PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

A Krími-kongói vérzéses láz vírusának szerológiai vizsgálata Magyarországon és az RNS interferencia alkalmazása, mint hatékony módszer a vírusreplikáció gátlására

PhD értekezés

Földes Fanni Vivien

Témavezető:

Prof. Dr. Jakab Ferenc

PhD, habil

PÉCS, 2021

1. BEVEZETÉS

A felbukkanó és újra felbukkanó zoonózisos fertőzések az állatokról emberekre terjedő megbetegedések. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) megállapítása szerint az újonnan kialakuló emberi fertőző betegségek körülbelül 75%-a zoonózis. Az elmúlt évtizedekben növekvő tendenciával jelentek meg különböző zoonózisos megbetegedések az emberi- és klimatikus faktorok jelenlétének eredményeképp. Az éghajlatváltozás, a mezőgazdaság és az erdőirtás növekvő intenzitása miatt gyakrabban kerülnek kapcsolatba az emberek a vadon élő állatokkal. Továbbá a népsűrűség növekedése a városokban valamint a globális légi forgalom és az utazások is fontos tényezők az ilyen új találkozások kialakításában. A zoonózisokat ezért a fertőző betegségek legkritikusabb kockázati tényezőjének kell tekinteni az emberi egészség és jólét szempontjából [1]. A disszertáció témája a zoonózisok közül a Krími-Kongói vérzéses láz vírus (CCHFV), melyet a világ legnagyobb epidemiológiai szervezetei felbukkanó és újonnan felbukkanó zoonózisnak minősítenek az elmúlt évtizedekben jelentett esetek növekvő száma miatt [2].

A CCHFV a *Nairoviridae* víruscsaládba tartozik. A virális genom három, duplaszálú RNS szakasz által gyűrűvé záródott, egymástól elkülönülő negatív szálú és egyfonalú RNA molekulából épül fel. A három RNS molekulát méretük alapján különböztetjük meg: S, M és L szegmensek. A szegmensek által kódolt virális fehérjék funkciója különböző. Az S szegmens (~1,6 kb) kódolja a nukleokapszid proteint (NP). Az M szegmens (~5,4 kb) a glikoprotein prekurzort kódolja, melyből a különböző érési folyamatok és hasítások során alakulnak ki a virális glikoproteinek. A legnagyobb L szegmens (~12,1 kb) pedig az RNS függő RNS polimeráz gént kódolja [3].

Több, mint 30 kullancsfajt azonosítottak, melyek részt vehetnek a vírus terjesztésében, de ezek közül a legjelentősebbek a *Hyalomma* fajok. Az éghajlat melegedésének következtében a mediterrán kullancsfajok elterjedése egyre északabbra tolódott, például megjelentek *Hyalomma* populációk már Magyarországon is. A kullancsok terjedését egy másik tényező is segíti, a vándormadarakkal történő elterjedés, majd a kedvező éghajlati körülmények hatására történő megtelepedés [4].

A CCHFV világszerte széles körben elterjedt. A bejelentett CCHFV esetek száma az elmúlt két évtizedben nőtt, főleg az eurázsiai régió országaiban, ahol több helyen is endemikus a megbetegedés. A CCHFV jelenlétét Magyarországon az elmúlt évtizedekben kimutatták: az 1960-as években végzett szerológiai tanulmányokban juh, szarvasmarha és humán szérumokat vizsgáltak CCHFV antitestek kimutatása szempontjából [3]. Továbbá 2011-ben nyulakból szintén kimutatták az antitesteket [5], de azóta nem végeztek

szisztematikus vizsgálatot a CCHFV-vel kapcsolatban, felvetve a kérdést, hogy a CCHFV továbbra is Magyarországon cirkulál-e. A fent említett okból kifolyólag, a disszertációm keretein belül elvégzett kísérletekben a magyarországi rágcsáló populációk szerológiai vizsgálata zajlott, a CCHFV szeroprevalencia megállapítása érdekében.

A CCHFV által okozott megbetegedés esetén főként támogató kezelést alkalmaznak, továbbá ribavirin és favipiravir kezelést. A ribavirinnek és a favipiravirnak vírus ellenes hatásáról *in vitro* és *in vivo* ígéretes eredmények állnak rendelkezésre a szakirodalomban [6]. Azonban jelenleg nincs hatékony és széles körben elterjedt vakcina a CCHFV ellen, így újszerű, hatékony terápiák kidolgozása szükséges. A disszertáció főkent egy CCHFV esetében még nem alkalmazott, új antivirális megoldásra koncentrálódik, mely az RNS interferencián alapul. Az értekezés újdonsága abból is fakad, hogy az RNAi-t még nem alkalmazták a CCHFV esetében.

Az RNS interferencia elsődleges célja evolúciósan a védelem volt az exogén patogének és az endogén káros nukleinsavak ellen. Kísérleteink során is ezt a természetes jelenséget használtuk ki a szintetikus siRNS molekulák bejuttatásával. A miRNS génről átíródott pri-miRNS-ekből a Drosha nukleáz pre-miRNS-eket hoz létre, melyek a nukleáris pórus komplexen dokkolódó Ran-GTPáz-Exportin5 segítségével kijutnak a citoplazmába, ahol a Dicer endonukleázhoz kapcsolódnak. Innentől az útvonal megegyezik az exogén úton bejuttatott szintetikus siRNS molekulákéval. A duplaszálú RNS-t az Argonaute protein hasítja, így csak a vezető szál jut be a RISC komplexbe, a másik szál degradálódik. A RISC komplex a vezető szál RNS-sel hozzákapcsolódik a célszekvenciához és teljes komplementaritás esetén a cél mRNS-ek degradációját idézi elő. Ha a komplementaritás inkomplett, akkor a transzláció gátlása következik be [7].

2. CÉLKITŰZÉS

Az értekezés egyik elsődleges fő célja a CCHFV magyarországi megjelenésének vizsgálata a vadon élő rágcsálók körében a természetben előforduló CCHFV szeroprevalencia értékelésével. Ennek megvalósításához a következő célokat tűztük ki: CCHFV rekombináns nukleokapszid fehérje (rNP) előállítása; C57BL/6 egerek immunizálása CCHFV rNP-nel a poliklonális antitest előállításához; immunvizsgálatok (dot-blot, Western-blot, immunfluoreszcencia vizsgálat) optimalizálása; rágcsáló szérumminták előszűrése dot-blot vizsgálattal, majd immunfluoreszcencens vizsgálat megerősítés céljából a CCHFV antitest kimutatása érdekében; CCHFV szeroprevalencia meghatározása a rágcsáló populációkban.

Másik fő célja a disszertációnak az RNS interferencián alapuló antivirális módszer alkalmazása a CCHFV ellen. Ennek megvalósításához a következő célokat tűztük ki: siRNS-ek tervezése és szintézise; siRNS-ek transzfekciója sejtekbe és a transzfekciós kontrollok optimalizálása; optimális siRNS koncentráció megtalálása; siRNS-ek CCHFV-t gátló hatásának megállapításához az RT-ddPCR rendszer optimalizálása; CCHFV replikációt szignifikánsan gátló siRNS-ek meghatározása.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Előkísérletek: rNP előállítása, egér immunizálás

BL21 Rosetta sejteket alkalmaztunk a CCHFV rNP előállításához. Az *Escherichia coli* baktériumokba transzformált „pET28a(+)-CCHFV" konstrukciót a korábbiakban leírtak szerint állítottuk elő [8]. A rNP tisztítását Ni-affinitás kromatográfia módszerével végeztük el a fehérjéken lévő His-tag jelölésekkel. A rNP méretét SDS-PAGE gélfuttatást követően állapítottuk meg és Western-blot vizsgálattal igazoltuk a jelenlétét. A rNP koncentrációját Qubit Fluorometer segítségével határoztuk meg.

Az immunizálás során C57BL/6 egereket oltottunk a CCHFV rNP-nel komplett- majd inkomplett Freud adjuvánssal keverve. Az immunválasz igazolásához Western-blot vizsgálatot alkalmaztunk.

3.2 RNS interferencia kísérletek: vírus titer meghatározása, siRNS-ek tervezése, transzfekciós és infekciós kísérletek, PCR vizsgálatok

A vírus titer meghatározása TCID50 koncentrációmeghatározás módszerével zajlott. A fertőzött sejtek százalékos arányát immunfluoreszcens vizsgálattal állapítottuk meg a vírushígításokat figyelembe véve, majd a TCID50 eredmények kiszámításához a Spearman-Karber módszert alkalmaztuk.

A CCHFV Kosova Hoti törzsének S, M és L szegmensének szekvenciáját használtuk az siRNS-ek tervezéséhez. A szintetikus 21 nukleotid hosszú siRNS-eket a Whitehead siRNA Selection Program segítségével terveztük meg [9]. Minden szegmens esetében 5 db siRNS tervezése és szintetizáltatása történt a Dhramacon™ gyártóval. Az ON-TARGET plus non-targeting siRNA poolt használtuk a kísérletekben siRNS kontrollként.

A kísérletek során az siTOX (Dharmacon™) transzfekciós kontrollt alkalmaztuk a transzfekció hatékonyságának megállapításához. A transzfekciós hatékonyságot az élő és halott sejtek arányából határoztunk meg.

A citotoxicitás megállapításához lumineszcens sejt életképességi vizsgálatokat végeztünk (Promega, Cell Titer Glo Luminescent assay). Ezzel a módszerrel

meghatározható az életképes sejtek száma, a jelen lévő ATP mennyiségi meghatározása alapján. A sejteket különböző siRNS-koncentrációkkal transzfektáltuk (0,1 nM és 200 nM között). A transzfekciós reagens, a Lipofectamine RNAiMax (Thermo Fisher Scientific) citotoxicitását is teszteltük. A CC50-et (50% citotoxikus koncentráció) a GraphPadPrism 8.00 szoftver (Graph Pad Software, San Diego, Kalifornia, USA) alkalmazásával számítottuk ki.

A sejteket háromszoros biológiai replikátumban transzfektáltuk siRNS-ekkel a következő végkoncentrációkban: 10 nM, 50 nM. A transzfektált és kontroll sejtek felülúszójából nukleinsav kivonást végeztünk a gyártói utasítások szerint.

A tervezett siRNS-ek gátló hatásának megállapításához először qRT-PCR mérést végeztünk előszűrés céljából Light Cycler 2.0 rendszeren (Roche). Ezt követően, a szignifikánsan gátló siRNS-ek által előidézett CCHFV replikáció csökkenést RT Droplet Digital PCR rendszerrel mértük.

3.3 Mintagyűjtés, immunoassayk: dot-blot és immunfluoreszcencia vizsgálat

A rágcsálók mintavételezése egy korábbi ökológiai vizsgálat és szerológiai felmérés része volt [10]. A mintagyűjtés a Mecsek hegységben, a Kőszegi-forrás erdőrezervátum területén zajlott 2011-2013-ig, 13 mintavételi ponton.

A rágcsálóktól származó minták előszűrése dot-blot rendszerrel (Bio-Rad) zajlott, az előállított rNP és poliklonális antitestek segítségével. A dot-blot pozitív rágcsálóminták CCHFV antitest jelenlétének megerősítéséhez immunfluoreszcens vizsgálatot végeztünk.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Előkísérletek eredményei

Az előkísérletek során a CCHFV Kosova Hoti törzsét adaptáltuk az A549 sejtvonalra. A CCHFV fertőzés után mikroszkóposan megfigyelhető citopatogén hatást detektáltunk az A549 sejteken, és qRT-PCR-t és immunfluoreszcens vizsgálatot végeztünk a vírus replikációjának megerősítésére. A kísérletek során használt CCHFV vírusszuszpenzió esetén a koncentráció 2.15×10^4 TCID50/ml.

A szerológiai szűrések és az egérimmunizálás alapjaként a CCHFV rNP-t alkalmaztuk. A rNP előállítása és az oszlopos tisztítást követő elúció esetében a rNP pH=5, pH=5.5, és pH=6 esetén volt kimutatható. A koncentrációmérés eredményeként meghatároztuk, hogy az előállított rNP koncentrációja 89 µg/ml.

Az immunizálás során 3 egeret immunizáltunk és egy negatív kontrol egeret alkalmaztunk. Az immunizálás hatékonyságát Western-blot vizsgálattal igazoltuk.

4.2 Szerológiai vizsgálatok eredményei

A szerológiai vizsgálatok alkalmával 2085 db rágcsáló szérum minta tesztelése zajlott CCHFV antitestek kimutatása céljából. A befogott állatok négy kategóriába sorolhatók fajok szerint: 1439 db sárganyakú erdei egér (*Apodemus flavicollis*), 448 db vöröshátú erdeipocok (*Myodes glareolus*), 156 db erdei egér (*A. sylvaticus*) és 42 db pirókegér (*A. agrarius*). A négy vizsgált faj közül az *A. flavicollis*t szignifikánsan gyakrabban fordult elő a mintagyűjtés során.

A CCHFV antitestek kimutatását két szerológiai vizsgálat felhasználásával határoztuk meg: dot-blot előszűrés és immunfluoreszcens vizsgálat segítségével. A 2085 db vizsgált rágcsálóból 20 db (0.96%) mindkét módszerrel pozitívnak bizonyult a CCHFV IgG antitest ellen.

A 20 db CCHFV antitest pozitív rágcsáló szérum minta közül 18 db volt *A. flavicollis.* Egy pozitív minta származott *A. agrarius*tól és egy *M. glareolus*tól. A szeroprevalencia értékek az egyes fajoknál a következőképpen alakultak: 1.25% (18/1439) az *A. flavicollis* esetében, 0.22% (1/448) a *M. glareolus* esetében és 0.24% (1/42) az *A. agrarius* esetében.

2011-ben, a tesztelt 684 db rágcsáló minta közül 5 bizonyult pozitívnak (0.73%). Mind az 5 minta *A. flavicollis*tól származott. 2012-ben az 1165 db szérum mintából 10 volt pozitív, mely 0.09%-os szeroprevalenciát jelent. A 10 db mintából 8 db minta *A. flavicollis*tól származott, egy minta *A. agrarius*ból és egy *M. glareolus*ból. 2013 során gyűjtött 236 rágcsáló szérum mintából 5 volt pozitív (2.12%) és mindegyik minta *A. flavicollis*tól származott.

4.3 RNS interferencia eredményei

A citotoxicitási vizsgálatok során a sejtek morfológiai megfigyelését fénymikroszkóppal végeztünk el illetve lumineszcens sejt életképességi vizsgálatokat (Promega, Cell Titer Glo Luminescent assay) folytattunk. A CC50 értékeket GraphPad szoftver segítségével határoztuk meg.

A CCHFV S szegmens elleni siRNS-ek esetében a mikroszkóposan megfigyelt eredmények a sejtek életképességi tesztjeivel megegyeztek: $CC50_{siS1}$=177.7 nM; $CC50_{siS2}$=246.7 nM, $CC50_{siS6}$=106.5 nM. Az M szegmens elleni siRNS-ek esetében 300 nM körüli CC50 értékeket is megállapítottunk: $CC50_{siM1}$=99.84 nM; $CC50_{siM6}$=316.8 nM, $CC50_{siM17}$=298.8 nM. Az L szegmens elleni siRNS-ek esetében az siL3 és siL4 CC50 értéke 80.92 nM és 54.29 nM érték volt. Az siL1 esetében 109.7 nM értéket mértünk. Azonban az összes szegmens elleni siRNS-t az összehasonlíthatóság miatt legfeljebb 50 nM koncentrációban alkalmaztuk. A kísérletek során alkalmazott legnagyobb koncentrációt az

siRNS-ek legalacsonyabb CC50-értéke határozza meg. Összefoglalva a sejtek életképességének eredményeit, a siRNS-ek minimális koncentrációját 10 nM-ra, a maximális koncentrációt 50 nM-ra állítottuk be minden kísérlet esetében a különböző szegmenseknél. A kísérletek során legalább egy szignifikánsan gátló siRNS-t találtunk minden szegmens esetében.

A CCHFV S szegmensére tervezett siRNS-ek közül az siS2 volt a leghatékonyabb gátló siRNS. Az siRNS-t 50 nM koncentrációban használva szignifikáns gátló hatást tapasztaltunk a pozitív kontrollhoz hasonlítva (77%) ($P<0.001$). Továbbá, az siS6 közepes gátló hatást okozott a CCHFV replikációja során ($P<0.01$). Ezzel ellentétben, az siS1 esetében 10 és 50 nM koncentrációban sem okozott nagy mértékű gátló hatást.

Az M szegmensre tervezett siRNS-ek között az siM1 szignifikáns antivirális aktivitást mutatott 50 nM koncentrációnál (90%) ($P <0,001$). Ezenkívül az siM6 közepes szintű gátló hatást mutatott ($P <0,001$) 10 nM koncentrációnál, és szignifikáns antivirális aktivitást 50 nM koncentrációnál ($P <0,001$). Ezzel szemben az siM17 nem gátolta szignifikánsan a CCHFV replikációt sem 10 nM, sem 50 nM koncentráció mellett.

Az L szegmens esetében, az siL4-et 50 nM koncentrációban alkalmazva erősen gátolta a CCHFV replikációt a pozitív kontrollhoz képest (91%) ($P <0,001$). Az siL3 szintén jelentős aktivitást mutatott a CCHFV replikációján 50 nM koncentráció mellett, míg az siL1 közel azonos hatékonyságot mutatott 50 nM koncentrációban.

Az siRNS-ek gátló hatásának mértékét a pozitív kontrollhoz hasonlítottuk. Az ON-TARGET plus non-targeting siRNS poolt használtuk kontrollként a kísérletek során, mely nem okozott jelentős különbséget a pozitív kontrollhoz hasonlítva. Így a vizsgálatokban a pozitív kontrollhoz hasonlítottuk az siRNS-ek gátló hatását. A különböző siRNS koncentrációk gátló hatásának megállapítását kópiaszám/µl koncentrációban határoztuk meg.

5. DISZKUSSZIÓ

5.1 Szerológiai vizsgálatok eredményeinek megvitatása

A disszertáció a magyarországi CCHFV szeroprevalencia vizsgálatán alapul. Több tanulmány is alátámasztja azt a tényt, hogy a rágcsálók valószínűleg számos vírus terjesztői Magyarországon [5], [8]. A rágcsálók a kullancscsípésnek nagy mértékben kitett állatok, így feltételezhetően a CCHFV illetve más nairovírusok terjesztésében is szerepük van.

A három éves mintagyűjtési periódusban a rágcsálók száma majdnem a duplája volt a 2012-es évben a 2011-eshez hasonlítva. 2012-től 2013-ra a mintaszámban majdnem 80%-os csökkenés tapasztalható. A rágcsálók populációs ingadozásait befolyásoló tényezők különbözők és különféle irányító mechanizmusokat is tartalmazhatnak [11].

A vektor által hordozott mikroorganizmusok esetében az átvitel szempontját figyelembe véve a terjesztés általában szezonális. Rechav és munkatársai két fejlődési állapotuk első szakaszban lévő *Hyalomma* kullancsfajt találták mezei nyulak és más kisemlősök esetében, melyek CCHFV pozitivitást mutattak [12]. Az értekezés vizsgálatai során két kiemelkedő időszak tapasztalható a szeroprevalencia esetén (tavasz, nyár), míg ősszel sokkal alacsonyabb szeroprevalencia tapasztalható.

A dot-blot vizsgálat és az immunfluoreszcens vizsgálat a keresztreakciókhoz vezethet az általunk használt poliklonális antitestek miatt más nairovírusokkal. Azonban a rokon nairovírusokkal vagy a *Bunyaviridae* családból származó más vírusokkal szembeni antitestek esetében kimutatták, hogy nem reagálnak a CCHFV rNP-nel [13]. Az RNS polimerázt és a nukleokapszid fehérjéket kódoló CCHFV L és S szegmensei nagy hasonlóságot mutatnak a Lassa vírussal (*Arenaviridae* család) [14], de Magyarországon nincs molekuláris bizonyítékunk az *Arenaviridae* családból származó vírusok, mint például a vad rágcsálókból származó limfocita choriomeningitis (LCM) vírus jelenlétére. Így az értekezés kísérleteiben használt indirekt immunfluoreszcens vizsgálat specifikusabb CCHFV kimutatásnak bizonyult. A jelenlegi szerológiai vizsgálat eredményei alapján feltételezzük a CCHFV jelenlétét az egész régióban, de további molekuláris vizsgálatokra van szükség a vírus jelenlétének igazolásához. A következő években figyelembe kell venni a CCHFV potenciális belépését új földrajzi területekre és megfelelő, hatékony szeroprevalencia vizsgálatok kiépítését, hogy megállapítható legyen a vírus transzmisszió dinamikája, a lehetséges rezervoár gazdák és vírus vektorok meghatározása a nem endemikus területeken is.

5.2 RNS interferencia vizsgálatok eredményeinek megvitatása

A CCHFV fertőzés kezelésének terápiás lehetőségei hiányosak, így szükséges újabb és kifinomultabb vírusellenes terápiák kidolgozása a nairovírus fertőzések ellen. Az elmúlt években számos tanulmány kimutatta, hogy az RNS interferencia (RNAi) jelenségét kihasználva az siRNS-ek specifikus terápiás stratégiaként működhetnek egyes vírusfertőzések ellen [15]. Ezen szintetikus siRNS molekulák *in vivo* alkalmazása és klinikai használata terápiás lehetőségként azonban még számos kihívást tartogat.

Az RNAi kísérletek során az egyik fő feladat az „off-target effect” elkerülése, amelyben az siRNS-ek nem kötődnek specifikusan a célgénhez, hanem más homológ génekben indukálják a géncsendesítést. A disszertáció kísérletei során az siRNS-ek koncentrációját 50 nM-ban maximalizáltuk, így csökkentve az „off-target effect” előfordulásának lehetőségét.

Az értekezésben szereplő vizsgálatok során a CCHFV S (nukleoprotein), M (glikoproteinek) és L (polimeráz) szegmenseket célzó siRNS-ek antivirális aktivitását vizsgáltuk *in vitro*. Megfigyelhető volt, hogy a 15 darab tesztelt siRNS közül 4 darab (siS2, siM1, siL3, siL4) több mint 70%-kal csökkentette a CCHFV kópiaszámot, a pozitív kontrollhoz képest. A CCHFV replikáció erős gátlása (körülbelül 90%-kal) azonban csak kettő siRNS (siM1, siL4) esetében volt tapasztalható. A CCHFV kópiaszám csökkenését RT-ddPCR-rel határoztuk meg.

A CCHFV S szegmense által kódolt NP központi szerepet játszik a vírus replikációjának szabályozásában. A NP a genomi virális RNS-hez kapcsolódva RNP-ket képez, és templátként szolgál a polimeráz számára. Az elmúlt években számos tanulmány foglalkozott más nairovírusok S szegmensének siRNS-ekkel történő gátlásán alapuló RNS interferencia kísérletekkel [16], [17]. Levin és munkatársai az akabane vírus esetében 99%-os gátló hatást tapasztaltak [18], míg Chiang és munkatársai az andes vírus S szegmense elleni siRNS-ek jelentősen csökkentették (> 60%) a vírusfehérje expresszióját [16]. A hazara vírus gátlása esetén az S szegmensre tervezett siRNS-ek esetében nagyobb gátló hatást mutattak ki (90%), mint az M és L szegmenst célzóknak [15]. Az értekezésben leírt eredmények összhangban vannak a korábbi szakirodalomban megjelent eredményekkel [15], [16], melyek esetén az S szegmens siRNS-ekkel történő célzásával szintén hatékony gátló hatást értek el. Következésképpen elmondható, hogy az S szegmens használata a vírusreplikáció gátlásának célpontjaként tekinthető a jövőbeli terápiák során.

A CCHFV glikoproteinek (Gn, Gc) a vírus sejtbe történő bejutásában játszanak szerepet, illetve a kezdeti kötésben és a fúzióban. Azonban a CCHFV esetében a glikoprotein specifikus szerepének a részletei a sejtbejutáshoz még ismeretlenek [19]. Ellentétben az eddigi publikációs adatokkal, kísérleteink során magas gátló hatást (90%) tapasztaltunk az M szegmens ellen tervezett siRNS-ek esetében. Chiang és munkatársai eredményei alapján az siRNS-ekkel történő gátlás hatására a vírus kópiaszám 90%-al csökkent [16]. Bár az M szegmens által kódolt glikoproteinek a nairovírusok legváltozatosabb részei, a glikoproteinek néhány funkcionális doménje jól konzervált, így ezen részekre az siRNS-ek tervezése is hatásosabb lehet [19].

A CCHFV esetében a három szegmens közül a legnagyobb, az L szegmens, mely az RNS-függő RNS polimeráz gén kódolásáért felelős és számos konzervált funkcionális régió jellemzi [19]. Továbbá, a nukleoprotein mellett az RNS-függő RNS polimeráz végzi a transzkripció és a replikáció folyamatait, amelyek a citoplazmában mennek végbe a vírus replikációs ciklusa alatt. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy az siL4 a pozitív kontrollhoz képest 90%-kal csökkentette a CCHFV kópiaszámot.

A disszertációban ismertetett eredményeink további alapot nyújtanak az RNS interferencián alapuló technikák alkalmazásához a CCHFV fertőzések elleni vírusellenes gyógyszerek kifejlesztésében. Jelenlegi ismereteink szerint az értekezésben szereplő vizsgálat, amelyben a tervezett szintetikus siRNS-eket alkalmaztuk a CCHFV replikációjának csökkentése érdekében *in vitro*, az első CCHFV ellen alkalmazott RNS interferencián alapuló kísérlet.

6. FELHASZNÁLT IRODALOM

[1] B. Ludwig, F. B. Kraus, R. Allwinn, H. W. Doerr, and W. Preiser, "Viral Zoonoses – A Threat under Control?," *Intervirology*, vol. 46, no. 2, pp. 71–78, 2003, doi: 10.1159/000069749.

[2] J. P. Messina *et al.*, "The global distribution of Crimean-Congo hemorrhagic fever," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 109, no. 8, pp. 503–513, Mar. 2015, doi: 10.1093/trstmh/trv050.

[3] Ö. Ergönül, "Crimean-Congo haemorrhagic fever," *Lancet Infect. Dis.*, vol. 6, no. 4, pp. 203–214, Apr. 2006, doi: 10.1016/S1473-3099(06)70435-2.

[4] A. Estrada-Peña *et al.*, "Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, Southwestern Europe, 2010.," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 18, no. 1, pp. 179–80, Jan. 2012, doi: 10.3201/eid1801.111040.

[5] V. Németh *et al.*, "Serologic evidence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in Hungary," *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, vol. 13, no. 4, pp. 270–272, 2013, doi: 10.1089/vbz.2012.1011.

[6] D. W. Hawman *et al.*, "Efficacy of favipiravir (T-705) against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in cynomolgus macaques," *Antiviral Res.*, vol. 181, p. 104858, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104858.

[7] D. M. Dykxhoorn and J. Lieberman, "Silencing viral infection.," *PLoS Med.*, vol. 3, no. 7, p. e242, Jul. 2006, doi: 10.1371/journal.pmed.0030242.

[8] V. Németh *et al.*, "Detection of Dobrava-Belgrade hantavirus using recombinant-nucleocapsid-based enzyme-linked immunosorbent assay and SYBR Green-based real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction," *Arch. Virol.*, vol. 156, no. 9, pp. 1655–1660, Sep. 2011, doi: 10.1007/s00705-011-1013-0.

[9] B. Yuan, R. Latek, M. Hossbach, T. Tuschl, and F. Lewitter, "siRNA Selection Server:

an automated siRNA oligonucleotide prediction server.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. Web Server issue, pp. W130-4, Jul. 2004, doi: 10.1093/nar/gkh366.

[10] M. Oldal *et al.*, "Serologic survey of Orthopoxvirus infection among rodents in Hungary," *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, vol. 15, no. 5, pp. 317–322, 2015, doi: 10.1089/vbz.2014.1731.

[11] R. D. Cavanagh *et al.*, "Disease dynamics in cyclic populations of field voles (Microtus agrestis): cowpox virus and vole tuberculosis (Mycobacterium microti)," *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.*, vol. 271, no. 1541, pp. 859–867, Apr. 2004, doi: 10.1098/rspb.2003.2667.

[12] Y. Rechav, "Seasonal activity and hosts of the vectors of Crimean-Congo haemorrhagic fever in South Africa," *South African Med. J.*, vol. 69, no. 6, pp. 364–368, Mar. 1986, [Online]. Available: https://journals.co.za/content/m_samj/69/6/AJA20785135_5931.

[13] S. Garcia *et al.*, "Evaluation of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus recombinant antigen expressed by Semliki Forest suicide virus for IgM and IgG antibody detection in human and animal sera collected in Iran," *J. Clin. Virol.*, vol. 35, no. 2, pp. 154–159, Feb. 2006, doi: 10.1016/J.JCV.2005.02.016.

[14] A. Guterres, R. C. de Oliveira, J. Fernandes, E. R. S. de Lemos, and C. G. Schrago, "New bunya-like viruses: highlighting their relations," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 49, pp. 164–173, 2017, doi: 10.1016/j.meegid.2017.01.019.

[15] O. Flusin, S. Vigne, C. N. Peyrefitte, M. Bouloy, J. M. Crance, and F. Iseni, "Inhibition of Hazara nairovirus replication by small interfering RNAs and their combination with ribavirin," *Virol. J.*, vol. 8, 2011, doi: 10.1186/1743-422X-8-249.

[16] C.-F. Chiang, C. G. Albariň, M. K. Lo, and C. F. Spiropoulou, "Small interfering RNA inhibition of andes virus replication," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, p. 99764, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0099764.

[17] O. Flusin, S. Vigne, C. N. Peyrefitte, M. Bouloy, J.-M. Crance, and F. Iseni, "Inhibition of Hazara nairovirus replication by small interfering RNAs and their combination with ribavirin," *Virol. J.*, vol. 8, no. 1, p. 249, Dec. 2011, doi: 10.1186/1743-422X-8-249.

[18] A. Levin, L. Kutznetova, R. Kahana, M. Rubinstein-Guini, and Y. Stram, "Highly effective inhibition of Akabane virus replication by siRNA genes," *Virus Res.*, vol. 120, no. 1–2, pp. 121–127, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.virusres.2006.02.009.

[19] M. Zivcec, F. Scholte, C. Spiropoulou, J. Spengler, and É. Bergeron, "Molecular insights into Crimean-Congo hemorrhagic fever virus," *Viruses*, vol. 8, no. 4, p. 106, Apr. 2016, doi: 10.3390/v8040106.

7. PUBLIKÁCIÓK

7.1 Publikációk a PhD értekezés témájában:

Földes F, Madai M, Papp H, Kemenesi G, Zana B, Geiger L, Gombos K, Somogyi B, Bock-Marquette I, Jakab F Small interfering RNAs are highly effective inhibitors of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus replication *in vitro* MOLECULES 25, 5771 (2020)

Földes F, Madai M, Németh V, Horváth G, Bock-Marquette I, Herczeg R, Jakab F Serologic survey of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection among wild rodents in Hungary TICKS AND TICK-BORNE DISEASES S1877-959X(19)30089-5 (2019)

7.2 Előadások és poszter prezentációk PhD értekezés témájában:

Földes F, Madai M, Papp H, Kemenesi G, Zana B, Geiger L, Gombos K, Jakab F Krími-kongói vérzéses láz vírus replikációjának gátlása siRNS-ekkel. XVIII. Szentágothai János Multidiszciplináris Konferencia és Hallgatói Verseny Absztrakt kötet XVIII. János Szentágothai Multidisciplinary Conference and Student Competition Book of Abstracts Pécs, Magyarország, János Szentágothai Scholastic Honorary Society, Faculty of Sciences, University of Pécs, 2020 pp. 19-20. 2 p.

Földes F, Madai M, Németh V, Horváth Gy, Herczeg R, Jakab F Krími-kongói vérzéses láz vírusfertőzés szerológiai felmérése a magyarországi rágcsáló populációkban. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése és a XIII. Fermentációs Kollokvium Eger, Magyarország, 2018. október 17-19.