

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Luka FAJS

**ANTAGONISTIČNO DELOVANJE VIRUSA
KRIMSKO-KONGOŠKE HEMORAGIČNE
MRZLICE NA ODZIV INTERFERONOV TIPA I
DOKTORSKA DISERTACIJA**

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Luka FAJS

**ANTAGONISTIČNO DELOVANJE VIRUSA KRIMSKO-KONGOŠKE
HEMORAGIČNE MRZLICE NA ODZIV INTERFERONOV TIPA I
DOKTORSKA DISERTACIJA**

**ANTAGONISM OF TYPE I INTERFERON RESPONSES BY
CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER
DOCTORAL DISSERTATION**

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 31. seje Komisije za doktorski študij UL z dne 19.9.2012 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicina, s področja mikrobiologije. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Tatjana Avšič-Županc, univ. dipl. biol.

Doktorsko delo je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študijskega programa Biomedicina s področja mikrobiologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz.

Mentorica: prof. dr. Tatjana Avšič-Županc, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Srečko KOREN, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Mojca NARAT, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ-ŽUPANC, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora: 24.4.2014

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani soglašam z objavo svoje doktorske disertacije v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je doktorska disertacija, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Doktorand:

Luka Fajs

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 578.2+578.5:577.27:616.9(043)=163.6
KG virusi/*Bunyaviridae*/krimsko-kongoška hemoragična mrzlica/KKHM/
/interferoni/genetska raznolikost/antagonizem/nukleoproteini/imunski odziv
AV FAJS, Luka, univ. dipl. mikr.
SA AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij
Biomedicina, področje mikrobiologije
LI 2014
IN ANTAGONISTIČNO DELOVANJE VIRUSA KRIMSKO-KONGOŠKE
HEMORAGIČNE MRZLICE NA ODZIV INTERFERONOV TIPA I
TD Doktorska disertacija
OP XIII, 90 str., 19 pregl., 25 sl., 83 vir.
IJ SI
JI sl/en
AI Virus krimsko-kongoške hemoragične mrzlice (KKHM) povzroča akutno, smrtonosno hemoragično bolezen. Do okužbe z virusom KKHM pride po vbodu okuženega klopa iz rodu *Hyalomma* ali kontaktu s krvjo ali tkivi okuženih ljudi ali živali. Patogeneza virusa KKHM je slabo poznana, zaradi odsotnosti primernega živalskega modela in zaradi potrebe po delu v laboratorijih najvišje stopnje biološke varnosti. Raziskave so prav tako pokazale, da virus KKHM utiša oz. upočasni odziv IFN tipa I, vendar mehanizem tega utišanja ni znan. Odziv IFN tipa I predstavlja prvo obrambno linijo naravnega imunskega odziva pri ljudeh. Odziv IFN tipa I je sestavljen iz aktivacije izražanja IFN tipa I in aktivacije izražanja genov ki so stimulirani s strani interferonov (ISG). Antagonistično delovanje smo preverili s tremi sevi virusa KKHM, ki se domnevno ločijo med seboj v patogenetskem potencialu: sev IbAr10200 (prototipni sev, z neznanim patogenetskim potencialom), sev Hoti (dokazano patogen), sev AP92 (nepatogen oz. pogojno patogen). Rezultati so pokazali, da le beljakovina N, seva Hoti, utišala izražanje IFN- β . Ostale virusne beljakovine niso imele antagonističnega vpliva na izražanje IFN- β . Virusne beljakovine prav tako niso imele antagonističnega vpliva na izražanje elementa ISRE oz. na izražanje genov, ki jih stimulirajo interferoni. Doktorsko disertacijo smo razširili še na odziv IFN- γ in pokazali, da virusne beljakovine niso imele antagonističnega vpliva na izražanje IFN- γ . Z doktorsko nalogo smo dokazali, da virus KKHM na segmentu S nosi zapis za dejavnik, ki deluje antagonistično na odziv IFN tipa I. Prav tako smo pokazali, da virus nosi zapis za še en, dodaten dejavnik z antagonističnim delovanjem in da je antagonistično delovanje odvisno od seva virusa. Izsledki naših raziskav bodo pomembno prispevali k razumevanju patogeneze in razlik v smrtnosti med različnimi sevi KKHM po svetu.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 578.2+578.5:577.27:616.9(043)=163.6
CX viruses/*Bunyaviridae*/Crimean-Congo haemorrhagic fever/CCHF/interferons/ genetic diversity/antagonism/nucleoproteins/immune response
AU FAJS, Luka
AA AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biomedicine, field Microbiology
PY 2014
TI ANTAGONISM OF TYPE I INTERFERON RESPONSES BY CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER
DT Doctoral dissertation
NO XIII, 90 p., 19 tab., 25 fig., 83 ref.
LA SI
AL sl/en
AB Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is an acute zoonosis, which is characterized by a fulminant and often hemorrhagic course of disease and a case fatality rate of 10-50 %. CCHF is caused by the CCHF virus the most widespread tick-borne virus in the world. Pathogenesis of CCHF is poorly understood because of the absence of a suitable, immune-competent animal model and due to the requirement for high-containment laboratories for virus manipulation. Previous studies have shown that CCHFV delays the activation of type I interferon (IFN) responses. Type I IFN response plays a pivotal role in the first steps of human innate response to viruses. The aim of our research was to determine if CCHF virus encodes antagonists of the human type I IFN response, on its S and M genomic segments. Furthermore we wanted to explore whether three genetically distinct CCHF strains that presumably differ in their pathogenic potential differ in their antagonistic potential: strain IbAr10200 (prototype strain whose pathogenic potential is unclear), strain Hoti (pathogenic strain) and AP92 (presumably non-pathogenic or mildly pathogenic strain). Our results revealed that only the N protein of strain Hoti is capable of inhibiting the induction of IFN- β promoter. Our results revealed that no strain was able to inhibit the activity of the interferon-stimulated response element promoter and thereby the induction of interferon-stimulated genes. We expanded the goal of our study, to include the IFN- γ response (type II IFN response) and showed that no strain was able to inhibit the activity of the interferon-gamma activated sequence promoter and thereby the induction of IFN- γ stimulated genes. In conclusion, the results of our study showed that CCHF virus encodes an antagonist of the type I interferon response on its S genomic segment. Furthermore, we show that type I IFN antagonism is strain specific and that it possibly influences the pathogenic potential of CCHF strain. We also show that CCHF virus encodes an additional, yet unknown, type I IFN antagonist. Our study provides valuable knowledge to the field of CCHF pathogenesis as it enlightens a pivotal step in CCHF pathogenesis.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN	3
1.2 HIPOTEZE.....	4
2 PREGLED OBJAV	5
2.1 ZGODOVINA	5
2.2 KLASIFIKACIJA VIRUSA KKH.....	6
2.3 STRUKTURA VIRUSA KKH.....	6
2.3.1 Struktura virusnega delca.....	6
2.3.2 Organizacija genoma.....	7
2.4 POMNOŽEVANJE VIRUSA KKH.....	8
2.5 GENETSKA RAZNOLIKOST VIRUSA KKH.....	10
2.6 EPIDEMIOLOGIJA VIRUSA KKH.....	12
2.7 KLINIČNA SLIKA IN DIAGNOSTIKA KKH.....	15
2.8 PATOGENEZA KKH	16
2.9 ODZIV INTERFERONOV TIPA I.....	18
2.9.1 Prepoznavanje virusov in sinteza interferonov.....	19
2.9.2 Delovanje interferonov tipa I.....	23
2.9.3 Antagonistično delovanje virusov na odziv interferonov tipa I.....	24
2.9.4 Odziv interferonov tipa I in virus KKH	26
2.10 ODZIV INTERFERONOV TIPA II.....	27
3 MATERIAL IN METODE	29

3.1	CELIČNE LINIJE	29
3.2	PLAZMIDI	29
3.2.1	Poročevalni plazmidi	30
3.2.2	Kontrolni plazmid.....	30
3.2.3	Ekspresijski plazmidi	30
3.2.4	Osamitev virusne RNA.....	33
3.2.5	Pomnoževanje virusnih segmentov	33
3.2.5.1	Pomnoževanje celotnega segmenta S – protokol RT-PCR.....	35
3.2.5.2	Pomnoževanje celotnega segmenta M – protokol RT-PCR	36
3.2.5.3	Pomnoževanje odprtega bralnega okvirja segmenta S – protokol RT-PCR.....	37
3.2.5.4	Pomnoževanje odprtega bralnega okvirja segmenta M – protokol RT-PCR	38
3.2.6	Čiščenje pridelkov verižne reakcije s polimerazo.....	39
3.2.7	Kloniranje in transformacija bakterij	39
3.2.8	Osamitev in karakterizacija plazmidne DNA	40
3.2.9	Določanje nukleotidnega zaporedja	42
3.2.9.1	Sekvenčna reakcija	42
3.2.9.2	Čiščenje sekvenčne reakcije	43
3.2.9.3	Kapilarna elektroforeza	43
3.2.9.4	Analiza nukleotidnih zaporedij.....	43
3.3	TRANSFEKCIJA	43
3.3.1	Uspešnost izražanja virusnih beljakovin	44
3.3.2	Vpliv segmenta S, sevov virusa KKH M na aktivnost promotorja za interferon beta	44
3.3.3	Vpliv segmenta S, sevov virusa KKH M na aktivnost elementa ISRE	47
3.3.4	Vpliv segmenta S, sevov virusa KKH M na aktivnost elementa GAS	49
3.3.5	Vpliv segmenta M, sevov virusa KKH M na aktivnost promotorja za interferon beta	52
3.3.6	Vpliv segmenta M, sevov virusa KKH M na aktivnost elementa ISRE	52
3.3.7	Vpliv segmenta M, sevov virusa KKH M na aktivnost elementa GAS.....	53

3.3.8	Skupni vpliv segmentov S in M, sevov virusa KKHМ na aktivnost promotorja za interferon beta	55
3.3.9	Skupni vpliv segmentov S in M, sevov virusa KKHМ na aktivnost elementa ISRE	56
3.3.10	Skupni vpliv segmentov S in M, sevov virusa KKHМ na aktivnost elementa GAS	57
3.4	ANALIZA BELJAKOVIN PO WESTERNU.....	58
3.5	MERJENJE AKTIVNOSTI LUCIFERAZE	60
4	REZULTATI.....	62
4.1	IZDELAVA EKSPRESIJSKIH PLAZMIDOV	62
4.2	IZRAŽANJE BELJAKOVIN VIRUSA KKHМ V CELICAH HEK293T/17.....	63
4.3	VPLIV SEGMENTOV S IN M VIRUSA KKHМ NA AKTIVNOST PROMOTORJA ZA INTERFERON BETA	66
4.4	VPLIV SEGMENTOV S IN M, SEVOV VIRUSA KKHМ NA AKTIVNOST ELEMENTA ISRE	68
4.5	VPLIV SEGMENTOV S IN M, SEVOV VIRUSA KKHМ NA AKTIVNOST ELEMENTA GAS	69
5	RAZPRAVA	71
6	SKLEPI.....	78
7	POVZETEK	79
8	SUMMARY	81
9	VIRI	83
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za pomnoževanje genomskih odsekov virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice.....	34
Preglednica 2: Reakcijska mešanica za pomnoževanje celotnega segmenta S sevov Hoti oz. AP92	35
Preglednica 3: Reakcijska mešanica za pomnoževanje celotnega segmenta M sevov Hoti oz. AP92	36
Preglednica 4: Reakcijska mešanica za pomnoževanje odprtega bralnega okvirja segmenta S sevov Hoti oz. AP92.....	37
Preglednica 5: Reakcijska mešanica za pomnoževanje odprtega bralnega okvirja segmenta S sevov Hoti oz. AP92, z dodanim zaporedjem petih histidinov ali peptidom V5	37
Preglednica 6: Reakcijska mešanica za pomnoževanje odprtega bralnega okvirja segmenta M sevov Hoti oz. AP92	38
Preglednica 7: Reakcijska mešanica za pomnoževanje odprtega bralnega okvirja segmenta M sevov Hoti oz. AP92, z dodanim zaporedjem petih histidinov ali peptidom V5.....	38
Preglednica 8: Reakcijska mešanica za sekvenčno reakcijo	42
Preglednica 9: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmenta S virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost promotora za interferon beta	45
Preglednica 10: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmenta S virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost s strani interferonov stimuliranega odzivnega elementa ISRE	47
Preglednica 11: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmenta S virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost s strani interferona gama stimuliranega elementa GAS	50

Preglednica 12: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmenta M virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost promotorja za interferon beta	52
Preglednica 13: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmenta M virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost s strani interferonov stimuliranega odzivnega elementa ISRE	53
Preglednica 14: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmenta S virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost s strani interferona gama stimuliranega elementa GAS	55
Preglednica 15: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmentov S in M virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost promotorja za interferon beta	56
Preglednica 16: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmentov S in M virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost s strani interferonov stimuliranega odzivnega elementa ISRE	57
Preglednica 17: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmentov S in M virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost s strani interferona gama stimuliranega elementa GAS	58
Preglednica 18: Pripravljeni ekspresijski plazmidi, z zapisi za beljakovine virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice	63
Preglednica 19: Uspešnost izražanja ekspresijskih plazmidov, ki nosijo zapise za beljakovine virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice	65

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema virusnega delca, virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice (Bente in sod., 2013: 165)	7
Slika 2: Genomski segmenti virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice in procesiranje virusnih beljakovin (Bente in sod., 2013: 167)	8
Slika 3: Pomnoževanje virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice (Bente in sod., 2013: 166).....	9
Slika 4: Filogenetska analiza segmenta S, virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice (KKHM)(Bente in sod., 2013: 174).....	11
Slika 5: Zemljepisna razširjenost virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice (KKHM) (Bente in sod., 2013: 161)	13
Slika 6: Prenos virusa v naravi, med prenašalci (klopi) in gostitelji (Bente in sod., 2013: 168).....	14
Slika 7: Poenostavljena shema aktivacije izražanja interferonov tipa I (Perry in sod., 2005: 409) dsRNA: dvovijačna RNA, ssRNA: enovijačna RNA, LPS: lipopolisaharid, CpG DNA: DNA bogata z motivi CpG	21
Slika 8: Shema aktivacije izražanja genov, ki jih stimulirajo interferoni tipa I (levo) in shema aktivacije genov, ki jih stimulira interferon- γ (desno)(ViralZone, 2013b)	24
Slika 9: Stopnje odziva interferonov (IFN) tipa I na katere delujejo virusni dejavniki, ki delujejo kot antagonisti odziva IFN tipa I (ViralZone, 2013a)	26
Slika 10: Shematski prikaz ekspresijskega vektorja pcDNA3.1D/V5-His-TOPO (Invitrogen, 2010).....	41
Slika 11: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbnicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva IbAr10200, na aktivnost promotorja interferona beta.	45
Slika 12: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbnicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva Hoti, na aktivnost promotorja interferona beta	46
Slika 13: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbnicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva AP92, na aktivnost promotorja interferona beta	46

Slika 14: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbinicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva IbAr10200, na aktivnost s strani interferonov stimuliranega odzivnega elementa.	48
Slika 15: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbinicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva Hoti, na aktivnost s strani interferonov stimuliranega odzivnega elementa.....	48
Slika 16: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbinicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva AP92, na aktivnost s strani interferonov stimuliranega odzivnega elementa.....	49
Slika 17: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbinicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva IbAr10200, na aktivnost promotorja genov, ki so stimulirani s strani interferona gama.	50
Slika 18: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbinicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva Hoti, na aktivnost promotorja genov, ki so stimulirani s strani interferona gama.	51
Slika 19: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbinicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva AP92, na aktivnost promotorja genov, ki so stimulirani s strani interferona gama.	51
Slika 20: Uspešnost izražanja ekspresijskih plazmidov z zapisi za beljakovino N, virusa KKHM po analizi beljakovin po Westernu.	65
Slika 21: Uspešnost izražanja ekspresijskih plazmidov z zapisi za beljakovino N, katerim smo dodali epitopa V5 in 6×His, virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice po analizi beljakovin po Westernu.	66
Slika 22: Uspešnost izražanja ekspresijskih plazmidov z zapisi za beljakovine na segmentu M (Gn in Gc), virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice po analizi beljakovin po Westernu.....	66
Slika 23: Povprečne vrednosti in standarni odklon (pri treh ponovitvah poskusov) stopnje aktivacije promotorja za interferon beta ob hkratnem izražanju plazmidov z zapisi za beljakovine KKHM.	67

Slika 24: Povprečne vrednosti in standardni odklon (pri treh ponovitvah poskusov) stopnje aktivacije s strani interferonov stimuliranega odzivnega elementa ISRE ob hkratnem izražanju plazmidov z zapisi za beljakovine KKHМ.	68
Slika 25: Povprečne vrednosti in standardni odklon (pri treh ponovitvah poskusov) stopnje aktivacije aktivacijskega zaporedja interferona gama, GAS, ob hkratnem izražanju plazmidov z zapisi za beljakovine KKHМ.....	70

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Da	dalton
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. DeoxyriboNucleic Acid)
GAS	s strani interferona gama aktivirano zaporedje (angl. Interferon-Gamma Activated Sequence)
IFN	interferon
ISG	s strani interferonov stimulirani geni (angl. Interferon Stimulated Senes)
ISRE	s strani interferonov stimuliran odzivni element (angl. Interferon-Stimulated Response Element)
KKHM	krimsko-kongoška hemoragična mrzlica
OTU	domena tumorjev jajčnikov (angl. Ovarian Tumor domain)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. Ribonucleic Acid)
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo (angl. Polymerase Chain Reaction with Reverse Transcriptase)

1 UVOD

Krimsko-kongoška hemoragična mrzlica (KKHM) je akutna zoonotska bolezen, za katero je značilen hiter potek in visoka smrtnost, ki sega od 10-50 %. Bolezen povzroča virus KKHM, ki ga uvrščamo v rod *Nairovirus*, družino *Bunyaviridae*. Virus KKHM sodi med zemljepisno najbolj razširjene viruse, ki se prenašajo s členonožci (arbovirusi, iz angl.: arthropod borne viruses). Bolezen je endemična na južnem Balkanu, v Aziji, Afriki in Bližnjem vzhodu. Prisotnost virusa KKHM je povezana predvsem s prisotnostjo klopov iz rodu *Hyalomma*, ki so glavni prenašalci virusa (Bente in sod., 2013). Virus KKHM je virus z ovojnico, katerega genom predstavlja negativno polarna, enovijačna RNA, ki je razdeljena na tri odseke (segmente). Posamezni segmenti virusnega genoma nosijo zapis za najmanj štiri virusne beljakovine: beljakovino N, od RNA odvisno polimerazo RNA ter dve glikozilirani beljakovini, Gc in Gn. Najmanjši odsek genoma, imenovan odsek S (angl. small), nosi zapis za beljakovino N, srednji odsek nosi zapis za glikozilirani beljakovini, veliki odsek genoma pa nosi zapis za od RNA odvisno polimerazo RNA. Beljakovina N se združuje z odseki virusnega genoma in tvori virusno ribonukleokapsido. Glikozilirani beljakovini sta umeščeni v virusno lipidno ovojnico in služita pritrjanju virusa na receptorje gostiteljskih celic in vnos virusa v notranjost celic. Od RNA odvisna polimeraza RNA omogoča pomnoževanje virusnega genoma (Morikawa in sod., 2007). Najnovejše raziskave kažejo, da virus KKHM poleg zgoraj omenjenih beljakovin, nosi zapis za dodatno, nestrukturno beljakovino na odseku M, imenovano NSm, katere vloge še ni znana (Altamura in sod., 2007). Virus KKHM je genetsko izjemno raznolik. Filogenetske analize odseka S virusnega genoma so pokazale, da se sevi virusa KKHM združujejo v šest filogenetskih skupin, ki odražajo tudi zemljepisno razširjenost virusa: evropska skupina I, evropska skupina II, afriška skupina I, afriška skupina II, afriška skupina III in azijska skupina I. Prototipski sev virusa KKHM je sev IbAr10200, katerega uvrščamo v afriško skupino I (Deyde in sod., 2006). Sev IbAr10200 so osamili iz vzorca klopa, ki so ga vzorčili iz zdrave kamele v Nigeriji leta 1966 in se je do danes uveljavil kot sev izbire za raziskave virusa KKHM (predvsem v zahodnih državah), kljub temu, da okužb pri ljudeh s tem sevom niso nikdar dokazali. Dosedanje raziskave virusa KKHM v naši

raziskovalni skupini so temeljile na raziskovanju kliničnih vzorcev bolnikov s KKHM iz Kosova, kjer je prisoten sev Hoti. Sev Hoti uvrščamo v evropsko skupino I. Sev Hoti so osamili iz vzorca krvi bolnika s KKHM, ki je podlegel okužbi (Duh in sod., 2008). Iz stališča patogeneze KKHM, je zanimiva tudi evropska skupina II, v katero sodijo izolati, ki pri človeku ne povzročajo bolezni oz. povzročajo le blago obliko bolezni. Tipska različica te skupine je sev AP92 (Marriott in sod., 1994; Elevli in sod., 2010).

Do okužbe z virusom KKHM pride z vbodom okuženega klopa iz rodu *Hyalomma* ali ob stiku z okuženimi telesnimi tekočinami ali tkivi bolnih živali ali ljudi. Bolezen poteka v večini primerov v več fazah: inkubacijska doba, vročinska faza, hemoragična faza in faza okrevanja. Patogeneza virusa KKHM je slabo raziskana. Zaradi visoke virulence in patogenosti virusa je delo z virusom omejeno na laboratorije najvišje, četrte stopnje biološke varnosti. Poleg tega, do pred kratkim ni bilo ustreznega živalskega modela (Bente in sod., 2013). Danes poznamo dva, imunsko oslABLJENA, živalska modela: miši z odstranjenim genom za receptor interferonov tipa I (Berezky in sod., 2010) ter miši z odstranjenim genom za molekulo STAT1 (Bente in sod., 2010). Raziskave patogeneze virusa KKHM so bile usmerjene predvsem v odkrivanje napovednih dejavnikov poteka bolezni (Cevik in sod., 2008; Saksida in sod., 2010; Dokuzoguz in sod., 2013), v raziskave znotrajceličnih interakcij med celičnimi in virusnimi beljakovinami (Burt in sod., 1997; Andersson in sod., 2004a; Andersson in sod., 2004b) ter raziskave imunskega odziva na okužbo z virusom KKHM (Shepherd in sod., 1989a; Shepherd in sod., 1989b; Weber in Mirazimi, 2008; Saksida in sod., 2010). Izsledki teh raziskav so pokazali, da je patogeneza KKHM povezana tako z neposrednim vplivom virusa na tarčne celice, kot njegovim posrednim vplivom na prekomerni imunski odziv (Connolly-Andersen in sod., 2011). Pokazale so tudi močan vpliv prirojenega imunskega odziva, predvsem odziva interferonov tipa I, na učinkovitost okužbe in pomnoževanja virusa KKHM (Andersson in sod., 2004a; Andersson in sod., 2006; Andersson in sod., 2008). Pomembnost interferonskega odziva so pokazale tudi raziskave pri drugih virusih, ki povzročajo hemoragične mrzlice, npr. pri virusu Ebola, hantavirusih in virusu doline reke Rift, pri katerih so odkrili virusno zapisane dejavnike, ki neposredno zavirajo interferonski odziv (Basler, in sod., 2000; Billecocq, in sod., 2004; Levine in sod., 2010).

1.1 NAMEN

V doktorski nalogi smo želeli ugotoviti ali beljakovine virusa KKHM, zapisane na genomskih segmentih S in M, neposredno zavirajo odziv interferonov tipa I pri ljudeh. To domnevo smo želeli preveriti na dveh ključnih stopnjah odziva interferonov tipa I, tj. na stopnji izražanja interferonov in na stopnji izražanja genov, ki jih stimulirajo interferoni tipa I (ISG, iz angl. interferon stimulated genes). Namen doktorske naloge smo razširili tudi na odziv interferona gama, tj. interferona tipa II, ki igra ključno vlogo pri patogenezi KKHM.

Vpliv virusnih beljakovin na oba tipa odziva interferonov smo preverili s tremi sevi KKHM, iz treh ločenih filogenetskih skupin, ki se domnevno razlikujejo tudi v njihovem patogenetskem potencialu. V raziskavo smo vključili seve:

- IbAr10200: prototipni sev KKHM, za katerega ni znano ali lahko povzroči bolezen pri ljudeh, saj so ga osamili le iz klopa, vzorčenega iz zdrave kamele v Nigeriji. Prav tako, gre za virusni izolat, katerega so intenzivno kultivirali v celičnih kulturah (visoke pasaže virusa), kar lahko vodi v oslabitev virusa,
- Hoti: sev KKHM, ki so ga osamili iz vzorca krvi bolnika s KKHM na Kosovu, ki je podlegel okužbi. Sev Hoti tako dokazano povzroči smrtno nevarno obliko KKHM. Poleg tega, so sev Hoti gojili le do nizkih pasaž,
- AP92: sev KKHM, ki so ga osamili iz vzorca klopa v Grčiji. Od osamitve leta 1975 do danes niso objavili primerov bolezni s tem sevom (izjemoma so poročali o treh blagih primerih okužbe s sevi podobnimi AP92). Sev AP92 zato velja za nepatogenega oz. le za pogojno patogenega predstavnika virusov KKHM.

1.2 HIPOTEZE

V sklopu doktorske disertacije smo želeli potrditi naslednje delovne hipoteze:

- Predvidevamo, da beljakovine, ki so zapisane na genomskih odsekih S in/ali M virusa KKHM, zavirajo aktivnost promotorja gena za interferon beta.
- Predvidevamo, da beljakovine, ki so zapisane na genomskih odsekih S in/ali M virusa KKHM, zavirajo aktivnost promotorske regije ISG, oz. na aktivnost genetskega elementa ISRE.
- Predvidevamo, da imajo beljakovine različnih sevov virusa KKHM, različno močan vpliv na promotorsko regijo za interferon beta.
- Predvidevamo, da bodo aktivnost promotorja za interferon beta v največji meri utišale beljakovine sevov Hoti in IbAr10200, ter v najmanjši meri beljakovine seva AP92.
- Predvidevamo, da imajo beljakovine različnih sevov virusa KKHM, različno močan vpliv na element ISRE.
- Predvidevamo, da bodo aktivnost elementa ISRE v največji meri utišale beljakovine sevov Hoti in IbAr10200, ter v najmanjši meri beljakovine seva AP92.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA

O bolezni podobni KKHM so poročali že v 12. stoletju v Tadžikistanu. V prvih opisih so poročali o vročinski bolezni, ki je nastopila po vbodu klopa ali uši in so jo pogosto spremljale krvavitve. O podobnih boleznih so poročali tudi iz drugih predelov osrednje Azije (Hoogstraal, 1979). Prvi priznan izbruh KKHM so zabeležili poleti, leta 1944, na krimskem polotoku. Zbolelo je okoli 200 sovjetskih vojakov, ki so kazali znake akutne vročinske bolezni s pogostimi krvavitvami ter šokom in smrtnostjo blizu 10 %. Raziskovalci so ugotovili, da se bolezen prenaša z vbodom klopotov iz rodu *Hyalomma* in potrdili, da je (prvotno imenovana) krimska hemoragična mrzlica, klopno prenosljiva virusna bolezen (Bente in sod., 2013). Etiologijo bolezni so potrdili z inokulacijo psihiatričnih bolnikov in vojaških prostovoljcev z ultra-filtrati serumov bolnikov s KKHM in zdrobljenih, okuženih klopotov. Največjo težavo pri raziskavah virusa, je predstavljala odsotnost primerne laboratorijskega gostitelja. Zato so virus prvič osamili šele leta 1967, z inokulacijo serumov bolnikov ali okuženih klopotov v sesajoče, novorojene miši (Chumakov in sod., 1968). Osamitev virusa je omogočila razvoj virusno specifičnih diagnostičnih testov in razširitev raziskav o epidemiologiji krimske hemoragične mrzlice. Posledično so bolezen prepoznali v več predelih nekdanje Sovjetske zveze in v Bolgariji. Naslednji preboj v raziskavah je bilo odkritje, da je virus krimske hemoragične mrzlice antigensko identičen virusu Kongo, katerega so izolirali leta 1956 v Belgijskem Kongu iz vzorcev klopotov in živali (Casals, 1969; Casals in sod., 1970; Chumakov in sod., 1970). Virus so kasneje poimenovali virus krimske hemoragične mrzlice Kongo in nato poenostavili v virus krimsko-kongoške hemoragične mrzlice (KKHM) (Casals in sod., 1970). Do danes so virus ali bolezen opisali že v več kot 30 državah v Evropi, Aziji in Afriki (Whitehouse, 2004).

2.2 KLASIFIKACIJA VIRUSA KKHM

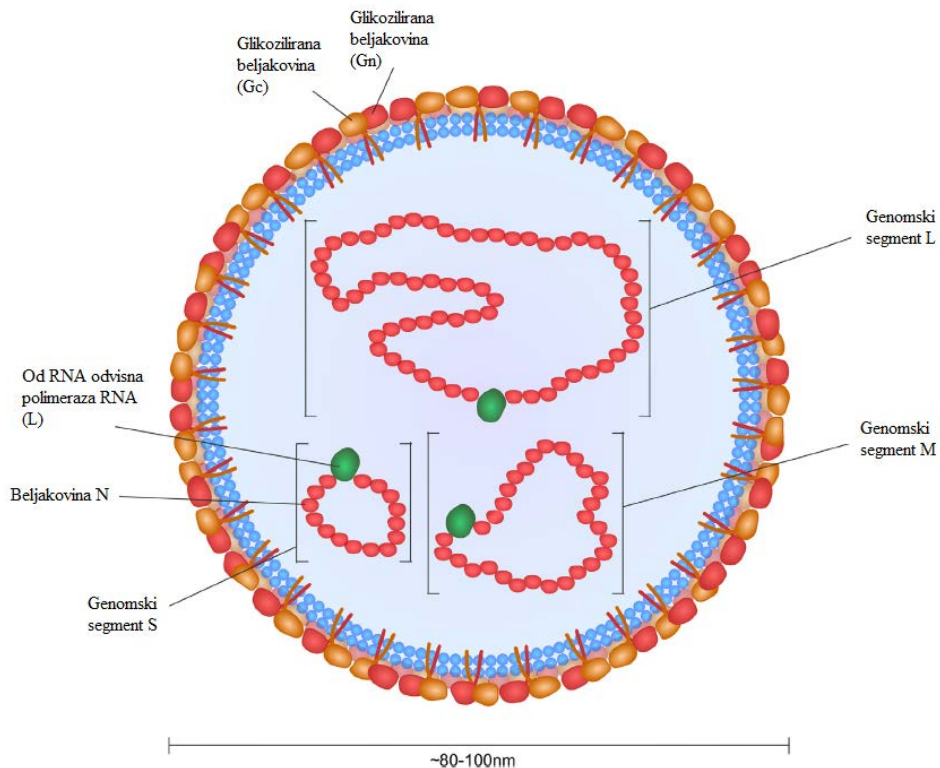
Virus KKHM uvrščamo v rod *Nairovirus*, v družino *Bunyaviridae*. V isto družino uvrščamo tudi rodove *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Phlebovirus* in *Tospovirus*. Poleg virusa KKHM, sta edina povzročitelja bolezni v rodu *Nairovirus*, virus Dugbe in virus nairobijske bolezni ovac. Viruse v rodu *Nairovirus* delimo v sedem seroloških skupin, pri čemer virus KKHM in virus Hazara uvrščamo v skupno serološko skupino KKHM (Schmaljohn in Nichol, 2001).

2.3 STRUKTURA VIRUSA KKHM

2.3.1 Struktura virusnega delca

Virusni delci virusa KKHM so okrogle oblike in premera 80-100nm. Virus KKHM ovija celično-pridobljena lipidna ovojnica, v katero sta umeščeni dve glikozilirani beljakovini: Gn in Gc. Glikozilirani beljakovini omogočata pripenjanje virusa na tarčne receptorje in vstop virusa v gostiteljske celice. Znotraj lipidne ovojnice se nahajajo trije segmenti virusne, genomske RNA: mali (S iz angl.: small), srednji (M iz angl.: medium) in veliki (L iz angl.: large). Genomski segmenti so prekriti z virusno beljakovino N in tvorijo tri ločene ribonukleokapside. Virusni genomski segmenti nosijo na 5' in 3' koncih komplementarna nukleotidna zaporedja, ki omogočijo parjenje obeh koncev in nastanek zank, ki ustvarijo videz krožne genomske RNA. Te krožne RNA so vidne tudi pod elektronskim mikroskopom in so značilne za viruse iz družine *Bunyaviridae* (Morikawa in sod., 2007)

Srednji genomski segment, segment M, nosi zapis za glikozilirani beljakovini Gn in Gc, ter nestrukturno beljakovino NSm, katere funkcija ni znana (Altamura in sod., 2007; Morikawa in sod., 2007). Na največjem segmentu, segmentu L sta zapisani od RNA odvisna polimeraza RNA, ki omogoča prepisovanje in podvajanje virusnega genoma in domena OTU (angl. ovarian tumor domain), katere vloga še ni pojasnjena (Frias-Staheli in sod., 2007; Bergeron in sod., 2010). Shema virusnega delca je prikazana na sliki 1.

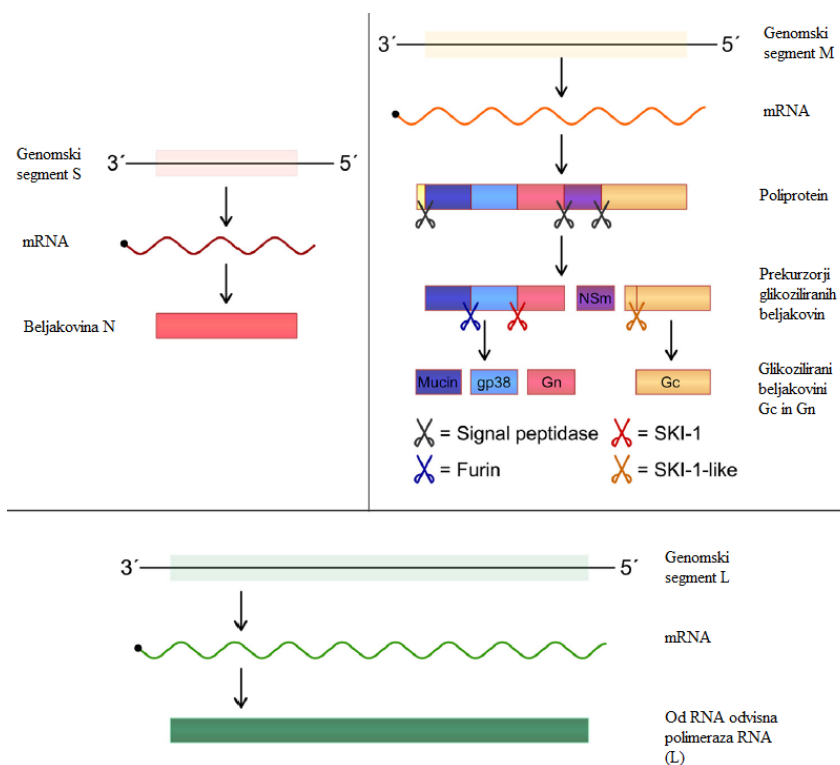


Slika 1: Shema virusnega delca, virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice (Bente in sod., 2013: 165)

2.3.2 Organizacija genoma

Genom virusa KKHM predstavljajo trije segmenti, negativno polarne RNA: mali (S, iz angl.: small), srednji (M, iz angl.: medium) in veliki (L, iz angl.: large). Segment S nosi zapis za beljakovino N, ki skupaj z genomskimi segmenti tvori ribonukleokapside. Segment M nosi zapis za poliprotein, ki se ko- in post- translacijsko cepi v glikozilirani beljakovini Gc in Gn ter nestrukturno beljakovino NSm (slika 2). Glikozilirani beljakovini Gc in Gn omogočata prepoznavanje in vezavo na tarčne receptorje ter vstop virusa v tarčne celice. Vloga nestrukturne beljakovine še ni poznana (Morikawa in sod., 2007). Segment M nosi tudi zapis za izredno spremenljivo, mucinu-podobno domeno, katere vloga prav tako ni poznana in glikozilirano beljakovino gp38, katere funkcija prav tako ni pojasnjena (Bente in sod., 2013). Segment L virusa KKHM je skoraj dvakrat večji od segmentov L drugih virusov v družini *Bunyaviridae* (Honig in sod., 2004). Segment L nosi zapis za od RNA odvisno polimerazo

RNA (RdRp, iz angl.: RNA-dependent RNA polymerase), ki omogoča prepisovanje in pomnoževanje virusnega genoma, in proteazo, domeno OTU (angl.: ovarian tumor domain), katere vloga še razjasnjena (Bergeron in sod., 2010). Edina poznana vloga domene OTU pri virusu KKH, je odstranjevanje ubikvitinskih molekul vezanih na celične beljakovine, kar bi lahko omogočilo utišanje celičnih protivirusnih mehanizmov (Frias-Staheli in sod., 2007).

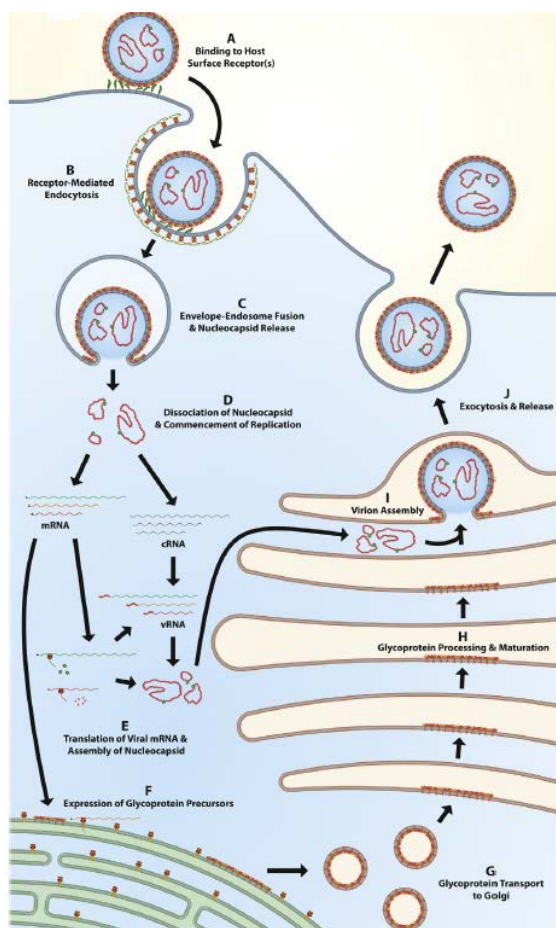


Slika 2: Genomski segmenti virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice in procesiranje virusnih beljakovin (Bente in sod., 2013: 167)

2.4 POMNOŽEVANJE VIRUSA KKH

Tarčne celice pomnoževanja virusa KKH so monociti, makrofagi, endotelijske celice in hepatociti (Whitehouse, 2004). Virus vstopa v tarčne celice z receptorsko-posredovano endocitozo, preko glikoziliranih beljakovin Gc in Gn. Vstop virusa v celice je odvisen od klatrinov (Simon in sod., 2009). Tarčnega receptorja še niso odkrili, vendar so pokazali, da je za vstop virusa v celico nujno potrebna celična molekula nukleolin in da pri vstopu virusa v

celico odigra ključno vlogo zunanja domena glikozilirane beljakovine Gc (Xiao in sod., 2011). Po vstopu virusa v celico, pride do združitve lipidne ovojnice virusa in endosoma, pri čemer pride do sprostitve virusnega genoma v citoplazmo. Takoj za tem nastopi prepisovanje virusne RNA in sinteza virusnih beljakovin ter podvajanje virusnega genoma s strani RdRp. Do prevajanja glikoziliranih beljakovin pride na ovojnica endoplazemskega retikuluma, do zorenja (glikozilacij) le-teh pa v Golgijevem predelu. Virusni delci se prav tako oblikujejo in brstijo na ovojnica Golgijevega predela ter se sproščajo v medcelični prostor z eksocitozo (Bente in sod., 2013). Shema pomnoževanja virusa KKHM je prikazana na sliki 3.



Slika 3: Pomnoževanje virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice (Bente in sod., 2013: 166)

A: vezava na celične, ovojnične receptorje, B: z receptorjem posredovana endocitoza, C: združitev ovojnic endosoma in virusa ter sprostitve ribonukleokapside v citoplazmo, D: prepisovanje virusnih genomskih segmentov in podvajanje genomске RNA, E: translacija virusne mRNA in izdelava ribonukleokapsid; F: izražanje prekursorja virusnih glikoziliranih beljakovin, G: prenos glikoziliranih beljakovin v Golgijev predel, H: zorenje glikoziliranih beljakovin, I: sestavljanje virusnega delca, J: izstop z eksocitozo

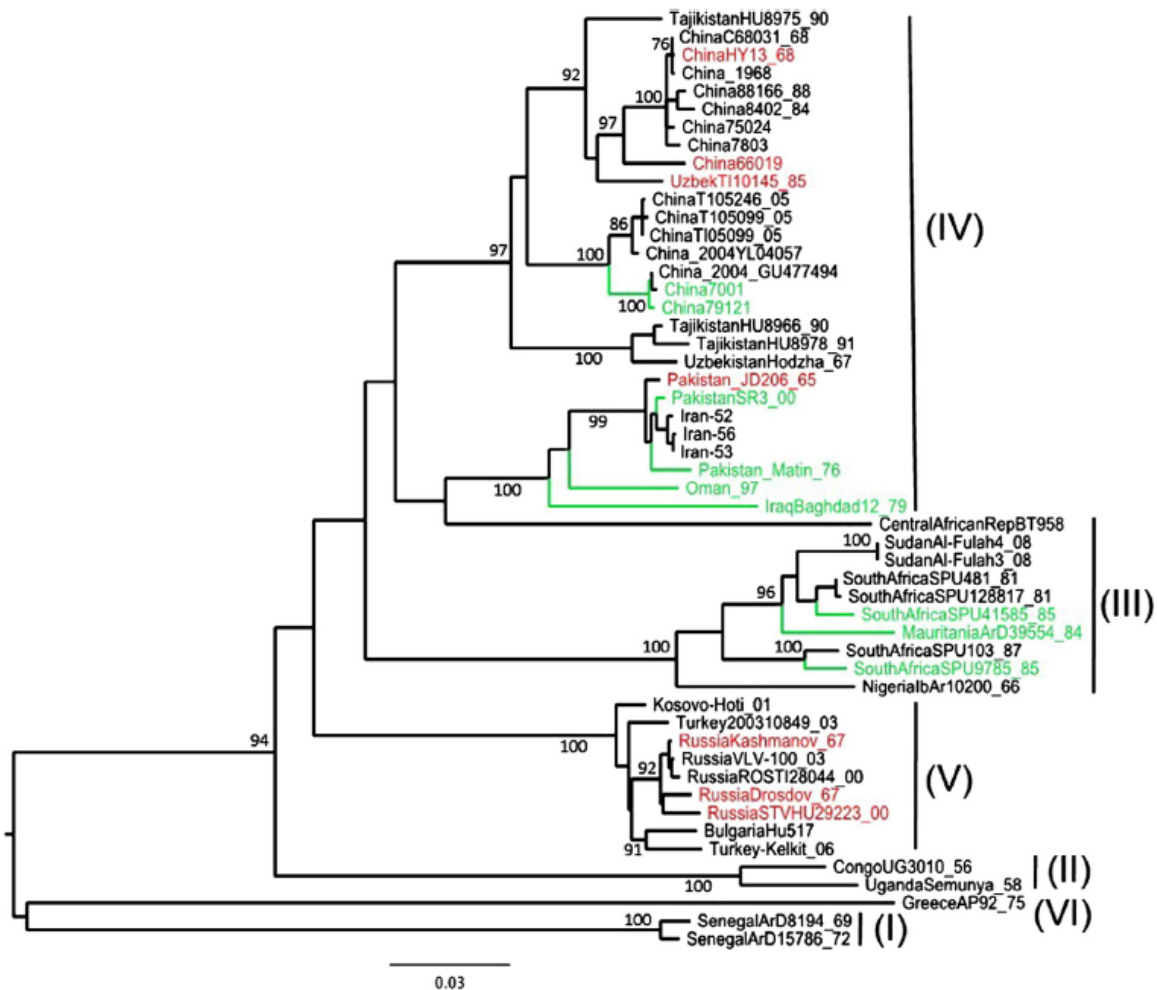
2.5 GENETSKA RAZNOLIKOST VIRUSA KKHM

Virus KKHM je genetsko najbolj raznolik arbovirus na svetu. Genetska raznolikost virusa je posledica:

- napakam podvržena lastnost RdRp, ki omogoča kopičenje mutacij v genomu (ti. genetski odmik, angl: genetic drift)
- razčlenjenosti genoma, ki omogoča izmenjevanje različnih genomskih segmentov (genetski premik, angl.: genetic shift) ob hkratni okužbi gostitelja in
- pojava rekombinacij znotraj posameznih genomov in med različnim virusnimi sevi ob hkratni okužbi gostitelja.

Genetska raznolikost sevov virusa KKHM se v največji meri kaže pri segmentu M (31 % raznolikost), manj pri segmentu L (22 %) in najmanj pri segmentu S (20 %). Genetska raznolikost virusa KKHM v veliki meri odraža oz. sovпада z njegovo zemljepisno razširjenostjo. Filogenetske analize segmenta S so namreč pokazale, da virus lahko uvrstimo v 6 ločenih filogenetskih linij, ki sovpadajo z zemljepisnim izvorom virusa (Deyde in sod., 2006)(slika 4):

- I – v to filogenetsko linijo uvrščamo afriške izolate, predvsem iz Senegala,
- II – v to filogenetsko skupino uvrščamo afriške izolate, predvsem iz Ugande in Demokratične Republike Kongo,
- III – v to filogenetsko skupino uvrščamo afriške izolate, predvsem iz Republike Južne Afrike in Nigerije,
- IV – v to filogenetsko skupino uvrščamo izolate iz Azije in Bližnjega vzhoda,
- V – v to filogenetsko skupino uvrščamo izolate iz Evrope (države Balkana, Turčija, Rusija) in
- VI – v to filogenetsko skupino uvrščamo izolate podobne sevu AP92, ki je bil izoliran v Grčiji.



Slika 4: Filogenetska analiza segmenta S, virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice (KHKM)(Bente in sod., 2013: 174)

Z rimskimi števkami so prikazane filogenetske skupine, ki odražajo tudi zemljepisno razširjenost virusa. V skupine I-III uvrščamo izolate KHKM iz Afrike, v skupino IV uvrščamo izolate iz Azije, v skupini V in VI uvrščamo izolate iz Evrope

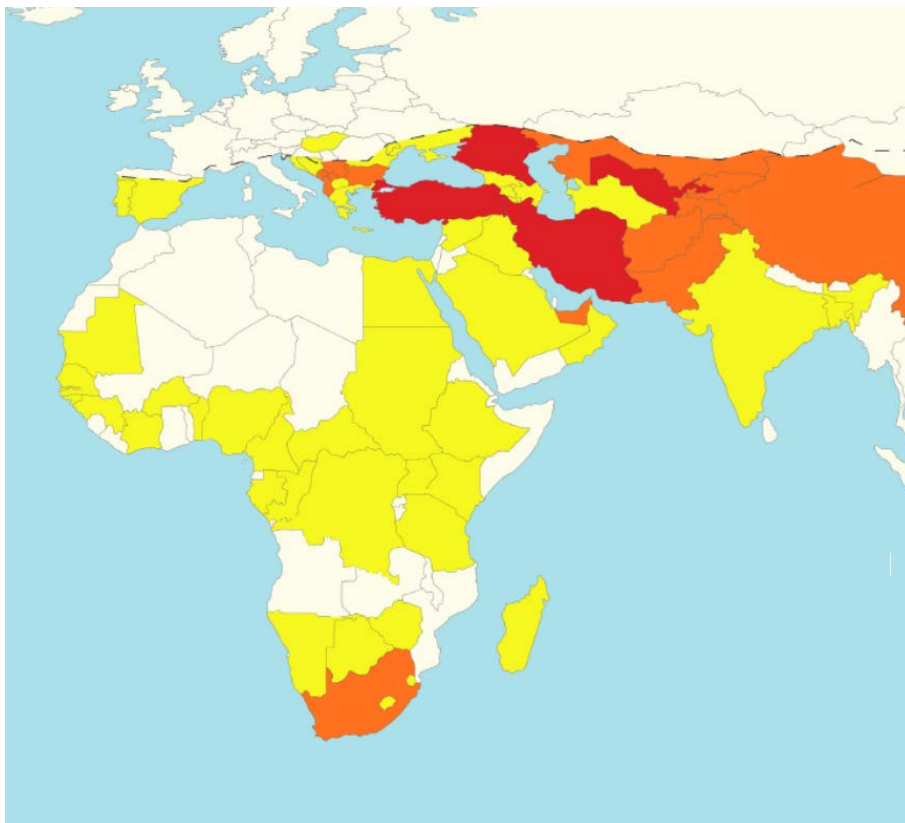
Filogenetske analize drugih segmentov so pokazale, da je med nekaterimi sevi virusa iz oddaljenih zemljepisnih področij prišlo do izmenjave segmentov ali rekombinacij. To kaže na vpliv migracij gostiteljev in/ali prenašalcev virusa na genetsko variabilnost virusa in pojavnost virusa. Poleg povezave genetske raznolikosti in zemljepisnega izvora virusa so nekatere raziskave nakazale tudi verjetnost povezave med jakostjo kliničnega poteka bolezni in genetsko raznolikostjo virusa KHKM. Burt in sod. (2009) so pokazali, da so afriški izolati, ki

so pridobili segment M azijskih izolatov, povzročili težjo obliko bolezni kot izolati pri katerih ni prišlo do genetskih prerazporeditev (Burt in sod., 2009). Povezavi jakosti kliničnega poteka bolezni in genetske različice virusa kažeta v prid tudi različne stopnje smrtnosti v različnih endemskih državah (smrtnost sega od 5-50 %) in obstoj nepatogene oz. pogojno patogene različice virusa KKHM, seva AP92. Sev AP92 predstavlja posebnost med sevi KKHM, saj velja kot edini nepatogen (oz. le pogojno patogen) sev virusa KKHM in je genetsko najbolj oddaljen od ostalih sevov KKHM. Sev AP92 je bil osamljen leta 1975 iz vzorca klopa vrste *Rhipicephalus bursa* (Papadopoulos in Koptopoulos, 1978). Od osamitve pa do nedavnega niso zabeležili nobenega primera bolezni s tem virusnim sevom. Šele v letih 2009 in 2010 so zabeležili prve primere okužb s sevom ki je podoben sevu AP92 (Elevli in sod., 2010; Ozkaya in sod., 2010). Vse opisane okužbe s sevi podobnimi AP92 so bile blage in niso vodile v težjo obliko bolezni, s krvavitvami. Prototipni sev virusa KKHM predstavlja sev IbAr10200, katerega so osamili leta 1966 iz vzorca klopa, katerega so vzorčili iz kamele, ki ni kazala znakov bolezni. Kljub temu, da okužbe pri ljudeh s tem sevom sicer do danes niso opisali, ostaja sev IbAr10200 prototipski sev za raziskave patogeneze, vsaj v zahodnem svetu. Priljubljenost tega seva je pripeljala tudi do tega, da so virus od osamitve, pa do danes intenzivno gojili v celičnih kulturah, do visokih pasaž (Bente in sod., 2013). Zato njegov patogenetski potencial pri ljudeh ostaja vprašljiv. Po drugi strani, sev Hoti, ki so ga osamili iz krvi bolnika s KKHM iz Kosova, ki je podlegel okužbi, predstavlja sev z dokazanim patogenetskim potencialom (Duh in sod., 2008). Sev Hoti in njegove genetske različice so odgovorni za vsakoletne izbruhe KKHM na Kosovu, in 25-30 % smrtnost (Fajs in sod., 2014a).

2.6 EPIDEMIOLOGIJA VIRUSA KKHM

Virus KKHM je zemljepisno najbolj razširjen, klopno-prenosljiv virus na svetu. Virus je endemičen v Afriki, Aziji, Bližnjem vzhodu in jugovzhodu Evrope (predvsem na Balkanu in Turčiji)(slika 5). Sloveniji najbližje endemsko področje je Kosovo, kjer okužbe z virusom KKHM beležijo na letni ravni. Bolezen so na Kosovu prvič opisali leta 1957, ko je zbolelo 7

oseb. Do leta 2001 so se okužbe pojavljale večinoma sporadično. Leta 2001 so zabeležili prvo večjo epidemijo KKHM, ko je zbolelo 31 oseb (Avšič-Županc, 2007). Tekom epidemije so osamili in opisali virusni sev, ki je odgovoren za okužbe na Kosovu, sev Hoti. Sev Hoti so izolirali iz vzorca bolnika, ki je imel fulminanten in težek potek bolezni, ki se je končala smrtno (Duh in sod., 2008).

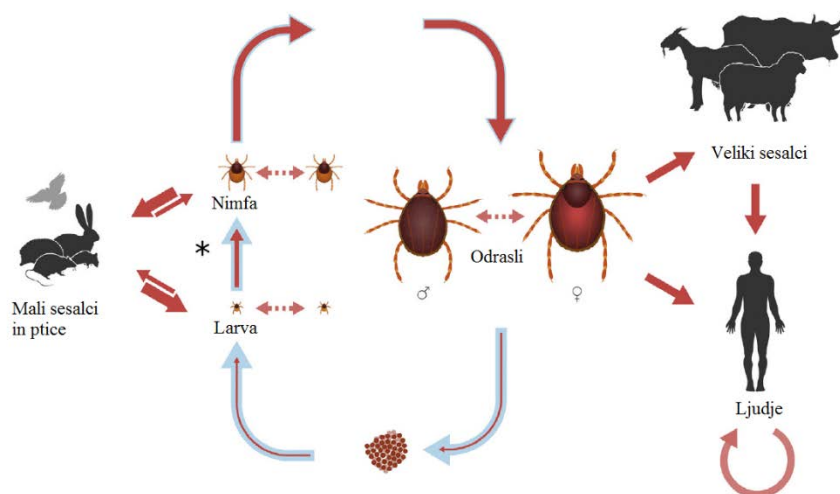


Slika 5: Zemljepisna razširjenost virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice (KKHM) (Bente in sod., 2013: 161)

Z rumeno barvo so označene predeli, kjer so virus dokazali le virološko ali serološko in so prisotni ustrezni prenašalci virusa. Z oranžno barvo so označeni predeli, kjer beležijo 5-49 primerov KKHM na leto. Z rdečo barvo so označeni predeli, kjer zabeležijo več kot 50 primerov KKHM na leto

Prisotnost virusa je tesno povezana s prisotnostjo prenašalca, klopov iz rodu *Hyalomma*. Glavni prenašalci virusa so klopi vrste *Hyalomma marginatum*. Virus so izolirali tudi iz drugih rodov klopov: *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Boophilus* in *Dermacentor* (Ergonul, 2006). Virus se v prenašalcih ohranja transstadialno (med razvojnimi stopnjami klopov) in transovarialno (s

samice na jajčeca). Pri ohranjanju virusa v naravi igra ključno vlogo tudi enzootski prenos, tj. prenos med klopi in naravnimi gostitelji. Med naravne gostitelje uvrščamo tako domače kot divje živali, predvsem male in velike sesalce: zajci, govedo, drobnica, ježi in glodavci. Pri živalih ni vidnih kliničnih znakov in so pogosto le prehodno viremične. Predvsem pri velikih sesalcih pa je mogoče zaznati specifična protitelesa proti virusu KKHM. Pomembno vlogo pri širjenju virusa na nova območja igrajo ptice selivke, ki lahko prenašajo okužene klope na dolge razdalje (Bente in sod., 2013). Jasen primer takšnega vpliva je odkritje virusa KKHM v vzorcih klopov v Španiji. Filogenetske analize dokazanega virusnega seva so namreč pokazale, da je najbolj soroden sevom, ki jih najdemo v Mavretaniji, tj. v severno zahodnem delu Afrike. Španija ni endemsko področje, zato sklepajo, da so okuženega klopa v Španijo prenesle ptice, tekom letnih selitev (Estrada-Pena in sod., 2012; Palomar in sod., 2013). Okužba z virusom KKHM je najpogosteje posledica vboda okuženega klopa, vendar še večje tveganje za razvoj težjega poteka bolezni predstavlja neposreden stik s krvjo ali tkivi okuženih živali ali bolnikov. Zaradi tega so okužbi z virusom KKHM najbolj izpostavljeni kmetovalci, veterinarji, delavci v klavnicah in zdravstveni delavci v endemskih področjih (Bente in sod., 2013). Shema prenosov virusa v naravi je prikazana na sliki 6.



Slika 6: Prenos virusa v naravi, med prenašalci (klopi) in gostitelji (Bente in sod., 2013: 168)

2.7 KLINIČNA SLIKA IN DIAGNOSTIKA KKH

Do okužbe z virusom KKH pride po vbodu okuženega klopa ali po stiku s krvjo ali tkivi okuženih ljudi ali živali. Inkubacijska doba KKH v povprečju traja od 3-7 dni. Bolezen večinoma poteka v treh fazah:

- vročinska ali prehemoragična faza,
- hemoragična faza in
- faza okrevanja.

V prvi fazi, vročinski fazi, se pojavijo neznačilni, gripi podobni klinični znaki: visoka vročina, glavobol, slabost, pordelost obraza in bolečine v mišicah. Pojavi se lahko tudi nespecifičen izpuščaj po celem telesu. Vročinska faza traja od nekaj ur do enega tedna. Naslednja faza je hemoragična faza oz. faza krvavitve, ki se pojavi 3-5 dni po pojavu kliničnih znakov. Hemoragična faza bolni je značilna za bolnike s težjim potekom bolezni. Najbolj značilne in najbolj pogoste so krvavitve iz nosu, dlesni in konjunktivalne krvavitve. Pri bolnikih s težkim potekom bolezni se pojavi tudi hematurija, melena in pri najtežjih primerih tudi notranje krvavitve, predvsem gastrointestinalne in možganske. Zaplet hemoragične faze je lahko sistemski hemodinamični šok, koma in odpoved organov, zaradi diseminirane intravaskularne koagulacije, ki v povprečno 30-50 % vodijo v smrt. Hemoragična faza traja od nekaj ur do 5 dni. Krvavitve predstavljajo glavni rizični dejavnik za sekundarni prenos virusa na druge osebe. Pri tem so najbolj izpostavljeni družinski člani, ki pogosto skrbijo za bolnike v zgodnji fazi bolezni, (pred hospitalizacijo) in bolnišnično osebje, ki je v tesnem stiku z bolnikom (Shepherd in sod., 1989b; Swanepoel in sod., 1989; Ergonul, 2006).

Pri zdravljenju okužb z virusom KKH si lahko pomagamo predvsem s podpornim zdravljenjem, saj nedvomno učinkovitega, specifičnega zdravljenja ne poznamo. Svetovna zdravstvena organizacija sicer priporoča uporabo oralnega ali intravenoznega ribavirina, vendar so številne raziskave pokazale, da je njegova učinkovitost omejena oz. nična (Ascioglu in sod., 2011; Arda in sod., 2012; Duygu in sod., 2012).

Faza okrevanja nastopi pri preživelih bolnikih. Faza okrevanja je zelo neznačilna. Pogosti so motnje srca, izpadanje las, polinevritis, motnje dihanje, motnje vida, izguba sluha, zmedenost in izguba spomina. Te težave so lahko prisotne še več mesecev ali let (Ergonul, 2006).

Pri diagnostiki KKHM so pomembni tako epidemiološki, klinični in laboratorijski podatki. Najpomembnejši epidemiološki podatki so: bivanje ali potovanje v endemsko področje, ugriz klopa, bližnji kontakt s krvjo ali tkivi živali ali bolnikov, poklic (kmetovalec, veterinar, delavec v klavnici). Klinične znake smo našli zgoraj, med najpomembnejše laboratorijske znake pa uvrščamo: znižano število trombocitov, povišan nivo jetrnih encimov, dokaz virusne RNA, prisotnost protiteles IgM, serokonverzija protiteles IgG ali osamitev virusa (Bente in sod., 2013).

2.8 PATOGENEZA KKHM

Znanje o patogenezi virusa KKHM je zelo omejeno, saj ne poznamo primerne imunske dovzetnega živalskega modela in ker so raziskave z virusom omejene na laboratorije najvišje stopnje biološke varnosti. Raziskave patogeneze so bile zato omejene na redke histopatološke raziskave, raziskave na celičnih kulturah in kliničnih raziskavah, kjer so merili različne biokemijske in imunske, napovedne dejavnike.

Pri patogenezi KKHM igra ključno vlogo virusno breme oz. količina virusa v krvi. Številne raziskave so namreč pokazale, da je virusno breme uporaben prognostični dejavnik, saj bolniki, pri katerih virusno breme naraste preko 10^8 kopij/ml seruma, v več kot 90 % podležejo okužbi (Duh in sod., 2007). Prav tako so Saksida in sod. nedvomno dokazali, da na podlagi virusnega bremena lahko ločimo tudi bolnike, z blažjim potekom bolezni in tiste s težjim potekom bolezni (Saksida in sod., 2010).

Tarčne celice virusnega pomnoževanja so monociti, hepatociti in endotelijske celice. Značilnost okužbe z virusom KKHM je povečana žilna prepustnost, ki pa ni nujno povezana z okužbo endotelija. Do povečane žilne prepustnosti naj bi namreč prišlo zaradi povišane stopnje vnetnih citokinov in ti. citokinske nevihte (Ergonul, 2006). Citokinska nevihta označuje pojav, ko imunski odgovor ni sorazmeren obsegu okužbe in posledično pride do

pretiranega izražanja vnetnih citokinov, ki povečajo žilno prepustnost, posredno poškodujejo tkiva in povzročijo diseminirano intravaskularno koagulacijo (Tisoncik in sod., 2012). Slednja naj bi predstavljala temelj za nastanek hemodinamskega šoka in odpovedi organov pri KKHM. Povišane stopnje citokinov so pokazali tako v raziskavah *in vitro*, kot tudi v kliničnih vzorcih bolnikov. Raziskave v Turčiji so pokazale, da so povišane vrednosti citokinov TNF- α in IL-6 povezane s težjim potekom bolezni oz. večjo smrtnostjo bolnikov s KKHM (Ergonul in sod., 2006). V drugi, obsežnejši raziskavi so Saksida in sod. pokazali, da so vrednosti IFN- γ , TNF- α in IL-10 statistično značilno višje pri bolnikih, ki okužbi podležejo. Prav tako so bile vrednosti višje pri bolnikih s težjim potekom, v primerjavi z bolniki, z lažjim potekom bolezni (Saksida in sod., 2010). Do podobnih rezultatov so prišli Connolly-Anderssen in sod. (2009), ki so v pogojih *in vitro* okužili človeške dendritične celice, ki so jih pridobili iz monocitov. Pokazali so, da okužene dendritične celice aktivirajo endotelijske celice in da dodatek protiteles proti TNF- α izniči aktivacijo endotelija (Connolly-Andersen in sod., 2009).

Raziskave *in vitro*, so bile do nedavnega omejene le na raziskave na celičnih linijah in redke raziskave v novorojenih, sesajočih miših. V zadnjih letih sta se pojavila dva (imunsko oslabljena) živalska modela:

- miši, katerim so odstranili gen za receptor interferonov tipa I (Berezky in sod., 2010) in
- miši, ki so jim odstranili gen za molekulo STAT1, ki je del signalne poti, ki omogoča sintezo genov, ki so stimulirani s strani interferonov (Bente in sod., 2010).

S pomočjo teh modelov so uspešno ponazorili potek bolezni, ki spominja na KKHM pri ljudeh. Prav tako so pokazali, da pride pri okužbi do povišanja vrednosti vnetnih citokinov: IL-6, IL-10, IFN- γ in TNF- α (Bente in sod., 2010; Berezky in sod., 2010).

Kljub spodbudnim rezultatom, pa je glavna omejitev teh dveh živalskih modelov ta, da sta oba imunsko oslabljena. To povzroča največjo težavo pri raziskavah cepiva proti KKHM, saj ti živalski modeli niso sposobni ustvariti zadostnega oz. učinkovitega protitelesnega odziva, ki se uporablja kot merilo učinkovitosti cepiv. Po drugi strani pa sta oba modela osvetlila drugo stran patogeneze virusa KKHM in to je njegova odvisnost od interferonskega odziva.

Predhodne raziskave na celičnih kulturah so prav tako pokazale, da je razmnoževanje virusa KKHM znatno utišano s strani interferonov tipa I (Andersson in sod., 2006). Prav tako so pokazali, da beljakovina MxA, ki jo uvrščamo med protivirusne učinkovine, ki so stimulirane s strani interferonov, neposredno veže virusno beljakovino N in s tem onemogoči virusno pomnoževanje (Andersson in sod., 2004a). Po drugi strani pa so isti raziskovalci pokazali, da je virus KKHM zmožen utišati odziv interferonov in, da nosi zapis za zdaj neznan dejavnik, ki neposredno utiša odziv interferonov tipa I (Andersson in sod., 2008).

2.9 ODZIV INTERFERONOV TIP A I

Prirojeni imunski sistem predstavlja prvo obrambno linijo človeškega imunskega sistema pred patogeni. Prirojeni imunski sistem ima vlogo pri neposrednem odstranjevanju in uničevanju patogenov kot tudi pri razvoju specifičnega imunskega sistema. Bistvena komponenta prirojenega imunskega sistema je odziv interferonov tipa I. Funkcije interferonov so mnogotere, saj delujejo proti raku, proti virusom in modulirajo imunski odziv. Pri sesalcih se interferoni tipa I sintetizirajo in izločajo v vseh celicah z jedri, vendar se način njihove stimulacije ali delovanja lahko razlikuje med različnimi tipi celic (Der in sod., 1998).

Interferone (IFN) tipa I so odkrili leta 1957, kot dejavnike, ki vzbudijo protivirusno stanje po okužbi z virusom influence. Od tod tudi njihovo poimenovanje, ki izvira iz angleške besede »interfere«, ki pomeni »motiti« (Isaacs in Lindenmann, 1957). Med IFN tipa I, ki jih najdemo pri ljudeh, uvrščamo številne podtipe IFN- α , IFN- β ter podtipe IFN- ϵ , - κ in - ω (Perry in sod., 2005). Poleg interferonov tipa I poznamo še dve družini interferonov, ki se razlikujeta predvsem v načinu njihove stimulacije in celičnih tipih, ki jih izražajo:

- interferoni tipa II - v to družino uvrščamo interferon gama (IFN- γ), ki ga izločajo predvsem celice T CD8 in naravne celice ubijalke. IFN- γ igra pomembno vlogo pri patogenezi KKHM, saj so vrednosti le-tega znatno povišane pri bolnikih s težjim potekom bolezni ali smrtnim izidom okužbe (Weber in Elliot, 2009; Saksida in sod., 2010).

- Interferoni tipa III – v to družino uvrščamo interferone lambda (IFN- λ), ki jih izločajo predvsem celice epitelija (Donnelly in Kotenko, 2010).

Skupna lastnost vseh IFN tipa I je, da se vežejo na skupni receptor, tj. receptor za IFN tipa I IFN α/β (receptor IFNAR)(Perry in sod., 2005).

Odziv interferonov tipa I lahko razdelimo na dve stopnji: v prvi stopnji pride do prepoznavanja patogenov in sinteze interferonov. V drugi stopnji pride do avtokrinega in parakrinega izločanja interferonov in izražanje genov, stimuliranih s strani interferonov (ISG, iz angl.: interferon stimulated genes), ki nosijo zapis za beljakovine, ki zavrejo nadaljnje pomnoževanje virusov oz. drugih patogenov (Perry in sod., 2005).

2.9.1 Prepoznavanje virusov in sinteza interferonov

V prvi stopnji odziva interferonov pride do prepoznavanja virusov oz. njihovih molekularnih struktur, ti. vzorcev PAMP (angl. Pathogen-associated molecular patterns), s strani receptorjev PRR (angl. Particle recognition receptors). Receptorje PRR v grobem delimo na transmembranske receptorje (npr. Tollu-podobni receptorji) in topne receptorje (npr. RIG1-podobni in NOD-podobni receptorji). Receptorji PRR omogočijo aktivacijo zapletenih, znotrajceličnih, signalnih kaskad, ki sprožijo izražanje množice različnih citokinov in kemokinov. Različni receptorji prepoznajo različne molekularne vzorce, vzbudijo različne signalne kaskade in omogočijo izražanje različnih kombinacij kemo- in citokinov. S tovrstnim odzivom, celice vzpostavijo imunski odgovor, ki je prilagojen specifičnemu patogenu ter s tem povečajo verjetnost uspešnega imunskega odziva (Perry in sod., 2005).

Izražanje IFN tipa I je uravnano na nivoju transkripcije. Izražanje IFN tipa I omogoči vezava aktiviranih transkripcijskih dejavnikov c-Jun/ATF-2, NF- κ B in IRF-3 na promotor za IFN- β . Aktivacija transkripcijskih dejavnikov c-Jun/ATF-2 do NF- κ B ni vezana le na odziv interferonov tipa I. Po drugi strani je aktivacija dejavnika IRF-3 skoraj izključno vezana na odziv interferonov tipa I. Dejavnik IRF-3 je v neaktivni obliki prisoten v citoplazmi vseh celic, ves čas. Ob prisotnosti virusnih ali bakterijskih molekularnih vzorcev PAMP, kinaza TBK1 ali

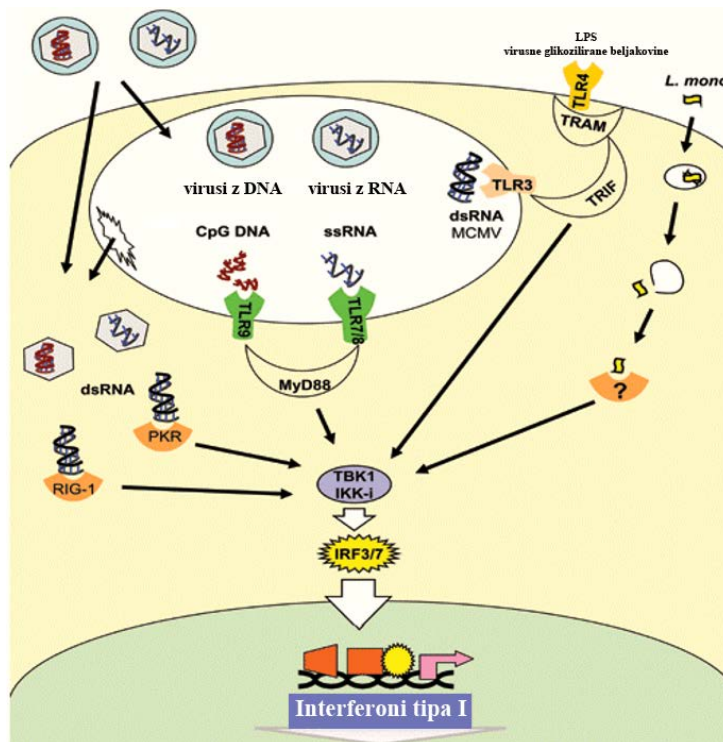
inducibilna kinaza I κ B fosforilira IRF-3, ki dimerizira in preide v jedro. V jedru se združi s koaktivatorjem CBP/P300 in sproži prepis IFN- β . Vzorce PAMP, kot omenjeno, prepoznajo receptorji PRR. Pri odzivu IFN tipa I (predvsem odzivu IFN tipa I pri okužbi z virusom KKH) igrajo ključno vlogo receptorji PRR iz družin Tollu-podobnih receptorjev (TLR, iz angl.: Toll-like receptors) in RIG-I-podobnih receptorjev (RLR, RIG-I-like receptors) (Perry in sod., 2005).

Receptorji TLR (angl. Toll-like receptor) prepoznajo številne vzorce PAMP virusov, bakterij, gliv in praživali (npr. virusne glikozilirane beljakovine, dvovijačno in enovijačno RNA in regije DNA bogate z motivi CpG, bakterijski lipopolisaharid, itd.) (Perry in sod., 2005). Receptorji TLR so transmembranski receptorji, ki vsebujejo zunajcelično domeno bogato z leucini (LRR, iz angl.: leucine-rich repeat), ki omogoča prepoznavanje PAMP in znotrajcelično domeno, receptor Toll/interleukin-1 (TIR, iz angl.: Toll/interleukin-1 receptor), ki aktivira različne znotrajcelične beljakovine, ki prav tako vsebujejo domeno TIR. Ena takšnih beljakovin je mieloidni diferenciacijski dejavnik-88 (MyD88, iz angl.: Myeloid differentiation factor-88). Vsi receptorji TLR, z izjemo receptorja TLR-3, lahko aktivirajo beljakovino MyD88, ki nato aktivira transkripcijski dejavnik NF- κ B in z mitogeni-aktivirane kinaze beljakovin (MAPK, iz angl.: Mitogen Activate Protein Kinases). Tovrstna, od MyD88-odvisna signalna pot vodi do aktivacije in razgradnje I κ B kinaznega kompleksa IKK, kar aktivira transkripcijski dejavnik NF- κ B. Transkripcijski dejavnik NF- κ B sproži prepis od NF- κ B odvisnih genov, med katerimi so geni za vnetne citokine TNF α , IL-6 in IL-1, in v sodelovanju z dodatnimi transkripcijskimi dejavniki, tudi prepis IFN tipa I (Akira in Takeda, 2004). Po drugi strani lahko receptorja TLR-3 in -4, preko signalnih kaskad, omogočita izražanje IFN tipa I neodvisno od beljakovine MyD88.

Kot že omenjeno, različni receptorji TLR prepoznajo različne vzorce PAMP. Pri prepoznavanju virusov z RNA, igrajo ključno vlogo TLR-3, TLR-7 in TLR-8. Receptor TLR-3 prepozna dvovijačno RNA, ki ni »naravna« človeškim celicam in polinozinsko:policitidilinsko kislino, ki je strukturno podobna dvovijačni RNA. Izražanje IFN tipa I aktivira preko kinaze TBK1 in transkripcijskega dejavnika IRF3. Receptorja TLR-7 in -8 prepoznata dolge odseke enovijačne RNA, bogate z gvanini in uracili. Do izražanja IFN tipa I

pride izključno preko beljakovine MyD88, ki aktivira transkripcijski dejavnik IRF-7. V tem primeru ne pride do aktivacije IRF-3, transkripcijski dejavnik IRF-7 pa nato sproži sintezo IFN- α (Perry in sod., 2005).

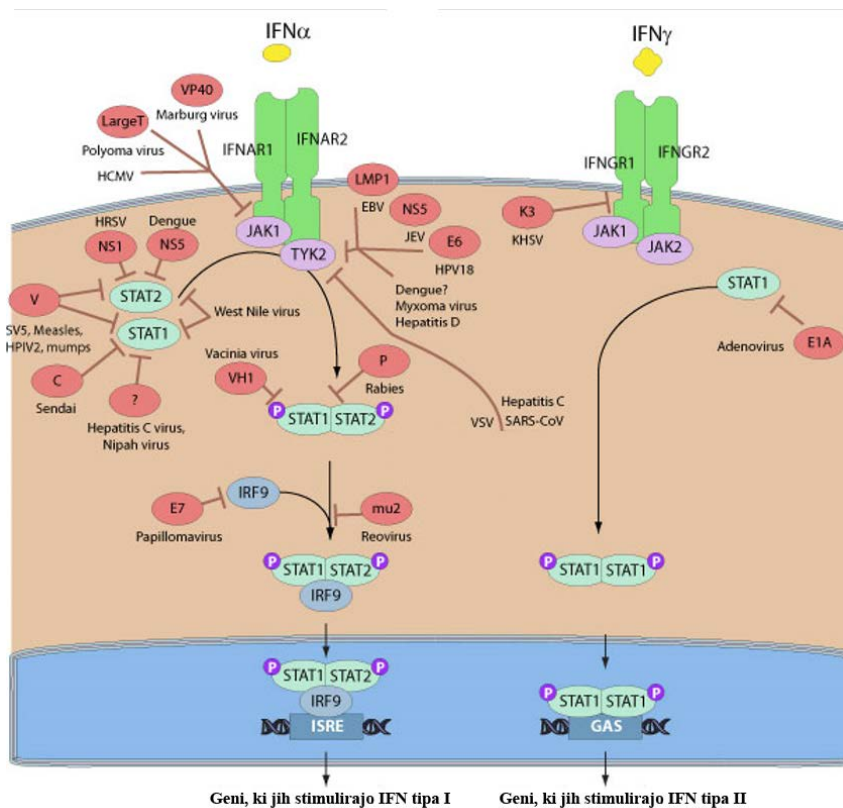
Pri prepoznavanju vzorcev PAMP sodelujejo tudi topni, citoplazemski receptorji. Pri virusih, še posebej v primeru virusa KKHM, igrajo pomembno vlogo receptorji RLR in kinaza beljakovin R (PKR, iz angl.: protein kinase R), ki prepoznajo dvovijačno RNA. Receptorji RLR, pri čemer sta najpomembnejša receptorja RIG-1 in MDA-5, prepoznata na 5' koncu trifosforilirano, enovijačno RNA. Receptorja RIG-1 in MDA-5, sta helikazi RNA, ki ju uvrščamo med poglavitna receptorja za znotrajcelično prepoznavanje virusne RNA. Vezava receptorjev na virusno RNA sproži signalno kaskado, ki omogoči aktivacijo IRF-3 in izražanje IFN- β (Perry in sod., 2005). Poenostavljena shema aktivacije izražanja IFN tipa I je prikazana na sliki 7.



Slika 7: Poenostavljena shema aktivacije izražanja interferonov tipa I (Perry in sod., 2005: 409) dsRNA: dvovijačna RNA, ssRNA: enovijačna RNA, LPS: lipopolisaharid, CpG DNA: DNA bogata z motivi CpG

2.9.2 Delovanje interferonov tipa I

Po sintezi IFN tipa I pride do njihovega izločanja iz celice. IFN tipa I delujejo avtokrino in parakrino, saj se vežejo na receptor IFNAR, ki je prisoten na vseh celicah. Vezava IFN tipa I na receptor IFNAR, aktivira kinazi beljakovin iz družine Janus (JAK, iz angl.: Janus kinases) Tyk2 in Jak1, ki nato fosforilirata tirozinske ostanke beljakovin STAT1 (angl.: signal transducers and activation of transcription 1) in STAT2. Tako aktivirani beljakovini STAT se nato, skupaj z dejavnikom IRF9, združita v heterotrimerni kompleks, ki se veže na promotorsko regijo genov ISG, ti. s strani interferonov stimuliran odzivni element ali ISRE (angl. Interferon stimulated response element)(slika 8). Geni ISG nosijo zapis za več kot 300 beljakovin, ki lahko zavrejo pomnoževanje patogenov. Med najboljše preučene beljakovine ISG uvrščamo 2'-5'-oligoadenilatna sintetaza (OAS), kinaza PKR in beljakovina MxA. OAS aktivira RNazo L, ob prisotnosti dvovijačne RNA, ki nato razgradi celično in virusno RNA, medtem ko kinaza PKR fosforilira dejavnik iniciacije sinteze beljakovin eIF-2 α in s tem prepreči sintezo beljakovin. Oba mehanizma zavreta virusno pomnoževanje na ravni izražanja beljakovin, tako virusnih kot celičnih. Beljakovino MxA uvrščamo med dinaminu-podobne GTP-aze. Beljakovina MxA deluje neposredno na virusne delce oz. njihove beljakovine takoj ob njihovem vstopu. Pomnoževanje virusov zavre tako odstrani oz. preusmeri virusne ribonukleokapside na nedostopna mesta v celici in jih s tem onemogočijo (Perry in sod., 2005).

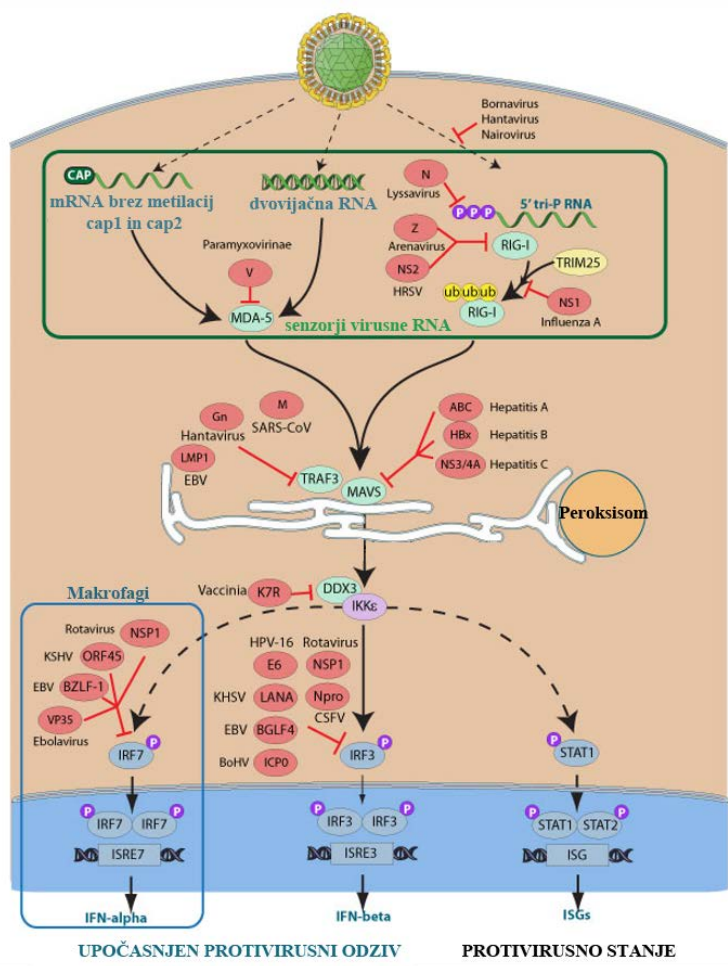


Slika 8: Shema aktivacije izražanja genov, ki jih stimulirajo interferoni tipa I (levo) in shema aktivacije genov, ki jih stimulira interferon- γ (desno)(ViralZone, 2013b)

2.9.3 Antagonistično delovanje virusov na odziv interferonov tipa I

Kot omenjeno, predstavlja odziv IFN tipa I prvo obrambno linijo človeškega imunskega odziva. Za premostitev te ovire, so virusi in drugi patogeni razvili mehanizme s katerimi lahko zavrejo posamezne stopnje odziva IFN in s tem omogočijo svoje pomnoževanje v tarčnih celicah. Virusi nosijo zapise za dejavnike s katerimi lahko zavrejo prepoznavanje s strani receptorjev PRR, utišanje izražanja IFN, utišanje izražanja ISG ali utišanje delovanja ISG. Tovrstne dejavnike z antagonističnim delovanjem na odziv IFN tipa I so odkrili pri različnih virusnih družinah, tako pri virusih z DNA in RNA. Na primer, beljakovina ICP_{34.5} virusa herpesa simpleksa-1, prepreči delovanje kinaze PKR in s tem prepreči razgradnjo celične RNA, kar vodi v zaustavitev sinteze beljakovin (He in sod., 1997). Naslednji primer je

beljakovina NS1 virusa influence, ki označi beljakovino STAT1 za razgradnjo in s tem prepreči sintezo beljakovin ISG (Didcock in sod., 1999). Beljakovine z antagonističnim delovanjem na odziv IFN tipa I so odkrili tudi pri virusih, ki povzročajo hemoragične mrzlice, kot so virus Ebole, hantavirusi, virus doline reke Rift, idr (Basler in sod., 2000; Billecocq in sod., 2004; Levine in sod., 2010). Beljakovina VP35, virusa Ebola Zaire deluje kot močan antagonist aktivacije izražanja IFN- β , tako da prepreči fosforilacijo in s tem aktivacijo dejavnika IRF-3 (Basler in sod., 2000). Antagonistično delovanje so pokazali tudi pri nukleoproteinu in glikoproteinu patogenih hantavirusov, pri čemer je bilo antagonistično delovanje pri nepatogenih hantavirusih zmanjšano ali popolnoma izničeno (Levine in sod., 2010). Na sliki 9 so prikazane stopnje na katerih prihaja do utišanja odziva IFN tipa I s strani različnih virusov.



Slika 9: Stopnje odziva interferonov (IFN) tipa I na katere delujejo virusni dejavniki, ki delujejo kot antagonisti odziva IFN tipa I (ViralZone, 2013a)

2.9.4 Odziv interferonov tipa I in virus KKH

Znanje o odzivu IFN tipa I proti virusu KKH je omejeno na posamezne raziskave. IFN tipa I inhibirajo pomnoževanje virusa KKH (Andersson in sod., 2006). Pri inhibiciji virusnega pomnoževanja igra pomembno vlogo beljakovina MxA, ki jo uvrščamo med beljakovine ISG. Raziskave so pokazale, da beljakovina MxA veže virusno beljakovino N in jo preusmeri v prostor med ovojnicama jedrnega ovoja in s tem onemogoči zorenje virusa. Pri inhibiciji virusnega pomnoževanja sodelujejo tudi druge beljakovine ISG, saj kljub inhibiciji delovanja beljakovine MxA, lahko pride do inhibicije pomnoževanja virusa KKH s strani IFN tipa I (Andersson in sod., 2004a). Kot možni beljakovini, ki vplivata na pomnoževanje virusa

KKHM, opisujejo beljakovini ISG20 in PKR, vendar njuni vlogi še nista nedvomno dokazani (Weber in Mirazimi, 2008). Pretekle raziskave so tudi pokazale, da je virus KKHM zmožen utišati oz. obiti odziv IFN tipa I. (Habjan in sod., 2008) so pokazali, da virus KKHM ne aktivira signalne poti RIG-1, tako kot njemu sorodni virusi, saj ima na 5' koncu genomske RNA monofosfat (ki ne aktivira signalne poti RIG-1) namesto trifosfata. Predvidevajo, da virus odstrani trifosfatne skupine z RNA med pomnoževanjem (Habjan in sod., 2008) in da je zaradi tega aktivacija odziva IFN tipa I upočasnjena in šibka (Andersson in sod., 2008). Raziskave so tudi pokazale, da virus KKHM utiša aktivacijo transkripcijskega dejavnika IRF-3 in s tem posledično tudi odziv IFN tipa I. V teh raziskavah so pokazali tudi, da virus nosi zapis za še neznan dejavnik, ki utiša odziv IFN tipa I. Temu v prid kažejo izsledki iste raziskave, kjer so pokazali, da je virus KKHM občutljiv na profilaktične odmerke IFN vendar ne tudi na terapevtske odmerke IFN: dodatek 1000 U/ml IFN eno uro po okužbi nima vpliva na virusno pomnoževanje, medtem ko isti odmerek IFN pred okužbo, zavre pomnoževanje virusa (Andersson in sod., 2008).

2.10 ODZIV INTERFERONOV TIPa II

Pri odzivu interferonov igra pomembno vlogo tudi odziv IFN tipa II. Edini predstavnik IFN tipa II je IFN- γ , ki se veže na celični receptor za IFN- γ (IFNGR, iz angl. Interferon gamma receptor). Vezava na IFNGR sproži aktivacijo kinaz JAK, ki fosforilirajo beljakovino STAT1. Tako aktivirana beljakovina STAT1 se združi v homodimer in prenese v jedro, kjer se veže na promotorsko regijo genov, ki jih stimulira IFN- γ , tj. na aktivacijsko zaporedje za IFN- γ oz. element GAS (angl. IFN- γ activated site). Med gene, ki jih stimulira IFN- γ uvrščamo mnoge gene ISG, kot tudi gene značilne za IFN- γ . Delovanje odziva IFN tipa II je podobno kot pri IFN tipa I, saj prav tako vzbudi protivirusno celično stanje. Medtem ko IFN tipa I izloča večina celic v telesu, IFN-tipa II izločajo predvsem celice T in celice NK (Platanias, 2005). Tako kot pri odzivu IFN tipa I, so virusi razvili mehanizme, s katerimi zavrejo odziv IFN tipa II. Virus Ectromelia, ki ga uvrščamo v rod *Orthopoxvirus*, npr. nosi zapis za beljakovino, ki veže in inhibira IFN- γ (Nuara in sod., 2008).

Pri virusu KKHM je odziv IFN tipa II slabo raziskan. Raziskave IFN tipa II so bile omejene le na določanje vrednosti IFN- γ v serumu bolnikov s KKHM in redkih raziskavah na imunsko oslabeledih mišjih modelih. Pri bolnikih s KKHM so pokazali, da imajo le-ti povišane vrednosti IFN- γ in da so visoke vrednosti IFN- γ značilno povezane z višjo smrtnostjo (Weber in Mirazimi, 2008; Saksida in sod., 2010). Prav tako so pokazali, da pri okužbi z virusom KKHM pri miših, ki imajo odstranjen gen za IFNAR ali STAT1, pride do povišanih vrednosti IFN- γ (Bente in sod., 2010; Zivcec in sod., 2013).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 CELIČNE LINIJE

Za namen izražanja ekspresijskih plazmidov v evkariontskem sistemu, smo uporabili celično linijo človeških embrionalnih ledvičnih celic, HEK 293T/17 (ATCC CRL-11268). Celično linijo HEK293T/17 smo izbrali zato, ker omogoča visoko raven izražanja vnesenih ekspresijskih plazmidov in ima neokrnjen interferonski sistem. Celično linijo smo gojili v gojišču GlutaMAX, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)(Life Technologies, Carlsbad, ZDA), kateremu smo dodali 10 % goveji fetalni serum (angl. Fetal Bovine Serum)(Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Celično linijo smo gojili pri 37 °C in v atmosferi s 5 % CO₂.

3.2 PLAZMIDI

Antagonistično delovanje virusa KKHM na odziv interferonov tipa I, smo preverili s ko-ekspresijo:

- poročevalnih plazmidov: plazmidi, ki nosijo zapis za luciferazo pod nadzorom promotorskih regij, vpletenih v regulacijo interferonskega odziva,
- kontrolnega plazmida: plazmid, ki nosi zapis za luciferazo pod nadzorom promotorja za timidin kinazo. Kontrolni plazmid poda mero učinkovitosti transfekcije, ki jo vključimo pri analizi rezultatov in
- ekspresijskih plazmidov: plazmidi, ki nosijo zapis za odprti bralni okvir genomskih segmentov virusa KKHM in omogočajo njihovo izražanje v evkariontskih celičnih linijah ter plazmid, ki nosi zapis za bralni okvir beljakovine VP35 virusa Ebola Zaire, ki služi kot pozitivna kontrola.

3.2.1 Poročevalni plazmidi

Antagonistično delovanje virusa KKHM, smo preverili na treh stopnjah interferonskega odziva:

- Vpliv na izražanje interferona beta: uporabili smo plazmid p125-luc, ki nosi zapis za luciferazo kresnice *Photinus pyralis*, ki je pod nadzorom promotorja za interferon beta (Matsumoto in sod., 2002). Plazmid p125-luc smo dobili od prof. Takashija Fujite iz inštituta Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto, Japonska.
- Vpliv na izražanje genov, ki jih stimulirajo interferoni tipa I: uporabili smo plazmid pISRE- Luc Cis-Reporter Plasmid (Stratagene, Agilent Technologies, Kalifornija, ZDA), ki nosi zapis za luciferazo kresnice *Photinus pyralis*, ki je pod nadzorom promotorja ISRE (s strani interferona stimuliran odzivni element, iz angl.: Interferon Stimulated Response Element).
- Vpliv na izražanje signalnih poti pod vplivom interferona gama: uporabili smo plazmid pGAS-Luc Cis-Reporter Plasmid (Stratagene, Agilent Technologies, Kalifornija, ZDA), ki nosi zapis za luciferazo kresnice *Photinus pyralis*, ki je pod nadzorom aktivacijskega zaporedja za interferon gama.

3.2.2 Kontrolni plazmid

V vse poskuse smo vključili kontrolni plazmid pRL-TK (Promega, Madison, ZDA), ki nosi zapis za luciferazo meduze vrste *Renilla reniformis* pod nadzorom promotorja za timidin kinazo, ki je v evkariontskih celicah konstitutivno aktiven. S kontrolnim plazmidom smo preverili učinkovitost transfekcije in omogočili primerljivost rezultatov različnih eksperimentov.

3.2.3 Ekspresijski plazmidi

Antagonistično delovanje virusa KKHМ na odziv interferonov tipa I smo preverili z ekspresijskimi plazmidi, ki so nosili zapis za odprti bralni okvir bodisi segmenta S, bodisi segmenta M, sevov virusa KKHМ IbAr1200, Hoti in AP92.

Ekspresijski plazmid pCAGGS ZEBOV VP35, z zapisom za odprti bralni okvir beljakovine VP35 virusa Ebola Zaire (ZEBOV), smo uporabili kot pozitivno kontrolo antagonističnega delovanja proti odzivu interferonov tipa I. Plazmid smo dobili od prof. Yoshihira Kawaoke iz University of Wisconsin, Madison, ZDA.

Ekspresijske plazmide virusa KKHМ, seva IbAr10200 smo dobili od dr. Connie Schmaljohn iz inštituta U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Ft. Detrick, ZDA. Pridobili smo tri plazmide (Bertolotti-Ciarlet in sod., 2005; Altamura in sod., 2007):

- pCAGGS-N: plazmid, ki nosi zapis za odprti bralni okvir segmenta S, virusa KKHМ sev IbAr10200. Odprti bralni okvir je kloniran v plazmidni vektor pCAGGS-MCS.
- pCAGGS-M: plazmid, ki nosi zapis za odprti bralni okvir segmenta M, virusa KKHМ sev IbAr10200. Odprti bralni okvir je kloniran v plazmidni vektor pCAGGS-MCS.
- pCAGGS-MCo: plazmid, ki nosi zapis za odprti bralni okvir segmenta M z modificiranimi kodoni (modificirani z namenom povečanja stopnje izražanja beljakovine v evkariontskem ekspresijskem sistemu), virusa KKHМ sev IbAr10200. Odprti bralni okvir je kloniran v plazmidni vektor pCAGGS-MCS.

Ekspresijske plazmide z zapisom za odprti bralni okvir segmentov S in M sevov Hoti in AP92 smo izdelali sami po naslednji shemi:

- Osamitev virusne RNA obeh sevov,
- Pomnoževanje celotnih bralnih okvirjev segmentov S in M z verižno reakcijo s polimerazo in reverzno transkriptazo,
- Čiščenje pridelkov verižne reakcije s polimerazo,
- Kloniranje pridelkov verižne reakcije s polimerazo v ekspresijski plazmidni vektor,
- Transformacija bakterij in izbira transformant,
- Osamitev in karakterizacija plazmidne DNA in
- Preverjanje istovetnosti z določanjem nukleotidnega zaporedja.

Podrobni postopek izdelave ekspresijskih plazmidov je opisan v nadaljevanju.

3.2.4 Osamitev virusne RNA

Virusno RNA seva Hoti smo osamili iz vzorca zamrznjenega supernatanta virusne kulture virusa KKHV sev Hoti (2. pasaža), shranjenega v laboratoriju 3. stopnje biološke varnosti, na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo. Virusna RNA seva AP92 je bila shranjena v arhivu laboratorija, zato je ni bilo potrebno dodatno osamiti.

Virusno RNA seva Hoti smo osamili s kompletom reagentov QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija), po navodilih proizvajalca. Komplet reagentov omogoča hitro in enostavno osamitev RNA na silika membranah. Osamljeno RNA smo shranili pri -20 °C.

3.2.5 Pomnoževanje virusnih segmentov

V naslednjem koraku smo pomnožili odprte bralne okvirje segmentov S in M, sevov Hoti in AP92, kateri so služili kot vključki za kloniranje v ekspresijski plazmidni vektor.

V prvi fazi smo pomnožili celotna segmenta S in M z metodo verižne reakcije s polimerazo in reverzno transkriptazo (RT-PCR iz angl.: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). Uporabili smo komplet reagentov SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity (Life Technologies, Carlsbad, ZDA) in naslednje kombinacije začetnih oligonukleotidov (Preglednica 1):

- CCHF RT in CCHF PCR, omogočata pomnoževanje celotnega segmenta S in
- CCHF MR in CCHF MF, omogočata pomnoževanje celotnega segmenta M.

V drugi fazi smo pomnožili celotni odprti bralni okvir segmentov S in M, sevov Hoti in AP92. Kot matrico za pomnoževanje smo uporabili pridelke PCR celotnih segmentov S oz. M. Uporabili smo komplet reagentov KOD Xtreme Hot Start DNA Polymerase (Merck, Darmstadt, Nemčija), ki omogoča nastanek pridelkov PCR s topimi konci (polimeraza Taq namreč na konce pridelkov PCR doda dodaten nukleotid, timin), ki so potrebni za kloniranje v izbran ekspresijski vektor. Uporabili smo naslednje kombinacije začetnih oligonukleotidov (Preglednica 1):

- SORF-F in SORF-R, omogočata pomnoževanje celotnega bralnega okvirja segmenta S,
- SORF-F in SORF-HisR, omogočata pomnoževanje celotnega bralnega okvirja segmenta S z dodanim zaporedjem šestih histidinov (6×His) ali peptidom V5 (začetni oligonukleotid omogoči dodajanje signalnega zaporedja med postopkom kloniranja) in
- MORF-F in MORF-R, omogočata pomnoževanje celotnega bralnega okvirja segmenta M,
- MORF-F in MORF-HisR, omogočata pomnoževanje celotnega bralnega okvirja segmenta M z dodanim zaporedjem šestih histidinov (6×His) ali peptidom V5 (začetni oligonukleotid omogoči dodajanje signalnega zaporedja med postopkom kloniranja).

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za pomnoževanje genomskih odsekov virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice

Table 1: Polymerase chain reaction primers used for amplification of Crimean-Congo hemorrhagic fever genomic sequences

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje	Vir
CCHF-RT	5'-TCTCAAAGAAACACGTGCCGC-3'	(Deyde in sod., 2006)
CCHF-PCR	5'-TCTCAAAGATATCGTTGCCGC-3'	(Deyde in sod., 2006)
CCHF-MF	5'-TCTCAAAGAAATACTTGC-3'	(Deyde in sod., 2006)
CCHF-MR	5'-TCTCAAAGATATAGTGGC-3'	(Deyde in sod., 2006)
CCHF SORF-F	5'-GCCATGGAAAACAAGATCGAGG-3'	lastni
CCHF SORF-R	5'-AGTTCTAGATGATGTTGGCAC-3'	lastni
CCHF SORF-HisR	5'-GATGATGTTGGCACTAGTGG-3'	lastni
CCHF MORF-F	5'-CACCATGCCCATCAACATTATG-3'	lastni
CCHF MORF-R	5'-GTTGAGTTAGCCAATGTGTG-3'	lastni
CCHF MORF-HisR	5'-GCCAATGTGTGTTTTGTGG-3'	lastni

3.2.5.1 Pomnoževanje celotnega segmenta S – protokol RT-PCR

Preglednica 2: Reakcijska mešanica za pomnoževanje celotnega segmenta S sevov Hoti oz. AP92
Table 2: Reaction mix for amplification of complete S segments of Hoti and AP92 strains

Reagenti	kol. (µl)
Reakcijski pufer »2x Reaction Mix«	25
Začetni oligonukleotid CCHF-RT (50 µM)	1
Začetni oligonukleotid CCHF-PCR (50 µM)	1
Encimska mešanica »SSIII RT/Platinum® Taq HiFi Mix«	1
Sterilna deionizirana voda (ddH ₂ O)	17
RNA	5
Skupaj	50

Reakcija je potekala v aparatu Mastercycler pro (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) po naslednjem temperaturnem protokolu:

- 1× 50,5 °C 30 min (prepis RNA v cDNA),
- 1× 94 °C 2 min (aktivacija polimeraze Taq),
- 40× 94 °C 30 s (denaturacija), 60 °C 30 s (prileganje začetnih oligonukleotidov), 68 °C 2 min (sinteza),
- 1× 68 °C 5 min (končna sinteza).

Prisotnost pridelkov PCR smo določili z agarozno elektroforezo. Molekule DNA smo ločevali v 2 % agaroznem gelu (agaroz NuSieve GTG, FMC BioProducts, Rockland, ZDA), ki smo ga pripravili v 50 ml 1 x koncentriranega pufru TAE (Tris Acetat EDTA, pH = 8,3).

Pridelke RT-PCR smo shranili pri -20 °C.

3.2.5.2 Pomnoževanje celotnega segmenta M – protokol RT-PCR

Preglednica 3: Reakcijska mešanica za pomnoževanje celotnega segmenta M sevov Hoti oz. AP92
Table 3: Reaction mix for amplification of complete M segments of Hoti and AP92 strains

Reagenti	kol. (µl)
Reakcijski puffer »2x Reaction Mix«	25
MgSO ₄ (5mM)	3
Začetni oligonukleotid CCHF-MF (50 µM)	1
Začetni oligonukleotid CCHF-MR (50 µM)	1
Encimska mešanica »SSIII RT/Platinum Taq HiFi Mix«	1
Sterilna deionizirana voda (ddH ₂ O)	14
RNA	5
Skupaj	50

Reakcija je potekala v aparatu Mastercycler pro (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) po naslednjem temperaturnem protokolu:

- 1× 52,5 °C 30 min (prepis RNA v cDNA),
- 1× 94 °C 2 min (aktivacija polimeraze Taq),
- 40× 94 °C 20 s (denaturacija), 50,5 °C 35 s (prileganje začetnih oligonukleotidov), 68 °C 4 min (sinteza),
- 1× 68 °C 5 min (končna sinteza).

Prisotnost pridelkov PCR smo določili z agarozno elektroforezo. Molekule DNA smo ločevali v 2 % agaroznem gelu (agaroz NuSieve GTG, FMC BioProducts, Rockland, ZDA), ki smo ga pripravili v 50 ml 1 x koncentriranega pufra TAE (Tris Acetat EDTA, pH = 8,3).

Pridelke RT-PCR smo shranili pri -20 °C.

3.2.5.3 Pomnoževanje odprtega bralnega okvirja segmenta S – protokol RT-PCR

Preglednica 4: Reakcijska mešanica za pomnoževanje odprtega bralnega okvirja segmenta S sevov Hoti oz. AP92
Table 4: Reaction mix for amplification of S segment open reading frames of Hoti and AP92 strains

Reagenti	kol. (µl)
Reakcijski pufer »2x Xtreme Buffer«	25
dNTPs (2 mM)	10
Začetni oligonukleotid CCHF-SORF-F (50 µM)	0,5
Začetni oligonukleotid CCHF-SORF-R (50 µM)	0,5
Encimska mešanica »KOD Xtreme Hot Start DNA Polymerase (1U/ul)«	1
Sterilna deionizirana voda (ddH ₂ O)	11
Pridelek PCR	2
Skupaj	50

Preglednica 5: Reakcijska mešanica za pomnoževanje odprtega bralnega okvirja segmenta S sevov Hoti oz. AP92, z dodanim zaporedjem petih histidinov ali peptidom V5
Table 5: Reaction mix for amplification of S segment open reading frames with the addition of V5 and 5×His epitope tags of Hoti and AP92 strains

Reagenti	kol. (µl)
Reakcijski pufer »2x Xtreme Buffer«	25
dNTPs (2 mM)	10
Začetni oligonukleotid CCHF-SORF-F (50 µM)	0,5
Začetni oligonukleotid CCHF-SORF-HisR (50 µM)	0,5
Encimska mešanica »KOD Xtreme Hot Start DNA Polymerase (1U/ul)«	1
Sterilna deionizirana voda (ddH ₂ O)	11
Pridelek PCR	2
Skupaj	50

Reakciji sta potekali v aparatu Mastercycler pro (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) po naslednjem temperaturnem protokolu:

- 1× 94 °C 2 min (aktivacija polimeraze),
- 40× 98 °C 10 s (denaturacija), 50 °C 30 s (prileganje začetnih oligonukleotidov), 68 °C 90 s (sinteza).

Prisotnost pridelkov PCR smo določili z agarozno elektroforezo. Molekule DNA smo ločevali v 2 % agaroznem gelu (agarozna UltraPure, Life Technologies, Carlsbad, ZDA), ki smo ga pripravili v 50 ml 1 x koncentriranega pufru TAE (Tris Acetat EDTA, pH = 8,3).

Pridelke RT-PCR smo shranili pri -20 °C.

3.2.5.4 Pomnoževanje odprtega bralnega okvirja segmenta M – protokol RT-PCR

Preglednica 6: Reakcijska mešanica za pomnoževanje odprtega bralnega okvirja segmenta M sevov Hoti oz. AP92

Table 6: Reaction mix for amplification of M segment open reading frames of Hoti and AP92 strains

Reagenti	kol. (µl)
Reakcijski pufer »2x Xtreme Buffer«	25
dNTPs (2 mM)	10
Začetni oligonukleotid CCHF-MORF-F (50 µM)	0,5
Začetni oligonukleotid CCHF-MORF-R (50 µM)	0,5
Encimska mešanica »KOD Xtreme Hot Start DNA Polymerase (1U/ul)«	1
Sterilna deionizirana voda (ddH ₂ O)	11
Pridelek PCR	2
Skupaj	50

Preglednica 7: Reakcijska mešanica za pomnoževanje odprtega bralnega okvirja segmenta M sevov Hoti oz. AP92, z dodanim zaporedjem petih histidinov ali peptidom V5

Table 7: Reaction mix for amplification of M segment open reading frames with the addition of V5 and 5×His epitope tags of Hoti and AP92 strains

Reagenti	kol. (µl)
Reakcijski pufer »2x Xtreme Buffer«	25
dNTPs (2 mM)	10
Začetni oligonukleotid CCHF-MORF-F (50 µM)	0,5
Začetni oligonukleotid CCHF-MORF-HisR (50 µM)	0,5
Encimska mešanica »KOD Xtreme Hot Start DNA Polymerase (1U/ul)«	1
Sterilna deionizirana voda (ddH ₂ O)	11
Pridelek PCR	2
Skupaj	50

Reakciji sta potekali v aparatu Mastercycler pro (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) po naslednjem temperaturnem protokolu:

- 1× 94 °C 2 min (aktivacija polimeraze),
- 40× 98 °C 10 s (denaturacija), 50 °C 30 s (prileganje začetnih oligonukleotidov), 68 °C 5 min (sinteza).

Prisotnost pridelkov PCR smo določili z agarozno elektroforezo. Molekule DNA smo ločevali v 2 % agaroznem gelu (agaroz UltraPure, Life Technologies, Carlsbad, ZDA), ki smo ga pripravili v 50 ml 1 x koncentriranega pufra TAE (Tris Acetat EDTA, pH = 8,3).

Pridelke RT-PCR smo shranili pri -20 °C.

3.2.6 Čiščenje pridelkov verižne reakcije s polimerazo

Pridelke PCR smo pred kloniranjem morali očistiti nečistoč, ki bi lahko vplivale na učinkovitost kloniranja: preostanek začetnih oligonukleotidov, soli, beljakovin. Za čiščenje pridelkov PCR smo uporabili komplet reagentov WIZARD[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, ZDA), po navodilih proizvajalca. Očiščene pridelke PCR smo nemudoma klonirali v ustrezen vektor in jih nato shranili pri -20 °C.

3.2.7 Kloniranje in transformacija bakterij

Pridelke PCR smo klonirali s kompletom reagentov pcDNA3.1 Directional TOPO Expression Kit (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Komplet reagentov omogoča hitro in enostavno kloniranje pridelkov PCR s topimi konci v ekspresijski vektor pcDNA3.1D/V5-His-TOPO, ki omogoča izražanje rekombinantnih beljakovin v sesalskih celičnih linijah. Kloniranje smo izvedli po navodilih proizvajalca, pri čemer smo uporabili 4 µl pridelka PCR..

Plazmidne konstrukte smo transformirali v kemično kompetentne bakterije vrste *Escherichia coli*; One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Transformacijo smo izvedli po navodilih proizvajalca. Transformante smo nacepili na trdno

gojišče imMedia Growth Medium, agar, ampicilin (Life Technologies, Carlsbad, ZDA) (gojišče z dodanim selekcijskim antibiotikom ampicilin) in jih inkubirali preko noči pri 37 °C. Kolonije bakterij, ki so zrasle preko noči, smo precepili v tekoče gojišče imMedia Growth Medium, liquid, ampicilin (Life Technologies, Carlsbad, ZDA) in jih inkubirali preko noči pri 37 °C s stresanjem.

V naslednjem koraku smo preverili ali bakterijski kloni vsebujejo ustrezne plazmidne vključke. Bakterijske kulture smo preverili z metodo PCR, tako da smo pomnožili ustrezen odprti bralni okvir (v reakciji PCR smo uporabili 2 µl prekonočne kulture namesto pridelka PCR), kot je opisano v poglavjih 0 in 0. Pri bakterijskih kulturah, kjer smo potrdili prisotnost ustreznega vključka smo nadaljevali z osamitvijo plazmidne DNA.

3.2.8 Osamitev in karakterizacija plazmidne DNA

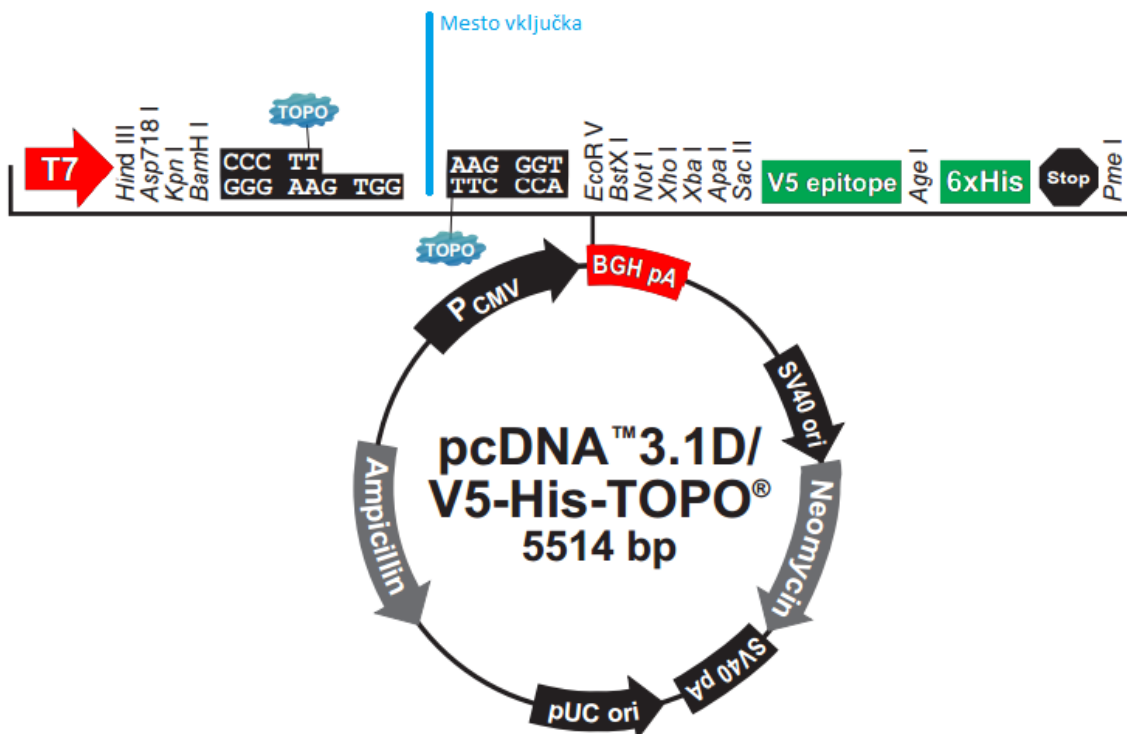
Plazmidno DNA smo osamili v dveh količinskih obsegih, glede na namen: v manjši količini za preverjanje uspešnosti kloniranja in v večji, pri preverjenih plazmidih za namen nadaljnjih poskusov, transfekcije.

V prvi stopnji smo plazmidno DNA osamili iz 2 ml prekonočne kulture, z namenom preverjanja pravilne orientacije vključka v ekspresijski vektor. Plazmidno DNA smo osamili s kompletom reagentov QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija), po navodilih proizvajalca. Pravilno vključitev vključka v ekspresijski vektor smo preverili z določanjem nukleotidnega zaporedja dela plazmidne DNA. Določili smo nukleotidno zaporedje med predeloma kjer se na plazmidni vektor nalegata začetna oligonukleotida T7 in BGH (Slika 10). Postopek določanja nukleotidnega zaporedja je opisan v poglavju 3.2.9.

V drugi stopnji smo plazmidno DNA osamili le iz bakterijskih klonov, pri katerih smo dokazali pravilno orientacijo vključka. V tej stopnji smo osamili večje količine plazmidne DNA, ki smo jo uporabili za nadaljnje poskuse. Plazmidno DNA smo osamili iz 250 ml prekonočne kulture z aparaturo BenchPro 2100 Plasmid Purification System (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Aparatura BenchPro 2100 Plasmid Purification System omogoča hitro in avtomatizirano osamitev velikih količin (do 1 mg), visoko-kakovostne

plazmidne DNA, ki je primerna za transfekcijo. Osamitev smo izvedli po navodilih proizvajalca. Plazmidne DNA seva IbAr10200, kot tudi plazmid p125-luc smo namnožili s storitvijo GeneArt Plasmid Services (Life Technologies, Carlsbad, ZDA), ki omogoča komercialno obogatitev plazmidne DNA v velikih količinah (1 mg) in visoke kakovosti, primerne za transfekcijo. Vse plazmidne DNA smo ponovno preverili z metodo določanja nukleotidnega zaporedja, kot je opisano v poglavju 3.2.9.

Koncentracijo plazmidne DNA smo preverili s kompletom reagentov Qubit dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, ZDA) in fluorometrom Qubit (Life Technologies, Carlsbad, ZDA) po navodilih proizvajalca. Vse plazmidne DNA smo nato umerili oz. poenotili na koncentracijo 500 ng/ μ l: pri preveč koncentriranih plazmidnih DNA smo dodali ustrezno količino sterilne, deionizirane vode, premalo koncentrirane vzorce pa smo koncentrirali v vakuumski centrifugi Savant SpeedVac ISS110 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA).



Slika 10: Shematski prikaz ekspresijskega vektorja pcDNA3.1D/V5-His-TOPO (Invitrogen, 2010). Na sliki je prikazano mesto, kjer smo vključili odprte bralne okvirje virusa KKH (Mesto vključka). Z rdečo barvo so označeni mesti vezave začetnih oligonukleotidov T7 in BGH, ki smo ju uporabili za preverjanje

uspešnosti kloniranja z metodo določanja nukleotidnega zaporedja. Z zeleno barvo sta označeni zaporedji peptidov V5 in 6xHis

3.2.9 Določanje nukleotidnega zaporedja

Nukleotidno zaporedje smo določali z namenom potrditve uspešnosti kloniranja tarčnih vključkov. Nukleotidna zaporedja smo določali v štirih korakih: sekvenčna reakcija, čiščenje sekvenčne reakcije, kapilarna elektroforeza in analiza nukleotidnih zaporedij..

3.2.9.1 Sekvenčna reakcija

Reakcijo za določanje nukleotidnega zaporedja (sekvenčno reakcijo) smo izvedli s kompletom reagentov BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Sekvenčno reakcijo smo izvedli ločeno za vsak začetni oligonukleotid. V spodnji preglednici je prikazana sestava reakcijske mešanice, sekvenčne reakcije (Preglednica 8).

Preglednica 8: Reakcijska mešanica za sekvenčno reakcijo
Table 8: Sequencing reaction mix

Reagenti	kol. (µl)
Začetni oligonukleotid* (20 µM)	1,3
Encimska mešanica »BigDye Terminator v3.1«	8
Sterilna deionizirana voda (ddH ₂ O)	5,7
Plazmidna DNA	5
Skupaj	20

*uporabili smo bodisi začetni oligonukleotid T7, bodisi začetni oligonukleotid BGH (Life Technologies, Carlsbad, ZDA)

Reakcija je potekala v aparatu Veriti (Life Technologies, Carlsbad, ZDA) po naslednjem temperaturnem protokolu:

- 25× 96 °C 10 s (denaturacija), 50 °C 5 s (prileganje začetnih oligonukleotidov), 60 °C 4 min (sinteza).

Po končani sekvenčni reakciji smo nadaljevali s čiščenjem le-te oz. smo pridelke sekvenčne reakcije shranili v temi, pri 4 °C največ tri dni.

3.2.9.2 Čiščenje sekvenčne reakcije

Sekvenčne reakcije smo pred kapilarno elektroforezo očistili odvečnih začetnih oligonukleotidov, preostalih nukleotidov, soli in beljakovin. Pridelke sekvenčne reakcije smo očistili s kompletom reagentov BigDye XTerminator (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Omenjeni komplet omogoča hitro in enostavno očiščenje sekvenčnih reakcij. Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije smo izvedli po navodilih proizvajalca. Očiščene pridelke sekvenčne reakcije smo shranili v temi, pri 4 °C največ 7 dni.

3.2.9.3 Kapilarna elektroforeza

Sekvenčne reakcije smo analizirali s kapilarno elektroforezo, z aparaturo 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, ZDA).

3.2.9.4 Analiza nukleotidnih zaporedij

Nukleotidna zaporedja smo analizirali v programskem okolju CLC Main Workbench (CLCBio, 2011). Nukleotidna zaporedja smo poravnali glede na *in silico* pripravljene vključke tarčnih zaporedij in ekspresijskih vektorjev. Nukleotidna zaporedja smo preverili tudi z orodjem BLAST (NCBI, 2013).

3.3 TRANSFEKCIJA

Transfekcija označuje postopek, s katerim vnesemo DNA v (evkariontske) celice, v našem primeru, celice človeških embrionalnih celic tipa HEK 293T/17. V celično linijo smo hkrati vnesli različne kombinacije poročevalnih, kontrolnih in ekspresijskih plazmidov. Z vnosom ekspresijskih plazmidov smo omogočili izražanje virusnih beljakovin v celični liniji.

Poročevalni plazmidi, z zapisi izbranih regulatornih regij, so omogočili spremljanje aktivnosti le-teh, glede na nivo izražanja luciferaze, ki je prav tako zapisana na poročevalnih plazmidih. S kontrolnim plazmidom smo nadzirali učinkovitost transfekcije.

Za namen naših raziskav smo uporabili kemično transfekcijo s kompletoma reagentov Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, ZDA) in FuGene 6 (Promega, Madison, ZDA). Transfekcijo smo izvajali v ploščicah z 12 vdolbinicami. Vse poskuse smo izvedli v najmanj 3-kratnih ponovitvah. V vsako vdolbinico smo 24 ur pred transfekcijo nacepili 2×10^5 celic. S tem smo omogočili približno 80 % konfluentnost rasti ob transfekciji.

3.3.1 Uspešnost izražanja virusnih beljakovin

V prvi stopnji smo želeli preveriti uspešnost izražanja virusnih beljakovin, zapisanih na ekspresijskih plazmidih. Preverili smo uspešnost izražanje vseh ekspresijskih plazmidov. Uporabili smo komplet reagentov Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). V reakcijsko (transfekcijsko) mešanico smo dodali po 1 μ g plazmidne DNA in 4 μ l reagenta. Transfekcijo smo izvedli po navodilih proizvajalca. Po 24 urah inkubacije pri 37 °C smo nadaljevali z analizo beljakovin po Westernu, ki je opisana v poglavju 3.4.

V sledečih poskusih smo s hkratnim izražanjem virusnih, ekspresijskih plazmidov, poročevalnih plazmidov in kontrolnega plazmida, želeli določiti vpliv virusnih beljakovin na aktivnost regulatornih regij, zapisanih na poročevalnih plazmidih.

3.3.2 Vpliv segmenta S, sevov virusa KKHM na aktivnost promotorja za interferon beta

V prvi stopnji smo želeli preveriti vpliv virusne beljakovine N zapisane na segmentu S virusnega genoma, vseh treh sevov virusa KKHM, na aktivnost promotorja za interferon beta. Transfekcijo smo izvedli s kompletom reagentov Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, ZDA), po navodilih proizvajalca, pri čemer smo uporabili količine plazmidne DNA

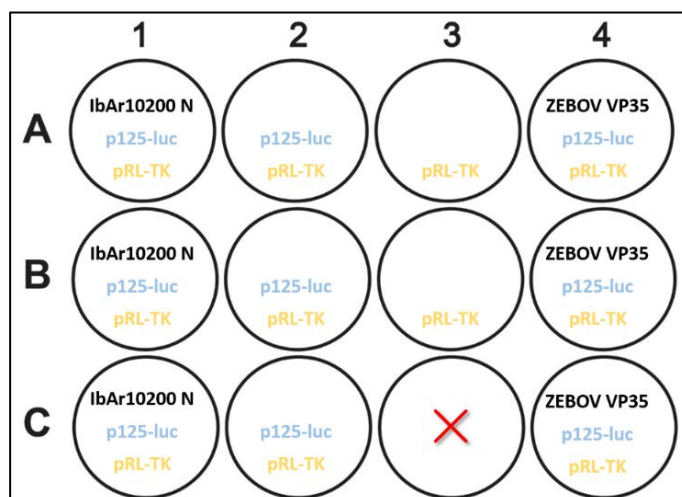
prikazane v preglednici (Preglednica 9) in 4 µl reagenta na vdolbinico. Komplekse reagenta in DNA smo pripravili v gojišču Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Life Technologies, Carlsbad, ZDA).

Preglednica 9: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmenta S virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost promotorja za interferon beta

Table 9: Quantity of plasmid DNA per well used for transfection experiments, with the aim of determining the influence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus S segment on the interferon beta promoter activity

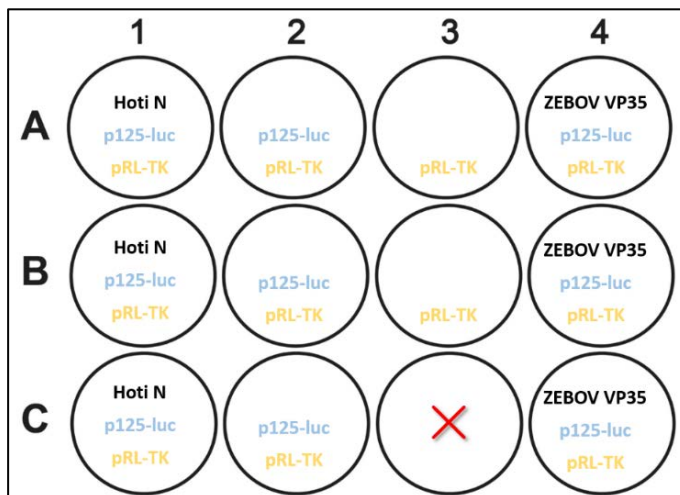
Plazmid	Količina plazmidne DNA
pCAGGS N (sev IbAr10200)	1000 ng
pcDNA3.1 Hoti N (sev Hoti)	1000 ng
pcDNA3.1 AP92 N (sev AP92)	1000 ng
pCAGGS ZEBOV VP35 (pozitivna kontrola)	1000 ng
p125-luc (poročevalni plazmid)	1000 ng
pRL-TK (kontrolni plazmid)	100 ng

Rezultate transfekcije smo analizirali po 24 urah. Sheme poskusov so prikazane na slikah 11-13.



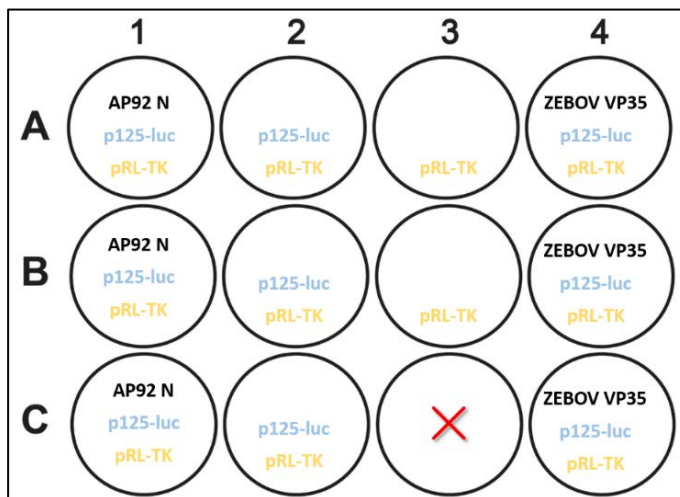
Slika 11: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbinicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva IbAr10200, na aktivnost promotorja interferona beta. »X« ponazarja vdolbinico, ki smo jo uporabili kot negativno kontrolo, kjer smo dodali le kompleks reagenta in gojišča

Figure 11: Layout of transfection experiments in 12 well plates, for determination of the influence of strain IbAr10200 N protein on the activity of the interferon beta promoter. »X« denotes a negative control well, where we only added the reagent and medium



Slika 12: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbinicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva Hoti, na aktivnost promotorja interferona beta. X« ponazarja vdolbinico, ki smo jo uporabili kot negativno kontrolo, kjer smo dodali le kompleks reagenta in gojišča

Figure 12: Layout of transfection experiments in 12 well plates, for determination of the influence of strain Hoti N protein on the activity of the interferon beta promoter. »X« denotes a negative control well, where we only added the reagent and medium



Slika 13: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbinicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva AP92, na aktivnost promotorja interferona beta. »X« ponazarja vdolbinico, ki smo jo uporabili kot negativno kontrolo, kjer smo dodali le kompleks reagenta in gojišča

Figure 13: Layout of transfection experiments in 12 well plates, for determination of the influence of strain AP92 N protein on the activity of the interferon beta promoter. »X« denotes a negative control well, where we only added the reagent and medium

3.3.3 Vpliv segmenta S, sevov virusa KKHM na aktivnost elementa ISRE

V drugi stopnji smo želeli preveriti vpliv virusne beljakovine N zapisane na segmentu S virusnega genoma, vseh treh sevov virusa KKHM, na aktivnost elementa ISRE.

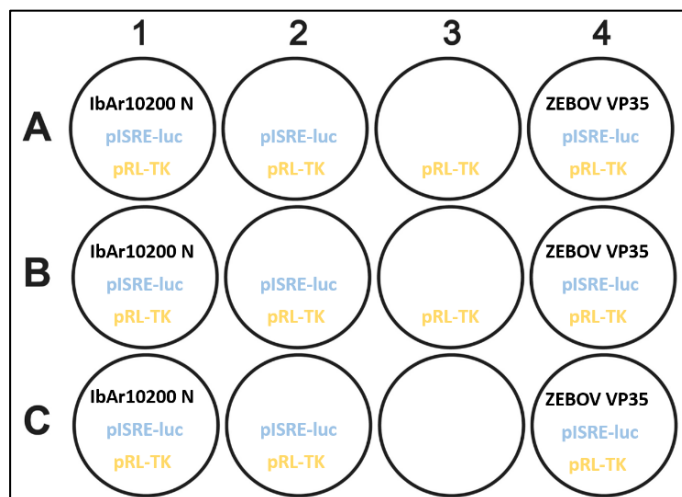
Transfekcijo smo izvedli s kompletom reagentov FuGene 6 (Promega, Madison, ZDA), po navodilih proizvajalca, pri čemer smo uporabili količine plazmidne DNA prikazane v preglednici 10 in 3 μ l reagenta na vdolbinico.

Preglednica 10: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmenta S virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost s strani interferonov stimuliranega odzivnega elementa ISRE

Table 10: Quantity of plasmid DNA per well used for transfection experiments, with the aim of determining the influence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus S segment on the interferon-stimulated response element ISRE

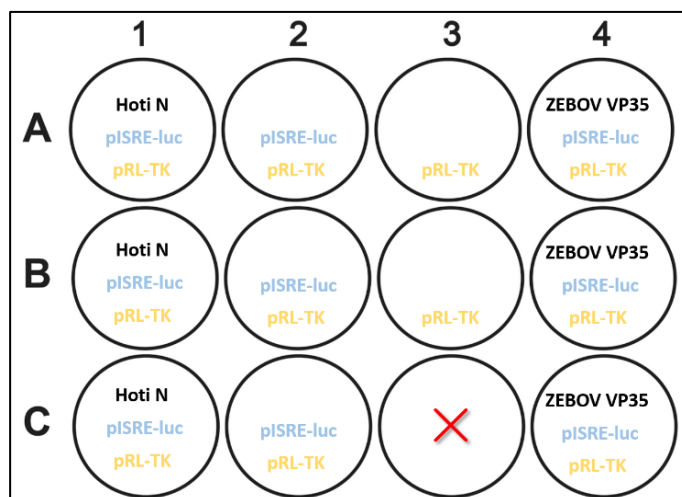
Plazmid	Količina plazmidne DNA
pCAGGS N (sev IbAr10200)	1000 ng
pcDNA3.1 Hoti N (sev Hoti)	1000 ng
pcDNA3.1 AP92 N (sev AP92)	1000 ng
pCAGGS ZEBOV VP35 (pozitivna kontrola)	1000 ng
pISRE-luc (poročevalni plazmid)	1000 ng
pRL-TK (kontrolni plazmid)	100 ng

Komplekse reagenta in DNA smo pripravili v gojišču Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Po 24-urni inkubaciji smo dodali 10 μ g/ml rekombinantnega, človeškega interferona beta (Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA), s katerim smo aktivirali element ISRE. Rezultate transfekcije smo analizirali po nadaljnjih 6-8 urah. Sheme poskusov so prikazane na slikah 14-16.



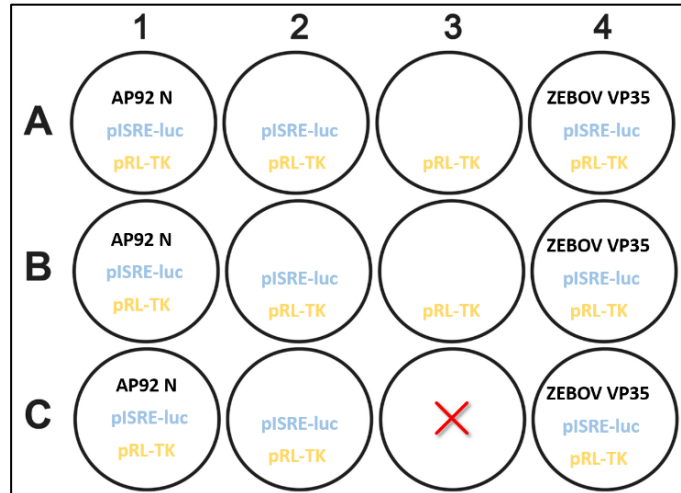
Slika 14: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbinicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva IbAr10200, na aktivnost s strani interferonov stimuliranega odzivnega elementa. »X« ponazarja vdolbinico, ki smo jo uporabili kot negativno kontrolo, kjer smo dodali le kompleks reagenta in gojišča

Figure 14: Layout of transfection experiments in 12 well plates, for determination of the influence of strain IbAr10200 N protein on the activity of the interferon-stimulated response element. »X« denotes a negative control well, where we only added the reagent and medium



Slika 15: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbinicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva Hoti, na aktivnost s strani interferonov stimuliranega odzivnega elementa. »X« ponazarja vdolbinico, ki smo jo uporabili kot negativno kontrolo, kjer smo dodali le kompleks reagenta in gojišča

Figure 15: Layout of transfection experiments in 12 well plates, for determination of the influence of strain Hoti N protein on the activity of the interferon-stimulated response element. »X« denotes a negative control well, where we only added the reagent and medium



Slika 16: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbinicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva AP92, na aktivnost s strani interferonov stimuliranega odzivnega elementa. »X« ponazarja vdolbinico, ki smo jo uporabili kot negativno kontrolo, kjer smo dodali le kompleks reagenta in gojišča
Figure 16: Layout of transfection experiments in 12 well plates, for determination of the influence of strain AP92 N protein on the activity of the interferon-stimulated response element. »X« denotes a negative control well, where we only added the reagent and medium

3.3.4 Vpliv segmenta S, sevov virusa KKHM na aktivnost elementa GAS

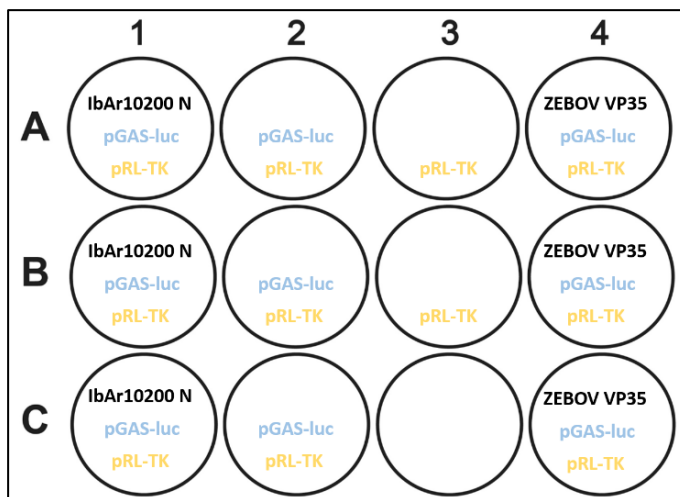
V tej stopnji smo želeli preveriti vpliv virusne beljakovine N zapisane na segmentu S virusnega genoma, vseh treh sevov virusa KKHM, na aktivnost elementa GAS.

Transfekcijo smo izvedli s kompletom reagentov FuGene 6 (Promega, Madison, ZDA), po navodilih proizvajalca, pri čemer smo uporabili količine plazmidne DNA prikazane v preglednici 11 in 3 μ l reagenta na vdolbinico. Komplekse reagenta in DNA smo pripravili v gojišču Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Po 24-urni inkubaciji smo dodali 10 μ g/ml poli-inozinske, poli-citidilinske kisline (pI:pC)(Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA). Rezultate transfekcije smo analizirali po nadaljnjih 6-8 urah. Sheme poskusov so prikazane na slikah 17-19.

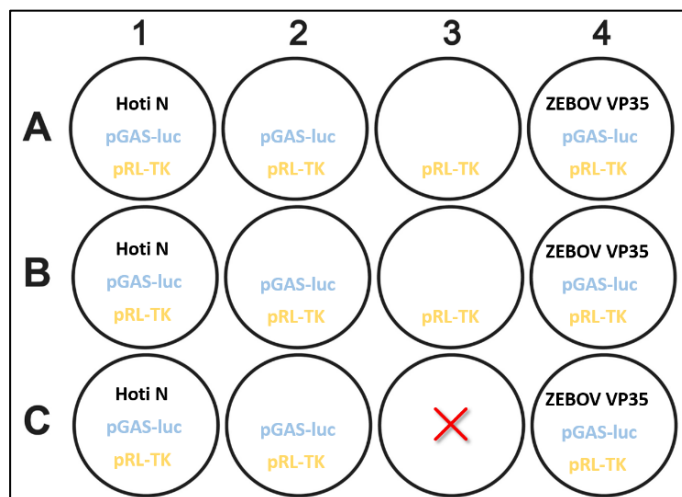
Preglednica 11: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmenta S virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost s strani interferona gama stimuliranega elementa GAS

Table 11: Quantity of plasmid DNA per well used for transfection experiments, with the aim of determining the influence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus S segment on the interferon-gamma activation sequence GAS

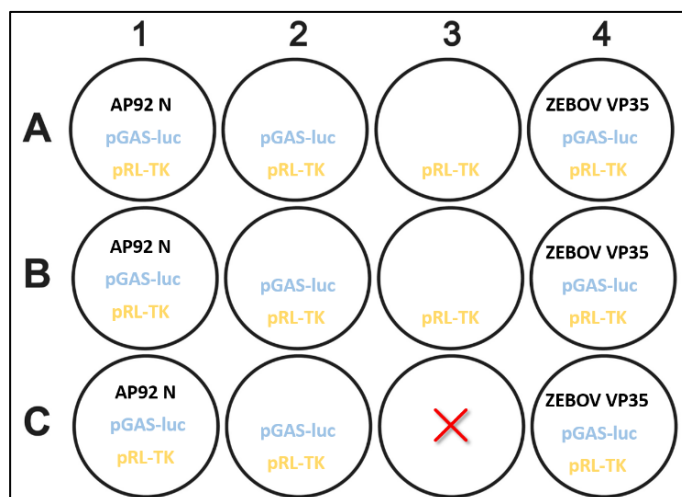
Plazmid	Količina plazmidne DNA
pCAGGS N (sev IbAr10200)	1000 ng
pcDNA3.1 Hoti N (sev Hoti)	1000 ng
pcDNA3.1 AP92 N (sev AP92)	1000 ng
pCAGGS ZEBOV VP35 (pozitivna kontrola)	1000 ng
pGAS-luc (poročevalni plazmid)	1000 ng
pRL-TK (kontrolni plazmid)	100 ng



Slika 17: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbinicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva IbAr10200, na aktivnost promotorja genov, ki so stimulirani s strani interferona gama. »X« ponazarja vdolbinico, ki smo jo uporabili kot negativno kontrolo, kjer smo dodali le kompleks reagenta in gojišča
 Figure 17: Layout of transfection experiments in 12 well plates, for determination of the influence of strain IbAr10200 N protein on the activity of the interferon-gamma activation sequence promoter. »X« denotes a negative control well, where we only added the reagent and medium



Slika 18: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbinicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva Hoti, na aktivnost promotorja genov, ki so stimulirani s strani interferona gama. »X« ponazarja vdolbinico, ki smo jo uporabili kot negativno kontrolo, kjer smo dodali le kompleks reagenta in gojišča
Figure 18: Layout of transfection experiments in 12 well plates, for determination of the influence of strain Hoti N protein on the activity of the interferon-gamma activation sequence promoter. »X« denotes a negative control well, where we only added the reagent and medium



Slika 19: Shema transfekcij v ploščici z 12 vdolbinicami, s katerimi smo želeli določiti vpliv beljakovine N, seva AP92, na aktivnost promotorja genov, ki so stimulirani s strani interferona gama. »X« ponazarja vdolbinico, ki smo jo uporabili kot negativno kontrolo, kjer smo dodali le kompleks reagenta in gojišča
Figure 19: Layout of transfection experiments in 12 well plates, for determination of the influence of strain AP92 N protein on the activity of the interferon-gamma activation sequence promoter. »X« denotes a negative control well, where we only added the reagent and medium

3.3.5 Vpliv segmenta M, sevov virusa KKH M na aktivnost promotorja za interferon beta

V tej stopnji smo želeli preveriti vpliv virusnih beljakovin zapisanih na segmentu M virusnega genoma, vseh treh sevov virusa KKH M, na aktivnost promotorja za interferon beta.

Transfekcijo smo izvedli s kompletom reagentov FuGene 6 (Promega, Madison, ZDA), po navodilih proizvajalca, pri čemer smo uporabili količine plazmidne DNA prikazane v preglednici 12 in 3 μ l reagenta na vdolbinico. Komplekse reagenta in DNA smo pripravili v gojišču Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Rezultate transfekcije smo analizirali po 24 urah. Sheme poskusov so enake kot pri 3.3.2, le da smo zamenjali ekspresijski plazmid. Pri virusnem sevu IbAr10200 smo uporabili le ekspresijski plazmid pCAGGS MCo, saj je bila ekspresija beljakovin pri tem največja.

Preglednica 12: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmenta M virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost promotorja za interferon beta

Table 12: Quantity of plasmid DNA per well used for transfection experiments, with the aim of determining the influence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus M segment on the interferon beta promoter activity

Plazmid	Količina plazmidne DNA
pCAGGS MCo (sev IbAr10200)	1000 ng
pcDNA3.1 Hoti M (sev Hoti)	1000 ng
pcDNA3.1 AP92 M (sev AP92)	1000 ng
pCAGGS ZEBOV VP35 (pozitivna kontrola)	1000 ng
p125-luc (poročevalni plazmid)	1000 ng
pRL-TK (kontrolni plazmid)	100 ng

3.3.6 Vpliv segmenta M, sevov virusa KKH M na aktivnost elementa ISRE

V tej stopnji smo želeli preveriti vpliv virusnih beljakovin zapisanih na segmentu M virusnega genoma, vseh treh sevov virusa KKH M, na aktivnost elementa ISRE.

Transfekcijo smo izvedli s kompletom reagentov FuGene 6 (Promega, Madison, ZDA), po navodilih proizvajalca, pri čemer smo uporabili količine plazmidne DNA prikazane v

preglednici 13 in 3 μ l reagenta na vdolbinico. Komplekse reagenta in DNA smo pripravili v gojišču Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Po 24-urni inkubaciji smo dodali 10 μ g/ml rekombinantnega, človeškega interferona beta (Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA), s katerim smo aktivirali element ISRE. Rezultate transfekcije smo analizirali po nadaljnjih 6-8 urah. Sheme poskusov so enake kot pri 3.3.3, le da smo zamenjali ekspresijski plazmid.

Preglednica 13: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmenta M virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost s strani interferonov stimuliranega odzivnega elementa ISRE

Table 3: Quantity of plasmid DNA per well used for transfection experiments, with the aim of determining the influence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus M segment on interferon-stimulated response element activity

Plazmid	Količina plazmidne DNA
pCAGGS MCo (sev IbAr10200)	1000 ng
pcDNA3.1 Hoti M (sev Hoti)	1000 ng
pcDNA3.1 AP92 M (sev AP92)	1000 ng
pCAGGS ZEBOV VP35 (pozitivna kontrola)	1000 ng
pISRE-luc (poročevalni plazmid)	1000 ng
pRL-TK (kontrolni plazmid)	100 ng

3.3.7 Vpliv segmenta M, sevov virusa KKHM na aktivnost elementa GAS

V tej stopnji smo želeli preveriti vpliv virusnih beljakovin zapisanih na segmentu M virusnega genoma, vseh treh sevov virusa KKHM, na aktivnost elementa GAS.

Transfekcijo smo izvedli s kompletom reagentov FuGene 6 (Promega, Madison, ZDA), po navodilih proizvajalca, pri čemer smo uporabili količine plazmidne DNA prikazane v preglednici 14 in 3 μ l reagenta na vdolbinico. Komplekse reagenta in DNA smo pripravili v gojišču Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Po 24-urni inkubaciji smo dodali 10 μ g/ml pI:pC (Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA). Rezultate transfekcije smo analizirali po nadaljnjih 6-8 urah. Sheme poskusov so enake kot pri 3.3.4, le da smo zamenjali ekspresijski plazmid.

Preglednica 14: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmenta S virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost s strani interferona gama stimuliranega elementa GAS

Table 14: Quantity of plasmid DNA per well used for transfection experiments, with the aim of determining the influence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus M segment on the interferon-gamma activation sequence GAS activity

Plazmid	Količina plazmidne DNA
pCAGGS MCo (sev IbAr10200)	1000 ng
pcDNA3.1 Hoti M (sev Hoti)	1000 ng
pcDNA3.1 AP92 M (sev AP92)	1000 ng
pCAGGS ZEBOV VP35 (pozitivna kontrola)	1000 ng
pGAS-luc (poročevalni plazmid)	1000 ng
pRL-TK (kontrolni plazmid)	100 ng

3.3.8 Skupni vpliv segmentov S in M, sevov virusa KKHM na aktivnost promotorja za interferon beta

V tej stopnji smo želeli preveriti skupni vpliv virusnih beljakovin zapisanih na segmentih S in M virusnega genoma, vseh treh sevov virusa KKHM, na aktivnost promotorja za interferon beta.

Transfekcijo smo izvedli s kompletom reagentov FuGene 6 (Promega, Madison, ZDA), po navodilih proizvajalca, pri čemer smo uporabili količine plazmidne DNA prikazane v preglednici 15 in 3 µl reagenta na vdolbinico. Komplekse reagenta in DNA smo pripravili v gojišču Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Rezultate transfekcije smo analizirali po 24 urah. Sheme poskusov so enake kot pri 3.3.2, le da smo poleg ekspresijskega plazmida, ki je nosil zapis za beljakovino N dodali še ekspresijski plazmid, ki je nosil zapis za odprti bralni okvir segmenta M, istega virusnega seva.

Preglednica 15: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmentov S in M virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost promotora za interferon beta

Table 15: Quantity of plasmid DNA per well used for transfection experiments, with the aim of determining the influence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus S and M segments on the interferon beta promoter activity

Plazmid	Količina plazmidne DNA
pCAGGS N (sev IbAr10200)	1000 ng
pcDNA3.1 Hoti N (sev Hoti)	1000 ng
pcDNA3.1 AP92 N (sev AP92)	1000 ng
pCAGGS MCo (sev IbAr10200)	1000 ng
pcDNA3.1 Hoti M (sev Hoti)	1000 ng
pcDNA3.1 AP92 M (sev AP92)	1000 ng
pCAGGS ZEBOV VP35 (pozitivna kontrola)	1000 ng
p125-luc (poročevalni plazmid)	1000 ng
pRL-TK (kontrolni plazmid)	100 ng

3.3.9 Skupni vpliv segmentov S in M, sevov virusa KKH na aktivnost elementa ISRE

V tej stopnji smo želeli preveriti skupni vpliv virusnih beljakovin zapisanih na segmentih S in M virusnega genoma, vseh treh sevov virusa KKH, na aktivnost elementa ISRE.

Transfekcijo smo izvedli s kompletom reagentov FuGene 6 (Promega, Madison, ZDA), po navodilih proizvajalca, pri čemer smo uporabili količine plazmidne DNA prikazane v preglednici 16 in 3 μ l reagenta na vdolbinico. Komplekse reagenta in DNA smo pripravili v gojišču Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Po 24-urni inkubaciji smo dodali 10 μ g/ml rekombinantnega, človeškega interferona beta (Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA), s katerim smo aktivirali element ISRE. Rezultate transfekcije smo analizirali po nadaljnjih 6-8 urah. Sheme poskusov so enake kot pri 3.3.3, le da smo poleg ekspresijskega plazmida, ki je nosil zapis za beljakovino N dodali še ekspresijski plazmid, ki je nosil zapis za odprti bralni okvir segmenta M, istega virusnega seva.

Preglednica 16: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmentov S in M virusa krmsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost s strani interferonov stimuliranega odzivnega elementa ISRE

Table 3: Quantity of plasmid DNA per well used for transfection experiments, with the aim of determining the influence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus S and M segments on interferon-stimulated response element activity

Plazmid	Količina plazmidne DNA
pCAGGS N (sev IbAr10200)	1000 ng
pcDNA3.1 Hoti N (sev Hoti)	1000 ng
pcDNA3.1 AP92 N (sev AP92)	1000 ng
pCAGGS MCo (sev IbAr10200)	1000 ng
pcDNA3.1 Hoti M (sev Hoti)	1000 ng
pcDNA3.1 AP92 M (sev AP92)	1000 ng
pCAGGS ZEBOV VP35 (pozitivna kontrola)	1000 ng
pISRE-luc (poročevalni plazmid)	1000 ng
pRL-TK (kontrolni plazmid)	100 ng

3.3.10 Skupni vpliv segmentov S in M, sevov virusa KKH na aktivnost elementa GAS

V tej stopnji smo želeli preveriti skupni vpliv virusnih beljakovin zapisanih na segmentih S in M virusnega genoma, vseh treh sevov virusa KKH, na aktivnost elementa GAS.

Transfekcijo smo izvedli s kompletom reagentov FuGene 6 (Promega, Madison, ZDA), po navodilih proizvajalca, pri čemer smo uporabili količine plazmidne DNA prikazane v preglednici 17 in 3 μ l reagenta na vdolbinico. Komplekse reagenta in DNA smo pripravili v gojišču Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Life Technologies, Carlsbad, ZDA) Po 24-urni inkubaciji smo dodali 10 μ g/ml pI:pC (Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA). Rezultate transfekcije smo analizirali po nadaljnjih 6-8 urah. Sheme poskusov so enake kot pri 3.3.4, le da smo poleg ekspresijskega plazmida, ki je nosil zapis za beljakovino N dodali še ekspresijski plazmid, ki je nosil zapis za odprti bralni okvir segmenta M, istega virusnega seva.

Preglednica 17: Količine plazmidnih DNA na eno vdolbinico, ki smo jih uporabili za transfekcije, z namenom določanja vpliva segmentov S in M virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice na aktivnost s strani interferona gama stimuliranega elementa GAS

Table 14: Quantity of plasmid DNA per well used for transfection experiments, with the aim of determining the influence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus S and M segments on the interferon-gamma activation sequence GAS activity

Plazmid	Količina plazmidne DNA
pCAGGS N (sev IbAr10200)	1000 ng
pcDNA3.1 Hoti N (sev Hoti)	1000 ng
pcDNA3.1 AP92 N (sev AP92)	1000 ng
pCAGGS MCo (sev IbAr10200)	1000 ng
pcDNA3.1 Hoti M (sev Hoti)	1000 ng
pcDNA3.1 AP92 M (sev AP92)	1000 ng
pCAGGS ZEBOV VP35 (pozitivna kontrola)	1000 ng
pGAS-luc (poročevalni plazmid)	1000 ng
pRL-TK (kontrolni plazmid)	100 ng

3.4 ANALIZA BELJAKOVIN PO WESTERNU

Po transfekciji smo preverili stopnjo izražanja virusnih beljakovin. Stopnjo izražanja beljakovin smo preverili z metodo po Westernu. Najprej smo vsako vdolbinico dvakrat sprali s 500 µl sterilnega fosfatnega pufra (137 mM NaCl, 2,7 mM, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH=7,4). V vsako vdolbinico smo nato nanesti 250 µl pufra za lizo »Passive lysis buffer«, ki je vključen v kompletu reagentov Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, ZDA) in inkubirali 15 min s stresanjem. Po koncu lize, smo 90 µl prenesli v sterilne mikrocentrifugirke in jih ustrezno označili. K vsakemu vzorcu smo dodali 30 µl pufra NuPAGE® LDS Sample Buffer (Life Technologies, Carlsbad, ZDA) in vzorce denaturirali 10 min pri 70 °C.

Beljakovine smo ločili s SDS poliakrilamidno elektroforezo. Uporabili smo komercialno dostopne, pripravljene 3 % SDS poliakrilamidne gele »NuPAGE® Tris-Acetate Gel« (Life Technologies, Carlsbad, ZDA) in jih uporabili v sistemu »XCell SureLock® Mini-Cell« (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Poleg denaturiranih vzorcev smo na gele nanesti tudi beljakovinski lestvici, ki sta omogočili oceno velikosti beljakovin na gelu: MagicMark XP

Western Protein Standard in SeeBlue Plus2 Pre.Stained protein Standard (Life Technologies, Carlsbad, ZDA).

Po končani elektroforezi smo poliakrilamidne gele sprali s sterilno deionizirano vodo in izvedli prenos po Westernu, na nitrocelulozne membrane, s kompletom reagentov iBlot® Transfer Stack, Nitrocellulose Membrane (Life Technologies, Carlsbad, ZDA) in aparaturo iBlot® Gel Transfer Device (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Omenjen sistem omogoča enostaven prenos beljakovin iz poliakrilamidnih gelov na nitrocelulozne membrane, v sedmih minutah. Prenos smo izvedli po navodilih proizvajalca.

Nitrocelulozne membrane smo po prenosu beljakovin iz poliakrilamidnih gelov, sprali s sterilno deionizirano vodo in takoj nadaljevali z detekcijo beljakovin, s poliklonskimi ali monoklonskimi protitelesi.

Virusno beljakovino N, smo dokazovali s poliklonskimi protitelesi v hiper-imuni mišji peritonealni tekočini HMAF (angl. hyperimmune mouse ascitic fluids), ki so jo dobili po okužbi miši z virusom KKHM. Virusno beljakovino smo dokazovali tudi z monoklonskim protitelesom proti virusni beljakovini N, Anti-N 9d5-1-1a, ki smo ga dobili od dr. Connie Schmaljohn iz inštituta U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Ft. Detrick, ZDA. Virusne beljakovine na segmentu M, smo dokazovali s poliklonskimi protitelesi v HMAF. Virusne beljakovine, katerim smo dodali signalni epitop V5 smo dokazovali z monoklonskimi protitelesi V5 Mouse Monoclonal Antibody (Life Technologies, Carlsbad, ZDA).

Primarna protitelesa specifična proti virusu KKHM (poliklonska ali monoklonska) smo redčili v razmerju 1:1000 v fosfatnem pufru z dodanim 5 % mlekom v prahu in 0,05 % TWEEN (Pomurske mlekarne, Murska Sobota, Slovenija). Primarna protitelesa pri epitopu V5, smo redčili v razmerju 1:5000 v fosfatnem pufru z dodanim 5 % mlekom v prahu in 0,05 % TWEEN (Pomurske mlekarne, Murska Sobota, Slovenija). Nitrocelulozne membrane smo inkubirali s primarnimi protitelesi eno uro, z rahlim stresanjem. Po končani inkubaciji smo membrane spirali 3-krat po 5 minut v pufru za spiranje, »Antibody wash«, ki smo ga dobili v kompletu reagentov WesternBreeze Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Nato smo na nitrocelulozne membrane dodali sekundarna

protitelesa, tj. protitelesa specifična proti mišjim protitelesom, z dodanim encimom alkalna fosfataza, ki smo jih dobili v istem kompletu reagentov in inkubirali eno uro z rahlim stresanjem. Po končani inkubaciji smo membrane spirali 3-kart po 5 minut v pufru za spiranje. Po končanem spiranju smo membrane sprali še v sterilni deionizirani vodi. V zadnjem koraku smo na membrane nanegli 10 ml substrata encima alkalne fosfataze, BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolil-fosfat)/NBT (nitri modri tetrazolijev klorid), ki smo ga dobili v kompletu reagentov WesternBreeze Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Po 30 minutah, smo membrane sprali s sterilno deionizirano vodo in s tem zaustavili reakcijo. Prisotnost beljakovin smo pregledali s prostim očesom (beljakovine so bile vidne kot modro-vijolične proge na nitrocelulozni membrani) in membrane posneli z optičnim čitalcem (Hewlett-Packard, Palo Alto, ZDA).

3.5 MERJENJE AKTIVNOSTI LUCIFERAZE

S transfekcijo poročevalnih plazmidov, ki nosijo zapis za luciferazo, smo omogočili spremljanje aktivnosti izbranih regulatornih genskih zaporedij. Aktivirana regulatorna zaporedja namreč omogočijo prepisovanje in posledično prevajanje gena za luciferazo. Stopnjo izražanja luciferaze smo preverili z dodatkom ustreznega substrata glede na tip luciferaze. Aktivnost luciferaze smo merili s kompletom reagentov Dual-Luciferase reporter assay system (Promega, Madison, ZDA), ki omogoča enostavno, zaporedno merjenje aktivnosti dveh luciferaz (luciferaza kresnice *Photinus pyralis*, katere zapis nosijo poročevalni plazmidi in luciferaza meduze vrste *Renilla reniformis*, katere zapis nosi kontrolni plazmid). Aktivnost luciferaze smo izmerili v 20 µl lizata celičnih kultur, 24 ur po transfekciji, z aparatom Synergy II Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, ZDA). Pripravo lizata smo opisali v poglavju 3.4.

Pri analizi rezultatov smo posameznim vrednostim odšteli vrednost negativne kontrole, s čimer smo se znebili ti. ozadja. Vrednosti luminiscence luciferaze kresnice *Photinus pyralis* (poročevalnih plazmidov), smo normalizirali glede na vrednosti luminiscence luciferaze meduze vrste *Renilla reniformis* (kontrolnih plazmidov). S tem smo omogočili primerljivost

posameznih poskusov in zmanjšali vpliv variabilnosti, ki nastane zaradi različne učinkovitosti posameznih transfekcij. Vse poskuse smo izvedli v treh ponovitvah. Končne rezultate smo podali kot povprečno stopnjo aktivacije in standarnim odklonom stopnje aktivacije: razmerje med stopnjo normalizirane luminiscence ob prisotnosti ekspresijskih plazmidov in povprečno normalizirano luminiscenco poročevalnih plazmidov ob odsotnosti ekspresijskih plazmidov. Formula izračuna normalizirane luminiscence (lum_{norm}) je prikazana v formuli (1). Formula izračuna stopnje aktivacije (SA) je prikazana v formuli (2) (Promega, 2011).

$$lum_{norm} = \frac{lum_{poročevalni\ plazmid} - lum_{negativna\ kontrola}}{lum_{kontrolni\ plazmid} - lum_{negativna\ kontrola}} \quad \dots(1)$$

$$SA = \frac{lum_{norm}(eksp.)}{lum_{norm}(brez\ eksp.)} \quad \dots(2)$$

Legenda:

lum = vrednost luminiscence (RLU, iz angl.: relative luminiscence units)

eksp. = prisotnost ekspresijskih plazmidov

brez. eksp = odsotnost ekspresijskih plazmidov

4 REZULTATI

4.1 IZDELAVA EKSPRESIJSKIH PLAZMIDOV

Antagonistično delovanje beljakovin virusa KKH M smo preverjali s hkratnim izražanjem različnih ekspresijskih plazmidov, zato smo v prvi stopnji naših raziskav izdelali ekspresijske plazmide, ki so nosili zapis za odprte bralne okvirje segmentov S in M, virusnih sevov Hoti in AP92. Ekspresijske plazmide seva IbAr10200 smo namreč dobili od zunanjih sodelavcev.

V ta namen smo z verižno reakcijo s polimerazo pomnožili odprte bralne okvirje segmentov S in M, virusnih sevov Hoti in AP92 in modificirane bralne okvirje, ki na koncu 3' niso vsebovali stop kodona. Modificirani odprti bralni okvirji so namreč omogočili dodatek epitopa V5 in šestih histidinov (6×His) na 3' konec virusne beljakovine. Začetne oligonukleotide smo izdelali sami, v programskem okolju CLC Bio Main Workbench. Začetni oligonukleotidi so bili izdelani tako, da so omogočili neposredno kloniranje v ekspresijski vektor.

Vse bralne okvirje smo nato klonirali v ekspresijski vektor pcDNA3.1D/V5-His-TOPO in osamili plazmidno DNA. Po kloniranju smo pregledali vse zrasle kolonije in istovetnost ekspresijskih plazmidov preverili z analizo nukleotidnega zaporedja. Kolonije, ki so vsebovale ustrezen plazmid smo precepili v večje volumne in iz njih osamili večje količine plazmidne DNA. Pripravljeni ekspresijski plazmidi so prikazani v preglednici 18. Koncentracijo plazmidne DNA smo uravnali na 500 ng/μl.

Preglednica 18: Pripravljeni ekspresijski plazmidi, z zapisi za beljakovine virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice

Table 18: Designed expression plasmids encoding Crimean-Congo hemorrhagic virus proteins

Ekspresijski plazmid	Virusni sev	Odprti bralni okvir	Modifikacija na koncu 3'
pcDNA3.1 Hoti N	Hoti	Segment S	brez
pcDNA3.1 Hoti N/His	Hoti	Segment S brez stop kodona	epitopV5 in 6×His
pcDNA3.1 Hoti M	Hoti	Segment M	brez
pcDNA3.1 Hoti M/His	Hoti	Segment M brez stop kodona	epitopV5 in 6×His
pcDNA3.1 AP92 N	AP92	Segment S	brez
pcDNA3.1 AP92 N/His	AP92	Segment S brez stop kodona	epitopV5 in 6×His
pcDNA3.1 AP92 M	AP92	Segment M	brez
pcDNA3.1 AP92 M/His	AP92	Segment M brez stop kodona	epitopV5 in 6×His

4.2 IZRAŽANJE BELJAKOVIN VIRUSA KKHV V CELICAH HEK293T/17

V naslednjem koraku smo preverili ali izdelani (in pridobljeni) ekspresijski plazmidi, ki nosijo zapis za beljakovine virusa KKHV, omogočajo izražanje le-teh v celični liniji HEK293T/17. V ta namen smo izvedli ločene poskuse, kjer smo posamezne ekspresijske plazmide vnesli v celice (transfekcija) in z metodo po Westernu preverili uspešnost izražanja.

Pri sevu IbAr10200 smo preverili izražanje naslednjih ekspresijskih plazmidov:

- pCAGGS N,
- pCAGGS M in
- pCAGGS MCo.

V celicah HEK 293T/17 smo uspešno izrazili vse tri ekspresijske plazmide, vendar je bila stopnja izražanja nemodificiranega segmenta M (ekspresijski plazmid pCAGGS M) zelo nizka, kar je razvidno tudi na sliki 22. Zato smo v nadaljnjih poskusih, kjer smo želeli preveriti vpliv segmenta M, uporabili le plazmid pCAGGS MCo, ki nosi zapis za segment M z modificiranimi kodoni.

Pri sevu Hoti smo preverili izražanje naslednjih ekspresijskih plazmidov:

- pcDNA3.1 Hoti N
- pcDNA3.1 Hoti N/His

- pcDNA3.1 Hoti M
- pcDNA3.1 Hoti M/His

V celicah HEK 293T/17 smo uspešno izrazili plazmide pcDNA3.1 Hoti N, pcDNA3.1 Hoti N/His in pcDNA3.1 Hoti M, pri čemer je bila stopnja izražanja segmenta M zelo nizka, kar je razvidno na sliki 22. V nadaljnjih poskusih, kjer smo želeli preveriti vpliv segmenta S, smo uporabili plazmid pcDNA3.1 Hoti N, saj je bila stopnja izražanja enaka kot pri plazmidu pcDNA3.1 Hoti N/His. V nadaljnjih poskusih, kjer smo želeli preveriti vpliv segmenta M, smo uporabili plazmid pcDNA3.1 Hoti M. Kljub večkratnim ponovitvam tako kloniranja kot transfekcije, nismo uspeli izraziti oz. zaznati epitopa V5, pri ekspresijskem plazmidu pcDNA3.1 Hoti M/His.

Pri sevu Hoti smo preverili izražanje naslednjih ekspresijskih plazmidov:

- pcDNA3.1 AP92 N
- pcDNA3.1 AP92 N/His
- pcDNA3.1 AP92 M
- pcDNA3.1 AP92 M/His

V celicah HEK 293T/17 smo uspešno izrazili plazmide pcDNA3.1 AP92 N, pcDNA3.1 AP92 N/His in pcDNA3.1 AP92 M, pri čemer je bila stopnja izražanja segmenta M zelo nizka, kar je razvidno na sliki 22. V nadaljnjih poskusih, kjer smo želeli preveriti vpliv segmenta S, smo uporabili plazmid pcDNA3.1 AP92 N, saj je bila stopnja izražanja enaka kot pri plazmidu pcDNA3.1 AP92 N/His. V nadaljnjih poskusih, kjer smo želeli preveriti vpliv segmenta M, smo uporabili plazmid pcDNA3.1 AP92 M. Kljub večkratnim ponovitvam tako kloniranja kot transfekcije, nismo uspeli izraziti oz. zaznati epitopa V5, pri ekspresijskem plazmidu pcDNA3.1 AP92 M/His.

Rezultati uspešnosti izražanja vseh ekspresijskih plazmidov so prikazani v preglednici 19 in na slikah 20-22.

Preglednica 19: Uspešnost izražanja ekspresijskih plazmidov, ki nosijo zapise za beljakovine virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice

Table 19: Expression efficiency of transfected expression plasmids, encoding Crimean-Congo hemorrhagic fever virus proteins

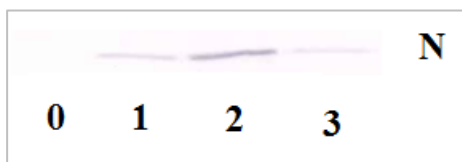
Ekspresijski plazmid	Virusni sev	Odpri bralni okvir	Stopnja izražanja beljakovin
pCAGGS N	IbAr10200	Segment S	+++
pCAGGS M	IbAr10200	Segment M	+
pCAGGS MCo	IbAr10200	Segment M, z optimiziranimi kodoni	++
pcDNA3.1 Hoti N	Hoti	Segment S	+++
pcDNA3.1 Hoti N/His	Hoti	Segment S brez stop kodona	+++
pcDNA3.1 Hoti M	Hoti	Segment M	+
pcDNA3.1 Hoti M/His	Hoti	Segment M brez stop kodona	-
pcDNA3.1 AP92 N	AP92	Segment S	+++
pcDNA3.1 AP92 N/His	AP92	Segment S brez stop kodona	++
pcDNA3.1 AP92 M	AP92	Segment M	+
pcDNA3.1 AP92 M/His	AP92	Segment M brez stop kodona	-

+++ = visoka stopnja izražanja beljakovin

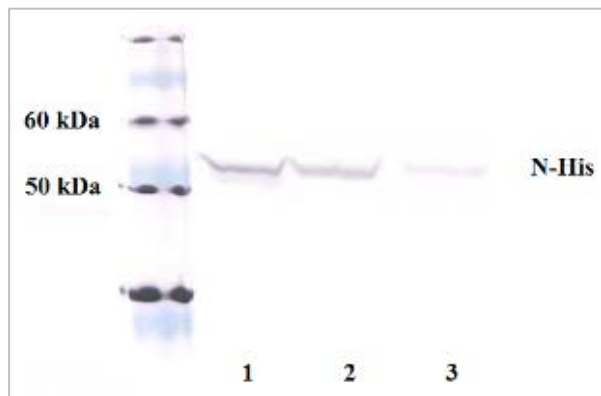
++ = nizka stopnja izražanja beljakovin

+ = zelo nizka stopnja izražanja beljakovin

- = izražanja beljakovin nismo potrdili

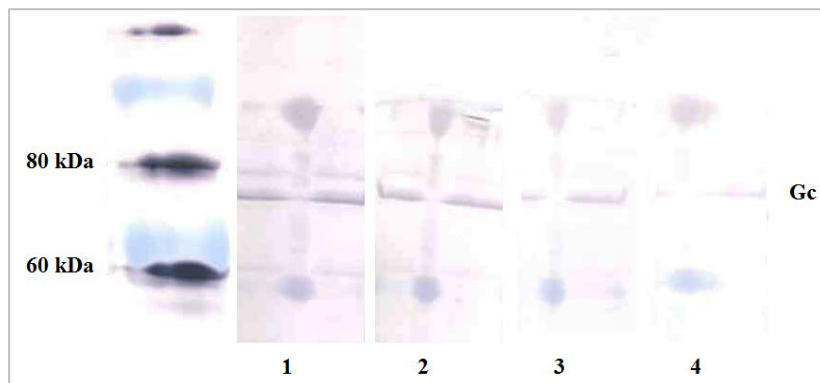


Slika 20: Uspešnost izražanja ekspresijskih plazmidov z zapisi za beljakovino N, virusa KKH po analizi beljakovin po Westernu. 0: negativna kontrola, 1: sev Hoti, 2: sev IbAr10200, 3: sev AP92
 Figure 20: Western blot analysis of transfected expression plasmids, encoding Crimean-Congo hemorrhagic fever virus protein N. 0: negative control, 1: strain Hoti, 2: strain IbAr10200, 3: strain AP92



Slika 21: Uspešnost izražanja ekspresijskih plazmidov z zapisi za beljakovino N, katerim smo dodali epitopa V5 in 6×His, virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice po analizi beljakovin po Westernu. 0: negativna kontrola, 1 in 2: vzorec seva Hoti, 3: vzorec seva AP92.

Figure 21: Western blot analysis of transfected expression plasmids, encoding Crimean-Congo hemorrhagic fever virus protein N containing a V5 and 6×His epitope tags. 0: negative control, 1 and 2: strain Hoti, 3: strain AP92



Slika 22: Uspešnost izražanja ekspresijskih plazmidov z zapisi za beljakovine na segmentu M (Gn in Gc), virusa krimsko-kongoške hemoragične mrzlice po analizi beljakovin po Westernu. 1: virusni sev IbAr10200, 2: virusni sev IbAr10200, ki ima modificirane kodone, 3: vzorec seva Hoti, 4: vzorec seva AP92.

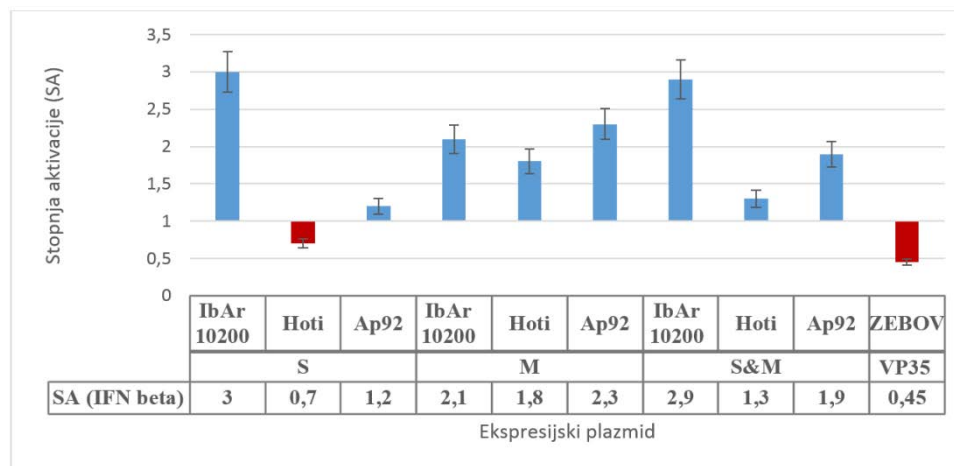
Figure 22: Western blot analysis of transfected expression plasmids, encoding Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoproteins. 0: negative control, 1: strain Hoti, 2: strain IbAr10200, 3: strain AP92

4.3 VPLIV SEGMENTOV S IN M VIRUSA KKHM NA AKTIVNOST PROMOTORJA ZA INTERFERON BETA

Vpliv izražanja beljakovin virusa KKHM, zapisanih na segmentih S in M, na aktivnost promotorja za interferon beta smo ugotavljali s kotransfekcijo ekspresijskih plazmidov, poročevalnega plazmida p125-luc in kontrolnega plazmida. Aktivnost promotorja za interferon

beta je sorazmerna stopnji izražanja luciferaze, zapisane na poročevalnem plazmidu. Stopnjo izražanja luciferaze smo podali kot stopnjo aktivacije, tj. razmerje med stopnjo izražanja luciferaze ob prisotnosti ekspresijskih plazmidov in stopnjo izražanja luciferaze ob odsotnosti ekspresijskih plazmidov. Stopnje aktivacije promotorja za interferon beta ob hkratnem izražanju plazmidov z zapisi za beljakovine KKHM so prikazane na sliki 23. Vrednosti nižje od 1 pomenijo utišanje, večje pa stimulacijo aktivnosti promotorja za interferon beta. Vrednost enaka 1 pomeni, da ni vpliva na aktivacijo promotorja za interferon beta.

Do utišanja aktivnosti promotorja za interferon beta je prišlo le ob izražanju segmenta S virusnega seva Hoti in pozitivne kontrole, beljakovine VP35 virusa ZEBOV. Ob izražanju vseh ostalih segmentih je prišlo do povečane aktivnosti promotorja za interferon beta, v največji meri pri izražanju segmenta S virusnega seva IbAr10200. Rezultate antagonističnega delovanja izbranih sevov KKHM, na aktivnost promotorja za IFN- β smo objavili v reviji Archives of Virology, ki jo indeksira SCI (Fajs in sod., 2014b).



Slika 23: Povprečne vrednosti in standardni odklon (pri treh ponovitvah poskusov) stopnje aktivacije promotorja za interferon beta ob hkratnem izražanju plazmidov z zapisi za beljakovine KKHM. Vrednosti nižje od 1 pomenijo utišanje, večje pa stimulacijo aktivnosti promotorja za interferon beta. Vrednost enaka 1 pomeni, da ni vpliva na aktivacijo promotorja za interferon beta. VP35 ZEBOV: pozitivna kontrola, beljakovina VP35 virusa ZEBOV. SA: Stopnja aktivacije

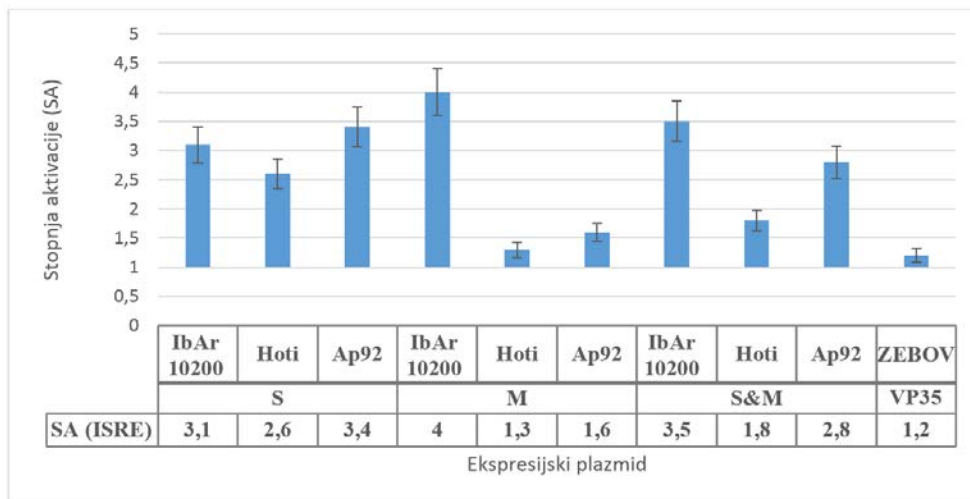
Figure 23: Fold activation of interferon beta promoter (IBP). Values larger than 1 represent inhibition of IBP while values larger than 1 represent activation of IBP. Values equal 1 represent no effect on IBP. VP35 ZEBOV: Ebola Zair virus VP35 protein as positive control. SA: Fold induction

4.4 VPLIV SEGMENTOV S IN M, SEVOV VIRUSA KKHM NA AKTIVNOST ELEMENTA ISRE

Vpliv izražanja beljakovin virusa KKHM, zapisanih na segmentih S in M, na aktivnost elementa ISRE smo ugotavljali s kotransfekcijo ekspresijskih plazmidov, poročevalnega plazmida pISRE-luc in kontrolnega plazmida. Aktivnost elementa ISRE je sorazmerna stopnji izražanja luciferaze, zapisane na poročevalnem plazmidu. Stopnjo izražanja luciferaze smo podali kot stopnjo aktivacije, tj. razmerje med stopnjo izražanja luciferaze ob prisotnosti ekspresijskih plazmidov in stopnjo izražanja luciferaze ob odsotnosti ekspresijskih plazmidov.

Stopnje aktivacije elementa ISRE ob hkratnem izražanju plazmidov z zapisi za beljakovine KKHM so prikazane na sliki 24. Vrednosti nižje od 1 pomenijo utišanje, večje pa stimulacijo aktivnosti elementa ISRE. Vrednost enaka 1 pomeni, da ni vpliva na aktivacijo elementa ISRE.

Izražanje virusnih beljakovin je aktivnost elementa ISRE spodbudilo. V nobenem primeru ni prišlo do utišanja aktivnosti elementa ISRE.

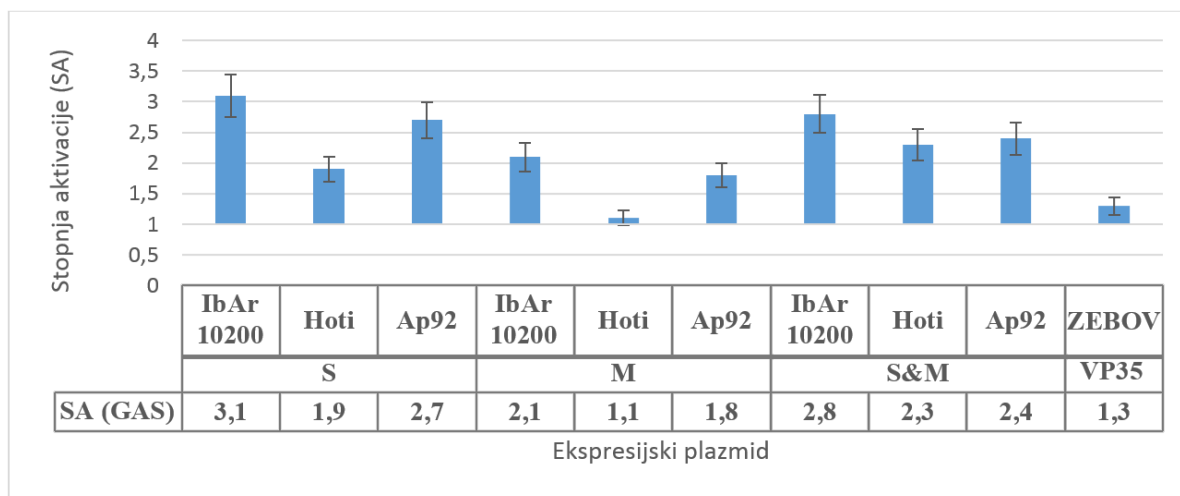


Slika 24: Povprečne vrednosti in standardni odklon (pri treh ponovitvah poskusov) stopnje aktivacije s strani interferonov stimuliranega odzivnega elementa ISRE ob hkratnem izražanju plazmidov z zapisi za beljakovine KKHM. Vrednosti nižje od 1 pomenijo utišanje, večje pa stimulacijo aktivnosti elementa ISRE. Vrednost enaka 1 pomeni, da ni vpliva na aktivacijo promotorja za interferon beta. VP35 ZEBOV: beljakovina VP35 virusa ZEBOV. SA: Stopnja aktivacije

Figure 24: Fold activation of interferon stimulated response element (ISRE). Values larger than 1 represent inhibition of ISRE while values larger than 1 represent activation of ISRE. Values equal 1 represent no effect on ISRE. VP35 ZEBOV: Ebola Zair virus VP35 protein. SA: Fold induction

4.5 VPLIV SEGMENTOV S IN M, SEVOV VIRUSA KKH M NA AKTIVNOST ELEMENTA GAS

Zaradi odsotnosti utišanja odziva interferonov pri sevih IbAr10200 in AP92 smo želeli preveriti ali omenjena seva (in tudi sev Hoti) vplivata na izražane genov ki so stimulirani strani interferona gama oz. na aktivnost elementa GAS. Vpliv izražanja beljakovin virusa KKH M, zapisanih na segmentih S in M, na aktivnost elementa GAS smo ugotavljali s kotransfekcijo ekspresijskih plazmidov, poročevalnega plazmida pGAS-luc in kontrolnega plazmida. Aktivnost elementa GAS je sorazmerna stopnji izražanja luciferaze, zapisane na poročevalnem plazmidu. Stopnjo izražanja luciferaze smo podali kot stopnjo aktivacije, tj. razmerje med stopnjo izražanja luciferaze ob prisotnosti ekspresijskih plazmidov in stopnjo izražanja luciferaze ob odsotnosti ekspresijskih plazmidov. Izražanje virusnih beljakovin je aktivnost elementa GAS spodbudilo oz. nanj ni imelo vpliva (segment M seva Hoti). V nobenem primeru ni prišlo do utišanja aktivnosti elementa GAS. Stopnje aktivacije elementa GAS ob hkratnem izražanju plazmidov z zapisi za beljakovine KKH M so prikazane na sliki 25. Vrednosti nižje od 1 pomenijo utišanje, večje pa stimulacijo aktivnosti elementa GAS. Vrednost enaka 1 pomeni, da ni vpliva na aktivacijo elementa GAS.



Slika 25: Povprečne vrednosti in standardni odklon (pri treh ponovitvah poskusov) stopnje aktivacije aktivacijskega zaporedja interferona gama, GAS, ob hkratnem izražanju plazmidov z zapisi za beljakovine KKHM. Vrednosti nižje od 1 pomenijo utišanje, večje pa stimulacijo aktivnosti elementa GAS. Vrednost enaka 1 pomeni, da ni vpliva na aktivacijo promotorja za interferon beta. VP35 ZEBOV: VP35 virusa ZEBOV. SA: Stopnja aktivacije

Figure 25: Fold activation of interferon gamma activation sequence (GAS). Values larger than 1 represent inhibition of GAS while values larger than 1 represent activation of GAS. Values equal 1 represent no effect on GAS. VP35 ZEBOV: Ebola Zair virus VP35 protein. SA: Fold induction

5 RAZPRAVA

Odziv IFN tipa I predstavlja ključno stopnjo v človeškem imunskem odzivu proti virusom in drugim patogenom (Perry in sod., 2005). Odziv IFN tipa I igra pomembno vlogo tudi pri okužbi z virusom KKH, ki povzroča smrtno nevarno, akutno bolezen (Andersson in sod., 2006). Tako kot pri mnogih drugih virusih, so tudi pri virusu KKH odkrili, da je sposoben utišati odziv IFN tipa I, sicer neznanim virusnim dejavnikom oz. mehanizmom (Andersson in sod., 2008). Mnogi virusi, iz številnih virusnih družin namreč nosijo zapis za virusne dejavnike, ki neposredno vplivajo na posamezne stopnje odziva IFN tipa I (Taylor in Mossman, 2013). Med temi so tudi hantavirusi, ki jih tako kot virus KKH, uvrščamo v družino *Bunyaviridae* in prav tako lahko povzročijo hemoragično mrzlico. V raziskavi, ki so jo objavili (Levine in sod., 2010), so pokazali, da beljakovini N in prekursor glikoziliranih beljakovin (GPC, iz angl.: glycoprotein precursor) virusov Andes in Sin Nombre, utišata izražanje IFN-beta in izražanje genov ISG. Poleg tega so pokazali, da se virusa razlikujeta glede na stopnjo utišanja odziva IFN tipa I, kar kaže na to, da se lahko tudi zelo sorodni virusi med seboj razlikujejo v stopnji in načinu antagonizma odziva IFN tipa I (Levine in sod., 2010). Te raziskave so nas spodbudile, da preverimo ali virus KKH nosi zapis za dejavnik, ki je sposoben utišati odziv IFN tipa I. Zanimalo nas je tudi ali se različni sevi virusa KKH, ki se domnevno med seboj ločijo v patogenetskem potencialu, med seboj razlikujejo tudi v stopnji utišanja odziva IFN tipa I. V ta namen smo izvedli raziskavo v kateri smo preverili vpliv beljakovin zapisanih na segmentih S in M, virusnih sevov IbAr10200 (prototipni sev, ki je domnevno oslavljen), Hoti (dokazano patogen sev) in AP92 (nepatogen oz. pogojno patogen).

Pridobili ali izdelali smo ekspresijske plazmide, ki imajo zapis za odprti bralni okvir segmenta S ali M in preverili njihovo izražanje v človeških, humanih embrionalnih celicah. Pri sevu IbAr10200 smo uspešno izrazili beljakovino N, glikozilirane beljakovine zapisane na segmentu M in glikozilirane beljakovine na segmentu M, z modificiranimi kodoni. Največjo težavo je predstavljalo izražanje nemodificiranega segmenta M, saj je bila stopnja izražanja glikoziliranih beljakovin zelo nizka. Možnih razlogov za nizko stopnjo izražanja je lahko več:

velika vsebnost redkih kodonov, vsebnost mest za cepitev, šibek promoter, itd. Zato smo dobili tudi segment z optimiziranimi kodoni, katerega smo izrazili v značilno večji količini. Vse ekspresijske plazmide smo dobili od dr. Connie Schmaljohn iz inštituta U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Ft. Detrick, ZDA (Bertolotti-Ciarlet in sod., 2005; Altamura in sod., 2007).

Pri sevih Hoti in AP92 smo vse ekspresijske plazmide izdelali sami. Pri obeh sevih smo uspešno izrazili beljakovino N in beljakovino N, kateri smo dodali epitop V5 in 6×His. Epitopa V5 in 6×His smo dodali z namenom, da bi povečali občutljivost zaznavanja izraženih beljakovin. Izkazalo se je, da je bila stopnja izražanja preoblikovanih beljakovin N manjša kot pri nemodificiranih beljakovinah N. Zaradi tega smo v nadaljnjih poskusih uporabili le nemodificirane beljakovine N.

Pri obeh sevih smo, podobno kot pri sevu IbAr10200, imeli težave pri izražanju glikoziliranih beljakovin, zapisanih na segmentu M. Stopnja izražanja je bila nizka, ne glede na količino DNA ki smo jo uporabili v poskusih. Prav tako nam ni uspelo izraziti glikoziliranih beljakovin, ki smo jim dodali epitopa V5 in 6×His. Epitopa V5 in 6×His smo dodali z namenom lažjega zaznavanja rekombinantnih beljakovin, saj domnevno ne vplivata na stopnjo izražanja beljakovin v ekspresijskih sistemih, hkrati pa omogočata njihovo zaznavanje s komercialno dostopnimi protitelesi, z veliko afiniteto. Specifična protitelesa proti virusu KKHM oz. specifična protitelesa proti glikoziliranim beljakovinam virusa KKHM so večinoma v nizkih koncentracijah in jih je na splošno težko dobiti, saj komercialno niso dostopna. Z dodatkom epitopov V5 in 6×His smo se želeli izogniti temu problemu, vendar pri izražanju beljakovin z dodanimi modifikacijami lahko pride do konformacijskih sprememb, ki onemogočijo dostop protiteles do tarčnih epitopov (Invitrogen, 2010). Menimo, da je v našem primeru prišlo do tovrstnih konformacijskih sprememb, pri čemer dodana epitopa nista bila dosegljiva za imunsko zaznavo. Tako si pojasnjujemo nižjo stopnjo izražanja modificiranih beljakovin N in odsotnost izražanja modificiranih glikoziliranih beljakovin, zapisanih na segmentu M. Glede na rezultate izražanja glikozilirane beljakovine pri sevu IbAr10200 predvidevamo, da bi stopnjo izražanja lahko povečali, v kolikor bi izdelali ekspresijske plazmide z modificiranimi kodoni, vendar v danem časovnem in finančnem okviru to ni bilo

izvedljivo. Kljub temu, da glikoziliranih beljakovin nismo uspeli izraziti v velikih količinah menimo, da je bilo izražanje glikoziliranih beljakovin (čeprav v nizkih koncentracijah) zadostno za namen naše naloge. Izkušnje drugih raziskovalcev so podobne našim, saj poročajo o izredno nizki stopnji izražanja nativnih glikoziliranih beljakovin (Bertolotti-Ciarlet in sod., 2005; Altamura in sod., 2007). Ključni problem pri izražanju glikoziliranih beljakovin virusa KKHM predstavlja sama uporabljena metodologija vnosa plazmidne DNA v celico in princip izražanja rekombinantnih beljakovin. S transfekcijo namreč vnesemo plazmidno DNA v jedro celice, kjer lahko pride do prepisa genov, zapisanih na plazmidih v mRNA, ki se nato prenese v citoplazmo, kjer se prevede v beljakovine. Med prenosom mRNA iz jedra v celico lahko pride do neželenih modifikacij, predvsem rezanj mRNA, kar posledično onemogoči pravilno prevajanje (Lewin, 2008). Sicer se virus KKHM pomnožuje v citoplazmi gostiteljske celice, zato se procesom neželenih in nepravilnih modifikacij izogne (Schmaljohn in Nichol, 2001). Izražanje virusnih beljakovin v citoplazmi celic bi lahko dosegli le v sistemih reverzne genetike, ki pa jih do danes za virus KKHM še niso razvili oz. niso dostopni. Težave z izražanjem glikoziliranih beljakovin so botrovale tudi k odločitvi, da se nismo odločili izraziti največjega segmenta, segmenta L. Pri segmentu L, predstavlja največjo težavo ravno njegova velikost (>12000 baznih parov). Velikost genomskega segmenta je ovira tako pri pomnoževanju s PCR, kloniranju kakor pri transfekciji. Drugo težavo predstavlja tudi odsotnost specifičnih protiteles, s katerimi bi lahko dokazali izražanje beljakovin zapisanih na tem segmentu.

V naslednji stopnji naše raziskave smo preverili vpliv izražanja virusnih beljakovin na odziv IFN tipa I. Njihov vpliv smo preverili na dveh ključnih stopnjah odziva IFN tipa I: izražanje IFN- β in izražanje genov ISG. Izražanje IFN- β smo merili posredno preko merjenja aktivnosti promotorja za IFN- β . V kolikor bi virusne beljakovine utišale odziv IFN tipa I na stopnji aktivacije izražanja IFN- β , bi se to pokazalo kot znižana aktivnost promotorja za IFN- β .

Rezultati so pokazali, da izražanje beljakovin virusnih sevov IbAr10200 in AP92 ne zniža aktivnosti promotorja za IFN- β . Ravno nasprotno, seva IbAr10200 in AP92 celo povečata njegovo aktivnost. Podobno smo pokazali, da izražanje glikoziliranih beljakovin seva Hoti poveča aktivnost istega promotorja. Nedvomno pa smo dokazali, da izražanje beljakovine N

virusnega seva Hoti, značilno zmanjša aktivnost promotorja za IFN- β . V skladu z našo hipotezo kažejo rezultati, da obstaja razlika v potencialu utišanja odziva IFN med posameznimi sevi, pri čemer je antagonistični vpliv viden le pri, beljakovini N seva Hoti. Rezultati so zanimivi predvsem iz stališča, da je sev Hoti edini izmed treh preučevanih virusnih sevov, pri katerem je patogenetski potencial nedvoumen. Sev Hoti so namreč osamili iz kliničnega vzorca bolnika s KKH, ki je okužbi podlegel in sam virusni izolat je bil v celičnih kulturah gojen le kratek čas, do nizkih pasaž (Duh in sod., 2008). Po drugi strani so sev IbAr10200 osamili že leta 1966, iz vzorca klopa, in prav tako do danes niso opisali primera bolezni s tem sevom. Hkrati je ta sev postal prototipski sev za raziskave virusa KKH, kar pomeni da je bil intenzivno gojen v celičnih kulturah in je dosegel visoke pasaže (sev IbAr10200 so izbrali za prototipski sev predvsem zato, ker je bil osamljen s strani ameriških raziskovalcev)(Bente in sod., 2013). Intenzivno gojenje virusov v celičnih kulturah povzroči njihovo prilagoditev in posledično oslabitev (Lauring in sod., 2010) zato smo prepričanja, da sev IbAr10200 ni patogen oz. je njegov patogenetski potencial okrnjen. Na osnovi naših rezultatov menimo, da je zmanjšan patogenetski potencial posledica nezmožnosti utišanja promotorja za IFN- β . Vendar glede na to, da so v raziskavah, kjer so pokazali, da virus KKH utiša odziv IFN tipa I, uporabili sev IbAr10200 menimo, da virusi KKH nosijo zapis za več (vsaj dva) antagonista odziva IFN tipa I. To je v sosledju z raziskavami pri drugih virusih, kjer so prav tako dokazali več dejavnikov z antagonističnim delovanjem, npr. pri hantavirusih (beljakovini N in GPC), virus Ebola (VP24 in VP35), itd (Basler in sod., 2000; Levine in sod., 2010). Glede na to, da smo preverili vpliv izražanja tako segmenta S kot M menimo, da je dodatni antagonist verjetno zapisan na segmentu L. Segment L nosi zapis za od RNA-odvisno polimerazo RNA kot tudi za proteazo OTU (Kinsella in sod., 2004). Vloga proteaze OTU pri virusu KKH še ni pojasnjena, vendar so raziskave pri drugih virusih iz rodu *Nairovirus* pokazale da lahko odstrani ubikvitinske molekule iz celičnih beljakovin in se s tem izogne protivirusnemu delovanju dejavnika ISG15, ki ga uvrščamo med beljakovine ISG (Frias-Staheli in sod., 2007).

Podobno kot pri sevu IbAr10200, tudi pri sevu AP92 ni zanesljivih podatkov o njegovem patogenetskem potencialu. Sev AP92 so prav tako osamili le iz vzorca klopa, leta 1975 v

Grčiji (Papadopoulos in Koptopoulos, 1978). Od osamitve pa do danes niso ugotovili primera bolezni s tem sevom. Zabeležili so le primere blagih bolezni, brez obsežnih krvavitev, s sevi podobnimi sevu AP92 (Elevli in sod., 2010). Seva AP92 sicer niso intenzivno gojili v celičnih kulturah, vendar kljub temu velja za nepatogen oz. le pogojno patogen sev virusa KKHV (Bente in sod., 2013). Enako kot pri sevu IbAr10200 menimo, da odsotnost antagonističnega vpliva na izražanje promotorja za IFN- β , pomembno vpliva na zmanjšan patogenetski potencial seva AP92.

Kot že omenjeno, izražanje segmentov M vseh treh sevov ni zmanjšalo aktivnost promotorja za IFN- β . Zaradi nizke stopnje izražanja beljakovin (še posebej pri sevih Hoti in AP92) ne moremo nedvoumno trditi, da omenjen genomski segment ne nosi zapisa za dejavnik, ki bi lahko utišal odziv IFN tipa I. Segment M je namreč poseben v tem, da nosi zapis tudi za nestrukturno beljakovino NSm, katere funkcija sicer še ni znana. Vendar so raziskave pri drugih virusih iz iste virusne družine pokazali, da številne nestrukturne beljakovine (zapisane bodisi na segmentu M ali S) delujejo antagonistično na odziv IFN tipa I (Walter in Barr, 2011). Menimo, da bi morali v prihodnjih raziskavah ponovno preučiti vpliv beljakovin na segmentu M, v sistemih reverzne genetike in ne z optimizacijo kodonov. Z optimizacijo kodonov namreč neposredno spremenimo tarčno nukleotidno zaporedje. Antagonistično delovanje namreč ni omejeno le na delovanje izraženih beljakovin, vendar lahko deluje tudi na nivoju interference RNA (Maillard in sod., 2013).

Izražanje genov ISG smo merili posredno preko merjenja aktivnosti promotorja, genetskega elementa ISRE. V kolikor bi virusne beljakovine utišale odziv IFN tipa I na stopnji aktivacije izražanja genov ISG, bi se to pokazalo kot znižana aktivnost elementa ISRE.

Rezultati so pokazali, da izražanje beljakovin vseh virusnih sevov ne zniža aktivnosti elementa ISRE, vendar jo celo poveča. Pri virusni beljakovini N smo gotovili, da dejansko ne vpliva na izražanje genov ISG, saj je bila stopnja izražanja le-te zadostna. Pri beljakovinah, zapisanih na segmentu M, pa lahko trdimo le, da verjetno ne nosijo zapisa za antagoniste odziva IFN tipa I. Zaradi nizke stopnje izražanja glikoziliranih beljakovin, namreč ne moremo nedvoumno ovreči hipoteze, da segment M nosi zapis za dejavnike z antagonističnim delovanjem na izražanje ISG. Povečane aktivnosti promotorja ISRE, kot tudi promotorja IFN- β , so po našem

mnenju posledica prekomerne aktivacije promotorjev zaradi same transfekcije. Transfekcija namreč predstavlja stres za celico, hkrati pa je izbran luciferazni test tako občutljiv, da zazna že minimalne stopnje aktivacije izbranih promotorskih mest.

Zaradi odsotnosti antagonističnega vpliva beljakovin virusa KKHM na izražanje beljakovin ISG smo v naši raziskavi razširili še na odziv interferonov tipa II, tj. IFN- γ . IFN- γ igra pomembno vlogo pri patogenezi virusa KKHM. Več raziskav je pokazalo, da so vrednosti IFN- γ značilno povišane pri bolnikih s KKHM in še, da so vrednosti IFN- γ bistveno višje pri bolnikih s težjim potekom ali smrtnim izidom kot pri bolnikih z blažjim potekom bolezni (Weber in Mirazimi, 2008; Saksida in sod., 2010). Podobne rezultate so pokazale tudi raziskave na živalskih modelih (Zivcec in sod., 2013). Tako kot pri odzivu IFN tipa I, so tudi pri odzivu IFN tipa II odkrili virusne dejavnike, ki ga lahko utišajo, kot je to npr. pri virusih iz rodu *Orthopoxvirus* (Nuara in sod., 2008). Vezava IFN- γ na receptor za IFN- γ , sproži prepis genov, ki so stimulirani s strani IFN- γ . Ti geni so pod nadzorom promotorske regije oz. genetskega elementa GAS. Vpliv virusnih beljakovin na delovanje IFN- γ smo merili posredno preko merjenja aktivnosti elementa GAS (Weber in Elliot, 2009). V kolikor bi virusne beljakovine utišale odziv IFN tipa II na stopnji aktivacije izražanja genov, ki jih stimulira IFN- γ , bi se to pokazalo kot znižana aktivnost elementa GAS. Rezultati so pokazali, da izražanje beljakovin vseh virusnih sevov ne zniža aktivnosti elementa GAS, vendar jo celo poveča. Zato menimo, da virus KKHM na segmentu S zagotovo in na segmentu M verjetno, ne nosi zapisa za dejavnik, ki deluje antagonistično na odziv IFN tipa II. Glede na skopost podatkov o odzivu ali antagonizmu tega tipa odziva IFN pri sorodnih virusih menimo, da pri patogenezi virusa KKHM igra največjo vlogo ravno antagonizem IFN tipa I.

Z našo raziskavo smo uspeli dokazati, da nosi virus KKHM zapis za dejavnik, ki deluje antagonistično na odziv IFN tipa I, na stopnji aktivacije izražanja IFN- β , ki je zapisan na genomskem segmentu S. Hkrati smo pokazali, da je bil utišanja odziva IFN tipa I zmožen le sev Hoti, ki je edini dokazano patogeni sev izmed treh preučevanih sevov KKHM. V nadaljnjih raziskavah je potrebno določiti natančen mehanizem antagonizma odziva IFN tipa I. Glede na predhodne raziskave, bi bilo smiselno preveriti ali izražanje virusnega segmenta S vpliva na aktivacijo ali delovanje dejavnika IRF-3, za katerega so pokazali da je utišán s strani

virusa KKHM (Andersson in sod., 2008). Prav tako bi bilo potrebno v nadaljnjih raziskavah preveriti antagonistični vpliv na več različnih celičnih linijah, da bi s tem izničili morebiten specifičen učinek posameznih celičnih kultur. V naši raziskavi smo celično linijo HEK293T/17 uporabili predvsem zaradi preverjeno visoke stopnje izražanja rekombinantnih beljakovin ter neokrnjenosti odziva IFN.

Odkrivanje virusnih dejavnikov z antagonističnim delovanjem na odziv IFN tipa I (in tipa II) je pomembno tako iz stališča boljšega razumevanja patogeneze KKHM kot tudi zaradi razvoja protivirusnih učinkovin. Tovrstni virusni dejavniki namreč predstavljajo ključne tarče proti katerim bi lahko razvili protivirusne učinkovine. Z utišanjem njihovega delovanja bi preprečili virusno pomnoževanje in širjenje okužbe. Pri razvoju oz. preizkušanju protivirusnih učinkovin, odigra ključno vlogo podrobno poznavanje tarče, bodisi virusa kot celote bodisi posameznih virusnih beljakovin. Glede na rezultate naših raziskav je zagotovo ena ključnih protivirusnih tarč pri virusu KKHM, beljakovina N. Ker so molekularno strukturo in funkcijo beljakovine N že opisali menimo, da je naslednji korak k morebitnemu zdravlilu proti KKHM, *in silico* analiza potencialnih protivirusnih učinkovin in nadalje preizkušanje le teh v sistemih *in vitro* (Carter in sod., 2012; Wang in sod., 2012).

Z doktorsko disertacijo smo prispevali k razumevanju patogeneze virusa KKHM. Pojasnili smo pomemben del v ključni stopnji virusnega pomnoževanja, tj. v začetni fazi virusnega pomnoževanja. Hitra in močna inhibicija celičnih obrambnih mehanizmov, po našem mnenju, odločilno vpliva na nadaljnji potek okužbe saj si s tem virus KKHM pridobi čas, v katerem se lahko pomnoži v zadostnem številu in uspešno razširi po gostiteljevem organizmu. Rezultati naše raziskave odpirajo tudi pomembna nova vprašanja, ki bodo nedvomno tema prihodnjih raziskav.

6 SKLEPI

- Virus KKHM **nosi** zapis za dejavnik, ki deluje antagonistično proti odzivu IFN tipa I,
- Virusni dejavnik je zapisan na **segmentu S**,
- Virusni dejavnik **prepreči izražanje IFN- β** ,
- Antagonistično delovanje je odvisno od **seva** KKHM,
- Patogeni sev virusa KKHM, sev Hoti, **utiša** odziv IFN tipa I,
- Nepatogena oz. pogojno patogena seva virusa KKHM, seva IbAr10200 in AP92, **ne utišata** odziva IFN tipa I,
- Virus KKHM **verjetno ne nosi** zapisa za dejavnik, ki deluje antagonistično proti izražanju beljakovin ISG,
- Virus KKHM **verjetno ne nosi** zapisa za dejavnik, ki deluje antagonistično proti izražanju beljakovin ki jih stimulira IFN- γ .
- Virus KKHM nosi zapis za **vsaj še en dejavnik**, ki deluje antagonistično proti odzivu IFN tipa I.

7 POVZETEK

Virus krimsko-kongoške hemoragične mrzlice (KKHM) povzroča akutno, smrtonosno hemoragično bolezen. Do okužbe z virusom KKHM pride po vbodu okuženega klopa iz rodu *Hyalomma* ali kontaktu s krvjo ali tkivi okuženih ljudi ali živali. Virus KKHM je zemljepisno najbolj razširjen klopno prenosljiv virus na svetu in je endemičen v delih Azije, Afrike in jugovzhodne Evrope. Patogeneza virusa KKHM je slabo poznana, zaradi odsotnosti primernega živalskega modela in zaradi potrebe po delu v laboratorijih najvišje stopnje biološke varnosti. Raziskave patogeneze so se v zadnjih letih osredotočale na vpliv odziva interferonov (IFN) tipa I. Odziv IFN tipa I predstavlja prvo obrambno linijo naravnega imunskega odziva pri ljudeh. Odziv IFN tipa I je sestavljen iz aktivacije izražanja IFN tipa I in aktivacije izražanja genov ki so stimulirani s strani interferonov (ISG). Po drugi strani so virusi razvili mehanizme s katerimi lahko utišajo interferone tipa I. Raziskave so prav tako pokazale, da virus KKHM utiša oz. upočasni odziv IFN tipa I, vendar mehanizem tega utišanja ni znan. Namen doktorske disertacije je bilo ugotoviti ali virus KKHM, na genomskih segmentih S in M nosi zapis za dejavnik, ki deluje antagonistično na odziv IFN tipa I. Antagonistično delovanje smo preverili s tremi sevi virusa KKHM, ki se domnevno ločijo med seboj v patogenetskem potencialu: sev IbAr10200 (prototipni sev, z neznanim patogenetskim potencialom), sev Hoti (dokazano patogen), sev AP92 (nepatogen oz. pogojno patogen).

Vpliv virusa KKHM na izražanje IFN- β smo preverili s kotransfekcijo virusnih ekspresijskih plazmidov in plazmida, ki nosi zapis za luciferazo pod nadzorom promotorja za IFN- β . Rezultati so pokazali, da le beljakovina N, seva Hoti utiša izražanje IFN- β . Ostale virusne beljakovine niso imele antagonističnega vpliva na izražanje IFN- β .

Vpliv virusa KKHM na izražanje ISG smo preverili s kotransfekcijo virusnih ekspresijskih plazmidov in plazmida, ki nosi zapis za luciferazo pod nadzorom promotorja za ISG, tj. elementa ISRE. Virusne beljakovine niso imele antagonističnega vpliva na izražanje elementa ISRE oz. na izražanje genov ISG.

Doktorsko disertacijo smo razširili še na odziv IFN- γ , tj. odziv IFN tipa II. Vpliv virusa KKHM na izražanje genov, ki jih stimulira IFN- γ smo preverili s kotransfekcijo virusnih

ekspresijskih plazmidov in plazmida, ki nosi zapis za luciferazo pod nadzorom promotorja za gene, ki jih stimulira IFN- γ , tj. elementa GAS. Virusne beljakovine niso imele antagonističnega vpliva na izražanje genov, ki jih stimulira IFN- γ . Z doktorsko disertacijo smo prispevali k razumevanju patogeneze virusa KKHM. Pojasnili del ključne stopnje virusnega pomnoževanja, tj. začetne faze virusnega pomnoževanja. Z doktorsko nalogo smo dokazali, da virus KKHM, na segmentu S, nosi zapis za dejavnik, ki deluje antagonistično na odziv IFN tipa I. Prav tako smo pokazali, da virus nosi zapis za še en, dodaten dejavnik z antagonističnim delovanjem in da je antagonistično delovanje odvisno od seva virusa. Izsledki naših raziskav bodo prispevali k razumevanju patogeneze in razlik v smrtnosti med različnimi sevi KKHM po svetu.

8 SUMMARY

Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is an acute zoonosis, which is characterized by a fulminant and often hemorrhagic course of disease and a case fatality rate of 10-50 %. CCHF is caused by the CCHF virus (genus Nairovirus, family Bunyaviridae), the most widespread tick-borne virus in the world. Cases of CCHF have been reported in Africa, south-eastern Europe, Middle East, and Asia. Humans get infected by a tick-bite from an infected *Hyalomma* tick or by contact with blood or tissues from infected patients or animals. Pathogenesis of CCHF is poorly understood because of the absence of a suitable, immune-competent animal model and due to the requirement for high-containment laboratories for virus manipulation. Previous studies have shown that CCHFV delays the activation of type I interferon (IFN) responses. Type I IFN response plays a pivotal role in the first steps of human innate response to viruses. Type I IFN response is bimodal and comprises of induction of IFN synthesis through several, intracellular signaling pathways and induction of synthesis of interferon-stimulated genes (ISG). On the other hand, viruses have evolved mechanisms to inhibit the type I IFN response, through direct inhibition of signaling pathways by viral proteins. The aim of our research was to determine if CCHF virus encodes antagonists of the human type I IFN response, on its S and M genomic segments. Furthermore we wanted to explore whether the different CCHF strains differ in their antagonistic potential. We investigated the interferon-antagonistic property of three genetically distinct CCHF strains that presumably differ in their ability to cause disease in humans (their pathogenic potential): strain IbAr10200 (prototype strain whose pathogenic potential is unclear), strain Hoti (pathogenic strain) and AP92 (presumably non-pathogenic or mildly pathogenic strain).

Antagonism of the type I IFN induction was investigated with co-transfection experiments, using viral expression plasmids (encoding S and M segment open reading frames) and a reporter plasmid, encoding a firefly luciferase controlled by the IFN- β promoter. Our results revealed that only the N protein of strain Hoti is capable of inhibiting the induction of IFN- β promoter.

Antagonism of ISG induction was investigated with co-transfection experiments, using viral expression plasmids (encoding S and M segment open reading frames) and a reporter plasmid, encoding a firefly luciferase controlled by the interferon-stimulated response element (ISRE) promoter. Our results revealed that no strain was able to inhibit the activity of the ISRE promoter and thereby the induction of ISG.

Due to the observed lack of inhibition of the ISG induction, we expanded the goal of our study, to include the IFN- γ response (type II IFN response). Antagonism of IFN- γ response, namely induction of IFN- γ stimulated genes, was investigated with co-transfection experiments, using viral expression plasmids (encoding S and M segment open reading frames) and a reporter plasmid, encoding a firefly luciferase controlled by the interferon-gamma activated sequence (GAS) promoter. Our results revealed that no strain was able to inhibit the activity of the GAS promoter and thereby the induction of IFN- γ stimulated genes.

In conclusion, the results of our study showed that CCHF virus encodes an antagonist of the type I interferon response on its S genomic segment. Furthermore, we show that type I IFN antagonism is strain specific and that it possibly influences the pathogenic potential of CCHF strain. We also show that CCHF virus encodes an additional, yet unknown, type I IFN antagonist. Our study provides valuable knowledge to the field of CCHF pathogenesis as it enlightens a pivotal step in CCHF pathogenesis. The results of our study also provide guidance for future studies as it opens new questions, mainly in connection between characteristics of different viral strains and their pathogenic potential.

9 VIRI

- Akira S., Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4: 499-511
- Altamura L.A., Bertolotti-Ciarlet A., Teigler J., Paragas J., Schmaljohn C.S., Doms R.W. 2007. Identification of a novel C-terminal cleavage of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus PreGN that leads to generation of an NSM protein. *Journal of Virology*, 81: 6632-6642
- Andersson I., Bladh L., Mousavi-Jazi M., Magnusson K.E., Lundkvist A., Haller O., Mirazimi A. 2004a. Human MxA protein inhibits the replication of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of Virology*, 78: 4323-4329
- Andersson I., Karlberg H., Mousavi-Jazi M., Martinez-Sobrido L., Weber F., Mirazimi A. 2008. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus delays activation of the innate immune response. *Journal of Medical Virology*, 80: 1397-1404
- Andersson I., Lundkvist A., Haller O., Mirazimi A. 2006. Type I interferon inhibits Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human target cells. *Journal of Medical Virology*, 78: 216-222
- Andersson I., Simon M., Lundkvist A., Nilsson M., Holmstrom A., Elgh F., Mirazimi A. 2004b. Role of actin filaments in targeting of Crimean Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein to perinuclear regions of mammalian cells. *Journal of Medical Virology*, 72: 83-93

- Arda B., Aciduman A., Johnston J.C. 2012. A randomised controlled trial of ribavirin in Crimean Congo haemorrhagic fever: ethical considerations. *Journal of Medical Ethics*, 38: 117-120
- Ascioglu S., Lelebicioglu H., Vahaboglu H., Chan K.A. 2011. Ribavirin for patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66: 1215-1222
- Avšič-Županc T. 2007. Epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Balkans. V: Crimean-Congo hemorrhagic fever: a global perspective. Ergonul O., Whitehouse C.A. (eds.). Dordrecht, Springer: 75-88
- Basler C.F., Wang X., Muhlberger E., Volchkov V., Paragas J., Klenk H.D., Garcia-Sastre A., Palese P. 2000. The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 12289-12294
- Bente D.A., Alimonti J.B., Shieh W.J., Camus G., Stroher U., Zaki S., Jones S.M. 2010. Pathogenesis and immune response of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in a STAT-1 knockout mouse model. *Journal of Virology*, 84: 11089-11100
- Bente D.A., Forrester N.L., Watts D.M., McAuley A.J., Whitehouse C.A., Bray M. 2013. Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Research*, 100: 159-189
- Berezky S., Lindegren G., Karlberg H., Akerstrom S., Klingstrom J., Mirazimi A. 2010. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection is lethal for adult type I interferon receptor-knockout mice. *Journal of General Virology*, 91: 1473-1477

- Bergeron E., Albarino C.G., Khristova M.L., Nichol S.T. 2010. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-encoded ovarian tumor protease activity is dispensable for virus RNA polymerase function. *Journal of Virology*, 84: 216-226
- Bertolotti-Ciarlet A., Smith J., Strecker K., Paragas J., Altamura L.A., McFalls J.M., Frias-Staheli N., Garcia-Sastre A., Schmaljohn C.S., Doms R.W. 2005. Cellular localization and antigenic characterization of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoproteins. *Journal of Virology*, 79: 6152-6161
- Billecocq A., Spiegel M., Vialat P., Kohl A., Weber F., Bouloy M., Haller O. 2004. NSs protein of Rift Valley fever virus blocks interferon production by inhibiting host gene transcription. *Journal of Virology*, 78: 9798-9806
- Burt F.J., Paweska J.T., Ashkettle B., Swanepoel R. 2009. Genetic relationship in southern African Crimean-Congo haemorrhagic fever virus isolates: evidence for occurrence of reassortment. *Epidemiology and Infection*, 137: 1302-1308
- Burt F.J., Swanepoel R., Shieh W.J., Smith J.F., Leman P.A., Greer P.W., Coffield L.M., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Peters C.J., Zaki S.R. 1997. Immunohistochemical and in situ localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus in human tissues and implications for CCHF pathogenesis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 121: 839-846
- Carter S.D., Surtees R., Walter C.T., Ariza A., Bergeron E., Nichol S.T., Hiscox J.A., Edwards T.A., Barr J.N. 2012. Structure, function, and evolution of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein. *Journal of Virology*, 86: 10914-10923

- Casals J. 1969. Antigenic similarity between the virus causing Crimean hemorrhagic fever and Congo virus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 131: 233-236
- Casals J., Henderson B.E., Hoogstraal H., Johnson K.M., Shelokov A. 1970. A review of Soviet viral hemorrhagic fevers, 1969. *Journal of Infectious Diseases*, 122: 437-453
- Cevik M.A., Erbay A., Bodur H., Gulderen E., Bastug A., Kubar A., Akinci E. 2008. Clinical and laboratory features of Crimean-Congo hemorrhagic fever: predictors of fatality. *International Journal of Infectious Diseases*, 12: 374-379
- Chumakov M.P., Butenko A.M., Shalunova N.V., Martiyanova L.I., Smirnova S.E., Bashkirtsev N., Zavodova T.I., Rubin S.G., Tkachenko E.A., Karmysheva V., Reingold V.N., Popov G.V., Savinov A.P. 1968. New data on the viral agent of Crimean hemorrhagic fever. *Voprosi Virusologii*, 13: 377-377
- Chumakov M.P., Smirnova S.E., Tkachenko E.A. 1970. Relationship between strains of Crimean haemorrhagic fever and Congo viruses. *Acta Virologica*, 14: 82-85
- CLCBio. 2011. CLC Bio Main Workbench. Aarhus, CLC Bio: (software)
<http://www.clcbio.com/> (januar 2011)
- Connolly-Andersen A.M., Douagi I., Kraus A.A., Mirazimi A. 2009. Crimean Congo hemorrhagic fever virus infects human monocyte-derived dendritic cells. *Virology*, 390: 157-162
- Connolly-Andersen A.M., Moll G., Andersson C., Akerstrom S., Karlberg H., Douagi I., Mirazimi A. 2011. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus activates endothelial cells. *Journal of Virology*, 85: 7766-7774

- Der S.D., Zhou A., Williams B.R., Silverman R.H. 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 15623-15628
- Deyde V.M., Khristova M.L., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Nichol S.T. 2006. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *Journal of Virology*, 80: 8834-8842
- Didcock L., Young D.F., Goodbourn S., Randall R.E. 1999. The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signalling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation. *Journal of Virology*, 73: 9928-9933
- Dokuzoguz B., Celikbas A.K., Gok S.E., Baykam N., Eroglu M.N., Ergonul O. 2013. Severity scoring index for Crimean-Congo hemorrhagic fever and the impact of ribavirin and corticosteroids on fatality. *Clinical Infectious Diseases*, 57: 1270-1274
- Donnelly R.P., Kotenko S.V. 2010. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 30: 555-564
- Duh D., Nichol S.T., Khristova M.L., Saksida A., Hafner-Bratkovic I., Petrovec M., Dedushaj I., Ahmeti S., Avšič-Županc T. 2008. The complete genome sequence of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolated from an endemic region in Kosovo. *Virology Journal*, 5: 7, doi:10.1186/1743-422X-5-7: 6 str.
- Duh D., Saksida A., Petrovec M., Ahmeti S., Dedushaj I., Panning M., Drosten C., Avsic-Zupanc T. 2007. Viral load as predictor of Crimean-Congo hemorrhagic fever outcome. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 1769-1772

- Duygu F., Kaya T., Baysan P. 2012. Re-evaluation of 400 Crimean-Congo hemorrhagic fever cases in an endemic area: is ribavirin treatment suitable? *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 12: 812-816
- Elevli M., Ozkul A.A., Civilibal M., Midilli K., Gargili A., Duru N.S. 2010. A newly identified Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strain in Turkey. *International Journal of Infectious Diseases*, 14, Suppl. 3: e213-e216
- Ergonul O. 2006. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infectious Diseases*, 6: 203-214
- Ergonul O., Tuncbilek S., Baykam N., Celikbas A., Dokuzoguz B. 2006. Evaluation of serum levels of interleukin (IL)-6, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases*, 193: 941-944
- Estrada-Pena A., Palomar A.M., Santibanez P., Sanchez N., Habela M.A., Portillo A., Romero L., Oteo J.A. 2012. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, 18: 179-180
- Fajs L., Jakupi X., Ahmeti S., Humolli I., Dedushaj I., Avšič-Županc T. 2014a. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Kosovo. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8: e2647, doi:10.1371/journal.pntd.0002647: 6 str.
- Fajs L., Resman K., Avsic-Zupanc T. 2014b. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein suppresses IFN-beta-promoter-mediated gene expression. *Archives of Virology*, 159: 345-348
- Frias-Staheli N., Giannakopoulos N.V., Kikkert M., Taylor S.L., Bridgen A., Paragas J., Richt J.A., Rowland R.R., Schmaljohn C.S., Lenschow D.J., Snijder E.J., Garcia-Sastre A.,

- Virgin H.W.t. 2007. Ovarian tumor domain-containing viral proteases evade ubiquitin- and ISG15-dependent innate immune responses. *Cell Host and Microbe*, 2: 404-416
- Habjan M., Andersson I., Klingstrom J., Schumann M., Martin A., Zimmermann P., Wagner V., Pichlmair A., Schneider U., Muhlberger E., Mirazimi A., Weber F. 2008. Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS One*, 3: e2032, doi:10.1371/journal.pone.0002032: 8 str.
- He B., Gross M., Roizman B. 1997. The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 843-848
- Honig J.E., Osborne J.C., Nichol S.T. 2004. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genome L RNA segment and encoded protein. *Virology*, 321: 29-35
- Hoogstraal H. 1979. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *Journal of Medical Entomology*, 15: 307-417
- Invitrogen. 2010. pcDNATM3.1 Directional TOPO[®] expression kit. Carlsbad, Invitrogen Corporation: 34 str. (Navodilo za uporabo)
- Isaacs A., Lindenmann J. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London*, 147: 258-267

- Kinsella E., Martin S.G., Grolla A., Czub M., Feldmann H., Flick R. 2004. Sequence determination of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus L segment. *Virology*, 321: 23-28
- Lauring A.S., Jones J.O., Andino R. 2010. Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines. *Nature Biotechnology*, 28: 573-579
- Levine J.R., Prescott J., Brown K.S., Best S.M., Ebihara H., Feldmann H. 2010. Antagonism of type I interferon responses by new world hantaviruses. *Journal of Virology*, 84: 11790-11801
- Lewin B. 2008. *Genes IX*. 9th ed. Sudbury, Jones and Bartlett Publishers: 127-150
- Maillard P.V., Ciaudo C., Marchais A., Li Y., Jay F., Ding S.W., Voinnet O. 2013. Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science*, 342: 235-238
- Marriott A.C., Polyzoni T., Antoniadis A., Nuttall P.A. 1994. Detection of human antibodies to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus using expressed viral nucleocapsid protein. *Journal of General Virology*, 75: 2157-2161
- Matsumoto M., Kikkawa S., Kohase M., Miyake K., Seya T. 2002. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293: 1364-1369
- Morikawa S., Saijo M., Kurane I. 2007. Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 30: 375-389

NCBI. 2013. BLAST: Basic local alignment search tool. Bethesda, National Center for Biotechnology Information: 1 str.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (1.1.2012)

Nuara A.A., Walter L.J., Logsdon N.J., Yoon S.I., Jones B.C., Schriewer J.M., Buller R.M., Walter M.R. 2008. Structure and mechanism of IFN-gamma antagonism by an orthopoxvirus IFN-gamma-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 1861-1866

Ozkaya E., Dincer E., Carhan A., Uyar Y., Ertek M., Whitehouse C.A., Ozkul A. 2010. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Turkey: occurrence of local topotype. *Virus Research*, 149: 64-70

Palomar A.M., Portillo A., Santibanez P., Mazuelas D., Arizaga J., Crespo A., Gutierrez O., Cuadrado J.F., Oteo J.A. 2013. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks from migratory birds, Morocco. *Emerging Infectious Diseases*, 19: 260-263

Papadopoulos O., Koptopoulos G. 1978. Isolation of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus from *Rhipicephalus bursa* ticks in Greece. *Acta Hellvetica Microbiologica*, 23: 20-28

Perry A.K., Chen G., Zheng D., Tang H., Cheng G. 2005. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Research*, 15: 407-422

Platanias L.C. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*, 5: 375-386

Promega. 2011. Dual-Luciferase® reporter assay system. Madison, Promega: 25 str. (Navodilo za uporabo)

- Saksida A., Duh D., Wraber B., Dedushaj I., Ahmeti S., Avšič-Županc T. 2010. Interacting roles of immune mechanisms and viral load in the pathogenesis of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17: 1086-1093
- Schmaljohn C.S., Nichol S.T. 2001. Bunyaviridae V: Fields virology. Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). 5th ed. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins: 1741-1790
- Shepherd A.J., Leman P.A., Swanepoel R. 1989a. Viremia and antibody response of small African and laboratory animals to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40: 541-547
- Shepherd A.J., Swanepoel R., Leman P.A. 1989b. Antibody response in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Reviews of Infectious Diseases*, 11, Suppl. 4: S801-S806
- Simon M., Johansson C., Mirazimi A. 2009. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry and replication is clathrin-, pH- and cholesterol-dependent. *Journal of General Virology*, 90: 210-215
- Swanepoel R., Gill D.E., Shepherd A.J., Leman P.A., Mynhardt J.H., Harvey S. 1989. The clinical pathology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Reviews of Infectious Diseases*, 11, Suppl. 4: S794-S800
- Taylor K.E., Mossman K.L. 2013. Recent advances in understanding viral evasion of type I interferon. *Immunology*, 138: 190-197
- Tisoncik J.R., Korth M.J., Simmons C.P., Farrar J., Martin T.R., Katze M.G. 2012. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76: 16-32

ViralZone 2013a. Inhibition of host IFN-mediated response initiation by virus. Lausanne, Swiss Institute of Bioinformatics: 1 str.

http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/875.html (6. jan. 2014)

ViralZone 2013b. Inhibition of host STAT1 by virus. Lausanne, Swiss Institute of Bioinformatics: 1 str.

http://viralzone.expasy.org/complete_by_species/282.html (6. jan. 2014)

Walter C.T., Barr J.N. 2011. Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *Journal of General Virology*, 92: 2467-2484

Wang Y., Dutta S., Karlberg H., Devignot S., Weber F., Hao Q., Tan Y.J., Mirazimi A., Kotaka M. 2012. Structure of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein: superhelical homo-oligomers and the role of caspase-3 cleavage. *Journal of Virology*, 86: 12294-12303

Weber F., Elliot R.M. 2009. Bunyaviruses and innate immunity. V: Cellular signaling and innate immune response to RNA virus infections. Braiser A.R., Garcia-Sastre A., Lemon S.M. (eds.). Washington, DC, ASM Press: 287-299

Weber F., Mirazimi A. 2008. Interferon and cytokine responses to Crimean Congo hemorrhagic fever virus; an emerging and neglected viral zoonosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 19: 395-404

Whitehouse C.A. 2004. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, 64: 145-160

Xiao X., Feng Y., Zhu Z., Dimitrov D.S. 2011. Identification of a putative Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411: 253-258

Zivcec M., Safronetz D., Scott D., Robertson S., Ebihara H., Feldmann H. 2013. Lethal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in interferon α/β receptor knockout mice is associated with high viral loads, proinflammatory responses, and coagulopathy. *Journal of Infectious Diseases*, 207: 1909-1921

ZAHVALA

V prvi vrsti bi se rad zahvalil mentorici prof. dr. Tajani Avšič-Županc za izkazano zaupanje in ponujeno priložnost za delo v njenem laboratoriju. Predvsem bi se rad zahvalil za vse konstruktivne ideje, debate in strokovno pomoč pri načrtovanju in izdelavi doktorske disertacije. Hkrati se ji zahvaljujem, ker mi je omogočila širok vpogled v svet znanosti in ker je vodila moje strokovno usposabljanje ter posledično rast vseh področjih.

Hvala Katarini Resman Rus, ki mi je pomagala pri praktičnem delu izdelave doktorske naloge. Hvala, ker si nesebično pomagala pri gojenju celic in transfekcijah in si to počela z nasmehom.

Zahvala gre tudi vsem sodelavkam v laboratoriju, ki vedno podpirale moje nepredvidljivo vedenje, me spodbujale in včasih tudi okregale. Hvala Ana, Katarina, Katja, Mateja, Miša, Nataša.

Roku Kogoju se zahvaljujem za vse debate in zabavne urice tako na Inštitutu kot izven. Prijateljstvo s teboj je pustilo izjemen pečat v teh štirih letih od kar sem na Inštitutu.

Zahvala gre tudi ostalim kolegom na Inštitutu, ki ste mi polepšali dneve s smehom in sproščenim pogovorom.

Zahvalil bi se vsem, ki so prispevali reagente, brez katerih te doktorske naloge ne bi bilo. Hvala dr. Connie Schmaljohn, dr. Yoshiro Kawaoka, prof. Takashi Fujita.

Članom komisije, prof. dr. Srečko Korenu, prof. dr. Mojci Narat in prof. dr. Tatjani Avšič-Županc, hvala za hiter in tehten pregled naloge ter za vse popravke in nasvete, ki so izboljšali disertacijo.

Hvala prof. dr. Miroslav Petrovec, prof. dr. Mario Poljak, prof. dr. Isuf Dedushaj, dr. Isme Humolli in prof. dr. Robert Marks, ker ste prispevali k moji rasti na znanstvenem in osebnem področju.

Hvala vsem mojim, ki ste me vedno podpirali, v dobrem in v slabem. Hvala oči, ker si me naučil dvomiti in hvala mama ker si me naučila, da ima vsaka težava svojo rešitev. Hvala Nina, ker si vedno pozitivna in si na sploh najboljša oseba na svetu. Hvala Viliem, ker si me pripravil do tega da sem dejansko napisal doktorat. Rad vas imam.