



Središnja medicinska knjižnica

Cebalo, Ljiljana (2007) *Imunoreakcije uzrokovane infekcijom virusima Hantaan i Andes u MRC-5 i HEK 293 stanicama*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/356>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ljiljana Cebalo

**Imunoreakcije uzrokovane infekcijom
virusima Hantaan i Andes u MRC-5 i HEK
293 stanicama**

DISERTACIJA

Zagreb, 2007.

Ovaj je rad izrađen u Odsjeku za celularnu imunologiju Odjela za istraživanje i razvoj Imunološkog zavoda u Zagrebu te u Odjelu za virologiju Medicinskog instituta za infektivne bolesti vojske Sjedinjenih Američkih Država u Fort Detricku, SAD. Studija je u potpunosti financirana iz sredstava projekta 0021005 Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH (voditeljica doc.dr.sc.Alemka Markotić, dr.med.).

Voditelj rada: Doc.dr.sc Alemka Markotić

ZAHVALA

Svojoj mentorici doc.dr.sc. Alemki Markotić iskreno se i od srca zahvaljujem na nesebičnoj pomoći, uloženom trudu, vrijednim savjetima i prijateljskoj pomoći.

Veliko hvala i dr.sc. Alenki Gagro i prof.dr.sc. Sabini Rabatić na stručnim savjetima i razumijevanju.

Ovaj rad ne bi bio moguć bez korisnih savjeta i ugodnog radnog okruženja za koje su bili zaslužni Alma, Ela, Mateja, Igor, Lidija i Anđelko.

Veliku pomoć u pripremi i izvođenju laboratorijskih testova pružili su mi i ostali kolege s Odjela za istraživanje i razvoj Imunološkog zavoda.

Najiskrenije zahvaljujem prof.dr.sc. Gordani Mlinarić-Galinović na iznimnom razumijevanju i toleranciji tijekom izrade ovog rada.

Na kraju najljepša hvala svojoj obitelji i Kreši, bez kojih ovaj rad ne bi imao smisla.

Ljiljana

SADRŽAJ

SADRŽAJ	1
POPIS KRATICA	3
1. UVOD	5
1.1. Hantavirusi	5
1.1.1. Povijest	5
1.1.2. Morfološke i molekularne značajke hantavirusa	8
1.1.3. Etiologija i epidemiologija hantavirusnih infekcija	11
1.1.4. Dijagnostika hantavirusnih infekcija	14
1.2. Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom	15
1.2.1. Klinička slika	15
1.2.2. Liječenje	17
1.3. Hantavirusni plućni sindrom	18
1.3.1. Klinička slika	18
1.3.2. Liječenje	19
1.4. Čimbenici uključeni u odgovor stanica na infekciju	19
1.4.1. Citokini	19
1.4.2. NF-κB	25
1.4.3. Apoptoza	28
1.4.4. Adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa	32
1.5. MRC-5 i HEK 293 stanice	36
1.5.1. MRC-5 stanice	36
1.5.2. HEK 293 stanice	39
1.6. Imunopatogeneza hantavirusnih infekcija	40
2. CILJEVI RADA I OBRAZLOŽENJE	45
3. HIPOTEZE	48
4. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA	50
4.1. Virus i stanice	50
4.2. Plak test	50
4.3. Izolacija RNK	51
4.4. Detekcija ekspresije gena metodom «GEArray»	52
4.5. Detekcija ekspresije gena reverznom transkripcijom - lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR)	55
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	67
5.1. Promjene u ekspresiji gena nakon infekcije MRC-5 stanica virusima Hantaan i Andes	67
5.1.1. Analiza ekspresije gena metodom «GEArray»	67
5.1.1.1. Analiza ekspresije citokinskih gena	67
5.1.1.2. Analiza ekspresije gena u sklopu NF-κB transkripcijskog puta	70
5.1.1.3. Analiza ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa	72
5.1.2. Analiza ekspresije gena metodom RT-PCR	74
5.1.2.1. Analiza ekspresije citokinskih gena	74
5.1.2.2. Analiza ekspresije gena u sklopu NF-κB transkripcijskog puta	76
5.1.2.3. Analiza ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa	77

5.2. Promjene u ekspresiji gena nakon infekcije HEK 293 stanica virusima Hantaan i Andes	79
5.2.1. Promjene u ekspresiji gena tri dana nakon infekcije HEK 293 stanica virusima Hantaan i Andes	79
5.2.1.1. Analiza ekspresije gena metodom «GEMArray»	79
5.2.1.1.1. Analiza ekspresije gena uključenih u proces apoptoze	79
5.2.1.1.2. Analiza ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa	81
5.2.1.2. Analiza ekspresije gena metodom RT-PCR	82
5.2.1.2.1. Analiza ekspresije gena uključenih u proces apoptoze	82
5.2.1.2.2. Analiza ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa	84
5.2.2. Promjene u ekspresiji gena pet dana nakon infekcije HEK 293 stanica virusima Hantaan i Andes	87
5.2.2.1. Analiza ekspresije gena metodom «GEMArray»	87
5.2.2.1.1. Analiza ekspresije gena uključenih u proces apoptoze	87
5.2.2.1.2. Analiza ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa	88
5.2.2.2. Analiza ekspresije gena metodom RT-PCR	91
5.2.2.2.1. Analiza ekspresije gena uključenih u proces apoptoze	91
5.2.2.2.2. Analiza ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa	93
6. RASPRAVA	96
7. ZAKLJUČCI	121
8. SAŽETAK	123
9. SUMMARY	124
10. POPIS LITERATURE	125
11. ŽIVOTOPIS	146

POPIS KRATICA

ADPRT	adenozildifosfat-riboziltransferaza (od engl. <i>ADP-ribosyltransferase</i>)
ANDV	virus Andes
AP-1	aktivacijski protein 1 (od engl. <i>activator protein 1</i>)
APAF	aktivirajući čimbenik apoptotičkih peptidaza (od engl. <i>apoptotic peptidase activating factor</i>)
Bad	BCL2-antagonist stanične smrti (od engl. <i>BCL2-antagonist of cell death</i>)
Bax	BCL2-pridružen X protein (od engl. <i>BCL2-associated X protein</i>)
Bcl-2	B-limfocitna kronična limfatička leukemija/limfom 2 (od engl. <i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>)
BIK	proapoptotički protein (od engl. <i>BCL2-interacting killer</i>)
BMP	koštani morfogenetski protein (od engl. <i>bone morphogenetic protein</i>)
BSL-3	laboratorij trećeg stupnja zaštite (od engl. <i>biosafety level 3</i>)
CAV	kaveolin (od engl. <i>caveolin</i>)
CCR	kemokinski (C-C motiv) receptor (od engl. <i>chemokine (C-C motif) receptor</i>)
CDH	kadherin (od engl. <i>cadherin</i>)
c-DNK	komplementarna DNK (od engl. <i>complementary DNA</i>)
CEACAM	karcinoembrijskom antigenu-srodna stanična adhezijska molekula (od engl. <i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule</i>)
COL	kolagen (od engl. <i>collagen</i>)
CSF	čimbenik stimulacije kolonija (od engl. <i>colony stimulating factor</i>)
CTNN	katenin (od engl. <i>catenin</i>)
CTSD	katepsin D (od engl. <i>cathepsin D</i>)
CXCR4	kemokinski (C-X-C motiv) receptor (od engl. <i>chemokine (C-X-C motif) receptor</i>)
CYC1	citokrom c (od engl. <i>cytochrome c</i>)
Daxx	protein 6 vezan za domenu smrti (od engl. <i>death domain-associated protein 6</i>)
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	deoksiribonukleotid tri-fosfat (od engl. <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
DOBV	virus Dobra
dsRNK	dvolančana RNK (od engl. <i>double-stranded RNA</i>)
DTT	ditiotreitol (od engl. <i>dithiothreitol</i>)
EBV	virus Epstein-Barr
ECM	izvanstanični matriks (od engl. <i>extracellular matrix</i>)
EGR	čimbenik ranog odgovora rasta (od engl. <i>early growth response</i>)
ELISA	enzimski imunotest (od engl. <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
FADD	FAS-vezana domena smrti (od engl. <i>Fas-associated via death domain</i>)
FGF	čimbenik rasta fibroblasta (od engl. <i>fibroblast growth factor</i>)
FN	fibronektin (od engl. <i>fibronectin</i>)
GADD	zaustavljanjem rasta i oštećenjem DNK-inducibilni protein (od engl. <i>growth arrest and DNA-damage-inducible</i>)
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (od engl. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
G-CSF	granulocitni čimbenik stimulacije kolonija (od engl. <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>)
GM-CSF	granulocitno-makrofagni čimbenik stimulacije kolonija (od engl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HBV	virus hepatitisa B
HCV	virus hepatitisa C
HEK	bubreg ljudskog embrija (od engl. <i>human embryonic kidney</i>)
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetanesulfonska kiselina
HGF	čimbenik rasta hepatocita (od engl. <i>hepatocyte growth factor</i>)
HIV	virus ljudske imunodeficijencije (od engl. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HPS	hantavirusni plućni sindrom (od engl. <i>hantavirus pulmonary syndrome</i>)
HTNV	virus Hantaan
HVBS	hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom
IAHA	test imunoadherencija hemaglutinacije (od engl. <i>immune adherence hemagglutination assay</i>)

ICAM	međustanična adhezijska molekula (od engl. <i>intercellular adhesion molecule</i>)
IFA	neizravna imunofluorescencija (od engl. <i>indirect fluorescent antibody</i>)
Ig	imunoglobulin
IH	inhibicija hemaglutinacije (od engl. <i>inhibition of hemagglutination</i>)
IkB	inhibitorski NF- κ B protein (od engl. <i>inhibitor of κB</i>)
IL	interleukin
INF	interferon
IP-10	interferonom-inducibilni protein 10 (od engl. <i>interferon-inducible protein 10</i>)
ITGA	integrin α
ITGB	integrin β
LAMB	laminin β
MCP	monocitni kemotaktički protein (od engl. <i>monocyte chemotactic protein</i>)
M-CSF	makrofagni čimbenik stimulacije kolonija (od engl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i>)
MEM	minimalni esencijalni medij (od engl. <i>minimum essential medium</i>)
MHC	glavni sklop antigena tkivne podudarnosti (od engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MIP	makrofagni upalni protein (od engl. <i>macrophage inflammatory protein</i>)
MMLV	vrsta reverzne transkriptaze (od engl. <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>)
MMP	matriks metaloproteinaza (od engl. <i>matrix metalloproteinase</i>)
MOI	(od engl. <i>multiplicity of infection</i>)
MRC-5	diploidne stanice-plućni fibroblasti (od engl. <i>medical research council 5</i>)
NCAM	adhezijska molekula neuralnih stanica (od engl. <i>neural cell adhesion molecule</i>)
Nef	negativni čimbenik (od engl. <i>negative factor</i>)
NF- κ B	nuklearni čimbenik κ B (od engl. <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>)
NFKBIB	inhibitor NF- κ B β (od engl. <i>nuclear factor κB inhibitor, beta</i>)
NK(stanice)	prirodnoubilačke stanice (od engl. <i>natural killer</i>)
NRCAM	adhezijska molekula neurona (od engl. <i>neuronal cell adhesion molecule</i>)
PCR	lančana reakcija polimeraze (od engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PECAM	adhezijska molekula trombocitnih/epitelnih stanica (od engl. <i>platelet/endothelial cell adhesion molecule</i>)
PUC18	plazmidna DNK (od engl. <i>PUC18 Plasmid DNA</i>)
PUUV	virus Puumala
RANTES	kemokin RANTES (od engl. <i>regulated upon activation, normal T expressed and secreted</i>)
RNK	ribonukleinska kiselina
iRNK	informacijska ribonukleinska kiselina
SAD	Sjedinjene Američke Države
SELE	selektin E (od engl. <i>selectin E</i>)
SELL	selektin L (od engl. <i>selectin L</i>)
SPP	izlučeni fosfoprotein (od engl. <i>secreted phosphoprotein</i>)
ssRNK	jednolančana RNK (od engl. <i>single-stranded RNA</i>)
Tat	regulatorni transaktivirajući protein (od engl. <i>transactivating regulatory protein</i>)
TGF	transformirajući čimbenik rasta (od engl. <i>transforming growth factor</i>)
THBS	trombospondin (od engl. <i>thrombospondin</i>)
TIMP	tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza (od engl. <i>tissue inhibitor of MMPs</i>)
TNF	čimbenik tumorske nekroze (od engl. <i>tumor necrosis factor</i>)
TP53	tumorski protein p53 (od engl. <i>tumor protein 53</i>)
TRAF	čimbenik povezan s receptorom obitelji TNF (od engl. <i>TNF receptor associated factor</i>)
USAMRID	Medicinski institut za infektivne bolesti vojske Sjedinjenih Američkih Država (od engl. <i>United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases</i>)
VCAM	adhezijska molekula vaskularnih stanica (od engl. <i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VEGF	čimbenik rasta vaskularnog endotela (od engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)

1. UVOD

1.1. Hantavirusi

1.1.1. Povijest

Svijet

Klinička slika hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom (HVBS) na području Azije poznata je već stoljećima te prvi važniji opisi bolesti datiraju s početka prošloga stoljeća [1]. Rusi su već 1913. godine opisali bolest koja se pojavila u okolici Moskve i koja kliničkom prezentacijom može odgovarati HVBS-u. Opisana se bolest kasnije pojavljuje i u drugim područjima zemalja bivšeg Sovjetskog Saveza [2]. Japanski liječnici također opisuju sličnu bolest među vojnicima tijekom okupacije Mandžurije (1935. – 1944.) [3].

Međutim, važna prekretnica u istraživanju hantavirusa bila je epidemija HVBS-a tijekom sudjelovanja vojnika Ujedinjenih Naroda u Korejskom ratu (1951.-1954. godine) [4, 5]. Pažnju istraživača i javnosti znatno je privuklo više od 3000 vojnika oboljelih od akutne bolesti praćene vrućicom te u jednoj trećini slučajeva hemoragijskim manifestacijama. U 5-10% slučajeva, bolest je završila smrtnim ishodom [4, 5]. Od ovoga razdoblja započinje intenzivno istraživanje bolesti koje će dovesti do otkrića hantavirusa kao uzročnika bolesti te mišolikih glodavaca kao rezervoara virusa. Budući da su se sukobi tijekom Korejskoga rata odvijali na području između Sjeverne i Južne Koreje, virus koji su otkrili *Lee i suradnici* 1976. godine dobiva naziv virus Hantaan (HTNV) po rijeci Hantaan koja protječe na tom području [6, 7]. Usprkos znatnim naporima znanstvenika, nakon razdoblja korejskog

rata prošlo je još 25 godina do otkrića da je poljski miš, *Apodemus agrarius*, rezervoar virusa [7].

Tijekom toga razdoblja na području Europe prepoznata je slična, premda blaža bolest koja dobiva naziv *nephropathia epidemica* [8]. Prva velika epidemija ove bolesti na području Europe opisana je za vrijeme Drugog svjetskog rata u Finskoj [9]. Opažanje da konvalescentni serum oboljelih od *nephropathie epidemice* reagira s virusom Hantaan, dovelo je do otkrića virusa Puumala (PUUV) kao uzročnika ovoga blažeg oblika bolesti te riđe voluharice, *Clethrionomys glareolus*, kao rezervoara virusa [10]. Tijekom daljnjih istraživanja otkriveno je više hantavirusa te njihova povezanost s određenom vrstom mišolikih glodavaca. Također je pokazano da je virus Dobrava (DOBV) uzročnik težih oblika hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom na području Europe te da je povezan s glodavcem *Apodemus flavicollis* [11].

Važna godina u istraživanju hantavirusa je zasigurno i 1993. kada je na jugozapadu SAD-a buknuła epidemija hantavirusnog plućnog sindroma (HPS), do tada u Svijetu neprepoznate bolesti. Klinička slika bolesti započela bi s vrućicom, glavoboljom te bolovima u mišićima, međutim ubrzo bi se razvili bilateralni plućni infiltrati i šok. Nakon kratkog razdoblja od 2 do 10 dana od početka bolesti gotovo 50 % slučajeva završilo je smrtnim ishodom. Ubrzo nakon pojave bolesti, otkriven je i uzročnik, virus Sin Nombre, te njegov domaćin *Peromyscus maniculatus* [12, 13]. Tijekom godina bolest se proširila i na ostale dijelove SAD-a te je otkriveno više od 15 različitih hantavirusa koji mogu uzrokovati HPS. Također je retrospektivnim serološkim istraživanjima utvrđeno da se bolest pojavila na području SAD-a znatno ranije, a prvi dokazani slučaj datira još iz 1959. godine [14].

Hrvatska

Dosadašnja istraživanja su pokazala da je gotovo cijela Hrvatska, osim otoka i priobalja, endemsko područje za HVBS te da su infekcije izazvane virusima Puumala i Dobrava [15]. Najčešći rezervoari su *Clethrionomys glareolus* i *Apodemus flavicolis* (Slika 1.) [16].

Clethrionomys glareolus



Izvor: www.zoologi.no/patlas/pat_foto.htm

Apodemus flavicolis



www.konigphoto.com/francais/galerie/xt

Slika 1. Prenosioci virusa Puumala i Dobrava, *Clethrionomys glareolus* i *Apodemus flavicolis*.

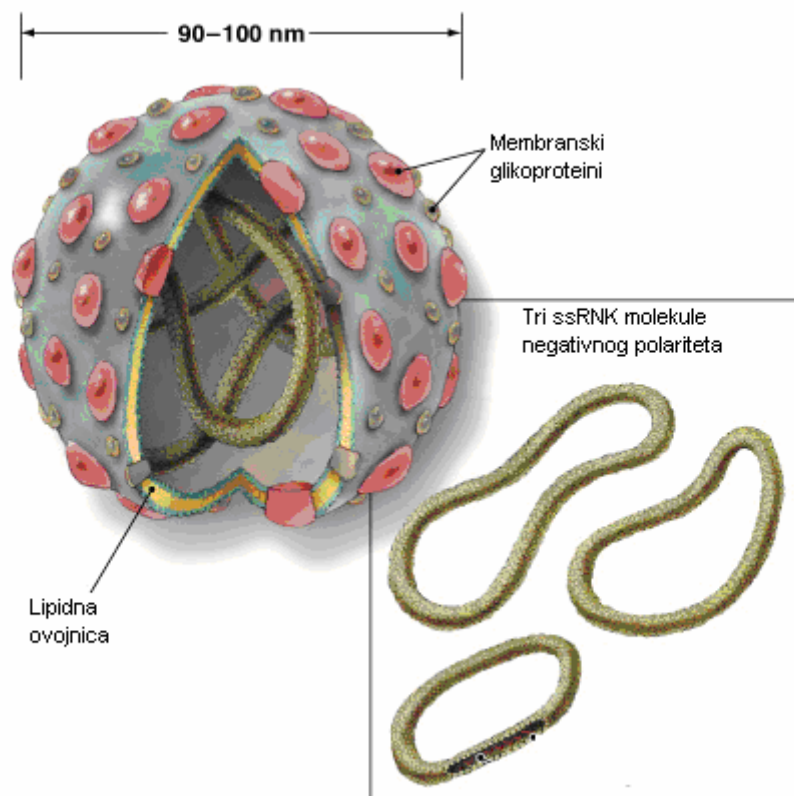
Prvi slučaj HVBS-a u Hrvatskoj zabilježen je 1952. godine te se do danas, svake godine pojavljuju sporadični slučajevi [17]. Nakon toga su opisane i dvije manje epidemije; prva epidemija opisana je 1967. godine na Plitvičkim jezerima, kada je oboljelo 14 šumskih radnika, dok 1989. godine izbija epidemija među vojnicima u blizini Velike Gorice [18, 19].

Prva veća epidemija buknuła je 1995. godine za vrijeme trajanja Domovinskog rata u Hrvatskoj [15, 20, 21]. Epidemija je počela naglo u proljeće s istodobnim pojavljivanjem bolesti na više lokaliteta. Oboljelo je 120 vojnika te nekoliko civila. Do 1995. godine na području Hrvatske bilo je poznato nekoliko prirodnih žarišta bolesti, uključujući Plitvička jezera i područja oko Ogulina, Slunja i Zagreba te pojedini dijelovi Like [22]. Tijekom trajanja epidemije otkrivena su nova žarišta pojavljivanja bolesti na području Male Kapele, Dinare te zapadne Slavonije [15, 21, 23]. Tijekom

daljnjih godina slučajevi HVBS-a pojavljuju se sporadično sve do 2002. godine kada je registrirana do sada najveća epidemija s oko 400 oboljelih [24-28]. Epidemija koja je trajala osam mjeseci započela je u Zajednici liječenih ovisnika u Ivanovcu kod Nove Gradiške te se proširila na gotovo cijelo područje kontinentalne Hrvatske [24, 27]. Uz već navedene lokalitete HVBS se tijekom zadnjeg epidemijskog pojavljivanja također javlja i na požeškom i novogradiškom području, u brodskoj Posavini, virovitičkoj Podravini, osječkom i vinkovačkom području, bjelovarskoj i sisačkoj okolici te u Gorskom kotaru sve do Kvarnerske obale [28, 29]. Tijekom ove epidemije obolijevali su pripadnici svih dobnih skupina, bez osobito izraženog profesionalnog karaktera bolesti. Od posljedica bolesti umro je jedan bolesnik koji je bio štićenik Zajednice liječenih ovisnika u Ivanovcu gdje je epidemija i započela [24, 27].

1.1.2. Morfološke i molekularne značajke hantavirusa

Hantavirusi predstavljaju rod genetički i serološki srodnih virusa koji pripadaju porodici *Bunyaviridae* [30, 31]. Virusna čestica je sferičnog oblika, veličine oko 100 nm te je pri pogledu elektronskim mikroskopom lako uočljiva dvoslojna vanjska membrana debljine oko 5 nm (Slika 2.).



Izvor: www2.bc.cc.ca.us/.../22-15_Hantavirus_1.jpg

Slika 2. Shematski prikaz hantavirusne čestice. Virusna čestica je veličine 90 do 100 nm te su jasno vidljivi lipidna ovojnica i membranski glikoproteini. Unutar ovojnice nalaze se tri jednolančane RNK molekule.

Virion je sastavljen od >50% proteina, 20 - 30% lipida te 2 - 7% ugljikohidrata [32].

Genom virusa predstavlja jednolančana RNK, negativnog polariteta koja se sastoji od tri segmenta koji su označeni kao L - veliki (large - $2,7 \times 10^3$ kDa), M - srednji (medium - $1,2 \times 10^3$ kDa) i S - mali (small - $0,6 \times 10^3$ kDa) [33, 34]. Navedeni segmenti kodiraju tri strukturalna proteina; S segment kodira nukleokapsidni protein (N), M segment kodira dva glikoproteina (G1 i G2), dok L segment kodira polipeptid od otprilike 240 kDa, za koji se vjeruje da predstavlja virusnu polimerazu. Svaki od tri genomska segmenta ima zajedničke 3' terminalne nukleotidne sekvence koje su komplementarne 5' terminalnim sekvencama. Ovi dijelovi genoma mogu stvarati cirkularne strukture za koje se vjeruje da sudjeluju prilikom transkripcije i replikacije virusa [35].

Kao i kod ostalih virusa koji sadrže ovojnicu, hantavirusi se mogu brzo inaktivirati toplinom, deterdžentima te organskim otapalima. Infektivni su pri pH 7 - 9 te pri temperaturi od 4 do 20°C. Do inaktivacije dolazi na 60°C te pri pH 5.

Prva uspješna kultivacija hantavirusa na stanicama u laboratorijskim uvjetima uspješno je provedena tek 1981. godine [36]. Vero stanice (stanice bubrega majmuna), osobito E6 klon, radi njihove osjetljivosti na infekciju hantavirusima najpogodnije su stanice za njihovu kultivaciju. Virus obično u kulturi raste sporo, replicira se u citoplazmi stanice domaćina te se oblikuje i pupa posredstvom Golgi kompleksa, uz iznimku virusa Sin Nombre za koji je pokazano kako u cijelosti pupa iz membrane inficiranih stanica [37-39]. Rano tijekom infekcije najviše se proizvodi N-protein, a RNK virusa može se detektirati u stanicama već šest sati nakon infekcije [40]. Stoga postoje pretpostavke da slično kao u ostalih pripadnika obitelji *Bunyaviridae*, hantavirusni N-protein igra centralnu ulogu tijekom replikacijskog ciklusa [41-43]. N-protein može zaštititi virusnu RNK enkapsidacijom te spriječiti njezinu degradaciju. Također je pokazano međudjelovanje N-proteina i staničnih proteina, što može imati utjecaja na staničnu vitalnost te replikaciju virusa [44]. Za hantavirusne glikoproteine pokazano je kako utječu na staničnu adheziju te fuziju. Tako virus Hantaan ulazi u stanicu koristeći integrinske receptore te vjerojatno dijelom i procesom endocitoze [45]. Pretpostavlja se da blago kiseli okoliš endosoma djeluje na konformacijske promjene površinskih proteina vodeći do fuzije endosoma i virusne membrane [46].

Do danas je otkriveno više od 30 hantavirusa različita genotipa koji su povezani s određenom vrstom mišolikih glodavaca. Od do sada otkrivenih vrsta hantavirusa, njih oko 20 su patogeni za ljude (Tablica 1.) [47].

1.1.3. Etiologija i epidemiologija hantavirusnih infekcija

Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom i hantavirusni plućni sindrom zoonoze su uzrokovane virusima iz roda *Hantavirus*, porodice *Bunyaviridae*. Rasprostranjene su širom svijeta te predstavljaju važan javnozdravstveni problem [30, 31]. Svaki je virus povezan s određenom vrstom glodavca u kojoj razvija trajnu inaparentnu infekciju te je pokazano da filogenija virusa usko prati filogeniju glodavca domaćina [48].

Virus se horizontalno prenosi među glodavcima, vjerojatno putem ugriza i ogreba, premda se ne može isključiti ni uloga zaraženog aerosola [49]. Glodavci virus izlučuju putem urina, fecesa i sline. Udisanje zaraženog aerosola dokazan je način zaraze u ljudi, međutim postoji opis ljudske zaraze i nakon ugriza glodavca [50]. Do danas nije dokazan prijenos hantavirusa koji uzrokuju HVBS s čovjeka na čovjeka, međutim epidemija HPS-a uzrokovanog virusom Andes (ANDV) koja je buknila u Argentini pokazatelj je mogućeg interhumanog prijenosa [51, 52]. Pet oboljelih tijekom epidemije bili su liječnici koji su imali kontakt s bolesnicima, dok nisu imali kontakt s glodavcima. Opisano je i više slučajeva laboratorijske infekcije pri kontaktu radnika sa zaraženim glodavcima [53, 54].

Tijekom proljeća i ljeta raste incidencija HVBS-a, radi većeg kontakta ljudi s glodavcima tijekom poljoprivrednih radova te boravka u prirodi [32]. Značajan broj slučajeva pojavljuje se kao posljedica profesionalne izloženosti kod vojnika, šumskih radnika te poljodjelaca [55, 56]. Epidemijska pojavljivanja obično su posljedica povećane brojnosti glodavca koja je uzrokovana klimatskim i okolišnim promjenama te cikličkim varijacijama u brojnosti populacija glodavaca. Bolest se vrlo rijetko pojavljuje u djece, te su muškarci češće zahvaćeni od žena [57].

Procjenjuje se da u svijetu godišnje oboli od 60000 do 100000 ljudi, od čega se najviše slučajeva pojavljuje u Azijskim zemljama [55]. Geografska distribucija HVBS-a i HPS-a odgovara rasprostranjenosti glodavca-domaćina određenog virusa (Tablica 1.).

Tablica 1. Kliničke manifestacije, geografska distribucija i rezervoari patogenih hantavirusa

Hantavirusi	Bolest	Geografska distribucija	Rezervoar virusa
virus Amur	HVBS	Azija	<i>Apodemus peninsula</i>
virus Andes	HPS	Južna Amerika	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>
virus Araraquara	HPS	Južna Amerika	<i>Bolomys lasiurus</i>
virus Araucaria	HPS	Južna Amerika	<i>Bolomys lasiurus</i> (?)
virus Bayou	HPS	Sjeverna Amerika	<i>Oryzomys palustris</i>
virus Bermejo	HPS	Južna Amerika	<i>Oligoryzomys chacoensis</i>
virus Black Creen Canal	HPS	Sjeverna Amerika	<i>Sigmodon hispidus</i>
virus Castelo dos Sonhos	HPS	Južna Amerika	<i>Oligoryzomyys spp.</i> (?)
virus Choclo	HPS	Južna Amerika	<i>Oligoryzomys flavescens</i>
virus Dobrava-Aa	HVBS	sjeveroistočna i centralna Europa	<i>Apodemus agrarius</i>
virus Dobrava-Af	HVBS	jugoistočna Europa i Bliski Istok	<i>Apodemus flavicolis</i>
virus Hantaan	HVBS	istočna Azija	<i>Apodemus agrarius</i>
virus Hu39694	HPS	Južna Amerika	<i>Oligoryzomys flavescens</i>
virus Juquitiba	HPS	Južna Amerika	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
virus Laguna negra	HPS	Južna Amerika	<i>Calomys laucha</i>
virus Lechiguanas	HPS	Južna Amerika	<i>Oligoryzomys flavescens</i>

virus Maciel	HPS	Južna Amerika	<i>Necromys benefactus</i>
virus Monongahela	HPS	Sjeverna Amerika	<i>Peromyscus maniculatus</i>
virus New York	HPS	Sjeverna Amerika	<i>Peromyscus leucopus</i>
virus Oran	HPS	Južna Amerika	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>
virus Puumala	HVBS	Europa	<i>Clethrionomys glareolus</i>
virus Rio Mamore	HPS	Južna Amerika	<i>Oligoryzomys microtis</i>
virus Seoul	HVBS	cijeli Svijet	<i>Rattus norvegicus</i>
virus Sin nombre	HPS	Sjeverna Amerika	<i>Peromyscus maniculatus</i>
virus Tula	HVBS?	Europa	<i>Microtus arvalis</i>

HVBS-hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom, HPS-hantavirusni plućni sindrom

Tablica priređena prema *Schmaljohn i sur.* [30] i *Khaiboullina i sur.* [58].

Na području Europe HVBS uzrokuju virusi Dobrava i Puumala. Međutim, u posljednje vrijeme postoje podaci da u Europi i virus Tula uzrokuje bolest u ljudi [59]. Virus Dobrava je najpatogeniji uzročnik HVBS u Europi te s njime povezana smrtnost iznosi do 12%, poglavito radi teških hemoragijskih manifestacija. Zanimljivo je da dva genetički slična podtipa virusa Dobrava prenose dva nesrodna mišolika glodavca; *Apodemus flavicollis* (DOBV-Af) i *Apodemus agrarius* (DOBV-Aa) [60]. Virus Puumala kojeg prenosi *Clethrionomys glareolus* je rasprostranjen većinom na području sjeverne i središnje Europe te obično uzrokuje blaži oblik bolesti nazvan *nephropathia epidemica* [61, 62].

U svibnju 1993. godine na sjevernoameričkom kontinentu buknuła je epidemija akutne respiratorne bolesti te od tada započinje era istraživanja HPS-a te virusa uzročnika bolesti [12]. Virus Sin Nombre je prvi virus uzročnik HPS-a koji je otkriven, a prenosi ga *Peromyscus maniculatus* [63]. Od 1995. godine prijavljuju se i prvi

slučajevi HPS-a s područja Središnje i Južne Amerike te se otkrivaju novi uzročnici bolesti [64-66].

Do sada je zabilježeno oko 1000 slučajeva ove teške bolesti kod koje je smrtnost vrlo visoka te iznosi oko 50% oboljelih [63].

1.1.4. Dijagnostika hantavirusnih infekcija

Uz kliničku sliku i simptome karakteristične za HPS ili HVBS, za kvalitetnu dijagnostičku obradu izrazito su važni i epidemiološki podaci o mogućoj izloženosti mišolikim glodavcima, osobito u razdoblju epidemije.

Međutim, kliničku sumnju treba potvrditi i specifičnim laboratorijskim testovima. U kliničkoj praksi najčešće se koriste serološki testovi za dokazivanje specifičnih antitijela na hantaviruse. IgM antitijela pojavljuju se vrlo rano, već u prvim danima bolesti te perzistiraju nekoliko mjeseci, dok se IgG antitijela pojavljuju u drugom tjednu bolesti i ostaju prisutna doživotno [67, 68].

Enzimski imunotest (ELISA) je metoda izbora za ranu detekciju IgM antitijela na hantaviruse te je u kombinaciji s IgG testom snažno dijagnostičko sredstvo. Ovi serološki testovi pokazuju visoku specifičnost i osjetljivost [69].

Test neizravne imunofluorescencije (IFA) je metoda koja pokazuje visoku osjetljivost i specifičnost u detekciji IgG antitijela, dok slabiju osjetljivost pokazuje kod detekcije IgM antitijela [70, 71].

Test inhibicije hemaglutinacije (IH) jednostavan je i brz test koji pokazuje veću osjetljivost od IFA-testa, premda postoji rizik od subjektivne procjene rezultata, dok

se test imunoadherencija hemaglutinacije (IAHA) može koristiti za serološku diferencijaciju hantavirusa [72-74].

Detekcija hantavirusnog antigena najčešće se primjenjuje za dokazivanje hantavirusa u bioptičkom ili obdukcijskom materijalu [75].

Kod direktne etiološke dijagnostike hantavirusa koriste se metode kojima možemo detektirati sam virus, odnosno virusni antigen. U tu svrhu mogu se koristiti različite metode poput lančane reakcije polimeraze (PCR, od engl. *polymerase chain reaction*) ili izolacije virusa [76, 77]. Međutim, ove se metode ne koriste u rutinskoj dijagnostici radi dužine trajanja, potrebe za stupnjem 3 biološke zaštite pri radu te zbog još uvijek niske osjetljivosti (PCR).

Također se u zadnje vrijeme u praksu uvode i brzi probirni testovi za detekciju hantavirusnih antitijela. Ovi imunokromatografski testovi mogu dati rezultat unutar nekoliko minuta [78, 79].

1.2. Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom

1.2.1. Klinička slika

Težina kliničke slike HVBS-a varira od subkliničkih infekcija, preko blagih i srednje teških, do teških oblika bolesti sa smrtnim ishodom [80, 81]. Kliničkom slikom dominiraju vrućica, slabost, mijalgije, mučnina, hemoragijske manifestacije, zamućenje vida te zahvaćenost bubrežnog sustava [1, 82]. Još uvijek nisu poznati svi parametri koji utječu na težinu bolesti i njezino trajanje. Pored općeg

zdravstvenog stanja bolesnika, njegove genetske predispozicije, važnu ulogu također imaju genetske karakteristike samih virusa [83, 84].

Inkubacija HVBS-a traje od 5 do 40 dana. Tipična se klinička slika može podijeliti u pet faza, a svaka je karakterizirana prepoznatljivim kliničkim i laboratorijskim značajkama [1, 85]. Međutim, ne mora se svih pet faza javiti u svakog bolesnika.

Bolest obično počinje naglo s izraženim općim simptomima, visokom temperaturom praćenom zimicom i tresavicom te bolovima u mišićima, osobito u lumbalnom području, leđima i truhu. U ovoj ranoj fazi bolesti karakteristične su i jake glavobolje, umor, mučnina te nerijetko povraćanje ili proljev. Premda nisu izraženi kao kod HPS-a, respiratorni simptomi (hunjavica, kašalj, konjunktivitis) prisutni su u oko polovice bolesnika. Tijekom ove prve ili febrilne faze koja traje tri do sedam dana pojavljuju se i hiperemija kože lica i vrata, dok je u laboratorijskim nalazima prisutna trombocitopenija, a u urinu albuminurija i eritrociturija.

Nakon ove faze, bolesnik ulazi u drugu ili hipotenzivnu fazu koja traje jedan do dva dana. Glavna značajka ove faze je sniženje krvnoga tlaka te u težim slučajevima zatajenje bubrega, sve do pojave šoka. U laboratorijskim nalazima pojavljuje se porast vrijednosti ureje i kreatinina, leukocitoza sa skretanjem u lijevo te proteinurija i trombocitopenija. Treća ili oligurijska faza obično nastupa početkom drugog tjedna bolesti. U ovoj fazi ureja i kreatinin dosežu najveće vrijednosti te se javlja oligurija ili anurija te elektrolitski disbalans. Bolesnik osjeća jake bolove te se pojavljuju hemoragijske manifestacije. Hemoragije mogu varirati od petehijskog osipa na koži i sluznicama, preko subkonjunktivalnog krvarenja, do manifestnih krvarenja u pojedinim organskim sustavima (nos, pluća, probavni sustav, bubrezi, mozak). Također se u težim slučajevima mogu pojaviti i komplikacije sa strane središnjeg živčanog sustava (dezorijentacija, nemir, somnolencija). Na ovu se fazu nadovezuje

kompenzacijska poliurijska faza kod koje se izlučuju velike količine urina niske specifične težine. Ova faza može potrajati do dva tjedna te normalizacijom diureze nastupa poboljšanje u kliničkoj slici te normalizacija laboratorijskih nalaza. Tada nastupa rekonvalescentna ili faza oporavka. Karakterizirana je normalizacijom krvnoga tlaka i bubrežnih funkcija. Ovisno o težini bolesti oporavak može trajati i do nekoliko mjeseci. HVBS obično završava potpunim ozdravljenjem, premda su opisani i slučajevi s kroničnim posljedicama u vidu povišenog krvnog tlaka [86, 87].

1.2.2. Liječenje

Zlatni standard u liječenju HVBS-a je suportivna terapija [88]. Glavni elementi ovoga pristupa jesu održavanje intravaskularnog volumena te elektrolitske ravnoteže. U težim slučajevima bolesti kada dolazi do zatajenja bubrega primjenjuje se i hemodijaliza. Međutim, novija istraživanja pokazuju da se intravenskim davanjem antivirusika ribavirina do sedmog dana od početka bolesti, težina bolesti, a i smrtnost smanjuju [89, 90].

1.3. Hantavirusni plućni sindrom

1.3.1. Klinička slika

Sam razvoj bolesti odvija se u tri faze; prodromalna, kardiopulmonarna te rekonvalescentna faza [80]. Nakon inkubacijskog perioda koji može trajati jedan do dva tjedna, obično se javlja vrućica praćena zimicom, glavobolja te mijalgije. Česti su također i gastrointestinalni simptomi kao što su mučnina, povraćanje, bolovi u trbuhu ili proljev. Premda sam početak bolesti može nalikovati HVBS-u daljnji razvoj bolesti znatno se razlikuje. Kod HPS-a je rijetko prisutna blaga zahvaćenost bubrega te se ne javljaju hemoragijske manifestacije. Samo nekoliko dana od početka bolesti javlja se dispneja povezana s respiratornom dekompenzacijom te se razvija plućni edem [63, 91]. Kod svih bolesnika koji su hospitalizirani prisutan je infiltrat u plućnom parenhimu. Rendgenska snimka pluća kod bolesnika koji su razvili respiratornu insuficijenciju na početku otkriva intersticijalni edem koji se razvija u bibazilarne infiltrate koji se ubrzo proširuju i na ostale dijelove pluća. U laboratorijskim nalazima prisutna je trombocitopenija, hemokoncentracija i leukocitoza. Također je prisutno i umjereno povećanje vrijednosti laktat dehidrogenaze i aspartat aminotransferaze te alanin aminotransferaze. Proteinurija je često prisutna, dok je koncentracija kreatinina obično u granicama normale.

Teška kardiopulmonarna disfunkcija loš je prognostički pokazatelj u bolesnika s HPS-om [92]. Obično se javlja smanjenje ventrikularne sistoličke funkcije. Kod bolesnika s težim oblikom bolesti smrt nastupa nakon 1-3 dana, međutim opisani su i smrtni ishodi nakon samo nekoliko sati [92, 93]. Smrtnost je kod ove bolesti vrlo visoka te iznosi oko 50% [63].

1.3.2. Liječenje

Premda još uvijek postoje dvojbe može li se HPS prenijeti s čovjeka na čovjeka respiratornim putem, dobro je izolirati bolesnike budući da u diferencijalnu dijagnozu ulazi i plućni oblik kuge. Ribavirin se nije pokazao djelotvornim u dosadašnjim istraživanjima liječenja HPS-a te se i ne koristi u rutinskom liječenju [94]. Bolesnici kod kojih postoji sumnja na HPS trebali bi se liječiti antibiotskim režimom koji obuhvaća tipične i atipične uzročnike upale pluća i sepse, uključujući i *Yersiniu pestis*. Vrlo je važan monitoring oksigenacije tako da se pravovremeno može provesti intubacija i mehanička ventilacija ukoliko za to bude potrebe. Također je potrebno pratiti i vrijednosti arterijskog tlaka. Inotropni lijekovi kao što su dobutamin, dopamin i norepinefrin trebali bi se koristiti rano u liječenju šoka kod bolesnika s HPS-om. Također se preporučuje i agresivna terapija kardijalnih aritmija, osobito epizoda elektromehaničke disocijacije [92].

1.4. Čimbenici uključeni u odgovor stanica na infekciju

1.4.1. Citokini

Citokini su farmakološki aktivni proteini koji igraju vrlo važnu ulogu u obrani organizma od različitih patogena, uključujući viruse [95, 96]. Ove biološki aktivne molekule izlučuje stanica bilo zbog djelovanja na svoje funkcije (autokrini učinak) ili funkcije susjednih stanica (parakrini učinak). Također su uključeni u patogenezu i razvoj simptoma tijekom infekcije. Svoje učinke ostvaruju vezivanjem za površinske

receptore na ciljnim stanicama te posljedično prosljeđujući signal u jezgru stanice aktivirajući transkripciju različitih gena [97, 98].

Često pojedinačni citokini imaju višestruke biološke učinke. Međutim, različiti citokini mogu također imati isti učinak, što osigurava funkcionalnu raznovrsnost upalnog odgovora i imunološkog sustava [99]. Biološke promjene izazvane citokinima kreću se od proliferacije stanica, njihove aktivacije, diferencijacije pa sve do inhibicije rasta te stanične smrti.

Citokine možemo podijeliti u četiri skupine, ovisno o njihovoj indukciji te funkcionalnim karakteristikama: (a) početni ili urođeni citokini, (b) adaptivni ili stečeni citokini, (c) kemokini i (d) hematopoetski čimbenici rasta [95].

Imunoreakciju na patogene možemo tradicionalno podijeliti na urođenu i stečenu. Pojedini citokini mogu biti sastavni dio obiju faza imunološkog odgovora ili biti specifični za određenu fazu odgovora [100]. Tako se u ranoj fazi obično stvaraju interleukin (IL)-1, IL-6 i čimbenik tumorske nekroze alfa (TNF- α , od engl. *tumor necrosis factor alpha*), dok se interferon γ (IFN- γ , od engl. *interferon gamma*) može lučiti i tijekom urođenog, ali i stečenog odgovora. S druge strane, IL-2 je citokin karakterističan za stečeni imunološki odgovor [100, 101].

Urođeni citokini uključeni su u primarni i rani odgovor na infekciju. Luče se od strane različitih stanica u tijelu ili stanica koje sudjeluju u mehanizmima urođene imunosti kao što su: polimorfonukleari, monociti, prirodno ubilačke stanice (NK, od engl. *natural killer*) ili dendritičke stanice. U ovu skupinu pripadaju mnogi važni medijatori imunološkog odgovora, uključujući IL-1, IL-6, IFN- α/β i TNF- α . Postoje najmanje dva puta proizvodnje citokina tijekom ranog imunološkog odgovora. Prvi vodi do proizvodnje visokih razina IFN- α i IFN- β , što je karakteristika ranog odgovora prilikom mnogih virusnih infekcija [99, 102]. Ovi su citokini bili najprije opisani u

sklopu svojeg antivirusnog djelovanja. Glavni su im učinci djelovanje na ekspresiju brojnih citokina i citokinskih receptora, mijenjanje distribucije imunoloških stanica *in vivo*, aktivacija NK citotoksične aktivnosti te inhibicija odgovora NK-stanica na djelovanje IL-12 [103-105].

Drugi put vodi do lučenja IL-6, IL-12, TNF- α , te ranog IFN- γ . Ovakav citokinski profil sastavni je dio mnogih nevirusnih, ali i određenih virusnih infekcija [106, 107].

TNF- α važna je karika u imunološkom odgovoru s obzirom na njegovo izraženo proupalno djelovanje koje se očituje u indukciji adhezivne sposobnosti vaskularnog endotela, pojačane vaskularne permeabilnosti, aktivaciji monocita te indukciji ekspresije MHC (glavni sustav tkivne podudarnosti, od engl. *major histocompatibility complex*) klase I [108].

Biološko djelovanje IL-1 znatno se preklapa s djelovanjem TNF- α [109]. Ovaj čimbenik stoga igra važnu ulogu u poticanju imunoreakcija te djeluje kao endogeni pirogen [109]. Zanimljivi su i lokalni učinci ovoga citokina, koji uključuju poticanje sinteze metaloproteinaza u hondrocitima te kolagenaza u sinovijalnim stanicama, djelovanja koja pridonose oštećenju tkiva.

IL-6 je važan citokin koji posjeduje brojne biološke učinke, a glavna mu je uloga stimulacija imunoreakcije. Ovo djelovanje odraz je indukcije aktivnosti stanične imunosti stimulacijom T-limfocita, ali i humoralne imunosti potičući diferencijaciju B-limfocita u plazma stanice te inducirajući lučenje imunoglobulina [110].

IFN- γ se prvenstveno izlučuje od strane NK-stanica tijekom ranih imunoreakcija, premda ga mogu lučiti i T-limfociti tijekom stečene imunosti. Glavne su značajke ovoga citokina aktivacija monocita te djelovanje na aktivnost više citokina i kemokina [111].

Za razliku od prije opisane grupe, adaptivni citokini sudjeluju u kasnijim imunološkim događajima te igraju važnu ulogu u stečenoj imunosti. Različite podgrupe T-limfocita mogu izlučivati različite citokine, ovisno o polaritetu imunoreakcije. Tako je Th1 odgovor povezan s izlučivanjem IL-2 i IFN- γ , dok je Th2 odgovor karakteriziran izlučivanjem IL-4, IL-5 i IL-13. Istraživanja su pokazala da različite virusne infekcije mogu inducirati proizvodnju IL-2. Uz njegovo autokrino djelovanje na rast T-limfocita, IL-2 također djeluje i na njihovo povećano lučenje IFN- γ [112]. Izlučivanje IFN- γ od strane T-limfocita važan je čimbenik u antivirusnom odgovoru. Ovaj citokin ima važnu imunoregulatornu funkciju, djelujući na izotipsko prekapćanje klasa imunoglobulina te pojačavajući antigensku prezentaciju.

IL-4 i IL-13 posjeduju strukturalne i funkcionalne sličnosti. Oba su citokina važna u regulaciji lučenja antitijela IgE te modulaciji funkcije mastocita i eozinofila [113]. IL-5 ima djelovanje slično prije spomenutim citokinima u aktivaciji eozinofila te je njegova prisutnost opisana u nekim virusnim infekcijama [114].

Kemokini čine obitelj kemotaktičkih citokina koji su u centru istraživanja zadnjih 20 godina. Luče ih mnoge stanice imunološkog sustava, ali i stanice koje direktno ne sudjeluju u obrani domaćina kao što su fibroblasti i epitelne stanice. Do danas je poznato 46 kemokina i 23 kemokinskih receptora, ali mnogi se kandidati još istražuju. Podjela kemokina bazirana je na njihovoj primarnoj aminokiselinskoj sekvenci, tako da razlikujemo četiri grupe: CXC - α kemokini, CC - β kemokini, C - γ kemokini i CX₃C kemokini [115].

Kemokini svoju funkciju ostvaruju vezivanjem za specifične receptore, koji su građeni od sedam transmembranskih domena. Ključna uloga kemokina je u usmjeravanju i aktivaciji leukocita. Pokazano je da pored njihove osnovne funkcije, kemokini i njihovi receptori također igraju važnu ulogu prilikom virusnih infekcija te

virusne replikacije. Tako je pokazano kako kemokinski receptori čine dio receptor/fuzijskog kompleksa ljudskog virusa primarne imunodeficijencije (HIV, od engl. *human immunodeficiency virus*) te da određeni kemokini mogu utjecati na ulazak virusa u stanicu [116]. Mnogi virusi kao što su herpesvirusi kodiraju stvaranje različitih kemokina koji posljedično djeluju na replikaciju ne samo primarnog virusa, već i ostalih nesrodnih virusa [117].

Kemokine CXC većinom luče aktivirani monociti, a djeluju poglavito na neutrofile, monocite, limfocite te na nehematopoetske stanice tijekom cijeljenja rana [118]. Vrlo važan predstavnik prve skupine kemokina je IL-8. Njegova glavna uloga je kemotaksija neutrofila. U ovu skupinu kemokina također pripada i interferonom-inducibilni protein 10 (IP-10, od engl. *interferon-inducible protein 10*), kojeg luče mnoge stanice, a prvenstveno djeluje na kemotaksiju limfocita [118].

Kemokine C-C luče prvenstveno aktivirani T-limfociti i monociti, međutim najmanje dva člana, makrofagni upalni protein (MIP, od engl. *macrophage inflammatory protein*) i RANTES (od engl. *regulated upon activation, normal T expressed and secreted*) također mogu lučiti i NK-stanice [115]. Važni predstavnici ove skupine jesu i monocitni kemotaktički proteini (MCP-1,2,3, od engl. *monocyte chemotactic protein*) te MIP-1 α i 1 β . Njihovo je kemotaktičko djelovanje prvenstveno usmjereno na monocite/makrofage.

Obitelj C kemokina trenutno ima samo jednog člana, limfotaktin, koji djeluje kemotaktično na limfocite. Od kemokina C-X₃-C također je poznat do sada samo jedan član, fraktalkin, koji djeluje na monocite i limfocite.

Četvrta grupa citokina sastavljena je od medijatora uključenih u rast, diferencijaciju i sazrijevanje stanica. Ovoj grupi pripadaju granulocitno-makrofagni čimbenik stimulacije kolonija (GM-CSF, od engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating*

factor), granulocitni čimbenik stimulacije kolonija (G-CSF, od engl. *granulocyte colony-stimulating factor*) i makrofagni čimbenik stimulacije kolonija (M-CSF, od engl. *macrophage colony-stimulating factor*), koji redom stimuliraju sazrijevanje granulocitno-monocitnih, granulocitnih, odnosno monocitnih prekursora. Premda im je primarna funkcija u sklopu normalnog razvoja ciljnih stanica, neki pripadnici ove grupe mogu sudjelovati i u imunološkom odgovoru [119, 120]. Tako GM-CSF pojačava mikrobicidnu aktivnost, oksidativni metabolizam i fagocitozu neutrofila i makrofaga, a može djelovati i kao kemoatraktant za neutrofile i eozinofile [121, 122]. Nadalje, pokazana je njegova uloga u imunološkom prepoznavanju, budući da uzrokuje funkcionalno sazrijevanje Langerhansovih stanica u dendritičke stanice. Za M-CSF je također pokazana imunološka uloga u vidu indukcije sinteze proupalnih citokina te poticanja oksidativnog metabolizma [123].

Čimbenici rasta fibroblasta (FGFs, od engl. *fibroblast growth factors*) predstavljaju veliku obitelj molekula koja djeluje na kompleksne biološke procese u tijelu [124]. Pokazano je kako mnogi signali potiču lučenje ovih molekula uključujući metabolički stres (nizak pH, hipokalcemija), citokine, mehanički stres, genetske mutacije te imunoreakcije posredovane imunološkim stanicama koje su dospjele na mjesto upale. FGFs igraju važnu ulogu u nekoliko procesa koji uključuju pregradnju tkiva kao što su embrionalni razvoj, neoangiogeneza, zaraštavanje rana te upala [125]. Ove se promjene ostvaruju djelovanjem ovih čimbenika rasta na vlastite receptore koji dalje posreduju u učincima kao što su stanično preživljavanje, proliferacija, migracija, invazija i diferencijacija.

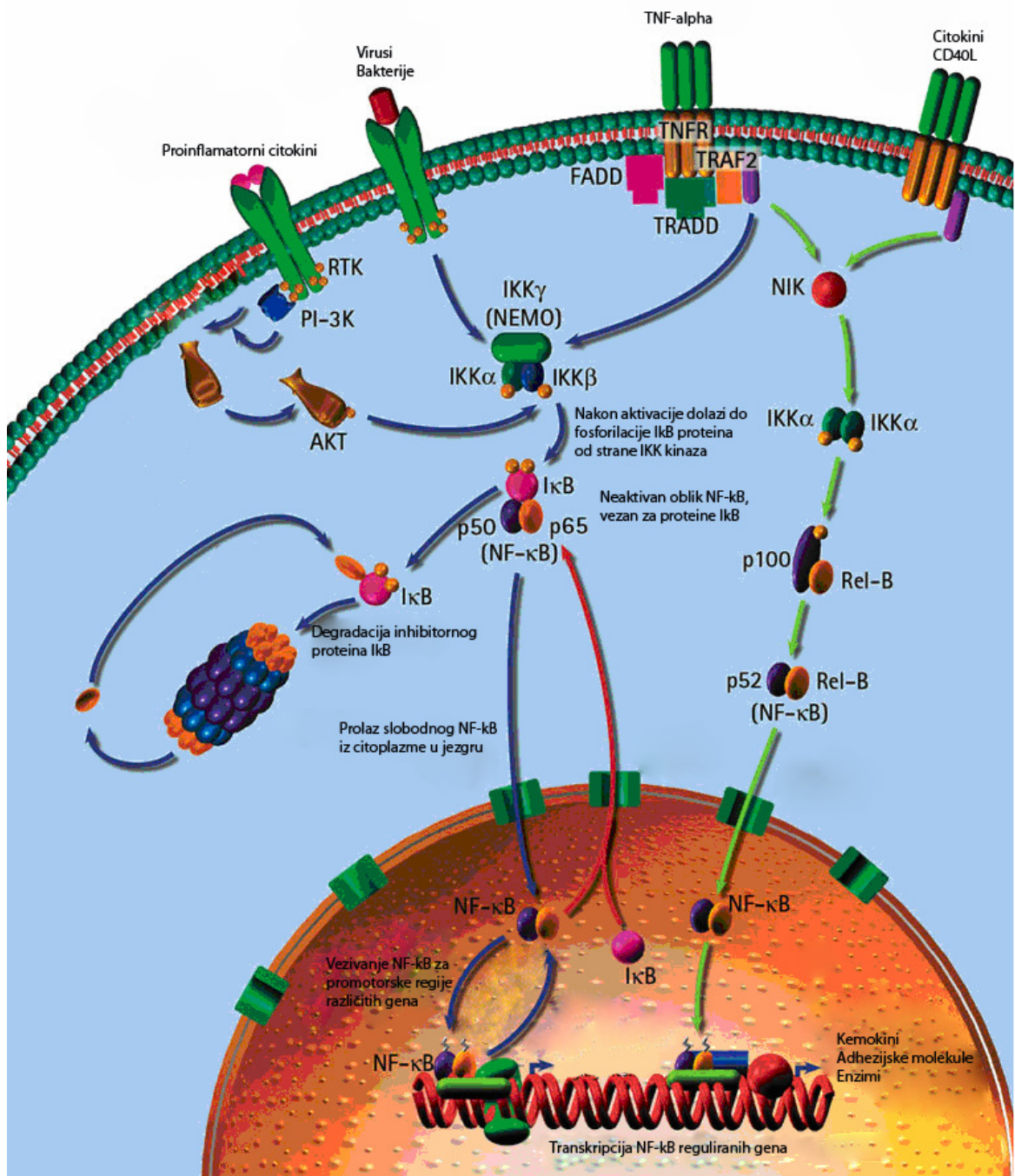
1.4.2. NF- κ B

Obitelj NF- κ B (od engl. *nuclear factor κ B*) transkripcijskih čimbenika predstavlja grupu evolucijski konzerviranih proteina koji igraju važnu ulogu kod ranog imunološkog odgovora domaćina na patogene [126, 127].

Do aktivacije ovoga puta dolazi prilikom odgovora na razne stimulse kao što su virusne infekcije, bakterijske infekcije, mitogeni, čimbenici rasta te proinflamatorni citokini (Slika 3.) [128-130]. U pojedinim slučajevima, vezivanje virusne čestice za vlastiti receptor dovoljan je poticaj za aktivaciju NF- κ B puta, a ovakvo djelovanje mogu imati i virusni produkti kao što su dsRNK i virusni proteini.

U većini stanica NF- κ B se nalazi u obliku inaktivnog citoplazmatskog kompleksa, vezan za obitelj inhibitornih proteina (I κ B, od engl. *inhibitor of κ B*) [126]. Njihova interakcija maskira jezgrino vezujuće mjesto na NF- κ B molekuli onemogućujući prelazak čimbenika iz citoplazme u jezgru, a time i njegovo biološko djelovanje.

Pojedini aktivacijski stimulusi pokreću različite kaskadne reakcije koje u većini slučajeva vode do fosforilacije i degradacije I κ B proteina. Time dolazi do oslobađanja NF- κ B proteina i njegove translokacije u jezgru. Ova kaskadna reakcija kontrolirana je na više razina mehanizmima negativne i pozitivne povratne sprege [131-134]. Ovakva višestruka kontrola potrebna je s obzirom na veliki broj gena čija je ekspresija regulirana putem NF- κ B puta.



Izvor: www.calbiochem.com/NF-kB

Slika 3. Temeljni putevi aktivacije NF-κB transkripcijskog puta. Do danas je opisano pet članova NF-κB obitelji: NF-κB1 (p50/p105), NF-κB2 (p52/p100), RelA (p65), RelB i c-Rel. Heterodimer p50/p65 je glavni Rel/NF-κB kompleks u većini stanica. NF-κB se nalazi u citoplazmi stanice vezan za inhibitorne proteine IκB obitelji. Pojedini aktivacijski stimuli pokreću različite kaskadne reakcije koje u većini slučajeva vode do fosforilacije i degradacije IκB proteina. Time dolazi do oslobađanja NF-κB proteina i njegove translokacije u jezgru gdje djeluje na ekspresiju mnogih gena, uključujući gene za kemokine, adhezijske molekule, enzime i druge.

RTK-receptor tirozin kinaza, PI-3K-fosfatidil inozitol kinaza, AKT-serin/treonin kinaza, IκB-inhibitorni protein, IKK-IκB kinaza, TNFR-receptor čimbenika tumorske nekroze, FADD-FAS-vezana domena smrti, TRADD-adaptorski protein povezan s receptorom TNF obitelji, TRAF2-čimbenik povezan s receptorom obitelji TNF 2, NIK-protein kinaza kinaze kinaze 14

Do danas su NF-kB vezujuća mjesta dokazana u promotorskim regijama kod više od 150 gena, uključujući gene za citokine i kemokine, receptore potrebne za adheziju i transmigraciju neutrofila, receptore uključene u imunološkom prepoznavanju, kao i proteine važne u antigenskoj prezentaciji [135]. Međutim, zanimljivo je da citokini koji su inducirani putem NF-kB puta, kao što su TNF- α i IL-1 β jesu također i snažni aktivatori samoga NF-kB puta te mogu pojačati imunološki odgovor te pridonijeti razvoju kronične upale. Radi jakog utjecaja na imunološki sustav, NF-kB put je poznat kao cilj djelovanja protuupalnih lijekova, nadasve nesteroidnih protuupalnih lijekova.

Nedavna istraživanja naglašavaju važnost ovoga transkripcijskog puta u kontroli stanične proliferacije i apoptoze. NF-kB aktivira mnoge pozitivne regulatore staničnog ciklusa te također potiče gene koji imaju antiapoptotičke učinke. Tako NF-kB direktno utječe na preživljavanje stanice djelujući na članove Bcl-2 (od engl. *B-cell CLL/lymphoma 2*) obitelji, celularne inhibitore apoptoze te čimbenike povezane s receptorima obitelji TNF (TRAF, od engl. *TNF receptor associated factor*), TRAF-1 i TRAF-2 molekule. Premda NF-kB prvenstveno sprječava proces apoptoze djelujući na tzv. receptore smrti i na mitohondrijski put apoptoze, u određenim slučajevima aktivacija NF-kB puta može dovesti i do smrti stanice [136-138].

Upravo glavne značajke NF-kB aktivacije; djeluje unutar nekoliko minuta od početnog stimulusa, ne zahtjeva sintezu proteina, te je u mogućnosti djelovati na ključne korake prilikom imunoreakcija, učinili su ovaj transkripcijski put iznimno privlačnom metom za različite patogene, osobito viruse. Zato ne čudi što su mnogi virusi kao što su HIV, virus influence, virus hepatitisa B (HBV) i herpesvirusi razvili različite strategije kako bi modulirani NF-kB aktivnost [139].

Uvriježeno je mišljenje da aktivacija NF-kB puta djeluje protektivno za domaćina kojem prijete infekcija određenim virusom. Ovu tvrdnju potvrđuju i pokusi s miševima koji su deficijentni u pojedinim segmentima NF-kB puta te koji imaju veću prijemljivost za infekcije [140]. Nadalje, u prilog tomu govori i činjenica da su mnogi virusi razvili strategije za zaustavljanje NF-kB aktivacije. Tako HIV sprječava degradaciju I κ B proteina te time onemogućava oslobađanje aktivnog NF-kB [141]. Međutim, postoje indikacije da određeni virusi mogu koristiti i strategiju aktivacije NF-kB puta. Ovakvo bi djelovanje bilo usmjereno u smjeru blokiranja apoptoze te posljedično produženju života stanice domaćina virusa, poboljšanju replikacije te diseminacije. Ovaj je način iskorištavanja NF-kB puta pokazan za više virusa uključujući HIV, herpesviruse i virus hepatitisa C (HCV) [142]. Nadalje, novija su istraživanja pokazala da su stanice koje imaju nisku aktivnost NF-kB puta rezistentne na infekciju virusom influence, međutim postaju prijemljive za infekciju nakon njegove aktivacije što također govori u prilog negativnog utjecaja aktivacije ovoga transkripcijskog puta [143].

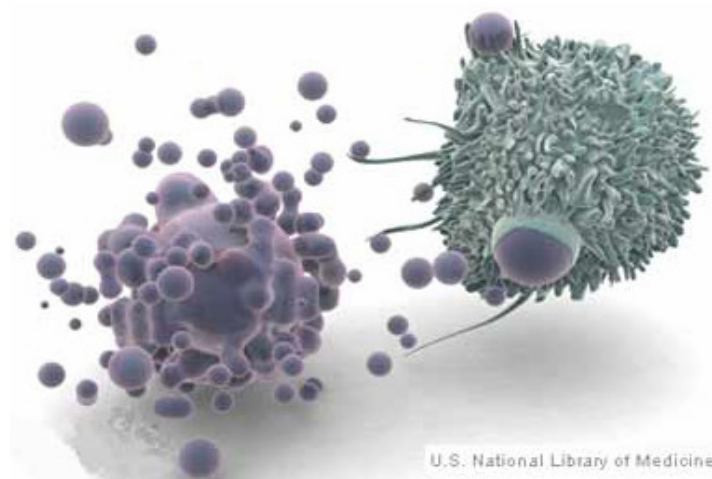
1.4.3. Apoptoza

Apoptoza ili programirana stanična smrt ključan je proces uključen u normalan razvoj, održavanje tkivne homeostaze te odigravanje efektivnog imunološkog odgovora. Ovaj evolucijski konzervirani mehanizam razvijen je kako bi se odstranile oštećene stanice, stanice tijekom organogeneze, autoreaktivni limfociti ili stanice zaražene određenim patogenom [144].

Sam proces apoptoze možemo podijeliti u tri faze. Prva faza predstavlja inicijacijski signal koji pokreće programiranu staničnu smrt te uključuje cijeli niz stimulusa [145]. Nakon ove početne faze slijedi period umiranja koji može trajati različito dugo ovisno o vrsti poticaja te vrsti stanice koja je krenula u programiranu staničnu smrt. Ovaj stadij uključuje karakteristične apoptotične promjene u morfologiji stanice, uključujući kondenzaciju kromatina te vakuolizaciju citoplazme. U finalnom stadiju dolazi do stvaranja apoptotičkih tjelešaca koja pupaju sa stanične membrane te koja naknadno progutaju stanice fagocitnog sustava (Slika 4.).

Glavnu ulogu tijekom procesa apoptoze imaju kaspaze, grupa proteaza koje mogu djelovati na nekoliko stotina staničnih supstrata [146].

Kako bi se spriječilo neželjeno kretanje u staničnu smrt kaspaze se u stanicama nalaze u inaktivnom obliku (zimogeni). Prije no što "izvršne" kaspaze (kaspaza 3, 6, 7) napadnu svoje substrate, iz inaktivnog se oblika pretvaraju u aktivne posredstvom "inicijacijskih" kaspaza kao što su kaspaza 8 i kaspaza 9.

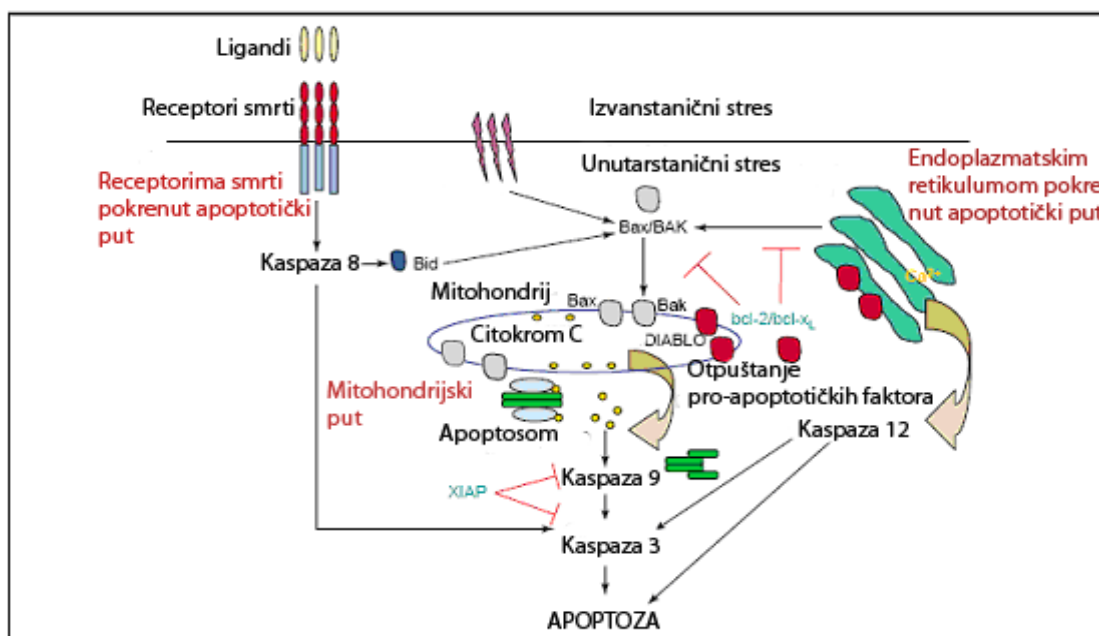


Izvor: www.apoptosisinfo.com/images/apoptosis-logo.jpg

Slika 4. Smrt stanice procesom apoptoze. Stvorena apoptotička tjelešca uvlači stanica fagocitnog sustava.

Najpoznatija su dva puta aktivacije ovog suicidalnog mehanizma; fiziološki (vanjski put) i stresom aktivirani (unutarnji put) (Slika 5.).

Fiziološki mehanizmi aktivacije uključuju određene receptore na površini stanice, uključujući TNF receptore ili CD95, koji su poznati i kao "receptori smrti" [147]. Vezivanjem liganda na receptore smrti dolazi do njihove agregacije te do vezivanja adaptorskog proteina FADD (od engl. *Fas-associated death domain*) koji dalje tijekom procesa djeluje na aktivaciju poglavito kaspaze 8. Ova kaspaza posljedično premješta apoptotički signal do mitohondrija ili direktno na slijedeće kaspaze, osobito kaspazu 3. Uloga kaspaze 3 prvenstveno se odnosi na izvršenje apoptotičnog signala, djelovanjem na više staničnih enzima te strukturalnih proteina jezgre i citoskeleta.



Slika prema Arden i sur. [148]

Slika 5. Osnovni apoptotički putevi. Vanjski apoptotički put započinje vezivanjem liganda na receptore smrti te slijedom signala dolazi do aktivacije kaspaze 8. Aktivirana kaspaza 8 sada može aktivirati izvršnu kaspazu 3 koja uvodi stanicu u apoptozu. Unutarnji apoptotički put aktivira se nakon određenih stresnih poticaja kao što je zračenje. Tada dolazi do promjena koje dovode do otpuštanja citokroma c iz mitohondrija, koji zajedno s molekulom Apaf 1 (apoptosom) dovodi do aktivacije kaspaze 9. Aktivirana kaspaza 9 tada djeluje na izvršne kaspaze koje pokreću programiranu staničnu smrt.

Bid-proapoptotički član Bcl-2 obitelji, Bax-Bcl2 pridružen X protein, Bad-Bcl2 antagonist stanične smrti, DIABLO-mitohondrijski proapoptotički protein, XIAP-antiapoptotički protein, Bcl-2-antiapoptotički regulator, Bcl_x-antiapoptotički regulator

Znatno se manje zna o mehanizmima kako dolazi do stresom provocirane programirane stanične smrti. Međutim, poznato je da kod ovoga oblika pokretanja stanične smrti dolazi do aktivacije kaspaze 9 posredstvom aktivirajućeg čimbenika apoptotičkih proteaza 1 (Apaf 1, od engl. *apoptotic protease activating factor*). Poticaji za ovakvu staničnu smrt uključuju ekspoziciju UV zrakama te izlaganje slobodnim radikalima. Vjeruje se da vrlo važnu ulogu u ovom putu aktivacije imaju članovi Bcl-2 obitelji te mitohondriji. Istraživanja su pokazala kako rano tijekom stresom inducirane apoptoze dolazi do permeabilizacije vanjske membrane mitohondrija, oslobađanja citokroma C i ostalih proteina koji mogu inducirati smrt stanice [149]. Kako pojedini članovi Bcl-2 obitelji mogu spriječiti ove promjene, te onemogućiti oslobađanje kaspaza, prozvani su čuvarima integriteta mitohondrija [150, 151]. Međutim, novija istraživanja su pokazala da i tijekom stresom inducirane stanične smrti može doći do aktivacije kaspaza i neovisno od mitohondrija.

Mnogi su virusi razvili sposobnost moduliranja apoptotičkih procesa unutar stanice domaćina. Virus može imati koristi i indukcijom i inhibicijom apoptoze, premda mu u većini slučajeva prirodni apoptotički procesi unutar stanice škode. Dovoljno je da virus djeluje na samo jedan korak složenog signalnog puta kako bi utjecao na početak ili razvoj programirane stanične smrti. Međutim, postoje i druge strategije zaobilaženja utjecaja apoptoze kojima se koriste virusi osim djelovanja na signalni put. Tako određeni virusi proizvode veliki broj viriona u kratkom vremenu onemogućujući efektivan imunološki odgovor ili mogu razviti kriptičnu infekciju, kod koje je onemogućeno otkrivanje infektivne čestice [152]. Ovakvo djelovanje pokazuju većinom RNK virusi kao što su virus vezikularnog stomatitisa ili virus influence [153, 154]. Prednost inhibicije apoptoze u virusnim infekcijama odnosi se na duže preživljavanje stanice domaćina te na mogućnost širenja virusa po tijelu.

Međutim, i indukcija smrti stanice može predstavljati prednost za preživljavanje virusa. U ovom slučaju dolazi do stvaranja malih vrećastih tijela koja su poznata kao apoptotička tjelešca. Ova se tjelešca odvajaju od umiruće stanice te bivaju progutana od okolnih fagocitnih stanica. Ovakav oblik fagocitoze predstavlja način diseminacije virusa bez razvoja imunološkog odgovora koji bi slijedio nakon ispuštanja virusa u izvanstaničnu tekućinu [155].

Međutim, nije rijetkost ni da pojedini virus proizvodi proteine koji mogu djelovati i na inhibiciju i na indukciju apoptoze. Tako HIV može preko proteina negativni čimbenik (Nef, od engl. *negative factor*) inducirati apoptozu preko povećanja ekspresije TNF- α na staničnoj površini, a posredstvom regulatornog transaktivirajućeg proteina (Tat, od engl. *transactivating regulatory protein*) djelujući na povećanu ekspresiju CD95 [156, 157]. Istraživanja su pokazala kako proapoptotički protein Tat može također djelovati i na inhibiciju stanične smrti povećavajući razinu Bcl-2 te djelujući na apoptotički signal preko T-staničnog receptora [158]. Ovakva dvojna strategija može se objasniti djelovanjem virusnih proteina ovisno o stadiju infekcije. Tako da na početku infekcije inhibicija apoptoze omogućuje replikaciju virusa, dok kasnija indukcija može posredovati u njegovoj diseminaciji.

1.4.4. Adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa

Izvanstanični matriks (ECM, od engl. *extracellular matrix*) predstavlja kompleksnu mrežu strukturalnih i funkcionalnih makromolekula koje imaju važnu ulogu u morfogenezi organa i tkiva te u održavanju stanične i tkivne strukture i funkcije [159]. Međutim, osim utjecaja ECM-a na fiziološke procese, sve se više pojavljuju i

pokazatelji o njegovoj ulozi tijekom patoloških stanja, osobito prilikom odgovora domaćina na virusne infekcije.

ECM je građen od cijelog niza obitelji molekula, uključujući obitelj kolagena, elastičnih vlakana, glikozaminoglikana, proteoglikana te adhezivnih glikoproteina. Različita kombinacija, imobilizacija te prostorna organizacija sastavnica čine građevnu osnovu svih tkiva u ljudskome tijelu [159, 160].

Kolagen je najzastupljeniji protein u tijelu svih kralježnjaka. Do sada je pronađeno 20 vrsta kolagena koji imaju različita mehanička i funkcionalna svojstva. Kolageni tipa I, II i III najzastupljeniji su kolageni u ljudskome tijelu te čine fibrile važne za tenzijsku snagu tkiva. Ostale vrste kolagena, kao što su tip IV, VII, IX, X i XII građevni su elementi kolagenskih fibrila ili se nalaze u sklopu bazalnih lamina. Uz već navedene mehaničke i strukturalne funkcije, kolagen također igra važnu ulogu prilikom uspostave kontakta stanica s okolnim strukturama te tijekom stanične diferencijacije i migracije [161, 162].

Adhezivni glikoproteini jesu grupa izvanstaničnih molekula koji imaju sposobnost vezivanja za kolagen, proteoglikane te staničnu površinu [163]. Glavni predstavnici ove skupine molekula jesu fibronektin, laminin, vitronektin i trombospondin.

Većina stanica u tijelu luči fibronektin u izvanstanični prostor, gdje ulazi u interakciju s ostalim molekulama, uključujući kolagen, glikozaminoglikane, proteoglikane te trombospondin. Fibronektin ima važnu ulogu tijekom vezanja stanice za okolne strukture te tijekom staničnog pomicanja i diferencijacije [164]. Također je pokazano da kod pojedinih virusnih infekcija može olakšati ulazak virusa u stanicu djelujući kao most između stanice i izvanstaničnog prostora [165].

Laminin se poglavito nalazi u sklopu bazalne membrane te ima sposobnost vezanja za staničnu površinu, heparin te tip IV kolagena. Posjeduje brojne biološke funkcije

uključujući indukciju stanične adhezije, migracije, rasta i diferencijacije. Do danas je opisano nekoliko receptora koji vežu laminin, od kojih neki također mogu posredovati u virusnim infekcijama [166].

Glikoprotein trombospondin nalazi se u izvanstaničnom matriksu vezan za fibronektin ili heparan sulfat. Poznat je njegov utjecaj na koagulaciju i antikoagulantne čimbenike te agregaciju trombocita. Također je uključen u staničnu adheziju, proliferaciju, angiogenezu te sudjeluje u oporavku tkiva nakon oštećenja. Istraživanja su pokazala da prilikom infekcije fibroblasta ljudskim citomegalovirusom dolazi do smanjene ekspresije gena za trombospondin 1 i trombospondin 2, međutim uloga ovoga odgovora nije do kraja poznata [167].

Dva su glavna načina na koja izvanstanični matriks može djelovati na stanične procese.

Prvi je način da interakcija stanica-izvanstanični matriks može direktno utjecati na stanične funkcije djelujući na signalne puteve preko površinskih staničnih receptora. Na staničnoj površini nalaze se dvije vrste receptora: ne-integrinski i integrinski receptori. Od ne-integrinskih receptora najvažniji su površinski proteoglikani sindekan i CD44. Vezivanje receptora CD44 za tip I i tip IV kolagena te hijaluronan igra važnu ulogu prilikom stanične adhezije i migracije. Sindekan uz to što veže različite vrste kolagena, fibronektin i trombospondin, također veže i čimbenike rasta fibroblasta. Djelovanje ECM-a na signalne puteve koji su aktivirani čimbenicima rasta i diferencijacije vjerojatno je njegova najvažnija biološka funkcija [168]. Tako je studija *Aplina i sur.* otkrila da je u fibroblastima djelovanje čimbenika rasta pojačano kada su stanice adherentne [168].

S druge strane, izvanstanični matriks može utjecati na mobilizaciju čimbenika rasta ili diferencijacije te time djelovati na proliferaciju ili fenotip stanice [168]. ECM može i

limitirati difuziju čimbenika rasta te tako osigurati lokalni pul aktivnih molekula nakon što se one prestanu lučiti.

Drugu skupinu površinskih receptora predstavljaju integrini, glikoproteinski heterodimeri građeni od jednog α i jednog β lanca [169]. Integrini igraju važnu ulogu tijekom međusobne adhezije stanica, ekstravazacije, agregacije trombocita te migracije endotelnih stanica na proteinima izvanstaničnog matriksa te posreduju u kemijskoj signalizaciji [170]. Svi glavni građevni elementi ECM-a mogu biti prepoznati od strane jednog ili više integrina, međutim značenje ove redundancije nije poznato. Integrini igraju važnu ulogu tijekom virusnih infekcija te su *Gavrilowskaya i sur.* prvi pokazali kako β_3 integrini služe kao receptori za ulazak hantavirusa u stanicu [171]. Međutim, novija *in vivo* istraživanja pretpostavljaju da patogeni hantavirusi mogu koristiti i dodatne receptore [172].

Oštećenja različitih tkiva i organa dijelom su uzrokovana i narušenom ravnotežom između matriks metaloproteinaza (MMPs) i njihovih tkivnih inhibitora (TIMPs, od engl. *tissue inhibitors of MMPs*) [173, 174]. Nedavna istraživanja pokazala su značaj ovih molekula tijekom odgovora na infekcije različitim patogenima agensima [175, 176]. Vrlo važna karika imunološkog odgovora je migracija imunoloških stanica na mjesto infekcije. MMPs značajno utječu na ovaj proces degradirajući komponente izvanstaničnog matriksa, osobito bazalnu membranu što dopušta stanicama imunološkog sustava daljnju migraciju [175]. Također mogu djelovati na imunološki odgovor i modulirajući citokinsku aktivnost, kao na primjeru IL-8 kojega cijepaju na fragmente koji imaju 10 puta veću djelotvornost od polazne molekule [177]. Premda sekrecija MMPs omogućava učinkovit imunološki odgovor, pretjerana aktivnost ovih proteaza može također dovesti do oštećenja tkiva što je pokazano i kod nekih virusnih infekcija uključujući HIV i HBV [178, 179]. Promjena u razini iRNK za više

MMPs pokazana je tijekom encefalitisa uzrokovanog koronavirusima, te je u istoj studiji nađena i povećana ekspresija iRNK za TIMP-1 [180].

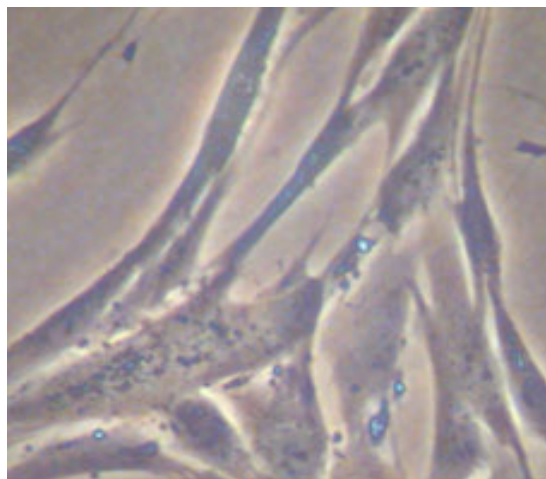
Također postoje i pokušaji liječenja infektivnih bolesti djelovanjem na MMPs. Preliminarni rezultati na modelu štakora pokazali su da inhibicija MMPs i TNF- α smanjuje smrtnost kod pneumokoknog meningitisa [181].

1.5. MRC-5 i HEK 293 stanice

1.5.1. MRC-5 stanice

MRC-5 (od engl. *Medical Research Council 5*) ljudske, diploidne stanice nastale su 1966. godine iz normalnog plućnog tkiva 14 tjedana starog muškog fetusa [182]. To su plućni fibroblasti koji se mogu dijeliti između 42 i 46 puta prije početka senescencije (Slika 6.).

MRC-5 stanice koriste se u laboratorijima širom svijeta kod različitih aplikacija, uključujući *in vitro* istraživanja citotoksičnosti, razvoju cjepiva te kao model za istraživanje različitih virusnih oboljenja.



Izvor:www-micro.msb.le.ac.uk/Video/graphics/MRC5.jpg

Slika 6. Mikroskopska slika MRC-5 stanica u kulturi

Glavna je uloga plućnih fibroblasta, pa tako i MRC-5 stanica, sudjelovanje u održavanju normalnog tkivnog integriteta, odnosno u građi samoga plućnog tkiva [183]. Međutim, sve je više dokaza kako je uloga ovih stanica u ljudskom tijelu puno kompleksnija. Danas je poznato kako plućni fibroblasti sudjeluju u procesu popravka tkiva nakon upalnog procesa lučenjem mnogih proteina izvanstaničnog matriksa. Ove stanice mogu i migrirati na mjesto oštećenja tkiva te nadomjestiti stanice koje nedostaju [184].

Uz ulogu koja je važna tijekom pregradnje tkiva, plućni fibroblasti bi također mogli biti važni učesnici u regulaciji lokalnih imunoreakcija, uključujući upalni odgovor. Sve je više podataka o ulozi plućnih fibroblasta u urođenoj imunosti. *Van Compernelle i sur.* su pokazali kako ljudski fibroblasti posjeduju formil peptidne receptore [185]. Ovi su receptori prvenstveno prisutni na neutrofilima te sudjeluju u njihovoj kemotaksiji na mjesto infekcije [186]. Aktivacija ovih receptora sa strane različitih patogena također dovodi do morfoloških i biokemijskih promjena u stanici, uključujući polarizaciju aktinskog citoskeleta, aktivaciju različitih integrina te

migraciju. Signalizacija preko ovih receptora također potiče i produkciju superoksidnih metabolita te degranulaciju. Ove promjene važne su prilikom migracije neutrofila, sekvestracije te ubijanja prisutnih mikroorganizama [186]. Možemo pretpostaviti da prisutnost ovih receptora na neimunološkim stanicama kao što su fibroblasti može govoriti u prilog važnosti ovih mezenhimskih stanica u urođenoj imunosti.

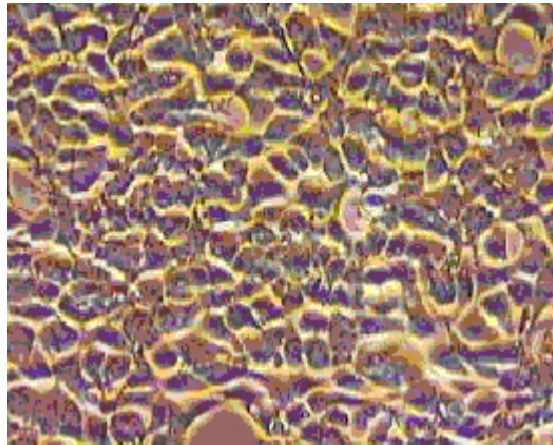
Nadalje, plućni fibroblasti posjeduju adhezijske molekule važne za kemotaksiju leukocita te su u mogućnosti proizvesti široku paletu upalnih citokina i kemokina [187]. Do danas je poznato kako plućni fibroblasti mogu lučiti kemokine RANTES i IL-8 nakon stimulacije s TNF- α , ali i prilikom virusnih infekcija [188, 189]. Istraživanja su pokazala da plućni fibroblasti mogu također lučiti MCP-1 i IL-11, te da izražavaju iRNK za eozinofilne kemokine MCP-3 i MCP-4 [188, 190]. Također je pokazano da prilikom infekcije MRC-5 stanica rinovirusom 14 dolazi do izlučivanja IL-6 te da je ovaj proces pod utjecajem NF-kB transkripcijskog puta [191].

Važno je naglasiti kako fibroblasti mogu lučiti različite čimbenike rasta koji posljedično mogu djelovati na diferencijaciju, aktivaciju i preživljavanje mnogih vrsta stanica [183].

Smith i sur. nazivaju fibroblaste stanicama čuvarima koje primaju i odašilju važne informacije drugim stanicama te naglašavaju važnost istraživanja uloge ovih stanica u imunopatogenezi infektivnih bolesti [192].

1.5.2. HEK 293 stanice

HEK 293 (od engl. *Human embryonic kidney*) stanice nastale su transformacijom ljudskih embrionalnih stanica bubrega pomoću DNK adenovirusa 5, a prvi ih je opisao Graham 1977. godine (Slika 7.) [193].



Izvor: nhri.pcking.net/images/Hek2931.jpg

Slika 7. Mikroskopska slika HEK 293 stanica u kulturi

Pokazalo se kako su ove stanice pogodne za proizvodnju različitih virusnih vektora i rekombinantnih proteina te se uglavnom koriste u virološkim testiranjima te kao transfektirane stanice za ekspresiju rekombinantnih proteina u studijama mnogih istraživačkih područja.

Premda apoptoza igra važnu ulogu tijekom embrijskog razvoja, patološka aktivacija ovoga procesa mogla bi dovesti i do oštećenja različitih tkiva i organa.

Nedavno je pokazano kako hantavirusi u ovim stanicama uzrokuju citopatični učinak te da je za ovu promjenu odgovoran proces apoptoze [194]. Istraživanje *Markotić i sur.* te nedostatak znanja o mehanizmima apoptoze uzrokovane hantavirusima, naglašavaju potrebu daljnjeg istraživanja različitih čimbenika koji sudjeluju u programiranoj staničnoj smrti HEK 293 stanica tijekom infekcije ovim virusima [194].

Izvanstanični matriks igra glavnu ulogu u normalnoj građi i funkciji bubrega. Veliki broj bubrežnih oboljenja praćeno je kvalitativnom i kvantitativnom promjenom kompozicije ove specijalizirane strukture [195]. Važnu ulogu u ovom procesu igraju matriks metaloproteinaze i njihovi tkivni inhibitori. Istraživanja su pokazala kako HEK 293 stanice eksprimiraju više proteaza te da bi mogle imati aktivnu ulogu u promjenama izvanstaničnog matriksa tijekom virusnih infekcija [196, 197].

1.6. Imunopatogeneza hantavirusnih infekcija

Dosadašnja istraživanja su pokazala kako imunopatogenetski mehanizmi igraju značajnu ulogu kod hantavirusnih infekcija.

Specifična IgM antitijela mogu se otkriti već na samom početku obje bolesti te dostižu maksimum unutar nekoliko dana [198]. IgG antitijela pojavljuju se kasnije te dostižu maksimum oko drugog tjedna bolesti [20, 198]. Također je pokazano kako IgE antitijela imaju ulogu u ranoj fazi infekcije djelujući na povećanje ekspresije citokina te ulazeći u sastav imunokompleksa [199]. Kako se hantavirusi prenose aerosolom te primarno inficiraju stanice respiratornog trakta, prisutnost IgA antitijela mogla bi utjecati na rezoluciju akutne infekcije, budući da IgA antitijela najveću razinu dostižu na početku bolesti [200].

Pretpostavlja se da humoralna imunost i kod HFRS-a i kod HPS-a može trajati gotovo doživotno.

Premda je značaj stanične imunosti kod hantavirusnih infekcija manje istražen, neki su autori pokazali kako je upravo ovaj vid imunosti većim dijelom odgovoran za otpornost životinja na infekciju ovim virusima [201].

T-limfocitna aktivacija pojavljuje se vrlo rano tijekom hantavirusne infekcije te je praćena porastom broja neutrofila, monocita, B-limfocita te CD8+ T-limfocita [75, 202, 203]. Povećan broj aktiviranih T-limfocita koji mogu djelovati na vaskularnu permeabilnost dokazan je u krvi i u tkivima akutnih HPS bolesnika [75, 204]. Vjeruje se kako su upravo ovi specifični T-limfociti dijelom odgovorni za nastanak oštećenja tijekom hantavirusnih infekcija [205].

Tijekom HVBS-a dolazi do aktivacije komplementa, i klasičnim i alternativnim putem te je stupanj aktivacije u korelaciji s težinom bolesti [206, 207]. Ulogu u nastanku oštećenja također mogu imati cirkulirajući imunokompleksi te njihovo taloženje u glomerularnoj bazalnoj membrani i tubulima bubrega [208, 209].

Lučenje citokina i kemokina tijekom infekcije hantavirusima moglo bi znatno doprinijeti nastanku simptoma kod HPS-a i HVBS-a.

Kod bolesnika s HVBS-om dolazi do lučenja citokina te su u akutnoj fazi bolesti u serumu dokazani IL-6, IL-1 i IL-10 [210, 211]. Kod bolesnika s HVBS-om također nalazimo povećane vrijednosti solubilnog IL-2 i solubilnog IL-6 receptora [212]. Podaci o povišenim razinama TNF- α u krvi bolesnika s HVBS-om te povećan broj TNF- α pozitivnih stanica iz plućnog tkiva umrlih od HPS-a govori u prilog važnosti ovog citokina u imunopatogenezi ove dvije bolesti [211, 213]. Citokini poput TNF- α , IL-1 i IL-6 odgovorni su za nastanak vrućice, septičnog šoka i lučenje proteina akutne faze. Međutim, vjeruje se kako ovi medijatori imaju važnu ulogu u nastanku pojačane vaskularne propusnosti prisutne kod HPS-a i HVBS-a, premda točan mehanizam ostaje nejasan [214].

Kemokini su važni lokalni medijatori koji usmjeravaju migraciju stanica koje sudjeluju u imunološkom odgovoru.

In vitro istraživanja su pokazala kako infekcije virusima Hantaan i Sin Nombre induciraju ekspresiju RANTES-a i IP-10, kemokina važnih za kemotaksiju leukocita na mjesto infekcije [214]. Studija *Geimonena i sur.* pokazala je kako virus Hantaan inducira proizvodnju kemokina u endotelnim stanicama, uključujući kemokine IL-8, RANTES i IP-10, dok nepatogeni hantavirus Prospect Hill nije doveo do njihove indukcije [215]. Ovi podaci potkrepljuju mišljenje kako kemokini igraju važnu ulogu u imunopatogenezi hantavirusnih infekcija.

Istraživanja su pokazala da hantavirusi mogu inficirati široki spektar ljudskih stanica, uključujući fibroblaste [216]. Međutim, prema dosadašnjim spoznajama endotelne stanice i makrofazi predstavljaju glavne ciljne stanice za hantaviruse.

Premda makrofazi imaju važnu ulogu u obrani organizma od različitih infekcija, njihova pojačana aktivacija može dovesti do oštećenja tkiva putem prevelike proizvodnje proinflammatoryh citokina. Vjeruje se kako ove fagocitne stanice također doprinose širenju hantavirusa s primarnog mjesta infekcije [207].

Infekcija hantavirusima uzrokuje porast vaskularne permeabilnosti, premda nije jasno koji mehanizmi dovode do ove patološke promjene. Za sada je poznato da hantavirusi povećavaju ekspresiju adhezijskih molekula na endotelnim stanicama te potiču migraciju imunoloških efektorskih stanica (monocita i leukocita) kroz kapilarnu stjenku [217].

Mnoga djelovanja izvanstaničnog matriksa posredovana su integrinima, receptorima na staničnoj površini koji povezuju stanicu s izvanstaničnim prostorom [45]. *Gavrilovskaya i sur.* su po prvi puta pokazali kako β_3 integrini posreduju ulazak hantavirusa u stanicu [45]. Budući da je povećana kapilarna permeabilnost dijelom određena i $\alpha_v\beta_3$ integrinima možemo pretpostaviti kako vezanje hantavirusa za vlastiti receptor može imati ulogu u narušavanju normalne hemostaze [171].

Podaci o ulozi apoptoze prilikom hantavirusnih infekcija dijelom su kontradiktorni. *Kang i sur.* još 1999 godine daju prve dokaze o mogućoj ulozi apoptoze prilikom smrti Vero E6 stanica tijekom infekcije virusima Hantaan i Prospect Hill [218]. Premda novija istraživanja pokretanja apoptoze konfluentnih Vero E6 stanica patogenim hantavirusima nisu potvrdila ova ispitivanja, apoptotička smrt bila je pojačana u Vero E6 stanicama koje su u fazi dijeljenja [219].

Nedavno je pokazano kako hantavirusi uzrokuju citopatični efekt u kulturi HEK 293 stanica te da je za ovu promjenu odgovoran proces apoptoze [194]. Premda je u više studija pokazana uloga apoptoze kod infekcije patogenim i nepatogenim hantavirusima, vrlo se malo zna o mehanizmima i putevima nastanka programirane stanične smrti [194, 220].

Istraživanje *Li i sur.* pokazalo je kako nukleokapsidni protein virusa Puumala djeluje na protein 6 vezan za domenu smrti (Daxx, od engl. *death-associated protein 6*), molekulu koja djeluje kao pojačivač apoptoze pokrenute FAS-putem [44]. Međutim, naša prethodna istraživanja nisu pokazala značaj FAS puta u pokretanju apoptoze kod hantavirusnih infekcija u HEK 293 stanicama [194]. Nadalje, infekcija Vero E6 stanica nepatogenim virusom Tula dovela je do pokretanja programirane stanične smrti, a ulogu u ovom procesu imale su kaspaza 3 i kaspaza 8 [220]. Također je nedavno otkrivena moguća uloga endoplazmatskog retikuluma kod pokretanja apoptoze Vero E6 stanica nakon infekcije virusom Tula [221]. Iz navedenih istraživanja je jasno da još uvijek postoji pitanje kojim se putem pokreću apoptotički procesi kod patogenih i nepatogenih hantavirusa.

Još uvijek nije poznata uloga NF- κ B transkripcijskog puta kod hantavirusnih infekcija. Ranija istraživanja su pokazala da kod infekcije virusom Denge, uzročnikom teškog oblika hemoragijske vrućice dolazi do aktivacije NF- κ B puta te

posljedično do apoptotične smrti stanica [137]. Međutim, nakon infekcije ljudskih endotelih stanica virusom New York, uzročnikom HPS-a, došlo je do smanjene ekspresije gena za TRAF-2, što može govoriti u prilog modulacije NF-kB puta tijekom infekcije hantavirusima [215]. Iz navedenog možemo zaključiti da uloga NF-kB u hantavirusnim infekcijama tek treba biti otkrivena.

2. CILJEVI RADA I OBRAZLOŽENJE

Glavni cilj ovoga rada bio je istražiti promjene u ekspresiji gena kao odgovor na infekciju virusom Hantaan i virusom Andes. Iako spadaju u isti rod *Hantavirus*, ova dva virusa uzrokuju dva različita klinička entiteta; virus Hantaan uzrokuje HVBS te pretežno bubrežne promjene, dok virus Andes uzrokuje HPS te zahvaća pluća. Stoga smo istražili utjecaj ovih virusa na ekspresiju gena u dvije različite vrste stanica; stanica podrijetlom iz plućnog tkiva, MRC-5 stanica (plućni fibroblasti) i stanica podrijetlom iz bubrežnog tkiva, HEK 293 stanica (ljudske embrionalne epitelne stanice bubrega).

Razlike u ekspresiji gena koje smo dobili ovim istraživanjem mogle bi nam dati nove spoznaje o imunoreakcijama koje se događaju prilikom infekcije hantavirusima, te dati bliži uvid zašto virus Hantaan najveće promjene uzrokuje u bubrezima, dok virus Andes u plućima.

1. Prilikom infekcije **plućnih fibroblasta** cilj je bio istražiti promjene u ekspresiji gena tijekom **rane infekcije** (6 sati) te smo odredili gene za ove tri skupine molekula:
 1. Citokine
 2. NF-kB transkripcijski put
 3. Adhezijske i matriks molekule

Odlučili smo istražiti ove tri skupine molekula koje mogu biti pokazatelji rane aktivacije plućnih fibroblasta i njihove potencijalne imunoregulatorne uloge.

Citokini su molekule koje sudjeluju u svim fazama imunoreakcija. Prethodna istraživanja su pokazala važnost nekih proupalnih citokina i kemokina kod

hantavirusnih infekcija, dok se vrlo malo zna o ulozi čimbenika rasta i antiupalnih citokina. U ovom istraživanju željeli smo potvrditi važnost pojedinih citokina te otkriti nove članove koji utječu na ishod infekcije.

NF-kB transkripcijski put predstavlja važnu kariku u ranom odgovoru organizma na različite patogene, osobito viruse. Budući da gotovo i nema podataka o važnosti ovoga transkripcijskog puta kod hantavirusnih infekcija, cilj nam je bio otkriti utječu li hantavirusi na ovaj put te na koji način.

Sve je više pokazatelja kako **adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa** ne predstavljaju samo građevni element tkiva, već aktivno sudjeluju u različitim imunoreakcijama. Važni članovi ove obitelji molekula jesu MMP i njihovi inhibitori te integrini. Cilj nam je bio otkriti kako infekcija hantavirusima utječe na promjene u ekspresiji gena za ovu važnu grupu molekula.

2. Prilikom infekcije **HEK 293 stanica** cilj nam je bio pratiti ekspresiju staničnih gena u dvije vremenske točke, nakon **tri i pet dana** te smo istraživali gene vezane za:

1. Različite puteve apoptoze

2. Adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa

Nedavno je pokazano kako hantavirusi uzrokuju citopatički efekt u kulturi HEK 293 stanica te da je za ovu promjenu odgovoran proces apoptoze. Međutim, kako se vrlo malo zna o mehanizmima i putevima nastanka programirane stanične smrti kod infekcije ovim virusima cilj nam je bio istražiti molekule koje sudjeluju u različitim putevima **apoptoze** te otkriti njihovu važnost kod hantavirusnih infekcija.

Promjene koje se događaju u **izvanstaničnom matriksu** mogu značajno utjecati na stanične funkcije. Cilj nam je bio otkriti mogu li ove molekule imati utjecaja na imunoreakcije tijekom hantavirusnih infekcija te osobito u nastanku apoptoze.

3. HIPOTEZE

Glavne hipoteze ovoga rada jesu:

1. Tijekom rane faze infekcije hantavirusima dolazi do indukcije gena koji se nalaze u sklopu NF-kB transkripcijskog puta – budući da je NF-kB važan regulator imunološkog odgovora kod mnogih virusnih infekcija, vjerujemo da NF-kB put sudjeluje i u ranom odgovoru domaćina na infekciju hantavirusima.
2. Prilikom infekcije virusima Hantaan i Andes dolazi do povećanja ekspresije određenih citokinskih/kemokinskih gena, poglavito gena koji kodiraju proupalne citokine i kemokine – važnost pojedinih citokina/kemokina već je pokazana u nekim kliničkim studijama, kao i u *in vitro* pokusima, uglavnom na endotelnim stanicama. U našim ispitivanjima, koristeći široki panel za veliki broj citokina i kemokina, očekujemo definirati one molekule koje bi mogle imati ulogu pri infekciji bubrežnih epitelnih stanica i plućnih fibroblasta.
3. Virusi Hantaan i Andes u obje vrste stanica uzrokuju promjene u ekspresiji gena za matriks metaloproteinaze i njihove tkivne inhibitore što indirektno može govoriti o narušenosti njihove homeostaze – budući da je već pokazana važnost narušene homeostaze matriks metaloproteinaza i njihovih inhibitora u nastanku oštećenja različitih tkiva i organa tijekom virusnih oboljenja, vjerujemo da bi ove izvanstanične molekule mogle igrati ulogu i u imunopatogenezi hantavirusnih infekcija.

4. Infekcija hantavirusima dovodi do promjene u ekspresiji gena za molekule izvanstaničnog matriksa, koje mogu biti odgovorne za pokretanje programirane stanične smrti – za mnoge molekule izvanstaničnog matriksa pokazano je kako sudjeluju u nastanku apoptoze tijekom virusnih infekcija, a nedavno je pokazano kako hantavirusi uzrokuju apoptozu u kulturi HEK 293 stanica. Stoga vjerujemo kako će virusi Hantaan i Andes dovesti do promjene u ekspresiji gena određenih molekula izvanstaničnog matriksa koje sudjeluju u nastanku programirane stanične smrti.

4. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Virusi i stanice

Virus Hantaan, soj 76118 (*Lee i sur.*, 1978) i virus Andes, soj Chile-9717869 (*Toro i sur.*, 1998) koje smo u pokusu koristili za infekciju propagirali smo u Vero E6 stanicama (VeroC1008, ATCC CRL 1586) [7, 222].

Infekcija stanica rađena je u laboratoriju trećeg stupnja zaštite (BSL-3, od engl. *biosafety level 3*), u Odjelu za virologiju, Medicinskog instituta za infektivne bolesti vojske Sjedinjenih Američkih Država (USAMRID, od engl. *United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases*), Fort Detrick, SAD.

MRC-5 stanice (ljudski fetalni plućni fibroblasti, ATCC CCL-171) i HEK 293 stanice (ljudske embrionalne epitelne stanice bubrega, ATCC CRL 1573) kultivirali smo u MEM mediju (od engl. *Minimum essential medium*) s 10% fetalnog bovinog seruma. Treći dan nakon nasađivanja obje vrste stanica inficirali smo virusima HTNV (MOI=10, od engl. *multiplicity of infection*) i ANDV (MOI=1) [7, 222]. Viruse smo adsorbirali jedan sat na 37°C i uz 5% CO₂. Kao kontrole za inficirane stanice koristili smo neinficirane stanice kojima je dodan samo medij. MRC-5 stanice smo inkubirati 6 sati, dok smo HEK 293 stanice inkubirali 3 i 5 dana, na 37°C uz 5% CO₂ bez promjene medija. Sve stanice korištene u pokusu testirane su na kontaminaciju mikoplazmama ELISA-PCR-om (Roche, Basel, Švicarska).

4.2. Plak test

Titar virusa odredili smo plak testom kako slijedi [7, 222]. 200 μ l uzorka dodali smo u pločicu sa šest udubina koja sadrži konfluentni sloj sedam dana starih Vero E6 stanica. Nakon jednosatne adsorpcije na 37°C u svaku smo udubinu dodali po 3 mL pokrovnog medija (overlay medium) (Earlov bazalni minimalni medij, 10 mM HEPES, 0,6% agaroze, 8 mM L-glutamin, antibiotici) koji sadrži 10% fetalnog goveđeg seruma te mješavinu 13 neesencijalnih aminokiselina (GIBCO, Carlsbad, CA, SAD). Pločice smo nadalje inkubirali sedam dana na 37°C uz 5% CO₂. Nakon inkubacije u svaku smo udubinu dodali po 2 mL pokrovnog medija koji sadrži 5% fetalnog bovinog seruma te 5% neutral red otopine (GIBCO). Broj plakova smo brojali nakon inkubacije od dva dana na 37°C. Osim titra virusa, plak testom smo pokazali i vijabilnost virusa.

4.3. Izolacija RNK

Izolacija RNK uzoraka rađena je u BSL-3 laboratoriju, Odjela za virologiju, USAMRID-a.

Ukupnu RNK iz sakupljenih uzoraka izolirali smo pomoću Trizola (Life Technologies, Rockville, MD, SAD) te posljedično faznom separacijom s kloroformom i precipitacijom s izopropanolom. Ukratko, u tubice koje sadrže stanice suspendirane u 1 mL Trizola dodali smo 250 μ L kloroforma te mućkali do razvoja mliječne boje otopine. Nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi centrifugirali smo uzorke (15min/4°C/12000g). Supernatant smo odlili u nove tubice te dodali 500 μ L

izopropanola. Tubice smo lagano promućkali te inkubirali uzorke 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja uzoraka (15min/4°C/12000g) odlili smo supernatant u tubice i dodali 1 mL etanola te promućkali uzorke 1 minutu na vorteksu. Nakon centrifugiranja (7min/4°C/7500g) odstranili smo supernatant te uzorke ostavili da se osuše. Uzorke RNK otopili smo u 20 µL vode koja ne sadrži RNA-azu. Integritet izolirane RNK odredili smo vizualizacijom na gelu. Uzorke smo do testiranja ekspresije gena pohranili na –80°C.

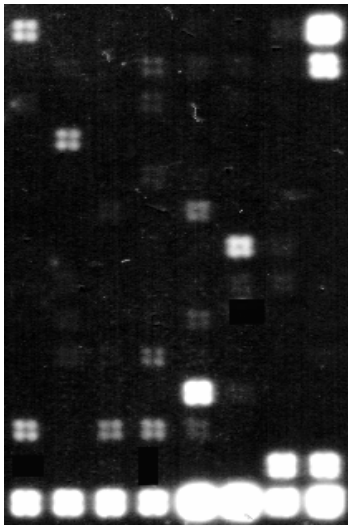
4.4. Detekcija ekspresije gena metodom «GEArray»

Usporedbu ekspresije gena različitih uzoraka RNK radili smo pomoću metode GEArray (GEArray, Superarray Bioscience, Frederic, MD, SAD) u Imunološkom zavodu, Zagreb.

Kod ispitivanja RNK iz MRC-5 stanica (6 sati nakon infekcije) koristili smo tri serije membrana; GEArray Q serija ljudski citokini (kat.broj HS-003) (Tablica 2.), GEArray Q serija ljudski NF-kB signalni put (kat.broj HS-016) (Tablica 3.) i GEArray Q serija ljudske adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa (kat.broj HS-010) (Tablica 4.). Prilikom testiranja uzoraka RNK iz HEK 293 stanica (3 i 5 dana nakon infekcije) koristili smo dvije vrste membrana, GEArray Q serija ljudske adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa (kat.broj HS-010) (Tablica 4.) i GEArray Q serija ljudska apoptoza (kat.broj HS-002) (Tablica 5.).

GEArray membrane sadrže 96 cDNK fragmenata uključenih u određeni biološki put ili obitelj molekula. Kao interne pozitivne kontrole membrane također sadrže i sekvence za β-aktin i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH, od engl.

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), dok kao negativne kontrole sadrže sekvence za PUC18 (od engl. *PUC18 Plasmid DNA*) (Slika 7.).



Slika 7. Izgled GEArray membrane. Svako bijelo područje predstavlja jačinu ekspresije pojedinog testiranog gena. Posljednjih 10 bijelih točaka prikazuju ekspresiju gena za pozitivne kontrole, β -aktin i GAPDH.

Analizu ekspresije gena na membranama radili smo prema uputama proizvođača. Ukratko, uzorke RNK smo preveli u cDNK pomoću reverzne transkripcije; 3 μ L uzorka smo pomiješali s 3 μ L pufera A te dodali vode do ukupnog volumena od 10 μ L. Tijekom inkubacije uzoraka (3min/70°C i 2min/42°C) napravili smo otopinu (RT koktel) koja sadrži 2 μ L biotin-16-dUTP (Roche), 1 μ L inhibitora reverzne transkripcije, 1 μ L MMLV reverzne transkriptaze i 4 μ L BN pufera (pufer sadrži 1 μ L 1 M DTT, 50 μ L dNTP smjese i 50 μ L RT pufera) te zagrijali smjesu 1 min na 42°C. Dobiveni RT koktel i uzorak smo pomiješali te inkubirali 90 min na 42°C i 5 min na 95°C te odmah stavili na led.

Dobivene c-DNK probe obilježene biotinom spremne su za daljnju obradu. Tijekom zadnjeg koraka sinteze proba započeli smo s pripremom membrana za hibridizaciju. Membrane koje se nalaze u plastičnim nosačima ovlažili smo s 5 mL deionizirane vode. Dok su se membrane vlažile napravili smo GEAprihib otopinu. Zagrijali smo GEAprihib hibridizacijsku otopinu na 60°C te smo stavili „salmon sperm“ DNK

(Invitrogen, Frederick, MD, SAD) otopinu 5min na 100°C. Pomiješali smo zagrijanu GEAhhib hibridizacijsku otopinu te denaturiranu „salmon sperm“ DNK te smo dobili GEApreib otopinu. Nakon što smo odlili deioniziranu vodu iz nosača dodali smo GEApreib otopinu te stavili nosače u cilindre hibridizatora i inkubirali 1,5 sati/ 60°C pri stalnoj vrtnji od 8 rpm.

Tijekom ove inkubacije napravili smo GEAhhib otopinu tako što smo pomiješali prije pripremljene cDNK probe i 0,75 mL zagrijane GEApreib otopine.

Nakon što smo odlili GEApreib otopinu iz plastičnih nosača dodali smo GEAhhib otopinu te slijedi inkubacija u hibridizatoru preko noći na 60°C pri stalnoj vrtnji od 8 rpm. Slijedeći dan isprali smo membrane te smo dodali po 2 mL GEA blokirajuće otopine Q. Slijedila je inkubacija od 40 min. pri stalnoj vrtnji od 20 rpm na sobnoj temperaturi. Nakon što smo odlili otopinu Q iz nosača, dodali smo streptavidin i inkubirali 10 min. na sobnoj temperaturi, pri stalnoj vrtnji od 8 rpm. Nakon ispiranja dodali smo 1 mL CDP-star kemiluminiscentnog supstrata te inkubirali na sobnoj temperaturi 2 min. Nakon inkubacije pincetom smo izvadili membrane iz plastičnih nosača te ih naslonili na filter papir kako bi odlili ostatak supstratne otopine. Kemiluminiscentnu detekciju smo izveli izlaganjem membrana rendgenskom filmu (u prosjeku je vrijeme ekspozicije iznosilo oko 5 min). Rendgenski film se skenira, a slika se obrađuje pomoću programa Kodak ID Analysis Software, Version 3.5 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, SAD). Jačina signala testiranih gena korigira se u odnosu na jačinu pozadinske ekspresije te ekspresiju kontrolnih gena β -aktina i GAPDH. Signifikantnom promjenom smatrali smo rezultat kod kojeg je omjer jačine signala određenog gena između dva testirana uzorka veći od dva. Kao najslabiji značajan signal smatrali smo jačinu signala od najmanje 10% jačine signala kontrolnih gena.

4.5. Detekcija ekspresije gena reverznom transkripcijom - lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR)

Pojedine gene ili skupinu gena kod kojih smo dobili značajnu razliku u ekspresiji između testiranih uzoraka GEArray metodom također smo testirali RT-PCR-om u Imunološkom zavodu, Zagreb.

U tu svrhu koristili smo komercijalno dostupne kitove "MultiGene"-12 RT-PCR Profiling kitove (Superarray Bioscience, Frederic, MD, SAD). Pomoću ovih kitova moguće je odrediti ekspresiju 11 gena u jednom uzorku, dok jedan gen služi kao interna pozitivna kontrola (GAPDH).

Za testiranje ekspresije citokinskih gena koristili smo slijedeće kitove: Prilagođeni "MultiGene"-12™ RT-PCR kit za ljudske citokine/kemokine i njihove receptore koji sadrži početnice za IL-6, IL-8, IL-11, IL-12A, IL-12B, IL-13, IL-15, MCP-1, kemokinski (C-C motiv) receptor 4 (CCR4, od engl. *chemokine (C-C motif) receptor 4*), kemokinski (C-X-C motiv) receptor 4 (CXCR4, od engl. *chemokine (C-X-C motif) receptor 4*) i IL-19; Prilagođeni "MultiGene"-12™ RT-PCR kit za ljudske angiogenetske čimbenike rasta koji sadrži početnice za čimbenik stimulacije kolonija 3 (CSF-3, od engl. *colony stimulating factor 3*), čimbenik rasta hepatocita (HGF, od engl. *hepatocyte growth factor*), IL-8, koštani morfogenetski protein 2 (BMP-2, od engl. *bone morphogenetic protein 2*), CSF-1, čimbenik stimulacije kolonija 1 receptor (CSF-1R, od engl. *colony stimulating factor 1 receptor*), CSF-2, CSF-2RA, CSF-2RB, CSF-3R i čimbenik ranog odgovora rasta (EGR-1, od engl. *early growth response 1*) te prilagođeni "MultiGene"-12™ RT-PCR kit za ljudske angiogenetske čimbenike rasta koji sadrži početnice za FGF-11, FGF-5, GADD45A (od engl. *growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha*), GADD45B, GADD45C,

transformirajući čimbenik rasta β 1 (TGFB1, od engl. *transforming growth factor, beta 1*), TGFB2, TGFB3, inducirani transformirajući čimbenik rasta β (TGFB1, od engl. *transforming growth factor, beta induced*), TGFBR1, TGF-BR2 i TGFBR3.

Za testiranje ekspresije gena koji se nalaze u sklopu NF- κ B transkripcijskog puta te gena koji sudjeluju u procesu apoptoze koristili smo prilagođeni "MultiGene"-12™ RT-PCR ljudski p53 kit koji sadrži početnice za Bcl2-pridružen X protein (BAX, od engl. *BCL2-associated X protein*), katepsin D (CTSD, od engl. *cathepsin D*), TNF, tumorski protein p53 (TP53, od engl. *tumor protein p53*), adenzilodifosfat-riboziltransferazu (ADPRT, od engl. *ADP-ribosyltransferase*), Bcl2-antagonist stanične smrti (Bad, od engl. *BCL2-antagonist of cell death*), antiapoptotički regulator Bcl-2, citokrom c 1 (CYC1, od engl. *cytochrome c-1*), Daxx, NFKBIB (od engl. *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor beta*) i TNFR1a.

Kako bi testirali ekspresiju gena za adhezijske i molekule koje čine izvanstanični matriks koristili smo slijedeće kitove: Prilagođeni "MultiGene"-12™ RT-PCR kit za ljudske integrine koji sadrži početnice za integrin α ₁ (ITGA1), ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGA2B, ITGAL, ITGAV, integrin β ₁ (ITGB1) i ITGB2; Prilagođeni "MultiGene"-12™ RT-PCR kit za ljudske proteine izvanstaničnog matriksa koji sadrži početnice za kaveolin 1 (CAV1, od engl. *caveolin 1*), kolagen 1 α ₁ (COL1A1, od engl. *collagen, type I, alpha 1*), COL4A2, ECM-1, fibronektin 1 (FN1), laminin β ₁ (LAMB1, od engl. *laminin, beta 1*), izlučeni fosfoprotein 1 (SPP1, od engl. *secreted phosphoprotein 1*), COL18A1, ITGA5, ITGB1 i trombospondin 2 (THBS2, od engl. *thrombospondin 2*); Prilagođeni "MultiGene"-12™ RT-PCR kit za ljudske matriks metaloproteinaze koji sadrži početnice za MMP-1, MMP-13, MMP-2, MMP-3, MMP-

12, MMP-10, MMP-24, MMP-25, MMP-26, MMPL-1 i MMP-15; Prilagođeni "MultiGene"-12™ RT-PCR kit za adhezijske molekule endotelnih stanica 1 koji sadrži početnice za ITGB3, adhezijsku molekulu trombocitnih/epitelnih stanica 1 (PECAM1, od engl. *platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*), selektin L (SELL), katenin α_1 (CTNNA1), kateninu α -sličan 1 (CTNNAL1, od engl. *catenin alpha-like 1*), katenin β_1 (CTNNB1), katenin δ_1 (CTNND1), katenin δ_2 (CTNND2), adhezijsku molekulu neuralnih stanica 1 (NCAM1, od engl. *neural cell adhesion molecule 1*), NCAM2 i adhezijsku molekulu neurona (NRCAM, od engl. *neuronal cell adhesion molecule*); Prilagođeni "MultiGene"-12™ RT-PCR kit za ljudske kaspaze koji sadrži početnice za kaspazu 1 (CASP1), CASP2, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CASP10 i CASP14; Prilagođeni "MultiGene"-12™ RT-PCR kit za ljudske adhezijske molekule endotelnih stanica 2 koji sadrži početnice za kadherin 1 (CDH1, od engl. *cadherin 1*), CEACAM5 (od engl. *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5*), CTNNA1, CTNNAL1, CTNNB1, CTNND1, CTNND2, međustaničnu adhezijsku molekulu 1 (ICAM1, od engl. *intercellular adhesion molecule*), selektin E (SELE), SELL i adhezijsku molekulu vaskularnih stanica (VCAM1, od engl. *vascular cell adhesion molecule 1*).

Kako bi odredili ekspresiju proapoptotičkog BIK gena (od engl. *BCL2-interacting killer*) također smo upotrijebili i "SingleGene" PCR kit istoga proizvođača kod kojega je moguće testirati ekspresiju jednoga gena i interne pozitivne kontrole GAPDH.

RT-PCR izvodili smo prema uputama proizvođača. Ukratko, uzorke RNK smo preveli u cDNK pomoću reverzne transkripcije. 1 μ L uzorka smo pomiješali s 1 μ L nasumičnih početnica (Promega) te dodali vode do ukupnog volumena od 10 μ L. Tijekom inkubacije uzoraka (3min/70°C i 10min/37°C) napravili smo otopinu koja

sadrži 4 μL dNTP (2,5 mM) smjese, 1 μL RNAza inhibitora, 1 μL MMLV reverzne transkriptaze i 4 μL RT pufera te inkubirali 1 min na 37°C. Dobivenu otopinu i uzorak smo pomiješali te inkubirali 60 min na 37°C i 5 min na 95°C. Dobivene c-DNK uzorke smo držali na ledu do daljnje obrade. Uzorke smo testirali ili "MultiGene"-12 RT-PCR kitom ili "SingleGene" PCR kitom kako slijedi.

"MultiGene"-12 RT-PCR metoda

Za svaki testirani c-DNK uzorak resuspendirali smo HotStart "Sweet" PCR master mix u 300 μL deionizirane vode. Tada smo prebacili 20 μL c-DNK uzorka u tubicu koja sadrži otopljeni PCR master mix te smo dobili PCR koktel. Nadalje smo dodali po 25 μL PCR koktela u svaku od 12 PCR tubica pojedinog "MultiGene"-12 PCR kita.

Uzorke smo dalje obradili metodom lančane reakcije polimeraze prema programu: 15 minuta na 95°C i 30 ciklusa (30 sekundi na 95°C, 30 sekundi na 55°C, 30 sekundi na 72°C).

"SingleGene" PCR metoda

Za svaki testirani c-DNK uzorak resuspendirali smo "Sweet" PCR master mix u 150 μL deionizirane vode te smo dobili 2XPCR koktel. Za svaki testirani gen pomiješali smo 12,5 μL 2XPCR koktela, 1 μL cDNK uzorka, 1 μL GAPDH početnica, 2 μL smjese početnica za testirani gen te smo dodali deionizirane vode do konačnog volumena od 25 μL . Uzorke smo dalje obradili metodom lančane reakcije polimeraze prema programu: 5 minuta na 94°C i 22 ciklusa (30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na 50°C, 45 sekundi na 72°C).

Produkte PCR-a prikazali smo elektroforezom na 2% agaroznom gelu te smo naknadno obradili pomoću programa Kodak ID Analysis Software, Version 3.5 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, SAD).

Tablica 2. Popis testiranih citokina

Redni broj	Banka gena	Simbol gena	Naziv proteina
1	NM_001623	AIF1	Alograftski upalni čimbenik 1 (od engl. <i>allograft inflammatory factor 1</i>)
2	NM_006129	BMP1	Koštani morfogenetski protein 1 (od engl. <i>bone morphogenetic protein 1</i>)
3	NM_001200	BMP2	Koštani morfogenetski protein 2
4	NM_004962	GDF10	Čimbenik diferencijacije rasta 10 (od engl. <i>growth differentiation factor 10</i>)
5	NM_130851	BMP4	Koštani morfogenetski protein 4
6	NM_001718	BMP6	Koštani morfogenetski protein 6
7	NM_001720	BMP8B	Koštani morfogenetski protein 8b
8	NM_000757	CSF1	Čimbenik stimulacije kolonija (od engl. <i>colony stimulating factor 1</i>)
9	NM_000758	CSF2	Čimbenik stimulacije kolonija 2
10	NM_000759	CSF3	Čimbenik stimulacije kolonija 3
11	NM_000799	EPO	Eritropoetin
12	NM_000800	FGF1	Čimbenik rasta fibroblasta 1 (od engl. <i>fibroblast growth factor 1</i>)
13	NM_004465	FGF10	Čimbenik rasta fibroblasta 10
14	NM_004112	FGF11	Čimbenik rasta fibroblasta 11
15	NM_021032	FGF12	Čimbenik rasta fibroblasta 12
16	NM_004113	FGF12	Čimbenik rasta fibroblasta 12
17	NM_004115	FGF14	Čimbenik rasta fibroblasta 14
18	NM_003868	FGF16	Čimbenik rasta fibroblasta 16
19	NM_003867	FGF17	Čimbenik rasta fibroblasta 17
20	NM_005117	FGF19	Čimbenik rasta fibroblasta 19
21	NM_002006	FGF2	Čimbenik rasta fibroblasta 2
22	NM_019851	FGF20	Čimbenik rasta fibroblasta 20
23	NM_019113	FGF21	Čimbenik rasta fibroblasta 21
24	NM_020638	FGF23	Čimbenik rasta fibroblasta 23
25	NM_005247	FGF3	Čimbenik rasta fibroblasta 3
26	NM_002007	FGF4	Čimbenik rasta fibroblasta 4
27	NM_004464	FGF5	Čimbenik rasta fibroblasta 5
28	NM_020996	FGF6	Čimbenik rasta fibroblasta 6
29	NM_002009	FGF7	Čimbenik rasta fibroblasta 7
30	NM_002010	FGF9	Čimbenik rasta fibroblasta 9
31	NM_004469	FIGF	C-fos-om induciran čimbenik rasta (od engl. <i>C-fos induced growth factor</i>)
32	NM_000601	HGF	Čimbenik rasta hepatocita (od engl. <i>hepatocyte growth factor</i>)
33	NM_024013	IFNA1	Interferon α 1
34	NM_000605	IFNA2	Interferon α 2
35	NM_021068	IFNA4	Interferon α 4
36	NM_002169	IFNA5	Interferon α 5
37	NM_021002	IFNA6	Interferon α 6
38	NM_021057	IFNA7	Interferon α 7
39	NM_002176	IFNB1	Interferon β 1
40	NM_000619	IFNG	Interferon γ
41	NM_002177	IFNW1	Interferon ω 1
42	NM_000618	IGF1	Čimbenik rasta sličan inzulinu 1 (od engl. <i>insulin-like growth factor 1</i>)
43	NM_000612	IGF2	Čimbenik rasta sličan inzulinu 2 (od engl. <i>insulin-like growth factor 2</i>)
44	NM_000572	IL10	Interleukin 10

45	NM_000641	IL11	Interleukin 11
46	NM_000882	IL12A	Interleukin 12A
47	NM_002187	IL12B	Interleukin 12B
48	NM_002188	IL13	Interleukin 13
49	L15344	IL14	Interleukin 14
50	NM_172175	IL15	Interleukin 15
51	NM_004513	IL16	Interleukin 16
52	NM_002190	IL17	Interleukin 17
53	NM_014443	IL17B	Interleukin 17B
54	NM_001562	IL18	Interleukin 18
55	NM_013371	IL19	Interleukin 19
56	NM_000575	IL1A	Interleukin 1 α
57	NM_000576	IL1B	Interleukin 1 β
58	NM_000586	IL2	Interleukin 2
59	NM_018724	IL20	Interleukin 20
60	NM_020525	IL22	Interleukin 22
61	NM_000588	IL3	Interleukin 3
62	NM_000589	IL4	Interleukin 4
63	NM_000879	IL5	Interleukin 5
64	NM_000600	IL6	Interleukin 6
65	NM_000880	IL7	Interleukin 7
66	NM_000584	IL8	Interleukin 8
67	NM_000590	IL9	Interleukin 9
68	NM_000230	LEP	Leptin
69	NM_000595	LTA	Limfotoksin α (od engl. <i>lymphotoxin alpha</i>)
70	NM_002341	LTB	Limfotoksin β
71	NM_002608	PDGFB	Čimbenik rasta trombocitnog podrijetla β (od engl. <i>platelet-derived growth factor beta polypeptide</i>)
72	NM_002607	PDGFA	Čimbenik rasta trombocitnog podrijetla α
73	NM_002825	PTN	Pleiotropin
74	NM_003236	TGFA	Transformirajući čimbenik rasta α (od engl. <i>transforming growth factor, alpha</i>)
75	NM_000660	TGFB1	Transformirajući čimbenik rasta β 1
76	NM_003238	TGFB2	Transformirajući čimbenik rasta β 2
77	NM_003239	TGFB3	Transformirajući čimbenik rasta β 3
78	NM_000460	THPO	Trombopoetin
79	NM_000594	TNF	Čimbenik tumorske nekroze 2 (od engl. <i>tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)</i>)
80	NM_003810	TNFSF10	Čimbenik tumorske nekroze 10
81	NM_003701	TNFSF11	Čimbenik tumorske nekroze 11
82	NM_003809	TNFSF12	Čimbenik tumorske nekroze 12
83	NM_003808	TNFSF13	Čimbenik tumorske nekroze 13
84	NM_006573	TNFSF13B	Čimbenik tumorske nekroze 13b
85	NM_003807	TNFSF14	Čimbenik tumorske nekroze 14
86	NM_005118	TNFSF15	Čimbenik tumorske nekroze 15
87	NM_005092	TNFSF18	Čimbenik tumorske nekroze 18
88	NM_003326	TNFSF4	Čimbenik tumorske nekroze 4
89	NM_000074	CD40LG	CD40 ligand
90	NM_000639	FASLG	Fas ligand (TNF obitelj, član 6)
91	NM_001252	TNFSF7	Čimbenik tumorske nekroze 7
92	NM_001244	TNFSF8	Čimbenik tumorske nekroze 8
93	NM_003811	TNFSF9	Čimbenik tumorske nekroze 9
94	NM_003376	VEGF	Čimbenik rasta vaskularnog endotela (od engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
95	NM_003377	VEGFB	Čimbenik rasta vaskularnog endotela B
96	NM_005429	VEGFC	Čimbenik rasta vaskularnog endotela C

Tablica 3. Popis testiranih gena uključenih u NF- κ B transkripcijski put

Redni broj	Banka gena	Simbol gena	Naziv proteina
1	NM_000029	AGT	Angiotenzinogen
2	NM_001880	ATF2	Aktivacijski transkripcijski čimbenik 2 (od engl. <i>activating transcription factor 2</i>)
3	NM_001710	BF	B-čimbenik, properdin
4	NM_000064	C3	Komponenta komplementa 3
5	NM_001278	CHUK	I κ B kinaza (od engl. <i>conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase</i>)
6	NM_004379	CREB1	Transkripcijski čimbenik (od engl. <i>CAMP responsive element binding protein 1</i>)
7	NM_000758	CSF2	Čimbenik stimulacije kolonija 2 (od engl. <i>colony stimulating factor 2</i>)
8	NM_000759	CSF3	Čimbenik stimulacije kolonija 3
9	NM_001964	EGR1	Čimbenik ranog odgovora rasta 1 (od engl. <i>early growth response 1</i>)
10	NM_005229	ELK1	Transkripcijski čimbenik, član ETS obitelji 1 (od engl. <i>Ets-like protein 1</i>)
11	NM_005230	ELK3	Transkripcijski čimbenik, član ETS obitelji 1
12	NM_003824	FADD	FAS-vezana domena smrti (od engl. <i>Fas-associated via death domain</i>)
13	NM_005252	FOS	Viralni onkogeni homolog (od engl. <i>V-fos osteosarcoma viral oncogene homolog</i>)
14	NM_000201	ICAM1	Međustanična adhezijska molekula 1 (od engl. <i>intercellular adhesion molecule 1</i>)
15	NM_000873	ICAM2	Međustanična adhezijska molekula 2
16	NM_002162	ICAM3	Međustanična adhezijska molekula 3
17	NM_001544	ICAM4	Međustanična adhezijska molekula 4
18	NM_003259	ICAM5	Međustanična adhezijska molekula 5
19	NM_024013	IFNA1	Interferon α 1
20	NM_002176	IFNB1	Interferon β 1
21	NM_000619	IFNG	Interferon γ
22	NM_001556	IKBKB	Kinaza inhibitora κ B β (od engl. <i>Inhibitor of κB, kinase beta</i>)
23	NM_003639	IKBKG	Kinaza inhibitora κ B γ
24	NM_014002	IKBKE	Kinaza inhibitora κ B ϵ
25	NM_000882	IL12A	Interleukin 12A
26	NM_002187	IL12B	Interleukin 12B
27	NM_000575	IL1A	Interleukin 1 α
28	NM_000576	IL1B	Interleukin 1 β
29	NM_000877	IL1R1	Interleukin 1 receptor, tip I
30	NM_004633	IL1R2	Interleukin 1 receptor, tip II
31	NM_000586	IL2	Interleukin 2
32	NM_000600	IL6	Interleukin 6
33	NM_000584	IL8	Interleukin 8
34	NM_001569	IRAK1	Interleukin 1 receptor povezana kinaza 1 (od engl. <i>interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>)
35	NM_001570	IRAK2	Interleukin 1 receptor povezana kinaza 2
36	NM_002198	IRF1	Čimbenik regulacije interferona 1 (od engl. <i>interferon regulatory factor 1</i>)
37	NM_002228	JUN	Onkogeni homolog, kodira dio transkripcijskog čimbenika AP-1 (od engl. <i>V-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog</i>)
38	NM_000595	LTA	Limfotoksin α
39	NM_003010	MAP2K4	Mitogenom aktivirana protein kinaza kinaze 4 (od engl. <i>mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>)
40	XM_042066	MAP3K1	Mitogenom aktivirana protein kinaza kinaze kinaze 1
41	NM_003954	MAP3K14	Mitogenom aktivirana protein kinaza kinaze kinaze 14
42	NM_006609	MAP3K2	Mitogenom aktivirana protein kinaza kinaze kinaze 2
43	NM_003188	MAP3K7	Mitogenom aktivirana protein kinaza kinaze kinaze 7
44	NM_001315	MAPK14	Mitogenom aktivirana protein kinaza 14
45	NM_002746	MAPK3	Mitogenom aktivirana protein kinaza 3
46	NM_002750	MAPK8	Mitogenom aktivirana protein kinaza 8
47	NM_002752	MAPK9	Mitogenom aktivirana protein kinaza 9
48	NM_002382	MAX	MYC-u pridružen čimbenik X (od engl. <i>MYC associated factor X</i>)
49	NM_002467	MYC	Onkogeni homolog (od engl. <i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>)

50	NM_002468	MYD88	Čimbenik sazrijevanja stanica mijeloidne loze 88 (od engl. <i>myeloid differentiation</i>)
51	NM_000615	NCAM1	Adhezijska molekula neuralnih stanica 1 (od engl. <i>neural cell adhesion molecule 1</i>)
52	NM_003998	NFKB1	Nuklearni čimbenik kB 1 (od engl. <i>Nuclear factor kB 1</i>)
53	NM_002502	NFKB2	Nuklearni čimbenik kB 2
54	NM_020529	NFKBIA	Inhibitor NF-kB α
55	NM_002503	NFKBIB	Inhibitor NF-kB β
56	NM_005163	AKT1	Onkogeni homolog (od engl. <i>V-akt thymoma viral oncogene homolog 1</i>)
57	NM_005007	NFKBIL1	Inhibitoru NF-kB-sličan protein 1 (od engl. <i>NF-kB inhibitor-like 1</i>)
58	NM_013432	NFKBIL2	Inhibitoru NF-kB-sličan protein 2
59	NM_006165	NFRKB	Nuklearni čimbenik povezan s kB vezujućim proteinom (od engl. <i>nuclear factor related to kappaB binding protein</i>)
60	NM_000625	NOS2A	Sintaza dušičnog oksida 2A (od engl. <i>nitric oxide synthase 2A</i>)
61	NM_000607	ORM1	Orosomukoid 1
62	NM_017617	NOTCH1	Transmembranski receptor
63	NM_002880	RAF1	Onkogeni homolog (od engl. <i>V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>)
64	NM_002908	REL	Onkogeni homolog (od engl. <i>V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog</i>)
65	NM_021975	RELA	Homolog viralnog onkogeno V-rel A
66	NM_006509	RELB	Homolog viralnog onkogeno V-rel B
67	NM_003804	RIPK1	Receptoru TNF obitelji pridružena serin-treonin kinaza 1 (od engl. <i>receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1</i>)
68	NM_000331	SAA1	Serumski amiloid A1
69	NM_002982	CCL2	Kemokinski (C-C motiv) ligand 2 (od engl. <i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>)
70	NM_000450	SELE	Selektin E
71	NM_000655	SELL	Selektin L
72	NM_003006	SELPLG	Selektin P ligand
73	NM_003131	SRF	Čimbenik serumskog odgovora (od engl. <i>serum response factor</i>)
74	NM_006116	MAP3K7IP1	Mitogenom aktiviran protein 1 koji djeluje na kinazu kinaze 7 (od engl. <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 1</i>)
75	NM_013254	TBK1	TANK-vezujuća kinaza 1 (od engl. <i>TANK-binding kinase 1</i>)
76	NM_030956	TLR10	Toll-u sličan receptor 10 (od engl. <i>Toll-like receptor 10</i>)
77	NM_003264	TLR2	Toll-u sličan receptor 2
78	NM_003265	TLR3	Toll-u sličan receptor 3
79	NM_003266	TLR4	Toll-u sličan receptor 4
80	NM_003268	TLR5	Toll-u sličan receptor 5
81	NM_006068	TLR6	Toll-u sličan receptor 6
82	NM_016562	TLR7	Toll-u sličan receptor 7
83	NM_016610	TLR8	Toll-u sličan receptor 8
84	NM_017442	TLR9	Toll-u sličan receptor 9
85	NM_000594	TNF	Čimbenik tumorske nekroze 2 (od engl. <i>tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)</i>)
86	NM_006290	TNFAIP3	Čimbenikom tumorske nekroze α inducirani protein 3 (od engl. <i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3</i>)
87	NM_003839	TNFRSF11A	Receptor čimbenika tumorske nekroze 11a
88	NM_003701	TNFSF11	Čimbenik tumorske nekroze 11
89	NM_003789	TRADD	Adaptorski protein povezan s receptorom TNF obitelji (od engl. <i>TNFRSF1A - associated via death domain</i>)
90	NM_005658	TRAF1	Čimbenik povezan s receptorom obitelji TNF 1 (od engl. <i>TNF receptor-associated factor 1</i>)
91	NM_021138	TRAF2	Čimbenik povezan s receptorom obitelji TNF 2
92	NM_003300	TRAF3	Čimbenik povezan s receptorom obitelji TNF 3
93	NM_004295	TRAF4	Čimbenik povezan s receptorom obitelji TNF 4
94	NM_004619	TRAF5	Čimbenik povezan s receptorom obitelji TNF 5
95	NM_004620	TRAF6	Čimbenik povezan s receptorom obitelji TNF 6
96	NM_001078	VCAM1	Adhezijska molekula vaskularnih stanica 1 (od engl. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>)

Tablica 4. Popis testiranih adhezijskih i molekula izvanstaničnog matriksa

Redni broj	Banka gena	Simbol gena	Naziv proteina
1	NM_006988	ADAMTS1	Metaloproteinaza s trombospondinskim motivom 1 (od engl. <i>A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 1</i>)
2	NM_007037	ADAMTS8	
3	NM_001228	CASP8	Metaloproteinaza s trombospondinskim motivom 8
4	NM_001229	CASP9	Kaspaza 8
5	NM_001753	CAV1	Kaspaza 9
6	NM_000610	CD44	Kaveolin 1
7	NM_004360	CDH1	CD44 antigen
8	NM_004363	CEACAM5	E-kadherin
9	NM_001843	CNTN1	Karcinoembrijskom antigenu-srodna stanična adhezijska molekula 5 (od engl. <i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5</i>)
10	NM_030582	COL18A1	Kontaktin 1
11	NM_000088	COL1A1	Kolagen, tipa XVIII, α 1
12	NM_001846	COL4A2	Kolagen, tipa I, α 1
13	NM_000099	CST3	Kolagen, tipa IV, α 2
14	NM_001903	CTNNA1	Cistatin C
15	NM_003798	CTNNA1	Katenin α 1
16	NM_001904	CTNNA1	Kateninu α -sličan1
17	NM_001331	CTNNA1	Katenin β 1
18	NM_001332	CTNNA1	Katenin δ 1
19	NM_001908	CTSB	Katenin δ 2
20	NM_001909	CTSD	Katepsin B
21	NM_001911	CTSG	Katepsin D
22	NM_001912	CTSL	Katepsin G
23	NM_005215	DCC	Katepsin L
24	NM_004425	ECM1	Izbrisan kod kolorektalnog karcinoma (od engl. <i>deleted in colorectal carcinoma</i>)
25	NM_005141	FGB	Protein izvanstaničnog matriksa 1 (od engl. <i>extracellular matrix protein 1</i>)
26	NM_002026	FN1	Fibrinogen β
27	NM_006665	HPSE	Fibronektin 1
28	NM_000201	ICAM1	Heparanaza
29	NM_181501	ITGA1	Međustanična adhezijska molekula 1 (od engl. <i>intercellular adhesion molecule</i>)
30	NM_003637	ITGA10	Integrin α_1
31	NM_012211	ITGA11	Integrin α_{10}
32	NM_002203	ITGA2	Integrin α_{11}
33	NM_000419	ITGA2B	Integrin α_2
34	NM_002204	ITGA3	Integrin α_{2b}
35	NM_000885	ITGA4	Integrin α_3
36	NM_002205	ITGA5	Integrin α_4
37	NM_000210	ITGA6	Integrin α_5
38	NM_002206	ITGA7	Integrin α_6
39	XM_167711	ITGA8	Integrin α_7
40	NM_002207	ITGA9	Integrin α_8
41	NM_002209	ITGAL	Integrin α_9
42	NM_000632	ITGAM	Integrin α_L
43	NM_002210	ITGAV	Integrin α_M
44	NM_000887	ITGAX	Integrin α_V
45	NM_002211	ITGB1	Integrin α_X
46	NM_000211	ITGB2	Integrin β_1
47	NM_000212	ITGB3	Integrin β_2
48	NM_000213	ITGB4	Integrin β_3

49	NM_002213	ITGB5	Integrin β_5
50	NM_000888	ITGB6	Integrin β_6
51	NM_000889	ITGB7	Integrin β_7
52	NM_002214	ITGB8	Integrin β_8
53	NM_002291	LAMB1	Laminin β_1
54	NM_002293	LAMC1	Laminin γ_1
55	NM_012215	MGEA5	Antigen eksprimiran u meningeomu 5 (od engl. <i>meningioma expressed antigen</i>) MHC klasi I podudarna sekvenca A (od engl. <i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i>)
56	NM_000247	MICA	
57	NM_002421	MMP1	Matriks metaloproteinaza 1
58	NM_002425	MMP10	Matriks metaloproteinaza 10
59	NM_005940	MMP11	Matriks metaloproteinaza 11
60	NM_002426	MMP12	Matriks metaloproteinaza 12
61	NM_002427	MMP13	Matriks metaloproteinaza 13
62	NM_004995	MMP14	Matriks metaloproteinaza 14
63	NM_002428	MMP15	Matriks metaloproteinaza 15
64	NM_005941	MMP16	Matriks metaloproteinaza 16
65	NM_016155	MMP17	Matriks metaloproteinaza 17
66	NM_004530	MMP2	Matriks metaloproteinaza 2
67	NM_004771	MMP20	Matriks metaloproteinaza 20
68	NM_006690	MMP24	Matriks metaloproteinaza 24
69	NM_021801	MMP26	Matriks metaloproteinaza 26
70	NM_002422	MMP3	Matriks metaloproteinaza 3
71	NM_002423	MMP7	Matriks metaloproteinaza 7
72	NM_002424	MMP8	Matriks metaloproteinaza 8
73	NM_004994	MMP9	Matriks metaloproteinaza 9
74	NM_000615	NCAM1	Adhezijska molekula neuralnih stanica 1 (od engl. <i>neural cell adhesion molecule 1</i>)
75	NM_005010	NRCAM	Adhezijska molekula neurona (od engl. <i>neuronal cell adhesion molecule</i>)
76	NM_000442	PECAM1	Adhezijska molekula trombocitnih/epitelnih stanica 1 (od engl. <i>platelet/endothelial cell adhesion molecule</i>)
77	NM_000930	PLAT	Plazminogen aktivator, tkivni
78	NM_002658	PLAU	Plazminogen aktivator, urokinaza
79	NM_002659	PLAUR	Plazminogen aktivator, urokinaza receptor
80	NM_000450	SELE	Selektin E
81	NM_000655	SELL	Selektin L
82	NM_003005	SELP	Selektin P
83	NM_002575	SERPINB2	Serinski (ili cisteinski) inhibitor proteinaze B2 (od engl. <i>serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 2</i>)
84	NM_002639	SERPINB5	Serinski (ili cisteinski) inhibitor proteinaze B5
85	NM_000602	SERPINE1	Serinski (ili cisteinski) inhibitor proteinaze E1
86	NM_003118	SPARC	Osteonektin (od engl. <i>secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)</i>)
87	NM_000582	SPP1	Osteopontin (od engl. <i>secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)</i>)
88	NM_003246	THBS1	Trombospondin 1
89	NM_003247	THBS2	Trombospondin 2
90	NM_007112	THBS3	Trombospondin 3
91	NM_003254	TIMP1	Tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza 1 (od engl. <i>tissue inhibitor of metalloproteinase 1</i>)
92	NM_003255	TIMP2	Tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza 2
93	NM_000362	TIMP3	Tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza 3
94	NM_019894	TMPRSS4	Transmembranska proteaza (od engl. <i>transmembrane protease, serine 4</i>)
95	NM_001078	VCAM1	Adhezijska molekula vaskularnih stanica 1 (od engl. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>)
96	NM_000638	VTN	Vitronektin

Tablica 5. Popis testiranih gena uključenih u proces apoptoze

Redni broj	Banka gena	Simbol gena	Naziv proteina
1	NM_001160	APAF1	Aktivirajući čimbenik apoptotičkih peptidaza 1 (od engl. <i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>)
2	NM_013258	PYCARD	Protein uključen u proces apoptoze (od engl. <i>PYD and CARD domain containing</i>)
3	NM_000051	ATM	Kinaza koja je promjenjena u bolesnika s ataksijom teleangiektazijom (od engl. <i>ataxia telangiectasia mutated</i>)
4	NM_004322	BAD	BCL2-antagonist stanične smrti (od engl. <i>BCL2-antagonist of cell death</i>)
5	NM_001188	BAK1	BCL2 antagonist 1 (od engl. <i>BCL2-antagonist/killer 1</i>)
6	NM_004324	BAX	BCL2-pridružen X protein (od engl. <i>BCL2-associated X protein</i>)
7	NM_003921	BCL10	Proapoptotički regulator (od engl. <i>B-cell CLL/lymphoma 10</i>)
8	NM_000633	BCL2	Antiapoptotički regulator
9	NM_004049	BCL2A1	BCL2-srodan protein A1 (od engl. <i>BCL2-related protein A1</i>)
10	NM_138578	BCL2L1	BCL2-sličan 1
11	NM_006538	BCL2L11	BCL2-sličan 11
12	NM_004050	BCL2L2	BCL2-sličan 2
13	NM_001197	BIK	Proapoptotički protein (od engl. <i>BCL2-interacting killer</i>)
14	NM_004536	BIRC1	Inhibitorski protein apoptoze 1 (od engl. <i>Baculoviral IAP repeat-containing 1</i>)
15	NM_001166	BIRC2	Inhibitorski protein apoptoze 2
16	NM_001165	BIRC3	Inhibitorski protein apoptoze 3
17	NM_001167	BIRC4	Inhibitorski protein apoptoze 4
18	NM_001168	BIRC5	Inhibitorski protein apoptoze 5
19	NM_016252	BIRC6	Inhibitorski protein apoptoze 6
20	NM_001715	BLK	B limfoidna tirozin kinaza (od engl. <i>B lymphoid tyrosine kinase</i>)
21	NM_004052	BNIP3	Proapoptotički član BCL2 obitelji (od engl. <i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3</i>)
22	NM_032515	BOK	BCL2 srodan proapoptotički protein u jajniku (od engl. <i>BCL2-related ovarian killer</i>)
23	NM_033292	CASP1	Kaspaza 1
24	NM_001230	CASP10	Kaspaza 10
25	NM_003723	CASP13	Kaspaza 13
26	NM_012114	CASP14	Kaspaza 14
27	NM_032982	CASP2	Kaspaza 2
28	NM_004346	CASP3	Kaspaza 3
29	NM_001225	CASP4	Kaspaza 4
30	NM_004347	CASP5	Kaspaza 5
31	NM_032992	CASP6	Kaspaza 6
32	NM_001227	CASP7	Kaspaza 7
33	NM_001228	CASP8	Kaspaza 8
34	NM_012115	CASP8AP2	CASP8 pridruženi protein 2 (od engl. <i>CASP8 associated protein 2</i>)
35	NM_001229	CASP9	Kaspaza 9
36	NM_003879	CFLAR	CASP8 i FADD-u sličan regulator apoptoze (od engl. <i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i>)
37	NM_001274	CHEK1	Serin/treonin protein kinaza 1 (od engl. <i>CHK1 checkpoint homolog</i>)
38	NM_001279	CIDEA	DFFA-sličan induktor apoptoze a (od engl. <i>cell death-inducing DFFA-like effector a</i>)
39	NM_014430	CIDEB	DFFA-sličan induktor apoptoze b
40	NM_003805	CRADD	Adaptorni proapoptotički protein (od engl. <i>CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain</i>)
41	NM_014326	DAPK2	Protein kinaza 2 (od engl. <i>death-associated protein kinase 2</i>)
42	NM_004401	DFFA	DNK fragmentacijski čimbenik α (od engl. <i>DNA fragmentation factor, alpha</i>)
43	NM_004402	DFFB	DNK fragmentacijski čimbenik β
44	NM_003824	FADD	FAS-vezana domena smrti (od engl. <i>Fas-associated via death domain</i>)
45	NM_001924	GADD45A	Zaustavljanjem rasta i DNK-oštećenjem-inducibilni protein α (od engl. <i>growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>)
46	NM_003806	HRK	Harakiri (aktivator apoptoze)
47	NM_016561	BFAR	Bifunkcionalni regulator apoptoze (od engl. <i>bifunctional apoptosis regulator</i>)

48	NM_004507	HUS1	Protein važan za održavanje genomskog integriteta (od engl. <i>HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)</i>)
49	NM_000595	LTA	Limfotoksin α
50	NM_002341	LTB	Limfotoksin β
51	NM_002342	LTBR	Limfotoksin β receptor
52	NM_021960	MCL1	Sekvenca 1 leukemijskih mijeloidnih stanica (od engl. <i>myeloid cell leukemia sequence</i>)
53	NM_002392	MDM2	p53 vezujući protein (od engl. <i>Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein</i>)
54	NM_002468	MYD88	Čimbenik diferencijacije stanica mijeloidne loze 88 (od engl. <i>myeloid differentiation factor</i>)
55	NM_006092	CARD4	Protein koji sudjeluje u kaskadi apoptoze te NF-kB puta (od engl. <i>caspase recruitment domain family, member 4</i>)
56	NM_003946	NOL3	Nukleolarni protein 3 (od engl. <i>nucleolar protein 3</i>)
57	NM_006825	CKAP4	Citoskeletu pridružen protein 4 (od engl. <i>cytoskeleton-associated protein 4</i>)
58	NM_007194	CHEK2	Serin/treonin protein kinaza 2 (od engl. <i>CHK2 checkpoint homolog 2</i>)
59	NM_003804	RIPK1	Kinaza povezana s TNF receptorom 1 (od engl. <i>receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1</i>)
60	NM_003821	RIPK2	Kinaza povezana s TNF receptorom 2
61	NM_002947	RPA3	Replikacijski protein A3 (od engl. <i>replication protein A3</i>)
62	NM_004180	TANK	NF-kB aktivator povezan s TRAF obitelji (od engl. <i>TRAF family member-associated NFKB activator</i>)
63	NM_000594	TNF	Čimbenik tumorske nekroze (od engl. <i>tumor necrosis factor</i>)
64	NM_003844	TNFRSF10A	Receptor čimbenika tumorske nekroze 10a
65	NM_003842	TNFRSF10B	Receptor čimbenika tumorske nekroze 10b
66	NM_003841	TNFRSF10C	Receptor čimbenika tumorske nekroze 10c
67	NM_003840	TNFRSF10D	Receptor čimbenika tumorske nekroze 10d
68	NM_003790	TNFRSF25	Receptor čimbenika tumorske nekroze 25
69	NM_003820	TNFRSF14	Receptor čimbenika tumorske nekroze 14
70	NM_001065	TNFRSF1A	Receptor čimbenika tumorske nekroze 1A
71	NM_001066	TNFRSF1B	Receptor čimbenika tumorske nekroze 1B
72	NM_003327	TNFRSF4	Receptor čimbenika tumorske nekroze 4
73	NM_001250	CD40	CD40 antigen
74	NM_000043	FAS	Receptor čimbenika tumorske nekroze 6 (od engl. <i>TNF receptor superfamily, 6</i>)
75	NM_001242	TNFRSF7	Receptor čimbenika tumorske nekroze 7
76	NM_001243	TNFRSF8	Receptor čimbenika tumorske nekroze 8
77	NM_001561	TNFRSF9	Receptor čimbenika tumorske nekroze 9
78	NM_003810	TNFSF10	Čimbenik tumorske nekroze 10
79	NM_003701	TNFSF11	Čimbenik tumorske nekroze 11
80	NM_003809	TNFSF12	Čimbenik tumorske nekroze 12
81	NM_003808	TNFSF13	Čimbenik tumorske nekroze 13
82	NM_003807	TNFSF14	Čimbenik tumorske nekroze 14
83	NM_003326	TNFSF4	Čimbenik tumorske nekroze 4
84	NM_000074	CD40LG	CD40 ligand
85	NM_000639	FASLG	Fas ligand
86	NM_001252	TNFSF7	Čimbenik tumorske nekroze 7
87	NM_001244	TNFSF8	Čimbenik tumorske nekroze 8
88	NM_003811	TNFSF9	Čimbenik tumorske nekroze 9
89	NM_000546	TP53	Tumorski protein p53
90	NM_005658	TRAF1	Čimbenik povezan s receptorom obitelji TNF 1 (od engl. <i>TNF receptor-associated factor</i>)
91	NM_021138	TRAF2	Čimbenik povezan s receptorom obitelji TNF 2
92	NM_003300	TRAF3	Čimbenik povezan s receptorom obitelji TNF 3
93	NM_004295	TRAF4	Čimbenik povezan s receptorom obitelji TNF 4
94	NM_004619	TRAF5	Čimbenik povezan s receptorom obitelji TNF 5
95	NM_004620	TRAF6	Čimbenik povezan s receptorom obitelji TNF 6
96	NM_005879	TRAIIP	Protein vezan s čimbenikom povezanim s receptorom obitelji TNF (od engl. <i>TRAF interacting protein</i>)

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Virus Hantaan, uzročnik HVBS-a i virus Andes, uzročnik HPS-a korišteni su za infekciju dviju vrsta stanica, ljudskih fibroblasta i epitelnih stanica bubrega.

Cilj istraživanja bio je pratiti ekspresiju gena različitih molekula u stanicama inficiranim s ova dva virusa koji pripadaju istoj obitelji, međutim uzrokuju dvije različite bolesti.

Uzorke RNK iz MRC-5 stanica analizirali smo šest sati nakon infekcije te smo dobivene rezultate usporedili s ekspresijom gena neinficiranih stanica.

Uzorke RNK iz HEK 293 stanica analizirali smo tri i pet dana nakon infekcije te također dobivene rezultate usporedili s ekspresijom gena neinficiranih stanica.

5.1. Promjene u ekspresiji gena nakon infekcije MRC-5 stanica virusima Hantaan i Andes

5.1.1. Analiza ekspresije gena metodom «GEArray»

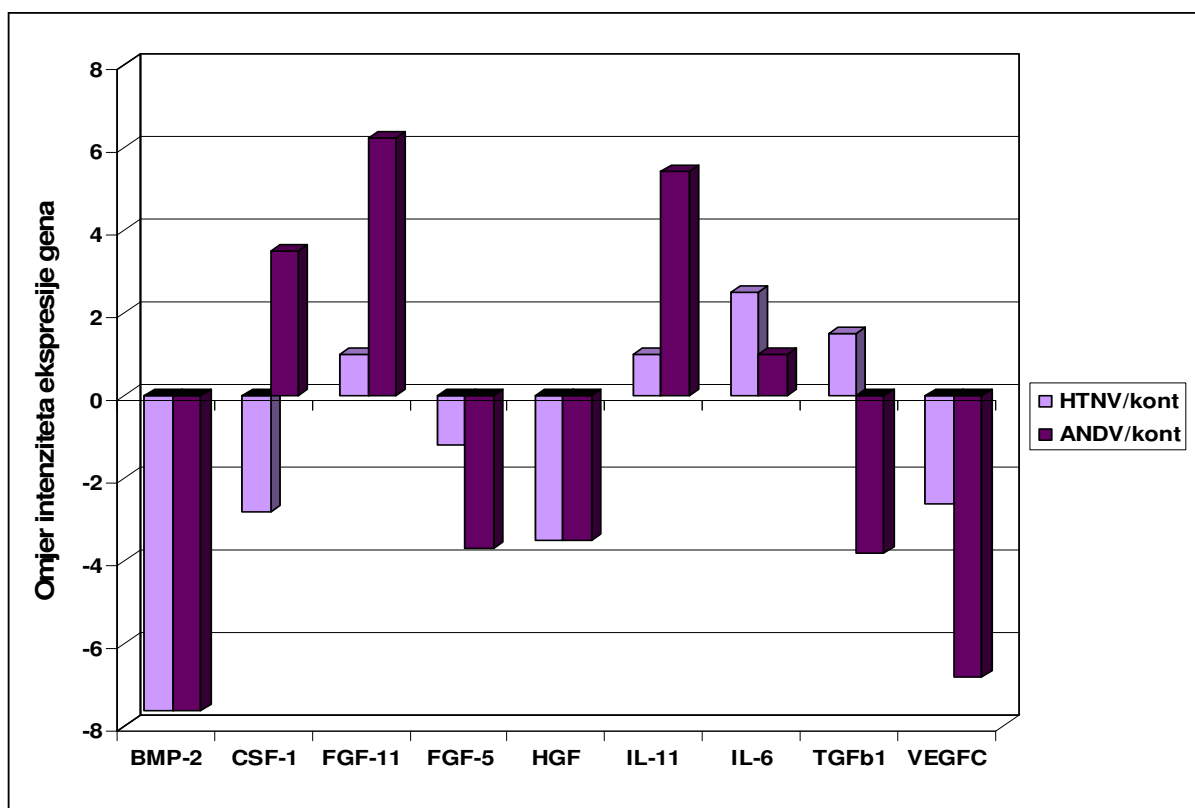
5.1.1.1. Analiza ekspresije citokinskih gena

Omjeri ekspresije gena za različite citokine između stanica inficiranih virusima Hantaan ili Andes i kontrolnih stanica prikazani su na slici 8. Od 96 testiranih citokinskih gena našli smo promjenu kod devet gena.

U ovom ranom stadiju infekcije virus Hantaan je utjecao na povećanje ekspresije gena za samo jedan gen, IL-6. Također je smanjio ekspresiju gena za različite čimbenike rasta uključujući, HGF, CSF-1 i čimbenik rasta vaskularnog endotela C (VEGFC, od eng. *vascular endothelial growth factor*). Najveća promjena nađena je kod gena za BMP-2, kojeg je ekspresija bila smanjena 7,6 puta.

Veći utjecaj na ekspresiju citokinskih gena imao je virus Andes, koji je smanjio ekspresiju pet gena, dok je ekspresija tri gena bila povećana u odnosu na kontrolne stanice. Slično kao virus Hantaan, i virus Andes je smanjio ekspresiju gena za HGF i VEGFC, međutim ekspresija gena za CSF-1 bila je povećana. Virus Andes je također utjecao na povećanje ekspresije gena za FGF-11, dok je smanjio ekspresiju gena za FGF-5 i TGF- β 1.

Također smo primijetili da je ekspresija gena za IL-11 bila povećana kod stanica inficiranih virusom Andes. Zanimljiv rezultat je i smanjena ekspresija gena za BMP-2 kod infekcije virusom Andes što smo također našli i kod infekcije virusom Hantaan.



BMP-2-koštani morfogenetski protein 2, **CSF-1**-čimbenik stimulacije kolonija 1, **FGF-11**-čimbenik rasta fibroblasta 11, **FGF-5**-čimbenik rasta fibroblasta 5, **HGF**-čimbenik rasta hepatocita, **IL-11**-interleukin 11, **IL-6**-Interleukin 6, **TGFb1**-transformirajući čimbenik rasta β 1, **VEGFC**-čimbenik rasta vaskularnog endotela C

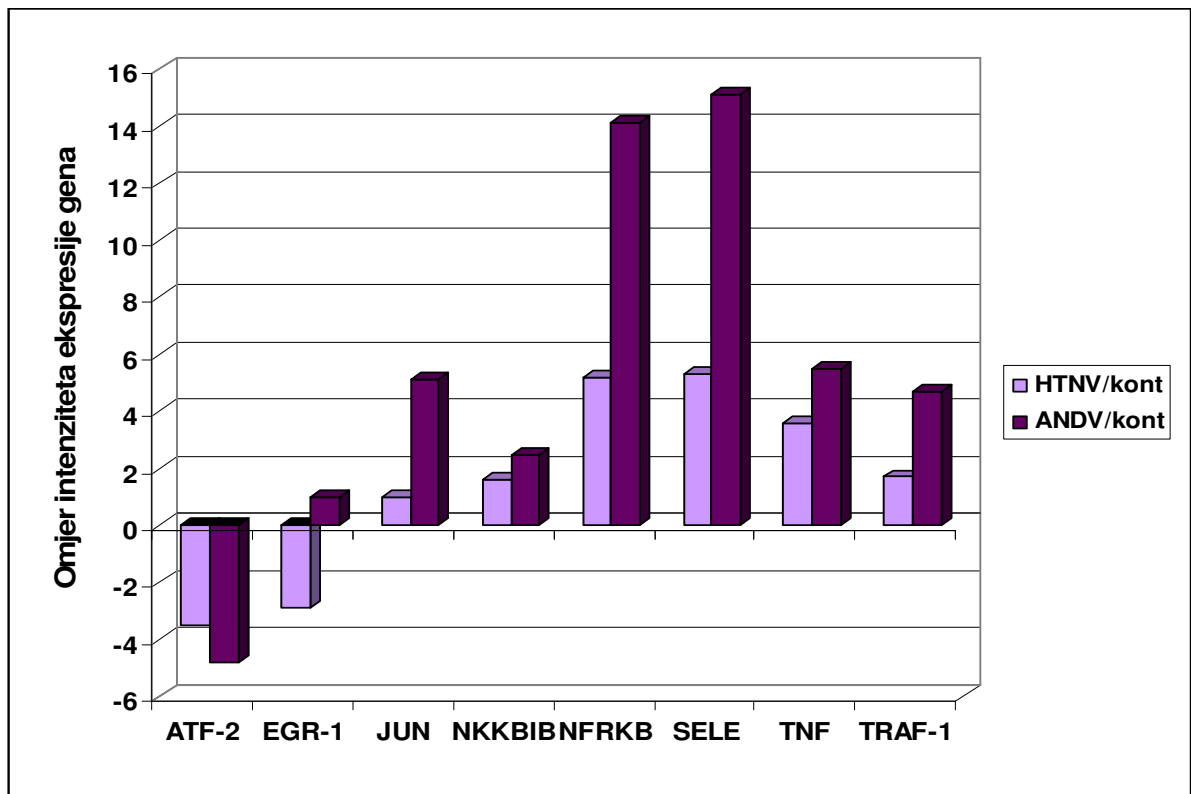
Slika 8. Citokinski geni kod kojih je nađena značajna promjena u genskoj ekspresiji između kontrolnih MRC-5 stanica i stanica inficiranih virusima Hantaan ili Andes. Uzorci RNK izolirani su šest sati nakon infekcije pomoću Trizola te posljedično faznom separacijom s kloroformom i precipitacijom s izopropanolom. Usporedbu ekspresije gena različitih uzoraka RNK rađena je pomoću metode GEArray. Kod ispitivanja citokinskih gena koristili smo membranu GEArray Q serija ljudski citokini. Za kvantifikaciju genskih signala na membranama koristili smo Kodak ID Image Analysis Software. Jačina signala testiranih gena korigira se u odnosu na jačinu pozadinske ekspresije te ekspresiju kontrolnih gena β -aktina i GAPDH. Značajnom promjenom smatramo rezultat kod kojeg je omjer jačine signala određenog gena između dva testirana uzorka veći od dva.

5.1.1.2. Analiza ekspresije gena u sklopu NF-kB transkripcijskog puta

Omjeri ekspresije gena za molekule uključene u NF-kB transkripcijski put između stanica inficiranih virusima Hantaan ili Andes i kontrolnih stanica prikazani su na slici 9. Od 96 testiranih gena koji se nalaze u sklopu NF-kB puta našli smo promjenu kod njih osam.

Virus Hantaan je utjecao na povećanje ekspresije tri gena, dok je smanjio ekspresiju dva gena. Smanjena ekspresija pronađena je kod gena za aktivacijski transkripcijski čimbenik 2 (ATF-2, od engl. *activating transcription factor 2*) i čimbenik ranog odgovora rasta 1 (EGR-1, od engl. *early growth response 1*). Povećana genska ekspresija nađena je kod člana Rel/NF-kB/IkB obitelji, vezujućeg proteina NFRKB (od engl. *nuclear factor related to kappa b binding protein*) te kod gena za E-selektin i TNF.

Virus Andes utjecao je na promjenu ekspresije sedam gena, kod šest gena smo pronašli povećanu ekspresiju, dok je kod samo jednoga gena (ATF-2) ekspresija bila smanjena. Kao i kod infekcije virusom Hantaan, virus Andes je povećao ekspresiju gena za NFRKB, TNF i E-selektin. Međutim, kod infekcije virusom Andes također smo uočili povećanu ekspresiju gena za inhibitor NF-kB β , NFKBIB (od engl. *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor beta*), onkogeni homolog JUN (od engl. *V jun sarcoma virus 17 oncogene homolog*) te TRAF-1.



ATF-2-aktivacijski transkripcijski čimbenik 2, **EGR-1**-čimbenik ranog odgovora rasta 1, **JUN**-V-jun onkogeni homolog, **NFKB1B**-inhibitor NF-kB β , **NFRKB**-nuklearni čimbenik povezan s kB vezujućim proteinom, **SELE**-selektin E, **TNF**-čimbenik tumorske nekroze, **TRAF1**-čimbenik povezan s receptorom obitelji TNF 1

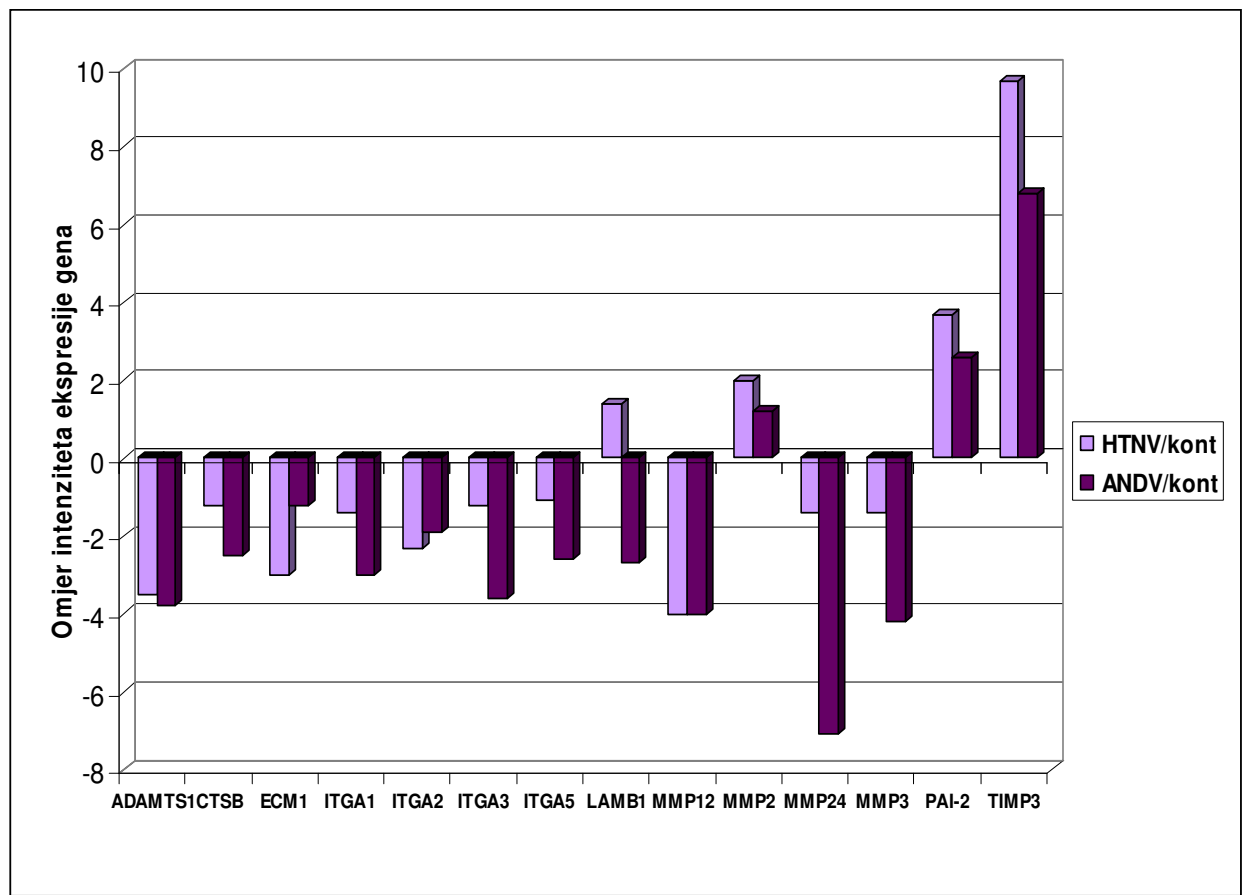
Slika 9. Geni u sklopu NF-kB transkripcijskog puta kod kojih je nađena značajna promjena u genskoj ekspresiji između kontrolnih MRC-5 stanica i stanica inficiranih virusima Hantaan i Andes. Uzorci RNK izolirani su šest sati nakon infekcije pomoću Trizola te posljedično faznom separacijom s kloroformom i precipitacijom s izopropanolom. Usporedbu ekspresije gena različitih uzoraka RNK rađena je pomoću metode GEArray. Kod ispitivanja gena u sklopu NF-kB puta koristili smo membranu GEArray Q serija ljudski NF-kB signalni put. Za kvantifikaciju genskih signala na membranama koristili smo Kodak ID Image Analysis Software. Jačina signala testiranih gena korigira se u odnosu na jačinu pozadinske ekspresije te ekspresiju kontrolnih gena β -aktina i GAPDH. Značajnom promjenom smatramo rezultat kod kojeg je omjer jačine signala određenog gena između dva testirana uzorka veći od dva.

5.1.1.3. Analiza ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa

Omjeri ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa između stanica inficiranih virusima Hantaan ili Andes i kontrolnih stanica prikazani su na slici 10. Od 96 testiranih gena našli smo promjenu kod njih 14.

Virus Hantaan je utjecao na povećanje ekspresije tri gena, dok je smanjio ekspresiju četiri gena. Smanjena ekspresija nađena je kod gena za ECM-1, integrin α_2 i metaloproteinazu s trombospondinskim motivom 1 (ADAMTS-1, od engl. *a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif*). Smanjena ekspresija nađena je kod gena za MMP-12, dok je ekspresija gena za MMP-2 bila povećana. Virus Hantaan utjecao je i na ekspresiju gena za serinski (ili cisteinski) inhibitor proteinaze 2 (SERPINB2, od engl. *serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 2* ili (PAI-2)) i TIMP-3 te je kod oba gena ekspresija bila povećana.

Virus Andes je utjecao na promjenu ekspresije jedanaest gena, kod devet gena je ekspresija bila smanjena, dok je kod dva gena bila povećana. Infekcija MRC-5 stanica virusom Andes znatno je utjecala na ekspresiju gena nekoliko članova obitelji integrina. Tako je pronađena smanjena ekspresija gena za integrin α_1 , integrin α_3 i integrin α_5 . Ovaj uzročnik HPS-a također je utjecao na smanjenje ekspresije gena za katepsin b (CTSB) i laminin β_1 . Virus Andes je smanjio ekspresiju gena za tri matriks metaloproteinaze MMP-3, MMP-12 i MMP-24. Slično kao kod infekcije virusom Hantaan, virus Andes je smanjio ekspresiju gena za ADAMTS-1.



ADAMTS1-metaloproteinaza s trombospondinskim motivom 1, **CTSB**-katepsin b, **ECM1**-protein izvanstaničnog matriksa 1, **ITGA1**-integrin α_1 , **ITGA2**-integrin α_2 , **ITGA5**-integrin α_5 , **LAMB1**-laminin β_1 , **MMP12**-matriks metaloproteinaza 12, **MMP24**-matriks metaloproteinaza 24, **MMP3**-matriks metaloproteinaza 3, **PAI-2**-serinski (ili cisteinski) inhibitor proteinaze 2, **TIMP3**-tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza 3

Slika 10. Geni za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa kod kojih je nađena značajna promjena u genskoj ekspresiji između kontrolnih MRC-5 stanica i stanica inficiranih virusima Hantaan ili Andes. Uzorci RNK izolirani su šest sati nakon infekcije pomoću Trizola te posljedično faznom separacijom s kloroformom i precipitacijom s izopropanolom. Usporedbu ekspresije gena različitih uzoraka RNK rađena je pomoću metode GEArray. Kod ispitivanja gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa koristili smo membranu GEArray Q serija ljudske izvanstanične i adhezijske molekule. Za kvantifikaciju genskih signala na membranama koristili smo Kodak ID Image Analysis Software. Jačina signala testiranih gena korigira se u odnosu na jačinu pozadinske ekspresije te ekspresiju kontrolnih gena β -aktina i GAPDH. Značajnom promjenom smatramo rezultat kod kojeg je omjer jačine signala određenog gena između dva testirana uzorka veći od dva.

5.1.2. Analiza ekspresije gena metodom RT-PCR

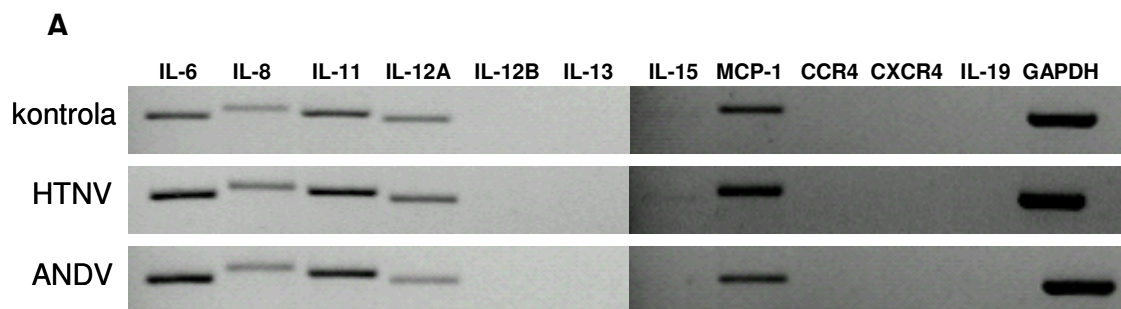
5.1.2.1. Analiza ekspresije citokinskih gena

Na slici 11 prikazani su rezultati testiranja citokinskih gena RT-PCR metodom, dok su u tablici 6 prikazani citokinski geni kod kojih smo RT-PCR analizom dobili značajne razlike u ekspresiji između inficiranih i kontrolnih stanica.

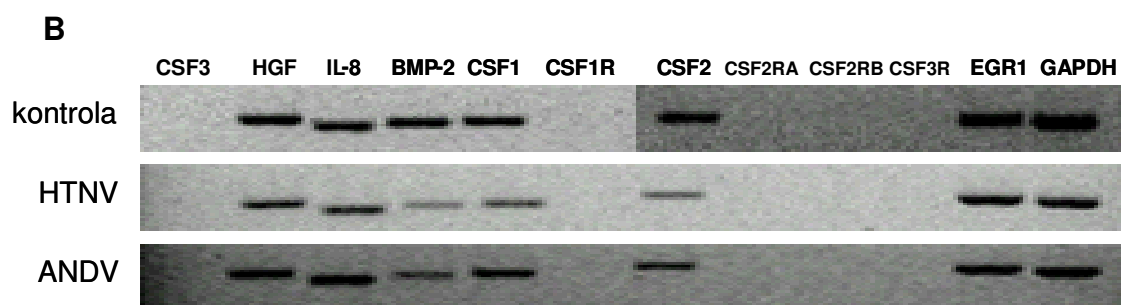
Rezultati testiranja ovom metodom slični su rezultatima GEAarray analize. Tako smo pokazali kako virus Hantaan značajno povisuje ekspresiju gena koji kodira IL-6, dok je smanjena ekspresija pronađena kod gena za CSF-1 i TGF- β 2. Na slici 11 jasno je vidljiv slabiji intenzitet signala za gen koji kodira čimbenik rasta CSF-2 kod MRC-5 stanica inficiranih virusom Hantaan. Međutim, radi jakog intenziteta pozadine, ekspresija istoga gena kod kontrolnih stanica izrazito je smanjena. Premda je radi ograničenja analize kontrolni signal smanjen te nema statističke značajnosti, smatramo kako bi trebalo napraviti daljnja istraživanja koja bi pokazala dolazi li kod infekcije virusom Hantaan do sniženja ekspresije ovoga čimbenika rasta.

Kod infekcije virusom Andes nismo našli povećanje ekspresije niti jednog testiranog gena, već smanjenje ekspresije gena za multifunkcionalni protein koji ima ulogu u popravku DNK, GADD45A (od engl. *growth arrest and DNA-damage-inducible*) te molekule TGF- β 2, člana TGF- β obitelji.

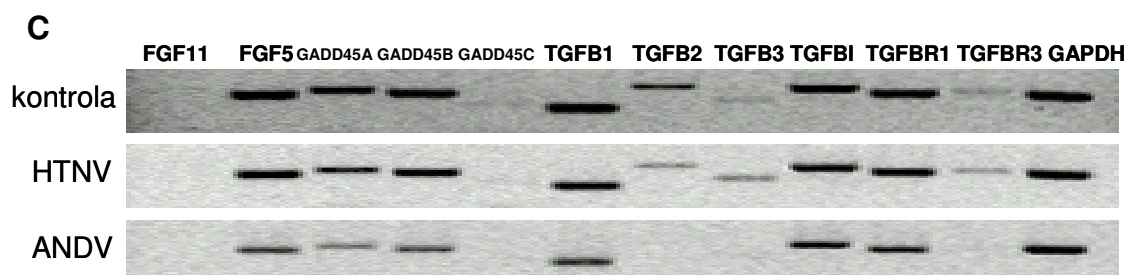
Zanimljivo je naglasiti kako je RT-PCR analiza također potvrdila i smanjenje ekspresije gena za BMP-2 kod infekcije virusima Hantaan i Andes.



IL-6-interleukin 6, **IL-8**-interleukin 8, **IL-11**-interleukin 11, **IL-12A**-interleukin 12a, **IL-12B**-interleukin 12b, **IL-13**-interleukin 13, **IL-15**-interleukin 15, **MCP-1**-monocitni kemotaktički protein 1, **CCR4**-kemokinski (C-C motiv) receptor 4, **CXCR4**-kemokinski (C-X-C motiv) receptor 4, **IL-19**- interleukin 19, **GAPDH**-gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza



CSF3-čimbenik stimulacije kolonija 3, **HGF**-čimbenik rasta hepatocita, **IL-8**-interleukin 8, **BMP-2**-koštani morfogenetski protein 2, **CSF1**-čimbenik stimulacije kolonija 1, **CSF1R**-čimbenik stimulacije kolonija 1 receptor, **CSF2**-čimbenik stimulacije kolonija 2, **CSF2RA**-čimbenik stimulacije kolonija 2 receptor α , **CSF2RB**-čimbenik stimulacije kolonija 2 receptor β , **CSF3R**-čimbenik stimulacije kolonija 3 receptor, **EGR1**-čimbenik ranog odgovora rasta 1, **GAPDH**- gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza



FGF11-čimbenik rasta fibroblasta 11, **FGF5**-čimbenik rasta fibroblasta 5, **GADD45A**-zaustavljanjem rasta i oštećenjem DNK-inducibilni protein 45 α , **GADD45B**-zaustavljanjem rasta i oštećenjem DNK-inducibilni protein 45 β , **GADD45C**-zaustavljanjem rasta i oštećenjem DNK-inducibilni protein γ , **TGFB1**-transformirajući čimbenik rasta β 1, **TGFB2**-transformirajući čimbenik rasta β 2, **TGFB3**-transformirajući čimbenik rasta β 3, **TGFBI**-inducirani transformirajući čimbenik rasta β , **TGFB1R**-transformirajući čimbenik rasta β receptor 1, **TGFB3R**-transformirajući čimbenik rasta β receptor 3, **GAPDH**-gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

Slika 11. RT-PCR detekcija ekspresije citokinskih gena kod neinficiranih stanica te stanica inficiranih virusima Hantaan i Andes. Uzorci RNK izolirani su šest sati nakon infekcije pomoću Trizola te posljedično faznom separacijom s kloroformom i precipitacijom s izopropanolom. Analiza ekspresije citokinskih gena različitih uzoraka RNK rađena je pomoću (A) "MultiGene"-12™ RT-PCR kita za ljudske citokine/kemokine i njihove receptore, (B) "MultiGene"-12™ RT-PCR kita za ljudske angiogenetske čimbenike rasta 1 i (C) "MultiGene"-12™ RT-PCR kita za ljudske angiogenetske čimbenike rasta 2. Za kvantifikaciju genskih signala na agaroznim gelovima koristili smo Kodak ID Image Analysis Software. Jačina signala testiranih gena korigira se u odnosu na jačinu pozadinske ekspresije te unutarnje kontrole (GAPDH).

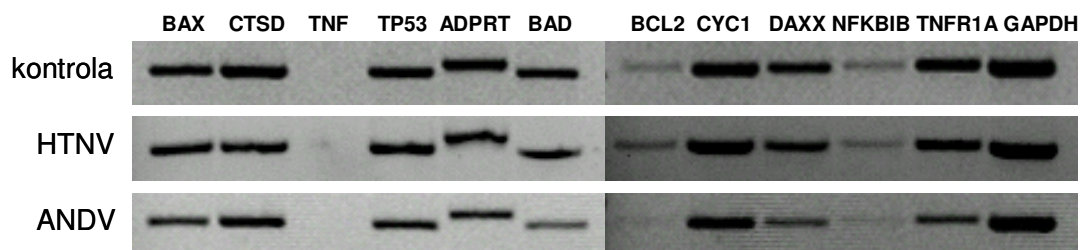
Tablica 6. Citokinski geni kod kojih je nađena značajna promjena u genskoj ekspresiji RT-PCR metodom između kontrolnih MRC-5 stanica i stanica inficiranih virusima Hantaan ili Andes.

Simbol gena	Naziv molekule	HTNV/kont	ANDV/kont
IL-6	Interleukin 6	2,4	1,5
BMP-2	Koštani morfogenetski protein 2	-4	-2,6
CSF-1	Čimbenik rasta kolonija 1	-2,3	-1,5
GADD45A	Zaustavljanjem rasta i oštećenjem DNK-inducibilni protein 45 α	-1,1	-2,9
TGFB2	Transformirajući čimbenik rasta β 2	-2,3	-10

5.1.2.2. Analiza ekspresije gena u sklopu NF-kB transkripcijskog puta

Od 11 testiranih gena RT-PCR metodom, virus Andes je utjecao na ekspresiju dva gena, dok virus Hantaan nije imao utjecaja na testirane gene. Smanjenje ekspresije gena utvrđeno je za gen koji kodira inhibitor NF-kB β (NFKBIB) i gen za molekulu Bcl-2 (Slika 12. i Tablica 7.).

Premda nismo našli statistički značajnu razliku u ekspresiji gena između kontrolnih stanica i stanica inficiranih virusom Andes, na slici 12 vidljiv je utjecaj ovoga virusa na tri značajne molekule u sklopu NF-kB puta, Bad, Daxx i TNFR1a (sniženje ekspresije kod sve tri molekule iznosilo je 1,8 puta). Stoga vjerujemo kako bi bilo zanimljivo dalje istražiti promjene ovih molekula te njihovu moguću ulogu kod hantavirusnih infekcija.



BAX-BCL2-pridružen X protein, **CTSD**-katepsin D, **TNF**-čimbenik tumorske nekroze, **TP53**-tumorski protein p53, **ADPRT**-adenozildifosfat-riboziltransferaza, **BAD**-BCL2-antagonist stanične smrti, **BCL2**-antiapoptotički regulator, **CYC1**-citokrom c, **DAXX**-protein 6 vezan za domenu smrti, **NFKBIB**-inhibitor NF-kB β , **TNFR1A**-čimbenik tumorske nekroze receptor 1a, **GAPDH**-gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

Slika 12. RT-PCR detekcija ekspresije 11 gena koji se nalaze u sklopu NF-kB puta kod neinficiranih stanica te stanica inficiranih virusima Hantaan i Andes. Uzorci RNK izolirani su šest sati nakon infekcije pomoću Trizola te posljedično faznom separacijom s kloroformom i precipitacijom s izopropanolom. Analiza ekspresije gena različitih uzoraka RNK rađena je pomoću "MultiGene"-12™ RT-PCR ljudskog p53 kita. Za kvantifikaciju genskih signala na agaroznim gelovima koristili smo Kodak ID Image Analysis Software. Jačina signala testiranih gena korigira se u odnosu na jačinu pozadinske ekspresije te unutarnje kontrole (GAPDH).

Tablica 7. Geni u sklopu NF-kB puta kod kojih je nađena značajna promjena u genskoj ekspresiji RT-PCR metodom između kontrolnih MRC-5 stanica i stanica inficiranih virusima Hantaan ili Andes.

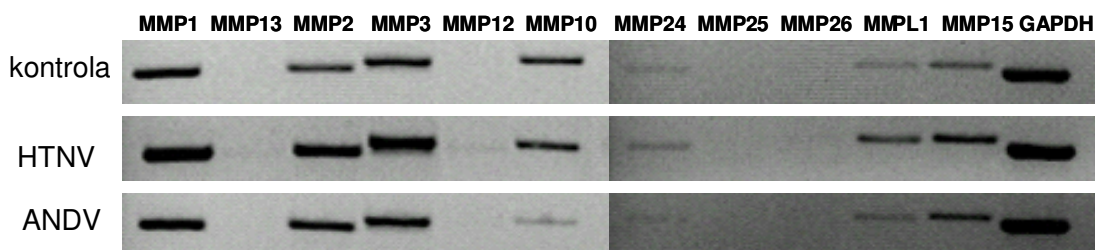
Simbol gena	Naziv molekule	HTNV/kont	ANDV/kont
BCL2	Antiapoptotički regulator	1,7	-2,4
NFKBIB	Inhibitor NF-kB β	1,6	-2,5

5.1.2.3. Analiza ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa

Infekcija virusom Hantaan utjecala je na povišenje ekspresije gena za dvije matriks metaloproteinaze, MMPL-1 i MMP-15.

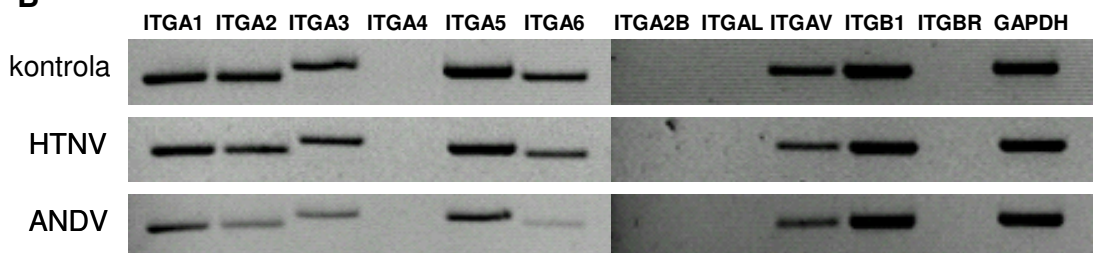
Kod infekcije virusom Andes uočene su veće promjene u ekspresiji, osobito kod integrinskih gena. Tako je nađeno smanjenje ekspresije gena za integrin α_2 , integrin α_3 i integrin α_6 . Virus Andes je također utjecao na ekspresiju gena jedne matriks metaloproteinaze, MMP-10, koja je bila smanjena. Nadalje, infekcija ovim virusom uzrokovala je i smanjenje ekspresije gena za ECM-1 i trombospondin 2 (Slika 13. i Tablica 8.).

A



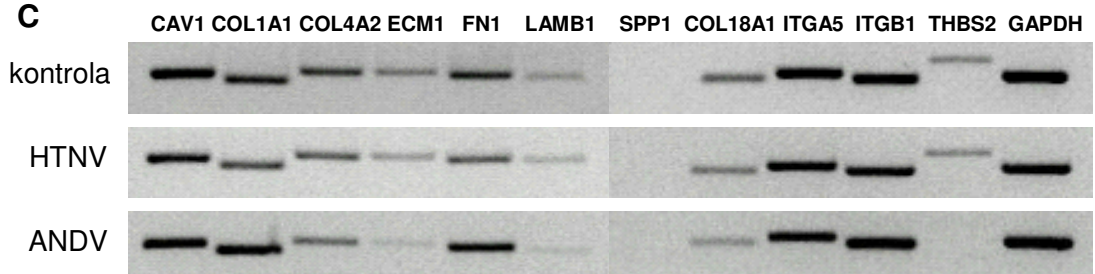
MMP1-matriks metaloproteinaza 1, **MMP13**-matriks metaloproteinaza 13, **MMP2**-matriks metaloproteinaza 2, **MMP3**-matriks metaloproteinaza 3, **MMP12**- matriks metaloproteinaza 12, **MMP10**-matriks metaloproteinaza 10, **MMP24**-matriks metaloproteinaza 24, **MMP25**-matriks metaloproteinaza 25, **MMP26**-matriks metaloproteinaza 26, **MMPL1**-matriks metaloproteinazi 1-sličan, **MMP15**-matriks metaloproteinaza 15, **GAPDH**-gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

B



ITGA1-integrin α_1 , **ITGA2**-integrin α_2 , **ITGA3**-integrin α_3 , **ITGA4**-integrin α_4 , **ITGA5**-integrin α_5 , **ITGA6**-integrin α_6 , **ITGA2B**-integrin α_{2b} , **ITGAL**-integrin α_i , **ITGAV**-integrin α_v , **ITGB1**-integrin β_1 , **ITGBR**-integrin β receptor, **GAPDH**-gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

C



CAV1-kaveolin 1, **CAL1A1**-kolagen, tipa I, $\alpha 1$, **COL4A2**-kolagen, tipa IV, $\alpha 2$, **ECM1**-protein izvanstaničnog matriksa 1, **FN1**-fibronektin 1, **LAMB1**-laminin $\beta 1$, **SPP1**-osteopontin, **COL18A1**-kolagen, tipa XVIII, $\alpha 1$, **ITGA5**-integrin $\alpha 5$, **ITGB1**-integrin $\beta 1$, **THBS2**-trombospondin 2, **GAPDH**-gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

Slika 13. RT-PCR detekcija ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa kod neinficiranih stanica te stanica inficiranih virusima Hantaan i Andes. Uzorci RNK izolirani su šest sati nakon infekcije pomoću Trizola te posljedično faznom separacijom s kloroformom i precipitacijom s izopropanolom. Analiza ekspresije gena različitih uzoraka RNK rađena je pomoću (A) "MultiGene"-12™ RT-PCR kita za ljudske matriks metaloproteinaze, (B) "MultiGene"-12™ RT-PCR kita za ljudske integrine i (C) "MultiGene"-12™ RT-PCR kita za ljudske proteine izvanstaničnog matriksa. Za kvantifikaciju genskih signala na agaroznim gelovima koristili smo Kodak ID Image Analysis Software. Jačina signala testiranih gena korigira se u odnosu na jačinu pozadinske ekspresije te unutarnje kontrole (GAPDH).

Tablica 8. Geni za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa kod kojih je nađena značajna promjena u genskoj ekspresiji RT-PCR metodom između kontrolnih MRC-5 stanica i stanica inficiranih virusima Hantaan ili Andes.

Simbol gena	Naziv molekule	HTNV/kont	ANDV/kont
MMP10	Matriks metaloproteinaza 10	-1,4	-3,3
MMPL1	Matriks metaloproteinazi 1-sličan	2,4	1,2
MMP15	Matriks metaloproteinaza 15	2,0	1,7
ITGA2	Integrin $\alpha 2$	1,0	-3,3
ITGA3	Integrin $\alpha 3$	-1,1	-2,5
ITGA6	Integrin $\alpha 6$	-1,3	-6,4
ECM1	Protein izvanstaničnog matriksa 1	1,1	-2,6
THBS2	Trombospondin 2	1,0	-4,4

5.2. Promjene u ekspresiji gena nakon infekcije HEK 293 stanica virusima

Hantaan i Andes

5.2.1. Promjene u ekspresiji gena tri dana nakon infekcije HEK 293 stanica virusima Hantaan i Andes

5.2.1.1. Analiza ekspresije gena metodom «GEArray»

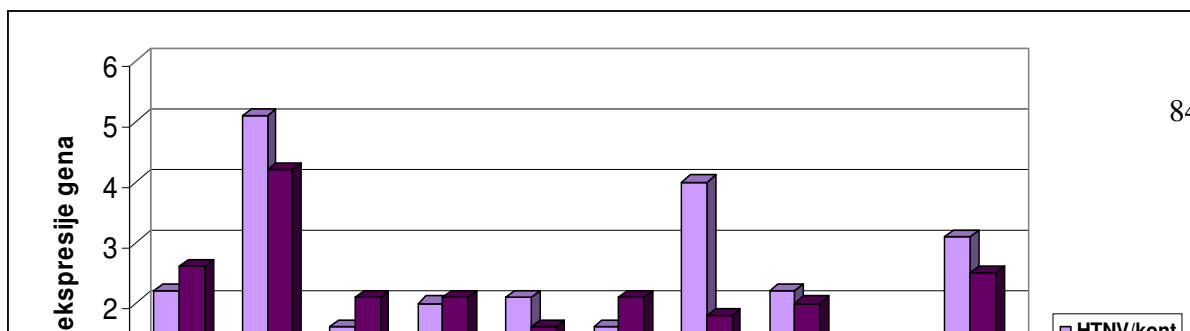
5.2.1.1.1. Analiza ekspresije gena uključenih u proces apoptoze

Omjeri ekspresije gena za molekule uključene u proces apoptoze između stanica inficiranih virusima Hantaan ili Andes i kontrolnih stanica prikazani su na slici 14. Od 96 testiranih gena našli smo značajnu promjenu kod njih 10.

Infekcija HEK 293 stanica virusom Hantaan uzrokovala je povećanu ekspresiju gena za Bcl-10, BIK i proapoptotički član Bcl-2 obitelji, BNIP-3 (od engl. *BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3*). Također je primijećen porast ekspresije gena za dvije kaspaze, kaspazu 7 i kaspazu 14. Nadalje, virus Hantaan je uzrokovao i povišenje ekspresije za TNF-11, dok je smanjio ekspresiju gena za receptor TNFR10d.

Slično kao kod infekcije virusom Hantaan, virus Andes je uzrokovao povećanje ekspresije gena za Bcl-10, BIK, BNIP-3, ali i za apoptoza inhibitorni protein 6, BIRC6 (od engl. *baculoviral IAP repeat-containing 6*). Ovaj je virus također povećao ekspresiju gena za TNF-11 i kaspazu 3.

Oba su virusa utjecala na povećanje ekspresije gena za aktivator apoptoze, molekulu harakiri.



Bcl-10-proapoptotički regulator, **BIK**-proapoptotički protein, **BIRC6**-apoptoza inhibitorni protein 6, **BNIP3**-proapoptotički član BCL2 obitelji, **CASP14**-kaspaza 14, **CASP3**-kaspaza 3, **CASP7**-kaspaza 7, **TNFSF11**-čimbenik tumorske nekroze 11, **TNFR10D**-čimbenik tumorske nekroze receptor 10d, **Harakiri**-aktivator apoptoze

Slika 14. Geni uključeni u proces apoptoze kod kojih je nađena značajna promjena u genskoj ekspresiji između kontrolnih HEK 293 stanica i stanica inficiranih virusima Hantaan i Andes. Uzorci RNK izolirani su tri dana nakon infekcije pomoću Trizola te posljedično faznom separacijom s kloroformom i precipitacijom s izopropanolom. Usporedbu ekspresije gena različitih uzoraka RNK rađena je pomoću metode GEArray. Kod ispitivanja gena uključenih u proces apoptoze koristili smo membranu GEArray Q serija ljudska apoptoza. Za kvantifikaciju genskih signala na membranama koristili smo Kodak ID Image Analysis Software. Jačina signala testiranih gena korigira se u odnosu na jačinu pozadinske ekspresije te ekspresiju kontrolnih gena β -aktina i GAPDH. Značajnom promjenom smatramo rezultat kod kojeg je omjer jačine signala određenog gena između dva testirana uzorka veći od dva.

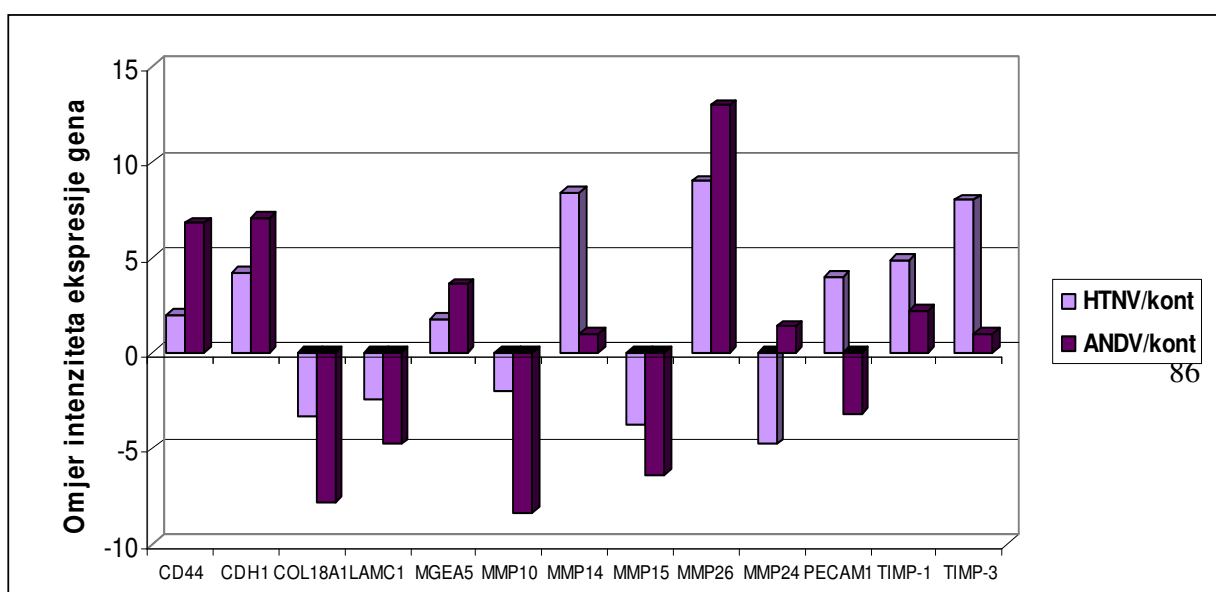
5.2.1.1.2. Analiza ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa

Omjeri ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa između stanica inficiranih virusima Hantaan ili Andes i kontrolnih stanica prikazani su na slici 15. Od 96 testiranih gena našli smo značajnu promjenu kod njih 13.

Najveći utjecaj na ekspresiju gena infekcija virusom Hantaan pokazala je kod članova obitelji matriks metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora. Tako je ovaj

virus uzrokovao povećanje ekspresije gena za MMP-14 i MMP-26, dok je do smanjenja ekspresije došlo kod gena za MMP-10, MMP-15 i MMP-24. Utjecaj na tkivne inhibitore matriks metaloproteinaza kod infekcije virusom Hantaan pokazao se kroz povećanje ekspresije gena za TIMP-1 i TIMP-3. Virus Hantaan je doveo i do povećanja ekspresije za CDH-1 i PECAM-1, dok je uzrokovao smanjenje ekspresije gena za COL18 α 1 i laminin γ ₁. Ovaj je uzročnik HVBS-a također doveo i do povećane ekspresije gena za adhezijsku molekulu CD44.

Virus Andes je također pokazao jaki utjecaj na ekspresiju gena za matriks metaloproteinaze i njihove tkivne inhibitore. Slično kao kod infekcije virusom Hantaan, virus Andes je uzrokovao povećanje ekspresije za MMP-26 te smanjenje ekspresije gena za MMP-10 i MMP-15. Ovaj uzročnik HPS-a povećao je ekspresiju gena za TIMP-1. Virus Andes doveo je do promjene ekspresije više adhezijskih molekula, uključujući povećanje ekspresije gena za CDH-1 i CD44, dok je uzrokovao smanjenje ekspresije gena za PECAM-1 i laminin γ ₁. Nadalje, infekcija virusom Andes dovela je do promjene ekspresije gena koji kodira važan građevni element COL18 α 1 te molekulu MGEA-5 (od engl. *meningioma expressed antigen 5*).



CD44-antigen CD44, **CDH1**-kadherin 1, **COL18A1**-kolagen, tipa XVIII, $\alpha 1$, **LAMC1**-laminin $\gamma 1$, **MGEA5**-antigen ekspimiran u meningeomu 5 (hijaluronidaza), **MMP10**-matriks metaloproteinaza 10, **MMP15**-matriks metaloproteinaza 15, **MMP26**-matriks metaloproteinaza 26, **MMP24**-matriks metaloproteinaza 24, **PECAM1**-adhezijska molekula trombocitnih/epitelnih stanica 1, **TIMP-1**-tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza 1, **TIMP-3**-tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza 3

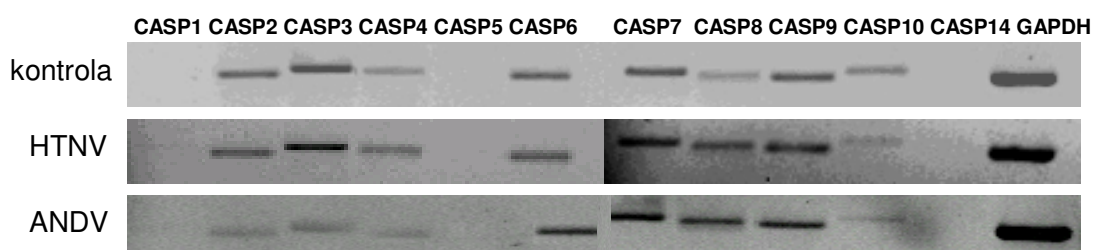
Slika 15. Geni za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa kod kojih je nađena značajna promjena u genskoj ekspresiji između kontrolnih HEK 293 stanica i stanica inficiranih virusima Hantaan i Andes. Uzorci RNK izolirani su tri dana nakon infekcije pomoću Trizola te posljedično faznom separacijom s kloroformom i precipitacijom s izopropanolom. Usporedbu ekspresije gena različitih uzoraka RNK rađena je pomoću metode GEArray. Kod ispitivanja gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa koristili smo membranu GEArray Q serija ljudske adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa. Za kvantifikaciju genskih signala na membranama koristili smo Kodak ID Image Analysis Software. Jačina signala testiranih gena korigira se u odnosu na jačinu pozadinske ekspresije te ekspresiju kontrolnih gena β -aktina i GAPDH. Značajnom promjenom smatramo rezultat kod kojeg je omjer jačine signala određenog gena između dva testirana uzorka veći od dva.

5.2.1.2. Analiza ekspresije gena metodom RT-PCR

5.2.1.2.1. Analiza ekspresije gena uključenih u proces apoptoze

Kod infekcije virusom Hantaan od 11 testiranih gena za različite kaspaze dobili smo pojačanu ekspresiju gena za kaspazu 2, kaspazu 3, kaspazu 4, kaspazu 5, kaspazu 6, kaspazu 7, kaspazu 8, kaspazu 9 i kaspazu 10 (Slika 16. i Tablica 9.).

S druge strane, infekcija virusom Andes je uzrokovala sniženje ekspresije gena za tri kaspaze; kaspazu 2, kaspazu 3 i kaspazu 10 (Slika 16. i Tablica 9.).



CASP1-kaspaza 1, **CASP2**-kaspaza 2, **CASP3**-kaspaza 3, **CASP4**-kaspaza 4, **CASP5**-kaspaza 5, **CASP6**-kaspaza 6, **CASP7**-kaspaza 7, **CASP8**-kaspaza 8, **CASP9**-kaspaza 9, **CASP10**-kaspaza 10, **CASP14**-kaspaza 14, **GAPDH**-gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

Slika 16. RT-PCR slike ekspresije gena uključenih u proces apoptoze kod neinficiranih HEK 293 stanica te stanica inficiranih virusima Hantaan i Andes. Uzorci RNK izolirani su tri dana nakon infekcije pomoću Trizola te posljedično faznom separacijom s kloroformom i precipitacijom s izopropanolom. Analiza ekspresije gena različitih uzoraka RNK rađena je pomoću “MultiGene”-12™ RT-PCR kita za ljudske kaspaze. Za kvantifikaciju genskih signala na agaroznim gelovima koristili smo Kodak ID Image Analysis Software. Jačina signala testiranih gena korigira se u odnosu na jačinu pozadinske ekspresije te unutarnje kontrole (GAPDH).

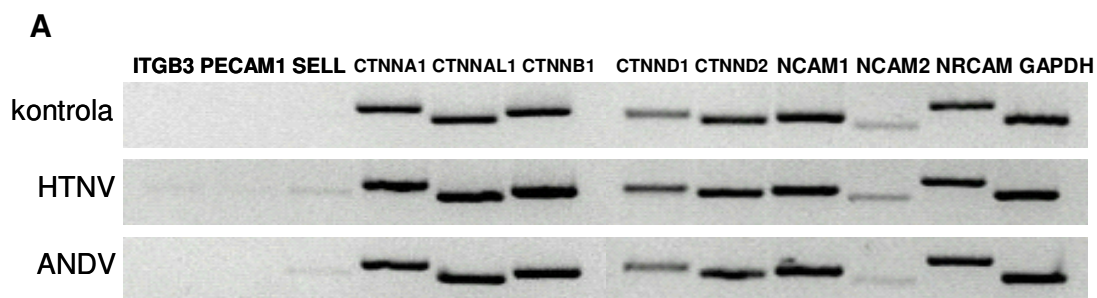
Tablica 9. Geni za molekule uključene u proces apoptoze kod kojih je nađena značajna promjena u genskoj ekspresiji RT-PCR metodom između kontrolnih HEK 293 stanica i stanica inficiranih virusima Hantaan ili Andes tri dana nakon infekcije.

Simbol gena	Naziv molekule	HTNV/kont	ANDV/kont
CASP2	Kaspaza 2	1,2	-3,5
CASP3	Kaspaza 3	1,4	-6,9
CASP8	Kaspaza 8	2,1	1,3
CASP10	Kaspaza 10	-1,7	-2,2

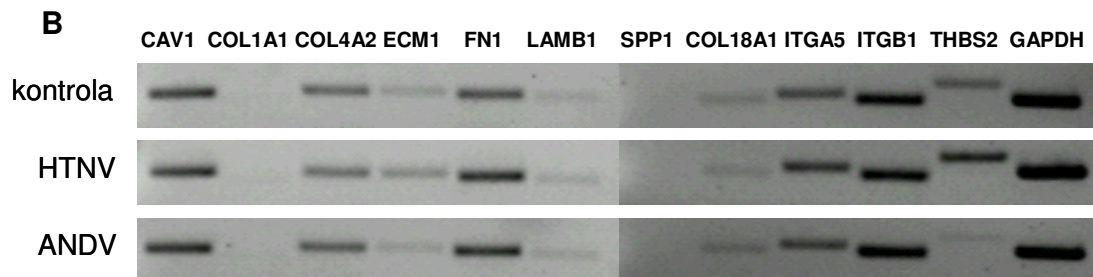
5.2.1.2.2. Analiza ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa

Tri dana nakon infekcije HEK 293 stanica virus Hantaan uzrokovao je povišenje ekspresije kod gena koji kodira matriks metaloproteinazu 13. Blago povećanje ekspresije u odnosu na kontrolne stanice primijetili smo i kod gena za trombospondin 2 koje je iznosilo 1,9 puta.

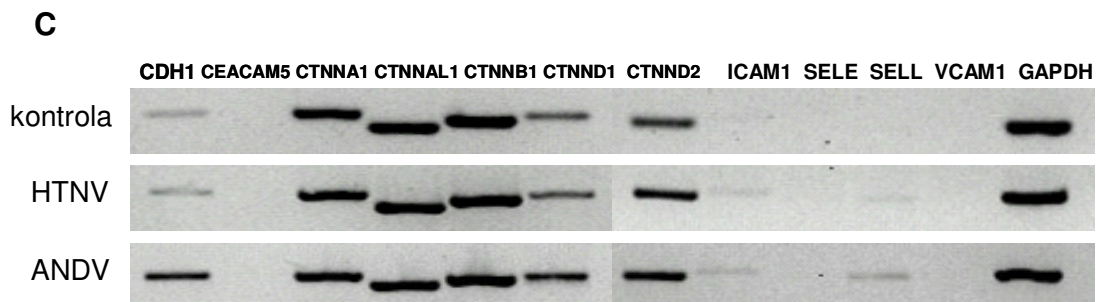
Veće promjene u ekspresiji gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa uočili smo kod infekcije HEK 293 stanica virusom Andes. Ovaj je virus uzrokovao povećanje ekspresije nekoliko adhezijskih molekula uključujući selektin L i kadherin 1. Smanjenje ekspresije gena virus Andes uzrokovao je kod gena za NCAM-2 i trombospondin 2. Najznačajnije promjene u ekspresiji nakon infekcije virusom Andes primijetili smo kod članova obitelji matriks metaloproteinaza. Tako je smanjena ekspresija nađena kod gena za MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-24 te MMPL-1 (Slika 17. i Tablica 10.).



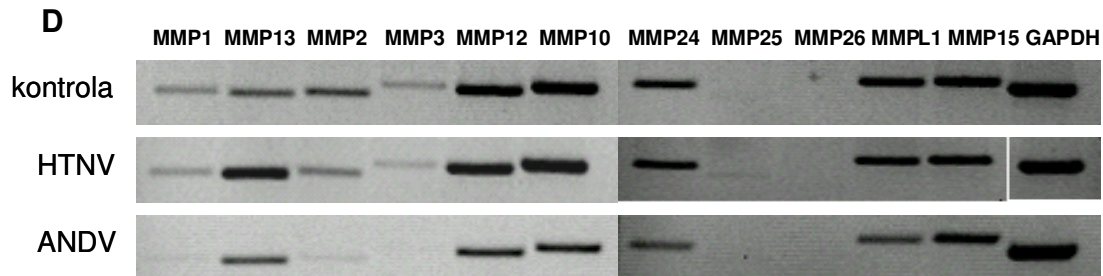
ITGB3-integrin β_3 , **PECAM1**-adhezijska molekula trombocitnih/epitelnih stanica 1, **SELL**-selektin L, **CTNNA1**-katenin α_1 , **CTNNAL1**-kateninu α_1 -sličan, **CTNNB1**-katenin β_1 , **CTNND1**-katenin δ_1 , **CTNND2**-katenin δ_2 , **NCAM1**-adhezijska molekula neuralnih stanica 1, **NCAM2**-adhezijska molekula neuralnih stanica 2, **NRCAM**-adhezijska molekula neurona, **GAPDH**-gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza



CAV1-kaveolin 1, **COL1A1**-kolagen, tipa I, α_1 , **COL4A2**-kolagen, tipa IV, α_2 , **ECM1**-protein izvanstaničnog matriksa 1, **FN1**-fibronektin 1, **LAMB1**-laminin β_1 , **SPP1**-osteopontin, **COL18A1**-kolagen, tipa XVIII, α_1 , **ITGA5**-integrin α_5 , **ITGB1**-integrin β_1 , **THBS2**-trombospondin 2, **GAPDH**-gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza



CDH1-kadherin 1, **CEACAM5**-karcinoembrijskom antigenu-srodna stanična adhezijska molekula 5, **CTNNA1**-katenin α_1 , **CTNNAL1**-kateninu α_1 -sličan, **CTNNB1**-katenin β_1 , **CTNND1**-katenin δ_1 , **CTNND2**-katenin δ_2 , **ICAM1**-međustanična adhezijska molekula 1, **SELE**-selektin E, **SELL**-selektin L, **VCAM1**-adhezijska molekula vaskularnih stanica 1, **GAPDH**-gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza



MMP1-matriks metaloproteinaza 1, **MMP13**-matriks metaloproteinaza 13, **MMP2**-matriks metaloproteinaza 2, **MMP3**-matriks metaloproteinaza 3, **MMP12**- matriks metaloproteinaza 12, **MMP10**-matriks metaloproteinaza 10, **MMP24**-matriks metaloproteinaza 24, **MMP25**-matriks metaloproteinaza 25, **MMP26**-matriks metaloproteinaza 26, **MMPL1**-matriks metaloproteinazi 1-sličan, **MMP15**-matriks metaloproteinaza 15, **GAPDH**-gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

Slika 17. RT-PCR detekcija ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa kod neinficiranih stanica te stanica inficiranih virusima Hantaan i Andes. Uzorci RNK izolirani su tri dana nakon infekcije pomoću Trizola te posljedično faznom separacijom s kloroformom i precipitacijom s izopropanolom. Analiza ekspresije gena različitih uzoraka RNK rađena je pomoću (A) "MultiGene"-12™ RT-PCR kita za ljudske endotelne adhezijske molekule 1, (B) "MultiGene"-12™ RT-PCR kita za ljudske endotelne adhezijske molekule 2 i (D) "MultiGene"-12™ RT-PCR kita za ljudske matriks metaloproteinaze. Za kvantifikaciju genskih signala na agaroznim gelovima koristili smo Kodak ID Image Analysis Software. Jačina signala testiranih gena korigira se u odnosu na jačinu pozadinske ekspresije te unutarnje kontrole (GAPDH).

Tablica 10. Geni za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa kod kojih je nađena značajna promjena u genskoj ekspresiji RT-PCR metodom između kontrolnih HEK 293 stanica i stanica inficiranih virusima Hantaan ili Andes tri dana nakon infekcije.

Simbol gena	Naziv molekule	HTNV/kont	ANDV/kont
NCAM2	Adhezijska molekula neuralnih stanica 2	1	-2,6
SELL	Selektin L	1	2,6
THBS2	Trombospondin 2	1,9	-6,1
CDH1	Kadherin 1	1,1	5,8
MMP1	Matriks metaloproteinaza 1	-1,2	-5,8
MMP13	Matriks metaloproteinaza 13	2,2	1,1
MMP2	Matriks metaloproteinaza 2	-1,7	-6,4
MMP3	Matriks metaloproteinaza 3	-1,5	-4
MMP24	Matriks metaloproteinaza 24	-1,2	-2,2
MMPL1	Matriks metaloproteinazi 1-sličan	-1,3	-2,3

5.2.2. Promjene u ekspresiji gena pet dana nakon infekcije HEK 293 stanica virusima Hantaan i Andes

5.2.2.1. Analiza ekspresije gena metodom «GEArray»

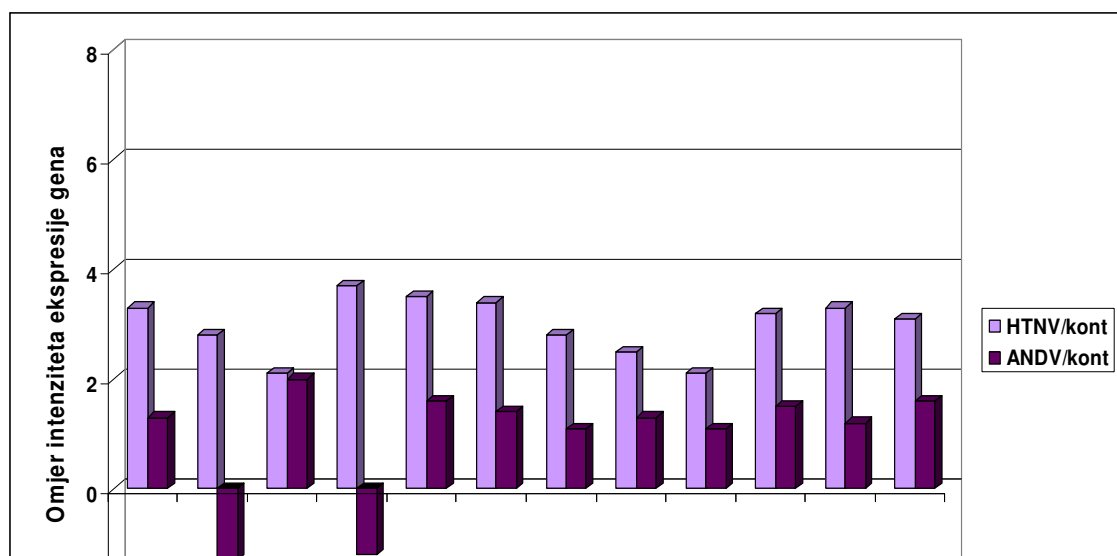
5.2.2.1.1. Analiza ekspresije gena uključenih u proces apoptoze

Omjeri ekspresije gena za molekule uključene u proces apoptoze između stanica inficiranih virusima Hantaan ili Andes i kontrolnih stanica prikazani su na slici 18. Od 96 testiranih gena našli smo značajnu promjenu kod njih 12.

Infekcija virusom Hantaan uzrokovala je znatno veće promjene u ekspresiji gena od infekcije virusom Andes.

Tako je značajno povećanje ekspresije virus Hantaan inducirao kod gena za Bcl-10, BIK, kaspazu 2 i kaspazu 7. Povećanje ekspresije pronašli smo i kod gena koji kodira serin/treonin protein kinazu 1 (CHEK 1, od engl. *CHK1 checkpoint homolog*) i aktivator apoptoze, molekulu harakiri. Značajno povećanje ekspresije virus Hantaan je inducirao kod gena koji se nalaze u sklopu TNF obitelji. Povećana ekspresija nađena je kod gena za TNF-9 i TNF-11 te u obitelji TNF receptora, uključujući TNFR10b i TNFR10c. Također je povećana ekspresija nađena i kod gena za TRAF-4 te kod vrlo važnog tumor supresor gena, gena p53.

Virus Andes je pet dana nakon infekcije HEK 293 stanica inducirao vrlo male promjene u ekspresiji te smo uočili jedino povećanje ekspresije kod gena za kaspazu 2.



Bcl-10-proapoptotički regulator, **BIK**-proapoptotički protein, **CASP2**-kaspaza 2, **CASP7**-kaspaza 7, **CHEK1**-serin/treonin protein kinaza 1, **Harakiri**-aktivator apoptoze, **TNFR10B**-čimbenik tumorske nekroze receptor 10b, **TNF9**-čimbenik tumorske nekroze 9, **TNF11**-čimbenik tumorske nekroze 11, **p53**-tumorski protein p53, **TRAF4**-čimbenik povezan s receptorom obitelji TNF 4, **TNFR10C**-čimbenik tumorske nekroze receptor 10c

Slika 18. Geni uključeni u proces apoptoze kod kojih je nađena značajna promjena u genskoj ekspresiji između kontrolnih HEK 293 stanica i stanica inficiranih virusima Hantaan i Andes. Uzorci RNK izolirani su pet dana nakon infekcije pomoću Trizola te posljedično faznom separacijom s kloroformom i precipitacijom s izopropanolom. Usporedbu ekspresije gena različitih uzoraka RNK rađena je pomoću metode GEArray. Kod ispitivanja gena uključenih u proces apoptoze koristili smo membranu GEArray Q serija ljudska apoptoza. Za kvantifikaciju genskih signala na membranama koristili smo Kodak ID Image Analysis Software. Jačina signala testiranih gena korigira se u odnosu na jačinu pozadinske ekspresije te ekspresiju kontrolnih gena β -aktina i GAPDH. Značajnom promjenom smatramo rezultat kod kojeg je omjer jačine signala određenog gena između dva testirana uzorka veći od dva.

5.2.2.1.2. Analiza ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa

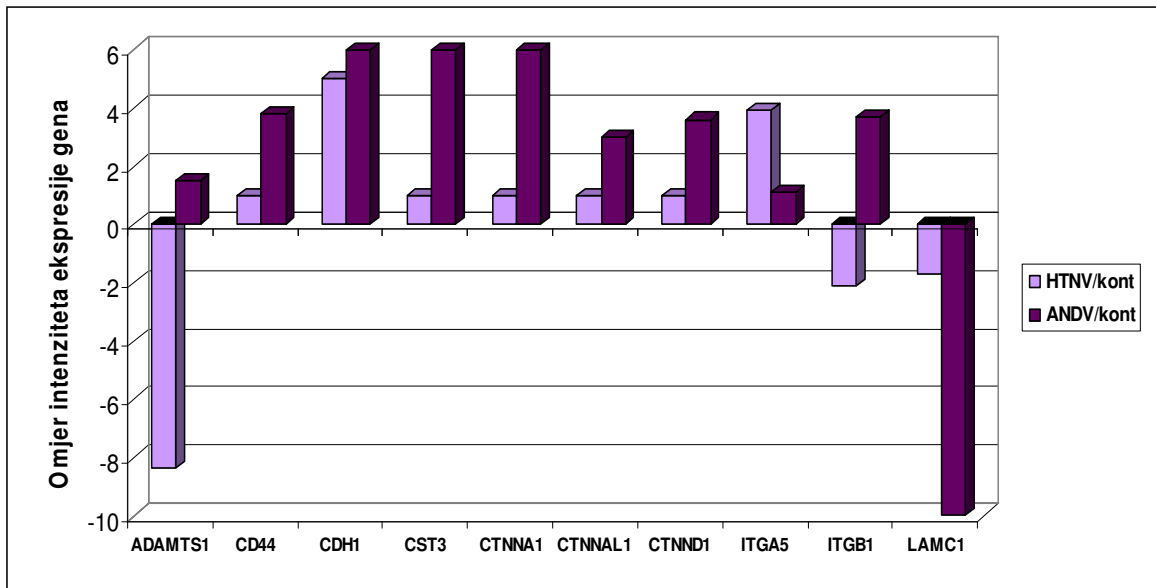
Omjeri ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa između stanica inficiranih virusima Hantaan ili Andes i kontrolnih stanica prikazani su na slici 19. Od 96 testiranih gena našli smo značajnu promjenu kod njih 21.

Infekcija HEK 293 stanica virusom Hantaan dovela je do sniženja ekspresije dva gena, gena za ADAMTS-1 i integrin β_1 . Nadalje, virus Hantaan je utjecao i na

povećanje ekspresije gena koji kodira integrin α_5 . Ovaj je virus također imao značajan utjecaj i na molekule iz obitelji matriks metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora čime je narušena njihova fiziološka homeostaza. Tako je virus Hantaan povećao ekspresiju gena za MMP-14 i MMP-26 te tkivnog inhibitora TIMP-3. Prilikom infekcije ovim uzročnikom HVBS-a također je došlo do povećanja ekspresije gena za nekoliko važnih adhezijske molekula, uključujući gene za E-kadherin, NCAM-1, PECAM-1 i E-selektin. Virus Hantaan povećao je ekspresiju gena za MHC klase I podudarnu sekvencu A, MICA gen (od engl. *MHC class I polypeptide-related sequence A*).

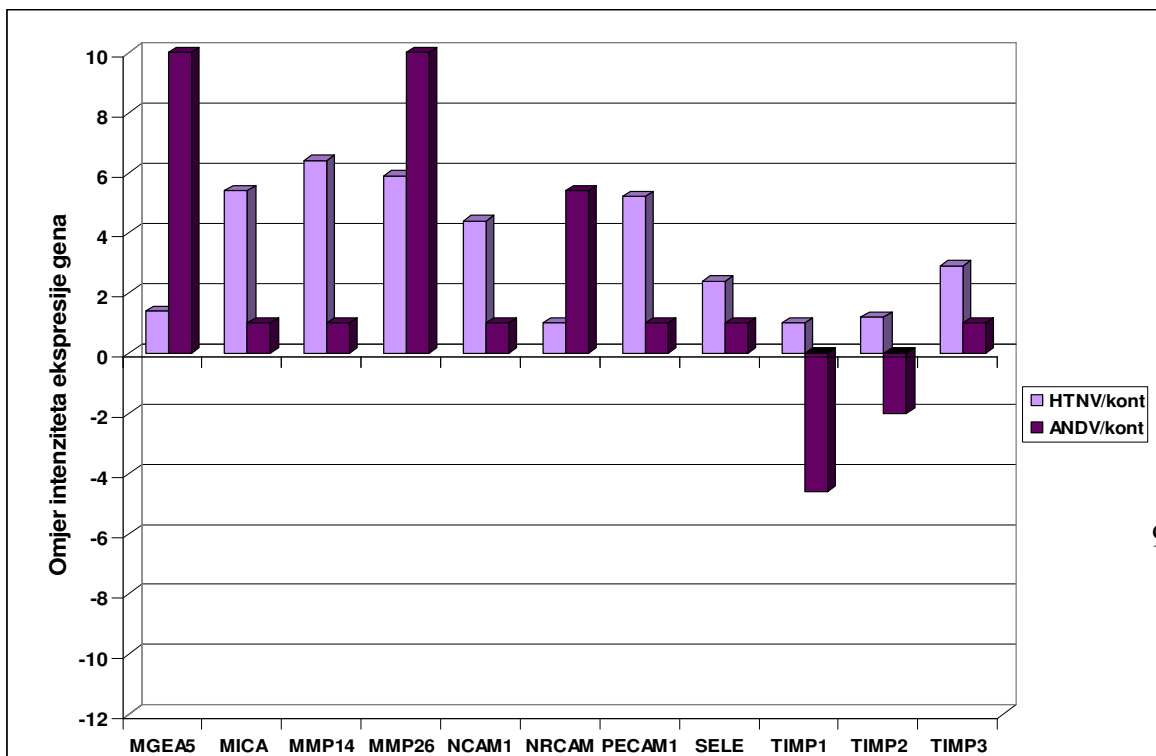
Značajne promjene u ekspresiji gena nađene su i kod infekcije virusom Andes. Ovaj je uzročnik HPS-a povećao ekspresiju gena za glikoprotein stanične površine CD44, dok je smanjenje ekspresije gena inducirao kod gena za laminin γ_1 . Ovaj je virus također imao utjecaj na matriks metaloproteinaze i njihove tkivne inhibitore. Tako je nađena povećana ekspresija gena za MMP-26, dok je smanjena ekspresija nađena za gene koji kodiraju TIMP-1 i TIMP-2. Virus Andes je utjecao i na ekspresiju različitih adhezijskih molekula. Tako je nađena povećana ekspresija gena za E-kadherin, katenin α_1 , katenin α_1 ligand, katenin δ_1 , NRCAM i integrin β_1 . Nadalje, infekcija virusom Andes uzrokovala je i povećanje ekspresije gena za inhibitor cisteinske proteinaze, cistatin C te hijaluronidazu MGEA-5.

A



ADAMTS1-metaloproteinaza s trombospondinskim motivom 1, **CD44**-antigen CD44, **CDH1**-kadherin 1, **CST3**-cistatin C, **CTNNA1**-katenin α_1 , **CTNNAL1**-kateninu α_1 -sličan, **CTNND1**-katenin δ_1 , **ITGA5**-integrin α_5 , **ITGB1**-integrin β_1 , **LAMC1**-laminin γ_1

B



MGEA5-antigen eksprimiran u meningeomu 5 (hijaluronidaza), **MICA**-MHC klasi I podudarna sekvenca A, **MMP14**-matriks metaloproteinaza 14, **MMP26**-matriks metaloproteinaza 26, **NCAM1**-adhezijska molekula neuralnih stanica 1, **NRCAM**-adhezijska molekula neurona, **PECAM1**-adhezijska molekula trombocitnih/epitelnih stanica, **SELE**-selektin E, **TIMP1**-tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza 1, **TIMP2**-tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza 2, **TIMP3**-tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza 3

Slika 19a i 19b. Geni za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa kod kojih je nađena značajna promjena u genskoj ekspresiji između kontrolnih HEK 293 stanica i stanica inficiranih virusima Hantaan i Andes. Uzorci RNK izolirani su pet dana nakon infekcije pomoću Trizola te posljedično faznom separacijom s kloroformom i precipitacijom s izopropanolom. Usporedbu ekspresije gena različitih uzoraka RNK rađena je pomoću metode GEArray. Kod ispitivanja gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa koristili smo membranu GEArray Q serija ljudske adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa. Za kvantifikaciju genskih signala na membranama koristili smo Kodak ID Image Analysis Software. Jačina signala testiranih gena korigira se u odnosu na jačinu pozadinske ekspresije te ekspresiju kontrolnih gena β -aktina i GAPDH. Značajnom promjenom smatramo rezultat kod kojeg je omjer jačine signala određenog gena između dva testirana uzorka veći od dva.

5.2.2.2. Analiza ekspresije gena metodom RT-PCR

5.2.2.2.1. Analiza ekspresije gena uključenih u proces apoptoze

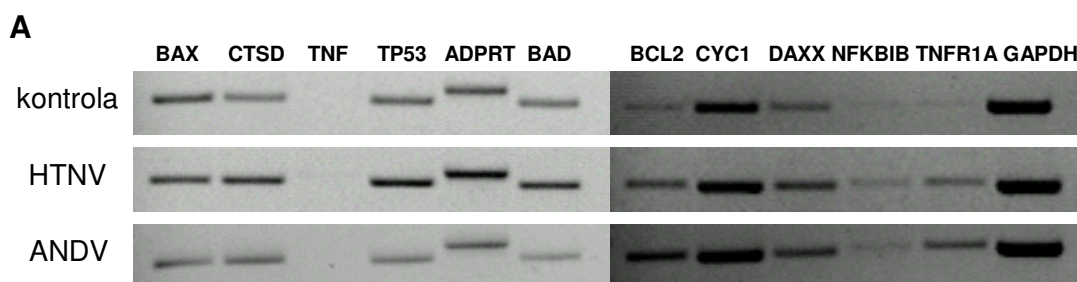
Pet dana nakon infekcije HEK 293 stanica virusom Hantaan došlo je do promjene ekspresije više gena uključenih u proces apoptoze. Tako je ovaj virus povećao ekspresiju gena za TNFR1a, Bcl-2 i BIK.

Omjer jačine ekspresije za gene p53, Bad i Daxx između stanica inficiranih virusom Hantaan i kontrolnih stanica iznosio je gotovo dva. Stoga smatramo kako bi bilo zanimljivo u daljnjim istraživanjima utvrditi dolazi li kod infekcije virusom

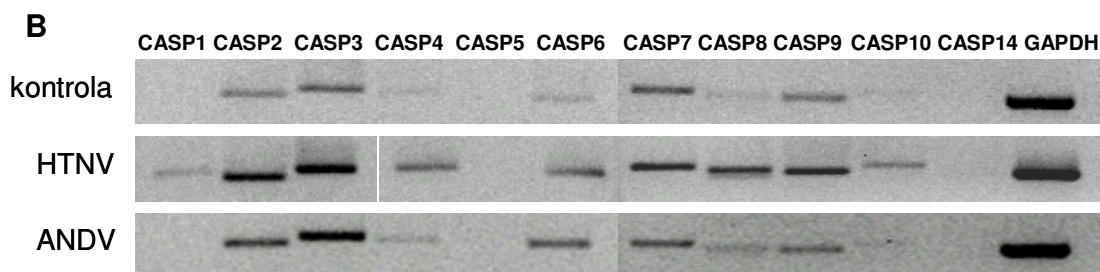
Hantaan do indukcije ovih gena te otkriti njihov mogući značaj u imunopatogenezi ovoga virusa.

Najveću promjenu prilikom infekcije virusom Hantaan uočili smo kod članova obitelji kaspaza. Ovaj je uzročnik HVBS-a povećao ekspresiju gena za kaspazu 2, kaspazu 3, kaspazu 4, kaspazu 6, kaspazu 8, kaspazu 9 i kaspazu 10.

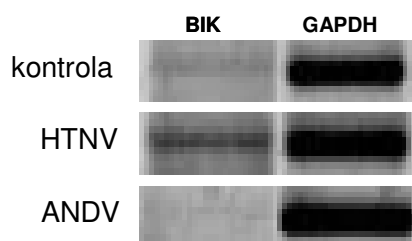
Virus Andes je također utjecao na povećanje ekspresije više gena koji sudjeluju u procesu apoptoze, uključujući Bcl-2, TNFR1a i Daxx. Slično kao kod infekcije virusom Hantaan, virus Andes je također povećao ekspresiju više kaspaza (kaspaza 2, kaspaza 3, kaspaza 6 i kaspaza 8) (Slika 20. i Tablica 11.).



BAX-BCL2-pridružen X protein, **CTSD**-katepsin D, **TNF**-čimbenik tumorske nekroze, **TP53**-tumorski protein p53, **ADPRT**-adenozildifosfat-riboziltransferaza, **BAD**-BCL2-antagonist stanične smrti, **BCL2**-antiapoptotički regulator, **CYC1**-citokrom c, **DAXX**-protein 6 vezan za domenu smrti, **NFKBIB**-inhibitor NF-kB β , **TNFR1A**-čimbenik tumorske nekroze receptor 1a, **GAPDH**-gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza



CASP1-kaspaza 1, **CASP2**-kaspaza 2, **CASP3**-kaspaza 3, **CASP4**-kaspaza 4, **CASP5**-kaspaza 5, **CASP6**-kaspaza 6, **CASP7**-kaspaza 7, **CASP8**-kaspaza 8, **CASP9**-kaspaza 9, **CASP10**-kaspaza 10, **CASP14**-kaspaza 14, **GAPDH**-gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

C

BIK-proapoptotički protein, **GAPDH**-gliceraldehyd-3-fosfat dehidrogenaza

Slika 20. RT-PCR detekcija ekspresije gena uključenih u proces apoptoze kod neinficiranih HEK 293 stanica te stanica inficiranih virusima Hantaan i Andes. Uzorci RNK izolirani su pet dana nakon infekcije pomoću Trizola te posljedično faznom separacijom s kloroformom i precipitacijom s izopropanolom. Analiza ekspresije gena različitih uzoraka RNK rađena je pomoću (A) "MultiGene"-12™ RT-PCR ljudskog p53 kita i (B) "MultiGene"-12™ RT-PCR kita za ljudske kaspaze. Ekspresiju gena za molekulu BIK testirali smo pomoću "SingleGene" PCR kita istoga proizvođača (C). Za kvantifikaciju genskih signala na agaroznim gelovima koristili smo Kodak ID Image Analysis Software. Jačina signala testiranih gena korigira se u odnosu na jačinu pozadinske ekspresije te unutarnje kontrole (GAPDH).

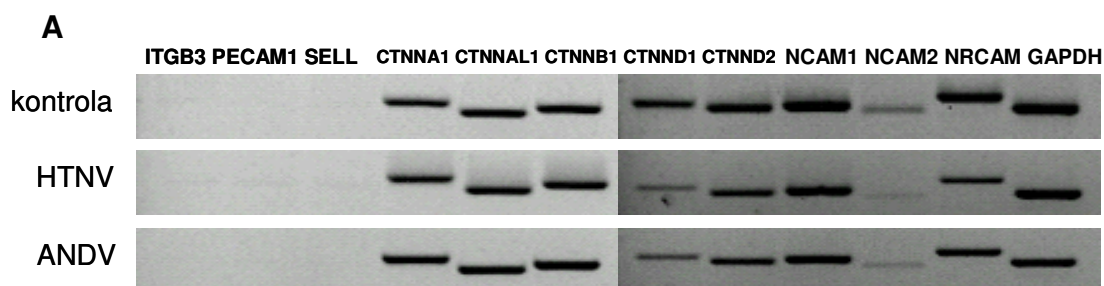
Tablica 11. Geni za molekule uključene u proces apoptoze kod kojih je nađena značajna promjena u genskoj ekspresiji RT-PCR metodom između kontrolnih HEK 293 stanica i stanica inficiranih virusima Hantaan ili Andes pet dana nakon infekcije.

Simbol gena	Naziv molekule	HTNV/kont	ANDV/kont
BCL2	Antiapoptotički regulator	3,1	5,7
DAXX	Protein 6 vezan za domenu smrti	1,9	2,6
TNFR1A	Čimbenik tumorske nekroze, receptor 1a	4,6	9,6
BIK	Proapoptotički protein	3,2	-1,7
CASP2	Kaspaza 2	2,4	2,7
CASP3	Kaspaza 3	2,3	3
CASP4	Kaspaza 4	4	1,9
CASP6	Kaspaza 6	2,6	4,8
CASP8	Kaspaza 8	8	2,6
CASP9	Kaspaza 9	2,2	1
CASP10	Kaspaza 10	3,2	1

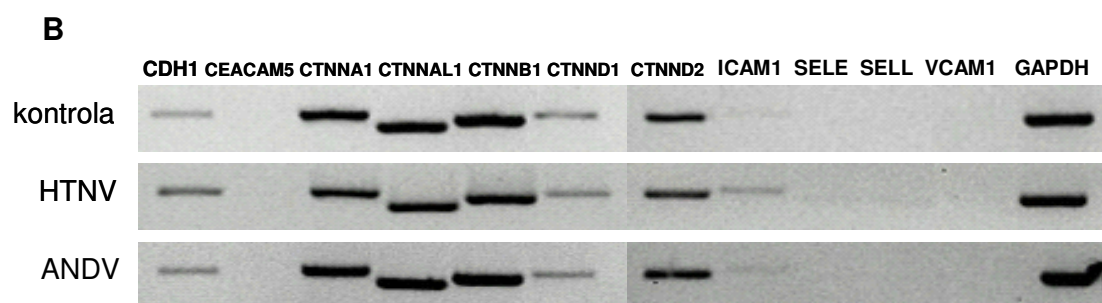
5.2.2.2.2. Analiza ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa

Virus Hantaan je utjecao na ekspresiju više gena za različite adhezijske molekule. Tako smo našli sniženje ekspresije gena za katenin δ_1 i NCAM-2, dok je povećanje ekspresije uočeno kod gena za kadherin 1 i ICAM-1. Ovaj je virus najveći utjecaj imao kod članova obitelji integrina. Povećana ekspresija nađena je kod gena za integrin α_2 , integrin α_3 , integrin α_5 i integrin α_v .

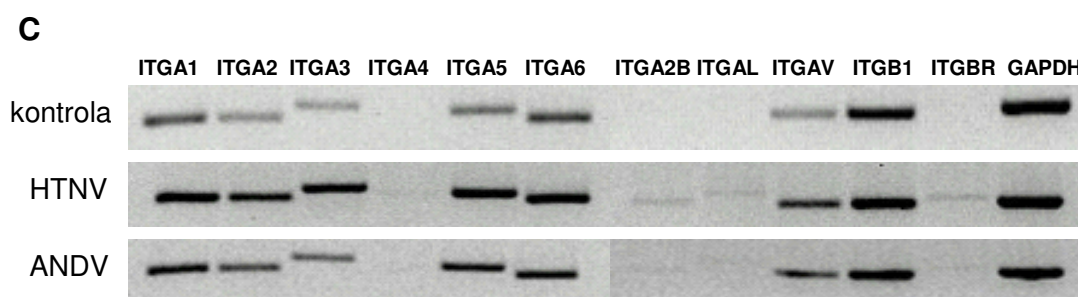
U skupini adhezijskih molekula virus Andes je utjecao na sniženje ekspresije gena za NCAM-2. Ovaj je virus također imao značajan utjecaj na molekule iz obitelji integrina. Tako je povišenje ekspresije nađeno kod gena za integrin α_2 , integrin α_3 i integrin α_5 (Slika 21. i Tablica 12.).



ITGB3-integrin β_3 , **PECAM1**-adhezijska molekula trombocitnih/epitelnih stanica 1, **SELL**-selektin L, **CTNNA1**-katenin α_1 , **CTNNAL1**-kateninu α_1 -sličan, **CTNNB1**-katenin β_1 , **CTNND1**-katenin δ_1 , **CTNND2**-katenin δ_2 , **NCAM1**-adhezijska molekula neuralnih stanica 1, **NCAM2**-adhezijska molekula neuralnih stanica 2, **NRCAM**-adhezijska molekula neurona, **GAPDH**-glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza



CDH1-kadherin 1, **CEACAM5**- karcinoembrijskom antigenu-srodna stanična adhezijska molekula 5, **CTNNA1**-katenin α_1 , **CTNNAL1**-kateninu α_1 -sličan, **CTNNB1**-katenin β_1 , **CTNND1**-katenin δ_1 , **CTNND2**-katenin δ_2 , **ICAM1**-međustanična adhezijska molekula 1, **SELE**-selektin E, **SELL**-selektin L, **VCAM1**-adhezijska molekula vaskularnih stanica 1, **GAPDH**-glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza



ITGA1-integrin α_1 , **ITGA2**-integrin α_2 , **ITGA3**-integrin α_3 , **ITGA4**-integrin α_4 , **ITGA5**-integrin α_5 , **ITGA6**-integrin α_6 , **ITGA2B**-integrin α_{2b} , **ITGAL**-integrin α_L , **ITGAV**-integrin α_v , **ITGB1**-integrin β_1 , **ITGBR**-integrin β receptor, **GAPDH**-glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza

Slika 21. RT-PCR detekcija ekspresije gena adhezijskih i molekula izvanstaničnog matriksa kod neinficiranih HEK 293 stanica te stanica inficiranih virusima Hantaan i Andes. Uzorci RNK izolirani su pet dana nakon infekcije pomoću Trizola te posljedično faznom separacijom s kloroformom i precipitacijom s izopropanolom. Analiza ekspresije gena različitih uzoraka RNK rađena je pomoću (A) "MultiGene"-12™ RT-PCR kita za ljudske adhezijske molekule endotelne stanice 1, (B) "MultiGene"-12™ RT-PCR kita za ljudske adhezijske molekule endotelne stanice 2 i (C) "MultiGene"-12™ RT-PCR kita za ljudske integrine. Za kvantifikaciju genskih signala na agaroznim gelovima koristili smo Kodak ID Image Analysis Software. Jačina signala testiranih gena korigira se u odnosu na jačinu pozadinske ekspresije te unutarnje kontrole (GAPDH).

Tablica 12. Geni za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa kod kojih je nađena značajna promjena u genskoj ekspresiji RT-PCR metodom između kontrolnih HEK 293 stanica i stanica inficiranih virusima Hantaan ili Andes pet dana nakon infekcije.

Simbol gena	Naziv molekule	HTNV/kont	ANDV/kont
-------------	----------------	-----------	-----------

NCAM2	Adhezijska molekula neuralnih stanica 2	-6	-2
CDH1	Kadherin 1	2,2	1,3
ICAM1	Međustanična adhezijska molekula 1	3	1
ITGA2	Integrin α_2	2,8	2
ITGA3	Integrin α_3	4,3	2
ITGA5	Integrin α_5	2,5	2,1
ITGAV	Integrin α_v	2,2	1,9

6. RASPRAVA

Do danas se vrlo malo zna o mehanizmima koji stoje u pozadini promjena i oštećenja uzrokovanih hantavirusnim infekcijama. Također je nepoznato zašto određeni virusi ovoga roda uzrokuju pretežno bubrežne promjene te dovode do razvoja HVBS-a (virus Hantaan), dok drugi prvenstveno oštećuju pluća te dovode do razvoja HPS-a (virus Andes).

Istraživanja su pokazala da i kod HVBS-a i kod HPS-a značajnu ulogu u patogenezi bolesti imaju imunološki mehanizmi [75, 202, 203, 214].

Tako je pokazano kako bi citokini i kemokini, koji su produkt različitih stanica, mogli značajno doprinijeti razvoju i rezoluciji same bolesti [210-212, 214]. Stoga smo u našem istraživanju željeli utvrditi dolazi li tijekom infekcije ovim virusima do promjene u ekspresiji gena za pojedine citokine i kemokine.

Nadalje, NF-kB transkripcijski put, kojeg također možemo nazvati „centralnim medijatorom imunološkog odgovora“, se aktivira nakon izlaganja brojnim stimulusima, uključujući viruse. Aktivacija NF-kB puta posljedično može dovesti do modulacije više od 150 gena, uključujući različite citokine i kemokine, kao i receptore potrebne kod imunološkog prepoznavanja te receptore važne kod

neutrofilne adhezije i transmigracije kroz stjenku krvnih žila [135]. Kako je uloga ovoga transkripcijskog puta pokazana kod mnogih virusnih infekcija, željeli smo istražiti dolazi li kod hantavirusnih infekcija do modulacije molekula koje čine dio ovoga puta.

Više je istraživača do danas pokazalo kako hantavirusi u staničnoj kulturi mogu dovesti do umiranja stanica procesom apoptoze [194, 220]. Međutim, vrlo se malo zna koji putevi dovode do ovoga procesa te koje su molekule uključene u njegov daljnji tijek. Također je vrlo malo poznato o promjenama koje se događaju u pogođenim tkivima te dolazi li do narušavanja tkivne arhitekture i funkcije.

Kako bi bolje razumjeli imunološke promjene kod hantavirusnih infekcija, te pokazali važnost prije spomenutih bioloških promjena i molekula analizirali smo promjene u ekspresiji gena kod dvije vrste stanica različitog porijekla; MRC-5 stanica (plućni fibroblasti) te HEK 293 stanica (epitelne stanice bubrega), nakon infekcije virusima Hantaan i Andes.

MRC-5 stanice

Kod infekcije MRC-5 stanica naši rezultati pokazuju kako oba virusa dovode do rane aktivacije plućnih fibroblasta, upućujući na moguću ulogu ovih mezenhimskih stanica u imunološkom odgovoru tijekom hantavirusnih infekcija. Kod infekcije MRC-5 stanica virusom Andes našli smo izraženije promjene u ekspresiji gena u odnosu na infekciju virusom Hantaan, vjerojatno radi toga što pretežito uzrokuje plućne promjene.

Oba virusa utjecala su na gensku ekspresiju kod članova Rel/NF κ B/I κ B obitelji, molekula koje su modulirane preko NF- κ B puta, transkripcijskih čimbenika te adaptornih proteina. Navedene promjene mogu govoriti u prilog našoj hipotezi da tijekom rane faze hantavirusnih infekcija dolazi do aktivacije NF- κ B transkripcijskog puta.

Infekcija virusom Andes smanjila je ekspresiju gena za Bcl-2, integralnog membranskog proteina koji je poglavito lociran na vanjskoj membrani mitohondrija [223]. Budući da može spriječiti proces apoptoze, njegova smanjena razina mogla bi dijelom biti odgovorna za apoptotičku smrt plućnih fibroblasta, već opisanu kod hantavirusnih infekcija [224]. Nadalje, *Kang i sur.* još 1999. godine opisuju smanjenu razinu Bcl-2 molekule kod hantavirusne infekcije Vero E6 stanica te spominju njegovu moguću ulogu kod indukcije apoptoze od strane hantavirusa [218].

Virus Andes je smanjio ekspresiju gena koji kodira NF κ BIB protein. Ovaj I κ B protein vezan je za NF- κ B transkripcijski čimbenik u citoplazmi i onemogućuje njegov ulaz u jezgru te posljedično njegovo djelovanje [225]. Smanjenje njegove ekspresije moglo bi utjecati na oslobađanje NF- κ B transkripcijskog čimbenika iz citoplazme te vezivanje za ciljne gene u jezgri.

Virus Andes je djelovao na povećanje ekspresije Jun gena. Protein kojeg kodira dio je transkripcijskog čimbenika AP-1 (od engl. *activator protein 1*) koji djeluje na mnoge stanične procese, uključujući stanični rast, diferencijaciju te apoptozu [226, 227]. Novija istraživanja su pokazala spregu između AP-1 transkripcijskog čimbenika i NF- κ B puta u vidu uzajamnog pozitivnog funkcionalnog učinka [228].

Kod MRC-5 stanica koje su bile inficirane virusom Hantaan GEArray metodom pokazali smo da je došlo do sniženja ekspresije gena za EGR-1, dok je PCR-om uočena razlika, ali je ona bila manja od 2. EGR-1 djeluje kao transkripcijski regulator te se aktivira kao odgovor na različite čimbenike rasta, citokine i mitogene [229]. Nedavna istraživanja pokazuju kako opisani protein djeluje na gene uključene u oporavak DNK, preživljavanje stanice te apoptozu [230]. Također je pokazano da u sinovijalnim fibroblastima djeluje narušavajući homeostazu između matriks metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora te bi mogao imati važnu ulogu kod razvoja oštećenja zahvaćenih tkiva [231].

Oba su virusa pojačala ekspresiju gena za selektin E, molekule čija je ekspresija regulirana putem NF- κ B transkripcijskog puta [232]. Njegova ekspresija na endotelnim stanicama vaskularnog zida igra važnu ulogu prilikom adhezije i akumulacije leukocita na mjesto upale, te govori o aktivaciji stanica [233]. Povećanje ekspresije gena za selektin E koje smo uočili na fibroblastima inficiranim hantavirusima može govoriti o aktivaciji ovih mezenhimskih stanica te o mogućoj ulozi u imunološkom odgovoru. Povećanje ekspresije gena za selektin E primijećeno je kod drugih virusnih infekcija, uključujući infekciju virusom Epstein-Barr, premda značenje ove promjene nije jasno [234].

Zadnjih nekoliko godina sve se više govori o važnosti pripadnika Bcl-2 obitelji u pokretanju procesa apoptoze.

Tako bi ulogu u imunoreakcijama kod hantavirusnih infekcija mogla imati dva člana Bcl-2 obitelji, Bad i Daxx, budući da je njihova ekspresija kod stanica inficiranih virusom Andes bila smanjena gotovo dva puta. Novija istraživanja

naglašavaju utjecaj molekule Daxx tijekom urođenog antivirusnog odgovora, a postoje pokazatelji o interakciji ove molekule i N-proteina virusa Puumala [44, 235]. Pretpostavljena su dva puta kojima Daxx može ispuniti svoju proapoptotičku ulogu; kao nuklearni transkripcijski regulator ili kao citoplazmatski čimbenik koji sudjeluje u FAS apoptotičkom putu. S druge strane, Bad u mnogim stanicama utječe na apoptotičke procese translokacijom i djelovanjem na mitohondrije [236]. Stoga, svojim utjecajem, Bad i Daxx mogu djelovati i na unutrašnji i na vanjski apoptotički put. Budući da hantavirusi u kulturi rastu sporo te da apoptotički proces započinje u kasnijem stadiju infekcije, bilo bi ih zanimljivo testirati u naprednijoj fazi. Iako nismo dokazivali moguću apoptozu MRC-5 stanica pri infekciji patogenim hantavirusima, buduća istraživanja članova Bcl-2 obitelji, uz ostale važne sudionike apoptotičkih procesa, mogla bi pokazati dolazi li te kojim se putem odvija programirana stanična smrt kod plućnih fibroblasta.

NF- κ B put ima izuzetno važnu ulogu u ranom imunološkom odgovoru te nakon aktivacije može djelovati na indukciju cijelog niza čimbenika, uključujući citokine. IL-6 je citokin koji ima široki spektar djelovanja u ljudskom tijelu te se povezuje s imunoreakcijama na različite patogene, uključujući viruse [110].

Kod MRC-5 stanica inficiranih virusom Hantaan našli smo povećanu ekspresiju gena za IL-6. Moguća uloga IL-6 kod hantavirusnih infekcija već je pokazana u *in vitro*, ali i u *in vivo* uvjetima [211, 215, 237]. Tako je njegova povećana razina nađena u plazmi i mokraći kod bolesnika u akutnom stadiju HVBS-a [237]. Uz stimulaciju imunoreakcije i sintezu proteina akutne faze, izravnim utjecajem na

centre u mozgu djeluje kao endogeni pirogen. Prije navedena uloga vjerojatno doprinosi razvoju vrućice, jednog od glavnih simptoma kod bolesnika s HVBS-om i HPS-om. Nadalje, svojim biološkim svojstvima može doprinijeti nastanku različitih oštećenja, a spominje se uloga u mijenjanju vaskularnog integriteta i trombocitnog potencijala [238, 239]. Ekspresija gena za IL-6 je regulirana putem NF-kB, te njegova pojačana ekspresija također može govoriti u prilog aktivaciji NF-kB puta [135, 232].

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti kako u ranoj fazi hantavirusne infekcije dolazi do promjene više gena koji se nalaze u sklopu NF-kB transkripcijskog puta, ali i gena na koje ovaj put posljedično djeluje. Stoga možemo pretpostaviti kako NF-kB sudjeluje u imunoreakcijama koje se odvijaju tijekom infekcije virusima Hantaan i Andes.

Čimbenici rasta su molekule za koje se sve više spominje uloga tijekom odgovora na infekciju različitim patogenima [119, 120]. Stoga promjene spomenutih čimbenika tijekom infekcije mogu imati značajne posljedice na razvoj bolesti.

Kod infekcije virusom Hantaan našli smo smanjenu ekspresiju gena za CSF-1, koji posjeduje mnoge funkcije u organizmu, uključujući djelovanje na diferencijaciju, rast i aktivaciju makrofaga [123]. Aktivacija fagocitnih stanica važna je karika u odgovoru domaćina na infekciju mnogim patogenim mikroorganizmima, osobito virusima. Smanjena ekspresija CSF-1 kod infekcije virusom Hantaan mogla bi utjecati na funkciju plućnih makrofaga te smanjiti njihovo mikrobicidno djelovanje.

Oba virusa djelovala su na smanjenje ekspresije gena za čimbenik rasta vaskularnog endotela VEGF-c. On kodira protein koji je aktivan u angiogenezi, rastu endotelnih stanica te može djelovati na propusnost krvnih žila [240]. Također je pokazano kako VEGF-c pojačava aktivnost plazminogen aktivatora u endotelnim stanicama [240]. Premda su glavne ciljne stanice za opisani čimbenik rasta endotelne stanice, njegovo smanjeno lučenje sa strane fibroblasta moglo bi također imati utjecaja na stanice endotela okolnih krvnih žila.

Virusi Hantaan i Andes djelovali su na povećanje ekspresije gena za PAI-2. Kao specifični inhibitor proteaza u ljudskom tijelu regulira plazminogen aktivirajući/plazminski sistem, najjači katalizator izvanstanične proteolize [241]. Međutim, za PAI-2 je pokazano da utječe na stanica koje predstavljaju ciljno mjesto hantavirusne infekcije, monocite. Istraživanja su pokazala kako kod monocita može modulirati adheziju, proliferaciju i diferencijaciju [241]. Stoga bi povećana aktivnost PAI-2 uz prije opisano sniženje ekspresije CSF-1 moglo pridonijeti oslabljenoj funkciju plućnih makrofaga te umanjiti njihovo protuvirusno djelovanje. Posljedica toga mogla bi biti olakšano širenje hantavirusa u tijelu domaćina, budući da monociti sudjeluju u migriranju hantavirusa s primarnog sjela infekcije [242].

Prilikom testiranja ekspresije citokinskih gena iznenadio nas je rezultat da virusi Hantaan i Andes smanjuju ekspresiju gena za BMP-2. Koštani morfogenetski proteini pripadaju obitelji proteina TGF- β , a glavna uloga u tijelu im je osteoinduktivna aktivnost [243]. Tijekom zadnjih nekoliko godina saznanja o funkciji BMPs znatno su se proširila. Tako danas na njih gledamo kao na

multifunkcionalne citokine, uključene u proces apoptoze, embrijski razvoj te zaraštavanje oštećenog tkiva [244, 245]. Pokazano je da BMP-2 može aktivirati NF- κ B put tako da njegova smanjena ekspresija može posljedično dovesti do slabije aktivacije ovoga transkripcijskog puta. Budući da može spriječiti proces apoptoze putem inhibicije kaspaze 3 i kaspaze 9, smanjena ekspresija BMP-2 kod hantavirusnih infekcija mogla bi pogodovati nastanku programirane stanične smrti, iako ove parametre u plućnim fibroblastima nismo ispitivali [245].

Infekcija MRC-5 stanica virusima Hantaan i Andes djelovala je na smanjenje ekspresije gena koji kodira TGF- β 2. Međutim, utjecaj virusa Andes na članove TGF obitelji mogao bi biti i veći budući da u PCR analizi postoje naznake smanjene ekspresije gena za TGF- β 3 i receptora TGFBR3, premda su signali suviše slabi za analizu. Glavna zadaća TGF- β u tijelu je održavanje tolerancije putem regulacije limfocitne proliferacije, diferencijacije i preživljavanja [246]. Djelovanje testiranih hantavirusa na smanjenje ekspresije gena članova iz TGF obitelji moglo bi doprinijeti pojačavanju upalnog odgovora te razvoju oštećenja radi smanjenog imunomodulatornog djelovanja ovih molekula.

GEArray metodom otkrili smo da je infekcija virusom Andes dovela do povećanja ekspresije gena za FGF-11, međutim PCR metodom nismo dobili ekspresiju ovoga gena. Moguće objašnjenje za ovakav fenomen moglo bi biti to što je GEArray metoda manje specifična od PCR analize tako da postoji mogućnost lažno pozitivnih rezultata. S druge strane, GEArray metodom dobili smo da je ekspresija gena za FGF-5 smanjena, što smo i potvrdili PCR tehnikom (omjer je iznosio 1,7 puta). FGF-5 pripada FGF obitelji proteina koji posjeduju širok

mitogeni potencijal te sudjeluju u mnoštvu bioloških aktivnosti kao što su embrijski razvoj, stanični rast i popravak oštećenog tkiva [247]. Tako je pokazano da FGF-5 potiče proliferaciju mezenhimskih fibroblasta te posljedično sudjeluje u popravku oštećenog tkiva [248]. Njegova snižena ekspresija u fibroblastima kod infekcije virusom Andes mogla bi pridonijeti nastanku oštećenja pluća kod HPS-a te produžiti vrijeme oporavka radi nedostatka važnog poticaja za rast.

Iz dobivenih rezultata ekspresije citokinskih gena možemo zaključiti kako ova skupina molekula vjerojatno ima važnu ulogu u obrani domaćina od infekcije virusima Hantaan i Andes. Također želimo naglasiti potrebu za daljnjim istraživanjem utjecaja molekula koje do sada nisu prepoznate kao važne u imunoreakcijama protiv hantavirusa, kao što su različiti čimbenici rasta te koštani morfogogenetski proteini.

Adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa osim što sudjeluju u održavanju tkivne arhitekture i funkcije, utječu i na staničnu signalizaciju. Međutim, s vremenom sve više dolaze na površinu saznanja o složenim interakcijama te njihovim kompleksnim djelovanjima. Ovoj obitelji pripadaju integrini, molekule koje djeluju kao poveznica stanice i izvanstaničnog prostora.

Virus Andes značajno je utjecao na ekspresiju više članova koji pripadaju obitelji integrina. Tako je snižena ekspresija nađena za gene koji kodiraju integrin α_2 , integrin α_3 i integrin α_6 .

Integrini su heterodimerni proteini koji se sastoje od jednog α i jednog β lanca te sudjeluju u međusobnoj adheziji stanica te u prijenosu signala sa stanične površine [169]. Nadalje, važno je naglasiti da mogu služiti kao receptori za ulazak

različitih virusa u stanicu. Tako je pokazano kako β_3 integrini posreduju kod ulaska patogenih hantavirusa u stanicu, međutim nedavna *in vivo* istraživanja pretpostavljaju postojanje dodatnih receptora [45, 172].

Uz još nedovoljno poznate mehanizme ulaska u stanicu, nejasne su i promjene koje se nalaze u pozadini povećane kapilarne propusnosti te nastanka plućnog edema kod infekcije virusom Andes. Kako su integrini važni sudionici u održavanju integriteta kapilarne stjenke, postoje pretpostavke da hantavirusi svojim djelovanjem na ove molekule utječu na kapilarnu propusnost [171, 249]. Međutim, utjecaj promjene ekspresije gena za različite integrine na plućnim fibroblastima ostaje nejasan. Moguće posljedice uključuju poremećaj u staničnoj povezanosti s okolnim strukturama te poremećenu signalizaciju s površine stanice, promjene koje mogu značajno narušiti stanične funkcije.

Novija istraživanja su pokazala da narušena homeostaza matriks metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora sudjeluje u nastanku promjena i oštećenja pluća različite etiologije. Na ekspresiju gena pripadnika ove važne skupine molekula značajno su utjecala oba testirana virusa.

Tako je GEArray metodom nađena povećana ekspresija gena za MMP-2 kod infekcije virusom Hantaan, dok je PCR tehnikom također nađena povećana ekspresija, ali je bila manja od dva. PCR tehnikom smo i kod infekcije virusom Andes našli nešto povećanu ekspresiju gena za MMP-2 koja je u odnosu na kontrolne stanice iznosila 1,7 puta. Testirana gelatinaza je konstitutivno eksprimirana na mezenhimskim stanicama te je povezana s više patoloških entiteta [250-252]. Povećana razina MMP-2 pronađena je u pleuralnim efuzijama

različitog uzroka, patološke promjene koja je nađena kod hantavirusnih infekcija [251]. Njena povećana ekspresija nađena je kod različitih virusnih infekcija, uključujući infekciju HIV-om [176]. Opisana saznanja te naš rezultat o povećanoj ekspresiji gena za MMP-2 kod oba virusa mogla bi govoriti u prilog mogućoj ulozi ove matriks metaloproteinaze u patogenezi hantavirusnih oboljenja.

Kod infekcije virusom Andes dobili smo smanjenu ekspresiju gena za MMP-10. Glavna funkcija MMP-10 je degradacija proteoglikana i fibronektina. Za MMP-10 Međutim, postoje podaci o mogućoj ulozi u cijeljenju oštećenog tkiva, te bi smanjena ekspresija kod infekcije virusom Andes mogla negativno utjecati na reparatorne procese kod bolesnika s HPS-om [253].

Kod infekcije virusom Hantaan primijetili smo povećanje ekspresije gena za MMPL-1 i MMP-15. Osim uloge u razgradnji izvanstaničnog matriksa, obje metaloproteinaze mogu utjecati na aktivaciju MMP-2 djelujući na konverziju neaktivnog (pro-MMP-2) u njen aktivni oblik (MMP-2) [254, 255]. Prije opisano djelovanje, uz povećanu ekspresiju gena za MMP-2, moglo bi pridonijeti povećanoj aktivnosti ove matriks metaloproteinaze kod hantavirusnih infekcija.

Nadalje, značajnu promjenu kod infekcije virusima Hantaan i Andes primijetili smo kod gena koji kodira ADAMTS-1, čija je ekspresija bila smanjena. Ona je važna za normalan rast, fertilitet te morfologiju i funkciju organa [256]. ADAMTS-1 posjeduje tri trombospondinska nastavka koje nalazimo i kod trombospondina 2. Budući da je ekspresija trombospondina 2 u našem istraživanju bila smanjena, možemo pretpostaviti kako postoji povezanost u regulaciji ekspresije ove dvije molekule. Uzrok smanjenoj ekspresiji ADAMTS-1

moгуće leži i u povećanoj ekspresiji gena za TIMP-3 koju smo našli kod infekcije s oba virusa. Novija istraživanja su pokazala kako TIMP-3 negativno djeluje na ekspresiju ADAMTS-1 proteina [257, 258].

Povećana ekspresija TIMP-3 molekule također djeluje i na smanjenje funkcije matriks metaloproteinaza te može uzrokovati apoptotičku smrt u više vrsta stanica [259]. Povećana ekspresija TIMP-3 pokazana je kod različitih virusnih infekcija kao što su infekcija virusom ospica te infekcija HIV-om [260]. Danas je poznato kako su različita plućna oštećenja dijelom izazvana narušenom homeostazom između matriks metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora [173]. Neravnoteža između matriks metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora koja je pronađena kod hantavirusnih infekcija može govoriti u prilog važnosti ovih molekula te njihove neravnoteže u imunopatogenezi HPS-a.

Kod infekcije MRC-5 stanica virusom Andes došlo je do smanjenja ekspresije gena za katepsin B. Ova se cisteinska proteaza normalno nalazi unutar lizosoma, gdje je uključena u razgradnju proteina te održavanje staničnog metabolizma [261]. Budući da ima ulogu tijekom razgradnje izvanstaničnog matriksa, možemo pretpostaviti kako smanjena aktivnost katepsina B može, uz narušenu homeostazu matriks metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora koju smo pronašli kod infekcija virusima Hantaan i Andes, doprinijeti nastanku oštećenja plućnih fibroblasta te razvoju bolesti.

Virus Andes smanjio je ekspresiju gena za trombospondin 2. Pretpostavlja se da ovaj glikoprotein može imati složenu ulogu tijekom imunološkog odgovora, budući da može regulirati lokalnu razinu citokina te različitih proteaza koje

sudjeluju u razgradnji izvanstaničnog matriksa. Tako je razina i aktivnost matriks metaloproteinaze 2 u kulturi fibroblasta koji nemaju trombospondin 2 bila povećana. Transfekcija DNK trombospondina 2 u istoj kulturi dovela je do sniženja razine MMP-2 na normalnu vrijednost, utjecaj koji potvrđuje međudjelovanje ove dvije molekule [262]. Ranije opisano istraživanje u skladu je s našim rezultatima, budući da smo i mi uz sniženje ekspresije gena za trombospondin 2 primijetili povećanu ekspresiju gena za MMP-2, što govori u prilog njihovom uzajamnom djelovanju. Nadalje, istraživanja su pokazala kako trombospondin 2 ima ulogu kod različitih virusnih infekcija, uključujući infekciju citomegalovirusom [263]. Smanjena ekspresija ove izvanstanične molekule nađena je također kod infekcije herpes simplex virusom [264]. Premda je pokazana uloga trombospondina 2 tijekom različitih virusnih infekcija, mehanizmi djelovanja tijekom infekcija nisu jasni. Međutim, moguće je da smanjena ekspresija trombospondina 2 kod infekcije virusom Andes negativno utječe na cijeli niz funkcija koje obično obavlja u stanici, uključujući staničnu vijabilnost, rast i diferencijaciju.

Iz dobivenih rezultata ekspresije gena za adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa želimo istaknuti mogući utjecaj narušene homeostaze između matriks metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora na promjene koje nastaju kod infekcija virusima Hantaan i Andes. Njihova uloga već je pokazana kod različitih oboljenja, a naši rezultati po prvi puta otvaraju mogućnost da ove molekule sudjeluju i u imunopatogenezi hantavirusnih infekcija.

HEK 293 stanice

Nedavna istraživanja su pokazala kako hantavirusi uzrokuju citopatični efekt u kulturi HEK 293 stanica te da je za ovu promjenu odgovoran proces apoptoze [194]. Međutim, točni mehanizmi koji dovode do smrti stanice ostaju nejasni. Stoga smo željeli istražiti utjecaj virusa Hantaan i Andes na ekspresiju gena koji sudjeluju u različitim apoptotičkim putevima te gena koji kodiraju molekule važne za održavanje izvanstaničnog matriksa te tkivne arhitekture i funkcije.

Ekspresiju ciljnih gena gledali smo u dvije vremenske točke, nakon tri i nakon pet dana, kako bismo pratili dinamiku promjena. Kao što smo i očekivali veće promjene u ekspresiji gena uključenih u proces apoptoze primijetili smo pet dana nakon infekcija. Opisani rezultat vjerojatno je odraz usporene replikacije virusa u kulturi i kasnije progresije apoptotičkog procesa kod infekcije hantavirusima.

Virus Hantaan uzrokovao je pojačanu ekspresiju gena za Bcl-10. Ovaj signalni protein sudjeluje u više važnih procesa u tijelu, uključujući indukciju apoptoze te aktivaciju NF- κ B signalnog puta [265, 266]. Nadalje, pokazano je da miševi koji nemaju Bcl-10 ubrzo nakon rođenja postaju prijemčivi za infekcije [266]. Istraživanje *Zhang i sur.* pokazalo je da povećanje njegove ekspresije dovodi do pokretanja apoptoze u HEK 293 stanicama [267]. Stoga, povećana ekspresija Bcl-10 koju smo našli u našem istraživanju otvara mogućnost njegove uloge u pokretanju apoptotičkih mehanizama u HEK 293 stanicama inficiranim hantavirusima.

Značajne promjene u ekspresiji gena primijetili smo u više pripadnika obitelji Bcl-2.

BIK je proapoptotički pripadnik obitelji Bcl-2, čija je ekspresija bila povišena kod infekcije virusom Hantaan. U ljudskim stanicama induciran je od strane mnogih stimulusa te sudjeluje u pokretanju apoptoze djelovanjem na membranu endoplazmatskog retikuluma, gdje potiče otpuštanje Ca^{2+} [268]. Svojim utjecajem na endoplazmatski retikulum, BIK posljedično potiče proces apoptoze ljudskih epitelnih stanica djelujući na otpuštanje citokroma C iz mitohondrija [269]. Uloga endoplazmatskog retikuluma u pokretanju apoptoze već je pokazana kod infekcije virusom Tula, nepatogenim hantavirusom [221]. Pretpostavlja se kako nakupljanje virusnih proteina tijekom njegovog replikativnog ciklusa može potaknuti apoptotički proces započet stresom endoplazmatskog retikuluma [221]. Nakupljanje virusnih proteina u endoplazmatskom retikulumu, uz utjecaj pojačane ekspresije BIK molekule, moglo bi potaknuti unutarnji apoptotički put te doprinijeti nastanku programirane stanične smrti kod infekcije virusom Hantaan. Oba virusa utjecala su na povećanje ekspresije gena za Bcl-2, integralnog membranskog proteina koji je poglavito lociran na vanjskoj membrani mitohondrija [223]. Bcl-2 sprječava proces apoptoze te je pokazano kako različiti virusi induciraju povećanje njegove ekspresije u kasnijoj fazi infekcije kako bi stanica domaćin živjela duže [270, 271]. Utjecaj na preživljavanje stanice vidljiv je i kod infekcije virusom Sindbis, gdje je ekspresija Bcl-2 gena dovela do konverzije litičke infekcije u perzistentni oblik [272]. *Kang i sur.* su pokazali da hantavirusi uzrokuju sniženje razine Bcl-2 proteina te su pretpostavili važnost

opisane promjene u pokretanju procesa apoptoze [218]. Međutim, njihova istraživanja vršena su na majmunskih Vero stanicama te su za infekciju korišteni različiti MOI. Premda postoji potreba za daljnjim istraživanjima utjecaja ove molekule, možemo pretpostaviti kako povećanje ekspresije gena za Bcl-2 pet dana nakon infekcije hantavirusima govori o nastojanju stanice da sebe održi živom.

Apoptotička smrt ili s druge strane preživljavanje stanice kontrolirano je od strane pro- i antiapoptotičkih proteina. Kako navedeni proteini djeluju jedni na druge, sudbina stanice ovisi o tome koji će put prevagnuti. S obzirom da se apoptotički procesi kod stanica inficiranih hantavirusima odvijaju tijekom dužeg vremenskog razdoblja, za očekivati je prisustvo antiapoptotičkih gena koji će usporiti pokretanje apoptoze.

Testirani virusi pokazali su utjecaj na više članova TNF obitelji koji sudjeluju u pokretanju programirane stanične smrti.

Povećana ekspresija primijećena je kod gena koji kodira TNFSF-11 ili TRANCE, koji igra važnu ulogu u diferencijaciji i aktivaciji osteoklasta [273]. Pokazana je njegova funkcija kod preživljavanja nezrelih dendritičkih stanica koje obitavaju u intersticijskom prostoru te koje nakon kontakta s patogenom mogu dalje prezentirati antigene imunološkim stanicama [274].

Budući da je uloga TRANCE-a kod virusnih infekcija nepoznata, daljnja istraživanja su potrebna kako bi se objasnila njegova uloga kod hantavirusnih infekcija.

Značajan utjecaj na pokretanje apoptotičkih procesa imaju TNF receptori [275]. Zanimljiv rezultat ovog istraživanja je povećanje ekspresije gena za TNFR1a, glavnog receptora za TNF- α na površini stanice. Premda nismo našli ekspresiju TNF- α , moguće je da u odsustvu ovoga citokina i drugi ligandi mogu utjecati na signalne puteve posredovane TNF receptorima.

Vezivanje liganda za TNFR1a potiče pleiotropan odgovor posredovan interakcijom unutarstaničnih dijelova receptora i stanične mašinerije [275]. Signalni putevi pokrenuti TNF receptorima mogu aktivirati NF- κ B, sudjelovati u pokretanju procesa apoptoze te regulirati upalni proces [276].

Postoji više načina kako opisani receptori mogu uzrokovati pokretanje programirane stanične smrti [276]. Najvažnije djelovanje uključuje aktivaciju kaskade kaspaza koje posljedično dovode do apoptotičke smrti stanice. Međutim, TNF receptori mogu djelovati na više pripadnika Bcl-2 obitelji koji utječu na permeabilnost membrane mitohondrija i oslobađanje citokroma C, što naposljetku dovodi do apoptoze.

Daljnji pokusi su potrebni da se pokaže međudjelovanje signala pokrenutih preko TNFR1a i unutarnjeg puta apoptoze, odnosno vanjskog i unutarnjeg puta.

GEArray metodom pokazali smo da su virusi Andes i Hantaan u obje vremenske točke povećali ekspresiju gena za proapoptotički protein harakiri. Djelujući na proteine Bcl-2 i Bcl-X_L, dvije antiapoptotičke molekule te smanjujući njihovu aktivnost uzrokuje programiranu staničnu smrt u stanicama sisavaca [277]. Povećanje ekspresije gena za harakiri moglo bi uz povećanje ostalih proapoptotičkih regulatora pridonijeti nastanku apoptoze.

Nezaobilaznu kariku u procesu apoptoze čine kaspaze, proteaze koje su uključene u sve dijelove ovoga složenog procesa.

Virus Andes je u ranijoj vremenskoj točki utjecao na sniženje ekspresije gena više članova iz obitelji kaspaza; kaspazu 2, kaspazu 3 i kaspazu 10. Međutim, u kasnijem stadiju istraživanja (5. dan) dolazi do indukcije ekspresije kaspaze 2 i kaspaze 3. Trenutno je malo poznato o dinamici ekspresije ovih molekula tijekom virusnih infekcija. Međutim, usporena indukcija apoptoze kod hantavirusa otvara mogućnost inhibitornog utjecaja trenutno nepoznatih čimbenika na kaspaze u ranijim stadijima infekcije, te njihove aktivacije i pokretanje apoptoze u kasnijem razdoblju. Izloženu hipotezu podržavaju naši rezultati kod infekcije virusom Andes gdje smo našli indukciju kaspaza pet dana od infekcije, nakon ranije inhibicije.

Kaspaza 2 je enzim jedinstven po svojim karakteristikama, budući da posjeduje karakteristike i inicijacijskih i efektorskih kaspaza. Uz aktivaciju kao odgovor na DNK oštećenje, izgleda da je kaspaza 2 potrebna za pokretanje apoptoze potaknute drugim stimulusima, uključujući viruse [278]. Premda u prošlosti nije zaokupila pažnju istraživača, kaspaza 2 sve više dobiva na važnosti budući da je nekoliko autora nedavno pokazalo kako ovaj enzim sudjeluje u permeabilizaciji vanjske membrane mitohondrija [279]. Također je pokazana poveznica između proteina p53 obitelji i aktivacije kaspaze 2, interakcija koja posljedično vodi u smrt stanice [278]. Možemo pretpostaviti kako interakcija nastaje i kod hantavirusnih infekcija, budući da smo primijetili određeni stupanj indukcije ekspresije p53 kod infekcije virusom Hantaan. Nadalje, p53 inducira ekspresiju kaspaze 6 koja

predstavlja zadnju kariku u lancu koji je pod kontrolom ove molekule [280]. Utjecaj p53 moguće postoji i kod hantavirusnih infekcija s obzirom da smo našli povećanu razinu efektorske kaspaze 6 kod oba testirana virusa.

Virus Hantaan je povećao ekspresiju gena za inicijacijske kaspaze, kaspazu 9 i kaspazu 10. Djelovanjem niza stimulusa, citokrom c se otpušta iz mitohondrija u citoplazmu te potiče stvaranje apoptosoma, kompleksa kojeg sačinjavaju citokrom c, Apaf1 i kaspaza 9 [281]. Aktivirana kaspaza 9 posljedično aktivira efektorske kaspaze, kaspazu 3 i kaspazu 7. Efektorske kaspaze tada djeluju na niz supstrata koji utječu na stanične i biokemijske procese te dovode do smrti stanice [282]. Možemo pretpostaviti kako se opisani slijed događaja odvija tijekom infekcije virusom Hantaan, budući da smo uz povećanu ekspresiju kaspaze 9 našli povećanu ekspresiju kaspaze 3. Važno je naglasiti kako je danas poznat samo jedan put kojim se aktivira kaspaza 9 i to putem otpuštanja citokroma c iz mitohondrija [282]. Stoga smatramo kako je povećana ekspresija kaspaze 9 kod infekcije virusom Hantaan mogući pokazatelj važnosti mitohondrijskog puta u pokretanju apoptoze kod hantavirusnih infekcija.

Funkcija kaspaze 10, koja je po strukturi slična kaspazi 8, u pokretanju procesa apoptoze još je nejasna, a nepoznati su i supstrati na koje djeluje. *Sprick i sur.* su 2002. godine pokazali kako do aktivacije kaspaze 10 dolazi u apoptozi pokrenutoj putem receptora smrti, ali da njeno djelovanje nije dovoljno ukoliko nedostaje djelovanje kaspaze 8 [283]. Stoga postoje pretpostavke kako kaspaza 10 djeluje na neke druge dijelove apoptotičkog puta ili da sudjeluje u nekim neapoptotičkim procesima koji su potaknuti receptorima smrti.

Kod infekcije virusom Andes, te osobito virusom Hantaan prepoznali smo inicijacijsku kaspazu 8 kao člana koji bi mogao imati značajan utjecaj na pokretanje apoptoze.

Ekspresija gena kaspaze 8 bila je povišena već treći dan nakon infekcije. U kasnijem vremenskom razdoblju indukcija je još i više došla do izražaja te je kod infekcije virusom Hantaan ekspresija bila čak osam puta veća nego u kontrolnim stanicama.

Aktivirana kaspaza 8 može imati višestruke utjecaje na apoptotičke puteve. Ona može direktno utjecati na pokretanje programirane stanične smrti aktivirajući efektorske kaspaze kao što je kaspaza 3 [275, 284]. Nadalje, djelujući na članove Bcl-2 obitelji može prenijeti apoptotički signal na mitohondrije te time na unutarnji put apoptoze [275]. *Markotić i sur.* nisu pronašli značajno povećanje ekspresije gena za kaspazu 8 kod HEK 293 stanica inficiranih hantavirusima [194]. Za detekciju ekspresije gena korištena je tada „ribonuclease protection assay“, metoda koja je moguće manje osjetljiva od PCR analize koju smo koristili u našem istraživanju.

Aktivacija inicijacijskih kaspaza dovodi do indukcije efektorskih kaspaza koje će naposljetku dovesti do apoptoze. Tako smo kod infekcije virusima Hantaan i Andes primijetili povećanu ekspresiju efektorske kaspaze 3, molekule ključne u pokretanju procesa apoptoze. Navedeni je rezultat u skladu s istraživanjima ostalih znanstvenika koja su također pokazala indukciju kaspaze 3 kod infekcije i patogenim i nepatogenim hantavirusima [220, 224]. Na aktivaciju kaspaze 3 mogu djelovati unutrašnji i vanjski put apoptoze. Iz dosadašnji rezultata možemo

pretpostaviti kako tijekom hantavirusne infekcije do aktivacije dolazi nakon otpuštanja citokroma c iz mitohondrija, odnosno djelovanjem unutarnjeg puta apoptoze.

U prilog važnosti unutarnjeg puta apoptoze kod infekcije virusom Hantaan govori i nalaz povećane ekspresije gena za kaspazu 4, koja pripada kaspaza-1 podobitelji te sudjeluje u pokretanju procesa apoptoze [285]. Kaspaza 4 može aktivirati vlastiti prekursor kao i prekursor kaspaze 1. Također je pokazano kako u ljudi igra važnu ulogu u pokretanju apoptoze putem endoplazmatskog retikuluma, te da stresni signali koji ne uključuju ovu organelu ne djeluju na aktivnost kaspaze 4 [285].

Iz navedenih rezultata možemo zaključiti kako prilikom infekcije HEK 293 stanica virusima Hantaan i Andes dolazi do indukcije cijelog niza gena koji sudjeluju u procesu apoptoze. Opisani rezultat je razumljiv budući da je programirana stanična smrt izuzetno kompleksan proces koji se može istovremeno odvijati različitim signalnim putevima. Premda naši rezultati daju blage naznake o sudjelovanju vanjskoga puta u pokretanju apoptotičkog procesa tijekom hantavirusnih infekcija, velika većina molekula ipak je sudionik unutarnjeg puta. Važnost u unutarnjem apoptotičkom putu imaju dvije organele, endoplazmatski retikulum i mitohondriji. U našem smo istraživanju pokazali indukciju više molekula koje djeluju upravo na prije spomenute organele te stoga potvrđuju hipotezu o važnosti unutarnjeg apoptotičkog puta kod hantavirusnih infekcija.

Adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa predstavljaju samu okosnicu života stanice. Iz toga jasno proizlazi da će njihova promjena tijekom infekcije znatno utjecati na rezoluciju patoloških promjena kod zahvaćenih tkiva i organa.

Pokazali smo da premda hantavirusi ne uzrokuju izraženi citopatični efekt u kulturi, ipak značajno utječu na ekspresiju gena više adhezijskih i molekula izvanstaničnog matriksa.

Virusi Hantaan i Andes utjecali su na povećanje ekspresije gena za molekulu CD44. Ovaj glikoprotein stanične površine ima više funkcija, uključujući interakciju susjednih stanica, staničnu adheziju i migraciju [286]. Također djeluje kao receptor za hijaluronsku kiselinu, a može ulaziti u interakcije i s drugim ligandima kao što su različiti kolageni i matriks metaloproteinaze. U normalnom bubregu ekspresija CD44 molekule prisutna je jedino na intersticijskim dendritičkim stanicama te novopridošlim leukocitima [287]. S druge strane, značajan porast ekspresije nalazimo u upalnim bolestima bubrega, osobito na epitelnim stanicama tubula, a spominje se uloga CD44 prilikom kemotaksije imunoloških stanica na mjesto upale [287, 288]. Povećana ekspresija CD44 koju smo našli u epitelnim stanicama bubrega kod infekcije virusom Hantaan mogla bi pridonijeti upalnom odgovoru i kemotaksiji imunoloških stanica na mjesto upale, utjecaj koji može doprinijeti razvoju oštećenja prilikom HVBS-a.

Oba su virusa povećala ekspresiju gena za adhezijski glikoprotein E-kadherin. E-kadherin je povezan sa staničnim citoskeletom putem niza katenina te igra važnu ulogu prilikom stanične adhezije te interakcija susjednih stanica. Jasno je pokazano kako E-kadherin djeluje kao epitelna adhezijska komponenta te je

uniformno prisutna na lateralnim površinama raznih epitela, a prisustvo na bazalnoj strani govori o mogućoj ulozi prilikom adhezije epitela za bazalnu membranu [289]. Uloga E-kadherina kod virusnih infekcije još je nejasna, premda je povećana ekspresija već nađena kod infekcije epitelnih stanica respiratornim sincicijskim virusom [290].

Kod E-kadherin posredovane adhezije i signalizacije važnu ulogu ima katenin $\delta 1$, koji se veže za citoplazmatski rep E-kadherina [291]. Smanjena ekspresija gena za katenin $\delta 1$ koju smo našli kod infekcije virusom Hantaan mogla bi uz promijenjenu ekspresiju gena za E-kadherin pridonijeti oštećenju epitelnih stanica bubrega. Sam mehanizam oštećenja mogao bi uključivati promijenjenu adheziju stanica te narušenu međustaničnu signalizaciju.

Virus Hantaan je pet dana nakon infekcije HEK 293 stanica povećao ekspresiju gena za adhezijsku molekulu ICAM-1. Opisani je rezultat u skladu s istraživanjima drugih autora, koji također pokazuju ulogu adhezijske molekule ICAM-1 u imunopatogenezi hantavirusnih infekcija [209]. Ekspresija ICAM-1 na epitelnim stanicama bubrega potiče priljublivanje T-limfocita te time može pridonijeti aktivnoj imunološkoj ulozi ovih stanica tijekom infekcije.

Virus Andes inducirao je ekspresiju gena za adhezijsku molekulu L-selektin, čija je povećana razina nađena u serumu bolesnika s različitim upalnim i imunološki uzrokovanim bolestima [292]. L-selektin sudjeluje u međustaničnim interakcijama te u kemotaksiji upalnih stanica na mjesto infekcije što posljedično dovodi do povećanog lučenja proupalnih citokina.

Važni sudionici međustanične komunikacije te spona stanice i izvanstaničnog matriksa jesu integrini.

Rezultati PCR analize su pokazali značajnu promjenu u ekspresiji gena koji kodiraju molekule iz obitelji integrina i kod infekcije virusom Hantaan i kod infekcije virusom Andes.

Oba su virusa uzrokovala povećanje ekspresije gena za integrin α_2 , integrin α_3 , integrin α_5 i integrin α_v . Nadalje, virus Hantaan je inducirao ekspresiju gena za integrin α_1 koje je iznosilo 1,9 puta.

Zadnjih nekoliko godina sve se više spominje uloga integrina u imunopatogenezi hantavirusnih infekcija te je poznato da patogeni hantavirusi koriste β_3 integrine kao receptore za ulazak u stanicu [45]. Međutim, neočekivano, PCR metodom nismo pokazali ekspresiju gena za β_3 integrine u HEK 293 stanicama. Stoga pretpostavljamo da hantavirusi za ulazak u stanicu koriste dodatne receptore, primjerice druge integrine. Također postoji mogućnost da u stanicu dijelom ulaze putem direktne endocitoze.

Istraživanja su pokazala da u bubregu integrini igraju važnu ulogu prilikom morfogeneze te u kasnijem razdoblju za njegovu građu i funkciju [293]. Tijekom oštećenja bubrežnih stanica dolazi do gubitka distribucije površinskih integrina te posljedično do narušene adhezije te nespecifičnog vezivanja stanica, što dovodi do oštećenja normalne tkivne arhitekture.

Premda je za integrine poznata njihova adhezivna funkcija te uloga u signalizaciji, točno djelovanje u bubregu za integrin α_v i integrin α_5 nije poznato,

dok se za integrin α_1 spominje moguća uloga u privlačenju monocita na mjesto upale.

α_2 i α_3 integrini prisutni su u bubregu tijekom razvoja te u odrasloj dobi, a čine heterodimere s integrinom β_1 , čiju smo ekspresiju pokazali PCR metodom na HEK 293 stanicama [294].

Funkcija α_2 integrina u odraslom bubregu još nije jasna, dok je za α_3 integrin pokazano kako primarno djeluje kao adhezivna molekula koja posreduje vezivanje epitelnih stanica za bazalnu membranu. Istraživanja su pokazala kako bi blokada heterodimera integrina $\alpha_3\beta_1$ specifičnim monoklonskim antitijelom *in vivo* mogla dovesti do proteinurije, promjene koja je prisutna tijekom HVBS-a [295]. Nadalje, spominje se moguća uloga $\alpha_3\beta_1$ integrina u regulaciji funkcije kadherina, molekula čija je ekspresija povećana od strane virusa Hantaan [296]. Jasno je da narušena funkcija integrina može višestruko doprinijeti nastanku oštećenja bubrežnih stanica.

Iako smo pet dana nakon infekcije s oba virusa našli povećanu ekspresiju gena za više integrina, tri dana nakon infekcije ove promjene nije bilo. Postoji mogućnost da je promjena nađena pet dana nakon infekcije uzrokovana reparacijskim mehanizmima te opisuje nastojanje stanica da vrate normalnu tkivnu arhitekturu. Bilo bi zanimljivo istražiti raniju točku tijekom infekcije kako bismo vidjeli dolazi li u ranijim stadijima do smanjene ekspresije integrina. Na ovakav razvoj događaja upućuju rezultati na MRC-5 stanicama gdje smo u početnoj fazi infekcije našli sniženu ekspresiju upravo spomenutih integrina.

Razgradnja izvanstaničnog matriksa važan je proces u razvoju bubrega te održavanju tkivnog integriteta i funkcije. Međutim, narušena homeostaza različitih molekula koje sudjeluju u ovom procesu može dovesti do njegova oštećenja. Obitelj molekula čija je ekspresija gena najviše bila pogođena infekcijom virusima Hantaan i Andes jesu matriks metaloproteinaze i njihovi tkivni inhibitori, ujedno molekule koje imaju najvažniju ulogu u razgradnji izvanstaničnog matriksa.

Virus Hantaan je inducirao ekspresiju gena za MMP-13, koja ima važnu ulogu u pregradnji izvanstaničnog kolagena, osobito kolagena II. Premda je moguće djelovanje MMP-13 tijekom virusnih infekcija uvelike neistraženo, povećana ekspresija nađena je u određenim upalnim bolestima kao što je reumatoidni artritis [297].

Ulogu u održavanju izvanstaničnog matriksa ima proteinaza ADAMTS-1, čija je ekspresija kod infekcije virusom Hantaan bila smanjena. Ova je molekula uključena u razgradnju izvanstaničnog matriksa te je potrebna za normalan razvoj i funkciju bubrega. Tako miševi koji nemaju ADAMTS-1 pokazuju znatne malformacije bubrega već u trenutku rođenja [298]. Od svih ispitanih tkiva, upravo epitel urinarnog sustava pokazuje najveću ekspresiju testirane proteinaze [256]. Radi važnosti ADAMTS-1 u bubregu, smanjenje ekspresije gena kod infekcije virusom Hantaan moglo bi doprinijeti nastanku oštećenja epitelnih stanica tijekom HVBS-a.

Sniženje ekspresije MMP-2 primijećeno je kod infekcije virusom Andes, ali i kod infekcije virusom Hantaan (1,7 puta). MMP-2 se povezuje s promjenom bazalne membrane u tubulima što doprinosi razvoju oštećenja bubrežne funkcije [252].

Nadalje, povećana razina pokazana je kod bolesnika s kroničnim bolestima bubrega [299]. S druge strane, niža ekspresija MMP-2 na početku bolesti povezuje se sa sprječavanjem razvoja patološkog procesa [252]. Stoga bi smanjenje MMP-2 kod hantavirusnih infekcija moglo biti odraz staničnih reparativnih procesa.

Virus Hantaan je tri dana nakon infekcije utjecao na povećanje ekspresije gena za dva tkivna inhibitora matriks metaloproteinaza, TIMP-1 i TIMP-3, dok je u kasnijoj fazi utjecaj bio znatno manji.

Povećana ekspresija TIMP-1 iRNK i proteina nađena je u brojnim bolestima bubrega te se vjeruje kako igra važnu ulogu u inhibiciji razgradnje izvanstaničnog matriksa koja posljedično dovodi do oštećenja tkiva [300]. Osim u razgradnji matriksa, spominje se uloga u sprječavanju proces apoptoze u epitelnim stanicama sisavaca [301]. TIMP-1 sudjeluje u odgovoru na razne virusne infekcije te je njegova ekspresija povećana kod encefalitisa uzrokovanog koronavirusima te kod infekcije virusom hepatitisa i virusom morbila [180, 260].

Kao što smo već opisali, povećana ekspresija TIMP-3 molekule djeluje na smanjenje funkcije matriks metaloproteinaza, a može uzrokovati i apoptotičku smrt u više vrsta stanica [259]. Nadalje, povećana ekspresija pokazana je kod različitih virusnih infekcija kao što su infekcija virusom ospica te infekcija HIV-om [260]. Postoji mogućnost da povećanje ekspresije gena za TIMP-3 tijekom infekcije doprinosi nastanku apoptoze u HEK 293 stanicama.

Virus Andes doveo je do smanjenja ekspresije gena za više matriks metaloproteinaza, uključujući MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-24 i MMPL-1. Da

djelovanje virusa na sniženje ekspresije nekoliko različitih matriks metaloproteinaza nije neuobičajeno, pokazuje primjer akutne infekcije virusom hepatitisa B, gdje je u serumu bolesnika nađena smanjena razina MMP-1, MMP-2 i MMP-3 [302]. Budući da sve matriks metaloproteinaze poglavito djeluju kao enzimi koji degradiraju različite sastavnice izvanstaničnog matriksa, izrazito sniženje ekspresije više matriks metaloproteinaza kod infekcije virusom Andes moglo bi biti uzrokovano nastojanjem za što manjim oštećenjem tkiva u ovoj fazi infekcije.

MMP-1 ili kolagenazu-1 luče razne stanice u *in vivo* i *in vitro* uvjetima, a djeluje poglavito na razgradnju različitih vrsta kolagena. Međutim, osim uloge u razgradnji izvanstaničnog matriksa, sve se više spominju dodatna važna svojstva. Djelovanje MMP-1 je snažno povezano s mitohondrijima i staničnom jezgrom, a tijekom mitotičke diobe nakuplja se unutar stanice [303]. *Limb i sur.* su pokazali kako tijekom procesa apoptoze dolazi do akumulacije MMP-1 oko mitohondrijima i fragmentirane stanične jezgre [303]. Ovaj enzim potiče rezistenciju na pokretanje apoptoze, a inhibicija dovodi do brže degradacije laminina α , aktivacije kaspaza i fragmentacije jezgre. Smanjena ekspresija MMP-1 mogla bi stoga doprinijeti proapoptotičkim signalima te utjecati na pokretanje programirane stanične smrti.

Nadalje, virus Andes je tri dana nakon infekcije utjecao na povećanje ekspresije matriks degradirajućeg enzima TIMP-1, dok je u kasnijoj fazi doveo do njegove snižene ekspresije. Moguće objašnjenje za opisanu promjenu leži u novijim istraživanjima dugotrajnije indukcije gena za TIMP-1 kod određenih virusnih

infekcija. Tako HIV u ranoj fazi infekcije inducira ekspresiju TIMP-1, dok u kasnijim stadijima dovodi do sniženja ekspresije, obrazac koji smo našli kod infekcije virusom Andes [304].

Iz navedenih rezultata možemo zaključiti kako adhezijske molekule moguće sudjeluju u promjenama koje se događaju prilikom infekcije virusima Hantaan i Andes. Štoviše, ove molekule, a osobito članovi obitelji integrina vjerojatno sudjeluju u infekciji od samoga početka, služeći kao receptori za ulazak virusa. Međutim, izrazite promjene koje smo opisali govore u prilog da adhezijske molekule imaju kompleksne učinke tijekom imunološkog odgovora te nastanku promjena kod hantavirusnih infekcija.

Također želimo još jednom istaknuti rezultat narušene homeostaze između matriks metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora što može utjecati na nastanak promjena i oštećenja tijekom hantavirusne infekcije. Spomenuta hipoteza otvara vrata daljnjim istraživanjima njihove moguće uloge u imunopatogenezi HVBS-a i HPS-a.

7. ZAKLJUČCI

- Plućni fibroblasti imaju aktivnu ulogu tijekom imunološkog odgovora te virusna infekcija dovodi do modulacije ekspresije cijelog niza gena koji mogu sudjelovati u prezentaciji i tijeku infekcije.
- Hantavirusi značajno utječu na ekspresiju citokinskih gena, a osobito je zanimljiv rezultat djelovanja na faktore rasta i koštani morfogenetski protein 2.
- Infekcija virusima Hantaan i Andes dovodi do promjene gena koji se nalaze u sklopu NF- κ B transkripcijskog puta, ali i gena na koje ovaj put posljedično djeluje. Stoga možemo pretpostaviti kako NF- κ B, kao važan regulator imunološkog odgovora, sudjeluje u ranom odgovoru domaćina na infekcije hantavirusima.
- Po prvi puta pokazano je djelovanje virusa Hantaan i Andes na ekspresiju matriks metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora. Budući da ove proteaze imaju glavnu ulogu u razgradnji izvanstaničnog matriksa, njihova neravnoteža može znatno doprinijeti razvoju patoloških promjena.
- Veliki utjecaj hantavirusi pokazuju na članove obitelji integrina, osobito α integrina, molekula koje sudjeluju u međustaničnoj komunikaciji i signalizaciji.
- Promjene u ekspresiji gena pripadnika Bcl-2 obitelji te molekula koje mogu sudjelovati u procesima apoptoze pokrenutim putem endoplazmatskog

retikuluma i mitohondrija, upućuju da unutarnji put apoptoze ima ključnu ulogu pri infekciji patogenim hantavirusima.

- U pokretanju programirane stanične smrti kod infekcije stanica virusima Hantaan i Andes značajnu ulogu imaju kako inicijacijske, tako i izvršne te proupalne kaspaze.
- Važnost povećane ekspresije TNFR1 te moguće međudjelovanje vanjskoga i unutarnjeg apoptotičkog puta trebamo dodatno ispitati u budućim istraživanjima.

Premda je ovo istraživanje temeljeno na analizi ekspresije gena, smatramo kako naši rezultati daju dobre smjernice za buduća istraživanja određenih signalnih puteva i obitelji molekula koje sudjeluju u nastanku oštećenja kod ljudskih stanica inficiranih virusima Hantaan i Andes. Stoga vjerujemo kako ispitivanja događaja na ovoj bazičnoj razini doprinose novim spoznajama te predstavljaju važan dio slagalice o promjenama koje se događaju tijekom infekcije različitim patogenima. Iako *in vitro* istraživanja imaju svoja ograničenja, dobiveni rezultati mogu indirektno ukazivati na potencijalne imunopatogenetske mehanizme u plućima i bubrezima kod infekcije patogenim hantavirusima.

8. SAŽETAK

Hantavirusi (HTV), rod *Hantavirus*, obitelj *Bunyaviridae* prenose se s mišolikih glodavaca na ljude te u čovjeka uzrokuju dvije različite bolesti: hemoragijsku vrućicu s bubrežnim sindromom (HVBS) te hantavirusni plućni sindrom (HPS). Vrlo se malo zna o imunopatogenezi hantavirusnih infekcija, te osobito o tome zašto određeni hantavirusi uzrokuju pretežito bubrežne promjene, dok drugi poglavito zahvaćaju pluća.

Cilj ovoga rada bio je istražiti određene nespecifične imunološke reakcije uzrokovane infekcijom virusom Hantaan (uzročnik HVBS-a) i virusom Andes (uzročnik HPS-a).

Promjene su praćene u dvije različite vrste stanica: ljudskim plućnim fibroblastima (MRC-5 stanice) i ljudskim bubrežnim epitelnim stanicama (HEK 293 stanice). Kod infekcije plućnih fibroblasta analizirali smo ekspresiju gena za različite citokine/kemokine, adhezijske i molekule izvanstaničnog matriksa te gene uključene u NF- κ B transkripcijski put u ranoj fazi infekcije (šest sati).

Kod infekcije HEK 293 stanica analizirali smo gene uključene u različite puteve apoptoze te promjene u adhezijskim i molekulama izvanstaničnog matriksa u dvije vremenske točke tijekom infekcije (3 i 5 dana).

Kako bi odredili gensku ekspresiju testiranih uzoraka RNK koristili smo GEArray metodu (GEArrays, SuperArray Bioscience, Frederick, MD, SAD). Određeni geni ili obitelji gena kod kojih smo našli značajnu promjenu GEArray metodom također smo testirali metodom RT-PCR.

Oba virusa utjecala su na gensku ekspresiju kod članova Rel/NF κ B/I κ B obitelji, molekula koje su modulirane preko NF- κ B puta, transkripcijskih čimbenika te adaptornih proteina. Ove promjene mogu govoriti u prilog našoj hipotezi da tijekom rane faze hantavirusnih infekcija dolazi do aktivacije NF- κ B transkripcijskog puta.

Po prvi puta smo pokazali utjecaj virusa Hantaan i Andes na ekspresiju matriks metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora. Budući da ove proteaze imaju glavnu ulogu u razgradnji izvanstaničnog matriksa, njihova neravnoteža može znatno doprinijeti razvoju patoloških promjena.

Nadalje, potvrdili smo značajnu interakciju hantavirusa i integrina te utjecaj na ekspresiju različitih citokina.

Značajne promjene tijekom infekcije virusima Hantaan i Andes primijetili smo kod pripadnika Bcl-2 obitelji te molekula koje mogu sudjelovati u procesima apoptoze pokrenutim putem endoplazmatskog retikuluma i mitohondrija. Ovi rezultati upućuju da unutarnji put apoptoze ima ključnu ulogu pri infekciji patogenim hantavirusima.

Ovi rezultati mogli bi usmjeriti buduća istraživanja koja bi trebala objasniti imunopatogenetske mehanizme koji stoje u pozadini bubrežnih i plućnih promjena koje se javljaju tijekom hantavirusnih infekcija.

9. SUMMARY

Hantaviruses (HTV), genus *Hantavirus*, family *Bunyaviridae* are rodent-borne viruses that are associated with two main clinical syndromes: hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and hantavirus pulmonary syndrome (HPS). Little is known about the immunopathogenesis in HTV infections, and especially why some HTV cause mainly kidney disorders, while others mostly affect the lungs.

The aim of this study was to analyze some non-specific immunoreactions regulated by two viruses; Hantaan virus (HFRS) and Andes virus (HPS) in two different cell types: human lung fibroblasts (MRC-5 cells) and human epithelial kidney cells (HEK 293 cells).

In lung fibroblasts we analyzed the gene expression for different cytokines/chemokines; extracellular matrix and adhesion molecules (ECM) and molecules involved in NF- κ B signal transductional pathway in the early phase of infection (six hours). In HEK 293 cells we analyzed the genes for different ECM molecules and molecules that take part in different apoptosis pathways in two time points during infection (3 and 5 days). GEArray method was used to compare gene expression profiles of different RNA samples (GEArrays, SuperArray Bioscience, Frederick, MD, USA). Selected genes identified by GEArray analysis were also analyzed by RT-PCR to verify transcriptional responses.

Both viruses increased gene expression for the members of Rel/NF κ B/I κ B family, NF- κ B responsive genes, transcription factors and adaptor proteins. These changes suggest a possible role for NF- κ B pathway in the early immune response against Hantaan and Andes viral infections.

We shown for the first time that pathogenic hantaviruses induce changes in the levels of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs). As MMPs and TIMPs are critical modulators of ECM remodeling, the deteriorated homeostasis found could have a role during immunoreactions to hantaviral infections. We confirmed the considerable interactions of tested viruses and integrins, and their effect to different cytokines.

Furthermore, we identified the influence of both tested viruses on different caspases, molecules that belong to Bcl-2 family and other factors which participate in death program associated with endoplasmic reticulum and mitochondria. Taken together, these results indicate that inner apoptotic pathway have an important role in hantaviral infections.

Our findings may direct future studies which should explain the mechanisms behind the immunopathogenesis of kidney and lung disorders during HFRS/HPS.

10. POPIS LITERATURE

1. Lee HW. Korean hemorrhagic fever. *Prog Med Virol* 1982;28:96-113.
2. Smorodintsev AA AI, Dunaevskii MI, Kiselev MV, Churilov AV, Karshkevich V. Etiology and clinical observation of hemorrhagic nephrosonephritis. Moscow: Medgiz 1944:38-46.
3. Kitano M. A study of epidemic hemorrhagic fever. *J Manchou Med* 1944;40:191-209.
4. Smadel JE. Epidemic hemorrhagic fever. *Am J Public Health* 1953;43:1327-1330.
5. Pon E, McKee KT Jr, Diniega BM, Merrell B, Corwin A, Ksiazek TG. Outbreak of hemorrhagic fever with renal syndrome among U.S. Marines in Korea. *Am J Trop Med Hyg* 1990;42:612-619.
6. Lee HW, Lee, PW. Korean hemorrhagic fever. Demonstration of causative agent and antibodies. *Kor J Intern Med* 1976;19:371-383.
7. Lee HW, Lee PW, Johnson KM. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1978;137:298-308.
8. Myhrman G. Nephropathia epidemica a new infectious disease in northern Scandinavia. *Acta Med Scand* 1951;140:52-56.
9. Lahdevirta J. Nephropathia epidemica in Finland. A clinical histological and epidemiological study. *Ann Clin Res* 1971;3:1-54.
10. Niklasson B, Leduc J, Nystrom K, Nyman L. Nephropathia epidemica: incidence of clinical cases and antibody prevalence in an endemic area of Sweden. *Epidemiol Infect* 1987;99:559-562.
11. Avsic-Zupanc T, Xiao SY, Stojanovic R, Gligic A, van der Groen G, LeDuc JW. Characterization of Dobrava virus: a Hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *J Med Virol* 1992;38:132-137.
12. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, *i sur*. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 1993;262:914-917.
13. Childs JE, Ksiazek TG, Spiropoulou CF, *i sur*. Serologic and genetic identification of *Peromyscus maniculatus* as the primary rodent reservoir for a new hantavirus in the southwestern United States. *J Infect Dis* 1994;169:1271-1280.

14. Frampton JW, Lanser S, Nichols CR. Sin Nombre virus infection in 1959. *Lancet* 1995;346:781-782.
15. Markotic A, Nichol ST, Kuzman I, *i sur.* Characteristics of Puumala and Dobrava infections in Croatia. *J Med Virol* 2002;66:542-551.
16. Borčić B, Turković B, Aleraj B, Tvrtković N. Hemoragijska groznica s bubrežnim sindromom (HGBS) u Hrvatskoj. Učestalost infekcije u ljudi i divlji animalni rezervoari. *Liječ Vjesn* 1991;113:320-323.
17. Radošević Z, Mohaček I. The problem of nephropathia epidemica Myhrman-Zetterholm in relation to acute interstitial nephritis. *Acta Med Scand* 1954;149:221-228.
18. Vesenjaj-Hirjan J, Hrabar A, Vince-Ribaric V, Borcic B, Brudnjak Z. An outbreak of hemorrhagic fever with a renal syndrome in the Plitvice Lakes area (preliminary report). *Folia Parasitol (Praha)* 1971;18:275-279.
19. Ropac D, Popović V, Baltić V, Kobetić T, Komadina G, Gligić A. Epidemiološki i klinički podaci o epidemiji hemoragijske groznice s bubrežnim sindromom. *Med Jad* 1991;21:107.
20. Markotic A, LeDuc JW, Hlaca D, *i sur.* Hantaviruses are likely threat to NATO forces in Bosnia and Herzegovina and Croatia. *Nat Med* 1996;2:269-270.
21. Kuzman I, Markotic A, Turčinov D, Beus I. Outbreak of hemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia in 1995. *Liječ Vjesn* 1997;119:311-315.
22. Borčić B, Puntarić D, Turković B, Aleraj B, Tvrtković N. New natural focus of hemorrhagic fever with renal syndrome in Novska. *Croat Med J* 1996;37:115-118.
23. Ledina D, Bradaric N, Borcic B, *i sur.* Dinara - new natural focus of hemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia. *Croat Med J* 2002;43:576-580.
24. Medved MM, Markotic A, Cebalo L, Turkovic B, Zupanc TA. Haemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia. *Lancet* 2002;360:415-416.
25. Kuzman I, Puljiz I, Turcinov D, *i sur.* [The biggest epidemic of hemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia]. *Acta Med Croatica* 2003;57:337-346.
26. Cvetko L, Markotic A, Plyusnina A, *i sur.* Puumala virus in Croatia in the 2002 HFRS outbreak. *J Med Virol* 2005;77:290-294.
27. Miletic-Medved M, Markotic A, Kuzman I, Maric Z, Avsic-Zupanc T. [An epidemic of hemorrhagic fever with renal syndrome at the therapeutic community

for treatment of psychoactive drug dependence in Ivanovac]. *Acta Med Croatica* 2003;57:361-364.

28. Kuzman I, Markotić A. Velika epidemija hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom (HVBS) u Hrvatskoj (prvo priopćenje). *Infektol Glasn* 2002;22:77-79.

29. Anonimno. Podaci o kretanju zaraznih bolesti: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2002.

30. Schmaljohn C, Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg Infect Dis* 1997;3:95-104.

31. Murphy F, Fauquet C, Bishop DHL. Hantavirus. *Virus taxonomy*. VI ed.: Springer-Verlag, 1995.

32. Gonzales-Scarano F, Nathanson N. Bunyaviridae. In: *Fields Virology*, 3rd edn. Vol. 1, Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors: Lippincot-Raven, 1996:1473-1504.

33. Schmaljohn CS, Dalrymple JM. Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of bunyaviridae. *Virology* 1983;131:482-491.

34. Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol* 1996;77(11):2677-2687.

35. Elliott RM, Schmaljohn CS, Collett MS. Bunyaviridae genome structure and gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;169:91-141.

36. French GR, Foulke RS, Brand OA, Eddy GA, Lee HW, Lee PW. Korean hemorrhagic fever: propagation of the etiologic agent in a cell line of human origin. *Science* 1981;211:1046-1048.

37. Goldsmith CS, Elliott LH, Peters CJ, Zaki SR. Ultrastructural characteristics of Sin Nombre virus, causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. *Arch Virol* 1995;140:2107-2122.

38. Matsuoka Y, Chen SY, Compans RW. Bunyavirus protein transport and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;169:161-179.

39. Spiropoulou CF, Goldsmith CS, Shoemaker TR, Peters CJ, Compans RW. Sin Nombre virus glycoprotein trafficking. *Virology* 2003;308:48-63.

40. Hutchinson KL, Peters CJ, Nichol ST. Sin Nombre virus mRNA synthesis. *Virology* 1996;224 (1):139-149.

41. Flick R, Pettersson RF. Reverse genetics system for Uukuniemi virus (Bunyaviridae): RNA polymerase I-catalyzed expression of chimeric viral RNAs. *J Virol* 2001;75(4):1643-1655.
42. Flick K, Hooper JW, Schmaljohn CS, Pettersson RF, Feldmann H, Flick R. Rescue of Hantaan virus minigenomes. *Virology* 2003;306;2:219-224.
43. Blakqori G, Kochs G, Haller O, Weber F. Functional L polymerase of La Crosse virus allows in vivo reconstitution of recombinant nucleocapsids. *J Gen Virol* 2003;84(5):1207-1214.
44. Li XD, Makela TP, Guo D, *i sur*. Hantavirus nucleocapsid protein interacts with the Fas-mediated apoptosis enhancer Daxx. *J Gen Virol* 2002;83(4):759-766.
45. Gavrilovskaya IN, Shepley M, Shaw R, Ginsberg MH and Mackow ER. beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:7074-7079.
46. Jin M, Park J, Lee S, *i sur*. Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology* 2002;294(1):60-69.
47. Maes P, Clement J, Gavrilovskaya I, Van Ranst M. Hantaviruses: immunology, treatment, and prevention. *Viral Immunol* 2004;17:481-497.
48. Xiao SY, Leduc JW, Chu YK, Schmaljohn CS. Phylogenetic analyses of virus isolates in the genus Hantavirus, family Bunyaviridae. *Virology* 1994;198:205-217.
49. Glass GE, Childs JE, Korch GW, LeDuc JW. Association of intraspecific wounding with hantaviral infection in wild rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol Infect* 1988;101:459-472.
50. Douron E, Moriniere B, Matheron S, *i sur*. HFRS after a wild rodent bite in the Haute-Savoie--and risk of exposure to Hantaan-like virus in a Paris laboratory. *Lancet* 1984;1:676-677.
51. Wells RM, Sosa Estani S, Yadon ZE, *i sur*. An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. *Emerg Infect Dis* 1997;3:171-174.
52. Enria D, Padula P, Segura EL, *i sur*. Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. Possibility of person to person transmission. *Medicina (B Aires)* 1996;56:709-711.
53. Umenai T, Lee HW, Lee PW, *i sur*. Korean haemorrhagic fever in staff in an animal laboratory. *Lancet* 1979;1:1314-1316.

54. Lee HW, Johnson KM. Laboratory-acquired infections with Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1982;146:645-651.
55. Lee HW. Epidemiology and pathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome. In: *The Bunyaviridae*, Elliot RM, ed. New York: Plenum Press, 1996:253-267.
56. Groen J, Gerding MN, Jordans JG, Clement JP, Nieuwenhuijs JH, Osterhaus AD. Hantavirus infections in The Netherlands: epidemiology and disease. *Epidemiol Infect* 1995;114:373-383.
57. LeDuc JW. Epidemiology of hemorrhagic fever viruses. *Rev Infect Dis* 1989;11 Suppl 4:S730-5.
58. Khaiboullina SF, Morzunov SP, St Jeor SC. Hantaviruses: molecular biology, evolution and pathogenesis. *Curr Mol Med* 2005;5(8):773-790.
59. Klempa B, Meisel H, Rath S, Bartel J, Ulrich R, Kruger DH. Occurrence of renal and pulmonary syndrome in a region of northeast Germany where Tula hantavirus circulates. *J Clin Microbiol* 2003;41(10):4894-4897.
60. Sibold C, Ulrich R, Labuda M, *i sur*. Dobrava hantavirus causes hemorrhagic fever with renal syndrome in central Europe and is carried by two different Apodemus mice species. *J Med Virol* 2001;63(2):158-167.
61. Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheri A. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis* 2003;3(10):653-661.
62. Niklasson B, Hornfeldt B, Mullaart M, *i sur*. An epidemiologic study of hemorrhagic fever with renal syndrome in Bashkortostan (Russia) and Sweden. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48(5):670-675.
63. Khan AS, Khabbaz RF, Armstrong LR, *i sur*. Hantavirus pulmonary syndrome: the first 100 US cases. *J Infect Dis* 1996;173(6):1297-1303.
64. Johnson AM, Bowen MD, Ksiazek TG, *i sur*. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology* 1997;238(1):115-127.
65. Monroe MC, Morzunov SP, Johnson AM, *i sur*. Genetic diversity and distribution of Peromyscus-borne hantaviruses in North America. *Emerg Infect Dis* 1999;5(1):75-86.
66. Zeier M, Handermann M, Bahr U, *i sur*. New ecological aspects of hantavirus infection: a change of a paradigm and a challenge of prevention--a review. *Virus Genes* 2005;30:157-180.

67. Lundkvist A, Horling J, Niklasson B. The humoral response to Puumala virus infection (nephropathia epidemica) investigated by viral protein specific immunoassays. *Arch Virol* 1993;130:121-130.
68. Groen J, Gerding M, Jordans JG, Clement JP, Osterhaus AD. Class and subclass distribution of Hantavirus-specific serum antibodies at different times after the onset of nephropathia epidemica. *J Med Virol* 1994;43(1):39-43.
69. Elgh F, Wadell G, Juto P. Comparison of the kinetics of Puumala virus specific IgM and IgG antibody responses in nephropathia epidemica as measured by a recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay and an immunofluorescence test. *J Med Virol* 1995;45:146-150.
70. Lee HW, Calisher C, Schmaljohn C. Manual of Hemorrhagic Fever with renal syndrome and Hantavirus pulmonary syndrome.: WHO collaborating center for virus reference and research (Hantaviruses), Asan Institute for life sciences, 1999.
71. Groen J, van der Groen G, Hoofd G, Osterhaus A. Comparison of immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays for the serology of Hantaan virus infections. *J Virol Methods* 1989;23:195-203.
72. Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Hovi T, *i sur.* Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J Infect Dis* 1980;141(2):131-134.
73. Takahashi Y, Okuno Y, Yamanouchi T, Takada N, Yamanishi K. Comparison of immunofluorescence and hemagglutination inhibition tests and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody in rats infected with hemorrhagic fever with renal syndrome virus. *J Clin Microbiol* 1986;24 (5):712-715.
74. Sugiyama K, Matsuura Y, Morita C, *i sur.* An immune adherence assay for discrimination between etiologic agents of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* 1984;149(1):67-73.
75. Zaki SR, Greer PW, Coffield LM, *i sur.* Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am J Pathol* 1995;146:552-579.
76. Grankvist O, Juto P, Settergren B, *i sur.* Detection of nephropathia epidemica virus RNA in patient samples using a nested primer-based polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1992;165(5):934-937.
77. Horling J, Lundkvist A, Persson K, *i sur.* Detection and subsequent sequencing of Puumala virus from human specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33(2):277-282.

78. Hujakka H, Koistinen V, Eerikainen P, *i sur.* New immunochromatographic rapid test for diagnosis of acute Puumala virus infection. *J Clin Microbiol* 2001;39(6):2146-2150.
79. Hujakka H, Koistinen V, Kuronen I, *i sur.* Diagnostic rapid tests for acute hantavirus infections: specific tests for Hantaan, Dobrava and Puumala viruses versus a hantavirus combination test. *J Virol Methods* 2003;108:117-22.
80. Peters CJ, Simpson GL, Levy H. Spectrum of hantavirus infection: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. *Annu Rev Med* 1999;50:531-545.
81. Cebalo L, Dusek T, Kuzman I, Markotic A. [Grading the severity of disease in patients with Puumala or Dobrava virus infections from 1995 to 2000 in Croatia]. *Acta Med Croatica* 2003;57:355-359.
82. McKee KTJ, MacDonald C, LeDuc JW, Peters CJ. Hemorrhagic fever with renal syndrome--a clinical perspective. *Mil Med* 1985;150(12):640-7.
83. Mustonen J, Partanen J, Kanerva M, *i sur.* Genetic susceptibility to severe course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. *Kidney Int* 1996;49:217-221.
84. Mustonen J, Partanen J, Kanerva M, *i sur.* Association of HLA B27 with benign clinical course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. *Scand J Immunol* 1998;47:277-279.
85. van Ypersele de Strihou C. Clinical features of hemorrhagic fever with renal syndrome in Europe. *Kidney Int* 1991;35:S80-3.
86. LeDuc JW, Childs JE, Glass GE. The Hantaviruses, etiologic agents of hemorrhagic fever with renal syndrome: a possible cause of hypertension and chronic renal disease in the United States. *Annu Rev Public Health* 1992;13:79-98.
87. Settergren B, Ahlm C, Alexeyev O, Billheden J, Stegmayr B. Pathogenetic and clinical aspects of the renal involvement in hemorrhagic fever with renal syndrome. *Ren Fail* 1997;19:1-14.
88. Chun CH, Laehdevirta J, Lee HW. Clinical manifestations of HFRS. In: *Manual of hemorrhagic fever with renal syndrome*. 1 ed, Lee, H. W. and Dalrymple JM editors, 1989:19-38.
89. Huggins JW, Kim GR, Brand OM, McKee KT Jr. Ribavirin therapy for Hantaan virus infection in suckling mice. *J Infect Dis* 1986;153:489-497.

90. Marcus KA, Johann-Liang R, Powers JH. Ribavirin trials and hantavirus--what we should not conclude. *Clin Infect Dis* 2005;40:1550-1551.
91. Khan AS, Ksiazek TG, Zaki SR, *i sur.* Fatal hantavirus pulmonary syndrome in an adolescent. *Pediatrics* 1995;95:276-280.
92. Hallin GW, Simpson SQ, Crowell RE, *i sur.* Cardiopulmonary manifestations of hantavirus pulmonary syndrome. *Crit Care Med* 1996;24(2):252-258.
93. Duchin JS, Koster FT, Peters CJ, *i sur.* Hantavirus pulmonary syndrome: a clinical description of 17 patients with a newly recognized disease. The Hantavirus Study Group. *N Engl J Med* 1994;330(14):949-955.
94. Chapman L, Mertz G, Khan AS. The ribavirin study group. Open label intravenous ribavirin for hanatvirus pulmonary syndrome, 1994.
95. Biron CA, Sen GC. Interferons and other cytokines. In: Fields Virology, 4rd edn. Vol. 1. Knipe DM and Howley PM ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:321-351.
96. Salazar-Mather TP, Hokeness KL. Cytokine and chemokine networks: pathways to antiviral defense. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;303:29-46.
97. Nishimoto N. Cytokine signal regulation and autoimmune disorders. *Autoimmunity* 2005;38:359-367.
98. Szenze EB. Cytokine signaling. In: The cytokine handbook Vol. 1 (Thomson WA and Lotze TM ed): Academic press, 2003.
99. Tilg H, Kaser A. Interferons and their role In inflammation. *Curr Pharm Des* 1999;5:771-785.
100. Steinke JW, Borish L. 3. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:441-5.
101. Bunting K, Wang J, Shannon MF. Control of interleukin-2 gene transcription: a paradigm for inducible, tissue-specific gene expression. *Vitam Horm* 2006;74:105-145.
102. Biron CA. Initial and innate responses to viral infections-pattern setting in immunity or disease. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:374-381.
103. Cousens LP, Orange JS, Su HC, Biron CA. Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:634-639.

104. Biron CA. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin Immunol* 1998;10:383-390.
105. Nguyen KB, Cousens LP, Doughty LA, Pien GC, Durbin JE, Biron CA. Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. *Nat Immunol* 2000;1:70-76.
106. Kanangat S, Babu JS, Knipe DM, Rouse BT. HSV-1-mediated modulation of cytokine gene expression in a permissive cell line: selective upregulation of IL-6 gene expression. *Virology* 1996;219:295-300.
107. Orange JS, Biron CA. Characterization of early IL-12, IFN-alpha/beta, and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 1996;156:4746-4756.
108. Wang H, Czura JC, Tracey JK. Tumor necrosis factor. In: *The Cytokine handbook Vol. 2* (Thomson WA and Lotze TM ed): Academic press, 2003.
109. Rosenwasser LJ. Biologic activities of IL-1 and its role in human disease. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:344-350.
110. Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2:619-626.
111. Schreiber HG, Schreiber DR. Interferon gamma. In: *The Cytokine handbook Vol. 1* (Thomson WA and Lotze TM ed): Academic press, 2003.
112. Cousens LP, Orange JS, Biron CA. Endogenous IL-2 contributes to T cell expansion and IFN-gamma production during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 1995;155:5690-5699.
113. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 1999;17:701-738.
114. Hussell T, Spender LC, Georgiou A, O'Garra A, Openshaw PJ. Th1 and Th2 cytokine induction in pulmonary T cells during infection with respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1996;77:2447-2455.
115. Mantovani A, Locati M, Sozzani S. CC chemokines. In: *The Cytokine handbook Vol. 2* (Thomson WA and Lotze TM ed): Academic press, 2003:1083-1116.
116. Kedzierska K, Crowe SM, Turville S, Cunningham AL. The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Rev Med Virol* 2003;13(1):39-56.

117. Rosenkilde MM, Kledal TN. Targeting herpesvirus reliance of the chemokine system. *Curr Drug Targets* 2006;7:103-118.
118. Mukaida N, Ketlinsky AS, Matsushima K. Interleukin-8 and other CXC chemokines. In: *The Cytokine handbook*. Vol. 2 (Thomson WA and Lotze TM ed) Academic Press, 2003:1049-1082.
119. Flanagan AM, Lader CS. Update on the biologic effects of macrophage colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol* 1998;5:181-185.
120. Franzke A. The role of G-CSF in adaptive immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17:235-244.
121. Kato T, Kitagawa S. Regulation of neutrophil functions by proinflammatory cytokines. *Int J Hematol* 2006;84:205-209.
122. Hamilton JA, Anderson GP. GM-CSF Biology. *Growth Factors* 2004;22:225-231.
123. Chitu V, Stanley ER. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol* 2006;18:39-48.
124. Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, Monini P. The fibroblast growth factors. In: *The Cytokine handbook*. Vol. 2 (Thomson WA and Lotze TM ed). Academic Press, 2003:747-782.
125. Thisse B, Thisse C. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol* 2005;287:390-402.
126. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-260.
127. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2:725-734.
128. MacDonald TT, Pettersson S. Bacterial regulation of intestinal immune responses. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:116-122.
129. Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 2001;107:13-19.
130. Santoro MG, Rossi A, Amici C. NF-kappaB and virus infection: who controls whom. *EMBO J* 2003;22:2552-2560.

131. Chen LF, Fischle W, Verdin E, Greene WC. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science* 2001;293:1653-1657.
132. Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M. Positive and negative regulation of I kappa B kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 1999;284:309-313.
133. Zhong H, Voll RE, Ghosh S. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1998;1:661-671.
134. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107:7-11.
135. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6853-6866.
136. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002;3:221-227
137. Marianneau P, Cardona A, Edelman L, Deubel V, Despres P. Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death. *J Virol* 1997;71:3244-3249.
138. Baichwal VR, Baeuerle PA. Activate NF-kappa B or die? *Curr Biol* 1997;7:R94-6.
139. Hiscott J, Kwon H, Genin P. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest* 2001;107:143-151.
140. Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 1995;80:321-330.
141. Bour S, Perrin C, Akari H, Strebel K. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein inhibits NF-kappa B activation by interfering with beta TrCP-mediated degradation of I kappa B. *J Biol Chem* 2001;276:15920-15928.
142. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 1999;53:577-628.
143. Nimmerjahn F, Dudziak D, Dirmeier U, *i sur*. Active NF-kappaB signalling is a prerequisite for influenza virus infection. *J Gen Virol* 2004;85:2347-2356.
144. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
145. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-1449.

146. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316.
147. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000;69:217-245.
148. Arden N, Betenbaugh MJ. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *Trends Biotechnol* 2004;22:174-180.
149. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 2003;112:481-490.
150. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-1312.
151. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:1899-1911.
152. Di Rosa F, Barnaba V. Persisting viruses and chronic inflammation: understanding their relation to autoimmunity. *Immunol Rev* 1998;164:17-27.
153. Koyama AH. Induction of apoptotic DNA fragmentation by the infection of vesicular stomatitis virus. *Virus Res* 1995;37:285-290.
154. Kurokawa M, Koyama AH, Yasuoka S, Adachi A. Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication. *Int J Mol Med* 1999;3:527-530.
155. Teodoro JG, Branton PE. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol* 1997;71:1739-1746.
156. Lama J, Ware CF. Human immunodeficiency virus type 1 Nef mediates sustained membrane expression of tumor necrosis factor and the related cytokine LIGHT on activated T cells. *J Virol* 2000;74:9396-9402.
157. Li-Weber M, Laur O, Dern K, Krammer PH. T cell activation-induced and HIV tat-enhanced CD95(APO-1/Fas) ligand transcription involves NF-kappaB. *Eur J Immunol* 2000;30:661-670.
158. McCloskey TW, Ott M, Tribble E, *i sur*. Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells. *J Immunol* 1997;158:1014-1019.
159. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* 2004;199:174-180.
160. Czirok A, Zamir EA, Filla MB, Little CD, Rongish BJ. Extracellular matrix macroassembly dynamics in early vertebrate embryos. *Curr Top Dev Biol* 2006;73:237-258.

161. Keely PJ, Fong AM, Zutter MM, Santoro SA. Alteration of collagen-dependent adhesion, motility, and morphogenesis by the expression of antisense alpha 2 integrin mRNA in mammary cells. *J Cell Sci* 1995;108(2):595-607.
162. Prasad N, Topping RS, Decker SJ. Src family tyrosine kinases regulate adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of 5'-inositol phosphatase SHIP2 during cell attachment and spreading on collagen I. *J Cell Sci* 2002;115:3807-3815.
163. Friedl P, Brocker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:41-64.
164. Mostafavi-Pour Z, Askari JA, Parkinson SJ, Parker PJ, Ng TT, Humphries MJ. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J Cell Biol* 2003;161:155-167.
165. Pollok KE, Williams DA. Facilitation of retrovirus-mediated gene transfer into hematopoietic stem and progenitor cells and peripheral blood T-lymphocytes utilizing recombinant fibronectin fragments. *Curr Opin Mol Ther* 1999;1:595-604.
166. Wang KS, Kuhn RJ, Strauss EG, Ou S, Strauss JH. High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. *J Virol* 1992;66:4992-5001.
167. Zhu H, Cong JP, Mamtora G, Gingeras T, Shenk T. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14470-14475.
168. Aplin AE, Howe AK, Juliano RL. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11(6):737-744.
169. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999;285:1028-1032.
170. Arnaout MA, Mahalingam B, Xiong JP. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:381-410.
171. Gavrilovskaya IN, Brown EJ, Ginsberg MH, Mackow ER. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. *J Virol* 1999;73:3951-3959.
172. Song JW, Song KJ, Baek LJ, Frost B, Poncz M, Park K. In vivo characterization of the integrin beta3 as a receptor for Hantaan virus cellular entry. *Exp Mol Med* 2005;37(2):121-127.
173. Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000;117(3):684-694.

174. Crouch E. Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol* 1990;259:159-84.
175. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4:617-629.
176. Elkington PT, O'Kane CM, Friedland JS. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol* 2005;142(1):12-20.
177. Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 2000;96(8):2673-2681.
178. Zhang K, McQuibban GA, Silva C, *i sur*. HIV-induced metalloproteinase processing of the chemokine stromal cell derived factor-1 causes neurodegeneration. *Nat Neurosci* 2003;6(10):1064-1071.
179. Lara-Pezzi E, Gomez-Gavero MV, Galvez BG, *i sur*. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 2002;110(12):1831-1838.
180. Zhou J, Marten NW, Bergmann CC, Macklin WB, Hinton DR, Stohlman SA. Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor during viral encephalitis. *J Virol* 2005;79(8):4764-4773.
181. Leib SL, Clements JM, Lindberg RL, *i sur*. Inhibition of matrix metalloproteinases and tumour necrosis factor alpha converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis. *Brain* 2001;124(9):1734-1742.
182. Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 1970;227:168-70.
183. Laberge S, El Bassam S. Cytokines, structural cells of the lungs and airway inflammation. *Paediatr Respir Rev* 2004;5 Suppl A:S41-5.
184. Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G, Laurent GJ. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29(1):5-17.
185. VanCompernelle SE, Clark KL, Rummel KA, Todd SC. Expression and function of formyl peptide receptors on human fibroblast cells. *J Immunol* 2003;171(4):2050-2056.

186. Le Y, Li B, Gong W, *i sur.* Novel pathophysiological role of classical chemotactic peptide receptors and their communications with chemokine receptors. *Immunol Rev* 2000;177:185-194.
187. Ghildyal R, Dagher H, Donninger H, *i sur.* Rhinovirus infects primary human airway fibroblasts and induces a neutrophil chemokine and a permeability factor. *J Med Virol* 2005;75(4):608-615.
188. Teran LM, Mochizuki M, Bartels J, *i sur.* Th1- and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20(4):777-786.
189. Moorman JP, Fitzgerald SM, Prayther DC, Lee SA, Chi DS, Krishnaswamy G. Induction of p38- and gC1qR-dependent IL-8 expression in pulmonary fibroblasts by soluble hepatitis C core protein. *Respir Res* 2005;6:105.
190. Wang J, Zhu Z, Nolfo R, Elias JA. Dexamethasone regulation of lung epithelial cell and fibroblast interleukin-11 production. *Am J Physiol* 1999;276:175-85.
191. Zhu Z, Tang W, Ray A, *i sur.* Rhinovirus stimulation of interleukin-6 in vivo and in vitro. Evidence for nuclear factor kappa B-dependent transcriptional activation. *J Clin Invest* 1996;97(2):421-430.
192. Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol* 1997;151(2):317-322.
193. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36(1):59-74.
194. Markotic A, Hensley L, Geisbert T, Spik K, Schmaljohn C. Hantaviruses induce cytopathic effects and apoptosis in continuous human embryonic kidney cells. *J Gen Virol* 2003;84:2197-2202.
195. Marti HP, McNeil L, Thomas G, Davies M, Lovett DH. Molecular characterization of a low-molecular-mass matrix metalloproteinase secreted by glomerular mesangial cells as PUMP-1. *Biochem J* 1992;285:899-905.
196. de Coignac AB, Elson G, Delneste Y, *i sur.* Cloning of MMP-26. A novel matrilysin-like proteinase. *Eur J Biochem* 2000;267(11):3323-3329.
197. Marcotte PA, Kozan IM, Dorwin SA, Ryan JM. The matrix metalloproteinase pump-1 catalyzes formation of low molecular weight (pro)urokinase in cultures of normal human kidney cells. *J Biol Chem* 1992;267(20):13803-13806.

198. LeDuc JW, Ksiazek TG, Rossi CA, Dalrymple JM. A retrospective analysis of sera collected by the Hemorrhagic Fever Commission during the Korean Conflict. *J Infect Dis* 1990;162:1182-1184.
199. Alexeyev OA, Ahlm C, Billheden J, Settergren B, Wadell G, Juto P. Elevated levels of total and Puumala virus-specific immunoglobulin E in the Scandinavian type of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994;1:269-272.
200. de Carvalho Nicacio C, Bjorling E, Lundkvist A. Immunoglobulin A responses to Puumala hantavirus. *J Gen Virol* 2000;81:1453-1461.
201. Asada H, Tamura M, Kondo K, *i sur.* Role of T lymphocyte subsets in protection and recovery from Hantaan virus infection in mice. *J Gen Virol* 1987;68(7):1961-1969.
202. Lee JS. Clinical features of hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. *Kidney Int Suppl* 1991;35:S88-93.
203. Lewis RM, Lee HW, See AF, *i sur.* Changes in populations of immune effector cells during the course of haemorrhagic fever with renal syndrome. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991;85(2):282-286.
204. Nolte KB, Feddersen RM, Foucar K, *i sur.* Hantavirus pulmonary syndrome in the United States: a pathological description of a disease caused by a new agent. *Hum Pathol* 1995;26:110-120.
205. Ennis FA, Cruz J, Spiropoulou CF, *i sur.* Hantavirus pulmonary syndrome: CD8+ and CD4+ cytotoxic T lymphocytes to epitopes on Sin Nombre virus nucleocapsid protein isolated during acute illness. *Virology* 1997;238:380-390.
206. Yan D, Gu X, Wang D, Yang S. Studies on immunopathogenesis in epidemic hemorrhagic fever: sequential observations on activation of the first complement component in sera from patients with epidemic hemorrhagic fever. *J Immunol* 1981;127:1064-1067.
207. Cosgriff TM, Lewis RM. Mechanisms of disease in hemorrhagic fever with renal syndrome. *Kidney Int Suppl* 1991;35:S72-9.
208. Jokinen EJ, Lahdevirta J, Collan Y. Nephropathia epidemica: immunohistochemical study of pathogenesis. *Clin Nephrol* 1978;9:1-5.
209. Mustonen J, Helin H, Pietila K, *i sur.* Renal biopsy findings and clinicopathologic correlations in nephropathia epidemica. *Clin Nephrol* 1994;41:121-126.

210. Krakauer T, Leduc JW, Krakauer H. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and interleukin-6 in hemorrhagic fever with renal syndrome. *Viral Immunol* 1995;8:75-79.
211. Linderholm M, Ahlm C, Settergren B, Waage A, Tarnvik A. Elevated plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)-alpha, soluble TNF receptors, interleukin (IL)-6, and IL-10 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* 1996;173:38-43.
212. Markotic A, Gagro A, Dasic G, *i sur.* Immune parameters in hemorrhagic fever with renal syndrome during the incubation and acute disease: case report. *Croat Med J* 2002;43:587-590.
213. Mori M, Rothman AL, Kurane I, *i sur.* High levels of cytokine-producing cells in the lung tissues of patients with fatal hantavirus pulmonary syndrome. *J Infect Dis* 1999;179:295-302.
214. Sundstrom JB, McMullan LK, Spiropoulou CF, *i sur.* Hantavirus infection induces the expression of RANTES and IP-10 without causing increased permeability in human lung microvascular endothelial cells. *J Virol* 2001;75:6070-6085.
215. Geimonen E, Neff S, Raymond T, Kocer SS, Gavrilovskaya IN, Mackow ER. Pathogenic and nonpathogenic hantaviruses differentially regulate endothelial cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13837-13842.
216. Temonen M, Vapalahti O, Holthofer H, Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Lankinen H. Susceptibility of human cells to Puumala virus infection. *J Gen Virol* 1993;74(3):515-518.
217. Temonen M, Mustonen J, Helin H, Pasternack A, Vaheri A, Holthofer H. Cytokines, adhesion molecules, and cellular infiltration in nephropathia epidemica kidneys: an immunohistochemical study. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;78:47-55.
218. Kang JI, Park SH, Lee PW, Ahn BY. Apoptosis is induced by hantaviruses in cultured cells. *Virology* 1999;264:99-105.
219. Hardestam J, Klingstrom J, Mattsson K, Lundkvist A. HFRS causing hantaviruses do not induce apoptosis in confluent Vero E6 and A-549 cells. *J Med Virol* 2005;76:234-240.
220. Li XD, Kukkonen S, Vapalahti O, Plyusnin A, Lankinen H, Vaheri A. Tula hantavirus infection of Vero E6 cells induces apoptosis involving caspase 8 activation. *J Gen Virol* 2004;85:3261-3268.

221. Li XD, Lankinen H, Putkuri N, Vapalahti O, Vaheri A. Tula hantavirus triggers proapoptotic signals of ER stress in Vero E6 cells. *Virology* 2005;333:180-189.
222. Toro J, Vega JD, Khan AS, *i sur*. An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome, Chile, 1997. *Emerg Infect Dis* 1998;4(4):687-694.
223. Hay S, Kannourakis G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol* 2002;83(7):1547-1564.
224. Xu FL, Lee YL, Tsai WY, *i sur*. Effect of cordycepin on Hantaan virus 76-118 infection of primary human embryonic pulmonary fibroblasts--characterization of apoptotic effects. *Acta Virol* 2005;49(3):183-193.
225. Karin M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 1999;18:6867-6874.
226. MacLaren A, Clark W, Gillespie DA. v-Jun sensitizes cells to apoptosis by a mechanism involving mitochondrial cytochrome C release. *Oncogene* 2000;19(51):5906-5918.
227. Wisdom R, Johnson RS, Moore C. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J* 1999;18(1):188-197.
228. Fujioka S, Niu J, Schmidt C, *i sur*. NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol Cell Biol* 2004;24(17):7806-7819.
229. Yan SF, Pinsky DJ, Mackman N, Stern DM. Egr-1: is it always immediate and early? *J Clin Invest* 2000;105:553-554.
230. Quinones A, Dobberstein KU, Rainov NG. The egr-1 gene is induced by DNA-damaging agents and non-genotoxic drugs in both normal and neoplastic human cells. *Life Sci* 2003;72(26):2975-2992.
231. Aicher WK, Alexander D, Haas C, *i sur*. Transcription factor early growth response 1 activity up-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2003;48(2):348-359.
232. Liang Y, Zhou Y, Shen P. NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cell Mol Immunol* 2004;1(5):343-350.
233. McMeekin SR, Dransfield I, Rossi AG, Haslett C, Walker TR. E-selectin permits communication between PAF receptors and TRPC channels in human neutrophils. *Blood* 2006;107(12):4938-4945.

234. Xiong A, Clarke-Katzenberg RH, Valenzuela G, Izumi KM, Millan MT. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activates nuclear factor-kappa B in human endothelial cells and inhibits apoptosis. *Transplantation* 2004;78(1):41-49.
235. Greger JG, Katz RA, Ishov AM, Maul GG, Skalka AM. The cellular protein daxx interacts with avian sarcoma virus integrase and viral DNA to repress viral transcription. *J Virol* 2005;79:4610-4618.
236. Jia W, Hegde VL, Singh NP, *i sur*. Delta9-tetrahydrocannabinol-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells is regulated by translocation of Bad to mitochondria. *Mol Cancer Res* 2006;4:549-562.
237. Makela S, Mustonen J, Ala-Houhala I, *i sur*. Urinary excretion of interleukin-6 correlates with proteinuria in acute Puumala hantavirus-induced nephritis. *Am J Kidney Dis* 2004;43:809-816.
238. Maruo N, Morita I, Shirao M, Murota S. IL-6 increases endothelial permeability in vitro. *Endocrinology* 1992;131:710-714.
239. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2001;2:95-101.
240. Pepper MS, Mandriota SJ, Jeltsch M, Kumar V, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular proteolytic activity. *J Cell Physiol* 1998;177:439-452.
241. Yu H, Maurer F, Medcalf RL. Plasminogen activator inhibitor type 2: a regulator of monocyte proliferation and differentiation. *Blood* 2002;99:2810-2818.
242. Kanerva M, Mustonen J, Vaheri A. Pathogenesis of puumala and other hantavirus infections. *Rev Med Virol* 1998;8:67-86.
243. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004;22:233-241.
244. Sieron AL, Louneva N, Fertala A. Site-specific interaction of bone morphogenetic protein 2 with procollagen II. *Cytokine* 2002;18(4):214-221.
245. Sugimori K, Matsui K, Motomura H, *i sur*. BMP-2 prevents apoptosis of the N1511 chondrocytic cell line through PI3K/Akt-mediated NF-kappaB activation. *J Bone Miner Metab* 2005;23(6):411-419.
246. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006;24:99-146.

247. Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:233-247.
248. Clase KL, Mitchell PJ, Ward PJ, Dorman CM, Johnson SE, Hannon K. FGF5 stimulates expansion of connective tissue fibroblasts and inhibits skeletal muscle development in the limb. *Dev Dyn* 2000;219(3):368-380.
249. Wu MH. Endothelial focal adhesions and barrier function. *J Physiol* 2005;569:359-366.
250. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000;14:2123-2133.
251. Iglesias D, Alegre J, Aleman C, *i sur.* Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in exudative pleural effusions. *Eur Respir J* 2005;25(1):104-109.
252. Cheng S, Pollock AS, Mahimkar R, Olson JL, Lovett DH. Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury. *FASEB J* 2006;20:1898-1900.
253. Krampert M, Bloch W, Sasaki T, *i sur.* Activities of the matrix metalloproteinase stromelysin-2 (MMP-10) in matrix degradation and keratinocyte organization in wounded skin. *Mol Biol Cell* 2004;15:5242-5254.
254. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol* 2006;533:133-144.
255. Pardo A, Selman M. MMP-1: the elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:283-288.
256. Shindo T, Kurihara H, Kuno K, *i sur.* ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J Clin Invest* 2000;105:1345-1352.
257. Rodriguez-Manzaneque JC, Westling J, Thai SN, *i sur.* ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:501-508.
258. Gendron C, Kashiwagi M, Hughes C, Caterson B, Nagase H. TIMP-3 inhibits aggrecanase-mediated glycosaminoglycan release from cartilage explants stimulated by catabolic factors. *FEBS Lett* 2003;555:431-436.

259. Bond M, Murphy G, Bennett MR, Newby AC, Baker AH. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway. *J Biol Chem* 2002;277:13787-13795.
260. Khuth ST, Akaoka H, Pagenstecher A, *i sur*. Morbillivirus infection of the mouse central nervous system induces region-specific upregulation of MMPs and TIMPs correlated to inflammatory cytokine expression. *J Virol* 2001;75:8268-8282.
261. Yan S, Sloane BF. Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies. *Biol Chem* 2003;384:845-854.
262. Yang Z, Kyriakides TR, Bornstein P. Matricellular proteins as modulators of cell-matrix interactions: adhesive defect in thrombospondin 2-null fibroblasts is a consequence of increased levels of matrix metalloproteinase-2. *Mol Biol Cell* 2000;11:3353-3364.
263. Cinatl J, Bittoova M, Margraf S, *i sur*. Cytomegalovirus infection decreases expression of thrombospondin-1 and -2 in cultured human retinal glial cells: effects of antiviral agents. *J Infect Dis* 2000;182(3):643-651.
264. Choudhary A, Hiscott P, Hart CA, Kaye SB, Batterbury M, Grierson I. Suppression of thrombospondin 1 and 2 production by herpes simplex virus 1 infection in cultured keratocytes. *Mol Vis* 2005;11:163-168.
265. Thome M. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol* 2004;4:348-359.
266. Ruland J, Duncan GS, Elia A, *i sur*. Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell* 2001;104:33-42.
267. Zhang Q, Siebert R, Yan M, *i sur*. Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet* 1999;22:63-68.
268. Mathai JP, Germain M, Shore GC. BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *J Biol Chem* 2005;280:23829-23836.
269. Germain M, Mathai JP, Shore GC. BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria. *J Biol Chem* 2002;277:18053-18060.
270. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6.

271. Aillet F, Masutani H, Elbim C, *i sur.* Human immunodeficiency virus induces a dual regulation of Bcl-2, resulting in persistent infection of CD4(+) T- or monocytic cell lines. *J Virol* 1998;72:9698-9705.
272. Levine B, Huang Q, Isaacs JT, Reed JC, Griffin DE, Hardwick JM. Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the bcl-2 cellular oncogene. *Nature* 1993;361:739-742.
273. Lacey DL, Timms E, Tan HL, *i sur.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-176.
274. Walsh MC, Choi Y. Biology of the TRANCE axis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:251-263.
275. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 2004;16:139-144.
276. Grivennikov SI, Kuprash DV, Liu ZG, Nedospasov SA. Intracellular signals and events activated by cytokines of the tumor necrosis factor superfamily: From simple paradigms to complex mechanisms. *Int Rev Cytol* 2006;252:129-161.
277. Inohara N, Ding L, Chen S, Nunez G. Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J* 1997;16:1686-1694.
278. Zhivotovsky B, Orrenius S. Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:859-867.
279. Troy CM, Shelanski ML. Caspase-2 redux. *Cell Death Differ* 2003;10:101-107.
280. MacLachlan TK, El-Deiry WS. Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:9492-9497.
281. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, *i sur.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-489.
282. Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 2005;121:671-674.
283. Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, Walczak H. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO* 2002;21:4520-4530.

284. Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 2003;17:2481-2495.
285. Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, *i sur*. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 2004;165:347-356.
286. Nagano O, Saya H. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci* 2004;95:930-935.
287. Benz PS, Fan X, Wuthrich RP. Enhanced tubular epithelial CD44 expression in MRL-lpr lupus nephritis. *Kidney Int* 1996;50:156-163.
288. Jun Z, Hill PA, Lan HY, *i sur*. CD44 and hyaluronan expression in the development of experimental crescentic glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol* 1997;108:69-77.
289. Birchmeier W, Weidner KM, Hulsken J, Behrens J. Molecular mechanisms leading to cell junction (cadherin) deficiency in invasive carcinomas. *Semin Cancer Biol* 1993;4:231-239.
290. Wang SZ, Hallsworth PG, Dowling KD, Alpers JH, Bowden JJ, Forsyth KD. Adhesion molecule expression on epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Eur Respir J* 2000;15:358-366.
291. Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* 1994;14:8333-8342.
292. Sfikakis PP, Tsokos GC. Clinical use of the measurement of soluble cell adhesion molecules in patients with autoimmune rheumatic diseases. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:241-246.
293. Perantoni AO. Cell adhesion molecules in the kidney: from embryo to adult. *Exp Nephrol* 1999;7:80-102.
294. Hamerski DA, Santoro SA. Integrins and the kidney: biology and pathobiology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999;8:9-14.
295. Adler S, Chen X. Anti-Fx1A antibody recognizes a beta 1-integrin on glomerular epithelial cells and inhibits adhesion and growth. *Am J Physiol* 1992;262:770-6.
296. Kreidberg JA, Symons JM. Integrins in kidney development, function, and disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:233-42.

297. Stahle-Backdahl M, Sandstedt B, Bruce K, *i sur.* Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 1997;76:717-728.
298. Mittaz L, Ricardo S, Martinez G, *i sur.* Neonatal calyceal dilation and renal fibrosis resulting from loss of Adamts-1 in mouse kidney is due to a developmental dysgenesis. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:419-423.
299. Chang HR, Yang SF, Li ML, Lin CC, Hsieh YS, Lian JD. Relationships between circulating matrix metalloproteinase-2 and -9 and renal function in patients with chronic kidney disease. *Clin Chim Acta* 2006;366:243-248.
300. Horstrup JH, Gehrman M, Schneider B, *i sur.* Elevation of serum and urine levels of TIMP-1 and tenascin in patients with renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1005-1013.
301. Liu XW, Bernardo MM, Fridman R, Kim HR. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic cell death via the focal adhesion kinase/phosphatidylinositol 3-kinase and MAPK signaling pathway. *J Biol Chem* 2003;278:40364-40372.
302. Koulentaki M, Valatas V, Xidakis K, *i sur.* Matrix metalloproteinases and their inhibitors in acute viral hepatitis. *J Viral Hepat* 2002;9:189-193.
303. Limb GA, Matter K, Murphy G, *i sur.* Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis. *Am J Pathol* 2005;166:1555-1563.
304. Suryadevara R, Holter S, Borgmann K, *i sur.* Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by astrocytes: links to HIV-1 dementia. *Glia* 2003;44:47-56.

11. ŽIVOTOPIS

Datum rođenja: 22. travnja, 1978.

Mjesto rođenja: Pula, Republika Hrvatska

Mjesto stanovanja: Savski Gaj, II put 15, HR-10000 Zagreb, Hrvatska

Telefon: 091-518-0107

E-mail: lcebal@gmail.com

Školovanje i radno iskustvo:

- 1984.-1992. Osnovna škola Fažana
- 1992.-1996. Opća gimnazija, Pula
- 1996.-2002. Medicinski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu (prosječna ocjena 4.54)
- 2001.-2002. Volonter - znanstveni rad u Odsjeku za celularnu imunologiju, Imunološkog zavoda u Zagrebu (mentor: Dr.sc. Alemka Markotić)
- 2002.-2006. Znanstveni novak – Odjel za istraživanje i razvoj, Odsjek za celularnu imunologiju, Imunološki zavod, Zagreb
- 2003. Upis na Poslijediplomski znanstveni studij Biomedicina i javno zdravstvo, Medicinski fakultet, Zagreb
- 2004. Znanstveno istraživački rad na Institutu za virusologiju Humboldt sveučilišta, Berlin, Njemačka
- 2006. Početak specijalizacije iz Kliničke mikrobiologije s parasitologijom na Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo
- 2006. Upis na poslijediplomski studij Menadžment u zdravstvu, Medicinski fakultet, Zagreb

Nagrade i stipendije:

- 1996.-2002. Stipendija Općine Vodnjan
- 2002. Rektorova nagrada za najbolji studentski rad "Interleukin (IL)-8, monocitni kemotaktični protein (MCP-1) i IL-10 u infekcijama leptospirama i hantavirusima" (mentor: Dr.sc. Alemka Markotić)
- 2003. Stipendija Ministarstva znanosti za sudjelovanje na Europskom imunološkom kongresu (EFIS 2003) na Rodosu, Grčka
- 2004. Stipendija Europskog društva za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti (ESCMID) za rad u Institutu za virusologiju Humboldt sveučilišta, Berlin, Njemačka
- 2004. Stipendija Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa za sudjelovanje na 6 međunarodnom kongresu o HVBS-u, HPS-u i hantavirusima, Seoulu, Južna Koreja
- 2004. Nagrada za najbolji poster na 4. hrvatskom kongresu infektologa s međunarodnim sudjelovanjem
- 2004. Priznaje za poster na godišnjem sastanku hrvatskog

imunološkog društva

- 2005. American Society for Microbiology Travel Fellowship za 2005 IUMS Congress
- 2005. Stipendija Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa za sudjelovanje na IUMS Kongresu, San Francisco, SAD

Objavljeni radovi:

- Miletić Medved M, Markotić A, Cebalo Lj, Turković B, Avšič Županc T. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia. *Lancet* 2002; 360: 415-416.2002.
- Cebalo Lj, Dušek T, Kuzman I, and Markotić A. Grading of disease severity in patients with Puumala or Dobrava virus infection in Croatia during the 1995 – 2000 period. *Acta Medica Croatica*. Vol.57 (2003) Num. 4, 355-359.
- Cebalo Lj. Leishmania – Od uboda do bolesti. *Infekt Glas* 2003; broj 4, 197-204.
- Cebalo Lj i Markotić A. Chemokine Production Predominates in Human Monocytes Infected with Tula Virus. *Viral Immunology* March 2007.