam zamorčice soja CRL:(HA)BR (Charles River Laboratories) starosti 4-6 tjedana, mužjake i ženke, mase od 300 do 500 g, uzgojene u Imunološkom zavodu u Zagrebu na Odjelu za kontrolu kvalitete, u Jedinici za kontrolu bakterijskih cjepiva. Životinje su za cijelo vrijeme trajanja eksperimenta imale *ad libitum* pristup hrani i vodi te obogaćeni okoliš.

Pokuse na životinjama izvodila sam sukladno odobrenju Povjerenstva za bioetiku i dobrobit životinja Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. broj: 251-58-10617-23-164, od 17. veljače 2023.). Protokoli za brigu i rukovanje životinjama bili su u skladu sa smjernicama hrvatskog zakonodavstva, Zakona o zaštiti životinja (NN 102/17) i Pravilnika o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13), a koji su u skladu s Direktivom EC 2010/63/EU. Vodeći brigu o zaštiti životinja, u pokuse sam uključila minimalan broj životinja koji daje meritorne podatke. Tijekom pokusa nastojala sam zaštititi pokusne životinje od nepotrebnog stresa ili boli, smatrajući da se time još više pridonosi pouzdanosti rezultata.

3.1.2. Početnice, kemikalije, kompleti reagensa, enzimi i otopine

3.1.2.1. Početnice

Specifične početnice (Integrated DNA Technologies, Sigma-Aldrich) koje sam koristila u radu su navedene u tablici 1. Sve radne otopine početnica sam pripremila u koncentraciji 20 μ M i čuvala pri -20 °C.

Tablica 1. Početnice za umnažanje i sekvenciranje rekombinantnih plazmida te genoma kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C koji su dobiveni iz rekombinantnih plazmida.

Oznaka	Slijed nukleotida (5'-3')
SmaI ins NPLZg, For	AAATAATGGACTTTGCACCCGGGGGCTACCCATTGATA
revIN1	CGCCCACTTGC GACTGTGCATTTTGATTAGGATTGTTTGGAAGG
fwIN2	TTCCCAAACAATCCTAATCAAAATGCACAGTCGCAAGTGGGC
revIN2	CAACATTCAATTCCTGTCTCAATTAAATCACCAGTCTCATCTTGTT
fwIN3	GATGAGACTGGTGATTTAATTGAGACAGGAATGAATGTTGC
Deopti g6 spoj4 Nru, Rev	TTCATGGATTTTCTCGCGAGTCTGGCATTCTGTTGGGTTTCATATGGCG
N0(+)	CCAAGGGGAAAAAGAAGATGGGA
P6 _{novi} (-)	GCCTTCTTGAGCCATGATT
P _{startHindIII} (+)	ATTATTAAGCTTATGGATCAATTTATAAAACA
LZ6(-)	GCTCGCAATTTGTAAGTAGG
LZ9(+)	TTCTCTATCGGCCATCCACT
L12(-)	GTCTCACCTCCAGTGAATACC
L9(+)	AAGGCTAATGCGAAGCACTC
L25(-)	ACCAAGGGGAGAAAAGTAAAATC
N4(+)	GGCCTAGATCATCTGCTACT
N5(+)	TCGGTACAGTCCTAGATGTC
P10(-)	TTGTGGCCTTGCTTAACGAG
N11(+)	GAATTCAGGCCTTACTGCCTTC
V2(-)	GTTTCGCACTGATCGCACTTTGC
N15(+)	GGGATGGAACACCAAGAT
revC2(-)	TAGTTCACGCCGTCTTCCAG
N9 _{novi} (+)	AATGCACAGTCGCAAGTGGGC
revC(-)	CGCACGTGAGGGTATCGATGAC
fwE(+)	CAGATGCCTGGTCTGACTATCC
fwP(+)	TAGCTGGGTCCAAGGAGAG
LZ11 _{neo} (+)	CCATATAGCCACCAATCAGG
revL2(-)	CAACCCGTTCTAGACCATCAC

3.1.2.2. Kemikalije

- 100 mM 2'-deoksinukleozid-5'-trifosfati (dNTP): dATP, dCTP, dGTP i dTTP (Promega)

- Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (VWR International)
- HCl (Merck)
- boratna kiselina (Kemika)
- etilen-diamino-tetraoctena kiselina (EDTA) (Kemika)
- glicerol (Kemika)
- boja bromfenol plavo (Sigma-Aldrich)
- etidijev bromid (Sigma-Aldrich)
- agaroza (VWR International)
- molekularni ljestvica za DNA *1 kb Plus DNA Ladder* (New England Biolabs)
- pufer za reakciju restrikcije *10 × Cut Smart® Buffer* (New England Biolabs)
- pufer za reakciju *In-Fusion 5 × IN-Fusion HD Enzyme Premix* (Takara Bio)
- LB-medij (Carl Roth)
- LB-agar (Carl Roth)
- medij SOC (Takara Bio)
- ampicilin (USB Corporation)
- CaCl₂ (Kemika)
- NaOH (Kemika)
- natrijev dodecil sulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) (USB Corporation)
- kalijev acetat (Kemika)
- octena kiselina (Merck)
- izopropanol (Kemika)
- etanol (Kemika)
- minimalni esencijalni medij (*Minimum Essential Medium*, MEM) (Capricorn Scientific)
- Dulbeccov modificirani Eagle medij (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM) (Capricorn Scientific)
- 200 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich)
- 10000 jedinica/mL penicilin-10 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich)
- fetalni teleći serum (FTS) (PAN-Biotech)
- 100 mg/mL antibiotik G 418 (Sigma-Aldrich)
- 0,25%-tna otopina tripsin-EDTA (Imunološki zavod)

- tripansko modriilo (Imunološki zavod)
- mješavina stabilizatora 1 i 2 za pripremu virusa korištenih u pokusima *in vivo* (Imunološki zavod)
- medij za transfekciju stanica *Opti-MEM™ Reduced Serum Medium* (Gibco)
- reagens za transfekciju stanica metodom lipofekcije *Lipofectamine™ LTX Reagent* (Invitrogen)
- reagens za povećanje efikasnosti transfekcije stanica *PLUS™ Reagent* (Invitrogen)
- 2 × MEM (bez fenolnog crvenila) (PAN-Biotech)
- neesencijalne aminokiseline (NEAA) (Sigma-Aldrich)
- agar Noble (Sigma-Aldrich)
- natrijev acetat (Merck)
- boja neutralno crvenilo (Merck)
- PBS (Capricorn Scientific)
- 50 μM nasumični heksanukleotidi (Invitrogen)
- kontrolna biblioteka za sekvenciranje metodom nove generacije (*next-generation sequencing*, NGS) *PhiX Control v3* (Illumina)
- IGEPAL® CA-630 (Sigma-Aldrich)
- natrij deoksikolat (Merck)
- koktel proteaznih inhibitora 25 × *cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail* (Roche)
- ditiotreitol (DTT) (Merck)
- 3-(N-morfolino)-propansulfonska kiselina (MOPS) (Kemika)
- 4 × pufer za nanošenje uzoraka na gel *NuPAGE™ LDS Sample Buffer* (Invitrogen)
- 10 × otopina za redukciju proteina *NuPAGE™ Sample Reducing Agent* (Invitrogen)
- 20 × pufer za prijenos proteina na membranu *NuPAGE™ Transfer Buffer* (Invitrogen)
- metanol (Kemika)
- mlijeko u prahu (Carl Roth)
- NaCl (Merck)
- Tween 20 (Merck)
- molekularni biljeg za proteine *ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker* (Lonza)
- supstrat za pojačanu kemifluorescenciju (*enhanced chemifluorescence*, ECF) (GE Healthcare)

- supstrat za pojačanu kemiluminiscenciju (*enhanced chemiluminescence*, ECL) (Thermo Scientific)
- fiziološka otopina (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu)
- ketamin (Richter Pharma)
- ksilazin (Bioveta)
- NaHCO_3 (Kemika)
- Na_2CO_3 (Kemika)
- Na_2HPO_4 (Kemika)
- KCl (Kemika)
- timerosal (Sigma-Aldrich)
- albumin iz goveđeg seruma (*bovine serum albumin*, BSA) (Sigma-Aldrich)
- limunska kiselina monohidrat (Kemika)
- kromogeni supstrat za detekciju *o*-fenilendiamin dihidroklorid (*o-phenylenediamine dihydrochloride*, OPD) (Sigma-Aldrich)
- H_2O_2 (Kemika)
- H_2SO_4 (Carlo Erba Reagents)
- 37% formaldehid (Biognost)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Kemika)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Kemika)
- medij za zamrzavanje tkiva za kriosekciju *Cryofix Gel* (Biognost)
- voda bez RNaza i DNaza
- destilirana voda (Sigma)
- sterilna voda (Sigma)
- pročišćena voda tipa 2 (pripremljena na uređaju PureLab Pulse 1, Elga)

3.1.2.3. Kompleti reagensa

- komplet reagensa za umnažanje DNA *Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs): pufer za umnažanje $5 \times \text{Phusion[®] High-Fidelity Reaction Buffer}$ i 2000 jedinica/mL DNA polimeraza *Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase*

- komplet reagensa za umnažanje DNA *OneTaq[®] DNA Polymerase* (New England Biolabs): pufer za umnažanje $5 \times$ *OneTaq[®] Standard Reaction Buffer* i 5000 jedinica/mL DNA polimeraza *OneTaq[®] DNA Polymerase*
- komplet reagensa za pročišćavanje fragmenata DNA iz agaroznog gela *NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel)
- komplet reagensa za određivanje koncentracije DNA *QuantiFluor ONE dsDNA System* (Promega)
- komplet reagensa za izolaciju plazmidne DNA *ZR Plasmid Miniprep – Classic* (Zymo Research)
- komplet reagensa za izolaciju RNA *Quick-RNA Viral Kit* (Zymo Research)
- komplet reagensa za reverznu transkripciju *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen): 0,1 M DTT, pufer za reverznu transkripciju $5 \times$ *First-Strand Buffer* i 200 jedinica/μL reverzna transkriptaza *M-MLV Reverse Transcriptase*
- komplet reagensa za pripremu biblioteka DNA *NEBNext[®] Ultra[™] II FS DNA Library Prep Kit for Illumina* (New England Biolabs)
- komplet reagensa za sekvenciranje metodom NGS *MiniSeq Mid Output Kit (300-cycles)* (Illumina): *Mid Output Reagent Cartridge (300 cycles)*, *Flow Cell* i *Hybridization Buffer*
- komplet reagensa za određivanje kvalitete biblioteka DNA *High Sensitivity DNA Kit* (Agilent)
- komplet reagensa za određivanje koncentracije proteina *Qubit[®] Protein Assay Kit* (Promega)

3.1.2.4. Enzimi

- restriksijska endonukleaza *SmaI*, 10 jedinica/μL (New England Biolabs)
- restriksijska endonukleaza *NruI*, 10 jedinica/μL (New England Biolabs)
- ribonukleaza (RNaza) A (Sigma-Aldrich)
- inhibitor RNaze, 20 jedinica/μL (Applied Biosystems)

3.1.2.5. Otopine, puferi i mediji

- 10 mM otopina dNTP-a (svaki): 25 μ L dATP, 25 μ L dTTP, 25 μ L dCTP, 25 μ L dGTP i 900 μ L voda bez RNaza i DNaza (otopinu sam čuvala pri -20 °C)
- 6 × pufer za nanošenje uzoraka na agarozni gel: 30% glicerol i 0,05% boja bromfenol plavo (pufer sam razdijelila i čuvala pri -20 °C)
- 2 × pufer TBE za elektroforezu DNA na agaroznom gelu: 43,12 g Tris, 22,01 g boratna kiselina, 2,98 g EDTA i destilirana voda do 2 L
- otopina etidijeva bromida: 50 mg etidijev bromid i 5 mL destilirana voda (otopinu sam čuvala na tamnom mjestu)
- 0,8-2,0%-tni agarozni gel: 0,4-1 g agarosa i 50 mL 1 × pufer TBE (otopinu sam kuhala dok se agarosa nije rastalila, ohladila na 50 do 55 °C i dodala u nju 4 μ L etidijevog bromida)
- otopina LB-medija (pH 7,0 $\pm$ 0,2): 1 L sadrži 10 g triptona, 5 g ekstrakta kvasca i 10 g NaCl (otopinu sam pripremila po uputi proizvođača i prije upotrebe autoklavirala)
- otopina LB-agara (pH 7,0 $\pm$ 0,2): 1 L sadrži 10 g triptona, 5 g ekstrakta kvasca, 10 g NaCl i 15 g agara (otopinu sam pripremila po uputi proizvođača i prije upotrebe autoklavirala)
- kruta LB podloga za detekciju transformirane *E. coli*: 25 mL otopine LB-agar i 250 μ L 10 mg/mL ampicilin (otopinu sam nalila u Petrijevu ploču, čekala da se stvrdne i čuvala pri 4 °C do mjesec dana)
- otopina za izradu kompetentnih stanica (0,1 M CaCl₂): 0,56 g CaCl₂ i 50 mL destilirana voda (otopinu sam sterilizirala filtriranjem kroz filter pora 0,45 μ m i spremila pri -20 °C do smrzavanja, a idući dan sam je prije upotrebe stavila pri 4 °C da se polako otapa)
- otopina I za izolaciju plazmida (pufer TE, pH 8,0): 10 mL 1 M Tris-HCl, 2 mL 0,5 M EDTA i 988 mL destilirana voda (otopinu sam filtrirala kroz filter pora 0,22 μ m i čuvala pri 4 °C)
- otopina II za izolaciju plazmida: 20 μ L 10 M NaOH, 100 μ L 10% SDS i 0,88 mL destilirana voda (otopinu sam svaki put prije upotrebe svježe pripremala)
- otopina III za izolaciju plazmida (5 M kalijev acetat, pH 5,7): 29,45 g kalijev acetat, 11,5 mL octena kiselina i destilirana voda do 100 mL (otopinu sam čuvala pri 4 °C)
- radni medij MEM bez FTS-a: 500 mL MEM, 10 μ L/mL penicilin-streptomycin i 10 μ L/mL L-glutamin

- radni medij MEM s 2/5/10% FTS-a: 490/475/450 mL MEM, 10/25/50 mL FTS, 10 µL/mL penicilin-streptomycin i 10 µL/mL L-glutamin
- radni medij DMEM s 3/10% FTS-a: 485/450 mL MEM, 15/50 mL FTS, 10 µL/mL penicilin-streptomycin i 10 µL/mL L-glutamin
- medij za prekrivanje staničnog sloja u testu plakiranja (radni medij 2 × MEM s 10% FTS-a): 450 mL 2 × MEM (bez fenolnog crvenila), 50 mL FTS, 10 µL/mL penicilin-streptomycin, 10 µL/mL L-glutamin i 10 µL/mL NEAA
- pokrov za test plakiranja: 1 volumen medija za prekrivanje staničnog sloja i 1 volumen 1,5%-tne otopine agara Noble u sterilnoj vodi, ohlađene pri 42 °C
- acetatni pufer (pH 5,2): 0,4 g natrijev acetat, 60 µL octena kiselina, destilirana voda do 100 mL
- 0,5%-tna otopina boje neutralno crvenilo (volumen 100 mL): 0,5 g boje neutralno crvenilo, 4 mL acetatni pufer, 95 mL destilirana voda (otopinu sam sterilizirala filtriranjem)
- otopina za bojanje pokrova u testu plakiranja: 1 volumen 0,5%-tne otopine boje neutralno crvenilo u acetatnom puferu i 9 volumena PBS-a
- pufer RIPA: 1 mL IGEPAL® CA-630, 1 mL 10% SDS, 0,5 g natrij deoksikolat i PBS do 100 mL (pufer sam čuvala pri 4 °C)
- pufer za lizu stanica u metodama za detekciju proteina (volumen 100 µL): 91 µL pufer RIPA, 4 µL 25 × koktel proteaznih inhibitora i 5 µL 0,01 M DTT (pufer sam svaki put prije upotrebe svježe pripremala)
- 20 × pufer za elektroforezu proteina na poliakrilamidnom gelu: 104,6 g MOPS, 60,6 g Tris, 10 g SDS, 3 g EDTA i destilirana voda do 500 mL (pufer sam čuvala pri 4 °C)
- pufer za prijenos proteina na membranu: 50 mL 20 × NuPAGE™ Transfer Buffer, 100 mL metanol i 850 mL destilirana voda
- pufer za blokiranje nespecifičnog vezanja antitijela na membranu (u metodama za detekciju proteina): 2,5 g mlijeko u prahu, 0,25 mL 1 M Tris-HCl (pH 7,5), 1,5 mL 5 M NaCl i destilirana voda do 50 mL (pufer sam svaki put prije upotrebe svježe pripremala)
- pufer za ispiranje nevezanog antitijela u metodama za detekciju proteina: 10 mL 1 M Tris-HCl (pH 7,5), 14 mL 5 M NaCl, 250 µL Tween 20 i destilirana voda do 0,5 L

- 4 × pufer za nanošenje uzoraka na membranu u kapljičnoj analizi proteina: 625 μ L 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 4 mL 10% SDS, 4 mL glicerol, 40 μ L 1 M DTT, 4 μ L 0,5 M EDTA i destilirana voda do 10 mL
- pufer za oblaganje zdenaca u enzimskom imunotestu na čvrstoj fazi (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) (0,05 M karbonatni pufer, pH 9,6): 0,29 g NaHCO₃, 0,16 g Na₂CO₃ i 100 mL pročišćena voda tipa 2 (pufer sam čuvala pri 4 °C)
- 20 × pufer PBST: 160 g NaHCO₃, 22 g Na₂HPO₄, 4 g KCl, 2 g timerosal, 10 mL Tween 20 i pročišćena voda tipa 2 do 1 L (pufer sam čuvala pri 4 °C)
- inkubacijski pufer u testu ELISA (0,5%-tna otopina BSA u puferu PBST): 1 g BSA i 200 mL pufer PBST (pufer sam čuvala pri 4 °C)
- citrat-fosfatni pufer (pH 5,0): 1,03 g limunska kiselina × H₂O, 1,44 g Na₂HPO₄ i 100 mL pročišćena voda tipa 2 (pufer sam čuvala pri 4 °C najduže mjesec dana)
- otopina kromogenog supstrata OPD (volumen 1 mL): 0,6 mg OPD, 1 mL citrat-fosfatni pufer i 0,5 μ L 30% H₂O₂ (otopinu sam svaki put prije upotrebe svježe pripremala)
- otopina za fiksaciju mozгова (10%-tni puferirani neutralni formalin): 4 g NaH₂PO₄ × H₂O, 6,5 g Na₂HPO₄ × 2H₂O, 100 mL 37% formaldehid i 900 mL pročišćena voda tipa 2

3.1.3. Oprema

- kabineti *Hera Safe* (Heraeus) i *FlowFAST V* (Faster) za rad u aseptičnim uvjetima s okomitim strujanjem zraka
- digestor (Plast-Vent)
- inkubatori s kontroliranom temperaturom i koncentracijom CO₂ (37 °C ± 0,5 °C, 5% CO₂ ± 0,5% CO₂ i 35 °C ± 0,5 °C, 5% CO₂ ± 0,5% CO₂) (Heraeus)
- stolni inkubator za uzgoj bakterija *Innova*[®] 40 (New Brunswick)
- termostat (Mettler)
- hladnjaci 2-8 °C, zamrzivači -15 °C i niže (Electrolux, Gorenje, Liebherr)
- ultradubinski zamrzivači -60 °C i niže (New Brunswick Scientific, Thermo Fisher Scientific, Telstar Boreas)
- stolne centrifuge s hlađenjem 5810R i 5415R (Eppendorf) te MICRO 200 R (Hettich)

- stolna centrifuga 5424 (Eppendorf)
- magnetska miješalica (Bellco Glass)
- miješalica za epruvete (*vortex*) (Technica Železniki)
- uređaj za okretanje epruveta (Stuart)
- kružna miješalica (BioRad)
- termoblok *TermoStat plus* (Eppendorf)
- pH metar (Mettler Toledo)
- spektrofotometar *BioPhotometer* (Eppendorf)
- fluorometar *Quantus* (Promega)
- termociklički amplifikatori *Proflex i 2720* (Applied Biosystems)
- oprema za horizontalnu elektroforezu *HE 33* (kadica, češljevi, držač gela) (Hoefer Scientific Instruments)
- izvor napajanja za elektroforezu (Hoefer Scientific Instruments)
- transiluminator *UVTM-25* (Hoefer Scientific Instruments)
- oprema za vertikalnu elektroforezu *XCell SureLock™ Mini-Cell* (kadica, držač gela, otvarač gelova) (Invitrogen)
- oprema za prijenos proteina *XCell II™ Blot Module* (modul za membranu, spužvice) (Invitrogen)
- automatizirani sustav za elektroforezu *2100 Bioanalyzer System* (Agilent)
- uređaj za sekvenciranje metodom NGS *Ilumina MiniSeq* (Ilumina)
- perlač pločica s 96 zdenaca *MW-12A* (Mindray)
- čitač pločica s 96 zdenaca *Synergy HTX S1 LFA* (BioTek Instruments)
- uređaj za snimanje membrana *Amersham Imager 680 RGB* (Amersham)
- kriotom (Leica CM 1100)
- invertni mikroskop (Nikon)
- invertni mikroskop (ZEISS Primovert) s digitalnom kamerom *Axiocam 208 color* (ZEISS)
- uređaj za fluorescentno praćenje stanica *ZOE Fluorescent Cell Imager* (BioRad)
- Neubauerova komorica za brojanje stanica (Merienfeld Superior)
- vaga *PB303-S DeltaRange* (Mettler Toledo)
- analitička vaga *Cubis* (Sartorius)

- vodena kupelj (Sigma-Aldrich)
- plinski plamenik
- automatske jednokanalne pipete (varijabilni volumeni 1-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL) (Eppendorf, Costar, Gilson, Axygen)
- automatska multikanalna pipeta (Eppendorf)
- pipetor (Falcon)
- stalci za mikroeprovete za lančanu reakciju polimerazom (*polymerase chain reaction*, PCR) s 96 mjesta (Applied Biosystems); prije svake upotrebe stalci su autoklavirani pri 121 °C/20 min/1,03 bar
- stalak za epruvete
- plastična posudica volumena 250 mL
- stakleno suđe (Erlenmayerove tikvice, boce, graduirane čaše, epruvete (13 × 100 mm), Petrijeve ploče)
- štapić Drigalski, pinceta, skalpel, škare, kistovi
- akrilna sagitalna matrica za štakorski mozak
- čelična oštrica
- metalni histološki kalupi (24 × 24 × 6 mm)
- metalni diskovi za preparate (statoliti)
- jednokratne oštrice za kriotom
- predmetna i pokrovna stakalca
- CO₂ komora za eutanaziju laboratorijskih životinja
- spremnici za infektivni i GMO otpad

3.1.4. Računalni programi i alati

- programi za vizualizaciju i uređivanje sekvencija *SnapGene Viewer* (Dotmatics) i *Clone Manager Suite* (SciEd Central)
- alat za sravnjivanje sekvencija sa sekvencijama iz baza podataka *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

- program za grafički prikaz sravnjenja sekvencija NCBI *Multiple Sequence Alignment* (MSA) *Viewer 1.25.0* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/msaviewer/>)
- server za modeliranje po homologiji *SWISS-MODEL* (<https://swissmodel.expasy.org/>)
- program za procesiranje slika *ImageJ*
- program za provođenje statističkih testova u obradi podataka *Prism 9 9.1.2.* (GraphPad Software)
- program za izračune u obradi podataka *Microsoft Excell 2016* (Microsoft)
- program za određivanje kvalitete podataka dobivenih metodom NGS *FastQC v0.11.8.*
- alat za izrezivanje i filtriranje očitavanja dobivenih metodom NGS *BBDuk* (paket *BBTools*)
- alat za sravnjivanje očitavanja dobivenih metodom NGS s referentnom sekvencijom *Bowtie2 v2.4.2*
- višenamjenski bioinformatički softver *Geneious Prime® 2019.2.3.*
- paket alata za procesiranje sravnjenja dobivenih metodom NGS *Samtools v1.12*
- alat za određivanje varijanti u populaciji iz očitavanja dobivenih metodom NGS *V-Phaser 2*
- programske skripte za obradu podataka dobivenih metodom NGS razvijene unutar laboratorija

3.1.5. Potrošni materijali

- plastične ploče sa 6 i 96 zdenaca (TPP, Sarstedt, VWR International, Costar)
- plastične T-boce za stanične kulture (25, 150 i 175 cm²) (TPP, Sarstedt, VWR International)
- plastični rezervoari (VWR International)
- plastični nastavci sa i bez filtara za automatske pipete (10, 20, 100, 200 i 1000 µL) (Sarstadt, Eppendorf)
- pipete za jednokratnu upotrebu (2, 5, 10, 25 i 50 mL) (TPP, Sarstadt, Thermo Scientific Nunc)
- filtri s porama promjera 0,22 i 0,45 µm (Costar)
- mikroeprovete za metodu PCR (Applied Biosystems); mikroeprovete su prije upotrebe autoklavirane pri 121 °C/20 min/1,03 bar
- sterilne Eppendorf epruvete od 0,5, 1,5 i 2,0 mL (Sarstadt)
- epruvete za centrifugiranje (15 i 50 mL) (TPP, Falcon)
- UV kivete za spektroskopska mjerenja (Eppendorf)

- mikroeprovete s tankim stijenkama od 0,5 mL (Axygen)
- gradijentni poliakrilamidni gelovi *NuPAGE Bis-Tris (4-12%)* (Invitrogen)
- membrana za prijenos proteina *Amersham Hybond P 0,45 PVDF* (GE Healthcare)
- filter papir (Amersham)
- inzulinske brizgalice *BD Micro FineTM Plus* (0,5 mL) s fiksnom iglom 0,3 × 8 (30G) (Becton Dickinson)
- brizgalice *BD PlastipakTM* (1 mL, 2,5 mL, 5 mL) (Becton Dickinson)
- sterilne igle 0,6 × 25 (23G) i 1,2 × 40 (18G) (TIK)
- staničevina

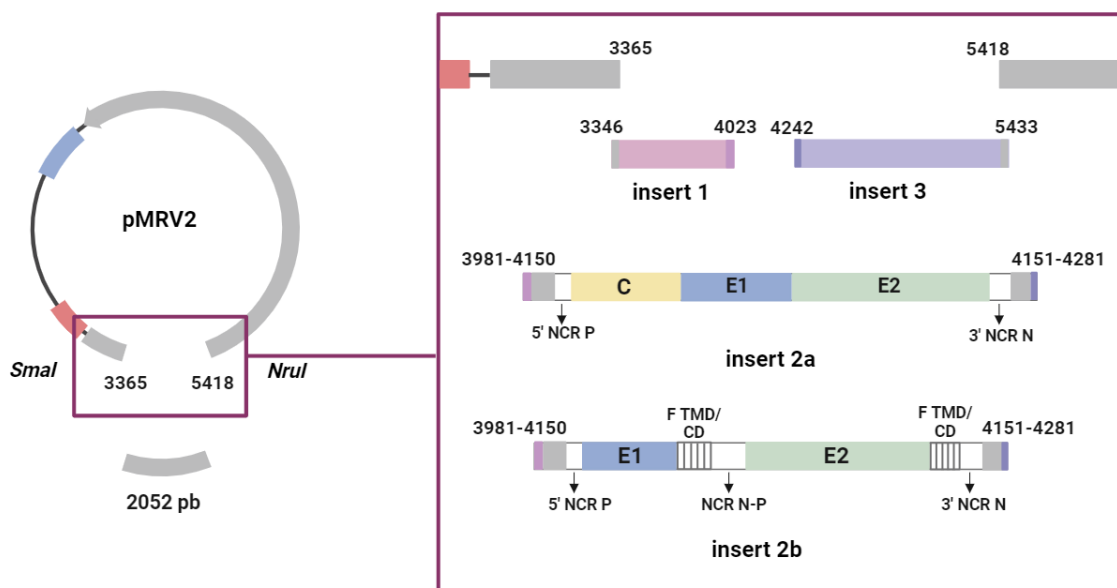
3.2. Metode

3.2.1. Dizajn sintetskih sljedova DNA koji kodiraju površinske glikoproteine virusa hepatitisa C

S ciljem dobivanja dva rekombinantna plazmida (pCE1E2-HCV-MRV2 i pE1E2TMD-HCV-MRV2) koji sadrže čitave antigenomske sekvencije kimernih virusa, dizajnirala sam dvije vrste sintetskih sljedova DNA: (a) slijed CE1E2-HCV, koji odgovara cjelovitim sekvencijama proteina C, E1 i E2 HCV-a i (b) slijed E1E2TMD-HCV, koji odgovara sekvencijama ektodomena proteina E1 i E2 HCV-a vezanim na domenu TMD/CD proteina F virusa zaušnjaka. Sintetske sljedove DNA sam ugradila u sekvenciju antigenoma cijepnog soja virusa zaušnjaka L-Zagreb u plazmidu pMRV2.

Tijekom dizajna vodila sam računa o mogućnosti recirkularizacije plazmida pMRV2, u slučaju cijepanja samo jednim restrikcijskim enzimom. Shodno tome, kloniranje sam dizajnirala na način da sam plazmid linearizirala restrikcijskim enzimima *SmaI* i *NruI*, čime sam iz plazmida pMRV2 izbacila regiju duljine 2052 parova baza (pb) (pozicije 3366-5417 u plazmidu pMRV2) i na taj način smanjila mogućnost recirkularizacije plazmida (slika 10). Zbog toga sam, osim sintetskih sljedova DNA, u plazmid pMRV2 ugrađivala i dva preklapajuća inserta koji su sadržavali sekvencije virusa zaušnjaka izbačene prilikom cijepanja (inserti 1 i 3). Insert 1 od 678 pb je sadržavao sekvencije koje su odgovarale pozicijama 3346-4023 u plazmidu pMRV2, a insert

3 od 1192 pb sekvencije koje su odgovarale pozicijama 4242-5433 u plazmidu pMRV2. Središnji dio izbačenih sekvencija, koji je obuhvaćao područje od 3' dijela CDS-a gena N do 5' dijela CDS-a gena P (pozicije 4024-4241 u plazmidu pMRV2), sam dodala u sekvencije sintetskih sljedova DNA (slika 10). Dakle, sintetski sljedovi DNA su nakon umnažanja (opisano u poglavlju 3.2.2.1.) na 5' kraju sadržavali sekvencije koje su odgovarale pozicijama 3981-4150 u plazmidu pMRV2, a na 3' kraju sekvencije koje su odgovarale pozicijama 4151-4281 u plazmidu pMRV2 (slika 10). Time je ostvarena i komplementarnost inserata 2a (korišten u proizvodnji plazmida pCE1E2-HCV-MRV2) i 2b (korišten u proizvodnji plazmida pE1E2TMD-HCV-MRV2) s krajevima inserata 1 i 3, što je nužno kako bih sve tri vrste fragmenata mogla istovremeno ugraditi u plazmid pMRV2 tijekom jedne reakcije kloniranja *In-Fusion*.



Slika 10. Shema kloniranja rekombinantnih plazmida koji sadrže genome virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C (pCE1E2-HCV-MRV2 i pE1E2TMD-HCV-MRV2). Lijeva strana prikazuje cijepanje plazmida pMRV2 restriksijskim enzimima *SmaI* i *NruI*. Desna strana prikazuje umnožene fragmente za kloniranje: insert 1, insert 3 te insert 2a ili 2b za dobivanje pCE1E2-HCV-MRV2 ili pE1E2TMD-HCV-MRV2. Brojevi označavaju pozicije u plazmidu pMRV2. Sivom bojom je označena pozicija virusnog antigenoma u pMRV2, crvenom bojom pozicije optimiziranog promotora T7 i ribozima *hammerhead*, a plavom bojom pozicija ribozima virusa hepatitisa delta. Krajevi inserata 1 i 3 koji su komplementarni insertima 2a i 2b označeni su tamno rozom, odnosno, tamno ljubičastom bojom. pb, parova baza; NCR, nekodirajuća regija; TMD/CD, transmembranska i citoplazmatska domena.

Sintetske sljedove DNA sam dizajnirala u programu *SnapGene Viewer* (Dotmatics). Za dizajn sam koristila sekvencije gena HCV-a koje kodiraju proteine C, E1 i E2 soja HC-J1, subtipa 1b (pristupni broj u bazi NCBI *GenBank* D10749.1). Sintetski slijed DNA za proizvodnju plazmida pCE1E2-HCV-MRV2 bio je dug 2683 pb i sadržavao je: regiju komplementarnu 3' kraju inserta 1 i izbačenim sekvencijama plazmida pMRV2 (148 pb), 5' NCR gena P (70 pb), gene za proteine C (573 pb), E1 (576 pb, s promijenjenim restriksijskim mjestom *NcoI*) i E2 (1089 pb) HCV-a, STOP kodon (3 pb), 3' NCR gena N (111 pb), intergensku N-P regiju (2 pb) te regiju komplementarnu

izbačenim sekvencijama plazmida pMRV2 i 5' kraju inserta 3 (111 pb, s promijenjenim restrikcijskim mjestom *SpeI*). Sintetski slijed DNA za proizvodnju plazmida pE1E2TMD-HCV-MRV2 bio je dug 2437 pb i sadržavao je: regiju komplementarnu 3' kraju inserta 1 i izbačenim sekvencijama plazmida pMRV2 (148 pb), 5' NCR gena P (70 pb), gen za protein E1TMD (645 pb, s dodanim START kodonom), 3' NCR gena N (111 pb), intergensku N-P regiju (2 pb), 5' NCR gena P (70 pb, s promijenjenim restrikcijskim mjestom *SpeI*), gen za protein E2TMD (1167 pb, s dodanim START kodonom), 3' NCR gena N (111 pb), intergensku N-P regiju (2 pb) te regiju komplementarnu izbačenim sekvencijama plazmida pMRV2 i 5' kraju inserta 3 (111 pb). Dizajnirani sljedovi DNA CE1E2-HCV i E1E2TMD-HCV sintetizirani su od strane specijaliziranog proizvođača BioCat i dostavljeni u obliku plazmida pUC19: pUC19-CE1E2-HCV i pUC19-E1E2TMD-HCV.

3.2.2. Umnažanja lančanom reakcijom polimerazom

Lančanu reakciju polimerazom (PCR) sam koristila za umnažanje fragmenata potrebnih za dobivanje rekombinantnih plazmida te za umnažanje genoma kimernih virusa. Ovisno o potrebnoj razini točnosti prepisivanja, koristila sam dvije vrste DNA polimeraze: *Phusion*, koja omogućuje veću vjernost replikacije, i *OneTaq*. Sastav reakcijskih smjesa i uvjeti umnažanja za obje polimeraze navedeni su u tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Sastav reakcijskih smjesa za umnažanje DNA polimerazama *Phusion* i *OneTaq*.

Komponenta	Volumen po reakciji (μL)	
	polimeraza <i>Phusion</i>	polimeraza <i>OneTaq</i>
pufer za umnažanje	10	10
10 mM dNTP (svaki)	4	4
20 μM nizvodna početnica	1,25	1
20 μM uzvodna početnica	1,25	1
DNA polimeraza	0,5	0,25
kalup	varijabilno	varijabilno
voda bez RNaza i DNaza	do 50	do 50

Tablica 3. Uvjeti umnažanja DNA prema protokolima za polimeraze *Phusion* i *OneTaq*.

Korak	Temperatura / vrijeme	
	polimeraza <i>Phusion</i>	polimeraza <i>OneTaq</i>
početna denaturacija	98 °C / 2 min	95 °C / 5 min
denaturacija	98 °C / 10 s	95 °C / 30 s
vezanje početnica	T_a / 30 s	T_a / 30 s
elongacija	72 °C / t_e	68 °C / t_e
završna elongacija	72 °C / 10 min	68 °C / 10 min

T_a , temperatura prijanjanja; t_e , vrijeme elongacije. Podaci o T_a i t_e su bili specifični za svaku reakciju umnažanja (kombinaciju početnica i duljinu fragmenta) te se nalaze u tablicama 4-8 u stupcu „specifični uvjeti reakcije (broj ciklusa umnažanja)“.

3.2.2.1. Umnažanje fragmenata za kloniranje u pMRV2

U svrhu ugradnje gena za površinske proteine HCV-a u plazmid pMRV2, umnožila sam četiri različita fragmenta:

- (a) fragment s kalupa pMRV2 koji je sadržavao sekvenciju izbačenu uslijed cijepanja restrikcijskim enzimom iz regije uzvodno od mjesta ugradnje ATU-a (insert 1)
- (b) dva tipa dizajniranih DNA sljedova, CE1E2-HCV i E1E2TMD-HCV, s kalupa plazmida pUC19-CE1E2-HCV i pUC19-E1E2TMD-HCV (inserti 2a i 2b)
- (c) fragment s kalupa pMRV2 koji je sadržavao sekvenciju izbačenu uslijed cijepanja restrikcijskim enzimom iz regije nizvodno od mjesta ugradnje ATU-a (insert 3)

Za umnažanje inserata 1, 2a, 2b i 3 s kalupa odgovarajućih plazmida koristila sam početnice koje omogućuju sintezu komplementarnih krajeva potrebnih za kloniranje *In-Fusion*. Umnažanje sam radila pomoću polimeraze *Phusion* kako je navedeno u tablici 4. Mase kalupa plazmida potrebnih za umnažanje su varirale između 40 i 65 ng po reakciji.

Tablica 4. Početnice i specifični uvjeti reakcije za umnažanje inserata za kloniranje rekombinantnih plazmida koji sadrže antigenome virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C.

Fragment	Kalup	Korištene početnice	Veličina produkta (pb)	Specifični uvjeti reakcije (broj ciklusa umnažanja)
insert 1	pMRV2	SmaI ins NPLZg, For revIN1	678	$T_a = 51\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 15\text{ s}$
insert 2a	pUC19- CE1E2-HCV	fwIN2 revIN2	2725	$T_a = 61\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 1:30\text{ min}$ (2 ×) $T_a = 68\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 1:30\text{ min}$ (38 ×)
insert 2b	pUC19- E1E2TMD-HCV	fwIN2 revIN2	2479	$T_a = 61\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 1:30\text{ min}$ (2 ×) $T_a = 68\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 1:30\text{ min}$ (38 ×)
insert 3	pMRV2	fwIN3 Deopti g6 spoj4 Nru, Rev	1192	$T_a = 61\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 45\text{ s}$ (2 ×) $T_a = 68\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 45\text{ s}$ (38 ×)

pb, parova baza; T_a , temperatura prijanjanja; t_e , vrijeme elongacije.

3.2.2.2. Umnažanje čitavih genoma kimernih virusa

S ciljem određivanja varijabilnosti populacija kimernih virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2, umnožila sam virusne cDNA u četiri ili pet preklapajućih fragmenata (tablice 5 i 6). Za umnažanje sam koristila polimerazu *Phusion*. Volumen cDNA u reakcijskim smjesama je iznosio 2 μL . Za umnažanje svih virusnih uzoraka, osim za tri replike 10. pasaža virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4 na stanicama fibroblasta pilećih embrija (vCE1E2-HCV-MRV2 p4 10pCEF A, B i C), sam koristila shemu umnažanja navedenu u tablici 5. Uzorke vCE1E2-HCV-MRV2 p4 10pCEF A, B i C sam umnožila prema shemi prikazanoj u tablici 6.

Tablica 5. Početnice i specifični uvjeti reakcije za umnažanje čitavih genoma kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C.

Fragment	Korištene početnice	Veličina produkta nakon umnažanja cDNA virusa vCE1E2-HCV-MRV2 / vE1E2TMD-HCV-MRV2 (pb)	Specifični uvjeti reakcije (broj ciklusa umnažanja)
1	N0(+) P6 _{novi} (-)	5782 / 5536	T _a = 61 °C, t _e = 3 min (40 ×)
2	P _{startHindIII} (+) LZ6(-)	5815	T _a = 60 °C, t _e = 3:30 min (40 ×)
3	LZ9(+) L12(-)	4654	T _a = 63 °C, t _e = 3:10 min (40 ×)
4	L9(+) L25(-)	4836	T _a = 60 °C, t _e = 3:30 min (40 ×)

pb, parova baza; T_a, temperatura prijanjanja; t_e, vrijeme elongacije.

Tablica 6. Početnice i specifični uvjeti reakcije za umnažanje čitavih genoma kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C u uzorcima u kojima se genomi nisu uspjeli umnožiti prema shemi iz tablice 5.

Fragment	Korištene početnice	Veličina produkta (pb)	Specifični uvjeti reakcije (broj ciklusa umnažanja)
0	N0(+) N4(-)	1300	T _a = 61 °C, t _e = 1 min (40 ×)
1	N5(+) P10(-)	3360	T _a = 61 °C, t _e = 2:30 min (40 ×)
2	P _{startHindIII} (+) LZ6(-)	5815	T _a = 60 °C, t _e = 3:30 min (40 ×)
3	LZ9(+) L12(-)	4654	T _a = 63 °C, t _e = 3:10 min (40 ×)
4	L9(+) L25(-)	4836	T _a = 60 °C, t _e = 3:30 min (40 ×)

pb, parova baza; T_a, temperatura prijanjanja; t_e, vrijeme elongacije.

3.2.2.3. Umnažanje dijelova genoma kimernih virusa

Umnažanje metodom PCR koristila sam i u svrhu određivanja konsenzus sekvencije pojedinačnih pozicija od interesa (tablica 7) i regija genoma koje odgovaraju insertiranim sekvencijama kimernih virusa (tablica 8). Izuzev dijela uzoraka koji su navedeni u tablici 8, umnažanje sam radila polimerazom *OneTaq*, a kao kalup sam koristila 2 μ L virusne cDNA. Za fragmente koje nisam mogla umnožiti metodom jednostupanjskog PCR-a, koristila sam metodu ugniježdenog PCR-a s dva para početnica, na način da sam 2 μ L prve reakcijske smjese koristila kao kalup u drugoj reakcijskoj smjesi. Tako dobivene fragmente sam pripremila za sekvenciranje metodom po Sangeru prema uputstvu davatelja usluge (Macrogen).

Tablica 7. Početnice i specifični uvjeti reakcije za umnažanje dijelova genoma s pojedinačnim pozicijama od interesa u uzorcima kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C.

Virus	Fragment	Korištene početnice	Veličina produkta (pb)	Specifični uvjeti reakcije (broj ciklusa umnažanja)
vCE1E2-HCV-MRV2 1pBSR	A1	N15(+) revC2(-)	812	$T_a = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 1\text{ min}$ (40 $\times$)
	A2*	N9 _{novi} (+) revC(-)	604	$T_a = 57\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 1\text{ min}$ (40 $\times$)
	B	fwE(+) P10 _{rev} (-)	728	$T_a = 52\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 1\text{ min}$ (40 $\times$)
	C	fwP(+) P6 _{novi} (-)	854	$T_a = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 1\text{ min}$ (40 $\times$)
vE1ETMD2-HCV-MRV2 1pBSR	D	LZ11 _{neo} (+) revL2(-)	757	$T_a = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 1\text{ min}$ (40 $\times$)

*Fragment A2 sam umnožila metodom ugniježdenog PCR-a. Volumen reakcijske smjese za umnažanje fragmenta A1 od 2 μ L sam koristila kao kalup za umnažanje fragmenta A2. 1pBSR, 1. pasaż na stanicama BSR T7/5; pb, parova baza; T_a , temperatura prijanjanja; t_e , vrijeme elongacije.

Tablica 8. Početnice, specifični uvjeti reakcije i vrsta polimeraze za umnažanje regija genoma koje odgovaraju inseriranim sekvencijama u uzorcima kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C.

Virus	Korištene početnice	Veličina produkta (pb)	Specifični uvjeti reakcije (broj ciklusa umnažanja)	Vrsta polimeraze
vCE1E2-HCV-MRV2 10pV B1	N11(+) V2(-)	4127	$T_a = 62\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 2:30\text{ min}$ (40 ×)	<i>Phusion</i>
vCE1E2-HCV-MRV2 10pV B3				
vE1ETMD2-HCV-MRV2 10pV B1	N0(+) P6 _{novi} (-)	5536	$T_a = 61\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 3\text{ min}$ (40 ×)	<i>Phusion</i>
vCE1E2-HCV-MRV2 p1-p10	N5(+) P10(-)	3360	$T_a = 53\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 4\text{ min}$ (40 ×)	<i>OneTaq</i>

10pV, 10. pasaż na stanicama Vero; B, linija uzastopnog kultiviranja održavana prenošenjem 100 µL virusnog supernatanta; p, plak; pb, parova baza; Ta, temperatura prijanjanja; te, vrijeme elongacije.

3.2.3. Elektroforeza u agaroznom gelu, pročišćavanje produkata lančane reakcije polimerazom i određivanje koncentracije DNA

Prije nanošenja na agarozni gel, uzorke sam pomiješala s puferom za nanošenje uzoraka u omjeru 1:6. Paralelno s testnim uzorcima, na gel sam nanosila i molekularni biljeg za određivanje veličine vrpce DNA *1 kb Plus DNA Ladder* (New England Biolabs). Elektroforeza plazmidne DNA je trajala 20-30 min u 0,8%-tnom gelu, dok je elektroforeza uzoraka dobivenih metodom PCR ovisila o očekivanoj duljini PCR produkata i trajala 30 min u 1%-tnom gelu, 45 min u 1,5%-tnom gelu ili 1,5 h u 2%-tnom gelu. Sve elektroforeze sam provodila pri sobnoj temperaturi u 1 × puferu TBE pri 100 mV. Produkte PCR reakcija i restrikcijskih digestija sam za potrebe kloniranja ili sekvenciranja izrezala iz agaroznog gela i pročistila pomoću kompleta reagensa *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel) prema uputama proizvođača. Uzorke sam eluirala u 15-23 µl vode bez RNaza i DNaza. Koncentraciju DNA u pročišćenim uzorcima sam određivala na fluorometru *Quantus* pomoću kompleta reagensa *QuantiFluor ONE dsDNA System* (Promega) prema uputama proizvođača.

3.2.4. Kloniranje produkata lančane reakcije polimerazom u plazmidni vektor

Rekombinantne plazmide pCE1E2-HCV-MRV2 i pE1E2TMD-HCV-MRV2 sam pripremila ugradnjom tri umnožena fragmenta (inserti 1, 2a i 3 za pCE1E2-HCV-MRV2; inserti 1, 2b i 3 za pE1E2TMD-HCV-MRV2) u linearizirani plazmidni vektor pMRV2 pomoću tehnike kloniranja *In-Fusion*. Ona omogućuje ugradnju jednog ili više fragmenata u bilo koji linearizirani vektor na temelju komplementarnosti od minimalno 15 pb na njihovim krajevima.

Postupak umnažanja i pripreme fragmenata za kloniranje opisan je u poglavljima 3.2.2.1. i 3.2.3. Cirkularnu DNA vektora pMRV2 linearizirala sam cijepanjem restrikcijskim endonukleazama *SmaI* i *NruI* kako je navedeno u tablici 9. Produkte cijepanja sam razdvojila elektroforezom u 0,8%-tnom agaroznom gelu, a fragment koji je po veličini odgovarao lineariziranom plazmidu sam pročistila kako je opisano u poglavlju 3.2.3.

Tablica 9. Reakcijska smjesa za cijepanje vektora za kloniranje restrikcijskim endonukleazama.

Komponenta	Volumen (μL)
pufer za reakciju restrikcije 10 × <i>Cut Smart</i> [®] Buffer	4
pMRV2	5
10 jedinica/μL restrikcijska endonukleaza <i>SmaI</i>	2
voda bez RNaza i DNaza	29
Reakcijsku smjesu sam inkubirala 2 h i 30 min pri 25 °C.	
pufer za reakciju restrikcije 10 × <i>Cut Smart</i> [®] Buffer	1
10 jedinica/μL restrikcijska endonukleaza <i>NruI</i>	1
voda bez RNaza i DNaza	8
Reakcijsku smjesu sam inkubirala 2 h i 30 min pri 37 °C.	

Reakcijsku smjesu za reakciju *In-Fusion* sam pripremila miješanjem lineariziranog plazmida s odgovarajućom količinom pročišćenih fragmenata koji sadrže komplementarne krajeve za ugradnju prema uputi proizvođača (tablica 10). Smjesu sam inkubirala 15 min pri 50 °C te ju pohranila pri -20 °C do transformacije bakterijskih stanica.

Tablica 10. Reakcijske smjese za pripremu rekombinantnih plazmida koji sadrže antigenome virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C tehnikom kloniranja.

Komponenta	Količina	
	pCE1E2-HCV-MRV2	pE1E2TMD-HCV-MRV2
pufer za reakciju <i>In-Fusion</i> 5 × <i>In-Fusion HD Enzyme Premix</i>	3 µL	3 µL
linearizirani pMRV2	90 ng	243,6 ng
insert 1	50 ng	50 ng
insert 2a/2b	201,04 ng	182, 89 ng
insert 3	87,94 ng	87,94 ng
voda bez RNaza i Dnaza	do 15 µL	do 15 µL

3.2.5. Priprema kompetentnih bakterija *E. coli* soja DH5α

Od prethodno pripremljenih kompetentnih bakterija sam napravila prekonoćnu kulturu na način da sam nasadila 50 µL bakterijske suspenzije u 5 mL otopine LB-medija i inkubirala preko noći uz miješanje pri 37 °C. Idući dan sam 4 mL dobivene prekonoćne kulture nasadila u 200 mL svježje otopine LB-medija i inkubirala pri 37 °C uz miješanje do OD₆₀₀ 0,4 (2-3 h). U aseptičkim uvjetima sam podijelila bakterijsku suspenziju u ohlađene epruvete od 50 mL te ostavila 20 min pri 4 °C. Suspenziju sam centrifugirala 10 min pri 3000 × g i 4 °C. Talog sam resuspendirala u 5 mL ledeno hladnog 0,1 M CaCl₂ te ostavila 30 min pri 4 °C. Suspenziju sam ponovno centrifugirala 10 min pri 3000 × g i 4 °C, a talog stanica sam resuspendirala u 1 mL ledeno hladnog 0,1 M CaCl₂ uz dodatak 15% glicerola. Suspenziju sam razdijelila u alikvote i pohranila pri -60 °C i niže. Ovako pripremljene kompetentne bakterije sam koristila jednokratno kroz period od šest mjeseci.

3.2.6. Transformacija bakterija *E. coli* plazmidnim vektorom

Transformaciju kompetentnih bakterija *E. coli* soja Stellar sam radila reakcijskom smjesom *In-Fusion* za potrebe kloniranja, a transformaciju kompetentnih bakterija soja DH5α plazmidima u svrhu umnažanja plazmida. Bakterije sam transformirala prema navedenom protokolu:

- 60 μL kompetentnih bakterija soja Stellar sam pomiješala s 2 μL reakcijske smjese *In-Fusion*, a 100 μL kompetentnih bakterija soja DH5 α s 1 μL plazmidnog vektora
- suspenziju sam inkubirala 30 min pri 4 °C, potom 45 s pri 42 °C u termobloku za stanice soja Stellar, odnosno 2 min pri 43 °C za stanice soja DH5 α , nakon čega sam suspenziju 2 min inkubirala pri -20 °C
- suspenziji sam dodala 440 μL medija SOC ugrijanog pri 37 °C za stanice soja Stellar, odnosno 900 μL otopine LB-medija za stanice soja DH5 α te je inkubirala 1-1,5 h pri 37 °C u inkubatoru za uzgoj bakterija uz miješanje
- 1/4 suspenzije stanica Stellar sam nacijepila na krutu LB podlogu s ampicilinom, a ostatak suspenzije sam centrifugirala 5 min pri 3381 $\times$ g, dekantirala supernatant i nacijepila resuspendirani talog na krutu LB podlogu s ampicilinom; suspenziju stanica DH5 α sam, nakon centrifugiranja 5 min pri 3381 $\times$ g i dekantacije, nacijepila u cijelom volumenu na krutu LB podlogu s ampicilinom
- ploče s podlogama sam inkubirala preko noći pri 37 °C

3.2.7. Izolacija plazmidne DNA

U svrhu umnažanja plazmida, pripremila sam prekonoćne bakterijske kulture. S prethodno pripremljenih ploča sam pojedinačne transformirane bakterijske kolonije prebacila u staklene bočice s 5 mL otopine LB-medija, u koju sam prethodno dodala ampicilin u konačnoj koncentraciji od 0,1 mg/mL. Bakterijske kulture sam inkubirala preko noći pri 37 °C uz miješanje te sam iz njih izolirala plazmidnu DNA.

Plazmidnu DNA koju sam koristila kao kalup u kloniranju i umnažanju te za potrebe sekvenciranja i transfekcije, izolirala sam pomoću kompleta reagensa *ZR Plasmid Miniprep – Classic* (Zymo Research) prema uputama proizvođača. Za provjeru rezultata kloniranja *In-Fusion*, plazmide sam izolirala prema sljedećem protokolu:

- 1,5 mL prekonoćne bakterijske kulture sam prebacila u Eppendorf epruvetu od 2 mL i centrifugirala 3 min pri 1301 $\times$ g
- dekantirala sam supernatant, a na talog sam dodala 200 μL otopine I i promiješala na miješalici

- u suspenziju sam dodala 200 μ L svježe pripremljene otopine II, promiješala sadržaj epruvete okretanjem 6-8 puta i inkubirala 3-5 min pri sobnoj temperaturi
- potom sam u suspenziju dodala 200 μ L ledeno hladne otopine III i sadržaj promiješala okretanjem epruvete 6-8 puta
- uzorak sam centrifugirala 10 min pri $20817 \times g$ i $4^\circ C$
- supernatant sam pažljivo odpipetirala u novu epruvetu pri čemu sam pazila da ne zahvatim bijeli precipitat, dodala sam mu jednaki volumen hladnog izopropanola i sadržaj promiješala okretanjem epruvete 6-8 puta
- uzorak sam inkubirala pri $4^\circ C$ 15 min, a zatim centrifugirala 25 min pri $20817 \times g$ i $4^\circ C$
- talog sam isprala s 300 μ L hladnog 70%-tnog etanola centrifugiranjem 5 min pri $20817 \times g$ i $4^\circ C$, osušila na zraku i otopila u 20 μ L 10 mM Tris-HCl pufera (pH 8,0)
- otopini sam dodala 2 μ L RNaze A i inkubirala 10 min pri $37^\circ C$
- izolirane plazmide sam pohranila pri $-20^\circ C$ do korištenja

3.2.8. Uzgoj staničnih kultura

Sve stanične kulture koje sam koristila u ovom istraživanju su adherentne. Osim primarne stanične kulture fibroblasta pilećih embrija, u radu sam koristila i kontinuirane stanične linije BSR T7/5 i Vero.

Stanične kulture BSR T7/5 i Vero sam uzgajala u inkubatoru pri $37^\circ C$ u atmosferi koja sadrži 95% zraka i 5% CO_2 . Uzgoj staničnih kultura sam započela kratkotrajnim odmrzavanjem ampule sa stanicama (koja je bila pohranjena u tekućem dušiku) pri $37^\circ C$. Stanice sam potom istaložila centrifugiranjem pri $150 \times g$ u trajanju od 5 min te sam pažljivo uklonila supernatant. Talog stanica sam resuspendirala u malom volumenu svježeg medija za uzgoj, prenijela u T-bocu od 25 cm^2 i na njega dodala 8 mL odgovarajućeg medija za uzgoj. Medij za uzgoj, učestalost supkultiviranja i omjer stanične suspenzije pri supkultivaciji navedeni su za svaku staničnu kulturu u tablici 11.

Postupak supkultivacije je bio sličan za obje kontinuirane stanične linije, BSR T7/5 i Vero. Uklonila sam medij za uzgoj stanica, a stanice sam isprala 0,25%-tnom otopinom tripsin-EDTA. Potom sam ih odvojila od podloge enzimskom digestijom (tripsinizacijom) dodatkom 0,25%-tne

otopine tripsin-EDTA u volumenu dovoljnom da prekrije stanični sloj u trajanju 2-3 min. Stanice sam mikroskopski pregledala kako bih potvrdila odvajanje od podloge. U staničnu suspenziju sam dodala medij za uzgoj u volumenu 10 puta većem od volumena korištene otopine tripsin-EDTA kako bi FTS iz medija inaktivirao tripsin. Određeni alikvot stanične suspenzije sam prenijela u novu bocu za uzgoj stanica te dodala svježi medij za uzgoj stanica (8 mL za bocu od 25 cm² ili 40 mL za bocu od 175 cm²).

Tablica 11. Uvjeti za supkultivaciju kontinuiranih staničnih linija.

Stanična linija	Medij za uzgoj	Vremenski razmak među supkultivacijama (dani)	Omjer stanične suspenzije pri supkultivaciji	Maksimalan broj supkultivacija
BSR T7/5	radni medij DMEM s 10% FTS-a (uz dodatak 0.01 g/mL antibiotika G 418 u svaki drugi pasaž)	3-4	1:10	40 (od pohranjene stanične banke)
Vero	radni medij MEM s 10% FTS-a	3-4	1:10-1:6	20 (od pohranjene stanične banke)

BSR T7/5, fibroblasti bubrega mladog hrčka sa stabilnom ekspresijom RNA polimeraze T7; DMEM, Dulbeccov modificirani Eagle medij; MEM, minimalni esencijalni medij; FTS, fetalni teleći serum.

3.2.9. De novo proizvodnja kimernih virusa postupkom reverzne genetike

Kimerne viruse vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 sam proizvela ko-transfekcijom stanica BSR T7/5 plazmidom koji sadrži čitavi virusni antigenom te tri pomoćna ekspresijska plazmida pSG5-N, pSG5-P i pSG5-L.

Stanice BSR T7/5 sam nasadila u koncentraciji $0,4-0,6 \times 10^6$ u 3 mL radnog medija DMEM s 10% FTS-a po zdencu u pločama sa šest zdenaca i inkubirala pri 37 °C u atmosferi s 5% CO₂ kroz 24 h. Četiri sata prije transfekcije zamijenila sam medij sa svježim alikvotom, a netom prije transfekcije, stanice sam isprala dva puta s 1 mL medija *Opti-MEM*TM ugrijanog pri 37 °C i dodala 0,8 mL medija *Opti-MEM*TM u svaki zdenac. Transfekciju sam radila koristeći reagens na bazi lipida (lipofekcija), na način da sam prvo pripremila reakcijske smjese A i B (tablica 12) za svaki

zdenac, a potom dodala smjesu A u smjesu B i inkubirala 15 min pri sobnoj temperaturi. Tako dobivenu smjesu sam nakapavajući dodala na stanice, a stanice sam inkubirala 18 h pri 37 °C. Sljedeći dan sam isprala stanice dva puta s 1 mL medija *Opti-MEM*TM ugrijanog pri 37 °C i dodala 3 mL svježeg radnog medija DMEM s 10% FTS-a.

Tablica 12. Dvije reakcijske smjese za transfekciju stanica s ciljem dobivanja kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C.

Reakcijska smjesa A		
Komponenta	Količina	
	vCE1E2-HCV-MRV2	vE1E2TMD-HCV-MRV2
medij za transfekciju stanica <i>Opti-MEM</i> TM <i>Reduced Serum Medium</i>	150 µL	150 µL
reagens za povećanje efikasnosti transfekcije stanica <i>PLUS</i> TM <i>Reagent</i>	5 µL	5 µL
plazmid s cijelim virusnim antigenomom	5 µg	9,18 µg
pSG5-N	0,3 µg	1 µg
pSG5-P	0,2 µg	0,5 µg
pSG5-L	0,3 µg	1 µg
Reakcijsku smjesu A sam inkubirala 15 min pri sobnoj temperaturi.		

Reakcijska smjesa B		
Komponenta	Količina	
	vCE1E2-HCV-MRV2	vE1E2TMD-HCV-MRV2
medij za transfekciju stanica <i>Opti-MEM</i> TM <i>Reduced Serum Medium</i>	150 µL	150 µL
reagens za transfekciju stanica metodom lipofekcije <i>Lipofectamine</i> TM <i>LTX Reagent</i>	9 µL	9 µL
Reakcijsku smjesu B sam inkubirala 5 min pri sobnoj temperaturi.		

Stanice sam potom inkubirala pri 35 °C kroz 4 dana za vCE1E2-HCV-MRV2, odnosno 5 dana za vE1E2TMD-HCV-MRV2. Svaki dan sam pratila pojavu CPE-a. Nakon prve inkubacije, stanice iz svakog zdenca sam presadila u T-boce od 25 cm² s 10 mL svježeg radnog medija DMEM s 3% FTS-a i propagirala kroz nekoliko supkultivacija u trajanju 3-5 dana. Za vE1E2TMD-HCV-

MRV2 sam napravila jednu supkultivaciju, a za vCE1E2-HCV-MRV2 tri supkultivacije. Supkultivacije sam radila na način da sam stanične suspenzije razrjeđivala s radnim medijem DMEM s 3% FTS-a u omjeru 1:3 do trenutka dok na stanicama nisam uočila jaki CPE.

3.2.10. Infekcija staničnih kultura

Stanice Vero i fibroblaste pilećih embrija sam inficirala u suspenziji na način da sam u T-boci pomiješala odgovarajući broj stanica s medijem za uzgoj koji je sadržavao određeni postotak FTS-a te dodala uzorak virusne suspenzije. Suspenziju virusa sam dodavala u prethodno definiranom volumenu ili u volumenu potrebnom da se postigne željeni MOI (željeni omjer broja virusnih čestica i broja stanica). Titar virusa koji sam koristila pri infekcijama sam odredila testom određivanja 50%-tne infektivne doze virusa u kulturi stanica procjenom citopatogenog efekta (*cell culture infective dose 50%*, CCID₅₀) (opisan u poglavlju 3.2.11.1.).

Broj stanica, MOI i trajanje infekcije su za svaki pojedini tip infekcije navedeni u tablici 13, uz izuzetak postupaka infekcija u svrhu razdvajanja virusnih varijanti postupkom plakiranja (opisan u poglavlju 3.2.12.) i u svrhu pripreme staničnog lizata (opisan u poglavlju 3.2.18.). Inficirane stanice sam inkubirala pri 35 °C u atmosferi koja je sadržavala 5% CO₂. Supernatante staničnih kultura sam sakupljala na način da sam virusne suspenzije centrifugirala pri 1620 × g u trajanju 5-10 min, razdijelila i spremila pri -60 °C ili niže. Kod serija virusa korištenih u pokusima *in vivo* sam prije smrzavanja u suspenziju dodala mješavinu stabilizatora 1 i 2 u udjelu od 25%.

U pokusima u kojima sam određivala kinetiku replikacije rekombinantnih virusa sam od drugog do sedmog dana infekcije iz boca uzimala 1 mL supernatanta staničnih kultura te ih obrađivala po gore navedenom postupku. Uzeti volumen sam svaki puta nadomještala s 1 mL svježeg medija za uzgoj. U svakom uzorku sam određivala virusni titar testom CCID₅₀.

Tablica 13. Uvjeti infekcija tijekom karakterizacije kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C.

Tip infekcije	Vrsta posuda	Medij	Broj i vrsta stanica	MOI ili volumen suspenzije	Trajanje infekcije
prilagodba virusa na stanice Vero	T-boca od 25 cm ²	10 mL radnog medija MEM s 2% FTS-a	1 × 10 ⁶ Vero	1 mL supernatanta sa stanica BSR T7/5 za 1. p, 1 mL supernatanta iz prethodnog p za ostale p	7-10 dana
izrada matičnih serija virusa	6 T-boca od 150 cm ²	50 mL radnog medija MEM s 5% FTS-a po boci	14 × 10 ⁶ Vero po boci	10 ⁻⁴ po boci	10 dana
određivanje kinetike rasta virusa	T-boca od 25 cm ²	10 mL radnog medija MEM s 5% FTS-a	3 × 10 ⁶ Vero	10 ⁻³	7 dana
uzastopno kultiviranje virusa na stanicama Vero	T-boca od 25 cm ²	10 mL radnog medija MEM s 5% FTS-a	3 × 10 ⁶ Vero	MOI 10 ⁻³ za 1. p, 1 µL ili 100 µL supernatanta iz prethodnog p za ostale p	vrijeme potrebno da 80% površine staničnog sloja bude zahvaćeno CPE-om (5-7 dana)
izrada serija virusa korištenih u pokusima <i>in vivo</i>	T-boca od 175 cm ²	40 mL radnog medija MEM s 5% FTS-a (24 h), 3 × ispiranje s radnim medijem MEM bez FTS-a, 40 mL radnog medija MEM bez FTS-a (do kraja)	14 × 10 ⁶ Vero	10 ⁻³	vrijeme potrebno da 80% površine staničnog sloja bude zahvaćeno CPE-om (5 dana)
uzastopno kultiviranje uzorka vCE1E2-HCV-MRV2 p4 na stanicama fibroblasta pilećih embrija	T-boca od 25 cm ²	10 mL radnog medija MEM s 5% FTS-a	3,2 × 10 ⁶ fibroblasta pilećih embrija	MOI 10 ⁻¹ za 1. p, 100 µL supernatanta iz prethodnog p za ostale p	7 dana

MEM, minimalni esencijalni medij; FTS, fetalni teleći serum; MOI, multiplicitet infekcije; BSR T7/5, fibroblasti bubrega mladog hrčka sa stabilnom ekspresijom RNA polimeraze T7; p, pasaž; CPE, citopatogeni efekt.

3.2.11. Određivanje virusnog titra

3.2.11.1. Određivanje virusnog titra testom određivanja 50%-tne infektivne doze virusa u kulturi stanica procjenom citopatogenog efekta

Testom određivanja 50%-tne infektivne doze virusa u kulturi stanica procjenom citopatogenog efekta (CCID₅₀) određuje se razrjeđenje uzorka koje izaziva CPE u 50% inokuliranih staničnih kultura. Za provedbu testa pripremila sam stanice Vero na način opisan u poglavlju 3.2.8. i podesila koncentraciju stanica u suspenziji tako da sadrži $1,6 \times 10^5$ stanica/mL radnog medija MEM s 5% FTS-a. Za svaki virusni uzorak sam u staklenim epruvetama priredila odgovarajući niz predrzrjeđenja i razrjeđenja virusa u hladnom radnom mediju MEM bez FTS-a. U svaki zdenac ploče s 96 zdenaca, osim u zdence u drugom stupcu u koje sam stavila početno razrjeđenje virusa, sam multikanalnom pipetom dodala 100 µL radnog medija MEM bez FTS-a. Zdence u prvom i zadnjem stupcu nisam inokulirala virusom jer su oni služili kao kontrola stanica na svakoj pločici. Virusni uzorak sam dodavala na način da sam u drugi stupac dodala 150 µL početnog razrjeđenja virusa te serijski prenosila po 50 µL virusne suspenzije u nizvodne stupce. Jednu ploču sam pripremila kao neinokuliranu kontrolu stanica gdje sam dodala samo 100 µL radnog medija MEM bez FTS-a. U zadnjem koraku sam u svaki zdenac ploča s 96 zdenaca dodala 100 µL prethodno pripremljene suspenzije stanica. U svakom testu sam usporedno s testiranjem uzorka ispitivala i laboratorijski standard virusa zaušnjaka.

Ploče sam inkubirala 10 dana pri 35 °C u atmosferi koja je sadržavala 5% CO₂. Deseti dan od postavljanja testa, mikroskopski sam pregledavala zdence i bilježila one u kojima se pojavio CPE. Titar virusa po inokulumu sam računala prema Spearman-Kärber formuli:

$$\log \text{CCID}_{50} = L + d(S - 0.5)$$

gdje je L = log početnog razrjeđenja, d = log faktora razrjeđenja, S = zbroj udjela broja zdenaca u svakom stupcu.

Test sam smatrala valjanim: a) ako je u početnom razrjeđenju CPE bio prisutan u barem 7 zdenaca, a u desetom stupcu u najviše 1 zdencu; b) ako titar laboratorijskog standarda nije odstupao

za više od $\pm 0,50 \log \text{CCID}_{50}/\text{mL}$ od deklarirane vrijednosti koja iznosi $6,49 \log \text{CCID}_{50}/\text{mL}$ (Svjetska zdravstvena organizacija, 1994).

3.2.11.2. Određivanje virusnog titra testom plakiranja

Stanice Vero sam pripremila na način opisan u poglavlju 3.2.8. i podesila koncentraciju stanica u suspenziji tako da sadrži $0,8 \times 10^6$ stanica/mL radnog medija MEM s 10% FTS-a. Automatskom pipetom sam dodala 1 mL stanične suspenzije po zdencu u pločama sa šest zdenaca, a nakon toga 2 mL radnog medija MEM s 10% FTS-a. Stanice sam inkubirala pri 37°C u atmosferi s 5% CO_2 kroz 48 h do postizanja konfluentnog monosloja (100% površine zdenca pokriveno je stanicama). U staklenim epruvetama sam priredila odgovarajući niz predrazrjeđenja i razrjeđenja virusa u hladnom radnom mediju MEM s 2% FTS-a. Iz zdenaca sa stanicama sam uklonila supernatant te sam inokulirala 1 mL pojedinog razrjeđenja uzorka u dva zdenca u pločici (počevši od najvećeg razrjeđenja virusa), a u kontrolne zdence sam inokulirala 1 mL radnog medija MEM s 2% FTS-a. Ploče sam inkubirala 1 h i 30 min pri 35°C u atmosferi s 5% CO_2 , nakon čega sam iz zdenaca uklonila virus (počevši od najvećeg razrjeđenja virusa) i pokrila stanični monosloj s 3 mL pokrova. Stanični monosloj sam ostavila 15 do 20 min pri sobnoj temperaturi da se pokrov skrutne, a pločice sam nakon toga stavila u prozirne plastične vrećice i inkubirala 6 dana pri 35°C u atmosferi s 5% CO_2 . Šesti dan od postavljanja testa, u svaki zdenac sam dodala 1 mL otopine za bojanje pokrova i inkubirala pločice 1 h pri 35°C u atmosferi s 5% CO_2 . Potom sam uklonila otopinu za bojanje iz zdenaca i inkubirala pločice još četiri sata u istim uvjetima.

Titar virusa izražava se u jedinicama stvaranja plakova (*plaque forming units*, PFU) po jedinici volumena. Broj plakova sam makroskopski očitavala za svaki zdenac (plakovi su prozirno ili svjetlije obojene čistine u odnosu na crveno obojeni stanični monosloj), a titar virusa (PFU/mL) sam za svako razrjeđenje u testu računala prema formuli:

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

Svaki uzorak sam testirala u tri razrjeđenja i u minimalno dva neovisna testa. Tijekom brojanja sam u obzir uzimala samo ona razrjeđenja u kojima se plakovi nisu preklapali i njihov broj se mogao jasno odrediti. Test sam smatrala valjanim ako titar laboratorijskog standarda nije odstupao za više od $\pm 0,50 \log \text{PFU/mL}$ od deklarirane vrijednosti koja iznosi $6,60 \log \text{PFU/mL}$

(Svjetska zdravstvena organizacija, 1994). Konačnu vrijednost titra sam dobila određivanjem dekadskog logaritma srednje vrijednosti svih pojedinačnih rezultata testa.

3.2.12. Razdvajanje virusnih varijanti postupkom plakiranja

Ovaj postupak sam koristila kako bih razdvojila virusne varijante iz uzorka matične serije virusa vCE1E2-HCV-MRV2. Virusne varijante sam razdvojila postupkom plakiranja opisanim u poglavlju 3.2.11.2. Dobivene plakove sam uzorkovala pomoću automatske pipete s nastavkom od 1 mL te ih nasadila u T-boce od 25 cm² s 1×10^6 stanica Vero u 10 mL radnog medija MEM s 2% FTS-a. Ukupno sam nasadila 10 plakova. Stanice sam inkubirala pri 35 °C u atmosferi koja je sadržavala 5% CO₂. Inficirane stanice sam pratila tijekom narednih dana kako bih primijetila pojavu CPE-a. Mikroskopski sam procijenila trenutak u kojem je infekcija dosegla 40%-tnu zahvaćenost staničnog sloja CPE-om te sam tada sakupila supernatante staničnih kultura po postupku opisanom u poglavlju 3.2.10. Uzorke sam pohranila pri -60 °C ili nižoj.

3.2.13. Izolacija ukupne virusne RNA

Ukupnu virusnu RNA sam izolirala iz 400 µL supernatanata inficiranih staničnih kultura (dobivenih postupkom opisanim u poglavlju 3.2.10.) pomoću kompleta reagensa *Quick-RNA Viral Kit* (Zymo Research) prema uputama proizvođača te sam odmah nastavila s postupkom reverzne transkripcije.

3.2.14. Reverzna transkripcija

Za ovaj postupak sam koristila ukupnu virusnu RNA koju sam izolirala kako je opisano u poglavlju 3.2.13. Protokol sam započela denaturacijom virusne RNA – pomiješala sam komponente pred-reakcijske smjese u mikroepruvetama kako je opisano u tablici 14 i zagrijavala smjesu 5 min pri 65 °C. Potom sam smjesu hladila 5 min pri 4 °C nakon čega sam u smjesu dodala preostale komponente za reakciju reverzne transkripcije (tablica 15). Reverznu transkripciju sam provodila pod sljedećim uvjetima: 10 min pri 25 °C, 50 min pri 37 °C i 15 min pri 70 °C. Tako dobivenu cDNA sam odmah koristila za umnažanje metodom PCR ili je pohranila pri -20 °C do

korištenja. Reakcije umnažanja u kojima sam koristila cDNA opisane su u poglavljima 3.2.2.2.-3.2.2.3.

Tablica 14. Sastav pred-reakcijske smjese za reverznu transkripciju.

Komponenta	Volumen po reakciji (μL)
50 μM nasumični heksanukleotidi	1
10 mM dNTP	4
RNA	11

dNTP, 2'-deoksinukleozid-5'-trifosfati.

Tablica 15. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju.

Komponenta	Volumen po reakciji (μL)
pred-reakcijska smjesa	16
pufer za reverznu transkripciju 5 × <i>First-Strand Buffer</i>	5
0.1 M DTT	2
20 jedinica/μL inhibitor RNaze	1
200 jedinica/μL reverzna transkriptaza <i>M-MLV Reverse Transcriptase</i>	1

DTT, ditioneitol.

3.2.15. Priprema biblioteka DNA i sekvenciranje metodom nove generacije

Sekvenciranje metodom nove generacije (NGS) sam koristila za (a) određivanje sekvencija rekombinantnih plazmida pCE1E2-HCV-MRV2 i pE1E2TMD-HCV-MRV2 i (b) određivanje varijabilnosti populacija kimernih virusa proizvedenih iz tih plazmida tijekom kultiviranja u odabranim staničnim linijama. Kao početne uzorke za pripremu biblioteka DNA koristila sam izolirane plazmide ili priređene preklapajuće fragmente (pomiješane u ekvimolarnim količinama) koji prekrivaju čitave virusne genome. Izolacija plazmidne DNA za sekvenciranje opisana je u poglavlju 3.2.7. Postupak izolacije RNA i reverzne transkripcije virusnih genoma opisan je u poglavljima 3.2.13. i 3.2.14., a postupak umnažanja i pripreme fragmenata za izradu biblioteka DNA opisan je u poglavljima 3.2.2.2. i 3.2.3.

Metodu NGS sam radila na uređaju *Illumina MiniSeq* koji koristi tehnologiju sekvenciranja sintezom (*sequencing by synthesis*). Za početak sam molekule DNA u početnim uzorcima izrezala

na manje fragmente koristeći enzimatsko cijepanje te na krajeve fragmenata dodala adaptore, indekse i regije komplementarne nukleotidnim sljedovima na protočnoj ćeliji gdje se odvija sam proces sekvenciranja. Takav konstrukt čini biblioteku DNA. Osim za vezanje na protočnu ćeliju, indeksi su bitni kasnije u analizi rezultata za identifikaciju uzoraka, jer sam u idućem koraku pomiješala priređene biblioteke DNA i nanijela ih na protočnu ćeliju. U procesu sekvenciranja, dobiveni fragmenti služili su kao kalupi na temelju kojih se sintetizirala DNA pomoću nukleotida označenih bojom. Kao rezultat sekvenciranja, dobila sam veliki broj očitavanja sekvencija koje sam onda obradila bioinformatičkom analizom.

Biblioteke fragmenata za sekvenciranje sam priredila pomoću kompleta reagensa *NEBNext® Ultra™ II FS DNA Library Prep Kit for Illumina* (New England Biolabs) prema uputama proizvođača. Kvalitetu biblioteka fragmenata sam odredila mjerenjem koncentracije DNA (opisano u poglavlju 3.2.3.) i analizom veličine fragmenata na automatiziranom sustavu za elektroforezu *2100 Bioanalyzer System* (Agilent) pomoću kompleta reagensa *High Sensitivity DNA Kit* (Agilent) prateći upute proizvođača. Uzorke zadovoljavajuće kvalitete sam sekvencirala na uređaju *Illumina MiniSeq* prema protokolu iz kompleta reagensa *NEBNext® Ultra™ II FS DNA Library Prep Kit for Illumina* (New England Biolabs).

3.2.16. Obrada očitavanja dobivenih sekvenciranjem metodom nove generacije

Kvalitetu podataka sekvenciranja određivala sam pomoću programa *FastQC v0.11.8*. Za uklanjanje adaptera, baza koje imaju vrijednosti niže od Q30 i očitavanja kraćih od 50 nukleotida koristila sam alat *BBDuk* unutar paketa *BBTools*. Parove očitavanja (dobivene sekvenciranjem istog lanca DNA s dva kraja) sam sravnila s referentnom sekvencijom plazmida pomoću alata *Bowtie2 v2.4.2* (Langmead i Salzberg, 2012), a konsenzus sekvencije sam odredila pomoću softvera *Geneious Prime® 2019.2.3*. U svrhu poboljšanja sravnjenja, očitavanja sam ponovno sravnila na ovako dobivenu konsenzus sekvenciju. U daljnjem procesiranju sravnjenja sam uklanjala očitavanja koja imaju više od dvije različite baze u odnosu na konsenzus sekvenciju, što sam radila s paketom alata *Samtools v1.12* (Li i sur., 2009). Podaci o broju dobivenih očitavanja prije i poslije filtriranja, kao i o vrijednostima pokrivenosti sravnjenja, prikazani su u prilogu 1. Za određivanje raznolikosti virusnih populacija koristila sam alat *V-Phaser 2* (X. Yang i sur., 2013). Nukleotidne promjene zastupljene u frekvenciji nižoj od 2%, kao i promjene detektirane u regijama vezanja početnica

korištenih za umnažanje metodom PCR sam odbacila pomoću programske skripte. Odbacila sam i promjene koje nisu bile prisutne u barem pet očitavanja s oba kraja. Iz daljnje analize sam izuzela i sve insercije i delecije. Takve vrste promjena nisu uočene u konsenzusima virusnih populacija, a ako se detektiraju u malim postocima, ne može se utvrditi jesu li one podrijetlom s istog genoma, niti jesu li takvi genomi funkcionalni.

Konsenzus sekvencije plazmida sam pohranila u bazu NCBI *GenBank* (pristupni brojevi MZ929423 i OP729419), a očitavanja dobivena sekvenciranjem metodom NGS uzoraka plazmida i virusnih genoma u bazu NCBI *Sequence Read Archive* (SRA) (pristupni brojevi PRJNA769261, PRJNA895323, PRJNA1040024 i PRJNA1040113).

3.2.17. Genska karakterizacija virusa

U svrhu genske karakterizacije virusnih populacija analiziranih metodom NGS, za svaki sam virusni uzorak određivala nekoliko parametara: raznolikost virusnih populacija, frekvenciju heterogenih mjesta po genima/regijama CDS/regijama NCR, promjene na razini konsenzusa, pojavnost nesinonimnih supstitucija, pojavnost zajedničkih varijabilnih pozicija i pozitivno selektiranih promjena te održanje cjelovitosti genoma.

Raznolikost virusnih populacija sam izražavala pomoću dvije veličine: broj heterogenih mjesta i nukleotidna raznolikost genoma (π) (Zhao i Illingworth, 2019). Kako bih dobila π , prvo sam računala raznolikost na svakoj pojedinoj poziciji (R_x):

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

gdje je x = pozicija u genomu, i = vrsta nukleotida (A, T, C ili G), j = ostala 3 nukleotida, n_i = broj kopija nukleotida i , n_j = broj kopija nukleotida j , N = dubina sekvenciranja na poziciji x . Zatim sam π računala po formuli:

$$\pi = \sum_{x=1}^L \frac{R_x}{L}$$

gdje je R_x = raznolikost na poziciji x , L = dužina genoma.

Frekvenciju heterogenih mjesta po genima/regijama CDS/regijama NCR sam definirala kao broj heterogenih mjesta po duljini pojedinog gena/svih regija CDS/svih regija NCR. Nukleotide prisutne u više od 50% očitavanja na pojedinoj genomskoj poziciji sam odredila kao dio konsenzusa virusne populacije. Zajedničke varijabilne pozicije sam definirala kao supstitucije koje sam detektirala u svim replikama virusa tijekom uzastopnog kultiviranja (i iz 5. i iz 10. pasaža na stanicama Vero; iz 10. pasaža na fibroblastima pilećih embrija), a pozitivno selektirane promjene kao supstitucije koje su pokazale jasan trend povećanja zastupljenosti iz ranijih u kasnije pasaže (iz inicijalnog uzorka u 5. pasaž i/ili iz 5. pasaža u 10. pasaž na stanicama Vero; iz inicijalnog uzorka u 10. pasaž na fibroblastima pilećih embrija).

3.2.18. Priprema staničnog lizata i određivanje koncentracije proteina

Za pripremu staničnog lizata, stanice Vero sam nasadila u T-bocama od 25 cm² u koncentraciji 3×10^6 stanica u 10 mL radnog medija MEM s 5% FTS-a te ih inficirala virusnim uzorcima pri MOI 2. Stanice sam inkubirala pri 35 °C u atmosferi s 5% CO₂ u trajanju od 72 h. Nakon tri dana, stanice sam isprala s 1 mL 0,25%-tne otopine tripsin-EDTA, odvojila ih od podloge za rast dodatkom otopine tripsin-EDTA u volumenu dovoljnom da prekrije stanični sloj i prenijela ih u epruvete za centrifugiranje od 15 mL. Tripsin-EDTA sam neutralizirala dodatkom 11 mL radnog medija MEM s 10% FTS-a. Stanice sam centrifugirala pri $1620 \times g$ u trajanju od 10 min. Dekantirala sam supernatant, a talog stanica sam isprala dva puta sa 6 mL PBS-a te centrifugirala 5 min pri $1620 \times g$. Potom sam stanice resuspendirala u 1 mL PBS-a, prebacila ih u Eppendorf epruvetu od 2 mL te ponovno centrifugirala 5 min pri $1620 \times g$ i uklonila sav preostali supernatant pomoću automatske pipete. Talog sam resuspendirala u 80 µL pufera za lizu stanica. Stanice sam inkubirala 30 min pri 4 °C i centrifugirala pri $15294 \times g$ kroz 15 min pri 4 °C. Supernatant koji je sadržavao proteine sam pažljivo prenijela u novu epruvetu i do korištenja pohranila pri -60 °C ili niže. Prije korištenja lizata, izmjerila sam koncentraciju proteina u uzorcima na fluorometru *Quantus* pomoću kompleta reagensa *Qubit® Protein Assay Kit* (Promega) prema uputama proizvođača.

3.2.19. Westernska metoda otiska

Ovu metodu sam radila s ciljem detekcije proteina C i E2 HCV-a u lizatima stanica inficiranim uzorcima virusa vCE1E2-HCV-MRV2 koji su dobiveni tijekom kultiviranja na stanicama Vero. Proteine u uzorcima sam prvo razdvojila elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima, nakon čega sam ih prenijela na membranu i detektirala sa specifičnim antitijelima.

3.2.19.1. Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima

Elektroforezu proteina sam radila na gradijentnom poliakrilamidnom gelu *NuPAGE Bis-Tris (4-12%)* (Invitrogen). Uzorke sam pomiješala s puferom za nanošenje uzoraka na gel u omjeru 1:4 i s otopinom za redukciju proteina u omjeru 1:10 tako da je ukupan volumen bio 25 μ L. Proteine u uzorku sam denaturirala inkubacijom pri 95 °C u trajanju od 5 min te ih nanijela na poliakrilamidni gel montiran u kadici za vertikalnu elektroforezu koju sam ispunila s 1 $\times$ puferom za elektroforezu. Paralelno s testnim uzorcima u kojima sam detektirala proteine HCV-a C i E2, na gel sam nanosila i lizate neinficiranih stanica Vero i stanica inficiranih uzorkom matične serije kontrolnog virusa vMRV2 (negativne kontrole) te molekularni biljeg za određivanje veličine proteinskih vrpca *ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker* (Lonza). Elektroforeza je trajala 1 h, a izvodila sam je pri sobnoj temperaturi, u uvjetima 200 V, 100 mA, 20 W.

3.2.19.2. Prijenos proteina na membranu

Proteine koje sam prethodno razdvojila elektroforezom sam u svrhu detekcije prenijela na membranu od poliviniliden difluorida (PVDF). Membranu sam aktivirala inkubacijom u metanolu, isprala u vodi i ekvilibrirala u puferu za prijenos proteina na membranu (prema uputama proizvođača membrane). U modul za prijenos proteina sam redom složila: spužvice umočene u pufer za prijenos, filter papir kojeg sam umočila u isti pufer, poliakrilamidni gel, membranu, te ponovno filter papir i spužvice. Modul sam montirala u istu kadiku koju sam koristila za vertikalnu elektroforezu i napunila ga puferom za prijenos, dok sam kadiku ispunila hladnom vodom. Prijenos proteina je trajao 50 min u uvjetima 600 V, 400 mA i 100 W.

3.2.19.3. Imunodetekcija proteina na membrani

Po završetku prijenosa, membranu sam ponovno aktivirala inkubacijom u metanolu i isprala je u vodi. Zatim sam je prenijela u epruvetu od 15 mL u koju sam prethodno dodala pufer za blokiranje nespecifičnog vezanja antitijela. Epruvetu sam inkubirala na uređaju za okretanje epruveta pri sobnoj temperaturi u trajanju 1 h. Po završetku blokiranja, na membranu u epruveti sam dodala primarno antitijelo pripremljeno u puferu za blokiranje nespecifičnog vezanja u razrjeđenju: 1:500 za detekciju proteina E2 HCV-a, 1:1000 za detekciju proteina C HCV-a ili β -aktina ili 1:2500 za detekciju proteina N virusa zaušnjaka. Vezanje antitijela je trajalo 2 h za detekciju proteina HCV-a, odnosno 1 h za detekciju proteina N virusa zaušnjaka i β -aktina, a izvodila sam ga na uređaju za okretanje epruveta pri sobnoj temperaturi. Za uklanjanje nevezanog primarnog antitijela, membranu sam isprala četiri puta po 10 min u puferu za ispiranje na uređaju za okretanje epruveta pri sobnoj temperaturi. Potom sam na membranu u epruveti dodala odgovarajuće sekundarno antitijelo pripremljeno u puferu za blokiranje nespecifičnog vezanja: kozje anti-mišje antitijelo IgG-AP za detekciju proteina E2 ili C HCV-a (razrijeđeno 1:5000), kozje anti-štakorsko antitijelo IgG-AP za detekciju proteina N virusa zaušnjaka (razrijeđeno 1:7500) ili kozje anti-kuniće antitijelo IgG-AP za detekciju β -aktina (razrijeđeno 1:5000). Vezanje antitijela je trajalo 1 h pri sobnoj temperaturi na uređaju za okretanje epruveta. Za uklanjanje nevezanog sekundarnog antitijela, membranu sam isprala po prethodno navedenom postupku. Membranu sam potom premjestila na čistu prozirnu plastičnu foliju, dodala na nju 250 μ L supstrata ECF za detekciju (tako da prekrije površinu membrane) i inkubirala u mraku 5 min, nakon čega sam fluorescentno obojenje detektirala na uređaju *Amersham Imager 680 RGB*.

3.2.20. Imunizacija zamorčica i obrada uzoraka za analize imunskih odgovora

S ciljem analize humoralnih imunskih odgovora, zamorčice sam imunizirala virusom vCE1E2-HCV-MRV2 p4 i kontrolnim virusom vMRV2. Svaki virusni uzorak sam testirala koristeći dva protokola imunizacije. U svakoj eksperimentalnoj skupini je bilo pet životinja, dok je u kontrolnim skupinama (inokuliranim fiziološkom otopinom) bilo tri do pet životinja. Zamorčice sam imunizirala supkutano virusnom suspenzijom koja je sadržavala 1×10^6 PFU virusa u radnom mediju MEM bez FTS-a, razdijeljeno na dva mjesta. Prvi protokol imunizacije je

uključivao jedno docjepljivanje s 1×10^6 PFU virusa 21. dan od prvotne imunizacije, a drugi protokol dva docjepljivanja s 1×10^6 PFU virusa 21. i 42. dan od prvotne imunizacije. Četrnaestog dana nakon posljednje imunizacije, životinje sam anestezirala intraperitonealnom administracijom 50 mg/kg ketamina i 5 mg/kg ksilazina te sam radila intranazalni izazov (*challenge test*) kontrolnim virusom vMRV3 u dozi 1×10^6 PFU.

Nakon tri dana, životinje sam anestezirala na prethodno opisan način. Prikupila sam krv kardijalnom punkcijom, a životinje sam potom eutanazirala plinom CO₂ u CO₂ komori. Svakoj životinji sam uzela uzorak bronhoalveolarnog ispirka (*bronchoalveolar lavage*, BAL) ispiranjem dušnika s 2 mL PBS-a. Uzorke BAL-a sam pripremila centrifugiranjem 5 min pri $300 \times g$, nakon čega sam odvojila supernatante i razdijelila ih u alikvote od 1 mL. Serume iz pune krvi sam izdvojila nakon zgrušavanja krvi centrifugiranjem pri $956 \times g$ i 4 °C u trajanju od 10 min i prebacila ih u Eppendorf epruvete od 2 mL.

Tako pripremljene uzorke sam pohranila pri -20 °C do korištenja. Uzorke BAL-a sam koristila u testovima titracije za određivanje titra kontrolnog virusa vMRV3 kod imuniziranih životinja testom CCID₅₀ (opisano u poglavlju 3.2.11.1.). U uzorcima seruma sam određivala titar antitijela IgG specifičnih za virus zaušnjaka pomoću enzimskog imunotesta na čvrstoj fazi (ELISA) te prisustvo antitijela specifičnih za protein E2 HCV-a pomoću kapljične analize proteina.

3.2.21. Enzimski imunotest na čvrstoj fazi za određivanje titra antitijela IgG specifičnih za virus zaušnjaka

Test ELISA sam koristila za određivanje količine antitijela IgG specifičnih za virus zaušnjaka u serumima imuniziranih zamorčića. Ovaj test se temelji na reakciji specifičnih antitijela IgG s virusom UC L-Zagreb vezanim na ploču s 96 zdenaca. Otopinu virusa UC L-Zagreb sam pripremila u razrjeđenju 1:500 s puferom za oblaganje, a tako pripremljenu otopinu antigena sam multikanalnom pipetom nanijela u pločice u volumenu od 100 µL/zdencu. Pločice sam inkubirala pri sobnoj temperaturi preko noći i sljedeći dan isprala zdence tri puta vodom u peraču pločica. Slobodna mjesta u zdencima sam blokirala nanošenjem 200 µL/zdencu inkubacijskog pufera i inkubacijom pri 37 °C u termostatu u trajanju od 2 h. Zdence sam nakon inkubacije isprala vodom u peraču pločica. U međuvremenu sam pripremila početna razrjeđenja seruma u inkubacijskom

puferu. Početna razrjeđenja seruma sam odredila s obzirom na rezultate preliminarnih pokusa. Za početak sam u svaki zdenac ploče s 96 zdenaca, osim u zdence u prvom stupcu u koje sam stavila 200 μ L početnih razrjeđenja uzoraka, dodala 100 μ L inkubacijskog pufera. Uzorke sam binarno razrjeđivala na način da sam, počevši od početnih razrjeđenja uzoraka u prvom stupcu, prenosila po 100 μ L otopine u svaki nizvodni stupac, ponavljajući taj postupak do kraja pločice. Paralelno s testnim uzorcima u kojima sam određivala koncentraciju antitijela IgG, na svaku pločicu sam nanijela i serum neimuniziranog zamorčića (negativna kontrola) u najmanjem razrjeđenju u kojem su se analizirali testni uzorci i serum zamorčića imuniziranog virusom UC L-Zagreb (pozitivna kontrola) u razrjeđenju 1:2000. Dio zdenaca sam pripremila tako da sadrži samo inkubacijski pufer, oni su služili kao kontrola pozadinskog signala u testu. Pločice sam inkubirala 2 h u termostatu pri 37 °C te isprala zdence tri puta vodom. U svaki zdenac sam potom dodala 100 μ L otopine sekundarnog kuničjeg anti-zamoračkog antitijela IgG-HRP razrijeđenog 1:1000 u inkubacijskom puferu. Nakon inkubacije u termostatu pri 37 °C u trajanju od 2 h, zdence sam isprala tri puta vodom, a zatim sam dodala 100 μ L otopine kromogenog supstrata OPD i inkubirala 30 min pri sobnoj temperaturi u tami. Enzimsku reakciju, uslijed koje se razvija narančasto obojenje, blokirala sam dodatkom 50 μ L/zdencu 12,5%-tne otopine H₂SO₄. Apsorbanciju sam mjerila na uređaju *Synergy HTX S1 LFA* pri valnoj duljini od 492 nm.

Količinu antitijela IgG specifičnih za virus zaušnjaka u zamoračkim serumima sam odredila analizom paralelnih pravaca, koja se koristi za procjenu relativne količine antitijela u uzorcima seruma. Za svaki ispitivani uzorak se, na temelju linearne ovisnosti vrijednosti A_{492} o razrjeđenju uzorka, konstruira pravac te ga se uspoređuje s istovjetnim pravcem standarda. Za standard sam odabrala jedan pozitivni uzorak, za koji sam definirala da ima 100 proizvoljnih jedinica (*arbitrary unit*, AU) antitijela IgG po mililitru. Na temelju udaljenosti između dvaju pravaca se svakom ispitivanom uzorku pripisuje vrijednost izražena u AU/mL.

3.2.22. Kapljična analiza proteina

Ova metoda slična je westernskoj metodi otiska, međutim u ovom slučaju proteini se prvotno ne razdvajaju elektroforezom, već se uzorak direktno stavlja na membranu u obliku kapljice. Kapljičnu analizu proteina sam radila s ciljem detekcije antitijela specifičnih za protein E2 HCV-a u serumima imuniziranih zamorčića. U tu svrhu, rE2 protein HCV-a sam pomiješala s

puferom za nanošenje uzoraka na membranu u omjeru 1:4 te sam ga denaturirala inkubacijom pri 95 °C u trajanju 5 min. Na isti način sam pripremila i lizate neinficiranih stanica Vero (negativna kontrola) i stanica inficiranih uzorkom matične serije virusa vCE1E2-HCV-MRV2 (pozitivna kontrola).

Membranu PVDF sam aktivirala postupkom opisanim u poglavlju 3.2.19.2. Na čistu radnu površinu sam redom složila: nekoliko komada suhe staničevine, suhi filter papir, filter papir umočen u pufer za prijenos proteina na membranu te membranu. Uzorke sam pažljivo, kap po kap, dodavala na membranu pomoću automatske pipete s nastavkom od 10 µL i čekala dok se ne apsorbiraju. Potom sam membranu prebacila na suhi filter papir složen na staničevini i tako držala 30 min pri sobnoj temperaturi, nakon čega sam ju ponovno aktivirala postupkom opisanim u poglavlju 3.2.19.3. Membranu sam prebacila u plastičnu posudicu s puferom za blokiranje nespecifičnog vezanja antitijela te inkubirala posudicu 1h na kružnoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Zatim sam na membranu dodala testni serum razrijeđen 1:20, antitijelo za detekciju proteina N virusa zaušnjaka razrijeđeno 1:100 ili antitijelo za detekciju proteina E2 HCV-a razrijeđeno 1:200 u puferu za blokiranje nespecifičnog vezanja. Posudicu sam inkubirala 1 h s testnim serumima i s antitijelom za detekciju proteina N virusa zaušnjaka, odnosno 2 h s antitijelom za detekciju proteina E2 HCV-a, pri sobnoj temperaturi na kružnoj miješalici. Nevezana antitijela sam uklonila ispiranjem membrane četiri puta po 10 min puferom za ispiranje na kružnoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Po završetku ispiranja, na membranu sam dodala odgovarajuće sekundarno antitijelo razrijeđeno u puferu za blokiranje nespecifičnog vezanja: kuniće anti-zamoračko antitijelo IgG-HRP za detekciju antitijela u testnom serumu (razrijeđeno 1:6250), kuniće anti-štakorsko antitijelo IgG-HRP za detekciju proteina N virusa zaušnjaka (razrijeđeno 1:2500) ili kuniće anti-mišje antitijelo IgG-HRP za detekciju proteina E2 HCV-a (razrijeđeno 1:2500). Posudicu sam inkubirala 1 h pri sobnoj temperaturi na kružnoj miješalici. Nevezana sekundarna antitijela sam uklonila ispiranjem membrane po prethodno navedenom postupku. Detekciju vezanih antitijela radila sam po postupku opisanom u poglavlju 3.2.19.3., uz iznimku da sam ovdje koristila 200 µL supstrata ECL za detekciju te sam na uređaju *Amersham Imager 680 RGB* detektirala kemiluminiscentni signal.

3.2.23. Test neurovirulencije *in vivo* na novookoćenim štakorima

Ovaj test sam koristila za procjenu neurovirulentnog potencijala uzorka vCE1E2-HCV-MRV2 p4. Virusni uzorak sam inokulirala u četiri legla novookoćenih štakora (ukupno 37 životinja) prije isteka 24 h po okoćenju životinja. Virusnu suspenziju volumena 10 µl koja je sadržavala 100 PFU virusa u radnom mediju MEM s 2% FTS-a sam inokulirala pomoću brizgalice i igle (inzulinske brizgalice *BD Micro FineTM Plus* (0,5 mL) s fiksnom iglom 0,3 × 8 (30 G)) u lijevi tjemeni režanj, 2 mm lijevo od sagitalnog šava lubanje (Mažuran, 2010; Rubin i sur., 2005). Tridesetog dana nakon inokulacije, životinje sam eutanazirala plinom CO₂ u CO₂ komori, izvadila sam mozgove i fiksirala ih u 10%-tnoj neutralnoj otopini formalina u trajanju od najmanje 10 dana.

Nakon fiksacije, uzorak mozga sam postavila u akrilnu matricu i prerezala po medijalnoj liniji, a tako dobivene hemisfere mozga sam još jednom prerezala 3-5 mm lateralno od medijalne linije. Uzimala sam uzorak od obje hemisfere. Tkivo sam postavila u metalni kalup u koji sam prethodno dodala malo medija za zamrzavanje, na način da sam medijalnu stranu mozga okrenula prema dolje. Ako su se pojavili mjehurići zraka, njih sam odmah uklonila. Metalni kalup s tkivom sam potom stavila na stalak u tekući dušik dok nije u potpunosti pobijelilo, nakon čega sam zamrznuti blok s tkivom izvadila iz kalupa i pohranila ga do kriosekcije pri -60 °C i niže. Prije same kriosekcije, zamrznuti blok s tkivom sam postavila na statolit na koji sam stavila malo medija za zamrzavanje, tako da medijalna strana bude okrenuta prema gore. Tako pripremljeni statolit s tkivnim uzorkom sam uložila u policu za brzo smrzavanje u kriotomu kako bi uzorak postigao temperaturu od -20 °C koja je optimalna za rezanje uzorka mozga na kriotomu. Potom sam statolit s tkivom fiksirala u ležište kriotoma i izravнала tkivo radeći 20 rezova debljine od 20 µm, nakon čega sam napravila dva reza debljine 10 µm i stavila ih na predmetna stakalca. Rezove na stakalcima sam osušila na zraku tijekom 24 h i skenirala ih na skeneru pri rezoluciji 600 dpi.

Slike dobivene skeniranjem sam obrađivala u računalnom programu *ImageJ*, gdje sam određivala površinu presjeka mozga (bez malog mozga i olfaktornih bulbosa) i površinu lateralnih ventrikula u pikselima. Svakom pojedinom uzorku sam računala indeks testa neurovirulencije na novookoćenim štakorima (*rat neurovirulence test*, RNVT) kao kvocijent površine presjeka lateralnih ventrikula i površine presjeka mozga bez malog mozga i olfaktornih bulbosa, a izrazila sam ga kao postotak:

$$\text{indeks RNVT (\%)} = \frac{\text{površina presjeka ventrikula}}{\text{površina presjeka mozga}} \times 100$$

Za izračun sam koristila podatke dobivene mjerenjem obaju moždanih hemisfera životinja. Vrijednost indeksa RNVT virusa sam odredila kao medijalnu vrijednost rezultata dobivenih za sve životinje.

3.2.24. Statistička obrada rezultata

Statističku analizu rezultata provela sam pomoću računalnih programa *Prism 9 9.1.2.* (GraphPad Software) i *Microsoft Excell 2016* (Microsoft). Rezultati su se kod svih statističkih izračuna smatrali značajnima ako je $p < 0,05$. Značajnost razlika u broju heterogenih mjesta i vrijednosti π virusa tijekom uzastopnog kultiviranja procijenila sam pomoću testa Wilcoxon signed-rank za ovisne uzorke te testa Mann-Whitney U za neovisne uzorke. Razlike u frekvenciji heterogenih mjesta u regijama CDS i NCR tijekom uzastopnog kultiviranja virusa te u neurovirulentnom potencijalu virusa sam procijenila primjenom testa Mann-Whitney U. Za procjenu značajnosti razlika u frekvenciji heterogenih mjesta pojedinih gena tijekom uzastopnog kultiviranja virusa koristila sam test Kruskal Wallis One-Way ANOVA, u kombinaciji s post-hoc testom Dunn za određivanje statistički značajnih razlika između pojedinih skupina. Podatke o relativnoj količini specifičnih antitijela IgG u serumima zamorčića sam prvo transformirala primjenom logaritamske transformacije kako bih normalizirala distribuciju podataka, nakon čega sam značajnost između skupina odredila testom Two-Way ANOVA, u kombinaciji s post-hoc testom Tukey.

3.2.25. Prikupljanje podataka

3.2.25.1. Podaci dobivenih sekvenciranjem metodom nove generacije

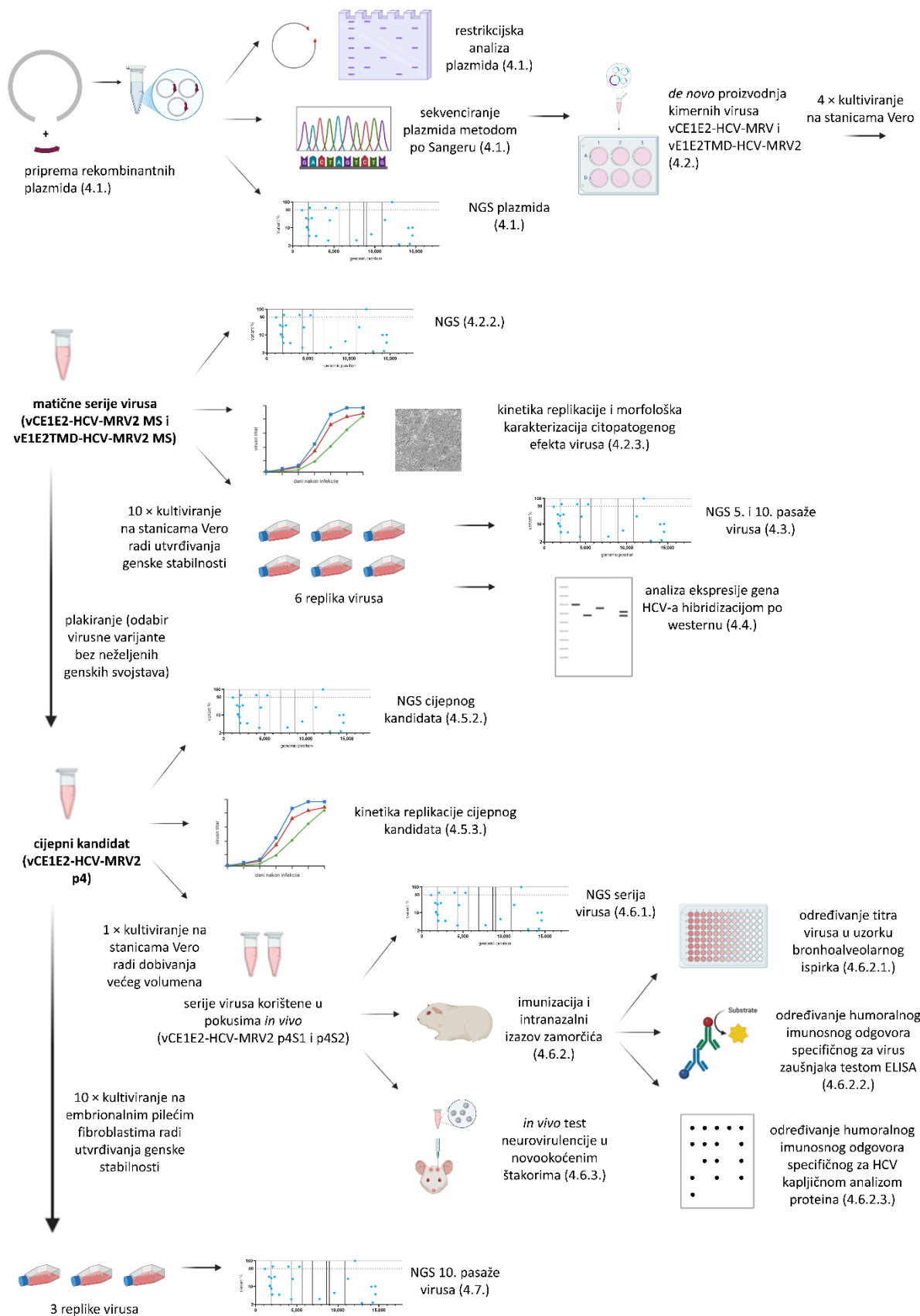
Iz baze NCBI SRA sam preuzela sve javno dostupne podatke (konsenzus sekvencije i datoteke bam) dobivene analizom varijabilnosti populacija kontrolnih virusa vMRV2 i vMRV3 metodom NGS (pristupni brojevi PRJNA769261 i PRJNA1040113) (Slović i sur., 2021). Preuzete podatke sam analizirala postupkom opisanim u poglavlju 3.2.16.

3.2.25.2. Podaci za analizu alatom BLAST

Sekvencije 389 javno dostupna unosa proteina L virusa zaušnjaka i 1000 javno dostupnih unosa proteina E2 HCV-a, subtipa 1b sam preuzela nakon pretraživanja baze NCBI s alatom BLAST (blastp) dana 9. svibnja 2024. Parametre pretrage sam postavila na: taksonomsku skupinu „*Mumps orthorubulavirus*“ ili „*Hepatitis C virus subtype 1b*“ i maksimalni broj ciljanih sekvencija „1000“. Pozicije od interesa sam analizirala korištenjem programa *MSA Viewer 1.25.0*.

3.2.26. Pregled korištenih metoda

U svrhu boljeg razumijevanja rezultata dobivenih u ovom istraživanju, cjelokupni tijek eksperimenata koje sam provela unutar ovog istraživanja je prikazan na slici 11.



Slika 11. Grafički prikaz tijeka eksperimenata. Dva rekombinantna plazmida koja sadrže antigenome kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C su pripremljena kloniranjem *In-Fusion*, a njihov identitet je potvrđen metodama restrikcijske analize i sekvenciranjem. Kimerni virusi su proizvedeni postupkom reverzne genetike iz navedenih plazmida, a nakon prilagodbe na staničnu liniju Vero, pripremljene su matične serije virusa. Matične serije su okarakterizirane analizom stabilnosti virusnih populacija sekvenciranjem metodom nove generacije (NGS) te određivanjem kinetike replikacije i morfološkom karakterizacijom citopatogenog efekta. Dva kimerna virusa su uzastopno kultivirana na staničnoj liniji Vero, nakon čega se određivala genska stabilnost populacija virusa iz 5. i 10. pasaža metodom NGS te ekspresija dodanih gena westernskom metodom otiska. U svrhu odabira virusne varijante bez neželjenih genskih svojstava, jedan od dvaju virusa je plakiran, a dobiveni cijepni kandidat je ponovno okarakteriziran analizom stabilnosti virusnih populacija metodom NGS te određivanjem kinetike replikacije. Cijepni kandidat je dodatno kultiviran jednom na staničnoj liniji Vero radi dobivanja većeg volumena te je reproducibilnost pripreme uzoraka iz uzorka cijepnog kandidata analizirana metodom NGS. Zatim je uslijedilo testiranje imunogeničnosti cijepnog kandidata, koje je provedeno nakon imunizacije i intranazalnog izazova i uključivalo je određivanje titra virusa u uzorku bronhoalveolarnog ispirka, određivanje humoralnog odgovora specifičnog za virus zaušnjaka enzimskim imunotestom na čvrstoj fazi (ELISA) i određivanje humoralnog odgovora specifičnog za virus hepatitisa C (HCV) kapljičnom analizom proteina, te procjena neurovirulentnog potencija cijepnog kandidata u *in vivo* testu neurovirulencije. Za kraj, kako bi se odredilo jesu li promjene uočene tijekom uzastopne kultivacije virusa na staničnoj liniji Vero svojstvene za odabrani cijepni kandidat, virus je uzastopno kultiviran na staničnoj kulturi fibroblasta pilećih embrija, nakon čega se određivala genska stabilnost populacija virusa iz 10. pasaža metodom NGS.

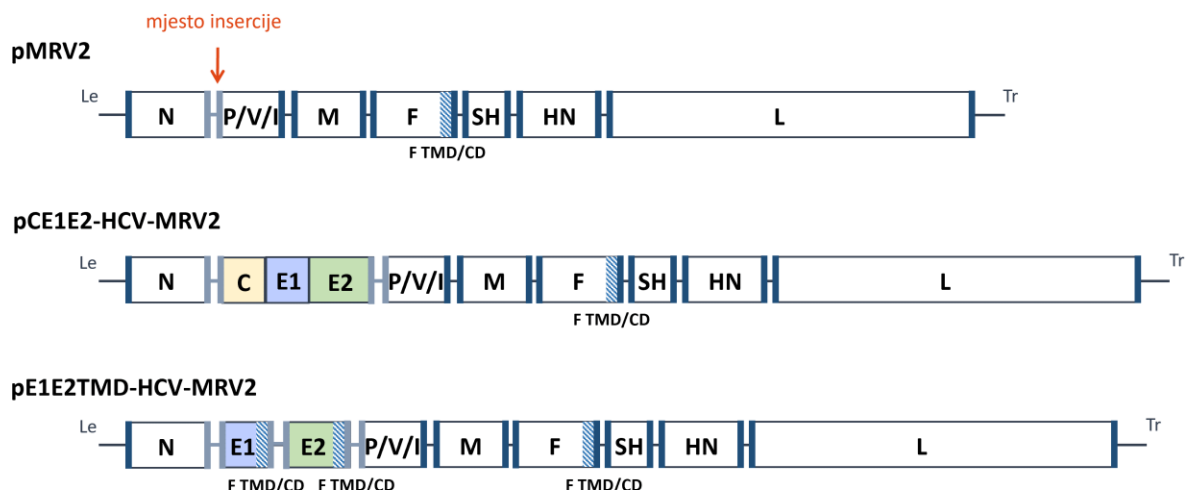
4. REZULTATI

4.1. Dizajn i priprema rekombinantnih plazmida i provjera njihovih sekvencija

S ciljem dobivanja kimernih virusa zaušnjaka s dodanim genima za površinske glikoproteine HCV-a, pripremila sam rekombinantne plazmide pCE1E2-HCV-MRV2 i pE1E2TMD-HCV-MRV2 koji sadrže čitave virusne antigenome. Ove plazmide sam dobila ugradnjom gena HCV-a u sekvenciju antigenoma cijepnog soja virusa zaušnjaka L-Zagreb u plazmidu pMRV2.

Strane gene sam u plazmid pMRV2 ugrađivala u obliku sekvencija ATU između gena N i P virusa zaušnjaka, na način da je nakon ugradnje svaki gen bio uzvodno i nizvodno omeđen s 3' NCR-om gena N i 5' NCR-om gena P kako bi se osigurala pravilna transkripcija (slika 12). Tijekom tog procesa uzela sam u obzir činjenicu da je za učinkovitu replikaciju kimernih virusa zaušnjaka bitno da je duljina insertiranih regija u skladu s „pravilom broja šest“ i ispravnim N-faznim kontekstom, a s obzirom da sam strane gene ugrađivala na poziciju drugog po redu gena u genomu virusa zaušnjaka, gena P, sve sekvencije ATU sam dizajnirala na način da odgovaraju N-faznom kontekstu gena P.

Plazmid pCE1E2-HCV-MRV2 sam dizajnirala tako da sadrži jednu sekvenciju ATU sa cjelovitim sekvencijama proteina C, E1 i E2 HCV-a (aminokiseline 1-746 u sekvenciji poliproteina HCV-a). Plazmid pE1E2TMD-HCV-MRV2 sam dizajnirala tako da sadrži dvije sekvencije ATU, E1TMD i E2TMD, sa sekvencijama ektodomena proteina E1 i E2 HCV-a vezanim na domenu TMD/CD proteina F virusa zaušnjaka (slika 12). Sekvencija ATU E1TMD (ATU 1) sadrži 157 aminokiselina ektodomene proteina E1 HCV-a (aminokiseline 192-348 u sekvenciji poliproteina HCV-a) i 56 aminokiselina domene TMD/CD proteina F virusa zaušnjaka (aminokiseline 483-538 u sekvenciji proteina F virusa zaušnjaka). Sekvencija ATU E2TMD (ATU 2) sadrži 331 aminokiselinu ektodomene proteina E2 HCV-a (aminokiseline 384-714) i 56 aminokiselina domene TMD/CD proteina F virusa zaušnjaka (aminokiseline 483-538). Zbog biosigurnosnih razloga, sekvencije proteina E1TMD i E2TMD u plazmidu pE1E2TMD-HCV-MRV2 ne sadrže signale za usmjeravanje u ER i transport na površinu stanice.



Slika 12. Shematski prikaz sekvencija rekombinantnih plazmida koji sadrže antigenome virusa zaušnjaka, bez (pMRV2) ili sa (pCE1E2-HCV-MRV2 i pE1E2TMD-HCV-MRV2) dodanim genima za površinske proteine virusa hepatitisa C (HCV). Geni HCV-a koji su dodani u genom virusa zaušnjaka su obojani, a 3' nekodirajuća regija (NCR) gena N i 5' NCR gena P koje se ponavljaju u antigenomima su označene sivom bojom. Transmembranska i citoplazmatska domena (TMD/CD) proteina F virusa zaušnjaka koje su dodane na ektodomene proteina ovojnice E1 i E2 HCV-a u plazmidu pE1E2TMD-HCV-MRV2 su označene prugasto plavo. Le, *leader* (regija NCR na 5' kraju antigenoma); Tr, *trailer* (regija NCR na 3' kraju antigenoma).

Za potvrdu identiteta dobivenih plazmida sam koristila restriksijsku analizu i sekvenciranje insertiranih sekvencija metodom po Sangeru. Dodatno, sekvencije plazmidnih regija koje odgovaraju čitavim virusnim antigenomima sam odredila metodom NGS. Varijabilne pozicije u regijama virusnih antigenoma sam detektirala u postocima nižim od granične vrijednosti koja iznosi 2%, što je značilo da sekvencije proizvedenih rekombinantnih plazmida pCE1E2-HCV-MRV2 i pE1E2TMD-HCV-MRV2 odgovaraju teoretskim sekvencijama.

4.2. Dobivanje i karakterizacija kimernih virusa

Za dobivanje kimernih virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 koristila sam postupak reverzne genetike (Beaty i sur., 2017). Stanice BSR T7/5 sam transfecirala

plazmidom koji sadrži virusni antigenom (pCE1E2-HCV-MRV2 ili pE1E2TMD-HCV-MRV2) te tri pomoćna ekspresijska plazmida pSG5 koji sadrže gene za proizvodnju proteina N, P i L virusa zaušnjaka. Nastanak virusa sam potvrdila mikroskopski detekcijom CPE-a na inficiranim stanicama te sekvenciranjem insertiranih sekvencija metodom po Sangeru.

4.2.1. Umnažanje kimernih virusa na staničnoj liniji Vero

Viruse sam potom prilagodila na staničnu kulturu Vero kultiviranjem kroz tri pasaža. Ovu staničnu liniju sam odabrala jer je riječ o regulatorno prihvatljivoj kontinuiranoj staničnoj liniji za proizvodnju virusnih cjepiva (Perdue i sur., 2011; Rodrigues i sur., 2015). Uzorke virusa iz trećeg pasaža na stanicama Vero sam nazvala pred-matičnim serijama (u nazivima uzoraka p-MS, od *pre-master seed*). Ovaj postupak sam provodila kako bih u sljedećem pasažu (u eksperimentalnim matičnim serijama) dobila visoki titar virusa.

Matična serija virusa je dobro okarakterizirani uzorak veće količine virusa istovremeno pripremljen iz istog izvornog uzorka kako bi se osigurao uniformni sastav virusne populacije u različitim serijama cjepiva (Svjetska zdravstvena organizacija, 1994). Virusni titar u uzorcima eksperimentalnih matičnih serija virusa (u nazivima uzoraka MS, od *master seed*) je iznosio 7,67 log CCID₅₀/mL za uzorak vCE1E2-HCV-MRV2 MS te 7,89 log CCID₅₀/mL za uzorak vE1E2TMD-HCV-MRV2 MS.

4.2.2. Genska karakterizacija pred-matičnih i matičnih serija kimernih virusa

Za procjenu uniformnosti populacija kimernih virusa nakon prilagodbe na staničnu liniju Vero i proizvodnje eksperimentalnih matičnih serija koristila sam metodu NGS. Strukturu populacija matičnih serija kimernih virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 sam uspoređivala sa strukturom populacija: (a) pred-matičnih serija tih virusa (analizirano u ovom radu) te (b) matične serije rekombinantnog virusa zaušnjaka bez ATU-a, vMRV2 MS i (c) matične serije kimernog virusa koji između gena N i P virusa zaušnjaka ima ugrađeni gen za EGFP, vMRV3 MS (analizirano u radu Slović i sur. (2021)).

Analiza podataka koje sam dobila metodom NGS je pokazala da su matične serije virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 imale sličnu raznolikost virusnih populacija kao pred-matične serije tih virusa, što je vidljivo kroz sličan broj heterogenih mjesta i vrijednosti π uzoraka za svaki pojedini virus (tablica 16). Mjere raznolikosti populacija matičnih serija svih triju kimernih virusa su bile više u odnosu na populacije matične serije virusa bez dodanih gena, vMRV2 MS (tablica 16).

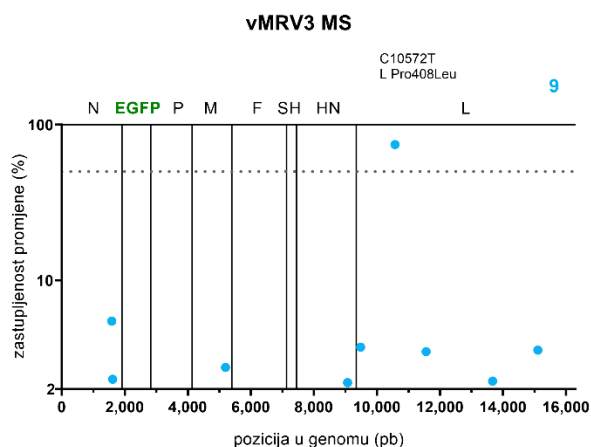
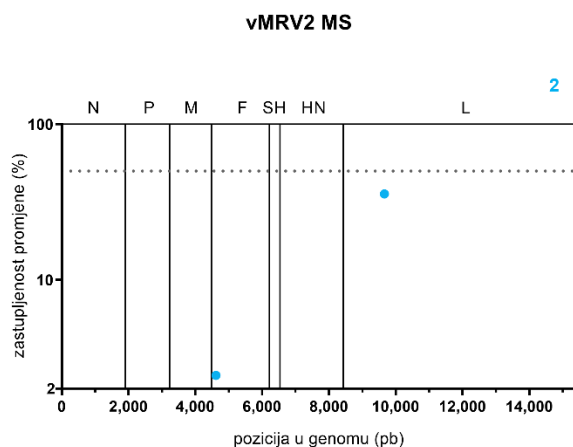
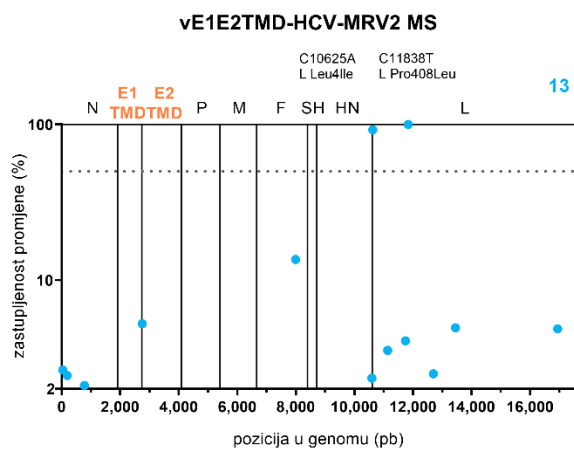
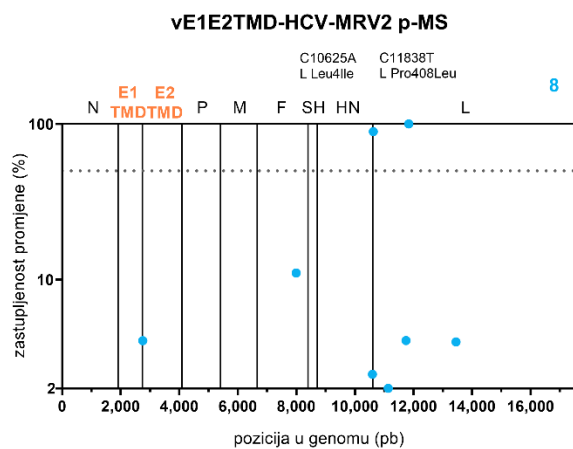
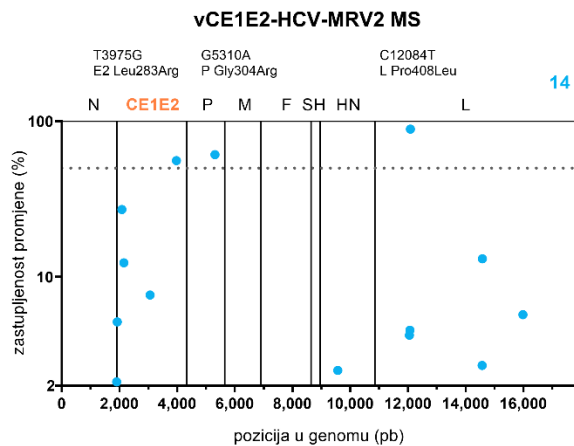
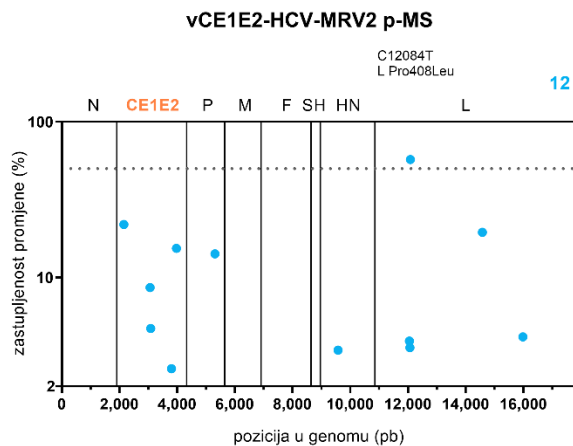
Tablica 16. Mjere raznolikosti virusnih populacija i broj konsenzusnih promjena u pred-matičnim i matičnim serijama kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C te matičnim serijama kontrolnih virusa.

Virus	Broj heterogenih mjesta	$\pi (\times 10^{-4})$	Broj promjena konsenzusa
vCE1E2-HCV-MRV2 p-MS	12	1,26	1
vCE1E2-HCV-MRV2 MS	14	1,50	3
vE1E2TMD-HCV-MRV2 p-MS	8	0,41	2
vE1E2TMD-HCV-MRV2 MS	13	0,60	2
vMRV2 MS	2	0,33	0
vMRV3 MS	9	0,54	1

p-MS; pred-matična serija; MS, matična serija; π , nukleotidna raznolikost genoma.

Broj promjena konsenzusa koje sam detektirala u svih šest proučavanih virusa je bio sličan (tablica 16, slika 13). Supstituciju Pro408Leu u proteinu L sam detektirala u uzorcima svih ispitivanih virusa (prilog 2). Ova promjena odgovara nukleotidnoj promjeni C12084T u uzorcima virusa vCE1E2-HCV-MRV2 (57,18% očitavanja za vCE1E2-HCV-MRV2 p-MS i 88,93% očitavanja za vCE1E2-HCV-MRV2 MS) te promjeni C11838T u uzorcima virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 (100% očitavanja za obje serije virusa). U pred-matičnoj i matičnoj seriji virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 sam zabilježila još jednu promjenu u konsenzusu, C10625A, koja dovodi do aminokiselinske promjene Leu4Ile u proteinu L (89,27% očitavanja za vE1E2TMD-HCV-MRV2 p-MS i 92,50% za vE1E2TMD-HCV-MRV2 MS). U uzorku vCE1E2-HCV-MRV2 MS sam detektirala tri promjene konsenzusa, od kojih sam jednu zabilježila i u pred-matičnoj seriji. Dvije preostale konsenzusne promjene koje sam detektirala u tom uzorku su bile: T3975G, koja dovodi

do aminokiselinske promjene Leu283Arg u proteinu E2 (55,85% očitavanja) te G5310A, koja dovodi do aminokiselinske promjene Gly304Arg u proteinu P (60,97% očitavanja) (slika 13, prilog 2).



Slika 13. Pozicije i zastupljenost promjena detektiranih u pred-matičnim i matičnim serijama kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C te matičnim serijama kontrolnih virusa. Broj promjena u svakom uzorku je naznačen u gornjem desnom uglu. Virusni geni su označeni iznad odgovarajuće regije u genomu (dodatne transkripcijske jedinice su označene bojom). Točkasta linija označava frekvenciju promjena od 50% (razina konsenzusa). Promjene konsenzusa u odnosu na sekvencije odgovarajućih rekombinantnih plazmida iz kojih su virusi proizvedeni su naznačene iznad svake točke; prikazane su nukleotidna i aminokiselinska promjena (prva oznaka odgovara sekvenciji plazmida, druga oznaka odgovara sekvenciji virusa). p-MS, pred-matična serija; MS, matična serija; pb, parova baza.

Jednu heterogenu poziciju sam zabilježila u insertiranim sekvencijama pred-matične i matične serije virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 (slika 13), promjenu T2751C u 5' NCR-u gena E2TMD (prilog 2). Za razliku od toga, u insertiranim sekvencijama pred-matične i matične serije virusa vCE1E2-HCV-MRV2 sam detektirala po pet promjena (slika 13). Dvije promjene koje sam zabilježila u uzorku vCE1E2-HCV-MRV2 p-MS su bile nesinonimne supstitucije (G3082A i C2153T) koje dovode do preuranjenih stop kodona nakon aminokiselina 176 u proteinu E1 (Trp177STOP) i 58 u proteinu C (Arg59STOP) u 4,70% i 21,89% očitanih sekvencija. Od te dvije supstitucije, promjena G3082A se nije zadržala u matičnoj seriji, dok se promjeni C2153T zastupljenost u matičnoj seriji smanjila za skoro polovinu (12,31% očitavanja). Dodatno, u uzorku matične serije sam detektirala još jednu nesinonimnu supstituciju, C2083A, koja dovodi do preuranjenog stop kodona nakon aminokiseline 34 u proteinu C (Tyr35STOP) u 27,09% očitanih sekvencija (prilog 2). Supstituciju T3975G (Leu283Arg) u proteinu E2, koju sam u uzorku vCE1E2-HCV-MRV2 MS detektirala na razini konsenzusa (slika 13), sam zabilježila već u uzorku pred-matične serije gdje je njen udio iznosio 15,35% (prilog 2).

Frekvencija heterogenih mjesta po genima je za sve proučavane uzorke prikazana u tablici 17. Vrijednosti frekvencije heterogenih mjesta u sekvencijama ATU matičnih serija virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 bile su slične ili identične vrijednostima zabilježenim u pred-matičnim serijama tih virusa. Dok sam u sekvencijama ATU uzoraka vCE1E2-HCV-MRV2 p-MS i vCE1E2-HCV-MRV2 MS zabilježila višu frekvenciju heterogenih mjesta u odnosu na gene virusa zaušnjaka, frekvencije heterogenih mjesta u sekvencijama ATU

uzoraka vE1E2TMD-HCV-MRV2 p-MS i vE1E2TMD-HCV-MRV2 MS su bile slične onima dobivenim za gene virusa zaušnjaka (tablica 17).

Za razliku od uzoraka vCE1E2-HCV-MRV2 MS i vE1E2TMD-HCV-MRV2 MS, vMRV3 MS nije imao promjena u ATU-u, a frekvencije heterogenih mjesta u genima virusa zaušnjaku u tom uzorku su većinom bile slične vrijednostima dobivenim za uzorke virusa s dodanim genima HCV-a (tablica 17). Uzorak vMRV2 MS je u gotovo svim genima imao nižu frekvenciju heterogenih mjesta u odnosu na matične serije triju kimernih virusa (tablica 17).

Tablica 17. Frekvencija heterogenih mjesta po genima u pred-matičnim i matičnim serijama kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C te matičnim serijama kontrolnih virusa.

Virus	Frekvencija heterogenih mjesta ($\times 10^{-3}$)								
	N	ATU1	ATU2	P	M	F	SH	HN	L
vCE1E2-HCV-MRV2 p-MS	0	2,06	N/P	0,76	0	0	0	0,53	0,72
vCE1E2-HCV-MRV2 MS	0,54	2,06	N/P	0,76	0	0	0	0,53	0,87
vE1E2TMD-HCV-MRV2 p-MS	0	0	0,74	0	0	0,58	0	0,53	0,72
vE1E2TMD-HCV-MRV2 MS	1,08	0	0,74	0	0	0,58	0	0,53	1,01
vMRV2 MS	0	N/P	N/P	0	0	0,58	0	0	0,14
vMRV3 MS	1,08	0	N/P	0	0,80	0	0	0,53	0,72

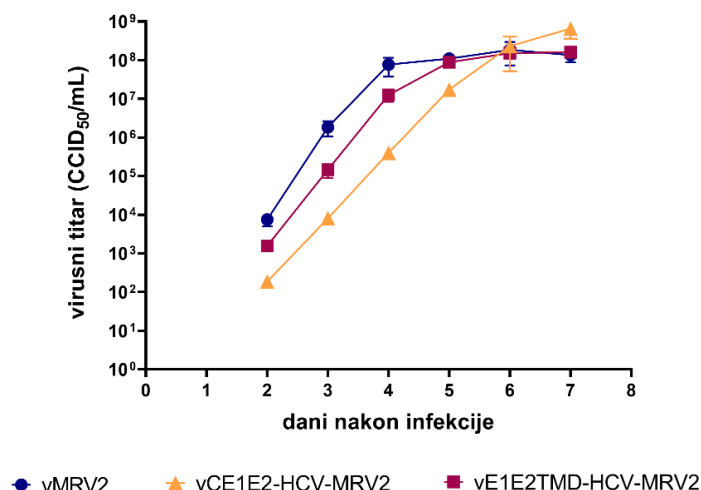
p-MS, pred-matična serija; MS, matična serija; ATU, dodatna transkripcijska jedinica; N/P, nije primjenjivo.

Zaključno, matične serije virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 su po svim proučavanim karakteristikama bile slične pred-matičnim serijama tih virusa. Dok su matične serije sva četiri analizirana virusa imale sličan broj konsenzusnih promjena, matične serije triju kimernih virusa su imale višu raznolikost virusnih populacija i veću frekvenciju heterogenih mjesta po genima virusa zaušnjaka u usporedbi s matičnom serijom virusa bez dodanih gena, vMRV2. Za razliku od ostala dva kimerna virusa, u ATU-u obje proučavane serije virusa vCE1E2-HCV-MRV2 sam zabilježila povećanu frekvenciju heterogenih mjesta te pojavu preuranjenih stop kodona u varijabilnom broju očitavanja.

4.2.3. Kinetika replikacije i morfološka karakterizacija citopatogenog efekta kimernih virusa

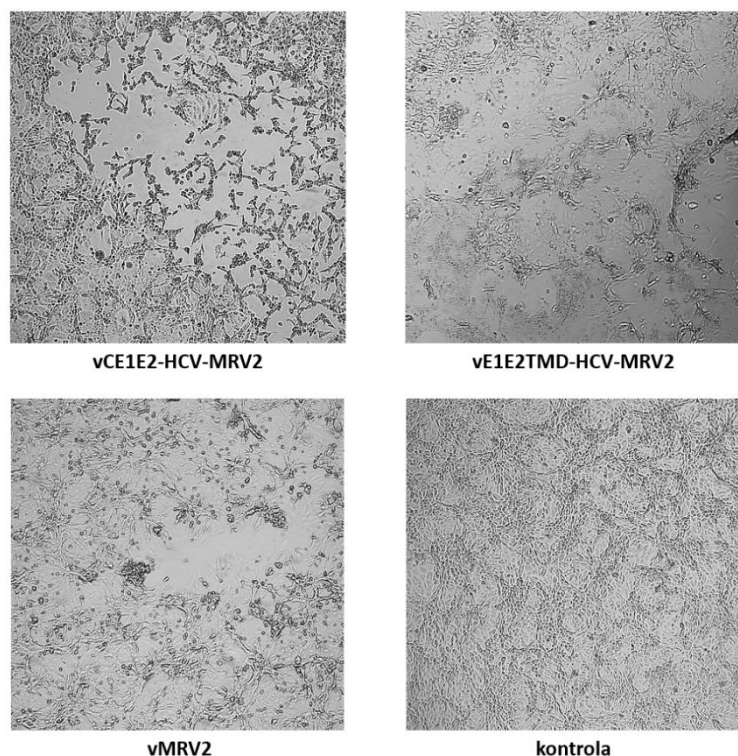
Kinetiku replikacije virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 sam uspoređivala s replikacijom kontrolnog virusa vMRV2. Stanice Vero sam inficirala s uzorcima matičnih serija virusa. Od drugog do sedmog dana infekcije sakupljala sam supernatant inficiranih staničnih kultura i u njima sam odredila virusni titar testom CCID₅₀ (slika 14).

Virusi vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 su u prvih pet dana infekcije na stanicama Vero imali sporiju replikaciju u odnosu na kontrolni virus vMRV2, ali su do kraja eksperimenta postigli jednak ili malo viši titar. Virus vMRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 su imali sličan uzorak replikacije, nakon eksponencijalnog porasta broja virusnih čestica ova dva virusa su dosegla stacionarnu fazu rasta 4., odnosno, 5. dana infekcije. Za razliku od njih, virus vCE1E2-HCV-MRV2 je imao linearan rast do 5. dana infekcije, nakon čega se porast virusnog titra usporio, ali virus nije dosegao stacionarnu fazu unutar proučavanog vremena (slika 14). U sedmom danu infekcije je došlo do snažne degeneracije staničnog sloja (nije prikazano), zbog čega nisam mogla analizirati replikaciju ovog virusa nakon isteka perioda od sedam dana.



Slika 14. Usporedba kinetike replikacije kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C (vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2) s kontrolnim virusom (vMRV2) na stanicama Vero pri multiplicitetu infekcije 10^{-3} . Podaci su za svaku skupinu prikazani u obliku srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija ($n = 3$ za vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2, $n = 6$ za vMRV2).

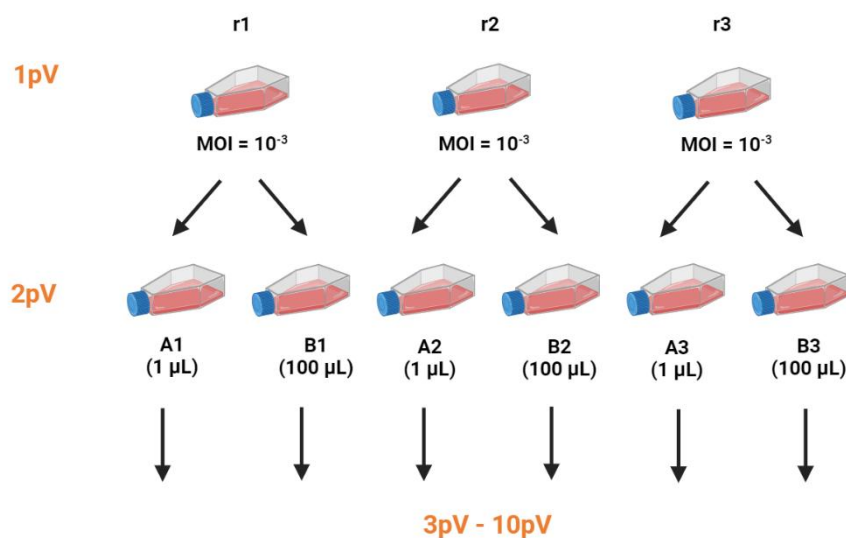
Tri rekombinantna virusa uzrokuju različite promjene u morfologiji inficiranih stanica (slika 15). Kontrolni virus vMRV2 na stanicama Vero inducira lako uočljiv CPE kojeg karakteriziraju fuzija citoplazmi i tvorba višejezgrenih sincicijskih stanica, pojava piknotičkih stanica raspršenih u staničnom sloju te liza i degeneracija staničnog sloja popraćene odvajanjem stanica u supernatant stanične kulture. U usporedbi s vMRV2, virus vCE1E2-HCV-MRV2 uzrokuje robusniji CPE, s izraženijom lizom i degeneracijom staničnog sloja. CPE kojeg inducira virus vE1E2TMD-HCV-MRV2 ima difuznu morfologiju i znatno je teže uočljiv od CPE-a uzrokovanog ostalim dvama virusima (slika 15).



Slika 15. Reprezentativni prikaz morfologije stanica Vero inficiranih kimernim virusima zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C i kontrolnim virusom.

4.3. Genska karakterizacija virusa uzastopno kultiviranih na stanicama Vero

Važan faktor o kojem treba voditi računa tijekom razvitka rekombinantnih virusa je genska stabilnost virusnih populacija jer promjene u strukturi kvazivirsa nastale za vrijeme kultiviranja mogu značajno utjecati na atenuacijski (Ivancic-Jelecki i sur., 2016) i imunosni profil (C. F. Yang i sur., 2013) cijepljenih kandidata. Kako bih istražila gensku stabilnost dizajniranih virusa, matične serije kimernih virusa sam uzastopno kultivirala kroz 10 pasaža u kontinuiranoj staničnoj liniji za proizvodnju cjepiva, Vero. Za pripremu prvog pasaža, stanice Vero sam inficirala u triplikatu uzorcima vCE1E2-HCV-MRV2 MS ili vE1E2TMD-HCV-MRV2 MS pri $\text{MOI } 10^{-3}$ (opisano u tablici 13). Od 2. do 10. pasaža održavala sam dvije linije uzastopnog kultiviranja, A i B, prenošenjem 1 μL virusnog supernatanta iz svakog prethodnog pasaža za liniju A te 100 μL virusnog supernatanta iz svakog prethodnog pasaža za liniju B (slika 16).



Slika 16. Shema uzastopnog kultiviranja kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C na stanicama Vero. MOI, multiplicitet infekcije; pV, pasaž na stanicama Vero; r, replika; A i B, linije uzastopnog kultiviranja održavane prenošenjem 1 i 100 µL virusnog supernatanta.

Viruse sam kultivirala u dvije linije kako dobivene rezultate ne bih temeljila na samo jednom setu podataka. Virusni titar u uzorcima 10. pasaža oba kimerna virusa nije se razlikovao s obzirom na liniju, što znači da su virusni uzorci podrijetlom od linija s različitim uvjetima kultiviranja imali sličnu učinkovitost replikacije (tablica 18).

Tablica 18. Virusni titar u uzorcima 10. pasaža uzastopnog kultiviranja kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C na stanicama Vero.

vCE1E2-HCV-MRV2		vE1E2TMD-HCV-MRV2	
Virusni uzorak	Titar virusa (log CCID ₅₀ /mL)	Virusni uzorak	Titar virusa (log CCID ₅₀ /mL)
10pV A1	8,09	10pV A1	8,69
10pV A2	7,55	10pV A2	8,98
10pV A3	7,85	10pV A3	7,43
10pV B1	7,27	10pV B1	8,39
10pV B2	7,03	10pV B2	7,91
10pV B3	7,33	10pV B3	8,27

10pV, 10. pasaž na stanicama Vero; A i B, linije uzastopnog kultiviranja održavane prenošenjem 1 i 100 μ L virusnog supernatanta; log CCID₅₀/mL, titar virusa određen testom određivanja 50%-tne infektivne doze virusa u kulturi stanica procjenom citopatogenog efekta.

Varijabilnost populacija virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 sam potom uspoređivala s varijabilnošću populacija kontrolnih virusa vMRV2 i vMRV3 koji su u ranijem pokusu unutar laboratorija prošli sličan kultivacijski protokol u trajanju od 10 pasaža (analizirano u radu od Slović i sur. (2021)). Gensku stabilnost sam analizirala metodom NGS u virusnim populacijama u supernatantima iz 5. i 10. pasaža (u nazivima uzoraka 5pV i 10pV, od 5. i 10. pasaža na stanicama Vero). Tijekom umnažanja virusnih genoma, u uzorcima 10. pasaža replika vCE1E2-HCV-MRV2 B1 i B3 te vE1E2TMD-HCV-MRV2 B1 sam uočila da su duljine umnoženih fragmenata koji su obuhvaćali insertirane sekvencije bile kraće od očekivanih. Sve tri replike iz linije kultiviranja B sam isključila iz ove analize, jer sam htjela doći do zaključaka o varijabilnosti populacija u uzorcima u kojima drugi evolucijski procesi nisu bili dominantni. To je ujedno bio razlog zašto u analizama genske stabilnosti nisam mogla uspoređivati varijabilnost populacija virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 podrijetlom od različitih linija. Sve tri isključene replike iz linije B sam u detalje razmotrila u poglavlju 4.3.3.

4.3.1. Genska stabilnost virusnih populacija tijekom uzastopnog kultiviranja

Tijekom obrade rezultata dobivenih metodom NGS nisam uočila pojavu insercija ni delecija na nivou konsenzusa virusnih populacija. Budući da se za insercije i delecije detektirane u malim postocima ne može sa sigurnošću utvrditi jesu li one podrijetlom s istog genoma (virusne varijante) niti jesu li genomi s takvim promjenama funkcionalni, u analizama genske stabilnosti virusnih populacija sam se koncentrirala samo na supstitucije.

4.3.1.1. Mjere raznolikosti virusnih populacija

Raznolikost virusnih populacija je u 5. i 10. pasažu sva četiri rekombinantna virusa bila viša u usporedbi s raznolikošću virusnih populacija u matičnim serijama ovih virusa (tablica 19). Populacije virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 iz 5. i 10. pasaža su imale sličnu razinu raznolikosti: između dvaju pasaža istog kimernog virusa nisam pronašla statistički značajne razlike u broju heterogenih mjesta (slika 17a) niti u π virusnih uzoraka (slika 17b). To znači da sam za oba kimerna virusa porast raznolikosti virusnih populacija zabilježila samo tijekom prvih pet pasaža (tablica 19). Virus bez dodanih gena, vMRV2, je u ovoj analizi imao najmanju raznolikost virusnih populacija, dok su raznolikosti populacija triju kimernih virusa bile slične. Sva četiri proučavana rekombinantna virusa su u prvih pet pasaža nakupila veći broj novih heterogenih mjesta u odnosu na kasnije pasaže (tablica 19).

Što se tiče strukture virusnih populacija, strukture populacija virusa vCE1E2-HCV-MRV2 iz 5. i 10. pasaža su bile slične, u smislu da sam u različitim replikama dvaju pasaža detektirala brojne zajedničke varijabilne pozicije, neovisno o linijama kultiviranja kojima su pripadale. Suprotno tome, različite varijabilne pozicije sam detektirala u populacijama virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 iz 5. i 10. pasaža, kako između dvaju linija s različitim uvjetima kultiviranja, tako i između replika unutar istih linija kultiviranja (prilog 3, poglavlje 4.3.2.2.).

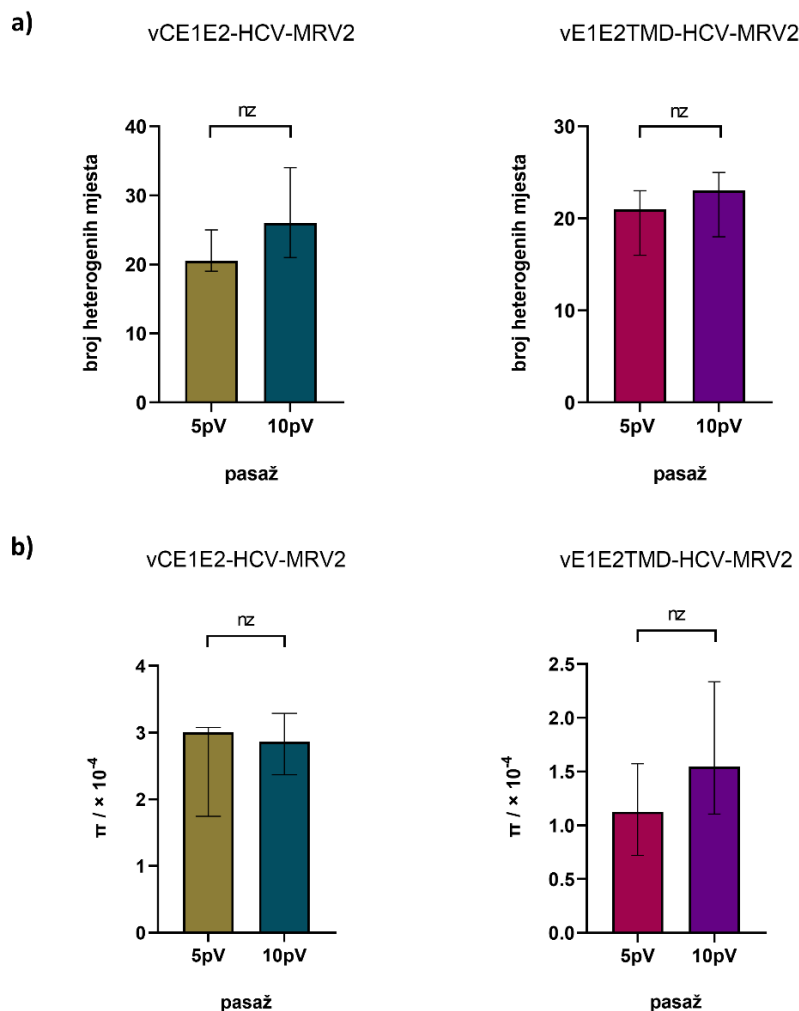
Zaključno, tijekom kultivacije na stanicama Vero sam kod sva četiri proučavana virusa uočila porast raznolikosti virusnih populacija. Virus bez dodanih gena, vMRV2, je imao manju raznolikost populacija od svih triju kimernih virusa s dodanim genima. Strukture populacija

kimernih virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 su se razlikovale s obzirom na broj zajedničkih varijabilnih pozicija detektiranih u tim virusima.

Tablica 19. Vrijednosti nukleotidne raznolikosti genoma (π) i broja heterogenih mjesta u genomima i dodatnim transkripcijskim jedinicama (ATU) kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C i kontrolnih virusa tijekom uzastopnog kultiviranja na stanicama Vero. Radi usporedbe su prikazani i podaci za matične serije (MS) virusa.

Virusni uzorak	Genom		ATU(i)		
	$\pi (\times 10^{-4})$	Broj heterogenih mjesta	Broj novih heterogenih mjesta*	Broj heterogenih mjesta	Broj novih heterogenih mjesta*
vCE1E2-HCV-MRV2					
MS	1,50	14	5	5	2
5pV A1	3,05	25	17	7	5
5pV A2	3,08	20	14	5	3
5pV A3	1,74	19	13	4	2
5pV B2	2,95	21	14	6	3
10pV A1	2,95	27	4	10	6
10pV A2	3,29	25	10	7	5
10pV A3	2,37	34	15	7	4
10pV B2	2,77	21	5	5	2
vE1E2TMD-HCV-MRV2					
MS	0,60	13	5	1	0
5pV A1	1,57	23	18	3	3
5pV A2	1,38	22	17	4	4
5pV A3	1,13	21	17	2	2
5pV B2	0,72	16	11	0	0
5pV B3	0,90	20	14	3	3
10pV A1	2,34	25	12	7	6
10pV A2	1,31	21	9	4	4
10pV A3	2,02	23	9	1	0
10pV B2	1,54	23	13	5	5
10pV B3	1,10	18	7	5	5
vMRV2					
MS	0,33	2	N/P	N/P	N/P
5pV	0,49	5	4	N/P	N/P
10pV	0,69	4	0	N/P	N/P
vMRV3					
MS	0,54	9	N/P	0	0
5pV	2,46	22	19	0	0
10pV	1,08	21	14	0	0

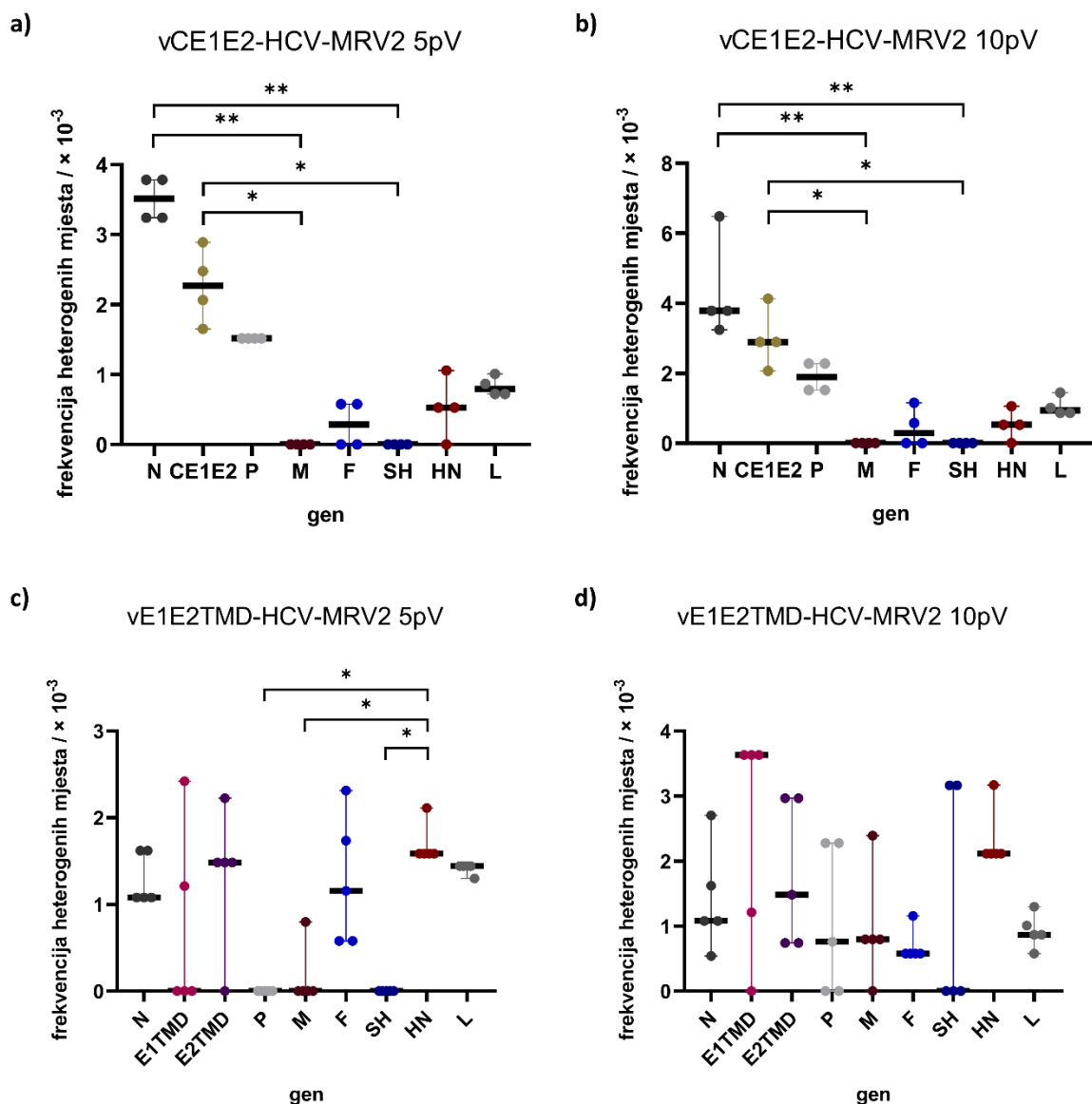
*Heterogena mjesta koja nisu detektirana kao varijabilna u prethodno analiziranom pasažu (za MS su podaci dobiveni u odnosu na pred-matičnu seriju čiji su rezultati prikazani u prilogu 2). pV, pasaž na stanicama Vero; A i B, linije uzastopnog kultiviranja održavane prenošenjem 1 i 100 μ L virusnog supernatanta; N/P, nije primjenjivo.



Slika 17. Mjere raznolikosti populacija kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C (vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2) iz 5. i 10. pasaža uzastopnog kultiviranja na stanicama Vero. Za određivanje raznolikosti populacija virusa korišteno je određivanje (a) broja heterogenih mjesta i (b) nukleotidne raznolikosti genoma (π) virusa iz istog pasaža. Podaci su za svaku skupinu prikazani u obliku medijana s 95%-tnim intervalom pouzdanosti ($n = 4$ za vCE1E2-HCV-MRV2, $n = 5$ za vE1E2TMD-HCV-MRV2). Statističke značajnosti među skupinama su određene testom Wilcoxon signed-rank. pV, pasaž na stanicama Vero; nz, razlika nije statistički značajna.

4.3.1.2. Frekvencija heterogenih mjesta po genima

Tijekom uzastopnog kultiviranja virusa vCE1E2-HCV-MRV2, u ATU-u sam zabilježila veću frekvenciju heterogenih mjesta u odnosu na sve gene virusa zaušnjaka, izuzev gena N. Za ATU i gen N sam u oba pasaža ovog virusa detektirala statistički značajne razlike u frekvenciji heterogenih mjesta u odnosu na gene M i SH (u tim genima nisam zabilježila nikakve promjene) (slika 18a-b). Tijekom uzastopnog kultiviranja virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2, ni u 5. ni u 10. pasažu nisam detektirala statistički značajne razlike u frekvenciji heterogenih mjesta dviju sekvencija ATU u usporedbi s ostatkom genoma (slika 18c-d). Za razliku od ova dva kimerna virusa, kimerni virus s ugrađenim genom za EGFP, vMRV3, nije imao niti jednu promjenu zabilježenu u ATU-u. U oba pasaža virusa vMRV3 sam u genima N, P i HN zabilježila veću frekvenciju heterogenih mjesta u odnosu na ostale gene (tablica 20). Virus bez dodanih gena, vMRV2, je u oba pasaža pokazao nižu ili jednaku frekvenciju heterogenih mjesta u odnosu na tri kimerna virusa za sve gene, osim za gen P. Heterogena mjesta u tom virusu sam detektirala samo u genima N, P, HN i L, a njihove frekvencije su bile slične (tablica 20). Ovi rezultati pokazuju da su četiri rekombinantna virusa na stanicama Vero imala različitu distribuciju heterogenih mjesta po genima.



Slika 18. Frekvencija heterogenih mjesta po genima u (a) 5. i (b) 10. pasažu uzastopnog kultiviranja virusa vCE1E2-HCV-MRV2 te (c) 5. i (d) 10. pasažu uzastopnog kultiviranja virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 na stanicama Vero. Podaci su za svaku skupinu prikazani u obliku pojedinačnih vrijednosti te medijana s 95%-tnim intervalom pouzdanosti ($n = 4$ za vCE1E2-HCV-MRV2, $n = 5$ za vE1E2TMD-HCV-MRV2). Statističke značajnosti među skupinama su određene testom Kruskal Wallis One-Way ANOVA uz post-hoc test Dunn. pV, pasaž na stanicama Vero; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Tablica 20. Usporedba medijana frekvencije heterogenih mjesta po genima u 5. i 10. pasažu uzastopnog kultiviranja kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C (vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2) s frekvencijama heterogenih mjesta po genima u 5. i 10. pasažu uzastopnog kultiviranja kontrolnih virusa na stanicama Vero. Medijani su za svaku skupinu određeni analizom rezultata dobivenih za 4 replike virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i 5 replika virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2.

Virusni uzorak	Medijan frekvencije ili frekvencija heterogenih mjesta ($\times 10^{-3}$)								
	N	ATU1	ATU2	P	M	F	SH	HN	L
vCE1E2-HCV-MRV2 5pV	3,51	2,27	N/P	1,52	0	0,29	0	0,53	0,79
vCE1E2-HCV-MRV2 10pV	3,78	2,89	N/P	1,90	0	0,29	0	0,53	0,94
vE1E2TMD-HCV-MRV2 5pV	1,08	0	1,48	0	0	1,16	0	1,59	1,44
vE1E2TMD-HCV-MRV2 10pV	1,08	3,63	1,48	0,76	0,80	0,58	0	2,11	0,87
vMRV2 5pV	0,54	N/P	N/P	0,76	0	0	0	0,53	0,29
vMRV2 10pV	0,54	N/P	N/P	0	0	0	0	0,53	0,29
vMRV3 5pV	2,70	0	N/P	3,79	0	1,16	0	2,64	0,72
vMRV3 10pV	2,70	0	N/P	1,52	0	0,58	0	4,23	0,72

pV, pasaž na stanicama Vero; ATU, dodatna transkripcijska jedinica; N/P, nije primjenjivo.

4.3.1.3. Konsenzusne promjene

Što se tiče promjena na razini konsenzusa, kimerni virusi vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 su generalno imali veći broj konsenzusnih promjena u odnosu na virus bez dodanih gena, vMRV2, ali manji u odnosu na kimerni virus vMRV3 (slika 19). Jedina promjena konsenzusa zajednička svim virusima je bila supstitucija koja dovodi do aminokiselinske promjene Pro408Leu u proteinu L. Zastupljenost ove supstitucije je u 5. i 10. pasažu svih virusa porasla u odnosu na postotak detektiran u matičnim serijama, osim kod virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2, gdje je njena zastupljenost već u matičnoj seriji bila 100% (prilozi 2 i 3).

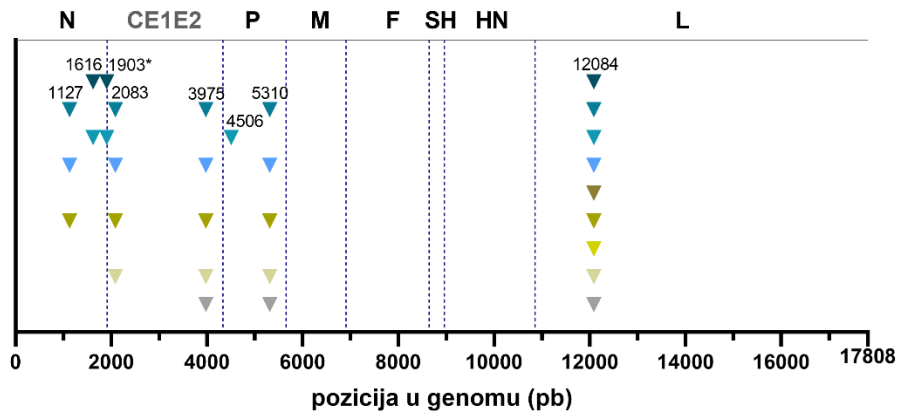
Sve konsenzusne promjene virusa vCE1E2-HCV-MRV2, osim supstitucije koja dovodi do aminokiselinske promjene Pro408Leu u proteinu L, detektirala sam u prvoj trećini genoma, u genu N, ATU-u i genu P (slika 19a). To je koreliralo s činjenicom da su gen N i ATU imali veću frekvenciju heterogenih mjesta u usporedbi s ostalim genima (slika 18a-b). Većinu konsenzusnih promjena kontrolnog virusa vMRV3 sam detektirala u genu N, iako taj gen nije bio najvarijabilniji

gen u genomu (slika 19d, tablica 20). Promjene u konsenzus sekvencijama virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 sam pronašla u nekoliko gena (N, F, SH, HN i L), a većinu njih sam zabilježila u jednom ili dva uzorka (slika 19b). One promjene konsenzusa koje sam zabilježila u uzorku vE1E2TMD-HCV-MRV2 MS sam detektirala i u konsenzusima svih uzoraka tog virusa tijekom uzastopnog kultiviranja, dok je kod uzorka vCE1E2-HCV-MRV2 MS to vrijedilo samo za supstituciju koja dovodi do aminokiselinske promjene Pro408Leu u proteinu L. Od svih promjena konsenzusa koje sam detektirala tijekom uzastopnog kultiviranja kontrolnog virusa vMRV3, samo sam supstituciju koja dovodi do aminokiselinske promjene Pro408Leu zabilježila i u konsenzusu uzorka vMRV3 MS (slika 19, poglavlje 4.2.2.).

Konsenzus sekvencija kontrolnog virusa vMRV3 se ustalila do 5. pasaža, dok su se konsenzus sekvencije istih replika 5. i 10. pasaža virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 razlikovale. Međutim, sve supstitucije koje su dosegle konsenzus u 5. pasažu tih dvaju virusa su zadržane u konsenzusima 10. pasaža (21 supstitucija) (slika 19). Od preostalih 14 supstitucija koje su dosegle konsenzus u 10. pasažu, njih 12 je već bilo prisutno u replikama 5. pasaža, dok su samo one koje su zabilježene u uzorcima virusa vCE1E2-HCV-MRV2 bile prisutne u relativno visokim postocima (slika 20).

Ovi rezultati pokazuju da su se tijekom uzastopnog kultiviranja broj promjena konsenzusa i njihova distribucija po genima razlikovali kod svakog od četiri proučavana virusa. Supstitucija koja dovodi do aminokiselinske promjene Pro408Leu u proteinu L je jedina koja je bila zajednička svim virusima te sam ju u visokim postocima detektirala u svim uzorcima. Za razliku od kontrolnog virusa vMRV3, virusi vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 su od 5. do 10. pasaža nakupili konsenzusne promjene koje prethodno nisu bile prisutne u 5. pasažu.

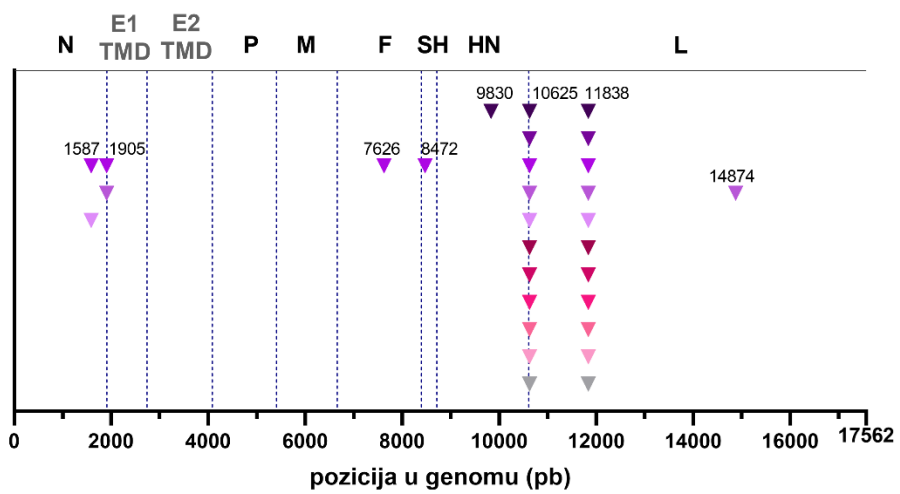
a) vCE1E2-HCV-MRV2



konsenzus

- ▼ 10pV B2
- ▼ 10pV A3
- ▼ 10pV A2
- ▼ 10pV A1
- ▼ 5pV B2
- ▼ 5pV A3
- ▼ 5pV A2
- ▼ 5pV A1
- ▼ MS

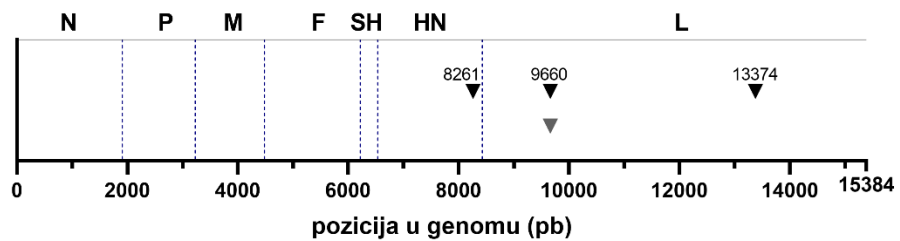
b) vE1E2TMD-HCV-MRV2



konsenzus

- ▼ 10pV B3
- ▼ 10pV B2
- ▼ 10pV A3
- ▼ 10pV A2
- ▼ 10pV A1
- ▼ 5pV B3
- ▼ 5pV B2
- ▼ 5pV A3
- ▼ 5pV A2
- ▼ 5pV A1
- ▼ MS

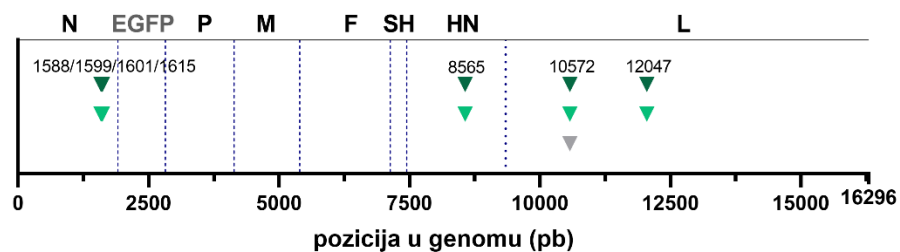
c) vMRV2



konsenzus

- ▼ 10pV
- ▼ 5pV

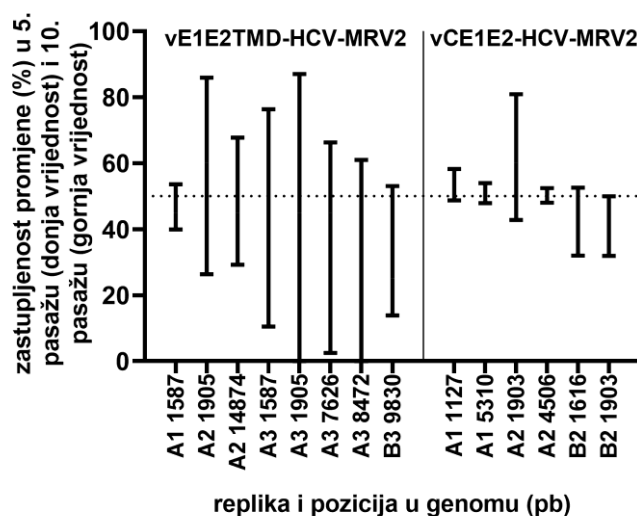
d) vMRV3



konsenzus

- ▼ 10pV
- ▼ 5pV
- ▼ MS

Slika 19. Pozicije konsenzusnih promjena (određenih u odnosu na sekvencije odgovarajućih rekombinantnih plazmida iz kojih su virusi proizvedeni) u 5. i 10. pasažu uzastopnog kultiviranja virusa: (a) vCE1E2-HCV-MRV2, (b) vE1E2TMD-HCV-MRV2, (c) vMRV2 i (d) vMRV3 na stanicama Vero. Radi usporedbe su prikazani i podaci za matične serije (MS) virusa (vMRV2 MS nema konsenzusnih promjena). Virusni geni su označeni iznad odgovarajuće regije u genomu (dodatne transkripcijske jedinice su označene sivom bojom). Pozicije konsenzusnih promjena u odnosu na duljinu virusnog genoma su naznačene iznad svake oznake. Supstitucija koja dovodi do aminokiselinske promjene Pro408Leu u proteinu L zajednička je svim virusima, a odgovara nukleotidnim pozicijama: 12084 za vCE1E2-HCV-MRV2, 11838 za vE1E2TMD-HCV-MRV2, 9660 za vMRV2 i 10572 za vMRV3. pV, pasaž na stanicama Vero; A i B, linije uzastopnog kultiviranja održavane prenošenjem 1 i 100 μ L virusnog supernatanta; pb, parova baza.



Slika 20. Pozicije i zastupljenost 14 promjena koje su dosegle razinu konsenzusa u 10. pasažu, ali ne i u 5. pasažu uzastopnog kultiviranja pojedinih replika kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C na stanicama Vero. Točkasta linija označava frekvenciju promjena od 50% (razina konsenzusa). Promjene konsenzusa određene su u odnosu na sekvencije odgovarajućih rekombinantnih plazmida iz kojih su virusi proizvedeni. A i B, linije uzastopnog kultiviranja održavane prenošenjem 1 i 100 μ L virusnog supernatanta; pb, parova baza.

4.3.1.4. Heterogena mjesta u dodatnim transkripcijskim jedinicama

Virus vCE1E2-HCV-MRV2 je tijekom uzastopnog kultiviranja imao veći broj heterogenih mjesta u insertiranim sekvencijama od virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 (tablica 19), iako se duljina njihovih inserata nije značajno razlikovala (2424 nukleotida za vCE1E2-HCV-MRV2 i 2178 nukleotida za vE1E2TMD-HCV-MRV2). Većina promjena koje sam detektirala u insertiranim sekvencijama ovih dvaju kimernih virusa se tijekom uzastopnog kultiviranja pojavila samo u pojedinim uzorcima, izuzev dvije promjene koje sam zabilježila u svim uzorcima virusa vCE1E2-HCV-MRV2, o čemu će više biti riječ u poglavlju 4.3.2.2. Za razliku od ta dva kimerna virusa, u ATU-u kontrolnog virusa vMRV3 nisam zabilježila nikakve promjene (tablica 19).

Ono što sam uočila u sekvencijama ATU virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 je pojava nesinonimnih supstitucija koje dovode do preuranjenih stop kodona (tablica 21). Takav tip promjena nisam zabilježila u ostalim genima virusa vCE1E2-HCV-MRV2, dok sam ih kod virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 našla u genu L: jedan preuranjeni stop kodon u niskom postotku sam detektirala u matičnoj seriji virusa, kao i u jednom uzorku 5. pasaža iz linije kultiviranja B (vE1E2TMD-HCV-MRV2 5pV B2) (prilozi 2 i 3). Preuranjene stop kodone sam kod virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 našla samo u ATU-u E1TMD; ukupno pet supstitucija te vrste sam detektirala u četiri virusna uzorka (tablica 21). Za razliku od toga, u svakom uzorku virusa vCE1E2-HCV-MRV2 sam detektirala minimalno jedan preuranjeni stop kodon, a većinu sam ih zabilježila u genu C (osim tog gena, zabilježila sam ih i u genu E1, u 5. i 10. pasažu jedne replike iz linije kultiviranja A) (tablica 21). Supstituciju koja dovodi do preuranjenog stop kodona nakon aminokiseline 34 u proteinu C, C2083A, sam detektirala u svim uzorcima ovog virusa. Ova promjena se pojavljuje već u uzorku vCE1E2-HCV-MRV2 MS u 27,09% očitavanja (poglavljje 4.2.2.), a tijekom uzastopnog kultiviranja je bila prisutna u približno istom postotku u 5. i 10. pasažu svake pojedinačne replike (od 20,49% do 86,25%) (tablica 21). Supstitucije koje bi dovele do preuranjenih stop kodona nisam zabilježila u ATU-u kimernog virusa vMRV3, niti u bilo kojem genu virusa zaušnjaka u virusu vMRV3 ili u virusu bez dodanih gena, vMRV2 (prilog 3).

Zaključno, tijekom uzastopne kultivacije sam u insertu virusa vCE1E2-HCV-MRV2 detektirala više heterogenih mjesta i veći sveukupni broj preuranjenih stop kodona u odnosu na insert virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2. Supstitucija Tyr35STOP, koju sam uočila već u matičnoj

seriji virusa, se zadržala u svim uzorcima virusa vCE1E2-HCV-MRV2. Treći proučavani kimerni virus, vMRV3, nije imao promjena u insertiranim sekvencijama.

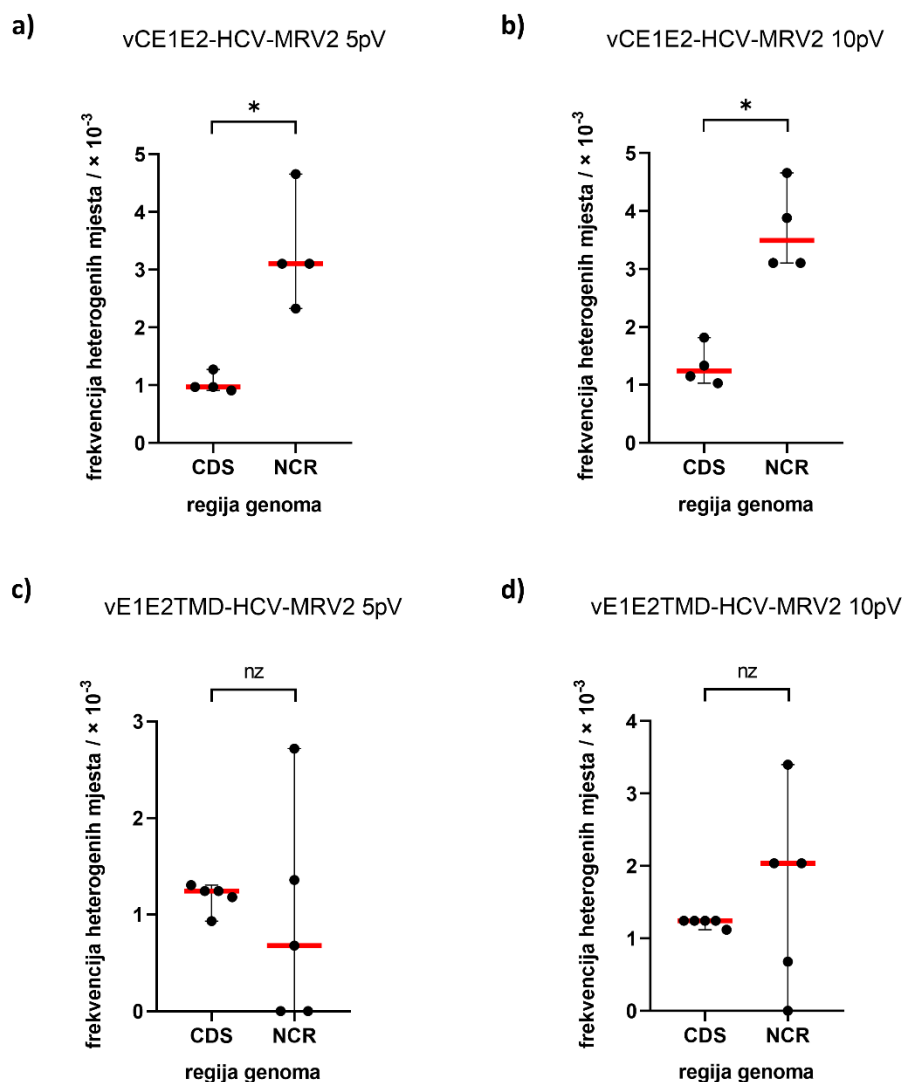
Tablica 21. Supstitucije koje dovode do preuranjenih stop kodona u dodatnim transkripcijskim jedinicama (ATU) kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C (vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2) iz 5. i 10. pasaža uzastopnog kultiviranja na stanicama Vero. Podebljano su označene promjene detektirane na razini konsenzusa. Supstitucije nađene u kodirajućoj regiji ATU-a virusa vCE1E2-HCV-MRV2 su podijeljene na zasebne gene virusa hepatitisa C, C, E1 ili E2.

Virusni uzorak	Gen	Nukleotidna promjena*	Aminokiselina promijenjena u stop	Zastupljenost promjene (%)
vCE1E2-HCV-MRV2				
5pV A1	C	A2003T	Arg9	4,96
	C	C2083A	Tyr35	60,39
5pV A2	C	C2083A	Tyr35	20,49
5pV A3	C	C2083A	Tyr35	86,25
5pV B2	E1	G2694A	Trp48	12,26
	C	C2083A	Tyr35	38,66
	C	C2153T	Arg59	2,97
10pV A1	C	A2003T	Arg9	2,70
	C	C2083A	Tyr35	62,03
10pV A2	C	C2083A	Tyr35	33,05
10pV A3	C	C2083A	Tyr35	84,84
10pV B2	E1	G2694A	Trp48	38,18
	C	C2083A	Tyr35	29,86
vE1E2TMD-HCV-MRV2				
5pV A2	E1TMD	G2124A	Trp49	3,66
10pV A1	E1TMD	G2125A	Trp49	2,93
	E1TMD	C2183T	Arg69	2,17
10pV A2	E1TMD	G2051T	Glu25	2,21
10pV B2	E1TMD	G2124A	Trp49	4,58

*Prva oznaka odgovara plazmidnoj sekvenciji, druga oznaka odgovara virusnoj sekvenciji. pV, pasaż na stanicama Vero; A i B, linije uzastopnog kultiviranja održavane prenošenjem 1 i 100 µL virusnog supernatanta.

4.3.1.5. Distribucija heterogenih mjesta u kodirajućim i nekodirajućim regijama

Još jedan čimbenik kojeg sam proučavala tijekom uzastopne kultivacije rekombinantnih virusa bila je distribucija heterogenih mjesta u regijama CDS, odnosno regijama NCR. Uzorci iz 5. i 10. pasaža kimernog virusa vCE1E2-HCV-MRV2 su imali statistički značajno veću frekvenciju heterogenih mjesta u regijama NCR nego u regijama CDS, što nisam zabilježila u uzorcima kimernog virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 (slika 21). Vrijednosti frekvencije heterogenih mjesta u regijama NCR trećeg kimernog virusa, vMRV3, su također bile slične vrijednostima frekvencije u regijama CDS tog virusa (tablica 22). Za razliku od sva tri kimerna virusa, tijekom uzastopnog kultiviranja virusa vMRV2 nisam zabilježila niti jednu promjenu u regijama NCR (tablica 22).



Slika 21. Frekvencija heterogenih mjesta u kodirajućim (CDS) i nekodirajućim regijama (NCR) u (a) 5. i (b) 10. pasažu uzastopnog kultiviranja virusa vCE1E2-HCV-MRV2 te (c) 5. i (d) 10. pasažu uzastopnog kultiviranja virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 na stanicama Vero. Podaci su za svaku skupinu prikazani u obliku pojedinačnih vrijednosti te medijana s 95%-tnim intervalom pouzdanosti ($n = 4$ za vCE1E2-HCV-MRV2, $n = 5$ za vE1E2TMD-HCV-MRV2). Statističke značajnosti među skupinama su određene testom Mann-Whitney U. pV, pasaż na stanicama Vero; nz, razlika nije statistički značajna; *, $p < 0,05$.

Tablica 22. Usporedba medijana frekvencije heterogenih mjesta u kodirajućim (CDS) i nekodirajućim regijama (NCR) u 5. i 10. pasažu uzastopnog kultiviranja kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C (vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2) s frekvencijama heterogenih mjesta u regijama CDS i NCR u 5. i 10. pasažu uzastopnog kultiviranja kontrolnih virusa na stanicama Vero. Medijani su za svaku skupinu određeni analizom rezultata dobivenih za 4 replike virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i 5 replika virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2.

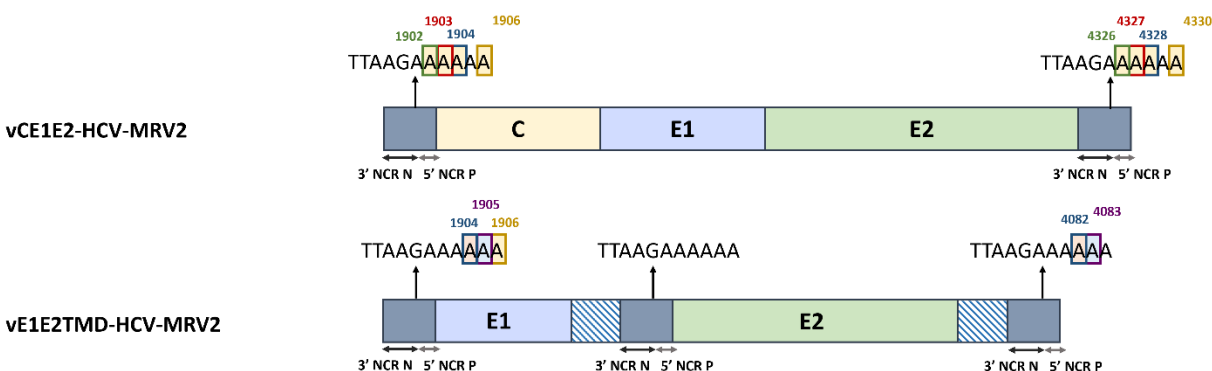
Virusni uzorak	Medijan frekvencije ili frekvencija heterogenih mjesta u regijama	Medijan frekvencije ili frekvencija heterogenih mjesta u regijama
	CDS ($\times 10^{-3}$)	NCR ($\times 10^{-3}$)
vCE1E2-HCV-MRV2 5pV	0,97	3,10
vCE1E2-HCV-MRV2 10pV	1,24	3,49
vE1E2TMD-HCV-MRV2 5pV	1,24	0,68
vE1E2TMD-HCV-MRV2 10pV	1,24	2,04
vMRV2 5pV	0,35	0
vMRV2 10pV	0,28	0
vMRV3 5pV	1,33	1,54
vMRV3 10pV	1,27	1,54

pV, pasaż na stanicama Vero.

Većina promjena koje sam detektirala u regijama NCR virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 bila je u genu N i sekvencijama ATU, dok takav trend nisam uočila za kontrolni virus vMRV3 (prilog 3). Gen N i sve sekvencije ATU u trima kimernim virusima sadrže 3' NCR gena N, gdje sam u sekvenciji poli(A) regije signala GE detektirala nekoliko ponavljajućih varijabilnih pozicija tijekom kultiviranja. Ovaj signal GE je kod virusa zaušnjaka dug 11 nukleotida (Kolakofsky i sur., 1998) te se u genomima virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vMRV3 ponavlja dva, a u genomu virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 tri puta. Ponavljajuće varijabilne pozicije detektirala sam u 3' NCR-u gena N virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 (regija 1902-1906), kao i na njihovim odgovarajućim mjestima u 3' NCR-u ATU-a virusa vCE1E2-HCV-MRV2 (regija 4326-4330) te u 3' NCR-u ATU-a E2TMD virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 (regija 4080-4084) (slika 22). Ove varijabilne pozicije detektirane su s različitom zastupljenošću u uzorcima 5. i 10. pasaža dvaju virusa, dok su u nekim uzorcima čak dosegle

razinu konsenzusa. Za razliku od ta dva kimerna virusa, varijabilne pozicije u sekvenciji poli(A) regije signala GE 3' NCR-a gena N nisam detektirala kod kontrolnog virusa vMRV3 (prilog 3).

Ovi rezultati pokazuju da se distribucija heterogenih mjesta u regijama CDS, odnosno regijama NCR, kod virusa vCE1E2-HCV-MRV2 razlikovala od distribucije kod ostalih dvaju kimernih virusa. S druge strane, oba kimerna virusa dobivena u ovom radu su, za razliku od kimernog virusa vMRV3, imala povećan broj promjena u regijama NCR gena N i sekvencija ATU te ponavljajuće varijabilne pozicije u sekvenciji poli(A) regije signala GE 3' NCR-a gena N na odgovarajućim mjestima u genomu. Za razliku od kimernih virusa, virus bez dodanih gena, vMRV2, nije imao promjena u regijama NCR.



Slika 22. Shematski prikaz ponavljajućih varijabilnih pozicija detektiranih u sekvenciji poli(A) regije signala za završetak transkripcije (GE) 3' nekodirajuće regije (NCR) gena N u kimernim virusima zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C tijekom uzastopnog kultiviranja na stanicama Vero. Ponavljajuće varijabilne pozicije su, ovisno o svojem položaju u poli(A) regiji, prikazane različitom bojom. Geni C, E1 i E2 virusa hepatitisa C (HCV) su označeni svijetložutom, svijetloplavom i svijetlozelenom bojom. Transmembranska i citoplazmatska domena (TMD/CD) proteina F virusa zaušnjaka koje su dodane na ektodomene proteina E1 i E2 HCV-a u virusu vE1E2TMD-HCV-MRV2 su označene prugasto plavo, a 3' NCR gena N i 5' NCR gena P koji se ponavljaju u genomima su označeni sivom bojom.

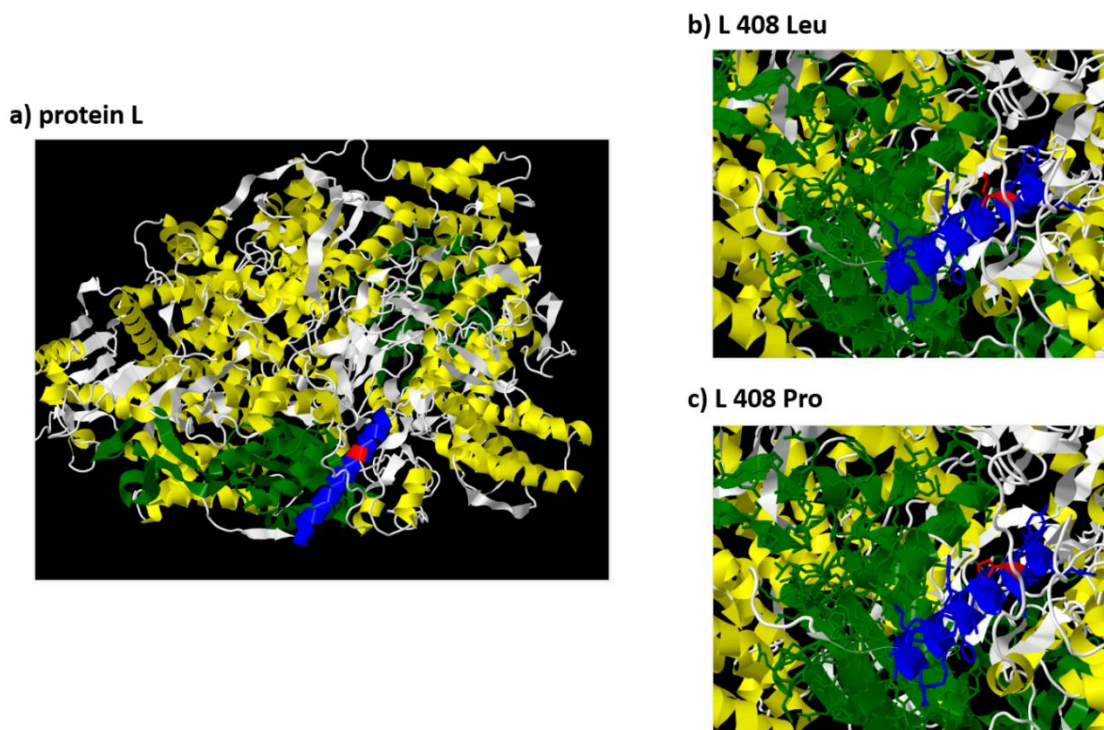
4.3.2. Selekcija zajedničkih varijabilnih pozicija

Tijekom infekcije stanica, virusi se adaptiraju novim okolišnim uvjetima kroz selekciju varijanti određenih genskih karakteristika koje će, same po sebi, u kombinaciji, ili sveukupno, dati virusnu populaciju s najvećim prosječnim fitnessom. Kako bih analizirala tijek selekcije u populacijama virusa ispitivanim u zadanim uvjetima, analizirala sam jesu li su se tijekom njihove kultivacije pojavile zajedničke varijabilne pozicije.

4.3.2.1. Supstitucija Pro408Leu u proteinu L

Supstituciju koja dovodi do aminokiselinske promjene Pro408Leu u proteinu L sam detektirala u konsenzus sekvencijama svih analiziranih virusnih uzoraka. To je bila jedina supstitucija koja se pozitivno selektirala tijekom kultivacije sva četiri rekombinantna virusa (prilog 3). Riječ je o reverziji promjene T9660C (pozicija u genomu virusa zaušnjaka) koja je nastala slučajno prilikom kloniranja plazmida pMRV2. Ovaj plazmid je korišten kao ishodišni materijal za pripremu plazmidne DNA za sve rekombinantne viruse. Reverzija citozina u timidin, nukleotid prisutan u konsenzus sekvenciji cijepnog soja L-Zagreb, je detektirana u rasponu od 35,66% do 100% očitavanja u matičnim serijama svih virusa, da bi do kraja kultivacijskog perioda dosegla maksimalni postotak u svim proučavanim replikama (prilozi 2 i 3). Detaljnijom analizom ove pozicije alatom BLAST sam pokazala da je aminokiselina leucin na poziciji 408 konzervirana u sva 381 javno dostupna unosa proteina L virusa zaušnjaka u bazi NCBI koji pokrivaju ovu regiju proteina.

Strukturnu analizu ove pozicije napravila sam pomoću servera za modeliranje po homologiji *SWISS-MODEL* (slika 23). Model proteina L koji sadrži originalnu aminokiselinu leucin na poziciji 408 bazirala sam na strukturi kompleksa L-P virusa PIV5 (pristupni broj u bazi *SWISS-MODEL Template Library* (SMTL) 6v85.1.A) (Abdella i sur., 2020). Aminokiseline 5-2232 proteina L (98% sekvencije proteina) sam modelirala s prosječnom pouzdanošću modela (QMEANDisCo) od $0,66 \pm 0,05$ (lokalna pouzdanost za poziciju 408 je iznosila 0,84 za leucin i 0,78 za prolin). Model je pokazao da je aminokiselina 408 u proteinu L smještena u sredini α -heliksa koji se nalazi blizu domene RdRp; poziciju ove domene sam mapirala s obzirom na sekvenciju proteina L virusa zaušnjaka soja Miyahara (pristupni broj u bazi *UniProt* P30929).



Slika 23. Strukturna analiza supstitucije Pro408Leu u proteinu L virusa zaušnjaka: (a) model proteina L s originalnom aminokiselinom leucin na poziciji 408 te detaljni prikaz α -heliksa u modelu proteina L koji na poziciji 408 sadrži (b) leucin i (c) prolin. Modeli su napravljeni pomoću servera *SWISS-MODEL* i vizualizirani pomoću softvera *Geneious Prime*® 2019.2.3. Svi α -heliksi proteina su prikazani žutom bojom, osim α -heliksa koji obuhvaća aminokiseline 394-416, on je prikazan plavom bojom. Crvenom bojom je prikazana aminokiselina 408. Zelenom bojom su označene dvije katalitičke regije proteina L, RNA-ovisna RNA polimeraza i 2'-O-metiltransferaza.

4.3.2.2. Zajedničke promjene u genomima kimernih virusa

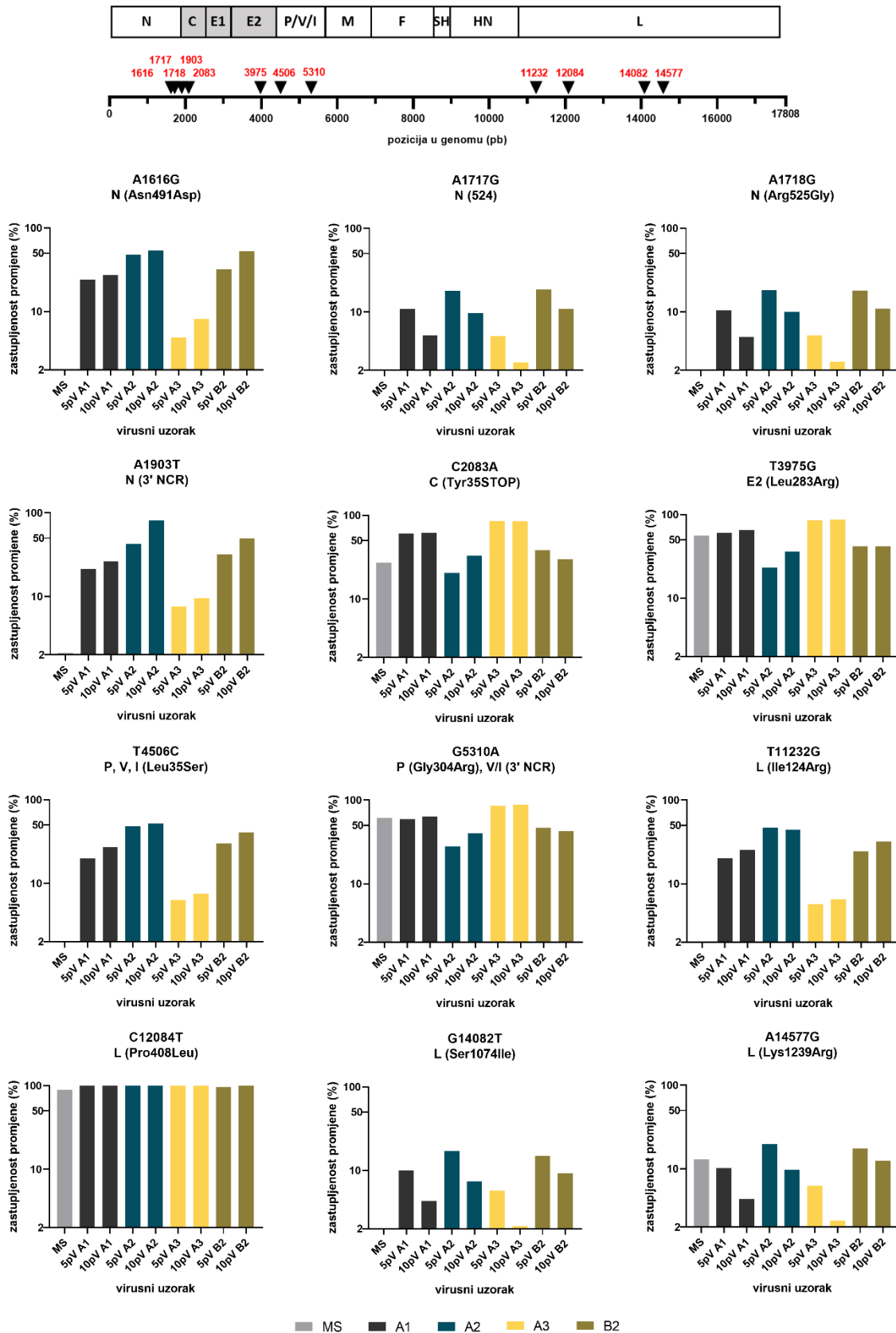
Tijekom kultivacije virusa vCE1E2-HCV-MRV2, uočila sam ukupno 12 zajedničkih varijabilnih pozicija, od kojih je većina bila u obliku nesinonimnih supstitucija. Čak polovina supstitucija je bila prisutna već u uzorku matične serije ovog virusa (slika 24).

Od ukupno 12 zajedničkih varijabilnih pozicija u virusu vCE1E2-HCV-MRV2, samo je supstitucija Pro408Leu u proteinu L (opisana u poglavlju 4.3.2.1.) bila pozitivno selektirana. Ostale supstitucije nisu pokazale isti trend povećanja zastupljenosti tijekom uzastopne kultivacije.

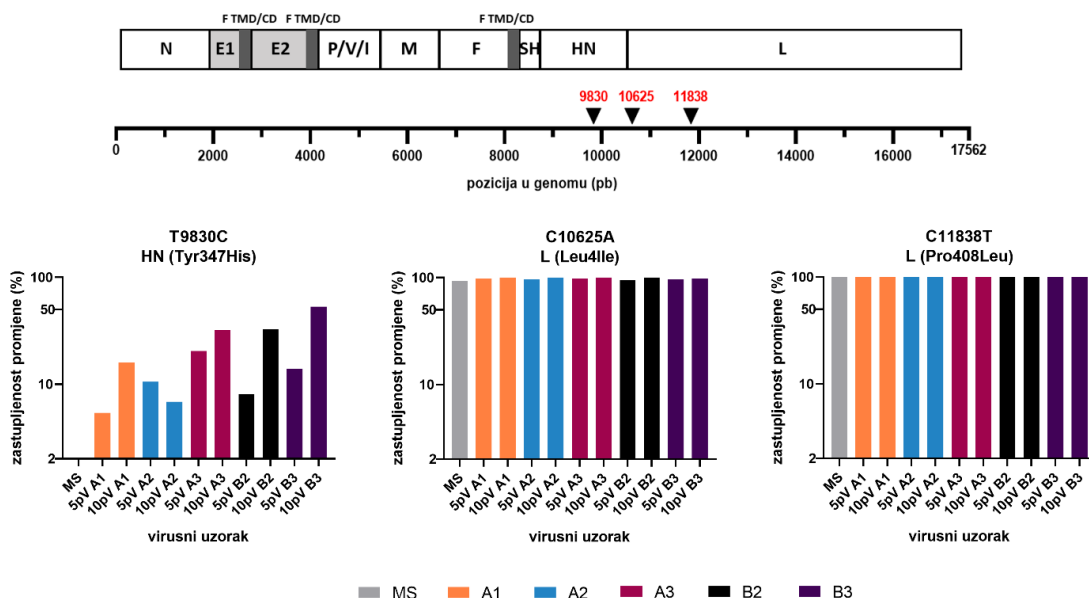
Većinu zajedničkih promjena ovog virusa detektirala sam u prvoj trećini genoma, u genu N, ATU-u i genu P (slika 24). Dvije zajedničke varijabilne pozicije sam pronašla u ATU-u: C2083A (dovodi do preuranjenog stop kodona nakon aminokiseline 34 u proteinu C; opisana u poglavlju 4.3.1.4.) i T3975G (dovodi do aminokiselinske promjene Leu283Arg u proteinu E2). Supstituciju T3975G sam detektirala još u uzorku vCE1E2-HCV-MRV2 MS u 55,85% očitavanja, a tijekom uzastopnog kultiviranja je bila prisutna u približno istom postotku u 5. i 10. pasažu svake pojedinačne replike (slika 24). Analizom alatom BLAST sam otkrila da se aminokiselina leucin na poziciji 283 nalazi u svih 684 javno dostupnih unosa proteina E2 HCV-a, genotipa 1b u bazi NCBI koji uz zadane parametre pokrivaju ovu regiju proteina, osim u jednoj sekvenciji objavljenoj od strane Humphreys i sur. (2009). Dodatno, strukturni položaj aminokiseline 283 koji sam odredila na temelju strukture heterodimera E1-E2 u kompleksu s tri antitijela bnAbs (pristupni broj u bazi SMTL 7t6x.1) (Torrents de la Peña i sur., 2022) pomoću servera *SWISS-MODEL* je pokazao da se ova aminokiselina nalazi u području β -ploče smještene u regiji baze proteina E2.

Tri zajedničke varijabilne pozicije, sve nesinonimne, sam pronašla kod virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2. Supstitucija T9830C je jedina od njih tri koju nisam detektirala u uzorku matične serije ovog virusa (slika 25).

Osim promjene Pro408Leu, još jedna supstitucija u proteinu L se pozitivno selektirala tijekom kultiviranja virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 – supstitucija C10625A, koja dovodi do aminokiselinske promjene Leu4Ile (slika 25). Ova promjena se pojavila već u uzorku matične serije virusa gdje sam ju detektirala u 92,50% očitavanja, a tijekom uzastopnog kultiviranja sam ju zabilježila u svim uzorcima ovog virusa sa zastupljenošću većom od 94% (prilozi 2 i 3). Usporedbom sa svih 382 javno dostupna unosa proteina L virusa zaušnjaka u bazi NCBI koji pokrivaju ovu regiju proteina sam ustanovila da se aminokiselina leucin na poziciji 4 nalazi u svim, osim u jednoj sekvenciji objavljenoj od strane Bryant i sur. (2022).



Slika 24. Zastupljenost 12 zajedničkih varijabilnih pozicija tijekom uzastopnog kultiviranja virusa vCE1E2-HCV-MRV2 na stanicama Vero. Radi usporedbe su prikazani i podaci za matičnu seriju (MS) virusa. Promjene su određene u odnosu na sekvenciju odgovarajućeg rekombinantnog plazmida iz kojeg je virus proizveden i navedene su iznad svakog grafa. Prikazane su nukleotidna i aminokiselinska promjena (prva oznaka odgovara sekvenciji plazmida, druga oznaka odgovara sekvenciji virusa), osim u slučaju sinonimne supstitucije A1717G gdje je prikazan samo broj odgovarajuće aminokiseline te u slučaju supstitucija u nekodirajućim regijama (NCR). Dva pasaža (5. i 10.) iste replike su prikazani u istoj boji. pV, pasaž na stanicama Vero; A i B, linije uzastopnog kultiviranja održavane prenošenjem 1 i 100 μ L virusnog supernatanta; pb, parova baza.



Slika 25. Zastupljenost 3 zajedničke varijabilne pozicije tijekom uzastopnog kultiviranja virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 na stanicama Vero. Radi usporedbe su prikazani i podaci za matičnu seriju (MS) virusa. Promjene su određene u odnosu na sekvenciju odgovarajućeg rekombinantnog plazmida iz kojeg je virus proizveden i navedene su iznad svakog grafa. Prikazane su nukleotidna i aminokiselinska promjena (prva oznaka odgovara sekvenciji plazmida, druga oznaka odgovara sekvenciji virusa). Dva pasaža (5. i 10.) iste replike su prikazani u istoj boji. pV, pasaž na stanicama Vero; A i B, linije uzastopnog kultiviranja održavane prenošenjem 1 i 100 μ L virusnog supernatanta; TMD/CD, transmembranska i citoplazmatska domena; pb, parova baza.

4.3.2.3. Ispitivanje podrijetla zajedničkih promjena u kimernim virusima

Osim što mogu nastati za vrijeme kultiviranja virusa, promjene uočene u virusnim genomima mogu biti i posljedica raznolikosti u molekulama plazmida korištenim u procesu reverzne genetike ili mutacija nastalih tijekom transkripcije na stanicama BSR T7/5 (koju prvotno obavlja RNA polimeraza T7).

Tijekom uzastopnog kultiviranja, zajedničke promjene C2083A, T3975G, G5310A i C12084T u virusu vCE1E2-HCV-MRV2 te C10625A i C11838T u virusu vE1E2TMD-HCV-MRV2 su mi se činile karakterističnima za navedene viruse, jer sam ih detektirala u matičnim serijama i u svim virusnim uzorcima s minimalnom zastupljenošću od 20% (slike 24 i 25). Budući da su rezultati sekvenciranja metodom NGS pokazali da plazmidi nisu sadržavali navedene promjene, čak niti kada sam analizu radila bez granične vrijednosti od 2% (nije prikazano), ispitala sam jesu li ove zajedničke promjene nastale tijekom postupka dobivanja virusa. Zajedničku promjenu koja dovodi do supstitucije Pro408Leu u proteinu L (C12084T u vCE1E2-HCV-MRV2 i C11838T u vE1E2TMD-HCV-MRV2) nisam analizirala, jer se ona pojavljuje u populacijama svih ostalih rekombinantnih virusa koji svoje podrijetlo vuku iz plazmida pMRV2 (Slović i sur., 2021). U supernatantima kultura stanica BSR T7/5, koje sam sakupila tijekom postupka reverzne genetike, sam metodom po Sangeru sekvencirala tri regije u genima C, E2 i P za virus vCE1E2-HCV-MRV2 i jednu regiju u genu L za virus vE1E2TMD-HCV-MRV2.

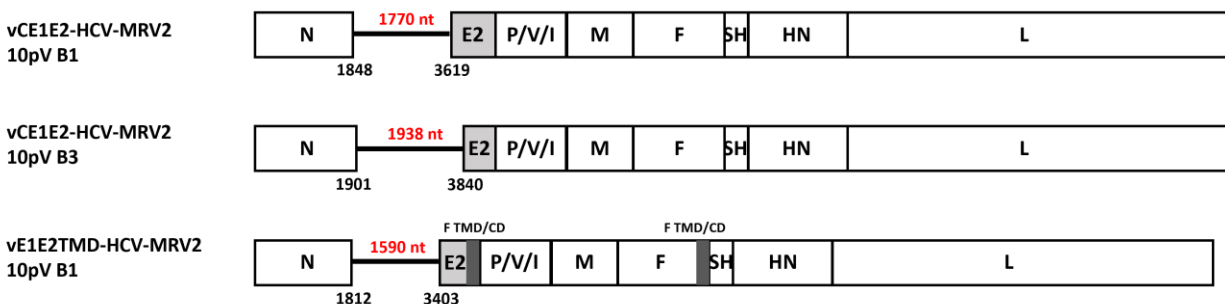
Rezultati sekvenciranja su pokazali da promjene od interesa nisu uočene ni na jednoj od proučavanih pozicija (nije prikazano), što znači da te promjene nisu nastale tijekom proizvodnje virusa na stanicama BSR T7/5. Budući da su sve navedene promjene detektirane već u uzorcima pred-matičnih serija (prilog 2), uključujući i promjenu C2083A koja je u pred-matičnoj seriji bila prisutna ispod granične vrijednosti od 2% (1,76% očitavanja), očito su se pojavile za vrijeme prilagodbe dvaju virusa na staničnu kulturu Vero.

4.3.3. Delecije u dodatnim transkripcijskim jedinicama u genomima kimernih virusa

Genska stabilnost sekvencija ATU se kod rekombinantnih paramiksovirusa može narušiti putem više mehanizama koji uključuju: (a) nakupljanje promjena, (b) pojavu stop kodona, (c)

insercije/delecije koje narušavaju „pravilo broja šest“ i ispravan N-fazni kontekst te (d) deleciju većeg dijela genoma. Metodom NGS sam ispitala prva tri navedena mehanizma, uz napomenu da sam pojavu insercija/delecija istraživala samo na razini konsenzusa (objašnjeno u poglavlju 4.3.1.), dok sam deleciju većeg dijela genoma ispitivala ovdje. Budući da sam tijekom pripreme PCR fragmenata za metodu NGS uočila da je u replikama vCE1E2-HCV-MRV2 B1 i B3 te vE1E2TMD-HCV-MRV2 B1 duljina umnoženih fragmenata koji su obuhvaćali insertirane sekvencije bila manja od očekivanih vrijednosti, postojala je mogućnost da je došlo do delecije dijela sekvencija ATU. Kako bih to provjerila, sekvencije cijelih sekvencija ATU tih replika iz 10. pasaža sam odredila sekvenciranjem metodom po Sangeru.

Rezultati su prikazani na slici 26. Za sve tri replike iz linije kultiviranja B sam potvrdila djelomičnu deleciju sekvencija ATU iz genoma kimernih virusa u 10. pasažu. Duljine deletiranih sekvencija iznosile su 1770, 1938 i 1590 nukleotida. U uzorcima vCE1E2-HCV-MRV2 10pV B1 i B3 su deletirane djelomične sekvencije 3' NCR-a gena N, cijele sekvencije gena C i E1 te djelomične sekvencije gena E2. U uzorku vE1E2TMD-HCV-MRV2 10pV B1 su deletirane djelomične sekvencije 3' NCR-a gena N, cijele sekvencije gena E1TMD te djelomične sekvencije gena E2TMD. Genomski segmenti su u slučaju sva tri uzorka izbačeni tako da je preostali dio genoma i dalje bio u skladu s „pravilom broja šest“ i ispravnim N-faznim kontekstom. Ovakav tip promjene genoma nisam detektirala ni u jednoj replici iz linije kultiviranja A.



Slika 26. Shematski prikazi delecija sekvencija u dodatnim transkripcijskim jedinicama 10. pasaža uzastopnog kultiviranja kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C iz linije kultiviranja B. Pozicije deletiranih sekvencija su prikazane u odnosu na genome odgovarajućih kimernih virusa i označene su ispod svake sheme (brojevi označavaju prve pozicije koje nisu deletirane). Duljina deletiranih sekvencija je označena crveno iznad svake sheme. 10pV, 10. pasaž na stanicama Vero; B, linija uzastopnog kultiviranja održavana prenošenjem 100 μ L virusnog supernatanta; nt, nukleotid; TMD/CD, transmembranska i citoplazmatska domena.

Virusne populacije koje su sadržavale i genome s deletiranim sekvencijama su se učinkovito replicirale na stanicama Vero, što sam potvrdila određivanjem virusnog titra u tim uzorcima testom CCID₅₀ (tablica 18). Titar uzoraka vCE1E2-HCV-MRV2 10pV B1 i B3 (7,27 i 7,33 log CCID₅₀/mL) te vE1E2TMD-HCV-MRV2 10pV B1 (8,39 log CCID₅₀/mL) je bio visok i sličan uzorcima virusa sa cjelovitom genomskom strukturom iz obje linije kultiviranja 10. pasaže (7,03-8,09 log CCID₅₀/mL za vCE1E2-HCV-MRV2 10pV i 7,43-8,98 log CCID₅₀/mL za vE1E2TMD-HCV-MRV2 10pV).

4.4. Ekspresija gena virusa hepatitisa C u stanicama inficiranim virusnim populacijama iz 10. pasaža na stanicama Vero

U prošlom poglavlju je opisana djelomična delecija sekvencija ATU u trima uzorcima kimernih virusa nastalim uzastopnim kultiviranjem na stanicama Vero. Idući korak je bio potvrda delecije sekvencija ATU iz virusnih genoma na proteinskoj razini, kako bih eliminirala mogućnost da je taj rezultat artefakt metode PCR nastao zbog sekundarnih struktura kalupa za umnažanje.

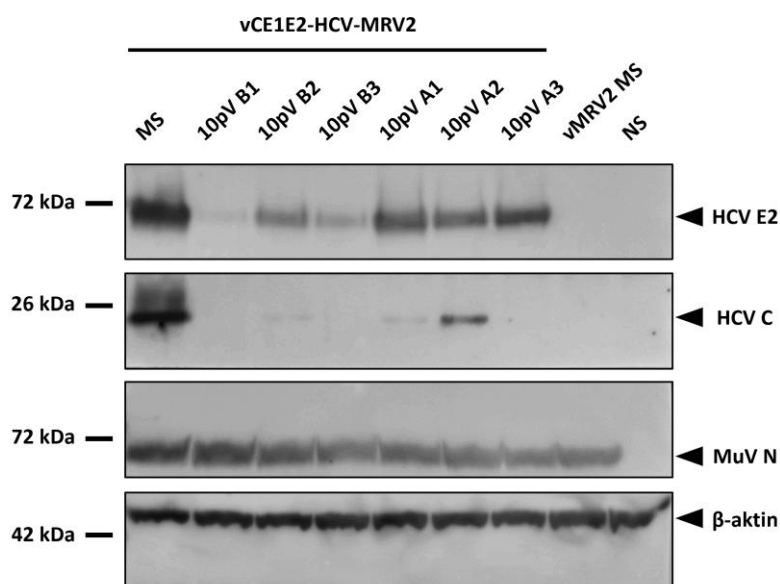
Stoga sam analizirala ekspresiju gena C i E2 HCV-a u stanicama Vero inficiranim uzorcima kimernih virusa iz 10. pasaža uzastopnog kultiviranja pomoću westernske metode otiska. Analizirala sam samo stanice inficirane uzorcima virusa vCE1E2-HCV-MRV2, budući da su rezultati preliminarnih pokusa westernske metode otiska pokazali da se protein E2 nije mogao detektirati uz pomoć dostupnog antitijela kod stanica inficiranih virusom vE1E2TMD-HCV-MRV2 (nije prikazano).

Za pripremu uzoraka za westernsku metodu otiska, stanice Vero sam inficirala u suspenziji pri MOI 2 uzorcima vCE1E2-HCV-MRV2 MS te vCE1E2-HCV-MRV2 10pV A1-A3 i B1-B3, a lizu stanica sam provela 72 h nakon infekcije. Kao negativne kontrole sam koristila lizate neinficiranih stanica (NS) te stanica inficiranih uzorkom vMRV2 MS koje sam pripremila pod prethodno opisanim uvjetima. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 27.

Proteinsku vrpcu veličine cca. 70 kDa, koja odgovara proteinu E2 HCV-a, sam detektirala u svim staničnim lizatima inficiranim uzorcima vCE1E2-HCV-MRV2. Stanice inficirane virusnim populacijama koje su sadržavale i genome s deletiranim sekvencijama, vCE1E2-HCV-MRV2 10pV B1 i B3, su imale znatno slabiju, ali još uvijek detektabilnu, ekspresiju gena E2 u usporedbi sa stanicama inficiranim virusnim populacijama sa cjelovitom genomskom strukturom (slika 27). To ukazuje na činjenicu da je niski postotak genoma bez delecije sekvencija ATU bio prisutan u stanicama inficiranim uzorcima vCE1E2-HCV-MRV2 10pV B1 i B3. Lizat stanica inficiran uzorkom vCE1E2-HCV-MRV2 MS je imao najjaču ekspresiju gena E2, dok su lizati stanica inficirani svim uzorcima iz linije kultiviranja A imali sličnu razinu ekspresije (slika 27). Proteinsku vrpcu veličine cca. 20 kDa, koja odgovara proteinu C HCV-a, sam detektirala samo u nekim staničnim lizatima inficiranim uzorcima virusa sa cjelovitom genomskom strukturom. U stanicama inficiranim virusnim populacijama koje su sadržavale i genome s deletiranim sekvencijama nije bilo ekspresije gena C HCV-a; izostanak proteinske vrpce sam zabilježila u stanicama inficiranim uzorcima vCE1E2-HCV-MRV2 10pV B1 i B3, kao i u stanicama inficiranih jednim uzorkom virusa sa cjelovitom genomskom strukturom, vCE1E2-HCV-MRV2 10pV A3. Ekspresija gena C je bila slaba u svim ispitivanim staničnim lizatima, osim u lizatu stanica inficiranih uzorkom vCE1E2-HCV-MRV2 MS (slika 27). U skladu s očekivanjem, u lizatima neinficiranih stanica (NS) i stanica inficiranih uzorkom vMRV2 MS nije bilo proteinskih vrpce koje odgovaraju proteinima HCV-a.

Za kontrolu varijacija u intenzitetu proteinskih vrpce ispitivanih proteina C i E2 HCV-a radila sam detekciju: (a) domaćinskog proteina (*housekeeping protein*) iz stanica Vero, β -aktina, koji je u svim staničnim lizatima inficiranim uzorcima vCE1E2-HCV-MRV2 dao proteinsku vrpcu jednakog intenziteta (cca. 45 kDa) te (b) proteina N virusa zaušnjaka, koji je s jednakim intenzitetom detektiran u stanicama inficiranim virusima vCE1E2-HCV-MRV2 i stanicama inficiranim uzorkom vMRV2 MS (cca. 70 kDa) (slika 27).

Bitno je napomenuti da razina ekspresije gena C i E2 HCV-a u stanicama inficiranim navedenim uzorcima nije korelirala s postotkom supstitucije C2083A (Tyr35STOP), jedine supstitucije detektirane metodom NGS koja dovodi do preuranjenog stop kodona u ATU-u virusa vCE1E2-HCV-MRV2 u svim tim uzorcima (tablica 21). Ovi rezultati ukazuju na mogućnost postojanja razlika u strukturi kvazivirsa populacija virusa koje se nalaze u inficiranim stanicama i onih koje se nalaze u supernatantu stanične kulture.



Slika 27. Detekcija proteina C i E2 virusa hepatitisa C (HCV) u stanicama Vero inficiranim virusima vCE1E2-HCV-MRV2 pomoću westernske metode otiska. Masa ukupnih proteina u staničnim lizatima iznosila je 72,55 μ g. MS, matična serija; 10pV, 10. pasaż na stanicama Vero; A i B, linije uzastopnog kultiviranja održavane prenošenjem 1 i 100 μ L virusnog supernatanta; NS, lizat neinficiranih stanica; MuV, virus zaušnjaka; kDa, kilodaltona.

4.5. Izolacija varijanti virusa vCE1E2-HCV-MRV2 postupkom plakiranja i njihova karakterizacija

Budući da je genska karakterizacija pokazala kako je za vrijeme kultivacije kimernih virusa na stanicama Vero došlo do nakupljanja promjena, uvođenja preuranjenih stop kodona i delecija u insertiranim sekvencijama, odlučila sam razdvojiti virusne varijante iz matične serije virusa vCE1E2-HCV-MRV2 postupkom plakiranja. To sam radila kako bih ispitala je li moguće izolirati virusne varijante i umnožiti ih u populacije kod kojih je količina neželjenih genskih promjena svedena na nedetektibilnu mjeru. Ovu analizu sam provodila na virusu vCE1E2-HCV-MRV2. Virus vE1E2TMD-HCV-MRV2 sam isključila iz daljnjih analiza zbog toga što se pokazalo da: (a) su promjene unutar virusnih populacija dobivene za vrijeme uzastopne kultivacije bile stohastičke i (b) kod stanica inficiranih tim virusom nisam mogla dokazati ekspresiju proteina E2 HCV-a.

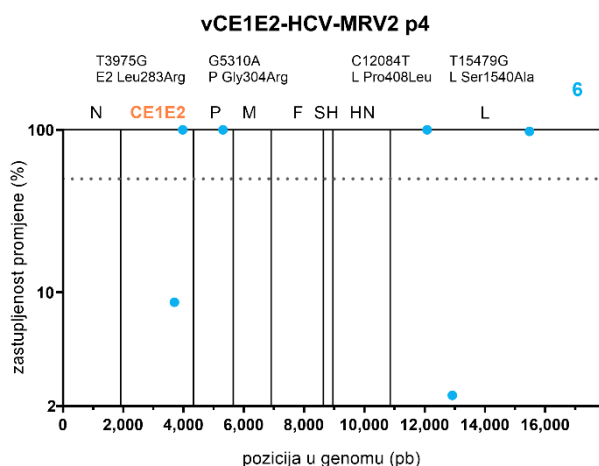
4.5.1. Razdvajanje varijanti virusa vCE1E2-HCV-MRV2

Iz uzorka vCE1E2-HCV-MRV2 MS sam postupkom plakiranja razdvojila 10 zasebnih plakova te ih uzgojila na staničnoj kulturi Vero. U svrhu provjere uspješnosti ovog postupka, cjelovite sekvencije ATU-a dobivenih plakova sam analizirala sekvenciranjem metodom po Sangeru. Pritom sam posebnu pažnju pridala elektroforetskim signalima koji odgovaraju onim pozicijama u virusnom genomu na kojima sam tijekom uzastopne kultivacije uočila pojavu stop kodona: Arg9STOP (A2003T), Tyr35STOP (C2083A) i Arg59STOP (C2153T) u proteinu C te Trp48STOP (G2694A) u proteinu E1 (tablica 21). Od ukupno 10 ispitanih plakova, vCE1E2-HCV-MRV2 plak 4 (p4) jedini je kod kojega nisam detektirala navedene supstitucije. U sekvenciji ATU virusne populacije umnožene iz vCE1E2-HCV-MRV2 p4 nisam uočila ni druge tipove odstupanja od očekivane sekvencije kimernog virusa.

4.5.2. Genska karakterizacija virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4

Dodatnu gensku karakterizaciju virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4 sam napravila metodom NGS. Analiza je pokazala da je vCE1E2-HCV-MRV2 p4, u odnosu na plazmid korišten u postupku reverzne genetike, imao tri supstitucije u genomu zastupljene u 100% očitavanja te još tri

heterogena mjesta (slika 28). Vrijednost π je iznosila $0,14 \times 10^{-4}$. Obje te vrijednosti bile su niže od vrijednosti koje sam dobila za uzorak vCE1E2-HCV-MRV2 MS (poglavlje 4.2.2.), što je značilo da je vCE1E2-HCV-MRV2 p4 imao nižu raznolikost virusne populacije u odnosu na vCE1E2-HCV-MRV2 MS. Sve tri promjene konsenzusa koje sam zabilježila u uzorku vCE1E2-HCV-MRV2 MS (poglavlje 4.2.2.) sam našla i u uzorku vCE1E2-HCV-MRV2 p4, gdje su bile zastupljene u maksimalnom postotku. Detektirala sam i novu konsenzusnu promjenu, T15479G, koja dovodi do aminokiselinske promjene Ser1540Ala u proteinu L (97,92% očitavanja) (slika 28).



Slika 28. Pozicije i zastupljenost promjena detektiranih u virusu vCE1E2-HCV-MRV2 plak 4 (p4). Broj promjena je naznačen u gornjem desnom uglu. Virusni geni su označeni iznad odgovarajuće regije u genomu (dodatna transkripcijska jedinica je označena narančastom bojom). Točkasta linija označava frekvenciju promjena od 50% (razina konsenzusa). Promjene konsenzusa u odnosu na sekvenciju odgovarajućeg rekombinantnog plazmida iz kojeg je virus proizveden su naznačene iznad svake točke; prikazane su nukleotidna i aminokiselinska promjena (prva oznaka odgovara sekvenciji plazmida, druga oznaka odgovara sekvenciji virusa). pb, parova baza.

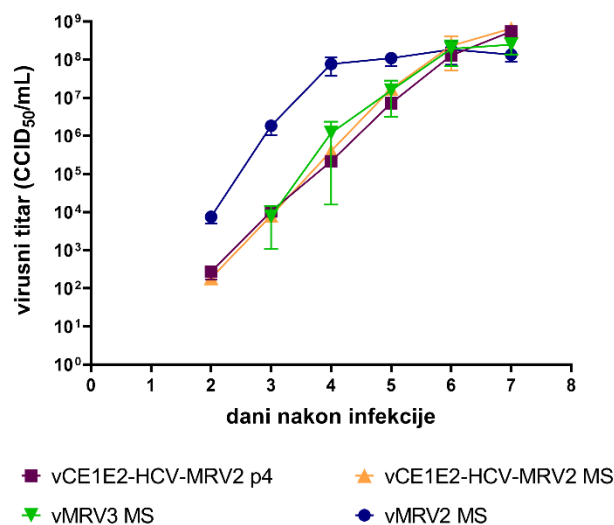
Što se tiče insertiranih sekvencija, frekvencija heterogenih mjesta koju sam detektirala u ATU-u uzorka vCE1E2-HCV-MRV2 p4 ($0,83 \times 10^{-3}$) je bila više nego dvostruko niža u usporedbi s ATU-om uzorka vCE1E2-HCV-MRV2 MS ($2,06 \times 10^{-3}$). U sekvenciji ATU uzorka vCE1E2-HCV-MRV2 p4 nisam detektirala supstitucije koje dovode do preuranjenih stop kodona (prilog 4), čime sam potvrdila rezultate dobivene sekvenciranjem metodom po Sangeru (poglavlje 4.5.1.).

Od dva heterogena mjesta koja sam zabilježila u insertiranim sekvencijama vCE1E2-HCV-MRV2 p4 (slika 28), jedno sam uočila kao heterogeno i u populaciji vCE1E2-HCV-MRV2 MS, Leu283Arg u proteinu E2, koje sam detektirala u 100% očitavanja u vCE1E2-HCV-MRV2 p4 (prilozi 2 i 4).

4.5.3. Određivanje kinetike replikacije virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4

Osim genske stabilnosti, ispitala sam i kinetiku replikacije vCE1E2-HCV-MRV2 p4 na stanicama Vero, kako bih potvrdila da postupkom plakiranja nisam dobila virusnu populaciju bitno različite mogućnosti replikacije, uslijed nekih osobitosti koje ne bih detektirala metodom NGS koju sam koristila. Titar virusa u uzorku vCE1E2-HCV-MRV2 p4 je bio visok (7,61 log CCID₅₀/mL) i sličan titrevima matičnih serija drugih rekombinantnih virusa, što je upućivalo da tijekom postupka plakiranja nije došlo do gubitka fitnesa populacije.

Kinetiku replikacije uzorka vCE1E2-HCV-MRV2 p4 sam uspoređivala s replikacijom uzoraka vCE1E2-HCV-MRV2 MS, vMRV2 MS i vMRV3 MS (slika 29). Uzorak vCE1E2-HCV-MRV2 p4, je kao i uzorak iz kojeg je dobiven postupkom plakiranja, vCE1E2-HCV-MRV2 MS, imao sporiju kinetiku replikacije u odnosu na vMRV2 MS. To svojstvo je bilo karakteristično i za vMRV3 MS, uzorak još jednog kimernog virusa koji vuče porijeklo iz plazmida pMRV2, kod kojega je detektabilan titar uočen tek 3. dana infekcije (slika 29). Uzorak vMRV3 MS je nakon eksponencijalnog porasta broja virusnih čestica ušao u stacionarnu fazu rasta 6. dana infekcije, što znači da je imao sličan replikacijski uzorak kao vMRV2 MS. Za razliku od toga, vCE1E2-HCV-MRV2 p4 je imao linearan rast do 6. dana infekcije i zbog snažne degeneracije staničnog sloja nije dosegao stacionarnu fazu rasta prije kraja inkubacijskog perioda, što je uočeno i kod uzorka vCE1E2-HCV-MRV2 MS. Sva tri uzorka kimernih virusa ispitana u ovoj analizi su, unatoč sporijoj replikaciji, u zadnja dva dana inkubacijskog perioda postigla titar jednak ili malo viši od titra uzorka virusa bez dodanih gena, vMRV2 MS (slika 29).



Slika 29. Usporedba kinetike replikacije virusa vCE1E2-HCV-MRV2 plak 4 (p4) s matičnim serijama (MS) virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i kontrolnih virusa (vMRV2 i vMRV3) na stanicama Vero pri multiplicitetu infekcije 10^{-3} . Podaci su za svaku skupinu prikazani u obliku srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija ($n = 3$, osim $n = 6$ za vMRV2 MS).

4.6. Ispitivanje imunogeničnosti i neurovirulentnog potencijala virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4

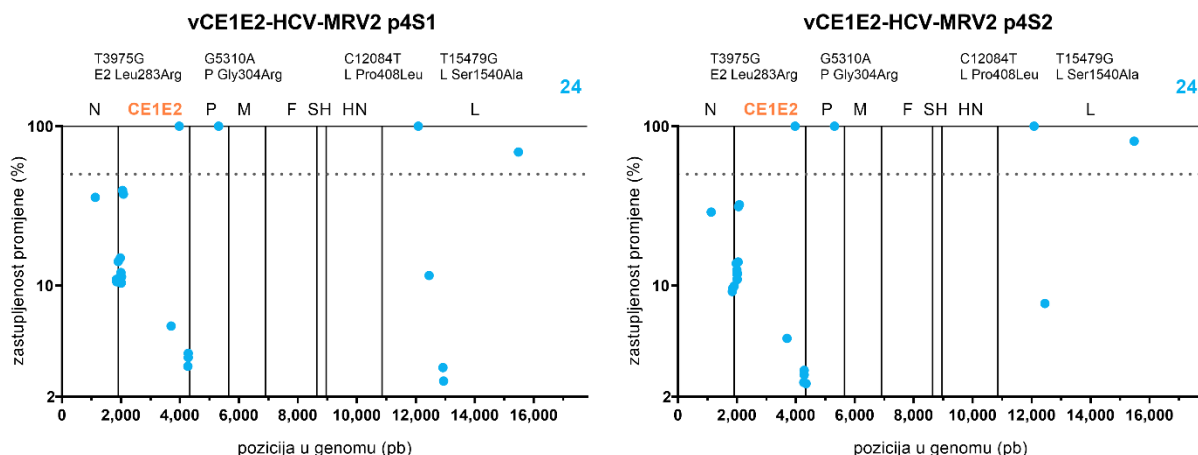
Postupkom razdvajanja virusnih varijanti dobila sam cijeplni kandidat, vCE1E2-HCV-MRV2 p4, koji je imao nisku razinu heterogenosti, nije imao stop kodone niti delecije u sekvenciji ATU te se učinkovito replicirao u kontinuiranoj staničnoj liniji za proizvodnju cjepiva. Ovaj virus sam odabrala za provedbu preostalih faza biološke karakterizacije, a to su analiza imunogenog profila i procjena neurovirulentnog potencijala. Oba ta koraka bitan su dio evaluacije cijeplnih kandidata koji se provodi u pokusima *in vivo*, na animalnim modelima.

Za aplikaciju vCE1E2-HCV-MRV2 p4 u animalne modele, pripremila sam uzorak većeg volumena virusne suspenzije koji nije sadržavao FTS. Stanice Vero sam inficirala pri $MOI 10^{-3}$ uzorkom vCE1E2-HCV-MRV2 p4 u dva neovisna postupka (opisano u tablici 13), jer sam na taj način od istog početnog uzorka uspostavila dvije serije virusa koje sam mogla genski usporediti. Virusni titar u serijama virusa korištenim u pokusima *in vivo* (u nazivima uzoraka p4S, od *plaque 4 seed*) je iznosio 5,42 log PFU/mL za vCE1E2-HCV-MRV2 p4S1, odnosno, 6,86 log PFU/mL

za vCE1E2-HCV-MRV2 p4S2. Prije same aplikacije uzoraka, sastav virusnih populacija u obje serije sam analizirala metodom NGS, a njihovu varijabilnost sam uspoređivala s varijabilnošću populacije uzorka iz kojeg su serije proizvedene, vCE1E2-HCV-MRV2 p4.

4.6.1. Genska karakterizacija serija virusa korištenih u pokusima *in vivo*

Raznolikost populacija dvaju analiziranih serija virusa je bila slična, ali znatno veća nego raznolikost populacije virusa dobivenog postupkom plakiranja, vCE1E2-HCV-MRV2 p4. To se očitovalo kroz jasan porast broja heterogenih mjesta (24 supstitucije za obje serije) i vrijednosti π serija virusa ($2,55 \times 10^{-4}$ za p4S1 i $2,39 \times 10^{-4}$ za p4S2) u odnosu na virus vCE1E2-HCV-MRV2 p4 (6 supstitucija, vrijednost π od $0,14 \times 10^{-4}$). Broj i vrsta konsenzusnih promjena detektiranih u virusnim serijama je bila istovjetna onima koje sam zabilježila u uzorku vCE1E2-HCV-MRV2 p4, samo se zastupljenost supstitucije koja dovodi do aminokiselinske promjene Ser1540Ala u proteinu L smanjila u odnosu na uzorak dobiven postupkom plakiranja (slika 30, poglavlje 4.5.2.).



Slika 30. Pozicije i zastupljenost promjena detektiranih u serijama virusa korištenim u pokusima *in vivo*. Broj promjena u svakom uzorku je naznačen u gornjem desnom uglu. Virusni geni su označeni iznad odgovarajuće regije u genomu (dodatna transkripcijska jedinica je označena narančastom bojom). Točkasta linija označava frekvenciju promjena od 50% (razina konsenzusa). Promjene konsenzusa u odnosu na sekvenciju odgovarajućeg rekombinantnog plazmida iz kojeg je virus proizveden su naznačene iznad svake točke; prikazane su nukleotidna i aminokiselinska promjena (prva oznaka odgovara sekvenciji plazmida, druga oznaka odgovara sekvenciji virusa). p4S1 i p4S2, serije virusa korištene u pokusima *in vivo*; pb, parova baza.

Vrijednosti frekvencije heterogenih mjesta koje sam dobila za većinu gena su bile slične između dvaju virusnih serija (tablica 23). Što se tiče ATU-a, ova regija je kod obje serije imala više od šest puta veću frekvenciju heterogenih mjesta u usporedbi s uzorkom vCE1E2-HCV-MRV2 p4 (poglavlje 4.5.2.), a osim toga, i najveću frekvenciju na razini cijelog genoma ($5,37 \times 10^{-3}$ za p4S1 i $5,78 \times 10^{-3}$ za p4S2). Najveću frekvenciju heterogenih mjesta izračunatu za gene virusa zaušnjaka u ovim serijama zabilježila sam u genu N (tablica 23). Povećana frekvencija heterogenih mjesta u genu N i ATU-u korelira s činjenicom da sam u regijama NCR tih gena zabilježila povećan broj promjena, što nisam uočila kod regija NCR ostalih gena u genomima ovih virusa (prilog 4). Obje serije virusa imale su veću frekvenciju heterogenih mjesta u regijama NCR u odnosu na regije CDS ($6,21 \times 10^{-3}$ u odnosu na $0,97 \times 10^{-3}$ za p4S1 te $6,98 \times 10^{-3}$ u odnosu na $0,91 \times 10^{-3}$ za p4S2).

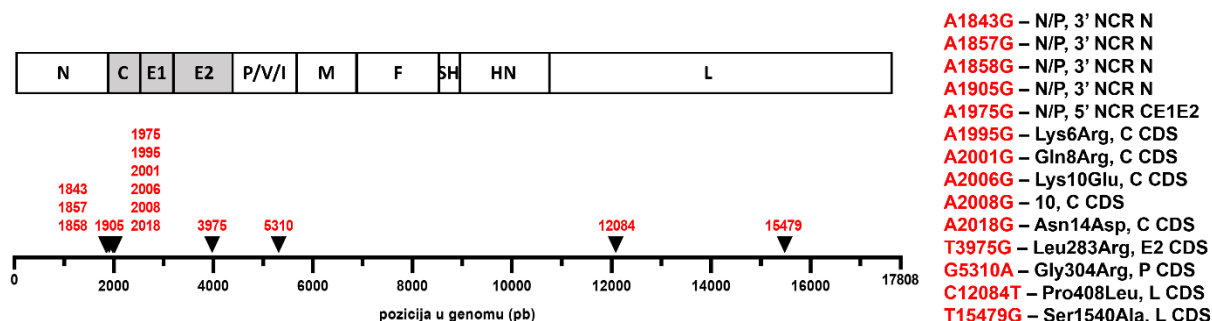
Tablica 23. Frekvencija heterogenih mjesta po genima u serijama virusa korištenim u pokusima *in vivo*.

Virus	Frekvencija heterogenih mjesta ($\times 10^{-3}$)				
	N	ATU	P	M, F, SH, HN	L
vCE1E2-HCV-MRV2 p4S1	2,70	5,37	0,76	0	0,72
vCE1E2-HCV-MRV2 p4S2	2,70	5,78	1,52	0	0,43

p4S1 i p4S2, serije virusa korištene u pokusima *in vivo*; ATU, dodatna transkripcijska jedinica.

Osim toga, više od polovinu promjena u genomima virusnih serija, njih 13, odnosno 14, detektirala sam u ATU-u (prilog 4). Obje promjene zabilježene u ATU-u uzorka vCE1E2-HCV-MRV2 p4 (poglavlje 4.5.2.) sam detektirala u virusnim serijama u sličnim postocima. U obje virusne serije sam detektirala i supstituciju C2083A (nisam je uočila u vCE1E2-HCV-MRV2 p4), koja dovodi do preuranjenog stop kodona nakon aminokiseline 34 u proteinu C (37,44% očitavanja u p4S1 i 32,13% očitavanja u p4S2). Tu supstituciju sam zabilježila i tijekom uzastopnog kultiviranja vCE1E2-HCV-MRV2 MS na stanicama Vero u svim uzorcima virusa iz 5. i 10. pasaža (poglavlja 4.3.1.4. i 4.3.2.2.).

Može se zaključiti da su dvije serije virusa, koje sam pripremila neovisno, ali po istoj proceduri i iz istog izvornog uzorka vCE1E2-HCV-MRV2 p4, imale izuzetno sličnu strukturu virusnih populacija. Od ukupno 24 promjene koje sam detektirala u genomu obje serije virusa, njih 22 su bile zajedničke u obje virusne populacije (prilog 4). Čak 14 tih zajedničkih promjena sam zabilježila i tijekom uzastopne kultivacije virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4 na fibroblastima pilećih embrija (slika 31), opisane u poglavlju 4.7., što upućuje da su one svojstvene za navedeni virus.

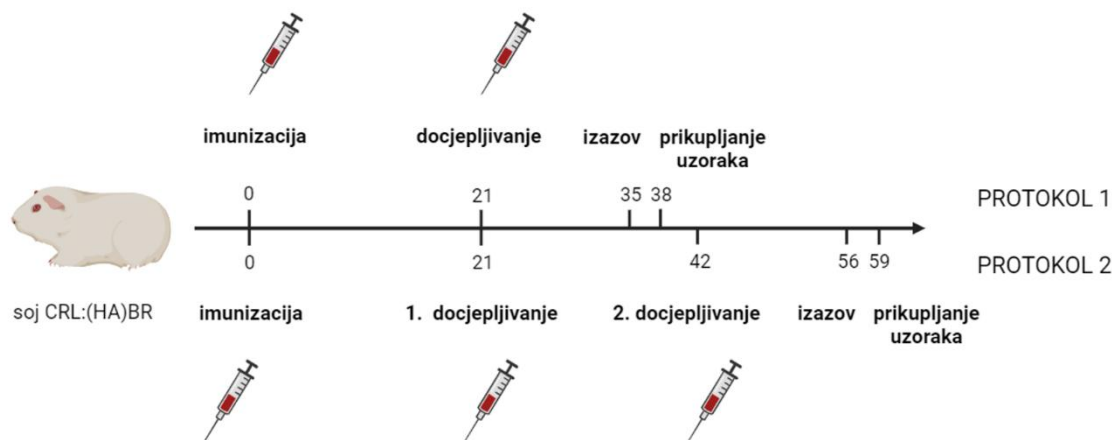


Slika 31. Četrnaest zajedničkih varijabilnih pozicija detektiranih u serijama virusa korištenim u pokusima *in vivo* koje su zabilježene i tijekom uzastopne kultivacije virusa vCE1E2-HCV-MRV2 plak 4 (p4) na fibroblastima pilećih embrija. Pozicije promjena su prikazane u odnosu na genom odgovarajućeg virusa i navedene su desno od sheme virusnog genoma. Prikazane su nukleotidna i aminokiselinska promjena (prva oznaka odgovara sekvenciji plazmida, druga oznaka odgovara sekvenciji virusa), osim u slučaju sinonimne supstitucije A2008G gdje je prikazan samo broj odgovarajuće aminokiseline te u slučaju supstitucija u nekodirajućim regijama. CDS, kodirajuća regija; NCR, nekodirajuća regija; pb, parova baza; N/P, nije primjenjivo.

Odabir uzorka za aplikaciju u animalne modele je bio ograničen načinom njegove pripreme. Virusni uzorci koji se koriste u ispitivanjima imunogeničnosti na animalnim modelima ne smiju sadržavati FTS, jer je poznato da komponente FTS-a, posebno BSA, mogu inducirati nespecifične imunostne odgovore (Kadri i sur., 2007; van den Berg i sur., 2007; Yoshino i Ellis, 1987). Genska karakterizacija dvije neovisno pripremljene serije virusa koje nisu sadržavale FTS je pokazala da je njihova heterogenost bila veća od uzorka vCE1E2-HCV-MRV2 p4. Međutim, skoro sve detektirane promjene su bile istovjetne za obje virusne serije, iz čega se može zaključiti da bi svaka priprema virusnog uzorka pod navedenim uvjetima vjerojatno rezultirala sličnom razinom heterogenosti. Shodno tome, testove imunogeničnosti i analize neurovirulentnog potencijala provodila sam korištenjem obje serije virusa, vCE1E2-HCV-MRV2 p4S1 i vCE1E2-HCV-MRV2 p4S2 (u daljnjem tekstu, cijepni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4S).

4.6.2. Analiza imunogeničnosti virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4S *in vivo*

Za ispitivanje imunogeničnosti, pet zamorčića po skupini sam imunizirala supkutano s 1×10^6 PFU cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 p4S ili kontrolnog virusa vMRV2 po dva imunizacijska protokola (uz jedno docjepljivanje 21. dan, odnosno, dva docjepljivanja 21. i 42. dan od prvotne imunizacije). Životinje u kontrolnim skupinama (3-5) sam inokulirala fiziološkom otopinom. Četrnaestoga dana nakon posljednje imunizacije radila sam intranazalni izazov s 1×10^6 PFU kontrolnog virusa vMRV3. Tri dana nakon izazova prikupila sam uzorke seruma i BAL-a za analizu imunosnih odgovora (slika 32). U svim testnim skupinama sam analizirala rezultate dobivene od pet životinja, osim u skupini životinja imuniziranih virusom vMRV2 uz dva docjepljivanja, gdje sam analizirala rezultate dobivene od četiri životinje jer je jedna uginula tijekom eksperimenta.

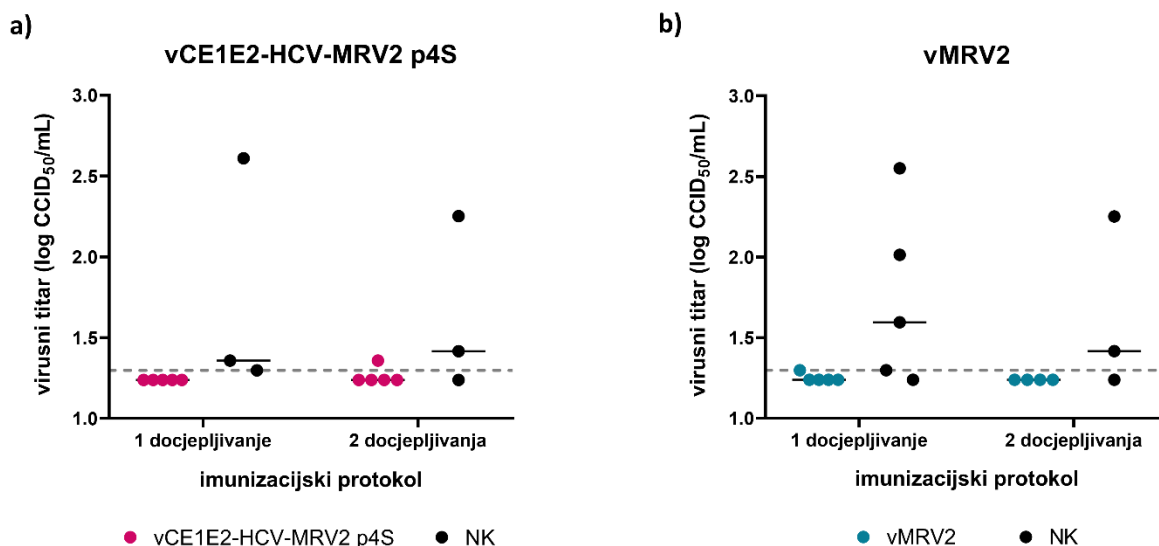


Slika 32. Shema pokusa na zamorčićima imuniziranim cijepnim kandidatom (vCE1E2-HCV-MRV2 p4S) i kontrolnim virusom (vMRV2) po dva protokola. Po protokolu 1, životinje su docjepljivane 21. dan od prvotne imunizacije odgovarajućim virusom, rađen je intranazalni izazov kontrolnim virusom vMRV3 14 dana nakon docjepljivanja te su uzorci seruma i bronhoalveolarnog ispirka (BAL) prikupljeni 3 dana nakon izazova. Po protokolu 2, životinje su docjepljivane 21. i 42. dan od prvotne imunizacije odgovarajućim virusom, rađen je intranazalni izazov kontrolnim virusom vMRV3 14 dana nakon drugog docjepljivanja te su uzorci seruma i BAL-a prikupljeni 3 dana nakon izazova.

4.6.2.1. Lokalna imunost u dišnim putevima

Učinkovitost lokalnih imunskih odgovora ispitivala sam određivanjem prisutnosti infektivnog virusa u uzorcima BAL-a skupljenim tri dana nakon izazova kontrolnim virusom vMRV3 u prethodno imuniziranih životinja te kontrolnih životinja. Virusni titar sam određivala testom CCID₅₀ u kojem sam koristila minimalna početna razrjeđenja uzoraka s obzirom na količinu prikupljenog materijala. Rezultati određivanja titra virusa vMRV3 u uzorcima BAL-a su za svaku pojedinu životinju iz proučavanih skupina prikazani na slici 33.

Životinje imunizirane virusima vCE1E2-HCV-MRV2 p4S i vMRV2 nisu imale detektabilan titar infektivnog virusa; medijalna vrijednost titra je u svakoj skupini bila niža od granice osjetljivosti testa koja iznosi 1,298 log CCID₅₀/mL. Samo je kod jedne životinje imunizirane cijepnim kandidatom vCE1E2-HCV-MRV2 p4 po protokolu s dva docjepljivanja dokazano prisustvo virusa u niskom titru. Slično tome, jedna životinja imunizirana kontrolnim virusom vMRV2 po protokolu s jednim docjepljivanjem je imala titar virusa na samom pragu detekcije. Očekivano, kod kontrolnih životinja je infektivan virus bio detektiran u većini prikupljenih uzoraka. Jedno docjepljivanje je bilo dovoljno za postizanje zaštitnih odgovora koji mogu učinkovito štititi životinje od izazova infektivnim virusom zaušnjaka.



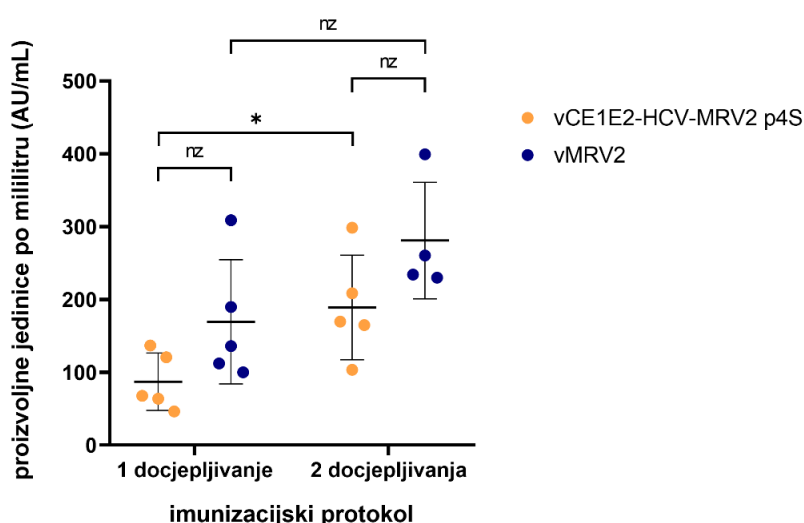
Slika 33. Titar infektivnog virusa u uzorcima bronhoalveolarnog ispirka nakon izazova kontrolnim virusom vMRV3 u životinja prethodno imuniziranih (a) cijepnim kandidatom vCE1E2-HCV-MRV2 p4S i (b) kontrolnim virusom vMRV2 po dva protokola imunizacije te u kontrolnim životinjama (NK). Siva iscrtana linija označava prag detekcije metode (1,298 log CCID₅₀/mL). Podaci su za svaku skupinu prikazani u obliku pojedinačnih vrijednosti za svaku životinju i medijana (n = 5 za vCE1E2-HCV-MRV2 p4S, n = 4 ili 5 za vMRV2, n = 3 ili 5 za NK). NK, životinje inokulirane fiziološkom otopinom; log CCID₅₀/mL, titar virusa određen testom određivanja 50%-tne infektivne doze virusa u kulturi stanica procjenom citopatogenog efekta.

4.6.2.2. Humoralni odgovor specifičan za virus zaušnjaka

Sljedeće sam istraživala može li odabrani cijepni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4S inducirati humoralni odgovor specifičan za virus zaušnjaka. U uzorcima seruma imuniziranih životinja sakupljenim nakon izazova kontrolnim virusom vMRV3 sam određivala titar antitijela IgG specifičnih za virus zaušnjaka testom ELISA. Dobivene vrijednosti titra su za svaku pojedinu životinju iz proučavanih skupina prikazani na slici 34.

Imunizacija virusima vCE1E2-HCV-MRV2 p4S i vMRV2 po oba imunizacijska protokola je inducirala proizvodnju antitijela specifičnih za virus zaušnjaka. Životinje imunizirane cijepnim kandidatom vCE1E2-HCV-MRV2 p4S su imale titar antitijela IgG sličan životinjama

imuniziranim kontrolnim virusom vMRV2, i kod protokola s jednim i kod protokola s dva docjepljivanja. Za životinje imunizirane kontrolnim virusom vMRV2 nisu utvrđene razlike u količini antitijela IgG između dvaju imunizacijskih protokola, dok su životinje imunizirane cijepnim kandidatom vCE1E2-HCV-MRV2 p4S po protokolu s dva docjepljivanja imale statistički značajno viši titar antitijela IgG od životinja imuniziranih po protokolu s jednim docjepljivanjem. Iz toga sam zaključila da je za indukciju jačeg humoralnog odgovora specifičnog za virus zaušnjaka tijekom imunizacije cijepnim kandidatom vCE1E2-HCV-MRV2 p4S potrebno koristiti protokol s dva docjepljivanja.



Slika 34. Detekcija humoralnog imunskog odgovora specifičnog za virus zaušnjaka u serumima životinja imuniziranih po dva protokola imunizacije cijepnim kandidatom (vCE1E2-HCV-MRV2 p4S) i kontrolnim virusom (vMRV2). Titar imunoglobulina (Ig) G specifičnih za virus zaušnjaka određen je enzimskim imunotestom na čvrstoj fazi. Podaci su za svaku skupinu prikazani u obliku pojedinačnih vrijednosti za svaku životinju i srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija ($n = 5$ za vCE1E2-HCV-MRV2 p4S, $n = 4$ ili 5 za vMRV2). Statističke značajnosti među skupinama su određene testom Two-Way ANOVA u kombinaciji s post-hoc testom Tukey, nakon što su relativne vrijednosti titra antitijela IgG transformirane primjenom logaritamske transformacije kako bi se normalizirala distribucija podataka. AU, proizvoljna jedinica; nz, razlika nije statistički značajna; *, $p < 0,05$.

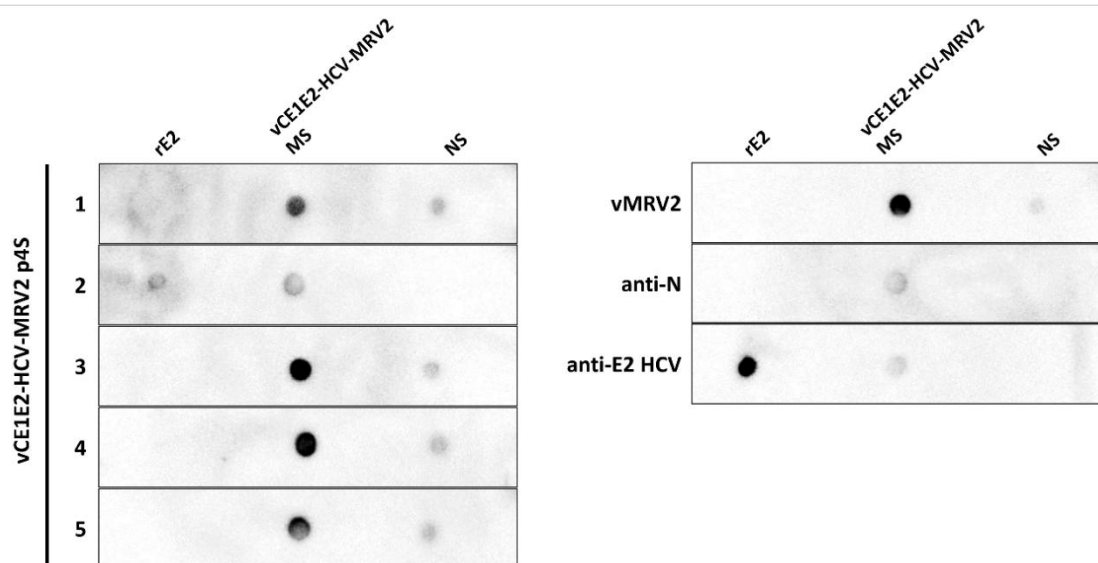
4.6.2.3. Određivanje prisustva specifičnih antitijela na virus hepatitisa C u serumu

Idući korak u procjeni imunogeničnosti cijeptnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 p4S je uključivao analizu HCV-specifičnog humoralnog odgovora kod imuniziranih životinja. To sam ispitivala na način da sam u serumima životinja imuniziranih cijeptnim kandidatom po protokolu s dva docjepljivanja detektirala antitijela specifična za HCV metodom kapljice analize proteina. Zbog sigurnosnih razloga, prisutnost antitijela u serumu nisam mogla ispitivati u reakciji s infektivnim HCV-om, već sam pritom koristila rE2 protein HCV-a, genotipa 1b. Mase rE2 proteina te lizata stanica Vero inficiranih uzorkom vCE1E2-HCV-MRV2 MS (pozitivna kontrola) i neinficiranih stanica (negativna kontrola) sam optimirala u preliminarnim eksperimentima. Testne serume sam analizirala u minimalnom razrjeđenju s obzirom na količinu prikupljenog materijala. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 35.

Antitijela specifična za protein E2 HCV-a sam detektirala samo kod jedne od pet životinja imuniziranih cijeptnim kandidatom vCE1E2-HCV-MRV2 p4S. Za razliku od toga, u serumima svih pet životinja imuniziranih cijeptnim kandidatom sam detektirala antitijela specifična za proteine virusa zaušnjaka, ali i stanične proteine, što je vidljivo kroz pozitivne signale koje sam dobila u reakciji s lizatom stanica inficiranih uzorkom vCE1E2-HCV-MRV2 MS te blago pozitivne signale dobivene u reakciji s lizatom neinficiranih stanica. Jačina signala koje sam dobila u reakciji s proteinima virusa zaušnjaka u testu kapljice analize proteina je korelirala s vrijednostima titra antitijela IgG specifičnih za virus zaušnjaka koje sam dobila u testu ELISA (nije prikazano). Kao kontrolu specifičnosti, testirala sam i serum jedne životinje imunizirane kontrolnim virusom vMRV2; u serumu ove životinje sam detektirala samo antitijela specifična za proteine virusa zaušnjaka i u znatno manjoj mjeri, stanične proteine.

Za potvrdu specifičnosti dobivenih signala koristila sam detekciju s anti-N i anti-E2 HCV antitijelom. Oba ta antitijela su u westernskoj metodi otiska mogla detektirati ciljane proteine u lizatu stanica inficiranih uzorkom vCE1E2-HCV-MRV2 MS (poglavlje 4.4.), a isto to sam dobila i u ovom eksperimentu, samo u slabijem intenzitetu. Dodatno, detekcija rE2 proteina s anti-E2 HCV antitijelom je potvrdila da je taj antigen pogodan za prepoznavanje HCV-specifičnih antitijela, odnosno, da mu je sekvencija dovoljno slična dodanim sekvencijama cijeptnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 p4S da bi došlo do prepoznavanja.

Budući da je protein E2 glavni neutralizacijski antigen HCV-a (Sepulveda-Crespo i sur., 2020), očekivala sam da će imunizacija virusom koji eksprimira E2 u nativnom obliku omogućiti indukciju HCV-specifičnog humoralnog odgovora. Iako sam antitijela specifična za virus zaušnjaka detektirala kod svih pet životinja koje su imunizirane cijepnim kandidatom vCE1E2-HCV-MRV2 p4S po protokolu s dva docjepljivanja (poglavlje 4.6.2.2.), samo sam kod jedne životinje detektirala antitijela specifična za HCV. Moguće je da je za indukciju jačeg HCV-specifičnog odgovora potrebno primijeniti drugačiji imunizacijski protokol ili modificirati dizajn stranog antigena kako bi se pojačala ekspresija dodanih gena.

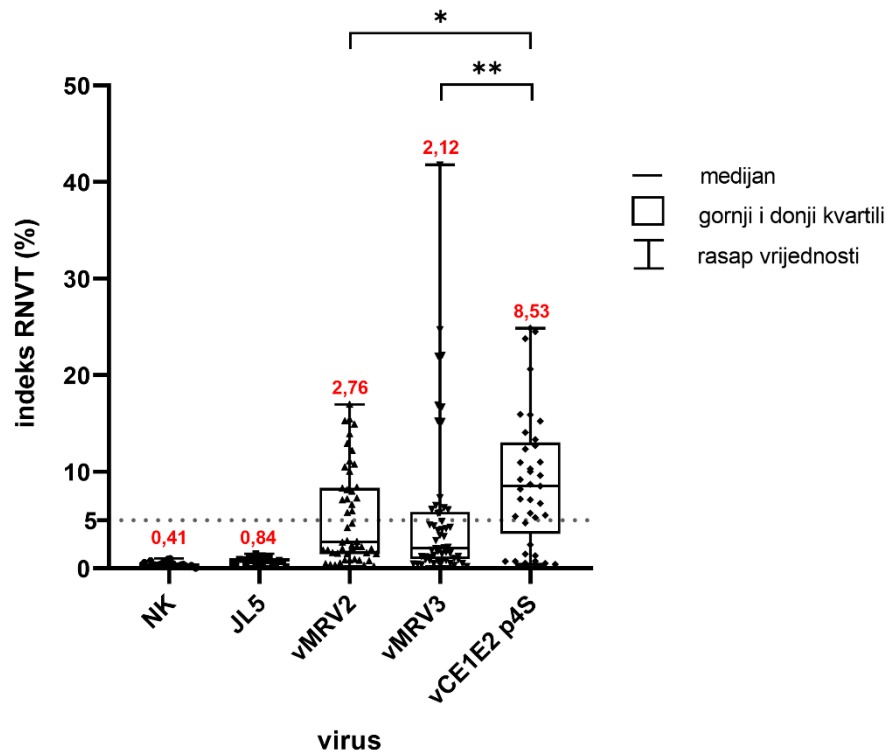


Slika 35. Određivanje prisustva antitijela specifičnih za protein E2 virusa hepatitisa C (HCV) u serumima životinja imuniziranih cijepnim kandidatom (vCE1E2-HCV-MRV2 p4S) i kontrolnim virusom (vMRV2) po protokolu s dva docjepljivanja metodom kapljice analize proteina. Lijeva strana prikazuje rezultate dobivene korištenjem seruma pet životinja imuniziranih cijepnim kandidatom. Desna strana prikazuje rezultate dobivene korištenjem seruma jedne životinje imunizirane kontrolnim virusom te korištenjem anti-N i anti-E2 HCV antitijela. Masa rekombinantnog proteina E2 je iznosila 2 µg, osim za detekciju s anti-E2 HCV antitijelom, gdje je iznosila 0,15 µg. Masa ukupnih proteina u staničnim lizatima iznosila je 1 µg. rE2, rekombinantni protein E2; vCE1E2-HCV-MRV2 MS, lizat stanica Vero inficiranih matičnom serijom (MS) virusa vCE1E2-HCV-MRV2; NS, lizat neinficiranih stanica.

4.6.3. Procjena neurovirulentnog potencijala virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4 u testu neurovirulencije *in vivo*

Sva cjepiva bazirana na atenuiranim sojevima virusa zaušnjaka moraju tijekom svoje proizvodnje proći procjenu razine neurovirulentnog potencijala. Za to sam koristila test neurovirulencije *in vivo* na novookoćenim štakorima (Rubin i sur., 2005; Rubin i Afzal, 2011). Prema standardnom operativnom postupku koji se koristi u Imunološkom zavodu, suspenzija volumena 10 µL koja sadrži 100 PFU virusa se inokulira u minimalno 30 životinja. Cijepni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4S sam inokulirala u četiri legla novookoćenih životinja (ukupno 37 životinja), a vrijednosti indeksa RNVT za taj virus sam usporedila s već postojećim rezultatima za kontrolne viruse vMRV2 i vMRV3 te cijepni soj virusa JL5. Kao negativnu kontrolu testa sam koristila medij za razrjeđivanje virusne suspenzije (radni medij MEM s 2% FTS-a). Rezultati testa neurovirulencije prikazani su na slici 36.

Medijana indeksa RNVT od 5% je definiran kao granična vrijednost iznad koje se virusi bazirani na virusu zaušnjaka smatraju neurovirulentnima. Cijepni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4S je imao medijan indeksa 8,53%, što je bio statistički značajno veći indeks RNVT od virusa bez dodanih gena, vMRV2 (2,76%) i od kimernog virusa vMRV3 (2,12%). Vrijednosti medijana indeksa RNVT za kontrolne viruse vMRV2 i vMRV3 su bili ispod vrijednosti od 5%, što ova dva virusa svrstava u rang atenuiranih virusa. U skladu s očekivanjem, medijan indeksa RNVT cijepnog soja virusa zaušnjaka JL (0,84%) je bio malo viši od medijana indeksa RNVT dobivenog nakon inokulacije s medijem za razrjeđivanje virusne suspenzije (0,41%). Ovi rezultati sugeriraju da je ugradnja gena za površinske proteine HCV-a u genom neuroatenuiranog virusa vMRV2 dovela do povećanja neurovirulentnosti.

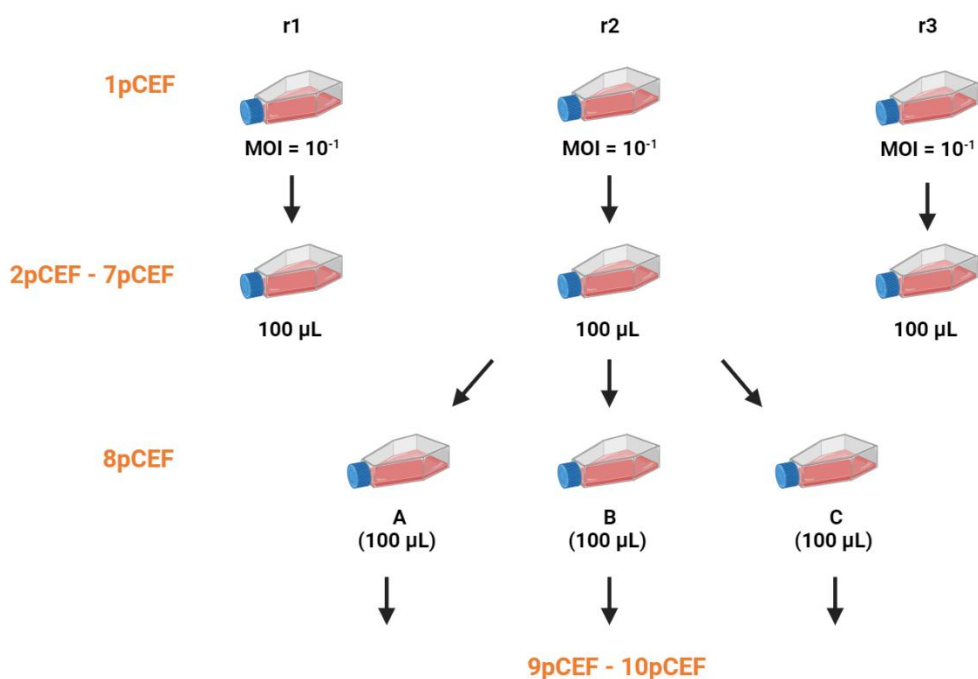


Slika 36. Neurovirulentni potencijal cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 p4S. Vrijednosti indeksa testa neurovirulencije (RNVT) na novookoćenim štakorima za taj virus prikazane su zajedno s ranije određenim vrijednostima za cijepni soj virusa (Jeryl Lynn (JL) 5), kontrolne viruse (vMRV2 i vMRV3) te za negativnu kontrolu (NK) testa. Podaci su za svaku skupinu prikazani u obliku pojedinačnih vrijednosti za svaku životinju te medijana, gornjih i donjih kvartila i rasapa vrijednosti ($n = 29$ za NK, $n = 24$ za JL5, $n = 50$ za vMRV2, $n = 54$ za vMRV3, $n = 37$ za vCE1E2-HCV-MRV2 p4S). Vrijednosti medijana za svaku skupinu su navedene i brojčano iznad svake grupe. Statističke značajnosti među skupinama od interesa su određene testom Mann-Whitney U. vCE1E2 p4S, vCE1E2-HCV-MRV2 p4S; NK, životinje inokulirane medijem za razrjeđivanje virusne suspenzije; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

4.7. Genska karakterizacija virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4 uzastopno kultiviranog na fibroblastima pilećih embrija

Genska karakterizacija vCE1E2-HCV-MRV2 MS je pokazala kako je taj uzorak nestabilan tijekom uzastopne kultivacije na stanicama Vero. Moguće je da je uočena nestabilnost svojstvena za proučavani virus, ili je nastala kao posljedica njegove adaptacije okolišnim uvjetima specifičnim za staničnu liniju Vero. Budući da sam postupkom razdvajanja virusnih varijanti iz vCE1E2-HCV-MRV2 MS dobila uzorak koji je imao nisku razinu heterogenosti, vCE1E2-HCV-MRV2 p4, zanimalo me kako će se takav virus ponašati tijekom kultivacije na nekoj drugoj staničnoj kulturi. Stoga sam odabrani cijepni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4 uzastopno kultivirala 10 pasaža na fibroblastima pilećih embrija, primarnoj staničnoj kulturi koja se koristi za proizvodnju cjepiva protiv virusa zaušnjaka (Rubin i Plotkin, 2013).

Za pripremu prvog pasaža, fibroblaste pilećih embrija sam inficirala u triplikatu virusom vCE1E2-HCV-MRV2 p4 pri $\text{MOI } 10^{-1}$, jer pri $\text{MOI } 10^{-3}$ koji sam koristila tijekom infekcija stanica Vero nisam dobila uspješnu infekciju. Za uzastopnu kultivaciju sam od 2. do 10. pasaža prenosila 100 μL virusnog supernatanta iz svakog prethodnog pasaža (opisano u tablici 13). Budući da u dvije od tri inicijalne replike umnažanjem metodom PCR nisam mogla dokazati prisustvo virusa tijekom prvih pet pasaža, te dvije replike sam prekinula. Unatoč izostanku vidljivog CPE-a, u preostaloj replici (r2) sam detektirala prisustvo virusa, te sam je tijekom pripreme 8. pasaža razdvojila u tri nove replike kako bih karakterizaciju virusa temeljila na više uzoraka (slika 37). Varijabilnost populacija novih replika virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4 sam potom uspoređivala s varijabilnošću populacija triju replika kontrolnog virusa vMRV2 koji je u ranijem pokusu unutar laboratorija prošao sličan kultivacijski period u trajanju od 10 pasaža. Gensku stabilnost sam analizirala metodom NGS u virusnim populacijama u supernatantima iz 10. pasaža (u nazivima uzoraka 10pCEF, od 10. pasaž na fibroblastima pilećih embrija (CEF)).



Slika 37. Shema uzastopnog kultiviranja cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 plak (p4) na stanicama fibroblasta pilećih embrija (CEF). MOI, multiplicitet infekcije; pCEF, pasaž na stanicama CEF; r, inicijalne replike u infekciji; A, B i C, replike nastale kultiviranjem od inicijalne replike r2.

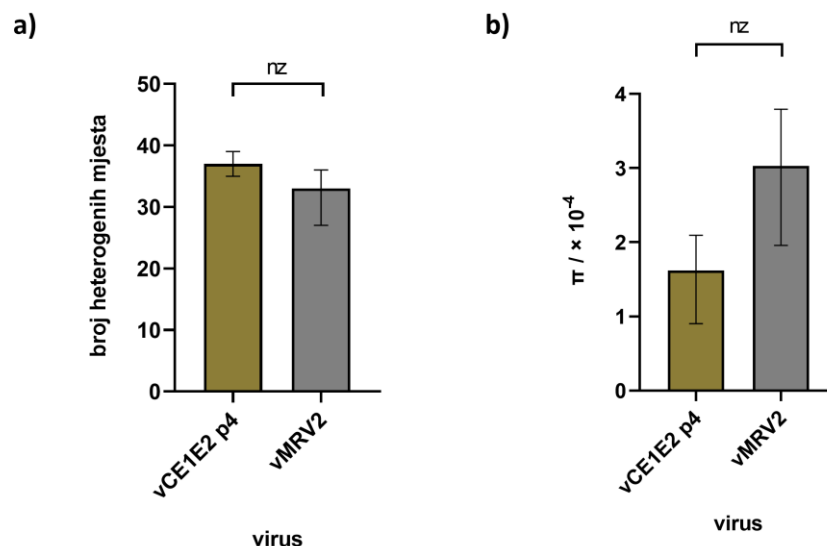
4.7.1. Mjere raznolikosti virusnih populacija

Populacije rekombinantnih virusa iz 10. pasaža na fibroblastima pilećih embrija su imale veću raznolikost od populacija inicijalnih uzoraka vCE1E2-HCV-MRV2 p4 i vMRV2 MS koje sam koristila za kultivaciju (tablica 24). To se očitovalo kroz jasan porast broja heterogenih mjesta i vrijednosti π u odnosu na inicijalne uzorke. Iako je kontrolni virus vMRV2 nakupio značajan broj promjena tijekom kultivacije, više od trećine detektiranih promjena je bilo u obliku sinonimnih supstitucija (36-45%, ovisno o replici) (prilog 5). Oba rekombinantna virusa su u 10. pasažu na fibroblastima pilećih embrija imala sličnu razinu raznolikosti: između dva virusa nisam pronašla statistički značajne razlike u broju heterogenih mjesta (slika 38a) niti u π virusnih uzoraka (slika 38b).

Tablica 24. Vrijednosti nukleotidne raznolikosti genoma (π) te broja heterogenih mjesta i konsenzusnih promjena u genomima i dodatnoj transkripcijskoj jedinici (ATU) cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 plak 4 (p4) i kontrolnog virusa vMRV2 iz 10. pasaža uzastopnog kultiviranja na fibroblastima pilećih embrija (CEF). Radi usporedbe su prikazani i podaci za inicijalne uzorke koji su korišteni za kultivaciju (vCE1E2-HCV-MRV2 p4 i matična serija virusa vMRV2).

Virusni uzorak	Genom				ATU		
	$\pi (\times 10^{-4})$	Broj heterogenih mjesta	Broj novih heterogenih mjesta ^A	Broj promjena konsenzusa ^B	Broj heterogenih mjesta	Broj novih heterogenih mjesta ^A	Broj promjena konsenzusa ^B
vCE1E2-HCV-MRV2 p4							
inicijalni uzorak	0,14	6	N/P	4	2	N/P	1
10pCEF A	0,90	37	33	23	13	12	10
10pCEF B	1,62	35	30	17	13	12	9
10pCEF C	2,09	39	34	24	16	15	13
vMRV2							
inicijalni uzorak	0,33	2	N/P	0	N/P	N/P	N/P
10pCEF A	3,79	33	32	1	N/P	N/P	N/P
10pCEF B	1,96	27	26	1	N/P	N/P	N/P
10pCEF C	3,03	36	35	4	N/P	N/P	N/P

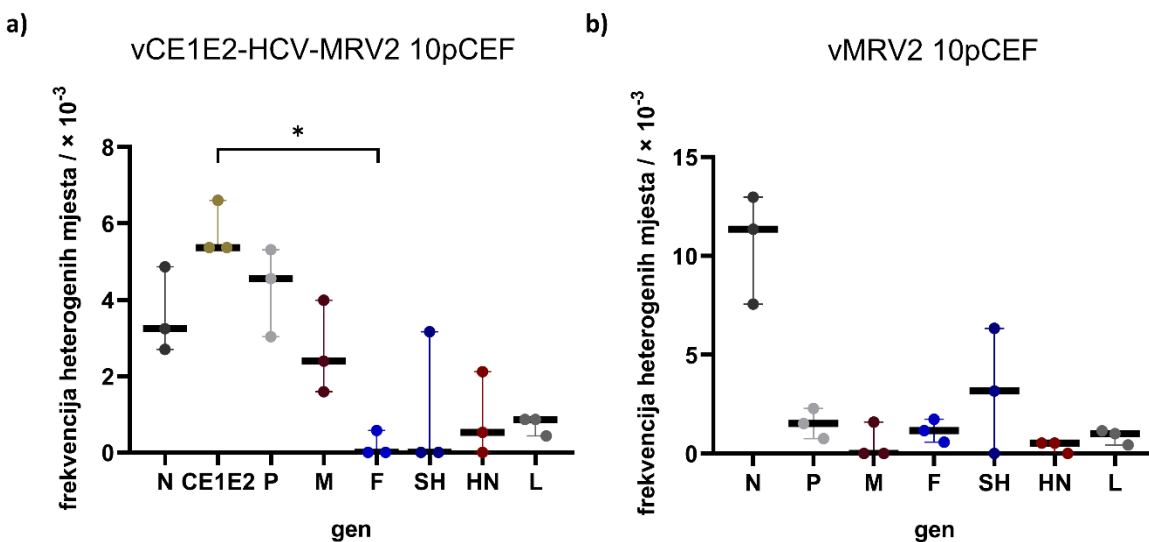
^AHeterogena mjesta koja nisu detektirana kao varijabilna u prethodno analiziranom pasažu. ^BU odnosu na sekvencije odgovarajućih rekombinantnih plazmida iz kojih su virusi proizvedeni. 10pCEF, 10. pasaž na stanicama CEF; A, B i C, replike; N/P, nije primjenjivo.



Slika 38. Mjere raznolikosti populacija cijeptog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 plak 4 (p4) i kontrolnog virusa vMRV2 iz 10. pasaža (10p) uzastopnog kultiviranja na fibroblastima pilećih embrija (CEF). Za određivanje raznolikosti populacija virusa korišteno je određivanje (a) broja heterogenih mjesta i (b) nukleotidne raznolikosti genoma (π) virusa. Podaci su za svaku skupinu prikazani u obliku medijana s 95%-tnim intervalom pouzdanosti ($n = 3$). Statističke značajnosti među skupinama su određene testom Mann-Whitney U. vCE1E2 p4, vCE1E2-HCV-MRV2 p4 10pCEF; pMRV2, pMRV2 10pCEF; nz, razlika nije statistički značajna.

4.7.2. Frekvencija heterogenih mjesta po genima

Po završetku uzastopnog kultiviranja cijeptog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 p4, ATU je imao veću frekvenciju heterogenih mjesta u usporedbi s ostalim genima kimernog virusa, ali sam statistički značajnu razliku u frekvenciji zabilježila samo u odnosu na gen F (slika 39a). Što se tiče virusa bez dodanih gena, vMRV2, gen N je u 10. pasažu ovog virusa imao visoku frekvenciju heterogenih mjesta, iako ta vrijednost nije bila statistički značajno različita od vrijednosti koje sam dobila za ostale gene (slika 39b). Unatoč tome, najmanje 51% svih varijabilnih mjesta u genomu sam zabilježila u genu N u svakom uzorku kontrolnog virusa vMRV2 (prilog 5). Ako se uspoređuju rezultati za ova dva virusa, vidljivo je da su proučavani virusi u 10. pasažu na fibroblastima pilećih embrija imali različitu distribuciju heterogenih mjesta po genima (slika 39).



Slika 39. Frekvencija heterogenih mjesta po genima u 10. pasažu uzastopnog kultiviranja (a) cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 plak 4 (p4) i (b) kontrolnog virusa vMRV2 na fibroblastima pilećih embrija (CEF). Podaci su za svaku skupinu prikazani u obliku pojedinačnih vrijednosti te medijana s 95%-tnim intervalom pouzdanosti ($n = 3$). Statističke značajnosti među skupinama su određene testom Kruskal Wallis One-Way ANOVA uz post-hoc test Dunn. 10pCEF, 10. pasaž na stanicama CEF; *, $p < 0,05$.

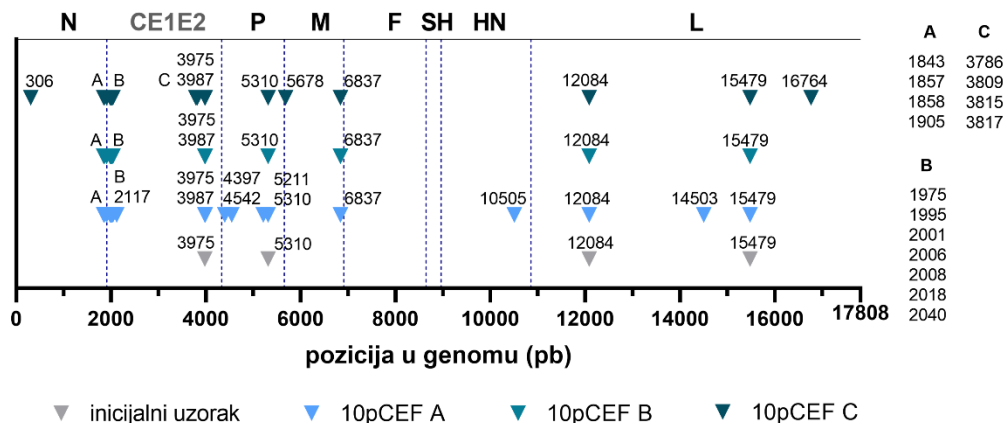
4.7.3. Konsenzusne promjene

Gledajući inicijalne uzorke vCE1E2-HCV-MRV2 p4 i vMRV2 MS, cijepni kandidat je na fibroblastima pilećih embrija nakupio znatno veći broj konsenzusnih promjena u odnosu na kontrolni virus vMRV2 (tablica 24, slika 40). Minimalno 48% promjena koje sam detektirala u svakoj replici 10. pasaža virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4 je bilo na razini konsenzusa (tablica 24), a njih ukupno 17 je bilo zajedničko svim replikama tog virusa (slika 40a). Jedina promjena konsenzusa zajednička virusima vCE1E2-HCV-MRV2 p4 i vMRV2 u 10. pasažu na fibroblastima pilećih embrija je bila supstitucija koja dovodi do aminokiselinske promjene Pro408Leu u proteinu L, koju sam u svim proučavanim uzorcima zabilježila u maksimalnom postotku (prilog 5).

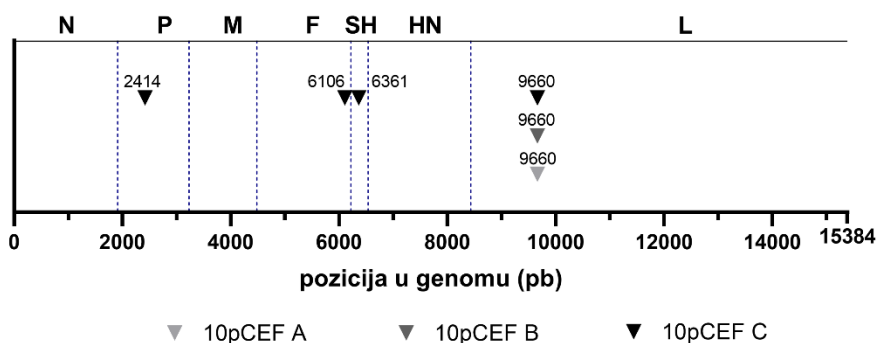
Većinu konsenzusnih promjena virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4 iz 10. pasaža sam detektirala u genu N i ATU-u (slika 40a). To je koreliralo s činjenicom da je ATU imao veću frekvenciju heterogenih mjesta u usporedbi s ostalim genima (slika 39a). Za razliku od toga, u 10.

pasažu kontrolnog virusa vMRV2 nisam uočila specifičan obrazac distribucije konsenzusnih promjena (slika 40b), unatoč tome što je gen N imao visoku frekvenciju heterogenih mjesta u tim replikama (slika 39b). One promjene konsenzusa koje sam zabilježila u uzorku vCE1E2-HCV-MRV2 p4 su se zadržale u konsenzusima svih replika tog virusa iz 10. pasaža na fibroblastima pilećih embrija (slika 40a).

a) vCE1E2-HCV-MRV2 p4



b) vMRV2



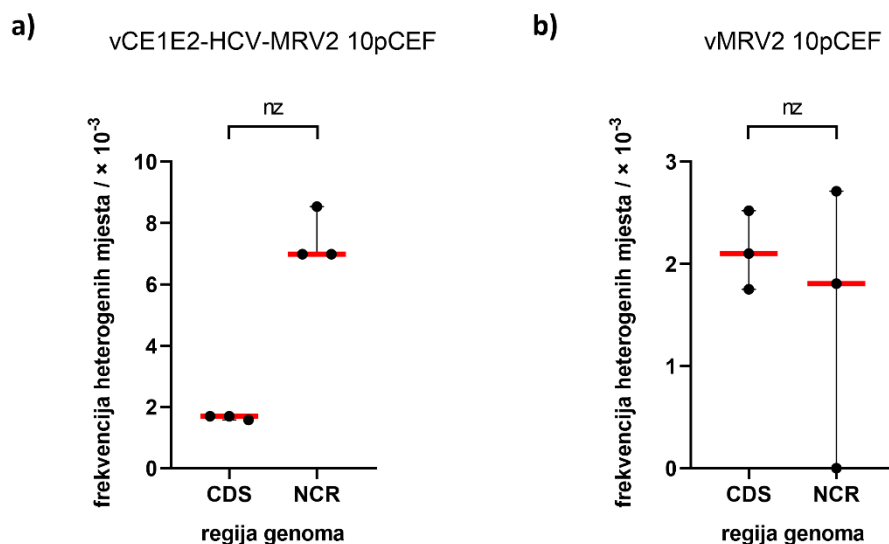
Slika 40. Pozicije konsenzusnih promjena (određenih u odnosu na sekvencije odgovarajućih rekombinantnih plazmida iz kojih su virusi proizvedeni) u 10. pasažu uzastopnog kultiviranja (a) cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 plak 4 (p4) i (b) kontrolnog virusa vMRV2 na fibroblastima pilećih embrija (CEF). Radi usporedbe su prikazani i podaci za inicijalni uzorak koji je korišten za kultivaciju (vCE1E2-HCV-MRV2 p4), dok inicijalni uzorak matične serije virusa vMRV2 nije imao konsenzusnih promjena. Virusni geni su označeni iznad odgovarajuće regije u genomu (dodatna transkripcijska jedinica je označena sivom bojom). Pozicije konsenzusnih promjena u odnosu na duljinu virusnog genoma su naznačene iznad svake oznake ili su, ako ih je bilo više u istoj regiji, indeksirane i navedene pored sheme virusnog genoma. Supstitucija koja dovodi do aminokiselinske promjene Pro408Leu u proteinu L zajednička je dvama virusima, a odgovara nukleotidnim pozicijama: 12084 za vCE1E2-HCV-MRV2 p4 i 9660 za vMRV2. 10pCEF, 10. pasaž na stanicama CEF; A, B i C, replike; pb, parova baza.

4.7.4. Heterogena mjesta u dodatnim transkripcijskim jedinicama

Većina mjesta na kojima sam uočila promjene u insertiranim sekvencijama vCE1E2-HCV-MRV2 p4 iz 10. pasaža je bila zajednička svim replikama tog virusa (prilog 5). Promjene u ATU-u sam pronašla u sekvencijama svih triju gena HCV-a, C, E1 i E2. Iako je značajan broj promjena detektiranih u ATU-u bio u visokom postotku, nisam zabilježila niti jednu supstituciju koja bi dovela do preuranjenog stop kodona (prilog 5).

4.7.5. Distribucija heterogenih mjesta u kodirajućim i nekodirajućim regijama

Za vrijeme uzastopne kultivacije na fibroblastima pilećih embrija, dva rekombinantna virusa su imala različitu distribuciju heterogenih mjesta u regijama CDS i NCR. Dok su frekvencije heterogenih mjesta tih dvaju regija u 10. pasažu kontrolnog virusa vMRV2 bile slične, u istom pasažu cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 p4 sam zabilježila povećanu frekvenciju heterogenih mjesta u regijama NCR u odnosu na regije CDS, iako to povećanje nije bilo statistički značajno (slika 41). Minimalno 45% promjena detektiranih u regijama NCR virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4 u 10. pasažu na fibroblastima pilećih embrija sam našla u genu N. Za razliku od toga, kontrolni virus vMRV2 nije imao specifičan obrazac distribucije promjena u regijama NCR. Ponavljajuće varijabilne pozicije u sekvenciji poli(A) regije signala GE 3' NCR-a gena N nisam uočila ni kod jednog virusa (prilog 5).



Slika 41. Frekvencija heterogenih mjesta u kodirajućim (CDS) i nekodirajućim regijama (NCR) u 10. pasažu uzastopnog kultiviranja (a) cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 plak 4 (p4) i (b) kontrolnog virusa vMRV2 na fibroblastima pilećih embrija (CEF). Podaci su za svaku skupinu prikazani u obliku pojedinačnih vrijednosti te medijana s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (n = 3). Statističke značajnosti među skupinama su određene testom Mann-Whitney U. 10pCEF, 10. pasaž na stanicama CEF; nz, razlika nije statistički značajna.

4.7.6. Selekcija zajedničkih varijabilnih pozicija

Što se tiče strukture virusnih populacija, populacije cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 p4 iz 10. pasaža na fibroblastima pilećih embrija su bile slične, u smislu da sam u trima proučavanim replikama ovog virusa zabilježila ukupno 21 zajedničku varijabilnu poziciju (tablica 25). Za razliku od toga, populacije kontrolnog virusa vMRV2 iz 10. pasaža su se razlikovale u svojoj strukturi. U njima sam detektirala pet zajedničkih varijabilnih pozicija, od kojih sam samo promjenu Pro408Leu u proteinu L uočila već u inicijalnom uzorku vMRV2 MS te sam ju u maksimalnom postotku zabilježila u sve tri replike iz 10. pasaža (prilog 5).

Većina zajedničkih varijabilnih pozicija virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4 iz 10. pasaža na fibroblastima pilećih embrija je bila u obliku nesinonimnih supstitucija u regijama CDS. Zajedničke promjene sam detektirala u nekoliko gena, a najviše sam promjena zabilježila u genu N i ATU-u (geni C i E2): u ATU-u sam detektirala ukupno 10 takvih promjena (tablica 25). Veliki

broj zajedničkih promjena sam detektirala u postotku većem od 96% u svim replikama. Samo četiri takve promjene su se selektirale u procesu razdvajanja virusnih varijanti postupkom plakiranja i uočila sam ih već u inicijalnom uzorku vCE1E2-HCV-MRV2 p4 na razini konsenzusa. Sve ostale promjene detektirane u postotku većem od 96% (njih 13) su se selektirale tijekom uzastopne kultivacije virusa na fibroblastima pilećih embrija (tablica 25).

Tablica 25. Zastupljenost 21 zajedničke varijabilne pozicije detektirane u 10. pasažu uzastopnog kultiviranja cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 plak 4 (p4) na fibroblastima pilećih embrija (CEF). Podebljano su označene promjene koje su u inicijalnom uzorku koji je korišten za kultivaciju (vCE1E2-HCV-MRV2 p4) detektirane u postotku većem od 97%. Supstitucije nađene u kodirajućoj regiji dodatne transkripcijske jedinice cijepnog kandidata su podijeljene na zasebne gene virusa hepatitisa C, C, E1 ili E2.

Nukleotidna promjena*	Regija genoma	Aminokiselinska promjena*	Zastupljenost promjene (%)		
			p4 10pCEF A	p4 10pCEF B	p4 10pCEF C
C108T	5' NCR N	N/P	5,42	3,58	4,17
A1843G	3' NCR N	N/P	96,24	100	100
A1857G	3' NCR N	N/P	100	100	100
A1858G	3' NCR N	N/P	100	100	100
A1905G	3' NCR N	N/P	96,99	100	100
A1975G	5' NCR CE1E2	N/P	100	100	100
A1995G	C CDS	Lys6Arg	100	100	100
A2001G	C CDS	Gln8Arg	100	100	100
A2006G	C CDS	Lys10Glu	100	100	100
A2008G	C CDS	Lys10Glu	100	100	100
A2018G	C CDS	Asn14Asp	100	100	100
A2040G	C CDS	Asp21Gly	100	100	100
C2117A	C CDS	Arg47Ser	100	17,64	5,69
T3975G	E2 CDS	Leu283Arg	100	100	100
C3987T	E2 CDS	Thr287Met	100	100	100
T4542A	P, V, I CDS	Val47Glu	100	11,07	8,91
G5310A	P CDS	Gly304Arg	100	100	97,58
A6837G	3' NCR M	N/P	100	100	97,42
C12084T	L CDS	Pro408Leu	100	100	100
C14503A	L CDS	Phe1214Leu	97,58	15,30	8,46
T15479G	L CDS	Ser1540Ala	97,85	100	100

*Prva oznaka odgovara plazmidnoj sekvenciji, druga oznaka odgovara virusnoj sekvenciji. 10pCEF, 10. pasaž na stanicama CEF; CDS, kodirajuća regija; NCR, nekodirajuća regija; N/P, nije primjenjivo.

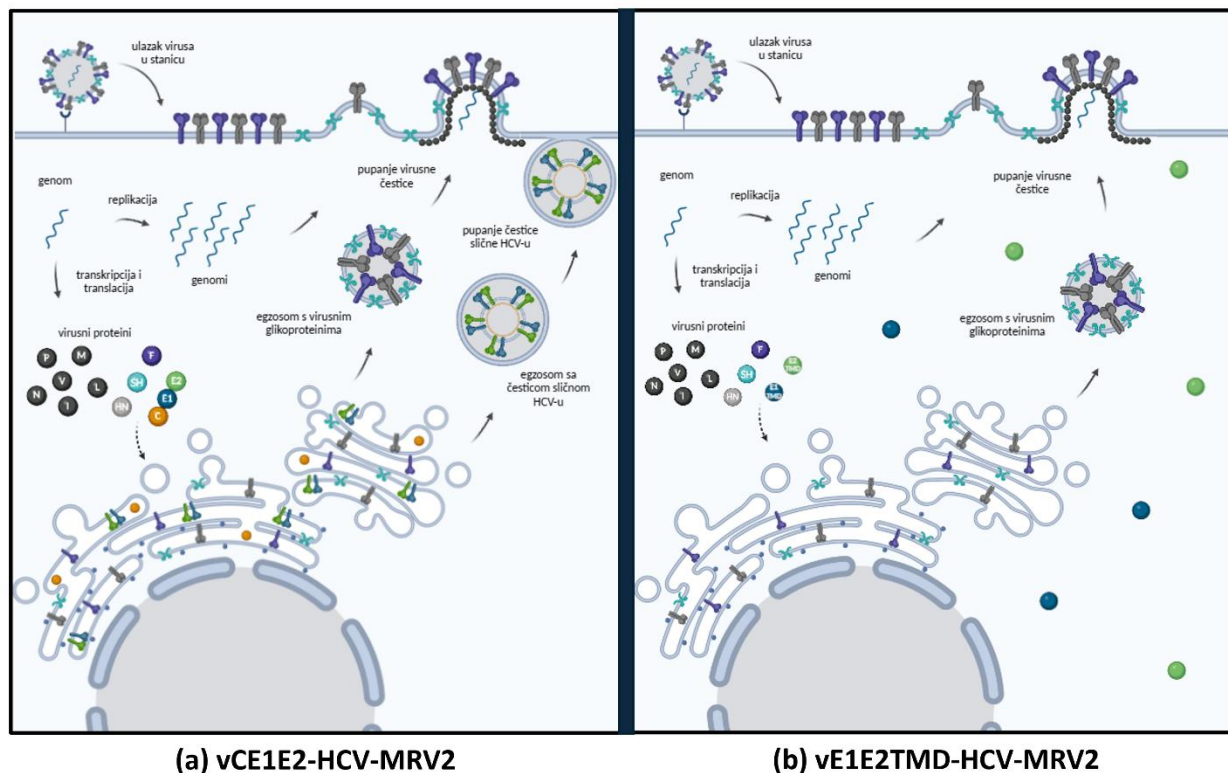
Ukratko sumirano: tijekom kultivacije virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4 i vMRV2 na fibroblastima pilećih embrija došlo je do porasta raznolikosti virusnih populacija. Oba rekombinantna virusa su u 10. pasažu imala sličnu razinu raznolikosti, ali različitu frekvenciju

heterogenih mjesta s obzirom na njihovu distribuciju po pojedinim genima ili po regijama CDS/regijama NCR. Cijepni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4 je nakupio znatno veći broj konsenzusnih promjena te zajedničkih varijabilnih pozicija u visokom postotku u odnosu na virus bez dodanih gena, vMRV2. Većinu promjena oba tipa u 10. pasažu virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4 sam detektirala u prvim dvama genima: genu N i ATU-u.

5. RASPRAVA

Živa atenuirana cjepiva djeluju na način da omogućuju ograničenu infekciju i replikaciju oslabljenog virusa u organizmu cijepljene osobe, izazivajući pritom snažan humoralni i stanični imunosni odgovor. Temeljem njihovih svojstava su se razvila rekombinantna vektorska cjepiva, kod kojih su principi imunizacije i zaštite isti, a s genoma tih virusa se eksprimiraju strani geni koji izazivaju dodatne odgovore specifične za patogen od interesa.

Cilj ovog istraživanja je bio dizajnirati kimerne viruse temeljene na konsenzus sekvenciji cijepnog soja virusa zaušnjaka s ugrađenim genima za površinske proteine E1 i E2 HCV-a za koji ne postoji profilaktičko cjepivo te ispitati njihova biološka svojstva. Za dizajn virusa sam koristila gene HCV-a podrijetlom od subtipa 1b jer je on najzastupljeniji na području Europe (Martinez i Franco, 2020). Viruse sam pripremila pomoću sustava reverzne genetike baziranog na soju L-Zagreb koji je uspostavljen u našem laboratoriju (Slović i sur., 2021). Budući da su prijašnja istraživanja pokazala da cijepni kandidati bazirani na VSV-u i virusu ospica s ugrađena prva tri gena HCV-a mogu efikasno eksprimirati glikoproteine E1 i E2 i inducirati HCV-specifične imunodne odgovore (Ezelle i sur., 2002; Reyes-del Valle i sur., 2012), virus vCE1E2-HCV-MRV2 sam dizajnirala tako da sadrži gene C, E1 i E2 HCV-a. Ovdje sam dodala i gen C jer C-terminalni kraj ovog proteina (aminokiseline 171-195 u sekvenciji poliproteina HCV-a) omogućuje usmjeravanje poliproteina HCV-a na membranu ER-a (Oehler i sur., 2012), gdje se odvijaju sinteza, procesiranje i smatanje svih proteina (Carrère-Kremer i sur., 2004; Goffard i Dubuisson, 2003; Penin i sur., 2004). Virus vE1E2TMD-HCV-MRV2 sam dizajnirala tako da sadrži ektodomene glikoproteina HCV-a, E1 i E2, vezane na domenu TMD/CD proteina F virusa zaušnjaka. Obzirom da je ranije pokazano da cijepni kandidat baziran na virusu ospica koji je slično dizajniran može djelovati kao cjepivo protiv HCV-a (Reyes-del Valle i sur., 2012), željela sam ispitati može li i virus zaušnjaka biti funkcionalan kao vektor kada se u njega ugrade dva dodatna gena. Proteini E1TMD i E2TMD bi se, zbog dodatka domene TMD/CD proteina F virusa vektora, u teoriji mogli ugrađivati u čestice virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2, što bi ga činilo biosigurnosnim rizikom. S ciljem da se onemogući ugradnja u virusne čestice, kimerni glikoproteini tog virusa nisu sadržavali signale za usmjeravanje u ER i transport na površinu stanice. Replikativni ciklusi dvaju kimernih virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 prikazani su na slici 42.



Slika 42. Shematski prikaz replikativnih ciklusa kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C (vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2). Virusi ulaze u stanicu fuzijom virusne i stanične membrane. Genomi virusa se repliciraju stvarajući nove genome koji će se pakirati u nove virusne čestice, a procesom transkripcije i translacije nastaju virusni proteini. Glikoproteini virusa zaušnjaka SH, F i HN, skupa s poliproteinom CE1E2 virusa vCE1E2-HCV-MRV2 na slici (a), ulaze u endoplazmatski retikulum (ER) te prolaze kroz stanični sustav vezikula. Egzosomi s proteinima SH, F i HN virusa zaušnjaka se transportiraju do stanične membrane, gdje ostvaruju interakcije s virusnim genomom i ostalim proteinima virusa zaušnjaka te se novi virioni od membrane odvajaju pupanjem. (a) U ER-u se poliprotein CE1E2 cijepa na tri zasebna proteina djelovanjem stanične signalne peptidaze i signalne peptidaze te se formiraju čestice slične HCV-u. One sustavom vezikula budu transportirane van stanice. (b) Tijekom infekcije s vE1E2TMD-HCV-MRV2, proteini E1TMD i E2TMD ne ulaze u ER, ne glikoziliraju se i ostaju u citoplazmi.

5.1. Osnovna biološka svojstva kimernih virusa

Oba kimerna virusa dizajnirana u ovom radu (vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2), kao i virus bez dodanih gena, vMRV2, te virus s ugrađenim genom za EGFP, vMRV3, proizvela sam u visokom titru. To je vrijedilo i za četiri rekombinantna virusa zaušnjaka dobivena pomoću istog sustava reverzne genetike (tijekom prijašnjih istraživanja u Laboratoriju za molekularnu biomedicinu Centra za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji u Zagrebu), čiji su genomi modificirani na druge načine (ugradnjom gena za protein F hRSV-a; ugradnjom gena za EGFP i dodatkom nasumičnih nukleotida u regiju NCR gena HN; maksimalnim povećanjem broja dinukleotida CG i AT u genima V ili SH) (Slović i sur., 2021). Mogućnost dizajna virusa s ovako raznolikim svojstvima upućuje na plastičnost genoma virusa zaušnjaka i na njegov potencijal za korištenje kao platforme u razne biotehnološke svrhe.

Dosadašnji podaci iz literature su pokazali da se sekvencije ATU mogu učinkovito ugraditi na poziciju bilo kojeg gena u genomu virusa zaušnjaka (Ammayappan i sur., 2016; Beaty i sur., 2017; Xu i sur., 2009; Zhang i sur., 2022), što dodatno potvrđuje plastičnost ovog virusa kao vektora. Sva tri kimerna virusa analizirana u ovom radu, kao i kimerni virus vF-RSV-MRV2 s ugrađenim genom za protein F hRSV-a (Slović i sur., 2021), sadrže sekvencije ATU koje se nalaze između gena N i P. Sposobnost replikacije tih virusa bila je slična, iako se radi o virusima koji sadrže različite tipove sekvencija ATU, čiji proteinski produkti mogu: (a) ostajati u citoplazmi (vE1E2TMD-HCV-MRV2 i vMRV3), (b) usmjeravati se u ER i izlaziti van iz stanice (vCE1E2-HCV-MRV2) ili (c) ugrađivati se u virusne čestice (vF-RSV-MRV2). Rezultati koje sam dobila u ovom istraživanju doprinose karakterizaciji sustava reverzne genetike uspostavljenog u našem laboratoriju, jer pokazuju kako se između gena N i P virusa zaušnjaka mogu ugraditi proteini različitih staničnih lokalizacija bez značajnog učinka na replikativnu sposobnost virusa vektora.

U skladu s drugim studijama gdje su kao vektori korišteni virus ospica (Billeter i sur., 2009; Frantz i sur., 2021) ili virus zaušnjaka (Xu i sur., 2023; Zhang i sur., 2022), kimerni virusi dobiveni u ovom radu su u početku imali odgođenu replikaciju u odnosu na virus bez dodanih gena vMRV2, ali su u konačnici postigli sličan titar. Virus vCE1E2-HCV-MRV2 se replicirao s većom odgodom u odnosu na vE1E2TMD-HCV-MRV2, što je vjerojatno bila posljedica toga što ATU ovog virusa kodira za glikoproteine koji se usmjeravaju u ER (Billeter i sur., 2009). Osim toga, virusi vCE1E2-

HCV-MRV2, vE1E2TMD-HCV-MRV2 i vMRV2 su na inficiranim stanicama inducirali znatno različiti CPE. To je u skladu sa svojstvom virusa zaušnjaka da različiti sojevi ovog virusa uzrokuju različite promjene u morfologiji inficiranih stanica (Forcic i sur., 2010; Hviid i sur., 2008), čak i ako je riječ o kimernim virusima baziranim na istom vektoru (Zhang i sur., 2022) ili o rekombinantnim virusima koji se razlikuju samo u točkastim mutacijama (Hao i sur., 2021).

Virusne populacije u matičnim serijama virusa vCE1E2-HCV-MRV2, vE1E2TMD-HCV-MRV2, vMRV2 i vMRV3 su bile genski homogene. Ove serije virusa su imale manje od 0,1% heterogenih pozicija u svojim genomima (vrijednost π nije prelazila $1,51 \times 10^{-4}$) te samo nekoliko promjena konsenzusa u odnosu na sekvenciju plazmida korištenog u postupku reverzne genetike. Takve vrijednosti su bile slične onima koje su u radu od Slović i sur. (2021) dobivene za matične serije ostalih rekombinantnih virusa proizvedenih pomoću istog sustava reverzne genetike, uključujući i kimerni virus s ugrađenim genom za protein F hRSV-a, vF-RSV-MRV2. Generalno, vrijednosti mjera raznolikosti populacija matičnih serija triju kimernih virusa koje sam analizirala u ovom radu (9 do 14 heterogenih mjesta, vrijednost π od $0,54$ do $1,50 \times 10^{-4}$) su bile nešto više od vrijednosti kod matične serije virusa bez dodanih gena, vMRV2 MS (2 heterogena mjesta, vrijednost π od $0,33 \times 10^{-4}$), ali slične rezultatima dobivenim za matičnu seriju kimernog virusa vF-RSV-MRV2 (13 heterogenih mjesta, vrijednost π od $1,51 \times 10^{-4}$). To može biti posljedica činjenice da je vMRV2 MS prošao kroz najmanji broj pasaža tijekom svoje pripreme, ali i činjenice da je osnovna razina varijabilnosti virusa koji imaju sekvencije ATU drugačija od virusa bez dodanih gena.

Od dva virusa s dodanim genima HCV-a, samo je vCE1E2-HCV-MRV2 u sekvencijama ATU pred-matične i matične serije imao dva preuranjena stop kodona te veću frekvenciju heterogenih mjesta u odnosu na gene virusa zaušnjaka. Budući da se jedan stop kodon iz vCE1E2-HCV-MRV2 p-MS nije zadržao u vCE1E2-HCV-MRV2 MS, a drugom se zastupljenost u vCE1E2-HCV-MRV2 MS smanjila na skoro polovinu, očekivala sam da se dva preuranjena stop kodona Tyr35STOP i Arg59STOP u proteinu C iz matične serije virusa neće održati tijekom kultivacije.

5.2. Genska stabilnost kimernih virusa tijekom uzastopnog kultiviranja na kontinuiranoj staničnoj liniji za proizvodnju cjepiva

Gensku stabilnost virusnih populacija sam ispitivala na stanicama Vero. Ove stanice sam odabrala jer (a) omogućuju efikasnu replikaciju virusa zaušnjaka (Afzal i sur., 2005), uključujući i cijepni soj L-Zagreb (Muley i Dhere, 2020); (b) je riječ o kontinuiranoj staničnoj liniji koja je odobrena od strane Svjetske zdravstvene organizacije za proizvodnju živih atenuiranih virusnih cjepiva za ljudsku upotrebu (Barrett i sur., 2009; Svjetska zdravstvena organizacija, 2013); te (c) nemaju interferonsku signalizaciju (Emeny i Morgan, 1979) i kao takve predstavljaju model u kojem virusna genska diverzifikacija nije limitirana staničnim supstratom. Gensku stabilnost tijekom uzastopne kultivacije sam određivala u uzorcima: (a) 5. pasaža, jer se za proizvodnju cjepiva obično ne koristi više od 5 pasaža od matične serije (Soleimani, 2022) te (b) 10. pasaža, kako bih procijenila jesu li promjene uočene u 5. pasažu uistinu reprezentativni prikaz sastava virusne populacije.

Dizajn kultivacijskog protokola sam temeljila na dva čimbenika. Prvo, inicijalni pasaż sam pripremila s definiranim MOI-jem kako bih osigurala da oba kimerna virusa s dodanim genima HCV-a imaju jednake početne uvjete kultiviranja. Vrijednost MOI je iznosila 10^{-3} i bila je 10 puta veća od MOI-ja kojeg sam koristila u pripremi matičnih serija. Ovo je bio kompromis; vrijednost MOI-ja viša od 10^{-4} je smanjila vjerojatnost genskog drifta (Willemssen i Zwart, 2019), a vrijednost MOI-ja višu od 10^{-3} nisam koristila kako bih minimalizirala vjerojatnost nakupljanja defektnih interferirajućih čestica koje sadrže nestandardne virusne genome (Šantak i sur., 2015). Drugo, od 2. do 10. pasaža sam održavala dvije linije uzastopnog kultiviranja, na način da sam prenosila 1 ili 100 μ L virusnog supernatanta iz svakog prethodnog pasaža i nisam kontrolirala MOI. Ovo sam radila jer sam željela identificirati ponavljajuće evolucijske trendove koji se javljaju u spektru MOI-ja. Vrijednosti MOI-ja sam retroaktivno odredila za pasaže 2., 3. i 6., a varirale su od 0,01 do 0,16 u liniji A i od 0,40 do 2,78 u liniji B za vCE1E2-HCV-MRV2, odnosno, od 0,04 do 0,42 u liniji A i od 0,47 do 12,61 u liniji B za vE1E2TMD-HCV-MRV2.

Svi virusi koje sam analizirala u ovom radu su pokazali da za vrijeme kultivacije na stanicama Vero dolazi do porasta raznolikosti njihovih populacija. Kimerni virusi vCE1E2-HCV-MRV2, vE1E2TMD-HCV-MRV2 i vMRV3 su tijekom kultivacije zadržali veću raznolikost

populacija u odnosu na vMRV2. Ovo svojstvo je vrijedilo i za dvije replike kimernog virusa vF-RSV-MRV2 analizirane u radu od Slović i sur. (2021), koje su u 10. pasažu imale 4,5 i 5,0 puta veći broj heterogenih mjesta te 1,9 i 2,5 puta veći π u odnosu na vMRV2. Za viruse s dodanim genima HCV-a sam porast raznolikosti i broja novih heterogenih mjesta primijetila samo u prvih pet pasaža. Iako je broj promjena konsenzusa nastavio rasti od 5. do 10. pasaža, 85% tih promjena sam identificirala već u 5. pasažu, a kod virusa vCE1E2-HCV-MRV2 su one bile prisutne u relativno visokim postocima. To znači da se kod virusa vCE1E2-HCV-MRV2 većina selekcijskog procesa odvila tijekom prvih pet pasaža, dok kod virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 taj period nije bio dovoljan da se u potpunosti završi proces diverzifikacije virusne populacije. Rezultati laboratorijske evolucije virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2 pokazuju da procedura u kojoj se od dobivanja virusa do proizvodnje matične serije koristi minimalan broj pasaža (Soleimani, 2022) nije idealan način za pripremu svih rekombinantnih RNA virusa.

Jedan od ciljeva ovog rada je bio odrediti hoće li tijekom kultiviranja sekvencije ATU nakupiti veći broj promjena u odnosu na gene virusa zaušnjaka. Kao što sam uočila već u uzorku matične serije, virus vCE1E2-HCV-MRV2 je tijekom uzastopne kultivacije u ATU-u imao veću frekvenciju heterogenih mjesta u odnosu na ostatak genoma (uz izuzetak gena N koji je imao najveću frekvenciju heterogenih mjesta). Za ostala dva kimerna virusa analizirana u ovom radu, vE1E2TMD-HCV-MRV2 i vMRV3, frekvencija heterogenih mjesta u sekvencijama ATU bila je jednaka ostalim virusnim genima. Podaci iz literature isto tako pokazuju da sekvencije ATU nisu varijabilnije od ostatka genoma. Pri tome je bitno naglasiti da je većina radova stabilnost sekvencija ATU analizirala na konsenzusnoj razini, dok je manji broj njih koristio analizu određivanja raznolikosti virusnih populacija pomoću metode NGS. Koristeći metodu NGS, Viktorova i sur. (2018) pokazali su da u populacijama cijepnog kandidata baziranog na NDV-u s ugrađenim genima poliovirusa tipa 1 nisu zabilježena značajna nakupljanja točkastih mutacija u sekvencijama ATU tijekom uzastopne kultivacije. Isto je pokazano i za kimerni virus zaušnjaka s ugrađenom genom za EGFP (Bamford i sur., 2019). Ovi podaci ukazuju da činjenica hoće li ATU nakupiti veći broj promjena u odnosu na vektorske gene ovisi o vektoru koji je korišten ili o kombinaciji vektora i inserta.

Općenito, veći broj heterogenih mjesta, konsenzusnih promjena i zajedničkih varijabilnih pozicija sam kod vCE1E2-HCV-MRV2 zabilježila u prvoj trećini genoma, u genu N, ATU-u i

genu P, dok su iste te vrste promjena kod vE1E2TMD-HCV-MRV2 bile stohastički raspoređene. Povećan broj promjena u genima N i P virusa vCE1E2-HCV-MRV2 je u skladu s rezultatima od Bamford i sur. (2019); oni su proizveli rekombinantne viruse zaušnjaka u kojima su detektirali nakupine visokozastupljenih promjena u tim genima. Visokozastupljene promjene u genu N su detektirane i u vMRV3 analiziranom u ovom radu, koji doduše nije imao najveću frekvenciju heterogenih mjesta u tom genu, te u kimernom virusu vF-RSV-MRV2 analiziranom od strane Slović i sur. (2021). Sličan afinitet za nakupljanje promjena na 3' kraju genoma je uočen i u kimernim virusima zaušnjaka dobivenim insercijskom mutagenезom, kod kojih su se nasumično dizajnirani transpozoni preferirano ugrađivali u gene N i P (Ikegame i sur., 2020). Ovi podaci ukazuju da rekombinantni virusi zaušnjaka mogu tolerirati promjene na 3' dijelu genoma, no zasad nije poznato omogućuju li uočene promjene selekcijsku prednost tim virusima ili se samo mogu dobro komplementirati djelovanjem ostalih genoma u populaciji.

Oba kimerna virusa s dodanim genima HCV-a su imala ponavljajuće varijabilne pozicije u sekvenciji poli(A) regije gena N koja sadrži 6 adenzina i nalazi se na kraju 3' NCR-a gena N i svih sekvencija ATU. Čak 88,89%, odnosno, 63,16% promjena zabilježenih u regijama NCR virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 sam detektirala u poli(A) regijama gena N i ATU-a, a kod vCE1E2-HCV-MRV2 je taj broj bio tako velik da je doveo i do povećane frekvencije mutacija u regijama NCR. Slijed od šest adenzina se nalazi na kraju svakog od sedam gena virusa zaušnjaka (Kolakofsky i sur., 1998) te na pet drugih pozicija unutar regija CDS u genomu. Međutim, povećan broj promjena sam zabilježila samo u opisanim poli(A) regijama (većinom u genu N), što sugerira da ova poli(A) regija djeluje kao mutacijsko žarište (*mutational hotspot*) za RdRp. Povećan broj promjena u području poli(A) regije gena uzvodno od ATU-a je prethodno zabilježen i kod kimernog VSV-a s ATU-om pozicioniranim između gena N i P (Wertz i sur., 2002) ili između gena G i L (Quiñones-Kochs i sur., 2001). Ovi kimerni virusi su osim supstitucija (Wertz i sur., 2002), imali i promjene u duljini poli(A) regija te supstitucije u tetranukleotidnom slijedu koji prethodi poli(A) regijama (Quiñones-Kochs i sur., 2001; Wertz i sur., 2002). Za kimerne viruse dobivene u ovom radu ne mogu sa sigurnošću tvrditi da nisu imali promjene u duljini poli(A) regija, budući da sam insercije i delecije u njihovim genomima mogla detektirati samo ako je njihova zastupljenost bila veća od 50%. Promjene u poli(A) regijama utječu na terminaciju transkripcije i sprječavaju transkripciju mRNA nizvodnog gena u monocistronsom obliku, što posljedično umanjuje njegovu ekspresiju. U stanicama u kojima sam detektirala

ekspresiju proteina E2 HCV-a nisam kvantificirala monocistronska mRNA za proteine C, E1 i E2, međutim, najveću količinu proteina E2 dobila sam u uzorcima koji su imali najmanji postotak promjena unutar poli(A) regije gena N (vCE1E2-HCV-MRV2 MS i 10pV A3).

Analiza strukture populacija pokazala je da je virus vCE1E2-HCV-MRV2 imao manje promjena u položaju varijabilnih pozicija u odnosu na vE1E2TMD-HCV-MRV2, odnosno da je kod tog virusa došlo do održavanja genskih karakteristika za vrijeme uzastopnog kultiviranja. S druge strane, manjak reproducibilnosti kod vE1E2TMD-HCV-MRV2 sugerira da populacije tog virusa vjerojatno ne bi bile konzistentne u sustavu proizvodnje cjepiva u kojem se iz matične serije cjepiva proizvode daljnjim supkultiviranjem.

Jedina zajednička varijabilna pozicija koja se pozitivno selektirala u populacijama sva četiri analizirana virusa, vCE1E2-HCV-MRV2, vE1E2TMD-HCV-MRV2, vMRV2 i vMRV3, je bila Pro408Leu u proteinu L. Ona je zabilježena i u populacijama svih ostalih rekombinantnih virusa koji svoje podrijetlo vuku iz plazmida pMRV2 (Slović i sur., 2021). Riječ je o reverziji promjene koja je uvedena nehotice prilikom kloniranja pMRV2. Sekvencija proteina L soja L-Zagreb, kao i sve sekvencije proteina L virusa zaušnjaka, na poziciji 408 sadrži leucin. Već otprije je poznato da je aminokiselina 408 dio jednog od visokokonzerviranih blokova definiranih za proteine L paramiksovirusa (Poch i sur., 1990); u ovom radu sam pokazala da se u strukturi proteina L virusa zaušnjaka ona nalazi u sredini α -heliksa smještenog blizu katalitičke domene RdRp-a. Ako se prolina nađu u α -heliksima, oni obično uzrokuju njegovo savijanje, zbog čega su većinom pozicionirani samo u prvim zavojima α -heliksa ili na pozicijama gdje polipeptidni lanac mijenja smjer (MacArthur i Thornton, 1991). Zasad nije poznato je li do reverzije prolina u leucin na poziciji 408 došlo zbog toga što je prolin imao negativan prostorni učinak na domenu RdRp ili je leucin na toj poziciji bio neophodan za katalitičku aktivnost enzima.

Osim ove promjene, u populacijama virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 sam zabilježila još nekoliko karakterističnih zajedničkih varijabilnih pozicija koje su se sve pojavile za vrijeme prilagodbe virusa na stanice Vero. Samo jedna takva promjena, Leu4Ile u proteinu L virusa vE1E2TMD-HCV-MRV2, se pozitivno selektirala. Strukturni položaj aminokiseline 4 u ovom radu nisam mogla odrediti jer kristalne strukture N-terminalnih krajeva proteina L virusa srodnih virusu zaušnjaka zasad nisu određene (Abdella i sur., 2020; Cong i sur., 2023), ali je poznato da je riječ o nekonzerviranoj aminokiselini (Poch i sur., 1990). Iako su obje

aminokiseline detektirane na ovoj poziciji slične po svojim svojstvima, postoje primjeri kada su njihove supstitucije imale značajan učinak na funkciju proteina (Feller i sur., 2000; Sitbon i sur., 1991). Obzirom da je varijanta s izoleucinom na poziciji 4 zabilježena i u izolatu divljeg tipa virusa zaušnjaka podrijetlom iz nedavne epidemije u New Yorku (Bryant i sur., 2022), moguće je da ova supstitucija virusu vE1E2TMD-HCV-MRV2 omogućuje određenu selekcijsku prednost u kontekstu virusne replikacije.

Od ostalih zajedničkih varijabilnih pozicija svakako treba izdvojiti dvije iz ATU-a virusa vCE1E2-HCV-MRV2 koje se doduše, nisu pozitivno selektirale, ali su se održale u postocima višim od 20%. Prva promjena iz ATU-a, Leu283Arg, se nalazi u području β -ploče smještene u regiji baze proteina E2 (Torrents de la Peña i sur., 2022) i zasad nije zabilježena u postojećim sekvencijama proteina E2, subtipa 1b. Za aminokiselinu 283 je nedavno otkriveno da se nalazi unutar epitopa za konformacijsko antitijelo nAbs HEPC111 koje se veže na protein E2 u kompleksu s E1 te je predložena kao jedna od konzerviranih aminokiselina koje imaju ulogu u stabilizaciji fuzije membrana prilikom ulaska HCV-a u stanicu (Pfaff-Kilgore i sur., 2022). S obzirom na njihovu različitu prirodu, supstitucija leucina za arginin može dovesti do gubitka hidrofobnih interakcija (Cherian i sur., 2021) te posljedično utjecati na strukturu konformacijskog epitopa u proteinu E2. I druga promjena iz ATU-a, preuranjeni stop kodon Tyr35STOP u proteinu C koji rezultira sintezom skraćenog proteina C HCV-a i gubitkom sinteze ostala dva proteina koji su dio istog ATU-a, E1 i E2, utječe na promjenu sastava epitopa dodanih proteina virusa vCE1E2-HCV-MRV2. Tako skraćenom proteinu C od 34 aminokiseline nedostaje nekoliko epitopa pretpostavljenih za protein C HCV-a (Ferroni i sur., 1993; Sällberg i sur., 1992), što znači da imunizacija s navedenim konstruktom ne bi rezultirala samo smanjenim imunim odgovorom na proteine E1 i E2 HCV-a, već i na sam protein C.

Preuranjeni stop kodoni u sekvencijama ATU su nađeni kod oba kimerna virusa s dodanim genima HCV-a, a osim toga, i u još jednom kimernom virusu analiziranom u radu od Slović i sur. (2021) koji svoje podrijetlo vuče iz plazmida pMRV2, vF-RSV-MRV2. Od svih preuranjenih stop kodona koje sam detektirala u virusima s dodanim genima HCV-a, promjena Tyr35STOP u proteinu C virusa vCE1E2-HCV-MRV2 je jedina koju sam detektirala u uzorku matične serije te se održala u svim uzorcima virusa tijekom uzastopne kultivacije. Ovakve vrste promjena u sekvencijama ATU kimernih virusa su već ranije zabilježene u literaturi. Tako je za cijepnog

kandidata MEDI-534 pokazano da je udio preuranjenog stop kodona u genu F hRSV-a, koji je u cijepnom pripravku detektiran u niskom postotku, porastao u populacijama virusa izoliranih iz cijepljenika, što je posljedično dovelo do smanjenja hRSV-specifičnog seroodgovora (C. F. Yang i sur., 2013).

Još jedan mehanizam kojim se može narušiti genska stabilnost sekvencija ATU je delecija insertiranih sekvencija. Za vrijeme uzastopne kultivacije, tri različite unutrašnje delecije sam zabilježila u genomima virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2, dok takve promjene nisam zabilježila kod virusa vMRV3, niti kod prethodno opisanog virusa vF-RSV-MRV2 (Slović i sur., 2021). Svaka od tih delecija je rezultirala uklanjanjem poli(A) regije gena N te produljenjem 3' NCR-a gena N sa 111 na 597, 699 ili 765 nukleotida. Ovako duge regije 3' NCR gena N nisu karakteristične za viruse roda *Orthorubulavirus*, kao ni za većinu virusa porodice *Paramyxoviridae*, izuzev virusa Nipah i virusa Hendra. Spomenuti virusi na 3' krajevima transkripcijskih jedinica imaju duge regije NCR (Wang i sur., 2000), od kojih su najduže regije NCR na 3' kraju gena N, čija je duljina slična onoj zabilježenoj kod virusa s delecijama u ovom radu (586 i 568 nukleotida u virusu Nipah, odnosno, virusu Hendra). Mehanizam kojim su nastale uočene unutrašnje delecije je vjerojatno sličan onome koji dovodi do stvaranja defektnih virusnih genoma s unutrašnjim delecijama, nestandardnih virusnih genoma koji se redovito nalaze u prirodnim populacijama virusa te se ne mogu replicirati bez prisustva cjelovitih genomskih varijanti (González Aparicio i sur., 2022; Vignuzzi i López, 2019). Činjenica da su kimerni virusi s delecijama imali slabiju, ali još uvijek detektabilnu, ekspresiju gena E2 u odnosu na viruse s cjelovitom genomskom strukturom, potvrđuje da se u njihovim populacijama isto tako nalaze cjelovite genomske varijante. Zasad nije poznato mogu li se varijante s produženim regijama 3' NCR gena N replicirati bez prisutnosti cjelovitih genomskih varijanti u populaciji.

Gubitak ekspresije stranih gena tijekom uzastopne kultivacije je već ranije zabilježen u literaturi, npr. kod kimernog VSV-a koji između gena G i L ima ugrađeni protein CD4⁺ ili protein F virusa ospica (Quiñones-Kochs i sur., 2001) te kod cijepnog kandidata, virusa ospica koji između gena P i M ima ugrađeni cjeloviti protein šiljka virusa SARS-CoV-2 (Frantz i sur., 2021). Ovaj potonji slučaj je posebno zanimljiv jer pokazuje kako se gubitak ekspresije stranog gena povezuje s dva različita događaja na genomskoj razini. Tako su virusi iz inficiranih stanica sadržavali mutacije koje uvodi adenzin deaminaza koja djeluje na RNA (*adenosine deaminase acting on*

RNA, ADAR), a virusi iz supernatanta stanične kulture mutacije u intergenskoj sekvenciji koja prethodi ATU-u (Frantz i sur., 2021). Ovakve razlike u genomima virusa koji se nalaze u inficiranim stanicama i onih koji se nalaze u supernatantu stanične kulture su možebitno postojale i u uzorcima vCE1E2-HCV-MRV2, kod kojih razina ekspresije gena C i E2 HCV-a u inficiranim stanicama nije korelirala s postotkom preuranjenog stop kodona Tyr35STOP u proteinu C koji je u virusima iz supernatanta detektiran metodom NGS.

Za razliku od vCE1E2-HCV-MRV2, u stanicama inficiranim uzorcima vE1E2TMD-HCV-MRV2 nisam mogla detektirati ekspresiju gena E2 korištenjem antitijela AP33. Moguće objašnjenje za to je nedostatak signala za usmjeravanje u ER koji dovodi do toga da u nedostatku glikozilacije, proteini E1TMD i E2TMD ne poprimaju pravilnu konformaciju (Lavie i sur., 2018), što onda vjerojatno utječe na strukturu epitopa u ektodomeni proteina E2 HCV-a i na njihovo prepoznavanje. Drugo potencijalno objašnjenje je da je uslijed dodavanja domene TMD/CD proteina F virusa zaušnjaka na ektodomenu proteina E2 došlo do promjene u konformaciji ektodomena.

Shodno svemu navedenom, genska karakterizacija virusnih populacija je pokazala kako je tijekom kultivacije na stanicama Vero stabilnost kimernih virusa s dodanim genima HCV-a bila narušena djelovanjem različitih mehanizama. Virus vE1E2TMD-HCV-MRV2 je imao dva svojstva koja su bila nepovoljna za nastavak istraživanja, nisku reproducibilnost tijekom kultiviranja i nemogućnost detekcije stranih proteina. Daljnje faze biološke karakterizacije, ispitivanje imunogeničnosti i neurovirulentnog potencijala, sam provela samo na vCE1E2-HCV-MRV2, ali sam za početak izolirala virusnu varijantu koje nije ispoljavala virusne karakteristike koje negativno utječu na gensku stabilnost.

5.3. Selekcija cijepnog kandidata s niskom razinom heterogenosti

Virusne varijante iz vCE1E2-HCV-MRV2 MS sam razdvojila postupkom plakiranja, tehnikom koja omogućuje smanjenje varijabilnosti populacija (López-Muñoz i sur., 2021) i nasumičan odabir varijanti genoma već prisutnih u populaciji (Domingo i sur., 2012). Selekcijom virusa s niskom razinom heterogenosti u cijelom genomu odabrala sam cijepni kandidat, vCE1E2-HCV-MRV2 p4, koji je imao znatno manji broj heterogenih mjesta i vrijednosti π u odnosu na

uzorak iz kojega je dobiven (6 u odnosu 14 heterogenih mjesta, vrijednost π od $0,14 \times 10^{-4}$ u odnosu na $1,50 \times 10^{-4}$). Ovaj virus je imao sve promjene konsenzusa detektirane u vCE1E2-HCV-MRV2 MS, uz dodatak supstitucije koja dovodi do aminokiselinske promjene Ser1540Ala u proteinu L. Cijepni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4 nije pokazivao ni ostala odstupanja od očekivane teoretske sekvencije koja su prethodno uočena tijekom uzastopne kultivacije vCE1E2-HCV-MRV2 MS na stanicama Vero, kao što su uvođenje preuranjenih stop kodona i delecije u ATU-u.

Sposobnost virusa da se replicira u određenim uvjetima može biti narušena ako se izgube varijante čije je kooperativno djelovanje bitno za infektivnost (Vignuzzi i sur., 2006) ili ako tijekom infekcije nastane velik broj defektnih interferirajućih čestica koje sadrže nestandardne virusne genome (Vignuzzi i López, 2019). Cijepni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4 je imao isti replikacijski uzorak kao vCE1E2-HCV-MRV2 MS, što znači da tijekom postupka plakiranja nije došlo do gubitka fitnesa populacije.

5.4. Reproducibilnost cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 p4 pri kultiviranju

Važan čimbenik o kojem treba voditi računa u proizvodnji cjepiva je reproducibilnost proizvodnog postupka, tj. mogućnost opetovane proizvodnje cijepnih pripravaka s istim genskim svojstvima. Prije daljnjih faza biološke karakterizacije koje su uključivale rad na animalnim modelima, odlučila sam ispitati reproducibilnost pripreme virusa vCE1E2-HCV-MRV2 p4 za aplikaciju. To sam ispitivala uspoređujući sastav populacija dvaju virusnih serija koje su u većim količinama pripremljene iz istog izvornog uzorka vCE1E2-HCV-MRV2 p4. Strukture populacija virusnih serija vCE1E2-HCV-MRV2 p4S1 i p4S2 su bile izuzetno slične, čak 91% svih detektiranih promjena je bilo istovjetno za oba uzorka, dok su razlike u zastupljenosti tih promjena varirale od 0 do 11,67%. Više od pola tih istih zajedničkih varijabilnih pozicija se pojavilo i nakon kultivacije vCE1E2-HCV-MRV2 p4 na fibroblastima pilećih embrija (opisano u poglavlju 5.6), što govori u prilog tome da uzorci nastali od ovog virusa pokazuju visoku razinu reproducibilnosti.

Dvije virusne serije vCE1E2-HCV-MRV2 p4 S1 i S2 su imale slične vrijednosti i za druge parametre koji su korišteni za analizu varijabilnosti virusnih populacija (raznolikost populacija, frekvencija promjena u ATU-u i genu N te u regijama NCR tih dvaju gena i broj promjena na

razini konsenzusa). Sve spomenute vrijednosti, izuzev broja i vrste promjena konsenzusa koje su bile jednake virusu vCE1E2-HCV-MRV2 p4, su bile više u odnosu na vCE1E2-HCV-MRV2 p4, ali i na uzorak matične serije. Ovakav rezultat nije začuđujući s obzirom na to da je RdRp relativno niske točnosti te se dodatna varijabilnost unosi sa svakim replikacijskim ciklusom dok se ne dosegne plato u nemijenjajućim uvjetima (Lauring i Andino, 2010). Osim toga, i sam virus zaušnjaka može podnositi visoku razinu heterogenosti, što je nedavno pokazano analizom genske varijabilnosti soja L-Zagreb nakon tretmana s nukleozidnim analogima (Jurković, 2024).

Već samo jedan pasaž na stanicama Vero kojeg sam napravila nakon razdvajanja virusnih varijanti bio je dovoljan da se ponovno ispolje virusne karakteristike koje se povezuju s narušavanjem genske stabilnosti, kao što su povećani broj promjena u ATU-u i uvođenje preuranjenog stop kodona Tyr35STOP. Činjenica da su te karakteristike uočene kod obje virusne serije podupire hipotezu da su one ili svojstvene za ovako dizajnirani virus, ili su nastale kao posljedica njegove adaptacije na stanice Vero. Budući da su ranije dobiveni rezultati pokazali kako razina ekspresije gena E2 ne korelira sa zastupljenošću promjene Tyr35STOP, odlučila sam nastaviti s daljnjim fazama biološke karakterizacije virusa te provjeriti imunogeničnost virusnih populacija u sustavu *in vivo*.

5.5. Određivanje imunosnog profila i neurovirulentnog potencijala cijepnog kandidata *in vivo*

Glavni ograničavajući čimbenik u razumijevanju patogeneze virusa zaušnjaka i imunosnih odgovora potrebnih za zaštitu od infekcije je nedostatak prikladnih animalnih modela (Gouma i sur., 2016). Osim ljudi, primati su jedina skupina organizama koja pokazuje kliničke znakove bolesti nakon infekcije ovim virusom (Xu i sur., 2013). Male laboratorijske životinje nisu prirodno podložne infekciji s virusom zaušnjaka, ali mogu razviti imunosni odgovor na njega (Flynn i Mahon, 2003). Za određivanje imunosnog profila cijepnog kandidata sam kao animalni model odabrala zamorčica, zato što je dokazano da: (a) se u zamorčicu virus zaušnjaka može limitirano replicirati nakon infekcije prirodnim (intranazalnim) putem (Lang Balija i sur., 2023) i (b) zamorčici imunizirani sojem L-Zagreb mogu razviti humoralni imunosni odgovor na taj virus (Halassy i sur., 2015; Šantak i sur., 2013). Zamorčice sam imunizirala cijepnim kandidatom vCE1E2-HCV-MRV2 p4S i s kontrolnim virusom vMRV2 po dvama imunizacijskim

protokolima, a imunosne odgovore specifične za virus zaušnjaka i HCV sam ispitivala nakon izazova s kontrolnim virusom vMRV3.

Za analizu odgovora specifičnog za virus zaušnjaka, određivala sam razinu virusa u dišnim putevima te količinu antitijela IgG u serumima zamorčića nakon intranazalnog izazova. Serume za određivanje količine antitijela IgG sam uzimala nakon izazova radi dobrobiti životinja, odnosno, kako ih ne bih dodatno uznemiravala vađenjem veće količine krvi prije izazova. Budući da sam krv uzela samo tri dana nakon izazova, titar antitijela IgG je primarno posljedica prvoj dvije imunizacije s vCE1E2-HCV-MRV2 p4S ili s kontrolnim virusom vMRV2. Analiza lokalne imunosti je pokazala da je kod oba virusa imunizacija uz jedno docjepljivanje bila dovoljna za postizanje lokalnog zaštitnog odgovora. Tijekom prirodne infekcije, ali i nakon cijepljenja, lokalni odgovori su bitan čimbenik koji sprječava širenje virusa zaušnjaka s početnog mjesta infekcije. Stoga je važno da rekombinantna vektorska cjepiva mogu inducirati jednako efikasne lokalne odgovore kao i originalni virus, u ovom slučaju virus L-Zagreb. Rezultate dobivene za cijepni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4S sam usporedila s rezultatima za nerekombinantni virus L-Zagreb pokazanim u studiji od Lang Balića i sur. (2023). Tada su zamorčići također bili imunizirani uz jedno docjepljivanje i nakon izazova s virusom vMRV3 nisu imali detektabilan titar virusa u dišnim putevima.

Cijepni soj L-Zagreb je tijekom svoje višegodišnje upotrebe pokazao iznimno dobre rezultate što se tiče imunogeničnosti. Prema rezultatima metaanalize objavljenim 2021., stopa serokonverzije procijenjena za soj L-Zagreb iznosi 97% (Schenk i sur., 2021). Slično je pokazano tijekom 90-ih godina u Indiji kada je postotak djece koja su četiri tjedna nakon imunizacije razvila antitijela IgG iznosio 92% (Bhargava i sur., 1995). Ti podaci su u skladu s podacima dobivenim u dvije studije provedene na području Hrvatske prije odobrenja cjepiva, na populacijama djece predškolske dobi. Serološki odgovor na cijepljenje je ispitan 5-6 tjedana nakon imunizacije s jednom dozom cjepiva u uzorcima 640 seruma; humoralni imunosni odgovori su zabilježeni u 88%, odnosno, 94% testiranih seruma (Mažuran, 2000). Shodno navedenim rezultatima, očekuje se da bi rekombinantni virusi bazirani na soju L-Zagreb trebali moći inducirati zadovoljavajuće humoralne odgovore. U slučaju bivalentnih cjepiva kao što je vCE1E2-HCV-MRV2 p4S, važno je voditi računa da ugradnja dodatnih gena ne utječe na imunosna svojstva vektora. Određivanje antitijela IgG u serumima imuniziranih životinja je pokazalo da su vCE1E2-HCV-MRV2 p4S i

vMRV2 inducirali slične humoralne odgovore specifične za virus zaušnjaka. Za razliku od kontrolnog virusa vMRV2, jačina odgovora kod cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 p4S ovisila je o broju docjepljivanja nakon primarne imunizacije te sam jači odgovor dobila primjenom protokola uz dva docjepljivanja. To je bio i razlog zašto sam humoralne odgovore specifične za HCV ispitivala samo kod zamorčica imuniziranih po tom protokolu.

Od ukupno pet zamorčica iz skupine s dva docjepljivanja, samo su kod jednog potvrđena antitijela specifična za protein E2 HCV-a, dok su kod svih potvrđena antitijela specifična za proteine virusa zaušnjaka. Zasad nije poznato što je točno razlog manjoj imunogeničnosti proteina HCV-a, ali je moguće da je ona povezana s pojavom preuranjenog stop kodona Tyr35STOP u dvama virusnim serijama korištenim u pokusima *in vivo* (u 37,44%, odnosno, 32,13% očitavanja; opisano u poglavlju 5.4.) ili s protokolom korištenim za imunizaciju. Postavke protokola su uspostavljene za virus zaušnjaka bez dodanih gena te ne moraju nužno predstavljati optimalne uvjete za imunizaciju sa svim virusima koji su na njemu bazirani. Smanjena imunogeničnost može biti povezana i sa dizajnom antigena; gene HCV-a sam u vCE1E2-HCV-MRV2 dodala u nativnom obliku. Takav dizajn je korišten i u studijama od Ezelle i sur. (2002) i Reyes-del Valle i sur. (2012), čiji su cijepni kandidati pokazali dobre rezultate što se tiče imunogeničnosti u miševima. Moguće je da je niska imunogeničnost proteina HCV-a koju sam dobila u ovom radu posljedica neoptimalne genske sekvencije tih antigena te da bi bolje rezultate dobila da je ekspresija gena HCV-a bila pojačana primjerice metodom optimizacije kodona.

Cijepni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4S je imao više od tri puta veći neurovirulentni potencijal od kontrolnog virusa vMRV2, odnosno, više od četiri puta veći neurovirulentni potencijal od kontrolnog virusa vMRV3, što sugerira da ugradnja gena za proteine HCV-a dovodi do povećanja neurovirulencije virusa zaušnjaka. Vrijednost indeksa RNVT od 8,53% koju sam odredila za vCE1E2-HCV-MRV2 p4S je bila viša od vrijednosti neurovirulencije koja bi bila prihvatljiva za cijepni soj (najviše 5%), ali još uvijek znatno niža od vrijednosti koje se dobivaju kod divljih sojeva virusa zaušnjaka (15-25%) (Sauder i sur., 2006). Determinante koje određuju virulenciju virusa zaušnjaka još uvijek nisu određene, ali je poznato da promjene heterogenosti u određenim genskim regijama (Ivancic-Jelecki i sur., 2016), kao i prisutnost defektnih interferirajućih čestica (Šantak i sur., 2015), mogu utjecati na neurovirulentni fenotip virusa. Heterogenost uzoraka vCE1E2-HCV-MRV2 p4S1 i p4S2 bila je veća od heterogenosti kontrolnih

virusa vMRV2 i vMRV3, a veći rezervoar virusnih varijanti je potencijalno omogućio bolju prilagodbu cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 p4S na uvjete u moždanom tkivu.

5.6. Genska stabilnost cijepnog kandidata tijekom uzastopnog kultiviranja na primarnoj staničnoj kulturi za proizvodnju cjepiva

Odabir stanica za kultivaciju može imati utjecaj na heterogenost virusnih populacija, što je ranije pokazano na primjerima virusa zaušnjaka sojeva Urabe AM9 (Santos-López i sur., 2006) i L-Zagreb (Kosutic-Gulija i sur., 2008). Budući da su rezultati pokazali kako je tijekom kultivacije na stanicama Vero stabilnost kimernih virusa s dodanim genima HCV-a bila narušena, odlučila sam ispitati stabilnost cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 p4 na nekoj drugoj staničnoj kulturi. Za tu svrhu sam odabrala fibroblaste pilećih embrija, stanice koje se koriste za proizvodnju soja L-Zagreb (Beck i sur., 1989).

Cijepni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4 se u korištenim uvjetima uzgoja teško prilagođavao kultivaciji na fibroblastima pilećih embrija. U dvije od tri inicijalno pripremljene replike nisam dobila detektabilnu infekciju stanica, a u trećoj replici nije došlo do razvoja vidljivog CPE-a, ali je infekcija potvrđena metodom PCR. Naknadno sam utvrdila da virus može inducirati slabo uočljiv CPE ako se kultivira svakih 14 dana, no zbog potrebe za usporedbama s kontrolnim virusom vMRV2, koristila sam kultivacijski protokol u trajanju od 7 dana.

Za oba virusa, vCE1E2-HCV-MRV2 p4 i vMRV2, sam tijekom kultivacije na fibroblastima pilećih embrija uočila porast raznolikosti populacija. Virusi su u 10. pasaži imali sličnu raznolikost, što se razlikovalo od rezultata koje sam dobila na stanicama Vero, gdje je vCE1E2-HCV-MRV2 MS imao veću raznolikost u odnosu na kontrolni virus vMRV2. Dominantan uzrok porasta raznolikosti vMRV2 na fibroblastima pilećih embrija je povećan broj promjena u genu N u odnosu na ostale gene. Promjene u genu N većinom sam zabilježila u manjim postocima (više od 61,90% promjena zabilježeno je u postotku manjem od 10%), međutim, one ipak imaju utjecaj na vrijednosti π virusa.

Tijekom kultivacije, cijepni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4 je imao sličnu distribuciju promjena kao i vCE1E2-HCV-MRV2 MS na stanicama Vero. U sekvenciji ATU sam detektirala veću frekvenciju heterogenih mjesta u odnosu na ostatak genoma, ali i u odnosu na gen N, koji je

na stanicama Vero imao nešto veću frekvenciju od ATU-a. Usprkos velikom broju promjena, nisam detektirala supstitucije koje dovode do preuranjenih stop kodona, a koje sam prethodno zabilježila kod kultivacije vCE1E2-HCV-MRV2 MS i virusnih serija korištenih u pokusima *in vivo* na stanicama Vero. Od ove dvije karakteristike koje se povezuju s narušavanjem genske stabilnosti, povećani broj promjena u ATU-u je očito svojstven za ovako dizajnirani virus, dok je pojavnost preuranjenih stop kodona svojstvo koje je vezano uz kultivaciju na stanicama Vero.

Distribucija konsenzusnih promjena i zajedničkih varijabilnih pozicija je također bila slična između kultivacija na dvama tipovima stanica, samo je kod vCE1E2-HCV-MRV2 p4 broj promjena bio znatno veći. Većina promjena je kod oba virusa detektirana u genu N i ATU-u, s time da su kod vCE1E2-HCV-MRV2 p4 one uglavnom bile u maksimalnom postotku i pozicionirane na kratkom genskom segmentu od 274 nukleotida (regija 1843-2040). Takva distribucija visoko zastupljenih promjena je bila slična onoj dobivenoj za rekombinantni virus zaušnjaka u studiji od Bamford i sur. (2019), gdje su 32 visokozastupljene mutacije bile grupirane u dvjema regijama u genu N, pozicioniranim uzvodno od regije iz ovog rada (regije 607-860 i 1225-1558). Shodno tome, rezultati ukazuju da je nakupljanje promjena na 3' dijelu genoma virusa zaušnjaka svojstveno za ovaj virus, dok uzorak po kojem se te promjene javljaju vjerojatno ovisi o okolišu u kojemu se virus kultivira.

Za razliku od vCE1E2-HCV-MRV2 MS, tijekom kultivacije cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 p4 nisam uočila ponavljajuće varijabilne pozicije u sekvenciji poli(A) regije gena N. Ovo mutacijsko žarište nisam uočila ni u virusnim serijama korištenim u pokusima *in vivo*, što znači da su se varijante koje su ga sadržavale izgubile tijekom pročišćavanja plakiranjem. S druge strane, svi spomenuti uzorci su imali povećanu frekvenciju heterogenih mjesta u regijama NCR, pogotovo u genu N i ATU-u. Ovi podaci ukazuju da ugradnja ATU-a remeti stabilnost sljedova koji inače čine prirodnu granicu između gena N i P, ali je to očitije tijekom uzastopne kultivacije na stanicama Vero nego na fibroblastima pilećih embrija.

Kada se analizira struktura populacija, cijepni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4 je u 10. pasaži imao znatno veći broj zajedničkih varijabilnih pozicija u odnosu na kontrolni virus vMRV2, što je očekivano obzirom na činjenicu da sam virusne uzorke od jedne inicijalne replike razdvojila tek u 8. pasažu. Tri pasaža su generalno dovoljna da se iz matične serije pripremi cjepivo (minimalno su potrebna dva; matična serija → radna serija → cjepivo), stoga u ovoj fazi

istraživanja nije bilo potrebe za pripremom većeg broja pasaža. Čak 13 zajedničkih varijabilnih pozicija je kod vCE1E2-HCV-MRV2 p4 nastalo kao rezultat pozitivnog selekcijskog procesa te sam ih detektirala u postotku većem od 96%, što je bilo znatno više od samo jedne pozitivno selektirane promjene kod vCE1E2-HCV-MRV2 MS na stanicama Vero. Ovi rezultati dodatno potvrđuju činjenicu da se cijepni kandidat teško prilagođavao kultivaciji na fibroblastima pilećih embrija: da bi se prilagodio na ovu staničnu kulturu, u genom je uveden veliki broj visokozastupljenih supstitucija.

Zaključno, dva kimerna virusa zaušnjaka s dodanim genima HCV-a su pokazala nestabilnost tijekom kultivacije na objema staničnim kulturama za proizvodnju cjepiva, što nije bilo u skladu s očekivanjima. Genska stabilnost soja L-Zagreb je potvrđena prije skoro dva desetljeća kada je dokazano da se virus tijekom proizvodnje ne mijenja na razini konsenzusa (Ivancic i sur., 2005). Nisam utvrdila koji je razlog smanjene stabilnosti ovih dvaju kimernih virusa, ali pretpostavljam da bi mogao biti vezan uz: (a) ugradnju na poziciju (N-P) koja je blizu početka genoma pa se strani geni eksprimiraju u velikoj količini što možda nije optimalno za virus zaušnjaka te 3' kraju varijabilnog gena N (Bamford i sur., 2019; Ikegame i sur., 2020) ili (b) dizajn stranih gena koji nije optimiran za ekspresiju u stanicama Vero i fibroblastima pilećih embrija. Ovo istraživanje naglašava potrebu za strogom kontrolom genske stabilnosti tijekom razvoja cjepiva.

Nadalje, dobiveni rezultati pokazuju da korištenje minimalnog broja pasaža između dobivanja virusa i proizvodnje matične serije može uzrokovati da proces diverzifikacije virusne populacije ne bude doveden do razine ravnoteže (*population equilibrium*) pri proizvodnim uvjetima, što posljedično može utjecati na gensku stabilnost. Što se tiče učinkovitosti i neškodljivosti, njih sam ispitala samo za plakiranjem pročišćenu varijantu virusa vCE1E2-HCV-MRV2. Pročišćeni cijepni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4S nije imao zadovoljavajuće biološke osobitosti, premda je inducirao imunosne odgovore. Ako se u budućnosti ovaj kimerni virus uspije optimirati, on ima potencijala za daljnji razvoj kao cijepni kandidat protiv HCV-a.

6. ZAKLJUČCI

- 1) Pomoću sustava reverzne genetike baziranog na soju L-Zagreb, dizajnirala sam i uspješno proizvela replikativno-sposobne kimerne viruse vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2, što znači da virus zaušnjaka može poslužiti kao platforma za ugradnju gena podrijetlom od HCV-a.
- 2) Oba kimerna virusa su se na stanicama Vero replicirala sa sličnom efikasnošću kao virus zaušnjaka koji u sebi nema dodane gene, vMRV2 i stvarala su jasan CPE. Strani geni podrijetlom od HCV-a su se kod virusa vCE1E2-HCV-MRV2 eksprimirali tijekom infekcije stanica Vero, stoga je s tog aspekta ovaj virus pogodan za daljnja istraživanja.
- 3) Genske strukture populacija kimernih virusa vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2 su bile nestabilne tijekom uzastopne kultivacije na stanicama Vero, što sam potvrdila nakupljanjem supstitucija u njihovim genomima, uvođenjem preuranjenih stop kodona, delecijama u sekvencijama ATU te uvođenjem promjena u poli(A) regiji gena N virusa zaušnjaka. Stabilnost genoma dvaju kimernih virusa bila je manja u odnosu na kimerni virus s ugrađenim genom za EGFP, vMRV3 i na virus bez dodanih gena, vMRV2.
- 4) Tijekom uzastopnog kultiviranja na stanicama Vero, vCE1E2-HCV-MRV2 je održavao iste genske karakteristike, dok je vE1E2TMD-HCV-MRV2 bio nereproducibilan. Većina heterogenih mjesta kod vCE1E2-HCV-MRV2 se pojavila u prvoj trećini genoma, dok su kod vE1E2TMD-HCV-MRV2 heterogena mjesta u genomu bila stohastički raspoređena.
- 5) Usprkos uspješnom pročišćavanju metodom plakiranja, cijeplni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4 je već nakon jednog pasaža na stanicama Vero ponovno ispoljio gensku nestabilnost u području ATU-a.
- 6) Cijeplni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4S je inducirao imunosne odgovore specifične za virus zaušnjaka koji su bili usporedivi s kontrolnim virusom vMRV2, ali nedovoljne humoralne imunosne odgovore specifične za HCV.

- 7) Ugradnja gena za površinske glikoproteine HCV-a u genom virusa vMRV2 je dovela do povećanja neurovirulencije rezultirajućeg cijepnog kandidata vCE1E2-HCV-MRV2 p4S.
- 8) Cijepni kandidat vCE1E2-HCV-MRV2 p4 se teško prilagođavao kultivaciji na fibroblastima pilećih embrija. Genska stabilnost populacija je bila narušena nakupljanjem supstitucija u ATU-u i pojavom velikog broja visokozastupljenih pozitivno selektiranih promjena u genomu, ali bez pojave preuranjenih stop kodona u ATU-u.
- 9) Procedura u kojoj se od dobivanja virusa do proizvodnje matične serije koristi minimalan broj pasaža nije idealan način za pripremu svih rekombinantnih RNA virusa te bi se zbog osiguranja veće sigurnosti i efikasnosti cijepnih kandidata taj period trebalo produžiti.

Ovdje prikazani rezultati doprinose znanju o biološkim osobitostima kimernih virusa temeljenih na konsenzus sekvenciji cijepnog soja L-Zagreb te omogućuju bolje razumijevanje genske kompleksnosti i varijabilnosti populacija kimernih virusa dobivenih iz plazmidnih klonova pri infekcijama *in vitro*.

7. POPIS LITERATURE

- Abdella, R., Aggarwal, M., Okura, T., Lamb, R. A., He, Y. (2020). Structure of a paramyxovirus polymerase complex reveals a unique methyltransferase-CTD conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(9), 4931–4941. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919837117>
- Afzal, M. A., Dussupt, V., Minor, P. D., Pipkin, P. A., Fleck, R., Hockley, D. J., Stacey, G. N. (2005). Assessment of mumps virus growth on various continuous cell lines by virological, immunological, molecular and morphological investigations. *Journal of Virological Methods*, 126(1–2), 149–156. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2005.01.032>
- Almansour, I. (2020). Mumps Vaccines: Current Challenges and Future Prospects. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1999. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01999>
- Amanna, I. J., Slifka, M. K. (2020). Successful Vaccines. *Current topics in Microbiology and Immunology*, 428, 1–30. https://doi.org/10.1007/82_2018_102
- Ammayappan, A., Russell, S. J., Federspiel, M. J. (2016). Recombinant mumps virus as a cancer therapeutic agent. *Molecular Therapy Oncolytics*, 3, 16019. <https://doi.org/10.1038/mto.2016.19>
- Bamford, C., Wignall-Fleming, E., Sreenu, V. B., Randall, R., Duprex, P., Rima, B. (2019). Unusual, stable replicating viruses generated from mumps virus cDNA clones. *PLOS ONE*, 14(7), e0219168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219168>
- Barrett, P. N., Mundt, W., Kistner, O., Howard, M. K. (2009). Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 8(5), 607–618. <https://doi.org/10.1586/ERV.09.19>
- Beaty, S. M., Park, A., Won, S. T., Hong, P., Lyons, M., Vigant, F., Freiberg, A. N., tenOever, B. R., Duprex, W. P., Lee, B. (2017). Efficient and Robust Paramyxoviridae Reverse Genetics Systems. *mSphere*, 2(2), e00376-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00376-16>
- Beck, M., Welsz-Malecek, R., Mesko-Prejac, M., Radman, V., Juzbasic, M., Rajninger-Miholic, M., Prislin-Musklic, M., Dobrovsak-Sourek, V., Smerdel, S., Stainer, D. W. (1989). Mumps vaccine L-Zagreb, prepared in chick fibroblasts. I. Production and field trials. *Journal of Biological Standardization*, 17(1), 85–90. [https://doi.org/10.1016/0092-1157\(89\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0092-1157(89)90031-0)
- Bernad, A., Blanco, L., Lázaro, J. M., Martín, G., Salas, M. (1989). A Conserved 3'→5' Exonuclease Active Site in Prokaryotic and Eukaryotic DNA Polymerases. *Cell*, 59(1), 219–228. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90883-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90883-0)
- Bernstein, D. I., Malkin, E., Abughali, N., Falloon, J., Yi, T., Dubovsky, F. (2012). Phase 1 Study of the Safety and Immunogenicity of a Live, Attenuated Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Virus Type 3 Vaccine in

- Seronegative Children. *The Pediatric infectious Disease Journal*, 31(2), 109–114. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31823386f1>
- Billeter, M. A., Naim, H. Y., Udem, S. A. (2009). Reverse Genetics of Measles Virus and Resulting Multivalent Recombinant Vaccines: Applications of Recombinant Measles Viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 329, 129–162. https://doi.org/10.1007/978-3-540-70523-9_7
- Bryant, P., Caldwell, H., Lamson, D. M., Yildirim, T., St George, K. (2022). Streamlined Whole-Genome Sequencing of Mumps Virus for High-Resolution Outbreak Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 60(1), e00841-21. <https://doi.org/10.1128/JCM.00841-21>
- Buchholz, U. J., Finke, S., Conzelmann, K.-K. (1999). Generation of Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 Is Not Essential for Virus Replication in Tissue Culture, and the Human RSV Leader Region Acts as a Functional BRSV Genome Promoter. *Journal of Virology*, 73(1), 251–259. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.1.251-259.1999>
- Bukreyev, A., Skiadopoulos, M. H., Murphy, B. R., Collins, P. L. (2006). Nonsegmented Negative-Strand Viruses as Vaccine Vectors. *Journal of Virology*, 80(21), 10293–10306. <https://doi.org/10.1128/JVI.00919-06>
- Buonocore, L., Blight, K. J., Rice, C. M., Rose, J. K. (2002). Characterization of Vesicular Stomatitis Virus Recombinants That Express and Incorporate High Levels of Hepatitis C Virus Glycoproteins. *Journal of Virology*, 76(14), 6865–6872. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.14.6865-6872.2002>
- Calain, P., Roux, L. (1993). The Rule of Six, a Basic Feature for Efficient Replication of Sendai Virus Defective Interfering RNA. *Journal of Virology*, 67(8), 4822–4830. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.8.4822-4830.1993>
- Carrère-Kremer, S., Montpellier, C., Lorenzo, L., Brulin, B., Cocquerel, L., Belouzard, S., Penin, F., Dubuisson, J. (2004). Regulation of Hepatitis C Virus Polyprotein Processing by Signal Peptidase Involves Structural Determinants at the p7 Sequence Junctions. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41384–41392. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406315200>
- Chang, A., Dutch, R. E. (2012). Paramyxovirus Fusion and Entry: Multiple Paths to a Common End. *Viruses*, 4(4), 613–636. <https://doi.org/10.3390/v4040613>
- Chen, H., Liu, H., Peng, X. (2022). Reverse genetics in virology: A double edged sword. *Biosafety and Health*, 4(5), 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2022.08.001>
- Chen, M., Ogino, T., Banerjee, A. K. (2007). Interaction of Vesicular Stomatitis Virus P and N Proteins: Identification of Two Overlapping Domains at the N Terminus of P That Are Involved in N0-P Complex Formation and Encapsidation of Viral Genome RNA. *Journal of Virology*, 81(24), 13478–13485. <https://doi.org/10.1128/JVI.01244-07>
- Cherian, S., Potdar, V., Jadhav, S., Yadav, P., Gupta, N., Das, M., Rakshit, P., Singh, S., Abraham, P., Panda, S., NIC

- Team. (2021). SARS-CoV-2 Spike Mutations, L452R, T478K, E484Q and P681R, in the Second Wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *Microorganisms*, 9(7), 1542. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071542>
- Chiba, Y., Horino, K., Umetsu, M., Wataya, Y., Chiba, S., Nakao, T. (1973). Virus Excretion and Antibody Response in Saliva in Natural Mumps. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 111(3), 229–238. <https://doi.org/10.1620/tjem.111.229>
- Chmielewska, A. M., Naddeo, M., Capone, S., Ammendola, V., Hu, K., Meredith, L., Verhoye, L., Rychlowska, M., Rappuoli, R., Ulmer, J. B., Colloca, S., Nicosia, A., Cortese, R., Leroux-Roels, G., Balfe, P., Bienkowska-Szewczyk, K., Meuleman, P., McKeating, J. A., Folgori, A. (2014). Combined Adenovirus Vector and Hepatitis C Virus Envelope Protein Prime-Boost Regimen Elicits T Cell and Neutralizing Antibody Immune Responses. *Journal of Virology*, 88(10), 5502–5510. <https://doi.org/10.1128/JVI.03574-13>
- Clarke, D. K., Sidhu, M. S., Johnson, J. E., Udem, S. A. (2000). Rescue of Mumps Virus from cDNA. *Journal of Virology*, 74(10), 4831–4838. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.10.4831-4838.2000>
- Collins, P. L., Hill, M. G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R. M., Murphy, B. R. (1995). Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(25), 11563–11567. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11563>
- Combredet, C., Labrousse, V., Mollet, L., Lorin, C., Delebecque, F., Hurtrel, B., McClure, H., Feinberg, M. B., Brahic, M., Tangy, F. (2003). A Molecularly Cloned Schwarz Strain of Measles Virus Vaccine Induces Strong Immune Responses in Macaques and Transgenic Mice. *Journal of Virology*, 77(21), 11546–11554. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.21.11546-11554.2003>
- Cong, J., Feng, X., Kang, H., Fu, W., Wang, L., Wang, C., Li, X., Chen, Y., Rao, Z. (2023). Structure of the Newcastle Disease Virus L protein in complex with tetrameric phosphoprotein. *Nature Communications*, 14(1), 1324. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37012-y>
- Connell, A. R., Connell, J., Leahy, T. R., Hassan, J. (2020). Mumps Outbreaks in Vaccinated Populations—Is It Time to Re-assess the Clinical Efficacy of Vaccines? *Frontiers in Immunology*, 11, 2089. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02089>
- Conzelmann, K. K. (2004). Reverse Genetics of Mononegavirales. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 283, 1–41. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06099-5_1
- Cox, R., Plemper, R. K. (2015). The paramyxovirus polymerase complex as a target for next-generation anti-paramyxovirus therapeutics. *Frontiers in Microbiology*, 6, 459. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00459>
- da Silveira, C. M., Kmetzsch, C. I., Mohrdieck, R., Sperb, A. F., Prevots, D. R. (2002). The risk of aseptic meningitis

- associated with the Leningrad-Zagreb mumps vaccine strain following mass vaccination with measles-mumps-rubella vaccine, Rio Grande do Sul, Brazil, 1997. *International Journal of Epidemiology*, 31(5), 978–982. <https://doi.org/10.1093/ije/31.5.978>
- de Wit, J., Emmelot, M. E., Poelen, M. C. M., van Binnendijk, R. S., van der Lee, S., van Baarle, D., Han, W. G. H., van Els, C. A. C. M., Kaaijk, P. (2018). Mumps infection but not childhood vaccination induces persistent polyfunctional CD8⁺ T-cell memory. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(5), 1908–1911. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.047>
- Dietz, C., Maasoumy, B. (2022). Direct-Acting Antiviral Agents for Hepatitis C Virus Infection—From Drug Discovery to Successful Implementation in Clinical Practice. *Viruses*, 14(6), 1325. <https://doi.org/10.3390/v14061325>
- DiNapoli, J. M., Kotelkin, A., Yang, L., Elankumaran, S., Murphy, B. R., Samal, S. K., Collins, P. L., Bukreyev, A. (2007). Newcastle disease virus, a host range-restricted virus, as a vaccine vector for intranasal immunization against emerging pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(23), 9788–9793. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703584104>
- DiNapoli, J. M., Yang, L., Samal, S. K., Murphy, B. R., Collins, P. L., Bukreyev, A. (2010). Respiratory tract immunization of non-human primates with a Newcastle disease virus-vectored vaccine candidate against Ebola virus elicits a neutralizing antibody response. *Vaccine*, 29(1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.024>
- Domingo, E. (2020). Quasispecies dynamics in disease prevention and control. *Virus as Populations*, 263–299. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816331-3.00008-8>
- Domingo, E., Sheldon, J., Perales, C. (2012). Viral Quasispecies Evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 159–216. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05023-11>
- Duncan, J. D., Urbanowicz, R. A., Tarr, A. W., Ball, J. K. (2020). Hepatitis C Virus Vaccine: Challenges and Prospects. *Vaccines*, 8(1), 90. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010090>
- Durbin, A. P., Hall, S. L., Siew, J. W., Whitehead, S. S., Collins, P. L., Murphy, B. R. (1997). Recovery of Infectious Human Parainfluenza Virus Type 3 from cDNA. *Virology*, 235(2), 323–332. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8697>
- Ebenig, A., Lange, M. V., Mühlebach, M. D. (2022). Versatility of live-attenuated measles viruses as platform technology for recombinant vaccines. *npj Vaccines*, 7, 119. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00543-4>
- Echeverría, N., Comas, V., Aldunate, F., Perbolianachis, P., Moreno, P., Cristina, J. (2021). In the era of rapid mRNA-based vaccines: Why is there no effective hepatitis C virus vaccine yet? *World Journal of Hepatology*, 13(10), 1234–1268. <https://doi.org/10.4254/wjh.v13.i10.1234>

- Egelman, E. H., Wu, S.-S., Amrein, M., Portner, A., Murti, G. (1989). The Sendai Virus Nucleocapsid Exists in at Least Four Different Helical States. *Journal of Virology*, 63(5), 2233–2243. <https://doi.org/10.1128/jvi.63.5.2233-2243.1989>
- Elango, N., Varsanyi, T. M., Kövamees, J., Norrby, E. (1988). Molecular Cloning and Characterization of Six Genes, Determination of Gene Order and Intergenic Sequences and Leader Sequence of Mumps Virus. *Journal of General Virology*, 69(11), 2893–2900. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-11-2893>
- EMA. (2024). *Ervebo*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ervebo>
- Emeny, J. M., Morgan, M. J. (1979). Regulation of the Interferon System: Evidence that Vero Cells have a Genetic Defect in Interferon Production. *Journal of General Virology*, 43(1), 247–252. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-43-1-247>
- Espejo, R., Breedlove, C., da Silva, L. F., Joiner, K., Toro, H. (2023). Cross-Protection Conferred by Combined Vaccine Containing Infectious Bronchitis Virus Attenuated Massachusetts and Recombinant LaSota Virus Expressing Arkansas Spike. *Avian Diseases*, 67(3), 273–278. <https://doi.org/10.1637/aviandiseases-D-23-00031>
- Ezelle, H. J., Markovic, D., Barber, G. N. (2002). Generation of Hepatitis C Virus-Like Particles by Use of a Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Vector. *Journal of Virology*, 76(23), 12325–12334. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.23.12325-12334.2002>
- FDA. (2023). *ERVEBO*. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/ervebo>
- Feller, J. A., Smallwood, S., Skiadopoulos, M. H., Murphy, B. R., Moyer, S. A. (2000). Comparison of Identical Temperature-Sensitive Mutations in the L Polymerase Proteins of Sendai and Parainfluenza3 Viruses. *Virology*, 276(1), 190–201. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0535>
- Ferroni, P., Mascolo, G., Zaninetti, M., Colzani, D., Pregliasco, F., Pirisi, M., Barbone, F., Gasparini, V. (1993). Identification of Four Epitopes in Hepatitis C Virus Core Protein. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(6), 1586–1591. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.6.1586-1591.1993>
- Flynn, M., Mahon, B. P. (2003). Cell Mediated And Humoral Immune Responses To Mumps Virus: Recent Developments. *Recent Research Developments in Virology*, 5, 97–115.
- Forcic, D., Košutić-Gulija, T., Šantak, M., Jug, R., Ivancic-Jelecki, J., Markusic, M., Mažuran, R. (2010). Comparisons of mumps virus potency estimates obtained by 50% cell culture infective dose assay and plaque assay. *Vaccine*, 28(7), 1887–1892. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.049>
- Frantz, P. N., Barinov, A., Ruffié, C., Combredet, C., Najburg, V., de Melo, G. D., Larrous, F., Kergoat, L., Teeravechyan, S., Jongkaewwattana, A., Billon-Denis, E., Tournier, J.-N., Prot, M., Levillayer, L., Conquet, L., Montagutelli, X., Tichit, M., Hardy, D., Fernandes, P., ... Tangy, F. (2021). A live measles-vectored COVID-

- 19 vaccine induces strong immunity and protection from SARS-CoV-2 challenge in mice and hamsters. *Nature Communications*, 12, 6277. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26506-2>
- Galazka, A. M., Robertson, S. E., Kraigher, A. (1999). Mumps and mumps vaccine: a global review. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(1), 3–14.
- Gans, H., Yasukawa, L., Rinki, M., DeHovitz, R., Forghani, B., Beeler, J., Audet, S., Maldonado, Y., Arvin, A. M. (2001). Immune Responses to Measles and Mumps Vaccination of Infants at 6, 9, and 12 Months. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(7), 817–826. <https://doi.org/10.1086/323346>
- Goffard, A., Dubuisson, J. (2003). Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie*, 85(3–4), 295–301. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(03\)00004-x](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(03)00004-x)
- González Aparicio, L. J., López, C. B., Felt, S. A. (2022). A Virus Is a Community: Diversity within Negative-Sense RNA Virus Populations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 86(3), e00086-21. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00086-21>
- Gouma, S., Koopmans, M. P. G., van Binnendijk, R. S. (2016). Mumps virus pathogenesis: Insights and knowledge gaps. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12(12), 3110–3112. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1210745>
- Guo, X., Zhong, J.-Y., Li, J.-W. (2018). Hepatitis C Virus Infection and Vaccine Development. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 8(2), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2018.02.003>
- Haas, G., Lee, B. (2024). Reverse Genetics Systems for the De Novo Rescue of Diverse Members of Paramyxoviridae. U D. R. Perez (Ur.), *Reverse Genetics of RNA Viruses. Methods in Molecular Biology*. (2. izd., Sv. 2733, str. 15–35). Humana. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3533-9_2
- Halassy, B., Kurtović, T., Brgles, M., Lang Balijsa, M., Forčić, D. (2015). Factors influencing preclinical in vivo evaluation of mumps vaccine strain immunogenicity. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11(10), 2446–2454. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1062191>
- Hanna-Wakim, R., Yasukawa, L. L., Sung, P., Arvin, A. M., Gans, H. A. (2008). Immune Responses to Mumps Vaccine in Adults Who Were Vaccinated in Childhood. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(12), 1669–1675. <https://doi.org/10.1086/588195>
- Hao, X., Wang, Y., Zhu, M., Zhou, D., Liu, R., Wang, B., Huang, Y.-W., Zhao, Z. (2021). Development of Improved Mumps Vaccine Candidates by Mutating Viral mRNA Cap Methyltransferase Sites in the Large Polymerase Protein. *Virologica Sinica*, 36(3), 521–536. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00326-y>
- Happe, M., Hofstetter, A. R., Wang, J., Yamshchikov, G. V., Holman, L. A., Novik, L., Strom, L., Kiweewa, F., Wakabi, S., Millard, M., Kelley, C. F., Kabbani, S., Edupuganti, S., Beck, A., Kaltovich, F., Murray, T., Tsukerman, S., Carr, D., Ashman, C., ... the VRC 208 and RV 422 study team. (2024). Heterologous cAd3-

- Ebola and MVA-EbolaZ vaccines are safe and immunogenic in US and Uganda phase 1/1b trials. *NPJ Vaccines*, 9, 67. <https://doi.org/10.1038/s41541-024-00833-z>
- Henao-Restrepo, A. M., Camacho, A., Longini, I. M., Watson, C. H., Edmunds, W. J., Egger, M., Carroll, M. W., Dean, N. E., Diatta, I., Doumbia, M., Draguez, B., Duraffour, S., Enwere, G., Grais, R., Gunther, S., Gsell, P. S., Hossmann, S., Watle, S. V., Kondé, M. K., ... Kieny, M. P. (2017). Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ça Suffit!). *The Lancet*, 389(10068), 505–518. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32621-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32621-6)
- Hoffman, M. A., Banerjee, A. K. (1997). An Infectious Clone of Human Parainfluenza Virus Type 3. *Journal of Virology*, 71(6), 4272–4277. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.6.4272-4277.1997>
- Hu, B., Jiang, J., Zhan, J., Li, G., Jiang, Y., Guan, X., Chen, Y., Fang, Z. (2014). Development of a reverse genetics system for respiratory syncytial virus long strain and an immunogenicity study of the recombinant virus. *Virology Journal*, 11, 142. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-142>
- Humphreys, I., Fleming, V., Fabris, P., Parker, J., Schulenberg, B., Brown, A., Demetriou, C., Gaudieri, S., Pfafferoth, K., Lucas, M., Collier, J., Huang, K.-H. G., Pybus, O. G., Klennerman, P., Barnes, E. (2009). Full-Length Characterization of Hepatitis C Virus Subtype 3a Reveals Novel Hypervariable Regions under Positive Selection during Acute Infection. *Journal of Virology*, 83(22), 11456–11466. <https://doi.org/10.1128/JVI.00884-09>
- Hviid, A., Rubin, S., Mühlemann, K. (2008). Mumps. *The Lancet*, 371(9616), 932–944. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60419-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60419-5)
- ICTV. (2023). *Current ICTV Taxonomy Release*. <https://ictv.global/taxonomy>
- Ikegame, S., Beaty, S. M., Stevens, C., Won, T., Park, A., Sachs, D., Hong, P., Lee, B., Thibault, P. A. (2020). Genome-wide transposon mutagenesis of paramyxoviruses reveals constraints on genomic plasticity. *PLOS Pathogens*, 16(10), e1008877. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008877>
- Ivancic-Jelecki, J., Forcic, D., Jagusic, M., Kosutic-Gulija, T., Mazuran, R., Lang Balija, M., Isakov, O., Shomron, N. (2016). Influence of population diversity on neurovirulence potential of plaque purified L-Zagreb variants. *Vaccine*, 34(20), 2383–2389. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.033>
- Ivancic, J., Kosutic Gulija, T., Forcic, D., Baricevic, M., Jug, R., Mesko-Prejac, M., Mazuran, R. (2005). Genetic characterization of L-Zagreb mumps vaccine strain. *Virus Research*, 109(1), 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.11.013>
- Jokinen, S., Österlund, P., Julkunen, I., Davidkin, I. (2007). Cellular Immunity to Mumps Virus in Young Adults 21 Years after Measles-Mumps-Rubella Vaccination. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(6), 861–867. <https://doi.org/10.1086/521029>

- Jurković, M. (2024). *Utjecaj nukleozidnih analoga na varijabilnost i infektivnost virusa zaušnjaka*. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.
- Kadri, N., Potiron, N., Ouary, M., Jegou, D., Gouin, E., Bach, J. M., Lieubeau, B. (2007). Fetal calf serum-primed dendritic cells induce a strong anti-fetal calf serum immune response and diabetes protection in the non-obese diabetic mouse. *Immunology Letters*, 108(2), 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.11.007>
- Kasama, Y., Satoh, M., Saito, M., Okada, S., Kai, C., Tsukiyama-Kohara, K. (2011). Evaluation of a Recombinant Measles Virus as the Expression Vector of Hepatitis C Virus Envelope Proteins. *World Journal of Vaccines*, 1(3), 98–103. <https://doi.org/10.4236/wjv.2011.13010>
- Katoh, H., Nakatsu, Y., Kubota, T., Sakata, M., Takeda, M., Kidokoro, M. (2015). Mumps Virus Is Released from the Apical Surface of Polarized Epithelial Cells, and the Release Is Facilitated by a Rab11-Mediated Transport System. *Journal of Virology*, 89(23), 12026–12034. <https://doi.org/10.1128/JVI.02048-15>
- Kolakofsky, D., Pelet, T., Garcin, D., Hausmann, S., Curran, J., Roux, L. (1998). Paramyxovirus RNA Synthesis and the Requirement for Hexamer Genome Length: the Rule of Six Revisited. *Journal of Virology*, 72(2), 891–899. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.2.891-899.1998>
- Kosutic-Gulija, T., Forcic, D., Šantak, M., Ramljak, A., Mateljak-Lukacevic, S., Mazuran, R. (2008). Genetic heterogeneity of L-Zagreb mumps virus vaccine strain. *Virology Journal*, 5, 79. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-79>
- Krishnamurthy, S., Huang, Z., Samal, S. K. (2000). Recovery of a Virulent Strain of Newcastle Disease Virus from Cloned cDNA: Expression of a Foreign Gene Results in Growth Retardation and Attenuation. *Virology*, 278(1), 168–182. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0618>
- Kubota, M., Hashiguchi, T. (2021). Unique Tropism and Entry Mechanism of Mumps Virus. *Viruses*, 13(9), 1746. <https://doi.org/10.3390/v13091746>
- Lamb, R. A., Parks, G. D. (2013). Paramyxoviridae. U D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, V. R. Racaniello, B. Roizman (Ur.), *Fields Virology* (6. izd., str. 957–995). Lippincott Williams & Wilkins.
- Lang Balija, M., Štimac, A., Košutić Gulija, T., Gudan Kurilj, A., Bekavac, A., Plećaš, A., Halassy, B., Jagušić, M., Forčić, D. (2023). Evaluation of the Interactions between Mumps Virus and Guinea Pig. *Journal of Virology*, 97(4), e0035923. <https://doi.org/10.1128/jvi.00359-23>
- Langmead, B., Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Latner, D. R., McGrew, M., Williams, N., Lowe, L., Werman, R., Warnock, E., Gallagher, K., Doyle, P., Smole, S., Lett, S., Cocoros, N., DeMaria, A., Konomi, R., Brown, C. J., Rota, P. A., Bellini, W. J., Hickman, C. J. (2011).

- Enzyme-Linked Immunospot Assay Detection of Mumps-Specific Antibody-Secreting B Cells as an Alternative Method of Laboratory Diagnosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(1), 35–42. <https://doi.org/10.1128/CVI.00284-10>
- Latner, D. R., Parker Fiebelkorn, A., McGrew, M., Williams, N. J., Coleman, L. A., Mclean, H. Q., Rubin, S., Hickman, C. J. (2017). Mumps Virus Nucleoprotein and Hemagglutinin-Specific Antibody Response Following a Third Dose of Measles Mumps Rubella Vaccine. *Open Forum Infectious Diseases*, 4(4), ofx263. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx263>
- Lauring, A. S., Andino, R. (2010). Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. *PLOS Pathogens*, 6(7), e1001005. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001005>
- Lavie, M., Hanouille, X., Dubuisson, J. (2018). Glycan Shielding and Modulation of Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies. *Frontiers in Immunology*, 9, 910. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00910>
- Lawson, N. D., Stillman, E. A., Whitt, M. A., Rose, J. K. (1995). Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), 4477–4481. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4477>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, S. S., Kochar, N. K., Elizaga, M., Hay, C. M., Wilson, G. J., Cohen, K. W., De Rosa, S. C., Xu, R., Ota-Setlik, A., Morris, D., Finak, G., Allen, M., Tieu, H.-V., Frank, I., Sobieszczyk, M. E., Hannaman, D., Gottardo, R., Gilbert, P. B., Tomaras, G. D., ... NIAID HIV Vaccine Trials Network. (2017). DNA Priming Increases Frequency of T-Cell Responses to a Vesicular Stomatitis Virus HIV Vaccine with Specific Enhancement of CD8⁺ T-Cell Responses by Interleukin-12 Plasmid DNA. *Clinical and Vaccine Immunology*, 24(11), e00263-17. <https://doi.org/10.1128/CVI.00263-17>
- Liang, B., Matsuoka, Y., Le Nouën, C., Liu, X., Herbert, R., Swerczek, J., Santos, C., Paneru, M., Collins, P. L., Buchholz, U. J., Munir, S. (2020). A Parainfluenza Virus Vector Expressing the Respiratory Syncytial Virus (RSV) Prefusion F Protein Is More Effective than RSV for Boosting a Primary Immunization with RSV. *Journal of Virology*, 95(2), e01512-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.01512-20>
- Lindenbach, B. D., Murray, C. L., Thiel, H.-J., Rice, C. M. (2013). Flaviviridae. U D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, V. R. Racaniello, B. Roizman (Ur.), *Fields Virology* (6. izd., str. 712–746). Lippincott Williams & Wilkins.
- Lindenbach, B. D., Rice, C. M. (2013). The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 688–700. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3098>
- Liu, R., Wang, J., Shao, Y., Wang, X., Zhang, H., Shuai, L., Ge, J., Wen, Z., Bu, Z. (2018). A recombinant VSV-vectored MERS-CoV vaccine induces neutralizing antibody and T cell responses in rhesus monkeys after single

- dose immunization. *Antiviral Research*, 150, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.12.007>
- López-Muñoz, A. D., Rastrojo, A., Martín, R., Alcamí, A. (2021). Herpes simplex virus 2 (HSV-2) evolves faster in cell culture than HSV-1 by generating greater genetic diversity. *PLOS Pathogens*, 17(8), e1009541. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009541>
- MacArthur, M. W., Thornton, J. M. (1991). Influence of Proline Residues on Protein Conformation. *Journal of Molecular Biology*, 218(2), 397–412. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90721-h](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90721-h)
- Madar-Balakirski, N., Rosner, A., Melamed, S., Politi, B., Steiner, M., Tamir, H., Yahalom-Ronen, Y., Bar-David, E., Ben-Shmuel, A., Sittner, A., Glinert, I., Weiss, S., Bar-Haim, E., Cohen, H., Elia, U., Achdout, H., Erez, N., Rotem, S., Lazar, S., ... Marcus, H. (2022). Preliminary nonclinical safety and immunogenicity of an rVSV-ΔG-SARS-CoV-2-S vaccine in mice, hamsters, rabbits and pigs. *Archives of Toxicology*, 96(3), 859–875. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03214-w>
- Malczyk, A. H., Kupke, A., Prüfer, S., Scheuplein, V. A., Hutzler, S., Kreuz, D., Beissert, T., Bauer, S., Hubich-Rau, S., Tondera, C., Eldin, H. S., Schmidt, J., Vergara-Alert, J., Süzer, Y., Seifried, J., Hanschmann, K.-M., Kalinke, U., Herold, S., Sahin, U., ... Mühlebach, M. D. (2015). A Highly Immunogenic and Protective Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Vaccine Based on a Recombinant Measles Virus Vaccine Platform. *Journal of Virology*, 89(22), 11654–11667. <https://doi.org/10.1128/JVI.01815-15>
- Malik, T., Ngo, L., Bosma, T., Rubin, S. (2019). A Single Point Mutation in the Mumps V Protein Alters Targeting of the Cellular STAT Pathways Resulting in Virus Attenuation. *Viruses*, 11(11), 1016. <https://doi.org/10.3390/v11111016>
- Martin, C. T., Muller, D. K., Coleman, J. E. (1988). Processivity in Early Stages of Transcription by T7 RNA Polymerase. *Biochemistry*, 27(11), 3966–3974. <https://doi.org/10.1021/bi00411a012>
- Martinez, M. A., Franco, S. (2020). Therapy Implications of Hepatitis C Virus Genetic Diversity. *Viruses*, 13(1), 41. <https://doi.org/10.3390/v13010041>
- Matsubara, K., Iwata, S., Nakayama, T. (2012). Antibodies against mumps virus component proteins. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 18(4), 466–471. <https://doi.org/10.1007/s10156-011-0358-3>
- Mažuran, R. (2000). *CTD Summaries on MMR vaccine*, Institute of Immunology Inc.
- Mažuran, R. (2010). *Završno izvješće tehnološkog projekta TP-05/0021-02 „Test neurovirulentnosti virusnih cjepiva: primjena i validacija“*.
- Mebatsion, T., Schnell, M. J., Cox, J. H., Finke, S., Conzelmann, K. K. (1996). Highly stable expression of a foreign gene from rabies virus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(14), 7310–7314. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.14.7310>
- Mire, C. E., Geisbert, J. B., Agans, K. N., Satterfield, B. A., Versteeg, K. M., Fritz, E. A., Feldmann, H., Hensley, L.

- E., Geisbert, T. W. (2014). Durability of a Vesicular Stomatitis Virus-Based Marburg Virus Vaccine in Nonhuman Primates. *PLOS ONE*, 9(4), e94355. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094355>
- Monath, T. P., Fast, P. E., Modjarrad, K., Clarke, D. K., Martin, B. K., Fusco, J., Nichols, R., Heppner, D. G., Simon, J. K., Dubey, S., Troth, S. P., Wolf, J., Singh, V., Collier, B.-A., Robertson, J. S. (2019). rVSVΔG-ZEBOV-GP (also designated V920) recombinant vesicular stomatitis virus pseudotyped with Ebola Zaire Glycoprotein: Standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine: X*, 1, 100009. <https://doi.org/10.1016/j.jvacx.2019.100009>
- Moshkani, S., Chiale, C., Lang, S. M., Rose, J. K., Robek, M. D. (2019). A Highly Attenuated Vesicular Stomatitis Virus-Based Vaccine Platform Controls Hepatitis B Virus Replication in Mouse Models of Hepatitis B. *Journal of Virology*, 93(5), e01586-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01586-18>
- Mühlebach, M. D. (2020). Measles virus in cancer therapy. *Current Opinion in Virology*, 41, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.07.016>
- Muley, R., Dhare, R. (2020). Effect of change in cell substrate on the critical quality attributes of L-Zagreb Mumps vaccine manufactured using parallel plate bioreactor. *Biologicals*, 67, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2020.07.008>
- NCT04033068. *Safety and Immunogenicity of a Novel Vaccine Formulation MV-ZIKA-RSP (V187-001) (MV-ZIKA-RSP)*. Pristupljeno: 16. siječanj 2024. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04033068>
- NCT04990466. *Phase 2b/3 Trial of VSV-ΔG SARS-CoV-2 Vaccine (BRILIFE) Against Approved Comparator Vaccine. (BRILIFE002)*. Pristupljeno: 25. siječanj 2024. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04990466>
- NCT06026514. *Phase I Safety Study of B/HPV3/S-6P Vaccine Via Nasal Spray in Adults*. Pristupljeno: 16. siječanj 2024. <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT06026514>
- Nyombayire, J., Anzala, O., Gazzard, B., Karita, E., Bergin, P., Hayes, P., Kopycinski, J., Omosa-Manyonyi, G., Jackson, A., Bizimana, J., Farah, B., Sayeed, E., Parks, C. L., Inoue, M., Hironaka, T., Hara, H., Shu, T., Matano, T., Dally, L., ... the S001 Study Team. (2017). First-in-Human Evaluation of the Safety and Immunogenicity of an Intranasally Administered Replication-Competent Sendai Virus–Vectored HIV Type 1 Gag Vaccine: Induction of Potent T-Cell or Antibody Responses in Prime-Boost Regimens. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(1), 95–104. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw500>
- Oehler, V., Filipe, A., Montserret, R., da Costa, D., Brown, G., Penin, F., McLauchlan, J. (2012). Structural Analysis of Hepatitis C Virus Core-E1 Signal Peptide and Requirements for Cleavage of the Genotype 3a Signal Sequence by Signal Peptide Peptidase. *Journal of Virology*, 86(15), 7818–7828. <https://doi.org/10.1128/JVI.00457-12>
- Paterson, R. G., Lamb, R. A. (1990). RNA Editing by G-Nucleotide Insertion in Mumps Virus P-Gene mRNA Transcripts. *Journal of Virology*, 64(9), 4137–4145. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.9.4137-4145.1990>

- Pekosz, A., He, B., Lamb, R. A. (1999). Reverse genetics of negative-strand RNA viruses: Closing the circle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(16), 8804–8806. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.8804>
- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F. A., Moradpour, D., Pawlotsky, J.-M. (2004). Structural Biology of Hepatitis C Virus. *Hepatology*, 39(1), 5–19. <https://doi.org/10.1002/hep.20032>
- Perdue, M. L., Arnold, F., Li, S., Donabedian, A., Cioce, V., Warf, T., Huebner, R. (2011). The future of cell culture-based influenza vaccine production. *Expert Review of Vaccines*, 10(8), 1183–1194. <https://doi.org/10.1586/erv.11.82>
- Pfaff-Kilgore, J. M., Davidson, E., Kadash-Edmondson, K., Hernandez, M., Rosenberg, E., Chambers, R., Castelli, M., Clementi, N., Mancini, N., Bailey, J. R., Crowe, J. E. J., Law, M., Doranz, B. J. (2022). Sites of vulnerability in HCV E1E2 identified by comprehensive functional screening. *Cell Reports*, 39(8), 110859. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110859>
- Pfaller, C. K., Cattaneo, R., Schnell, M. J. (2015). Reverse genetics of Mononegavirales: How they work, new vaccines, and new cancer therapeutics. *Virology*, 479–480, 331–344. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.029>
- Poch, O., Blumberg, B. M., Bougueleret, L., Tordo, N. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *Journal of General Virology*, 71(5), 1153–1162. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-5-1153>
- Pomeroy, L. W., Bjørnstad, O. N., Holmes, E. C. (2008). The Evolutionary and Epidemiological Dynamics of the Paramyxoviridae. *Journal of Molecular Evolution*, 66(2), 98–106. <https://doi.org/10.1007/s00239-007-9040-x>
- Ponce-de-León, S., Torres, M., Soto-Ramírez, L. E., Calva, J. J., Santillán-Doherty, P., Carranza-Salazar, D. E., Carreño, J. M., Carranza, C., Juárez, E., Carreto-Binaghi, L. E., Ramírez-Martínez, L., Paz De la Rosa, G., Viguera-Moreno, R., Ortiz-Stern, A., López-Vidal, Y., Macías, A. E., Torres-Flores, J., Rojas-Martínez, O., Suárez-Martínez, A., ... Lozano-Dubernard, B. (2023). Interim safety and immunogenicity results from an NDV-based COVID-19 vaccine phase I trial in Mexico. *npj Vaccines*, 8, 67. <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00662-6>
- Prescott, J., DeBuysscher, B. L., Brown, K. S., Feldmann, H. (2014). Long-Term Single-Dose Efficacy of a Vesicular Stomatitis Virus-Based Andes Virus Vaccine in Syrian Hamsters. *Viruses*, 6(2), 516–523. <https://doi.org/10.3390/v6020516>
- Quiñones-Kochs, M. I., Schnell, M. J., Buonocore, L., Rose, J. K. (2001). Mechanisms of Loss of Foreign Gene Expression in Recombinant Vesicular Stomatitis Viruses. *Virology*, 287(2), 427–435. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1058>
- Radecke, F., Spielhofer, P., Schneider, H., Kaelin, K., Huber, M., Dötsch, C., Christiansen, G., Billeter, M. A. (1995). Rescue of measles viruses from cloned DNA. *The EMBO Journal*, 14(23), 5773–5784. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00266.x>

- Reisinger, E. C., Tschismarov, R., Beubler, E., Wiedermann, U., Firbas, C., Loebermann, M., Pfeiffer, A., Muellner, M., Tauber, E., Ramsauer, K. (2019). Immunogenicity, safety, and tolerability of the measles-vectored chikungunya virus vaccine MV-CHIK: a double-blind, randomised, placebo-controlled and active-controlled phase 2 trial. *The Lancet*, 392(10165), 2718–2727. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32488-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32488-7)
- Reyes-del Valle, J., de la Fuente, C., Turner, M. A., Springfield, C., Apte-Sengupta, S., Frenzke, M. E., Forest, A., Whidby, J., Marcotrigiano, J., Rice, C. M., Cattaneo, R. (2012). Broadly Neutralizing Immune Responses against Hepatitis C Virus Induced by Vectored Measles Viruses and a Recombinant Envelope Protein Booster. *Journal of Virology*, 86(21), 11558–11566. <https://doi.org/10.1128/JVI.01776-12>
- Roberts, A., Reuter, J. D., Wilson, J. H., Baldwin, S., Rose, J. K. (2004). Complete Protection from Papillomavirus Challenge after a Single Vaccination with a Vesicular Stomatitis Virus Vector Expressing High Levels of L1 Protein. *Journal of Virology*, 78(6), 3196–3199. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.6.3196-3199.2004>
- Rodrigues, A. F., Soares, H. R., Guerreiro, M. R., Alves, P. M., Coroadinha, A. S. (2015). Viral vaccines and their manufacturing cell substrates: New trends and designs in modern vaccinology. *Biotechnology Journal*, 10(9), 1329–1344. <https://doi.org/10.1002/biot.201400387>
- Rodriguez, S. E., Cross, R. W., Fenton, K. A., Bente, D. A., Mire, C. E., Geisbert, T. W. (2019). Vesicular Stomatitis Virus-Based Vaccine Protects Mice against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Scientific Reports*, 9, 7755. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44210-6>
- Rubin, S. A., Afzal, M. A. (2011). Neurovirulence safety testing of mumps vaccines-Historical perspective and current status. *Vaccine*, 29(16), 2850–2855. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.02.005>
- Rubin, S. A., Afzal, M. A., Powell, C. L., Bentley, M. L., Auda, G. R., Taffs, R. E., Carbone, K. M. (2005). The rat-based neurovirulence safety test for the assessment of mumps virus neurovirulence in humans: an international collaborative study. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(7), 1123–1128. <https://doi.org/10.1086/428098>
- Rubin, S. A., Link, M. A., Sauder, C. J., Zhang, C., Ngo, L., Rima, B. K., Duprex, W. P. (2012). Recent Mumps Outbreaks in Vaccinated Populations: No Evidence of Immune Escape. *Journal of Virology*, 86(1), 615–620. <https://doi.org/10.1128/JVI.06125-11>
- Rubin, S. A., Pletnikov, M., Carbone, K. M. (1998). Comparison of the Neurovirulence of a Vaccine and a Wild-Type Mumps Virus Strain in the Developing Rat Brain. *Journal of Virology*, 72(10), 8037–8042. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.10.8037-8042.1998>
- Rubin, S. A., Plotkin, S. A. (2013). Mumps vaccine. U S. A. Plotkin, W. A. Orenstein, P. A. Offit (Ur.), *Vaccines* (6. izd., str. 419–446). Elsevier.
- Rubin, S. A., Sauder, C. J., Carbone, K. M. (2013). Mumps Virus. U D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, V. R. Racaniello, B. Roizman (Ur.), *Fields Virology* (6. izd., str. 1024–1041). Lippincott Williams & Wilkins.

- Rubin, S., Eckhaus, M., Rennick, L. J., Bamford, C. G. G., Duprex, W. P. (2015). Molecular biology, pathogenesis and pathology of mumps virus. *The Journal of Pathology*, 235(2), 242–252. <https://doi.org/10.1002/path.4445>
- Russell, C. J., Jones, B. G., Sealy, R. E., Surman, S. L., Mason, J. N., Hayden, R. T., Tripp, R. A., Takimoto, T., Hurwitz, J. L. (2017). A Sendai virus recombinant vaccine expressing a gene for truncated metapneumovirus (MPV) fusion protein protects cotton rats from hMPV challenge. *Virology*, 509, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.05.021>
- Ryder, A. B., Nachbagauer, R., Buonocore, L., Palese, P., Krammer, F., Rose, J. K. (2016). Vaccination with Vesicular Stomatitis Virus-Vectored Chimeric Hemagglutinins Protects Mice against Divergent Influenza Virus Challenge Strains. *Journal of Virology*, 90(5), 2544–2550. <https://doi.org/10.1128/JVI.02598-15>
- Rzymiski, P., Jibril, A. T., Rahmah, L., Abarikwu, S. O., Hashem, F., Lawati, A. A., Morrison, F. M. M., Marquez, L. P., Mohamed, K., Khan, A., Mushtaq, S., Minakova, K., Poniedziałek, B., Zarębska-Michaluk, D., Flisiak, R. (2024). Is there still hope for the prophylactic hepatitis C vaccine? A review of different approaches. *Journal of Medical Virology*, 96(9), e29900. <https://doi.org/10.1002/jmv.29900>
- Safronetz, D., Mire, C., Rosenke, K., Feldmann, F., Haddock, E., Geisbert, T., Feldmann, H. (2015). A Recombinant Vesicular Stomatitis Virus-Based Lassa Fever Vaccine Protects Guinea Pigs and Macaques against Challenge with Geographically and Genetically Distinct Lassa Viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(4), e0003736. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003736>
- Sakai, Y., Kiyotani, K., Fukumura, M., Asakawa, M., Kato, A., Shioda, T., Yoshida, T., Tanaka, A., Hasegawa, M., Nagai, Y. (1999). Accommodation of foreign genes into the Sendai virus genome: sizes of inserted genes and viral replication. *FEBS Letters*, 456(2), 221–226. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00960-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00960-6)
- Sällberg, M., Rudén, U., Wahren, B., Magnus, L. O. (1992). Immunodominant Regions within the Hepatitis C Virus Core and Putative Matrix Proteins. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(8), 1989–1994. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.8.1989-1994.1992>
- Sanjuán, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., Belshaw, R. (2010). Viral Mutation Rates. *Journal of Virology*, 84(19), 9733–9748. <https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10>
- Šantak, M., Lang-Balija, M., Ivancic-Jelecki, J., Košutić-Gulija, T., Ljubin-Sternak, S., Forcic, D. (2013). Antigenic differences between vaccine and circulating wild-type mumps viruses decreases neutralization capacity of vaccine-induced antibodies. *Epidemiology and Infection*, 141(6), 1298–1309. <https://doi.org/10.1017/S0950268812001896>
- Šantak, M., Markušić, M., Balija, M. L., Keć Kopač, S., Jug, R., Örvell, C., Tomac, J., Forčić, D. (2015). Accumulation of defective interfering viral particles in only a few passages in Vero cells attenuates mumps virus neurovirulence. *Microbes and Infection*, 17(3), 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.11.006>
- Santos-López, G., Cruz, C., Pazos, N., Vallejo, V., Reyes-Leyva, J., Tapia-Ramírez, J. (2006). Two clones obtained

- from Urabe AM9 mumps virus vaccine differ in their replicative efficiency in neuroblastoma cells. *Microbes and Infection*, 8(2), 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.06.031>
- Sauder, C. J., Vandenberg, K. M., Iskow, R. C., Malik, T., Carbone, K. M., Rubin, S. A. (2006). Changes in mumps virus neurovirulence phenotype associated with quasispecies heterogeneity. *Virology*, 350(1), 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.01.035>
- Scaggs Huang, F., Bernstein, D. I., Slobod, K. S., Portner, A., Takimoto, T., Russell, C. J., Meagher, M., Jones, B. G., Sealy, R. E., Coleclough, C., Branum, K., Dickey, M., Buschle, K., McNeal, M., Makowski, M., Nakamura, A., Hurwitz, J. L. (2021). Safety and immunogenicity of an intranasal sendai virus-based vaccine for human parainfluenza virus type I and respiratory syncytial virus (SeVRSV) in adults. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 17(2), 554–559. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1779517>
- Schenk, J., Abrams, S., Theeten, H., Van Damme, P., Beutels, P., Hens, N. (2021). Immunogenicity and persistence of trivalent measles, mumps, and rubella vaccines: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(2), 286–295. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30442-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30442-4)
- Schlotthauer, F., McGregor, J., Drummer, H. E. (2021). To Include or Occlude: Rational Engineering of HCV Vaccines for Humoral Immunity. *Viruses*, 13(5), 805. <https://doi.org/10.3390/v13050805>
- Schnell, M. J., Buonocore, L., Whitt, M. A., Rose, J. K. (1996). The Minimal Conserved Transcription Stop-Start Signal Promotes Stable Expression of a Foreign Gene in Vesicular Stomatitis Virus. *Journal of Virology*, 70(4), 2318–2323. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.4.2318-2323.1996>
- Schnell, M. J., Mebatsion, T., Conzelmann, K.-K. (1994). Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *The EMBO Journal*, 13(18), 4195–4203. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06739.x>
- Sepulveda-Crespo, D., Resino, S., Martinez, I. (2020). Hepatitis C virus vaccine design: focus on the humoral immune response. *Journal of Biomedical Science*, 27, 78. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00669-4>
- Sharma, H. J., Oun, S. A., Abou Bakr, S. S., Kapre, S. V., Jadhav, S. S., Dhere, R. M., Bhardwaj, S. (2010). No demonstrable association between the Leningrad-Zagreb mumps vaccine strain and aseptic meningitis in a large clinical trial in Egypt. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(4), 347–352. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03121.x>
- Sitbon, M., d'Auriol, L., Ellerbrok, H., André, C., Nishio, J., Perryman, S., Pozo, F., Hayes, S. F., Wehrly, K., Tambourin, P., Galibert, F., Chesebro, B. (1991). Substitution of leucine for isoleucine in a sequence highly conserved among retroviral envelope surface glycoproteins attenuates the lytic effect of the Friend murine leukemia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(13), 5932–5936. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5932>
- Skiadopoulos, M. H., Surman, S. R., Durbin, A. P., Collins, P. L., Murphy, B. R. (2000). Long Nucleotide Insertions between the HN and L Protein Coding Regions of Human Parainfluenza Virus Type 3 Yield Viruses with

- Temperature-Sensitive and Attenuation Phenotypes. *Virology*, 272(1), 225–234. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0372>
- Skiadopoulos, M. H., Surman, S. R., Riggs, J. M., Örvell, C., Collins, P. L., Murphy, B. R. (2002). Evaluation of the Replication and Immunogenicity of Recombinant Human Parainfluenza Virus Type 3 Vectors Expressing up to Three Foreign Glycoproteins. *Virology*, 297(1), 136–152. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1415>
- 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*, 13(12), 2550. <https://doi.org/10.3390/v13122550>
- Soleimani, S. (2022). A Review of the Establishment of the Seed Lot System in the Production of Biological Products and Its Importance. *Archives of Razi Institute*, 77(6), 2023–2035. <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.358890.2327>
- Steinhauer, D. A., Domingo, E., Holland, J. J. (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*, 122(2), 281–288. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90216-c](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90216-c)
- Steinhauer, D. A., Holland, J. J. (1987). Rapid evolution of RNA viruses. *Annual Review of Microbiology*, 41(1), 409–433. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002205>
- Ströh, L. J., Krey, T. (2020). HCV Glycoprotein Structure and Implications for B-Cell Vaccine Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6781. <https://doi.org/10.3390/ijms21186781>
- Su, S.-B., Chang, H.-L., Chen, K.-T. (2020). Current Status of Mumps Virus Infection: Epidemiology, Pathogenesis, and Vaccine. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5), 1686. <https://doi.org/10.3390/ijerph17051686>
- Suryanarayana, V. V. S., Chattopadhyay, D., Shaila, M. S. (2010). Non-segmented negative sense RNA viruses as vectors for vaccine development. *Current Science*, 98(3), 379–391.
- Svjetska zdravstvena organizacija. (1994). *Requirements for measles, mumps and rubella vaccines and combined vaccine (live)*. Annex 3. WHO Technical Report Series 840. <https://www.who.int/publications/m/item/measles-mumps-and-rubella-vaccines-and-combined-vaccine-live-annex-3-trs-no-840>
- Svjetska zdravstvena organizacija. (2012). Mumps virus nomenclature update: 2012. *Weekly Epidemiological Record*, 87(22), 217–224.
- Svjetska zdravstvena organizacija. (2013). *Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks*. Annex 3. WHO Technical Report Series 978.
- Svjetska zdravstvena organizacija. (2023). *Hepatitis C*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>

- Svjetska zdravstvena organizacija. (2024a). *Immunization coverage*. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage>
- Svjetska zdravstvena organizacija. (2024b). Mumps virus vaccines. *Weekly Epidemiological Record*, 99(11), 115–134.
- Tang, R. S., Schickli, J. H., MacPhail, M., Fernandes, F., Bicha, L., Spaete, J., Fouchier, R. A. M., Osterhaus, A. D. M. E., Spaete, R., Haller, A. A. (2003). Effects of Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus Antigen Insertion in Two 3' Proximal Genome Positions of Bovine/Human Parainfluenza Virus Type 3 on Virus Replication and Immunogenicity. *Journal of Virology*, 77(20), 10819–10828. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.20.10819-10828.2003>
- Tang, R. S., Spaete, R. R., Thompson, M. W., MacPhail, M., Guzzetta, J. M., Ryan, P. C., Reisinger, K., Chandler, P., Hilty, M., Walker, R. E., Gomez, M. M., Losonsky, G. A. (2008). Development of a PIV-vectored RSV vaccine: Preclinical evaluation of safety, toxicity, and enhanced disease and initial clinical testing in healthy adults. *Vaccine*, 26(50), 6373–6382. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.018>
- Tani, H., Komoda, Y., Matsuo, E., Suzuki, K., Hamamoto, I., Yamashita, T., Moriishi, K., Fujiyama, K., Kanto, T., Hayashi, N., Owsianka, A., Patel, A. H., Whitt, M. A., Matsuura, Y. (2007). Replication-Competent Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Encoding Hepatitis C Virus Envelope Proteins. *Journal of Virology*, 81(16), 8601–8612. <https://doi.org/10.1128/JVI.00608-07>
- Tokusumi, T., Iida, A., Hirata, T., Kato, A., Nagai, Y., Hasegawa, M. (2002). Recombinant Sendai viruses expressing different levels of a foreign reporter gene. *Virus Research*, 86(1–2), 33–38. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(02\)00047-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(02)00047-3)
- Torrents de la Peña, A., Sliepen, K., Eshun-Wilson, L., Newby, M. L., Allen, J. D., Zon, I., Koekkoek, S., Chumbe, A., Crispin, M., Schinkel, J., Lander, G. C., Sanders, R. W., Ward, A. B. (2022). Structure of the hepatitis C virus E1E2 glycoprotein complex. *Science*, 378(6617), 263–269. <https://doi.org/10.1126/science.abn9884>
- Toth, E. A., Andrianov, A. K., Fuerst, T. R. (2023). Prospects for developing an Hepatitis C virus E1E2-based nanoparticle vaccine. *Reviews in Medical Virology*, 33(5), e2474. <https://doi.org/10.1002/rmv.2474>
- Toth, E. A., Chagas, A., Pierce, B. G., Fuerst, T. R. (2021). Structural and Biophysical Characterization of the HCV E1E2 Heterodimer for Vaccine Development. *Viruses*, 13(6), 1027. <https://doi.org/10.3390/v13061027>
- Tschismarov, R., Van Damme, P., Germain, C., De Coster, I., Mateo, M., Reynard, S., Journeaux, A., Tomberger, Y., Withanage, K., Haslwanter, D., Terler, K., Schrauf, S., Müllner, M., Tauber, E., Ramsauer, K., Baize, S. (2023). Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-vectored Lassa fever vaccine: A randomised, placebo-controlled, first-in-human trial. *The Lancet*, 401(10384), 1267–1276. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)00048-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00048-X)
- van den Berg, W. B., Joosten, L. A. B., van Lent, P. L. E. M. (2007). Murine Antigen-induced arthritis. *Methods in*

- Vanhoutte, F., Liu, W., Wiedmann, R. T., Haspeslagh, L., Cao, X., Boundy, K., Aliprantis, A., Davila, M., Hartzel, J., Li, J., McGuire, M., Ramsauer, K., Tomberger, Y., Tschismarov, R., Brown, D. D., Xu, W., Sachs, J. R., Russell, K., Stoch, S. A., Lai, E. (2022). Safety and immunogenicity of the measles vector-based SARS-CoV-2 vaccine candidate, V591, in adults: results from a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *EBioMedicine*, 75, 103811. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103811>
- Vignuzzi, M., López, C. B. (2019). Defective viral genomes are key drivers of the virus–host interaction. *Nature Microbiology*, 4(7), 1075–1087. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0465-y>
- Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E., Andino, R. (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature*, 439(7074), 344–348. <https://doi.org/10.1038/nature04388>
- Viktorova, E. G., Khattar, S. K., Kouiyavskaya, D., Laassri, M., Zagorodnyaya, T., Dragunsky, E., Samal, S., Chumakov, K., Belov, G. A. (2018). Newcastle Disease Virus-Based Vectored Vaccine against Poliomyelitis. *Journal of Virology*, 92(17), e00976-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00976-18>
- Walpita, P., Flick, R. (2005). Reverse genetics of negative-stranded RNA viruses: A global perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 244(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.046>
- Wang, L.-F., Yu, M., Hansson, E., Pritchard, L. I., Shiell, B., Michalski, W. P., Eaton, B. T. (2000). The Exceptionally Large Genome of Hendra Virus: Support for Creation of a New Genus within the Family Paramyxoviridae. *Journal of Virology*, 74(21), 9972–9979. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.21.9972-9979.2000>
- Wang, Z., Hangartner, L., Cornu, T. I., Martin, L. R., Zuniga, A., Billeter, M. A., Naim, H. Y. (2001). Recombinant measles viruses expressing heterologous antigens of mumps and simian immunodeficiency viruses. *Vaccine*, 19(17–19), 2329–2336. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(00\)00523-5](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(00)00523-5)
- Wertz, G. W., Moudy, R., Ball, L. A. (2002). Adding Genes to the RNA Genome of Vesicular Stomatitis Virus: Positional Effects on Stability of Expression. *Journal of Virology*, 76(15), 7642–7650. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.15.7642-7650.2002>
- Whelan, S. P. J., Ball, L. A., Barr, J. N., Wertz, G. T. W. (1995). Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(18), 8388–8392. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.18.8388>
- Willemsen, A., Zwart, M. P. (2019). On the stability of sequences inserted into viral genomes. *Virus Evolution*, 5(2), vez045. <https://doi.org/10.1093/ve/vez045>
- Xu, J., Zhang, Y., Qu, P., Shamseldin, M. M., Yoo, S. J., Misny, J., Thongpan, I., K.C., M., Hall, J. M., Evans, J. P., Eltobgy, M., Lu, M., Ye, C., Chamblee, M., Liang, X., Martinez-Sobrido, L., Amer, A. O., Yount, J. S., Boyaka,

- P. N., ... Li, J. (2023). A next-generation intranasal trivalent MMS vaccine induces durable and broad protection against SARS-CoV-2 variants of concern. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(41), e2220403120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2220403120>
- Xu, P., Huang, Z., Gao, X., Michel, F. J., Hirsch, G., Hogan, R. J., Sakamoto, K., Ho, W., Wu, J., He, B. (2013). Infection of Mice, Ferrets, and Rhesus Macaques with a Clinical Mumps Virus Isolate. *Journal of Virology*, 87(14), 8158–8168. <https://doi.org/10.1128/JVI.01028-13>
- Xu, P., Li, Z., Sun, D., Lin, Y., Wu, J., Rota, P. A., He, B. (2011). Rescue of wild-type mumps virus from a strain associated with recent outbreaks helps to define the role of the SH ORF in the pathogenesis of mumps virus. *Virology*, 417(1), 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.05.003>
- Xu, R., Nasar, F., Megati, S., Luckay, A., Lee, M., Udem, S. A., Eldridge, J. H., Egan, M. A., Emini, E., Clarke, D. K. (2009). Prime-Boost Vaccination with Recombinant Mumps Virus and Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Vectors Elicits an Enhanced Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag-Specific Cellular Immune Response in Rhesus Macaques. *Journal of Virology*, 83(19), 9813–9823. <https://doi.org/10.1128/JVI.00550-09>
- Yang, C. F., Wang, C. K., Malkin, E., Schickli, J. H., Shambaugh, C., Zuo, F., Galinski, M. S., Dubovsky, F., Tang, R. S., The Study Group. (2013). Implication of respiratory syncytial virus (RSV) F transgene sequence heterogeneity observed in Phase 1 evaluation of MEDI-534, a live attenuated parainfluenza type 3 vectored RSV vaccine. *Vaccine*, 31(26), 2822–2827. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.04.006>
- Yang, X., Charlebois, P., Macalalad, A., Henn, M. R., Zody, M. C. (2013). V-Phaser 2: variant inference for viral populations. *BMC Genomics*, 14, 674. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-674>
- Yoneda, M., Georges-Courbot, M.-C., Ikeda, F., Ishii, M., Nagata, N., Jacquot, F., Raoul, H., Sato, H., Kai, C. (2013). Recombinant Measles Virus Vaccine Expressing the Nipah Virus Glycoprotein Protects against Lethal Nipah Virus Challenge. *PLOS ONE*, 8(3), e58414. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058414>
- Yoshino, S., Ellis, E. F. (1987). Effect of a Fish-Oil-Supplemented Diet on Inflammation and Immunological Processes in Rats. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 84(3), 233–240. <https://doi.org/10.1159/000234429>
- Zhang, Y., Lu, M., K. C., M., Kim, E., Shamseldin, M. M., Ye, C., Dravid, P., Chamblee, M., Park, J.-G., Hall, J. M., Trivedi, S., Chaiwatpongsakorn, S., Kenny, A. D., Murthy, S. S., Sharma, H., Liang, X., Yount, J. S., Kapoor, A., Martinez-Sobrido, L., ... Li, J. (2022). A highly efficacious live attenuated mumps virus–based SARS-CoV-2 vaccine candidate expressing a six-proline stabilized prefusion spike. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(33), e2201616119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2201616119>
- Zhao, H., Peeters, B. P. H. (2003). Recombinant Newcastle disease virus as a viral vector: effect of genomic location of foreign gene on gene expression and virus replication. *Journal of General Virology*, 84(Pt 4), 781–788. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18884-0>

- Zhao, L., Illingworth, C. J. R. (2019). Measurements of intrahost viral diversity require an unbiased diversity metric. *Virus Evolution*, 5(1), vey041. <https://doi.org/10.1093/ve/vey041>
- Zhou, D., Zhu, M.-Y., Wang, Y.-L., Hao, X.-Q., Zhou, D.-M., Liu, R.-X., Zhang, C.-D., Qu, C.-F., Zhao, Z.-Y. (2019a). Attenuated MuV-S79 as vector stably expressing foreign gene. *World Journal of Pediatrics*, 15(5), 511–515. <https://doi.org/10.1007/s12519-019-00287-7>
- Zhou, D., Zhu, M.-Y., Wang, Y.-L., Hao, X.-Q., Zhou, D.-M., Liu, R.-X., Zhang, C.-D., Qu, C.-F., Zhao, Z.-Y. (2019b). Establishment of an efficient reverse genetic system of Mumps virus S79 from cloned DNA. *World Journal of Pediatrics*, 15(5), 499–505. <https://doi.org/10.1007/s12519-019-00286-8>
- Zhu, F., Wang, Y., Xu, Z., Qu, H., Zhang, H., Niu, L., Xue, H., Jing, D., He, H. (2019). Novel adeno-associated virus-based genetic vaccines encoding hepatitis C virus E2 glycoprotein elicit humoral immune responses in mice. *Molecular Medicine Reports*, 19(2), 1016–1023. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9739>
- Zuniga, A., Liniger, M., Morin, T. N. A., Marty, R. R., Wiegand, M., Ilter, O., Weibel, S., Billeter, M. A., Knuchel, M. C., Naim, H. Y. (2013). Sequence and immunogenicity of a clinically approved novel measles virus vaccine vector. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(3), 607–613. <https://doi.org/10.4161/hv.23242>

8. PRILOZI

Prilog 1. Broj dobivenih očitavanja prije i poslije filtriranja te vrijednosti pokrivenosti sravnjenja za sve uzorke obrađene sekvenciranjem metodom nove generacije.

Virusni uzorak	Broj očitavanja	Broj očitavanja nakon kontrole kvalitete	% mapiranih očitavanja	Srednja vrijednost pokrivenosti	SD srednje vrijednosti pokrivenosti
vCE1E2-HCV-MRV2					
pDNA	802224	575790	81,60	2598	375
p-MS	778680	617772	93,80	3236	2649
MS	838100	427712	96,19	1992	827
5pV A1	1237864	570962	94,21	2455	1391
5pV A2	1018314	384266	95,35	1652	624
5pV A3	942702	474318	96,19	2205	1180
5pV B2	895866	390696	94,63	1671	1028
10pV A1	1168908	553370	95,32	2451	1301
10pV A2	1460270	768514	95,78	3429	1605
10pV A3	1466090	809376	95,95	3710	1975
10pV B2	1680292	952656	95,90	4427	2671
p4	1501852	1389010	96,48	4038	1702
p4S1	1413316	1321462	96,58	3917	1399
p4S2	1545900	1453072	95,69	4531	1766
10pCEF A	957480	895090	97,61	2809	1253
10pCEF B	1094496	1027556	96,76	3268	1258
10pCEF C	1189718	1111466	97,21	3447	1275
vE1E2TMD-HCV-MRV2					
pDNA	735198	592176	82,47	3150	378
p-MS	832430	670134	97,83	4192	3678
MS	1247116	854642	93,27	4167	3970
5pV A1	894326	589758	94,33	3027	2068
5pV A2	1079470	837814	94,49	4682	2884
5pV A3	587526	388652	95,60	2057	1652
5pV B2	736224	434162	95,23	2162	1281
5pV B3	983764	618372	97,21	3160	1685
10pV A1	633888	431062	94,36	2114	1492
10pV A2	497750	369118	94,20	1917	2209
10pV A3	698408	543830	95,18	2851	2622
10pV B2	794476	616648	95,02	3250	2422
10pV B3	596436	399826	93,02	1935	1844
vMRV2					
MS	482232	389916	98,48	2818	1239
5pV	153258	122078	98,71	876	696
10pV	470624	380568	98,82	2763	928
10pCEF A	1142952	1072212	96,08	3884	1716
10pCEF B	1409734	1311338	96,15	4479	1684

10pCEF C	1015454	947046	96,34	3431	1666
vMRV3					
MS	921748	582382	80,22	2863	2256
5pV	1376636	1160212	97,49	7991	6156
10pV	1385982	1169316	98,50	8222	7491

pDNA, plazmidna DNA; p-MS, pred-matična serija; MS, matična serija; pV, pasaž na stanicama Vero; A i B, linije uzastopnog kultiviranja održavane prenošenjem 1 i 100 µL virusnog supernatanta; p4, plak 4; p4S1 i p4S2, serije virusa korištene u pokusima *in vivo*; pCEF, pasaž na fibroblastima pilećih embrija; A, B i C, replike; SD, standardna devijacija.

Prilog 2. Popis promjena detektiranih sekvenciranjem metodom nove generacije u pred-matičnim i matičnim serijama kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C (vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2) te matičnim serijama kontrolnih virusa. Supstitucije nađene u kodirajućoj regiji (CDS) dodatne transkripcijske jedinice virusa vCE1E2-HCV-MRV2 su podijeljene na zasebne gene virusa hepatitis C, C, E1 ili E2. Za supstitucije nađene u genu P su navedene samo promjene u regijama CDS proteina P, V, i I.

Virusni uzorak	Nukleotidna pozicija	Novi nukleotid	Originalni nukleotid	Zastupljenost promjene (%)	Aminokiselinska promjena*	Regija genoma
vCE1E2-HCV-MRV2 p-MS	2153	T	C	21,89	Arg59STOP	C CDS
	3063	C	T	8,60	Phe171Ser	E1 CDS
	3082	A	G	4,70	Trp177STOP	E1 CDS
	3801	C	T	2,59	Leu225Pro	E2 CDS
	3975	G	T	15,35	Leu283Arg	E2 CDS
	5310	A	G	14,17	Gly304Arg	P CDS
	9577	G	A	3,41	180	HN CDS
	12051	C	T	3,90	Ile397Thr	L CDS
	12067	C	T	3,53	402	L CDS
	12084	T	C	57,18	Pro408Leu	L CDS
	14577	G	A	19,48	Lys1239Arg	L CDS
	15984	A	C	4,15	Ser1708Tyr	L CDS
vCE1E2-HCV-MRV2 MS	1903	T	A	2,12	N/P	3' NCR N
	1923	T	C	5,14	N/P	5' NCR CE1E2
	2083	A	C	27,09	Tyr35STOP	C CDS
	2153	T	C	12,31	Arg59STOP	C CDS
	3063	C	T	7,64	Phe171Ser	E1 CDS
	3975	G	T	55,85	Leu283Arg	E2 CDS
	5310	A	G	60,97	Gly304Arg	P CDS
	9566	A	G	2,51	Gly177Ser	HN CDS
	12051	C	T	4,22	Ile397Thr	L CDS
	12067	C	T	4,54	402	L CDS
	12084	T	C	88,93	Pro408Leu	L CDS
	14570	C	T	2,70	Tyr1237His	L CDS
	14577	G	A	13,07	Lys1239Arg	L CDS
	15984	A	C	5,72	Ser1708Tyr	L CDS
vE1E2TMD-HCV-MRV2 p-MS	2751	C	T	4,06	N/P	5' NCR E2TMD
	7992	T	C	11,02	423	F CDS
	10597	C	T	2,47	N/P	3' NCR HN
	10625	A	C	89,27	Leu4Ile	L CDS
	11137	T	G	2,00	Glu174Asp	L CDS
	11744	T	C	4,06	Gln377STOP	L CDS
	11838	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	13452	A	T	3,98	Leu946Gln	L CDS
vE1E2TMD-HCV-MRV2 MS	34	G	A	2,65	N/P	5' Le
	189	G	A	2,44	Gln15Arg	N CDS
	774	C	T	2,11	Met210Thr	N CDS
	2751	C	T	5,24	N/P	5' NCR E2TMD

	7992	T	C	13,59	423	F CDS
	10597	C	T	2,35	N/P	3' NCR HN
	10625	A	C	92,50	Leu4Ile	L CDS
	11137	T	G	3,54	Glu174Asp	L CDS
	11744	T	C	4,08	Gln377STOP	L CDS
	11838	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	12694	C	T	2,50	693	L CDS
	13452	A	T	4,94	Leu946Gln	L CDS
	16938	C	T	4,86	Ile2108Thr	L CDS
vMRV2 MS	4618	G	T	2,43	Leu25Val	F CDS
	9660	T	C	35,66	Pro408Leu	L CDS
vMRV3 MS	1588	C	T	5,47	481	N CDS
	1615	C	T	2,31	490	N CDS
	5194	G	A	2,76	Lys340Arg	M CDS
	9066	G	A	2,20	Asn514Ser	HN CDS
	9481	G	A	3,73	44	L CDS
	10572	T	C	74,62	Pro408Leu	L CDS
	11558	C	T	3,48	Phe737Leu	L CDS
	13670	A	G	2,25	Glu1441Lys	L CDS
	15103	A	G	3,56	1918	L CDS

*Prva oznaka odgovara plazmidnoj sekvenciji, druga oznaka odgovara virusnoj sekvenciji. Za sinonimne supstitucije je naveden samo broj aminokiseline. p-MS, pred-matična serija; MS, matična serija; CDS, kodirajuća regija; NCR, nekodirajuća regija; Le, *leader* (regija NCR na 5' kraju antigenoma); N/P, nije primjenjivo.

Prilog 3. Popis promjena detektiranih sekvenciranjem metodom nove generacije tijekom uzastopne kultivacije kimernih virusa zaušnjaka s genima za površinske proteine virusa hepatitisa C (vCE1E2-HCV-MRV2 i vE1E2TMD-HCV-MRV2) i kontrolnih virusa na stanicama Vero. Supstitucije nađene u kodirajućoj regiji (CDS) dodatne transkripcijske jedinice virusa vCE1E2-HCV-MRV2 su podijeljene na zasebne gene virusa hepatitisa C, C, E1 ili E2. Za supstitucije nađene u genu P su navedene samo promjene u regijama CDS proteina P, V, i I.

Virusni uzorak	Nukleotidna pozicija	Novi nukleotid	Originalni nukleotid	Zastupljenost promjene (%)	Aminokiselinska promjena*	Regija genoma
vCE1E2-HCV-MRV2 5pV A1	1127	A	G	48,71	Gly328Ser	N CDS
	1616	G	A	24,24	Asn491Asp	N CDS
	1717	G	A	10,82	524	N CDS
	1718	G	A	10,43	Arg525Gly	N CDS
	1903	T	A	21,50	N/P	3' NCR N
	1904	G	A	8,27	N/P	3' NCR N
	1906	G	A	8,47	N/P	3' NCR N
	1998	T	C	4,88	Pro7Leu	C CDS
	2003	T	A	4,96	Arg9STOP	C CDS
	2083	A	C	60,39	Tyr35STOP	C CDS
	2311	A	C	23,90	Asp111Glu	C CDS
	2852	C	A	4,83	Thr101Pro	E1 CDS
	3975	G	T	60,49	Leu283Arg	E2 CDS
	4327	T	A	3,22	N/P	3' NCR CE1E2
	4506	C	T	19,77	Leu35Ser	P, V, I CDS
	5310	A	G	59,43	Gly304Arg	P CDS
	7765	A	G	3,30	Glu266Lys	F CDS
	9566	A	G	5,68	Gly177Ser	HN CDS
	11232	G	T	20,26	Ile124Arg	L CDS
	12084	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	12940	C	T	2,28	693	L CDS
	14082	T	G	9,97	Ser1074Ile	L CDS
	14252	A	C	2,37	Gln1131Lys	L CDS
	14570	C	T	5,08	Tyr1237His	L CDS
	14577	G	A	10,22	Lys1239Arg	L CDS
vCE1E2-HCV-MRV2 5pV A2	1616	G	A	47,92	Asn491Asp	N CDS
	1717	G	A	17,87	524	N CDS
	1718	G	A	18,12	Arg525Gly	N CDS
	1903	T	A	42,77	N/P	3' NCR N
	1904	G	A	25,14	N/P	3' NCR N
	1906	G	A	25,92	N/P	3' NCR N
	2083	A	C	20,49	Tyr35STOP	C CDS
	3691	G	T	2,91	Ile188Met	E2 CDS
	3958	A	C	2,59	277	E2 CDS
	3975	G	T	23,12	Leu283Arg	E2 CDS
	4327	T	A	6,73	N/P	3' NCR CE1E2
	4506	C	T	48,07	Leu35Ser	P, V, I CDS
	5310	A	G	28,07	Gly304Arg	P CDS

	10284	A	G	4,04	Arg416Gln	HN CDS
	11232	G	T	47,11	Ile124Arg	L CDS
	12084	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	12940	C	T	2,06	693	L CDS
	14082	T	G	17,17	Ser1074Ile	L CDS
	14577	G	A	19,63	Lys1239Arg	L CDS
	16560	G	A	4,85	Glu1900Gly	L CDS
vCE1E2-HCV-MRV2 5pV A3	1127	A	G	80,39	Gly328Ser	N CDS
	1616	G	A	4,93	Asn491Asp	N CDS
	1717	G	A	5,14	524	N CDS
	1718	G	A	5,20	Arg525Gly	N CDS
	1903	T	A	7,56	N/P	3' NCR N
	1904	G	A	6,85	N/P	3' NCR N
	1906	G	A	6,72	N/P	3' NCR N
	2052	T	C	47,33	Pro25Leu	C CDS
	2083	A	C	86,25	Tyr35STOP	C CDS
	2694	A	G	12,26	Trp48STOP	E1 CDS
	3975	G	T	84,97	Leu283Arg	E2 CDS
	4506	C	T	6,33	Leu35Ser	P, V, I CDS
	5310	A	G	85,31	Gly304Arg	P CDS
	7019	A	C	4,22	Ser17Tyr	F CDS
	11232	G	T	5,69	Ile124Arg	L CDS
	12084	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	14082	T	G	5,72	Ser1074Ile	L CDS
	14284	C	T	5,18	1141	L CDS
	14577	G	A	6,23	Lys1239Arg	L CDS
vCE1E2-HCV-MRV2 5pV B2	1616	G	A	31,99	Asn491Asp	N CDS
	1717	G	A	18,50	524	N CDS
	1718	G	A	17,97	Arg525Gly	N CDS
	1903	T	A	31,91	N/P	3' NCR N
	1904	G	A	14,50	N/P	3' NCR N
	1906	G	A	14,79	N/P	3' NCR N
	2083	A	C	38,66	Tyr35STOP	C CDS
	2153	T	C	2,97	Arg59STOP	C CDS
	3975	G	T	41,70	Leu283Arg	E2 CDS
	4327	T	A	3,92	N/P	3' NCR CE1E2
	4328	G	A	2,76	N/P	3' NCR CE1E2
	4330	G	A	2,83	N/P	3' NCR CE1E2
	4506	C	T	30,12	Leu35Ser	P, V, I CDS
	5310	A	G	46,59	Gly304Arg	P CDS
	9469	A	C	2,56	144	HN CDS
	10284	A	G	3,37	Arg416Gln	HN CDS
	11232	G	T	24,29	Ile124Arg	L CDS
	12084	T	C	96,40	Pro408Leu	L CDS
	14082	T	G	14,96	Ser1074Ile	L CDS
	14577	G	A	17,48	Lys1239Arg	L CDS
	16560	G	A	2,50	Glu1900Gly	L CDS
vCE1E2-HCV-MRV2 10pV A1	1127	A	G	58,26	Gly328Ser	N CDS
	1616	G	A	27,17	Asn491Asp	N CDS
	1717	G	A	5,21	524	N CDS
	1718	G	A	4,99	Arg525Gly	N CDS
	1903	T	A	26,42	N/P	3' NCR N

	1904	G	A	4,05	N/P	3' NCR N
	1906	G	A	3,99	N/P	3' NCR N
	1923	T	C	7,65	N/P	5' NCR CE1E2
	1998	T	C	2,85	Pro7Leu	C CDS
	2003	T	A	2,70	Arg9STOP	C CDS
	2009	C	A	4,13	Thr11Pro	C CDS
	2083	A	C	62,03	Tyr35STOP	C CDS
	2311	A	C	37,99	Asp111Glu	C CDS
	2852	C	A	3,01	Thr101Pro	E1 CDS
	3063	C	T	3,07	Phe171Ser	E1 CDS
	3975	G	T	64,89	Leu283Arg	E2 CDS
	4327	T	A	5,39	N/P	3' NCR CE1E2
	4506	C	T	27,05	Leu35Ser	P, V, I CDS
	5310	A	G	63,35	Gly304Arg	P CDS
	7765	A	G	4,32	Glu266Lys	F CDS
	9566	A	G	3,54	Gly177Ser	HN CDS
	11232	G	T	25,22	Ile124Arg	L CDS
	12084	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	14082	T	G	4,32	Ser1074Ile	L CDS
	14570	C	T	2,93	Tyr1237His	L CDS
	14577	G	A	4,33	Lys1239Arg	L CDS
	15984	A	C	2,65	Ser1708Tyr	L CDS
vCE1E2-HCV-MRV2 10pV A2	949	A	C	9,77	268	N CDS
	1616	G	A	53,95	Asn491Asp	N CDS
	1717	G	A	9,74	524	N CDS
	1718	G	A	10,01	Arg525Gly	N CDS
	1869	T	C	9,39	N/P	3' NCR N
	1902	G	A	2,46	N/P	3' NCR N
	1903	T	A	80,91	N/P	3' NCR N
	2003	C	A	17,67	9	C CDS
	2083	A	C	33,05	Tyr35STOP	C CDS
	3691	G	T	7,44	Ile188Met	E2 CDS
	3958	A	C	8,44	277	E2 CDS
	3975	G	T	36,01	Leu283Arg	E2 CDS
	4293	T	C	4,44	N/P	3' NCR CE1E2
	4326	G	A	2,41	N/P	3' NCR CE1E2
	4347	C	T	7,84	N/P	5' NCR P
	4506	C	T	52,42	Leu35Ser	P, V, I CDS
	5310	A	G	39,87	Gly304Arg	P CDS
	10736	T	G	2,61	Val567Phe	HN CDS
	11232	G	T	44,50	Ile124Arg	L CDS
	12084	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	13030	G	T	18,28	723	L CDS
	14082	T	G	7,43	Ser1074Ile	L CDS
	14577	G	A	9,70	Lys1239Arg	L CDS
	16560	G	A	2,03	Glu1900Gly	L CDS
	17237	A	G	20,06	Val2126Ile	L CDS
vCE1E2-HCV-MRV2 10pV A3	1127	A	G	82,07	Gly328Ser	N CDS
	1423	C	T	2,22	426	N CDS
	1496	C	T	3,18	Phe451Leu	N CDS
	1616	G	A	8,13	Asn491Asp	N CDS
	1677	C	T	2,10	Leu511Ser	N CDS

	1717	G	A	2,50	524	N CDS
	1718	G	A	2,54	Arg525Gly	N CDS
	1753	C	T	5,25	536	N CDS
	1903	T	A	9,50	N/P	3' NCR N
	1904	G	A	2,84	N/P	3' NCR N
	1904	C	A	2,46	N/P	3' NCR N
	1906	G	A	2,78	N/P	3' NCR N
	2009	C	A	3,22	Thr11Pro	C CDS
	2009	G	A	2,02	Thr11Ala	C CDS
	2052	T	C	33,94	Pro25Leu	C CDS
	2083	A	C	84,84	Tyr35STOP	C CDS
	2694	A	G	38,18	Trp48STOP	E1 CDS
	3063	C	T	3,26	Phe171Ser	E1 CDS
	3975	G	T	87,74	Leu283Arg	E2 CDS
	4506	C	T	7,52	Leu35Ser	P, V, I CDS
	5310	A	G	88,33	Gly304Arg	P CDS
	5497	A	T	4,44	Phe366Tyr	P CDS
	7019	A	C	3,25	Ser17Tyr	F CDS
	8480	A	T	2,47	Phe504Tyr	F CDS
	11232	G	T	6,48	Ile124Arg	L CDS
	11683	C	A	2,40	274	L CDS
	12084	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	12921	A	G	2,68	Arg687His	L CDS
	12940	C	T	2,58	693	L CDS
	14082	T	G	2,16	Ser1074Ile	L CDS
	14284	C	T	15,99	1141	L CDS
	14577	G	A	2,39	Lys1239Arg	L CDS
	15984	A	C	3,68	Ser1708Tyr	L CDS
	17584	C	T	3,51	2241	L CDS
vCE1E2-HCV-MRV2 10pV B2	1616	G	A	52,550	Asn491Asp	N CDS
	1717	G	A	10,930	524	N CDS
	1718	G	A	10,940	Arg525Gly	N CDS
	1903	T	A	49,980	N/P	3' NCR N
	1904	G	A	12,420	N/P	3' NCR N
	1906	G	A	12,520	N/P	3' NCR N
	2009	C	A	2,594	Thr11Pro	C CDS
	2083	A	C	29,860	Tyr35STOP	C CDS
	3063	C	T	2,019	Phe171Ser	E1 CDS
	3975	G	T	41,480	Leu283Arg	E2 CDS
	4327	T	A	2,924	N/P	3' NCR CE1E2
	4506	C	T	40,700	Leu35Ser	P, V, I CDS
	5310	A	G	42,160	Gly304Arg	P CDS
	10284	A	G	2,469	Arg416Gln	HN CDS
	10531	A	T	2,132	Asn498Lys	HN CDS
	11232	G	T	32,140	Ile124Arg	L CDS
	12084	T	C	100,000	Pro408Leu	L CDS
	14082	T	G	9,298	Ser1074Ile	L CDS
	14577	G	A	12,570	Lys1239Arg	L CDS
	15984	A	C	4,706	Ser1708Tyr	L CDS
	17584	C	T	2,780	2241	L CDS
vE1E2TMD-HCV-MRV2 5pV A1	31	C	T	2,26	N/P	5' Le
	1587	C	T	39,91	Leu481Pro	N CDS

	1904	G	A	20,06	N/P	3' NCR N
	3160	T	G	3,65	Lys118Asn	E2TMD CDS
	3679	A	G	2,38	291	E2TMD CDS
	4082	G	A	5,34	N/P	3' NCR E2TMD
	7915	A	G	20,38	Asp398Asn	F CDS
	7992	T	C	6,09	423	F CDS
	8324	G	A	2,34	Asp534Gly	F CDS
	8382	G	A	2,11	N/P	3' NCR F
	9286	T	G	2,01	Met165Ile	HN CDS
	9830	C	T	5,36	Tyr347His	HN CDS
	10439	A	G	5,08	Gly550Ser	HN CDS
	10625	A	C	97,73	Leu4Ile	L CDS
	10836	C	T	31,83	Ile74Thr	L CDS
	11137	T	G	3,24	Glu174Asp	L CDS
	11619	T	C	2,10	Thr335Ile	L CDS
	11838	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	12318	T	C	2,66	Thr568Ile	L CDS
	12683	G	A	6,49	Asn690Asp	L CDS
	12770	T	C	2,18	Pro719Ser	L CDS
	13452	A	T	2,98	Leu946Gln	L CDS
	16903	C	A	2,37	Arg2096Ser	L CDS
vE1E2TMD-HCV-MRV2 5pV A2	1368	A	G	3,47	Gly408Glu	N CDS
	1587	C	T	6,16	Leu481Pro	N CDS
	1905	G	A	26,37	N/P	3' NCR N
	2103	G	A	4,02	Glu42Gly	E1TMD CDS
	2124	A	G	3,66	Trp49STOP	E1TMD CDS
	3160	T	G	5,13	Lys118Asn	E2TMD CDS
	4083	G	A	7,60	N/P	3' NCR E2TMD
	7304	A	C	2,80	Thr194Asn	F CDS
	7992	T	C	5,10	423	F CDS
	9461	C	T	4,08	Tyr224His	HN CDS
	9462	C	A	4,50	Tyr224Ser	HN CDS
	9830	C	T	10,51	Tyr347His	HN CDS
	10625	A	C	96,66	Leu4Ile	L CDS
	10836	C	T	5,77	Ile74Thr	L CDS
	10858	A	C	2,99	81	L CDS
	11010	G	T	3,08	Val132Gly	L CDS
	11137	T	G	2,03	Glu174Asp	L CDS
	11838	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	12683	G	A	3,94	Asn690Asp	L CDS
	13452	A	T	2,53	Leu946Gln	L CDS
	14847	T	C	3,33	Pro1411Leu	L CDS
	14874	T	A	29,23	Glu1420Val	L CDS
vE1E2TMD-HCV-MRV2 5pV A3	468	T	A	2,00	Glu108Val	N CDS
	1587	C	T	10,53	Leu481Pro	N CDS
	3160	T	G	5,64	Lys118Asn	E2TMD CDS
	3971	C	T	5,23	STOP389Gln	E2TMD CDS
	6496	T	A	3,48	Asp352Val	M CDS
	7626	A	C	2,53	301	F CDS
	7992	T	C	5,95	423	F CDS
	8193	T	C	2,07	490	F CDS
	9286	T	G	2,59	Met165Ile	HN CDS

	9462	C	A	2,37	Tyr224Ser	HN CDS
	9830	C	T	20,39	Tyr347His	HN CDS
	10439	A	G	8,43	Gly550Ser	HN CDS
	10625	A	C	97,91	Leu4Ile	L CDS
	10836	C	T	12,17	Ile74Thr	L CDS
	11010	G	T	2,51	Val132Gly	L CDS
	11137	T	G	2,45	Glu174Asp	L CDS
	11838	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	12068	G	A	2,55	Lys485Glu	L CDS
	12683	G	A	7,99	Asn690Asp	L CDS
	12770	T	C	3,85	Pro719Ser	L CDS
	16903	C	A	2,64	Arg2096Ser	L CDS
vE1E2TMD-HCV-MRV2 5pV B2	1368	A	G	2,85	Gly408Glu	N CDS
	1905	G	A	8,07	N/P	3' NCR N
	7992	T	C	9,78	423	F CDS
	9461	C	T	3,18	Tyr224His	HN CDS
	9462	C	A	3,02	Tyr224Ser	HN CDS
	9830	C	T	8,08	Tyr347His	HN CDS
	10625	A	C	94,65	Leu4Ile	L CDS
	10836	C	T	2,95	Ile74Thr	L CDS
	11010	G	T	2,08	Val132Gly	L CDS
	11137	T	G	3,60	Glu174Asp	L CDS
	11838	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	13452	A	T	4,18	Leu946Gln	L CDS
	13671	A	T	2,63	Leu1019STOP	L CDS
	14847	T	C	2,28	Pro1411Leu	L CDS
	14874	T	A	5,49	Glu1420Val	L CDS
	16139	T	G	3,20	Gly1842Cys	L CDS
vE1E2TMD-HCV-MRV2 5pV B3	589	G	A	2,00	148	N CDS
	860	G	T	2,22	Leu239Val	N CDS
	1587	C	T	6,62	Leu481Pro	N CDS
	2103	G	A	2,65	Glu42Gly	E1TMD CDS
	3160	T	G	3,52	Lys118Asn	E2TMD CDS
	3378	A	G	2,01	Gly191Glu	E2TMD CDS
	7992	T	C	11,02	423	F CDS
	9286	T	G	3,49	Met165Ile	HN CDS
	9830	C	T	13,88	Tyr347His	HN CDS
	10439	A	G	5,50	Gly550Ser	HN CDS
	10625	A	C	96,22	Leu4Ile	L CDS
	10836	C	T	5,27	Ile74Thr	L CDS
	11137	T	G	3,13	Glu174Asp	L CDS
	11838	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	12068	G	A	2,52	Lys485Glu	L CDS
	12565	A	T	2,10	Ser650Arg	L CDS
	12683	G	A	4,00	Asn690Asp	L CDS
	13452	A	T	3,08	Leu946Gln	L CDS
	16903	C	A	4,03	Arg2096Ser	L CDS
	16938	C	T	2,88	Ile2108Thr	L CDS
vE1E2TMD-HCV-MRV2 10pV A1	1587	C	T	53,65	Leu481Pro	N CDS
	1600	G	A	2,11	485	N CDS
	1722	A	G	4,52	Gly526Asp	N CDS
	1727	T	C	8,79	His528Tyr	N CDS

	1904	G	A	24,09	N/P	3' NCR N
	2125	A	G	2,93	Trp49STOP	E1TMD CDS
	2130	T	C	2,22	Ala51Val	E1TMD CDS
	2183	T	C	2,17	Arg69STOP	E1TMD CDS
	2751	C	T	3,08	N/P	5' NCR E2TMD
	3160	T	G	2,50	Lys118Asn	E2TMD CDS
	3679	A	G	11,38	291	E2TMD CDS
	4082	G	A	13,85	N/P	3' NCR E2TMD
	4133	C	A	2,30	N/P	5' NCR P
	5016	A	G	3,34	Glu288Lys	P CDS
	5036	G	T	19,89	Ser294Arg	P CDS
	5423	T	C	2,34	N/P	5' NCR M
	7915	A	G	35,52	Asp398Asn	F CDS
	9286	T	G	3,02	Met165Ile	HN CDS
	9830	C	T	15,93	Tyr347His	HN CDS
	10439	A	G	25,45	Gly550Ser	HN CDS
	10490	T	G	2,57	Val567Phe	HN CDS
	10625	A	C	100,00	Leu4Ile	L CDS
	10836	C	T	38,66	Ile74Thr	L CDS
	11838	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	16903	C	A	3,17	Arg2096Ser	L CDS
vE1E2TMD-HCV-MRV2 10pV A2	1587	C	T	3,78	Leu481Pro	N CDS
	1905	G	A	85,95	N/P	3' NCR N
	1981	T	G	2,53	Met1Ile	E1TMD CDS
	2051	T	G	2,21	Glu25STOP	E1TMD CDS
	2103	G	A	3,13	Glu42Gly	E1TMD CDS
	3160	T	G	5,19	Lys118Asn	E2TMD CDS
	5662	C	T	3,10	Ile74Thr	M CDS
	5953	A	G	5,86	Cys171Tyr	M CDS
	6087	A	G	2,02	Asp216Asn	M CDS
	7304	A	C	11,67	Thr194Asn	F CDS
	8309	T	C	2,10	Ser529Leu	F CDS
	9452	C	G	14,39	Ala221Pro	HN CDS
	9462	C	A	3,89	Tyr224Ser	HN CDS
	9826	G	T	3,76	Asn345Lys	HN CDS
	9830	C	T	6,82	Tyr347His	HN CDS
	10625	A	C	100,00	Leu4Ile	L CDS
	10761	T	G	2,47	Trp49Leu	L CDS
	10836	C	T	4,49	Ile74Thr	L CDS
	11838	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	12683	G	A	8,60	Asn690Asp	L CDS
	14874	T	A	67,75	Glu1420Val	L CDS
vE1E2TMD-HCV-MRV2 10pV A3	1587	C	T	76,39	Leu481Pro	N CDS
	1905	G	A	87,04	N/P	3' NCR N
	1906	G	A	4,00	N/P	3' NCR N
	2751	C	T	2,75	N/P	5' NCR E2TMD
	5001	A	G	2,80	Gly283Arg	P CDS
	6496	T	A	3,17	Asp352Val	M CDS
	7626	A	C	60,29	301	F CDS
	8472	T	C	61,24	9	SH CDS
	9286	T	G	4,65	Met165Ile	HN CDS
	9462	C	A	3,39	Tyr224Ser	HN CDS

	9725	G	A	2,40	Ile312Val	HN CDS
	9830	C	T	31,97	Tyr347His	HN CDS
	9893	G	A	3,83	Ser368Gly	HN CDS
	10439	A	G	25,50	Gly550Ser	HN CDS
	10625	A	C	100,00	Leu4Ile	L CDS
	10836	C	T	9,80	Ile74Thr	L CDS
	11010	G	T	2,17	Val132Gly	L CDS
	11838	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	12683	G	A	6,93	Asn690Asp	L CDS
	12770	T	C	5,42	Pro719Ser	L CDS
	13736	C	A	2,59	Ser1041Arg	L CDS
	16715	G	A	3,19	Arg2034Gly	L CDS
	16903	C	A	3,99	Arg2096Ser	L CDS
vE1E2TMD-HCV-MRV2 10pV B2	1368	A	G	2,71	Gly408Glu	N CDS
	1905	G	A	15,40	N/P	3' NCR N
	2103	G	A	8,88	Glu42Gly	E1TMD CDS
	2124	A	G	4,58	Trp49STOP	E1TMD CDS
	2564	C	T	5,10	Phe196Leu	E1TMD CDS
	3914	C	T	5,33	Phe370Leu	E2TMD CDS
	4083	G	A	5,65	N/P	3' NCR E2TMD
	4712	C	T	3,14	186	P CDS
					Phe186Leu	V CDS
	4747	C	T	2,99	Leu198Pro	P CDS
					197	V CDS
	4760	C	T	3,01	202	P CDS
					Phe202Leu	V CDS
	7992	T	C	2,88	423	F CDS
	8413	A	G	2,84	N/P	5' NCR SH
	9461	C	T	9,54	Tyr224His	HN CDS
	9462	C	A	12,47	Tyr224Ser	HN CDS
	9830	C	T	32,40	Tyr347His	HN CDS
	10439	A	G	3,40	Gly550Ser	HN CDS
	10625	A	C	100,00	Leu4Ile	L CDS
	10858	A	C	3,69	81	L CDS
	10936	A	G	4,44	Met107Ile	L CDS
	11838	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	14847	T	C	4,02	Pro1411Leu	L CDS
	14874	T	A	21,00	Glu1420Val	L CDS
	14998	A	T	3,44	1461	L CDS
vE1E2TMD-HCV-MRV2 10pV B3	860	G	T	2,87	Leu239Val	N CDS
	2103	G	A	3,44	Glu42Gly	E1TMD CDS
	2973	C	T	2,85	Leu56Ser	E2TMD CDS
	3073	C	T	2,02	89	E2TMD CDS
	3160	T	G	2,63	Lys118Asn	E2TMD CDS
	3914	C	T	2,18	Phe370Leu	E2TMD CDS
	6496	T	A	2,61	Asp352Val	M CDS
	8193	T	C	5,35	490	F CDS
	9286	T	G	10,90	Met165Ile	HN CDS
	9462	C	A	4,31	Tyr224Ser	HN CDS
	9830	C	T	53,04	Tyr347His	HN CDS
	10439	A	G	14,06	Gly550Ser	HN CDS
	10625	A	C	97,98	Leu4Ile	L CDS

	10836	C	T	2,51	Ile74Thr	L CDS
	11838	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	12683	G	A	2,62	Asn690Asp	L CDS
	16715	G	A	3,37	Arg2034Gly	L CDS
	16903	C	A	10,80	Arg2096Ser	L CDS
vMRV2 5pV	1793	C	T	6,58	STOP550Gln	N CDS
	2728	G	A	3,14	Gln251Arg	P CDS
	8261	A	G	5,42	Gly550Ser	HN CDS
	9660	T	C	74,66	Pro408Leu	L CDS
	13374	C	A	4,61	Gln1646Pro	L CDS
vMRV2 10pV	1793	C	T	26,76	STOP550Gln	N CDS
	8261	A	G	78,66	Gly550Ser	HN CDS
	9660	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	13374	C	A	79,43	Gln1646Pro	L CDS
vMRV3 5pV	135	T	C	2,65	N/P	5' NCR N
	1588	C	T	93,80	481	N CDS
	1599	C	T	93,19	Leu485Ser	N CDS
	1601	C	T	52,00	Tyr486His	N CDS
	1615	C	T	91,19	490	N CDS
	3274	C	T	17,89	128	P, V, I CDS
	3305	C	T	17,75	Phe139Leu	P, V, I CDS
	3494	C	T	19,11	202	P CDS
					Phe202Leu	V CDS
	3587	C	A	14,50	Gln233His	P CDS
	3750	A	G	2,08	Glu288Lys	P CDS
	5424	G	T	3,58	N/P	5' NCR F
	6514	C	A	5,02	Ile353Leu	F CDS
	8144	C	T	17,94	Ser207Pro	HN CDS
	8181	G	A	6,16	Gln219Arg	HN CDS
	8226	T	A	2,83	Tyr234Phe	HN CDS
	8506	A	G	3,90	327	HN CDS
	8565	T	A	56,17	Tyr347Phe	HN CDS
	10572	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	11525	T	C	3,55	Leu726Phe	L CDS
	11546	C	A	2,09	Asn733His	L CDS
	12047	G	T	57,67	Phe900Val	L CDS
	14177	A	G	2,39	Asp1610Asn	L CDS
vMRV3 10pV	135	135	C	2,56	N/P	5' NCR N
	1588	1588	T	100,00	481	N CDS
	1599	1599	T	100,00	Leu485Ser	N CDS
	1601	1601	T	100,00	Tyr486His	N CDS
	1615	1615	T	92,96	490	N CDS
	3735	3735	G	2,32	Gly283Arg	P CDS
	3750	3750	G	2,09	Glu288Lys	P CDS
	5424	5424	T	5,67	N/P	5' NCR F
	8181	8181	A	2,20	Gln219Arg	HN CDS
	8226	8226	A	2,20	Tyr234Phe	HN CDS
	8324	8324	G	3,73	Asp267Asn	HN CDS
	8506	8506	G	2,24	327	HN CDS
	8516	8516	A	8,02	Thr331Ala	HN CDS
	8565	8565	A	89,14	Tyr347Phe	HN CDS
	9182	9182	A	23,33	Ser553Gly	HN CDS

9184	9184	T	3,18	Ser553Arg	HN CDS
10572	10572	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
11525	11525	C	2,00	Leu726Phe	L CDS
12047	12047	T	89,33	Phe900Val	L CDS
13204	13204	A	4,46	1285	L CDS
14767	14767	T	3,39	1806	L CDS

*Prva oznaka odgovara plazmidnoj sekvenciji, druga oznaka odgovara virusnoj sekvenciji. Za sinonimne supstitucije je naveden samo broj aminokiseline. pV, pasaž na stanicama Vero; A i B, linije uzastopnog kultiviranja održavane prenošenjem 1 i 100 µL virusnog supernatanta; CDS, kodirajuća regija; NCR, nekodirajuća regija; Le, *leader* (regija NCR na 5' kraju antigenoma); N/P, nije primjenjivo.

Prilog 4. Popis promjena detektiranih sekvenciranjem metodom nove generacije u cijepnom kandidatu vCE1E2-HCV-MRV2 plak 4 (p4) te serijama virusa korištenim u pokusima *in vivo*. Supstitucije nađene u kodirajućoj regiji (CDS) dodatne transkripcijske jedinice virusa vCE1E2-HCV-MRV2 su podijeljene na zasebne gene virusa hepatitisa C, C, E1 ili E2. Za supstitucije nađene u genu P su navedene samo promjene u regijama CDS proteina P, V, i I.

Virusni uzorak	Nukleotidna pozicija	Novi nukleotid	Originalni nukleotid	Zastupljenost promjene (%)	Aminokiselinska promjena*	Regija genoma
vCE1E2-HCV-MRV2 p4	3700	T	G	8,70	191	E2 CDS
	3975	G	T	100,00	Leu283Arg	E2 CDS
	5310	A	G	100,00	Gly304Arg	P CDS
	12084	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	12921	A	G	2,33	Arg687His	L CDS
	15479	G	T	97,92	Ser1540Ala	L CDS
vCE1E2-HCV-MRV2 p4S1	1127	A	G	35,75	Gly328Ser	N CDS
	1843	G	A	10,90	N/P	3' NCR N
	1857	G	A	10,56	N/P	3' NCR N
	1858	G	A	10,93	N/P	3' NCR N
	1905	G	A	14,14	N/P	3' NCR N
	1975	G	A	14,88	N/P	5' NCR CE1E2
	1995	G	A	12,05	Lys6Arg	C CDS
	2001	G	A	11,34	Gln8Arg	C CDS
	2006	G	A	10,35	Lys10Glu	C CDS
	2008	G	A	10,40	10	C CDS
	2018	G	A	11,33	Asn14Asp	C CDS
	2052	T	C	39,50	Pro25Leu	C CDS
	2083	A	C	37,44	Tyr35STOP	C CDS
	3700	T	G	5,56	191	E2 CDS
	3975	G	T	100,00	Leu283Arg	E2 CDS
	4267	G	A	3,11	N/P	3' NCR CE1E2
	4281	G	A	3,53	N/P	3' NCR CE1E2
	4282	G	A	3,75	N/P	3' NCR CE1E2
	5310	A	G	100,00	Gly304Arg	P CDS
	12084	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	12448	C	T	11,54	529	L CDS
	12921	A	G	3,05	Arg687His	L CDS
	12940	C	T	2,51	693	L CDS
	15479	G	T	68,94	Ser1540Ala	L CDS
vCE1E2-HCV-MRV2 p4S2	1127	A	G	28,87	Gly328Ser	N CDS
	1843	G	A	9,16	N/P	3' NCR N
	1857	G	A	9,51	N/P	3' NCR N
	1858	G	A	9,60	N/P	3' NCR N
	1905	G	A	9,91	N/P	3' NCR N
	1975	G	A	13,75	N/P	5' NCR CE1E2
	1995	G	A	12,53	Lys6Arg	C CDS
	2001	G	A	11,77	Gln8Arg	C CDS
	2006	G	A	10,98	Lys10Glu	C CDS
	2008	G	A	10,90	10	C CDS

2018	G	A	11,88	Asn14Asp	C CDS
2040	G	A	14,05	Asp21Gly	C CDS
2052	T	C	31,29	Pro25Leu	C CDS
2083	A	C	32,13	Tyr35STOP	C CDS
3700	T	G	4,65	191	E2 CDS
3975	G	T	100,00	Leu283Arg	E2 CDS
4267	G	A	2,46	N/P	3' NCR CE1E2
4281	G	A	2,75	N/P	3' NCR CE1E2
4282	G	A	2,93	N/P	3' NCR CE1E2
4347	C	T	2,42	N/P	5' NCR P
5310	A	G	100,00	Gly304Arg	P CDS
12084	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
12448	C	T	7,71	529	L CDS
15479	G	T	80,61	Ser1540Ala	L CDS

*Prva oznaka odgovara plazmidnoj sekvenciji, druga oznaka odgovara virusnoj sekvenciji. Za sinonimne supstitucije je naveden samo broj aminokiseline. p4, plak 4; p4S1 i p4S2, serije virusa korištene u pokusima *in vivo*; CDS, kodirajuća regija; NCR, nekodirajuća regija; N/P, nije primjenjivo.

Prilog 5. Popis promjena detektiranih sekvenciranjem metodom nove generacije tijekom uzastopne kultivacije cijepnog kandidata (vCE1E2-HCV-MRV2 p4) i kontrolnog virusa (vMRV2) na fibroblastima pilećih embrija. Supstitucije nađene u kodirajućoj regiji (CDS) dodatne transkripcijske jedinice virusa vCE1E2-HCV-MRV2 su podijeljene na zasebne gene virusa hepatitisa C, C, E1 ili E2. Za supstitucije nađene u genu P su navedene samo promjene u regijama CDS proteina P, V, i I.

Virusni uzorak	Nukleotidna pozicija	Novi nukleotid	Originalni nukleotid	Zastupljenost promjene (%)	Aminokiselinska promjena*	Regija genoma
vCE1E2-HCV-MRV2 p4 10pCEF A	108	T	C	5,42	N/P	5' NCR
	1843	G	A	96,24	N/P	3' NCR
	1857	G	A	100,00	N/P	3' NCR
	1858	G	A	100,00	N/P	3' NCR
	1905	G	A	96,99	N/P	3' NCR
	1975	G	A	100,00	N/P	5' NCR CE1E2
	1995	G	A	100,00	Lys6Arg	C CDS
	2001	T	G	2,84	Arg8Leu	C CDS
	2001	G	A	100,00	Gln8Arg	C CDS
	2006	G	A	100,00	Lys10Glu	C CDS
	2008	G	A	100,00	Lys10Glu	C CDS
	2018	G	A	100,00	Asn14Asp	C CDS
	2040	G	A	100,00	Asp21Gly	C CDS
	2117	A	C	100,00	Arg47Ser	C CDS
	2150	A	C	2,06	Pro58Thr	C CDS
	2245	A	G	3,32	89	C CDS
	3975	G	T	100,00	Leu283Arg	E2 CDS
	3987	T	C	100,00	Thr287Met	E2 CDS
	4347	C	T	2,94	N/P	5' NCR P
	4397	T	C	100,00	N/P	5' NCR P
	4542	A	T	100,00	Val47Glu	P, V, I CDS
	5211	A	G	91,78	Ala271Thr	P CDS
	5310	A	G	100,00	Gly304Arg	P CDS
	5458	C	T	5,89	Ile353Thr	P CDS
	5723	A	G	12,15	12	M CDS
	5899	T	C	4,67	Ser71Phe	M CDS
	6380	T	G	13,12	231	M CDS
	6650	C	T	3,89	321	M CDS
	6837	G	A	100,00	N/P	3' NCR M
	8754	A	C	2,93	21	SH CDS
	9077	G	A	2,16	Thr14Ala	HN CDS
	10233	C	A	2,36	Asn399Thr	HN CDS
	10505	G	A	100,00	Ser490Gly	HN CDS
	10529	T	A	2,14	Asn498Tyr	HN CDS
	12084	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	14503	A	C	97,58	Phe1214Leu	L CDS
	15479	G	T	97,85	Ser1540Ala	L CDS
vCE1E2-HCV-MRV2 p4 10pCEF B	108	T	C	3,58	N/P	5' NCR N

	161	G	A	2,48	Lys6Glu	N CDS
	802	G	T	3,64	Ile219Met	N CDS
	1423	C	T	2,06	426	N CDS
	1452	C	T	2,43	Leu436Ser	N CDS
	1843	G	A	100,00	N/P	3' NCR N
	1857	G	A	100,00	N/P	3' NCR N
	1858	G	A	100,00	N/P	3' NCR N
	1905	G	A	100,00	N/P	3' NCR N
	1975	G	A	100,00	N/P	5' NCR CE1E2
	1995	G	A	100,00	Lys6Arg	C CDS
	2001	G	A	100,00	Gln8Arg	C CDS
	2006	G	A	100,00	Lys10Glu	C CDS
	2008	G	A	100,00	Lys10Glu	C CDS
	2018	G	A	100,00	Asn14Asp	C CDS
	2040	G	A	100,00	Asp21Gly	C CDS
	2117	A	C	17,64	Arg47Ser	C CDS
	2987	A	C	2,04	Leu146Met	E1 CDS
	3975	G	T	100,00	Leu283Arg	E2 CDS
	3987	T	C	100,00	Thr287Met	E2 CDS
	4136	A	G	2,42	Val337Ile	E2 CDS
	4329	G	A	2,25	N/P	3' NCR CE1E2
	4542	A	T	11,07	Val47Glu	P, V, I CDS
	4703	C	A	3,48	Thr101Pro	P, V, I CDS
	5310	A	G	100,00	Gly304Arg	P CDS
	5567	A	C	40,99	Ser389Arg	P CDS
	5678	T	C	41,25	N/P	5' NCR M
	6728	G	A	5,59	347	M CDS
	6837	G	A	100,00	N/P	3' NCR M
	12084	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	12921	A	G	2,06	Arg687His	L CDS
	14503	A	C	15,30	Phe1214Leu	L CDS
	15479	G	T	100,00	Ser1540Ala	L CDS
	16619	A	G	2,71	Gly1920Ser	L CDS
	16764	C	T	36,29	Ile1968Thr	L CDS
vCE1E2-HCV-MRV2 p4 10pCEF C	108	T	C	4,17	N/P	5' NCR N
	306	G	T	80,88	Phe54Cys	N CDS
	1843	G	A	100,00	N/P	3' NCR N
	1857	G	A	100,00	N/P	3' NCR N
	1858	G	A	100,00	N/P	3' NCR N
	1905	G	A	100,00	N/P	3' NCR N
	1975	G	A	100,00	N/P	5' NCR CE1E2
	1995	G	A	100,00	Lys6Arg	C CDS
	2001	G	A	100,00	Gln8Arg	C CDS
	2006	G	A	100,00	Lys10Glu	C CDS
	2008	G	A	100,00	Lys10Glu	C CDS
	2018	G	A	100,00	Asn14Asp	C CDS
	2040	G	A	100,00	Asp21Gly	C CDS
	2117	A	C	5,69	Arg47Ser	C CDS
	2669	T	C	4,01	Arg40Cys	E1 CDS
	3380	A	G	2,17	Gly85Ser	E2 CDS
	3786	C	T	79,41	Ile220Thr	E2 CDS
	3809	C	T	79,73	Tyr228His	E2 CDS

	3815	C	T	80,18	Tyr230His	E2 CDS
	3817	C	T	79,66	230	E2 CDS
	3975	G	T	100,00	Leu283Arg	E2 CDS
	3987	T	C	100,00	Thr287Met	E2 CDS
	4347	C	T	2,18	N/P	5' NCR P
	4542	A	T	8,91	Val47Glu	P, V, I CDS
	4835	C	A	2,81	Thr145Pro	P, V, I CDS
	4835	G	A	2,51	Thr145Ala	P, V, I CDS
	4852	T	A	2,60	150	P, V, I CDS
	5310	A	G	97,58	Gly304Arg	P CDS
	5604	G	A	2,36	N/P	3' NCR P
	5678	T	C	78,04	N/P	5' NCR M
	6837	G	A	97,42	N/P	3' NCR M
	8057	T	G	2,72	Gly363Val	F CDS
	10505	G	A	11,73	Ser490Gly	HN CDS
	12084	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	12921	A	G	2,12	Arg687His	L CDS
	14503	A	C	8,46	Phe1214Leu	L CDS
	15479	G	T	100,00	Ser1540Ala	L CDS
	16764	C	T	77,44	Ile1968Thr	L CDS
	17777	T	A	2,01	N/P	3' NCR L
vMRV2 10pCEF A	370	C	A	11,19	75	N CDS
	527	T	G	8,72	Ala128Ser	N CDS
	895	T	C	2,42	250	N CDS
	1474	C	T	4,22	443	N CDS
	1489	C	T	5,34	448	N CDS
	1496	C	T	46,46	Phe451Leu	N CDS
	1524	C	T	47,43	Val460Ala	N CDS
	1537	C	T	48,29	464	N CDS
	1588	C	T	2,19	481	N CDS
	1598	C	T	45,34	485	N CDS
	1601	C	T	44,27	Tyr486His	N CDS
	1615	C	T	46,28	490	N CDS
	1636	C	T	3,19	497	N CDS
	1639	C	T	2,39	498	N CDS
	1653	C	T	3,08	Ile503Thr	N CDS
	1675	C	T	3,00	510	N CDS
	1719	A	G	17,63	Arg525Lys	N CDS
	1739	C	T	2,98	Phe532Leu	N CDS
	1846	C	T	3,73	N/P	3' NCR N
	1889	C	T	2,25	N/P	3' NCR N
	1890	C	T	2,28	N/P	3' NCR N
	2852	A	T	4,58	Ser292Arg	P CDS
	2896	T	C	2,82	Ser307Leu	P CDS
	4614	T	C	8,66	23	F CDS
	5058	A	C	4,39	His171Gln	F CDS
	6426	A	C	4,26	Phe53Leu	SH CDS
	9373	C	T	3,48	312	L CDS
	9660	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	10497	A	G	2,52	Arg687His	L CDS
	11935	G	A	3,86	1166	L CDS
	13564	C	T	13,33	1709	L CDS

	14481	A	C	3,28	Thr2015Asn	L CDS
	14576	G	A	41,74	Ile2047Val	L CDS
vMRV2 10pCEF B	259	A	C	9,95	Phe38Leu	N CDS
	1496	C	T	11,75	Phe451Leu	N CDS
	1524	C	T	2,54	Val460Ala	N CDS
	1537	C	T	4,03	464	N CDS
	1644	C	T	2,54	Ile500Thr	N CDS
	1676	C	T	2,03	511	N CDS
	1677	C	T	2,41	Leu511Ser	N CDS
	1679	C	T	3,03	512	N CDS
	1680	C	T	3,09	Leu512Ser	N CDS
	1685	C	T	2,43	Tyr514His	N CDS
	1696	C	T	2,18	517	N CDS
	1721	A	G	7,24	Gly526Ser	N CDS
	1739	C	T	3,74	Phe532Leu	N CDS
	1875	T	C	13,20	N/P	3' NCR N
	2904	C	T	3,37	Ser310Pro	P CDS
	3869	T	A	6,15	202	M CDS
	4192	T	C	7,36	Pro310Leu	M CDS
	6204	G	A	2,27	N/P	3' NCR F
	6901	G	A	24,46	96	HN CDS
	8459	T	C	4,22	Leu8Phe	L CDS
	8470	C	A	24,11	Glu11Asp	L CDS
	9660	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
	10497	A	G	2,61	Arg687His	L CDS
	11764	G	A	9,72	1109	L CDS
	13678	A	G	2,40	1747	L CDS
	14344	T	C	4,62	1969	L CDS
	14974	T	C	7,87	2179	L CDS
vMRV2 10pCEF C	1443	C	T	2,09	Ile433Thr	N CDS
	1451	C	T	2,58	436	N CDS
	1452	C	T	2,02	Leu436Ser	N CDS
	1489	C	T	10,04	448	N CDS
	1496	C	T	10,49	Phe451Leu	N CDS
	1504	C	T	8,79	453	N CDS
	1522	C	T	2,01	459	N CDS
	1537	C	T	6,57	464	N CDS
	1543	C	T	5,98	466	N CDS
	1547	C	T	6,01	Phe468Leu	N CDS
	1548	C	T	5,28	Phe468Ser	N CDS
	1563	C	T	4,08	Leu473Ser	N CDS
	1575	C	T	2,76	Ile477Thr	N CDS
	1587	C	T	4,74	Leu481Pro	N CDS
	1588	C	T	2,28	481	N CDS
	1589	C	T	5,23	Phe482Leu	N CDS
	1590	C	T	13,59	Phe482Ser	N CDS
	1615	C	T	5,23	490	N CDS
	1639	C	T	5,91	498	N CDS
	1679	C	T	6,37	512	N CDS
	1708	G	A	3,23	521	N CDS
	1733	G	A	3,21	Asn530Asp	N CDS
	1739	G	T	4,91	Phe532Val	N CDS

1753	C	T	2,04	536	N CDS
2414	C	T	53,64	Ser146Pro	P, V, I CDS
2703	A	C	2,59	Leu243Ile	P CDS
3032	C	G	5,49	Met352Ile	P CDS
5819	C	T	2,61	Leu425Pro	F CDS
5927	G	A	3,81	Gln461Arg	F CDS
6106	G	A	55,18	Lys521Glu	F CDS
6361	G	A	62,62	Ile32Val	SH CDS
6426	A	C	15,32	Phe53Leu	SH CDS
6669	A	C	4,00	Pro19His	HN CDS
9660	T	C	100,00	Pro408Leu	L CDS
10497	A	G	2,29	Arg687His	L CDS
12335	C	T	6,23	1300	L CDS

*Prva oznaka odgovara plazmidnoj sekvenciji, druga oznaka odgovara virusnoj sekvenciji. Za sinonimne supstitucije je naveden samo broj aminokiseline. pCEF, pasaž na fibroblastima pilećih embrija; A, B i C, replike; CDS, kodirajuća regija; NCR, nekodirajuća regija; N/P, nije primjenjivo;.

9. ŽIVOTOPIS

Dorotea Pali rođena je 21. studenog 1995. godine u Zagrebu. Nakon završene II. gimnazije, Dorotea je upisala preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu koji je završila 2017. godine s prosjekom 4,81 te summa cum laude počastima. Iste godine upisala je diplomski studij molekularne biologije koji je završila 2020. godine s prosjekom 4,69 i diplomskim radom „Alternativno prekrajanje gena *BPM1*, *BPM2* i *BPM3* u uvjetima temperaturnog stresa“, pod vodstvom prof. dr. sc. Nataše Bauer. Za vrijeme studija, Dorotea je volontirala na fakultetu, u Laboratoriju za molekularnu genetiku u trajanju od tri mjeseca i u Laboratoriju za kulturu biljnoga tkiva u trajanju od deset mjeseci, a djelovala je i kao student demonstrator na ukupno tri kolegija.

Godine 2020. zaposlila se u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu kao asistent na dvama projektima financiranim od strane Europskog fonda za regionalni razvoj: „Jačanje kapaciteta CerVirVac-a za istraživanja u virusnoj imunologiji i vakcinologiji“, pod vodstvom prof. dr. sc. Stipana Jonjića te „Robusne i adaptabilne biološke platforme za nova cjepiva“, pod vodstvom dr. sc. Saša Kazazića. Iste godine upisala je doktorski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu pod mentorstvom dr. sc. Jelene Ivančić Jelečki, gdje je istraživala mogućnosti proizvodnje bivalentnih cjepiva baziranih na cijepnom soju virusa zaušnjaka s dodanim genima virusa od interesa. Sudjelovala je na nekoliko domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova gdje je bila ko-autor na ukupno deset posterskih priopćenja i održala jedno usmeno izlaganje. Objavila je dva izvorna znanstvena rada indeksirana u bazi Web of Science s jednim prvim autorstvom, dobila je certifikat za rukovanje laboratorijskim životinjama koje se koriste u istraživačke svrhe te je sudjelovala u održavanju nastave na kolegiju „Mikrobiologija patogena“ kao gost predavač. Od 2024. godine zaposlena je kao stručni suradnik u tvrtki Makpharm d.o.o. u Zagrebu koja djeluje u području farmaceutike.

Popis radova i aktivnih sudjelovanja na znanstvenim skupovima:

1. **Pali, D.**; Forčić, D.; Jagušić, M.; Košutić Gulija, T.; Jurković, M.; Babić, M.; Kalafatovic, D.; Ivančić-Jelečki, J. (2025). Early evolution of mumps-HCV chimeric viruses in Vero cells induces loss of HCV gene expression and promotes accumulation of substitutions uncharacteristic of mumps strains. *Virology*, 603, 110379. doi: 10.1016/j.virol.2024.110379
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*, 13(12), 2550. doi: 10.3390/v13122550
3. **Pali, D.**; Košutić Gulija, T.; Slović, A.; Jagušić, M.; Ivančić Jelečki, J. Microevolution of a Mumps Based Recombinant Virus with HCV Genes During Passaging in Vero Cells. The Annual Meeting of the Croatian Immunological Society 2023. Brijuni, Hrvatska. 05.10.2023.-07.10.2023. (poster priopćenje)
4. **Pali, D.**; Košutić Gulija, T.; Slović, A.; Jagušić, M.; Ivančić Jelečki, J. Microevolution of a Mumps Based Recombinant Virus with HCV Genes During Passaging in Vero Cells. 7. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a. Zagreb, Hrvatska. 21.04.2023-22.04.2023. (poster priopćenje)
5. Ivančić Jelečki, J.; Slović, A.; Košutić Gulija, T.; **Pali, D.**; Jurković, M.; Jagušić, M.; Forčić, D. Genetic stability of recombinant mumps viruses generated by reverse genetics technology. Cell Symposia: Viruses in health and disease. Sitges, Španjolska. 19.03.2023-21.03.2023. (poster priopćenje)
6. Košutić Gulija, T.; Slović, A.; **Pali, D.**; Jagušić, M.; Ivančić Jelečki, J. Impact of production cell line on genomic stability of chimeric virus F-RSV-MRV2. Cell Symposia: Viruses in health and disease. Sitges, Španjolska. 19.03.2023-21.03.2023. (poster priopćenje)
7. Jagušić, M.; Košutić Gulija, T.; Slović, A.; Lang Balijsa, M.; Ivančić Jelečki, J.; **Pali, D.**; Forčić, D. Effect of short, non-viral sequence inserted in the 3' untranslated region of hemagglutinin-neuraminidase on mumps virus neurovirulence. Cell Symposia: Viruses in health and disease. Sitges, Španjolska. 19.03.2023-21.03.2023. (poster priopćenje)

8. Kosutic Gulija, T. ; Slovic A.; Jagusic, M.; **Pali, D.**; Ivancic Jelecki, J. GENETIC STABILITY OF RECOMBINANT VACCINE CANDIDATE F-RSV-MRV2 UNDER SELECTIVE PRESSURE. The Annual Meeting of the Croatian Immunological Society 2022. Sveti Martin na Muri, Hrvatska. 06.10.2022.-08.10.2022. (poster priopćenje)
9. Ivančić Jelečki, J.; Slović, A.; Košutić Gulija, T.; **Pali, D.**; Jurković, M.; Jagušić, M.; Forčić, D. Genetic stability of recombinant mumps viruses generated by reverse genetics technology. First 5 years of the CerVirVac: Symposium. Rijeka, Hrvatska. 02.09.2022-03.09.2022. (poster priopćenje)
10. **Pali, D.**; Košutić Gulija, T.; Slović, A.; Ivančić Jelečki, J.; Forčić, D. Design of recombinant viral vaccines based on mumps virus. 15th Vaccine Congress. 03.10.2021.-06.10.2021. (usmeno priopćenje)
11. Slovic, A.; Kosutic Gulija, T.; Ivancic- Jelecki, J.; **Pali, D.**; Jurkovic, M.; Jagusic, M. Genetic stability of recombinant mumps viruses generated by reverse genetics technology. The Annual meeting of the Croatian Immunological Society 2021. Trogir, Hrvatska. 23.09.2021.-25.09.2021. (poster priopćenje)
12. **Pali, D.**; Košutić Gulija, T.; Slović, A.; Ivančić Jelečki, J.; Forčić, D. Design Of Recombinant Viral Vaccines Based On Mumps Virus. World Microbe Forum. 20.06.2021.-24.06.2021. (poster priopćenje)
13. **Pali, D.**; Košutić Gulija, T.; Slović, A., Ivančić Jelečki, J. Recombinant RSV and HCV vaccines based on mumps virus. 5. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a. Zagreb, Hrvatska. 24.04.2021.-25.04.2021. (poster priopćenje)