Utjecaj utišavanja kaveolina-1 na uspješnost transdukcije adenoviralnim vektorima tipa 5, 26 i 35

Švec, Danijel

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:539239

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb,
28. veljače 2020.

Danijel Švec
1017/MB

UTJECAJ UTIŠAVANJA KAVEOLINA-1 NA USPJEŠNOST TRANSDUKCIJE ADENOVIRALNIM VEKTORIMA TIPA 5, 26 I 35

Rad je izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u sklopu uspostavnog istraživačkog projekta „Razumijevanje puta ulaska Adenovirusa tipa 26 u stanicu: način poboljšanja vektora za vakcinaciju“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost pod mentorstvom dr.sc. Andreje Ambriović Ristov, voditeljstvom dr.sc. Dragomire Majhen te Davora Nestića, mag. ing. biotechn. koji je pri izradi diplomskog rada bio neposredni voditelj.

Zahvaljujem dr. sc. Andreji Ambriović Ristov na intrigantnom i kvalitetnom iznošenju predavanja koje je pobudilo moj interes prema genskoj terapiji kao i na poticajnom mentorstvu, svakoj motivacijskoj riječi i ugodnoj atmosferi.

Zahvaljujem dr. sc. Dragomiri Majhen na stručnom vodstvu tokom izrade diplomskog rada. Također, zahvaljujem na ogromnoj količini empatije i strpljenja uz intenzivnu motivaciju, poticaj i prenošenju želje za znanjem i dobrim istraživačkim rezultatima. Hvala na uvažavanju svake isprike, utrošenom vremenu i toploj atmosferi.

Zahvaljujem mag.ing.biotechn. Davoru Nestiću na trudu i vremenu koje je uložio na rad sa mnom. Hvala na svoj pomoći koju sam mogao zatražiti u bilo koje vrijeme dana. Hvala na svakom savjetu, konstruktivnoj kritici, šali i naučenom triku prilikom rada u laboratoriju.

Zahvaljujem svojim roditeljima bez kojih ne bih bio ovdje gdje jesam. Hvala im što su bili uz mene u svakom trenutku, što su mi kroz odricanja omogućili studij te je ovaj diplomski rad posvećen prvenstveno njima. Hvala baki Jeleni na svoj brizi i praćenju mog školovanja od prvog školskog dana do zadnjeg ispita na fakultetu i u njenim najtežim trenucima.

Zahvaljujem Elviri i Ljiljani, kolegicama sa studentskog posla, na svoj ljubavi, motivaciji i majčinskoj figuri koju su mi pružile. Hvala kolegicama Anđelki i Heleni na uvažavanju, fleksibilnosti, svakom izlasku u susret, poticaju za radom kao i na svakom ugodnom razgovoru praćenim šalom i smijehom uz šalicu kave.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za staničnu biologiju i prijenos signala, Laboratorij za biologiju i mikrobnu genetiku
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

UTJECAJ UTIŠAVANJA KAVEOLINA-1 NA USPJEŠNOST TRANSDUKCIJE ADENOVIRALNIM VEKTORIMA TIPA 5, 26 I 35

Danijel Švec, 1017/MB

Sažetak: Genska terapija predstavlja prijenos genskog materijala u stanicu s ciljem postizanja terapijskog učinka, bilo ispravljanjem prisutnog poremećaja, bilo unosom u stanicu nove funkcije. Najčešće korišteni vektori u genskoj terapiji su adenovirusi, no prisustvo neutralizacijskih protutijela prema učestalim serotipovima, poput adenovirusa tipa 5 (Ad5), može biti ograničavajući faktor u njihovoj primjeni, te je korištenje rijetkih adenovirusnih tipova poput adenovirusa tipa 26 (Ad26) ili 35 (Ad35), moguće rješenje. Adenovirusi za ulazak u stanicu koriste endocitozu te se klatrinom posredovana endocitoza smatra glavnim putem njihove internalizacije. Osim navedene, endocitoza putem kaveola važna je za ulazak nekih virusa. Do sada nije poznato koja je uloga kaveola u uspješnosti transdukcije Ad5, Ad26 i Ad35. U ovom radu ispitana je uloga kaveolina-1 prilikom endocitoze Ad5, Ad26 i Ad35. Stanice adenokarcinoma pluća čovjeka (A549) transfecirane su plazmidom koji sadrži *short hairpin* RNA za kaveolin-1 te su izdvojeni stabilni transfektanti sa smanjenom ekspresijom kaveolina-1 na kojima je ispitana uspješnost transdukcije Ad5, Ad26 i Ad35. Smanjenje kaveolina-1 smanjilo je površinsku ekspresiju adenoviralnih receptora CAR, CD46 i $\alpha_v\beta_5$ integrina, te povećalo ekspresiju integrina $\alpha_v\beta_3$. U skladu s promjenom količine receptora, utišavanje kaveolina-1 je smanjilo internalizaciju Ad5 i Ad26, smanjilo uspješnost transdukcije Ad5, no nije imalo značajnu ulogu na uspješnost transdukcije Ad26 i Ad35. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da kaveolin-1 ima ulogu u endocitozi Ad5 i Ad26 u A549 stanice.

Ključne riječi: adenovirus tipa 5, 26, 35, kaveolin, endocitoza
Rad sadrži: stranica 53, slika 15, tablica 9, literaturna navoda 69
Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: dr.sc. Andreja Ambriović Ristov, znan. savj. IRB
Pomoć pri izradi: dr. sc. Dragomira Majhen, viš. znan. sur. IRB i Davor Nestić, mag. ing. biotechn.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. izv.prof.dr.sc. Kristina Radošević, PBF
2. dr.sc. Andreja Ambriović Ristov, znan. savj. IRB
3. dr.sc. Dragomira Majhen, viš. znan. sur. IRB
4. izv.prof.dr.sc. Igor Slivac, PBF (zamjena)

Datum obrane: 28. veljače 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Biology and Signalling, Laboratory for Biology and Microbial Genetics
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

EFFECT OF SILENCING CAVEOLIN-1 ON TRANSDUCTION EFFICIENCY OF ADENOVIRAL VECTORS 5, 26 AND 35

Danijel Švec 1017/MB

Abstract: Gene therapy refers to the delivery of foreign gene material into the target cell with the purpose of therapeutic effect, in order to correct a particular disorder, or introduce a new function into the cell. The most used vectors in gene therapy are adenoviruses, but the presence of neutralizing antibodies against frequent serotypes like adenovirus type 5 (Ad5), can be a limiting factor in their application. Thus, using rare adenovirus serotypes like adenovirus type 26 (Ad26) or adenovirus type 35 (Ad35) may be the solution. Adenoviruses use endocytosis to enter the cell and it seems that clathrin mediated endocytosis is major path of their internalization. Besides that, caveolar endocytosis plays important role in internalization of some viruses. It's not known if caveolae have a part in Ad5, Ad26 and Ad35 transduction efficiency. The aim of this study is to investigate the role of caveolin-1 in Ad5, Ad26 and Ad35 endocytosis. Human lung adenocarcinoma cells (A549) have been transfected with plasmid containing short hairpin RNA for caveolin-1. Stabile transfectants with supressed levels of caveolin-1 have been selected and enroled in analysis of transduction efficiency analysis with Ad5, Ad26 and Ad35. Lower levels of caveolin-1 caused lower surface expression of adenoviral receptors CAR, C46 i $\alpha_v\beta_5$ and higher expression of $\alpha_v\beta_3$. In correlation with changes in expression levels of adenoviral receptors, caveolin-1 silencing led to lower internalization of Ad5 and Ad26, and reduced transduction efficiency of Ad5, but did not cause any significant change in transduction efficiency of Ad26 and Ad35. Results of this study indicate that caveolin-1 might play important role in Ad5 and Ad26 endocytosis in A549 cells.

Keywords: Adenovirus type 5, 26, 35, caveolin, endocytosis
Thesis contains: pages 53, figures 15, tables 9, references 69
Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format**) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: dr.sc. Andreja Ambriović Ristov, Senior scientist IRB, Assistant professor PBF
Technical support and assistance: dr. sc. Dragomira Majhen, Senior research associate, IRB and Davor Nestić, mag. ing. biotechn.

Reviewers:
1. PhD Kristina Radošević, Associate professor PBF
2. PhD Andreja Ambriović-Ristov, Senior scientist IRB, Assistant professor PBF
3. PhD Dragomira Majhen, Senior research associate IRB
4. PhD Igor Slivac, Associate professor PBF (replacement)

Thesis defended: 28th of February 2020

SADRŽAJ

1. UVOD **1**
2. TEORIJSKI DIO **2**
2.1. Životni ciklus adenovirusa 5
2.1.1. Receptori uključeni u vezanje adenovirusne čestice 6
2.1.2. Ulazak i internalizacija virusne čestice u stanici 7
2.2. Adenovirusi kao viralni vektori 9
2.2.1. Primjena adenoviralnih vektora 11
3. MATERIJALI I METODE **13**
3.1. MATERIJALI 13
3.1.1. Kemikalije 13
3.1.2. Stanične linije 15
3.1.3. Replikativno defektni adenovirusi 16
3.1.4. Plazmidi sh (CAV1) 16
3.1.5. Ostalo 16
3.1.6. Uređaji i pomagala pri radu 16
3.2. METODE 18
3.2.1. Uzgoj stanica 18
3.2.2. Održavanje stanica 18
3.2.3. Odmrzavanje i zamrzavanje stanica 18
3.2.4. Transfekcija stanica i izdvajanje stabilno transficiranih stanica 19
3.2.5. Razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE 20
3.2.6. Western blot 21
3.2.7. Umnažanje i pročišćavanje adenovirusa centrifugiranjem u cezijevom kloridu 22
3.2.8. Određivanje koncentracije virusnih čestica u suspenziji pročišćenih virusa 23
3.2.9. Fluorescentno obilježavanje adenovirusa 24
3.2.10. Određivanje uspješnosti transdukcije adenovirusom 25
3.2.11. Analiza površinskih receptora stanica protočnom citometrijom 25
3.2.12. Internalizacija fluorescentno obilježenih adenovirusa praćena konfokalnom mikroskopijom 26
4. REZULTATI I RASPRAVA **28**
4.1. IZDVAJANJE KLONOVA A549 STANICA SA SMANJENOM EKSPRESIJOM KAVEOLINA-1 NAKON STABILNE TRANSFEKCIJE PLAZMIDOM KOJI SADRŽI shRNA ZA KAVEOLIN-1 29
4.2 UMNAŽANJE ADENOVIRUSNIH ČESTICA U HEK293a STANICAMA I PROČIŠĆAVANJE NA JASTUČIĆU I U GRADIJENTU CsCl 33

4.3. TRANSDUKCIJA A549 STANICA I STANIČNIH KLONOVA SA SMANJENOM EKSPRESIJOM KAVEOLINA-1 ADENOVIRUSIMA Ad5, Ad26 i Ad35 36

4.4. ANALIZA EKSPRESIJE ADENOVIRUSNIH RECEPTORA NA POVRŠINI A549 STANICA I STANIČNIH KLONOVA SA SMANJENOM EKSPRESIJOM KAVEOLINA-1 38

4.5. INTERNALIZACIJA ADENOVIRUSA Ad5, Ad26 i Ad35 U A549 STANICE I STANIČNI KLON 120 S UTIŠANOM EKSPRESIJOM KAVEOLINA-1 41

5. ZAKLJUČCI 46

6. LITERATURA 47

1. UVOD

Genska terapija predstavlja prijenos genskog materijala u stanicu s ciljem nadoknađivanja nedostatka proteinskog produkta uslijed oštećenja ili nedostatka gena koji za taj produkt kodira, i to bilo korekcijom prisutnog poremaćaja bilo unošenjem potpuno nove funkcije u stanicu. Kako bi genska terapija bila uspješna, potrebno je osigurati kvalitetan i povoljan vektorski sustav čija je zadaća omogućiti efikasnu dostavu i ekspresiju gena od interesa. Kao idealni kandidati nameću se virusi čiji prirodni životni ciklus uključuje vrlo uspješan unos viralnog genoma u jezgru stanice domaćina. Najčešće korišteni vektori za prijenos gena u kliničkim istraživanjima su vektori temeljeni na adenovirusima. Rekombinantni adenovirusni (Ad) vektori najčešće se koriste za prijenos gena u terapiji tumora i u vakcinaciji. Prednosti rekombinantnih Ad vektora su dobro poznavanje njihove molekularne biologije, mogućnost relativno lake manipulacije Ad genomom, mogućnost umnažanja u visokom titru te činjenica da inficiraju stanice kako u diobi, tako i mirujuće stanice.

S obzirom da je svatko od nas u jednom trenutku života bio inficiran adenovirusom, većina populacije posjeduje neutralizacijska protutijela prema uobičajenim serotipovima adenovirusa, kao što je adenovirus tipa 5 (Ad5). Protutijela specifična za vektor mogu ograničiti djelotvornost vektora čime takav vektor postaje nefunkcionalan. Stoga je potreban razvoj novih strategija za izbjegavanje neželjenog imunosnog odgovora domaćina protiv vektora. Jedan od pristupa je korištenje rijetkih adenovirusnih tipova kao što su adenovirus tipa 26 (Ad26) i 35 (Ad35). Unatoč intenzivnom istraživanju Ad, još uvijek postoje neodgovorena pitanja vezana uz osnovnu biologiju Ad.

Ovaj diplomski rad vezan je uz samu infekciju adenovirusa, odnosno, ulazak adenovirusa u stanicu domaćina. Prema dosadašnjim saznanjima, smatra se da endocitoza putem kaveola nije esencijalni mehanizam ulaska adenovirusa u epitelne stanice. Kaveole, udubine u staničnoj membrani, gradi protein kaveolin-1. Kako bi se detaljnije ispitala uloga kaveolina-1 u endocitozi adenovirusa, kao modelni sustav u ovom diplomskom radu, izdvojeni su stabilno transfecirani stanični klonovi stanica epitela adenokarcinoma pluća s utišanom ekspresijom kaveolina-1 na kojima je ispitana uspješnost transdukcije adenovirusima tipa 5, 26, i 35. Nadalje, protočnom citometrijom analizirana je ekspresija površinskih adenoviralnih receptora u staničnim klonovima sa smanjenom ekspresijom kaveolina-1, te je u staničnom klonu s najnižom razinom ekspresije kaveolina-1 konfokalnom mikroskopijom praćena internalizacija fluorescentno obilježenih adenovirusa.

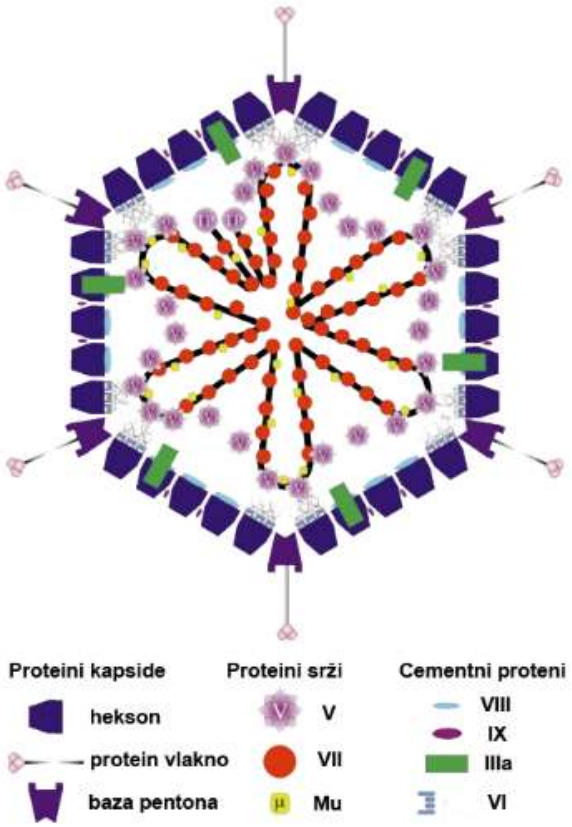
2. TEORIJSKI DIO

Adenovirusi pripadaju porodici *Adenoviridae*. Ova porodica obuhvaća rodove *Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* i *Mastadenovirus*. Adenovirusi čovjeka pripadaju rodu *Mastadenovirus* (Cann, 2005). Postoji više od 60 serotipova adenovirusa čovjeka koji se dijele u sedam grupa s obzirom na aglutinaciju eritrocita, a označavaju se slovima od A do G (Madisch i sur., 2005). Adenovirusi inficiraju raznovrsne postmitotičke stanice neovisno o stupnju proliferacije te inficiraju i visokodefinirane stanice koje čine tkiva poput mišićnog, srčanog ili koštanog. Adenovirusi vrlo efikasno dostavljaju vlastiti genom u jezgru stanice domaćina zbog čega su glavni kandidati za dostavu i ekspresiju terapeutskih gena. Modelni su sustavi za proučavanje ulaska virusa u stanicu, transkripciju i replikaciju viralnog genoma, ekspresiju proteina, kontrolu staničnog ciklusa i staničnog rasta, transformaciju stanica *in vitro* i tumorogenezu (Ginsberg i sur., 1984; Burnett i sur., 1997; Seth i sur., 1999).

Adenovirusi čovjeka prvi su put izolirani u 50-im godinama prošlog stoljeća iz adenoidnog tkiva (Rowe i sur., 1953; Hilleman i sur., 1954) te je poznato da su visoko prevalentni u populaciji ljudi (Vogels i sur., 2003). Njihove primarne mete u organizmu su respiratorni, gastrointestinalni i urinarni trakt te oko (Kojaoghlanian i sur., 2003), no adenovirusi u većini slučajeva ne izazivaju teže medicinske probleme.

Uobičajena morfologiju adenovirusa čini ikozaedralna kapsida sastavljena od tri proteina – heksona, baze pentona i vlakna. Osim proteina kapside, viralna čestica se sastoji još od nekoliko strukturnih proteina - V, VII, VIII, IX, Mu, VI i IIIa, čija je uloga učvršćivanje strukture viralne čestice i vezanje DNA virusa. Vlakna čine trimeri polipeptida IV koji su učvršćeni na bazi pentona kapside (San Martin i Burnett, 2003). Općenita struktura adenovirusa prikazana je na slici 1.

Hekson (trimer polipeptida II) je najzastupljeniji strukturni protein te čini 63 % ukupne proteinske mase jedne viralne čestice, a postoji u 240 kopija po čestici (von Oostrum i Burnett, 1985). Baza pentona (pentamer polipeptida III) zajedno s vlaknom odgovorna je za vezanje virusne čestice i njenu internalizaciju u stanicu domaćina.

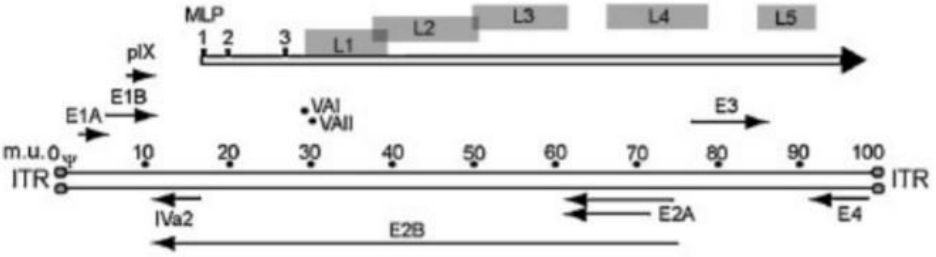


Slika 1. Općeniti prikaz strukture adenovirusa (Russell, 2000).

Adenovirusni genom čini linearna dvolančana DNA molekula koja u nekim serotipovima doseže i do 36 kB. Svaki kraj viralnog genoma sadrži ITR sekvencu (engl. *inverted terminal repeat*), odnosno, dugo invertirano terminalno ponavljanje koje sadrži ishodište replikacije genoma. Adenovirus koristi RNA-polimerazu II stanice domaćina koja provodi transkripciju virusnog genoma, odnosno, prepisivanje i sintezu mRNA molekule. Gledano s obzirom na redoslijed ekspresije, viralne gene možemo podijeliti na rane, intermedijarne i kasne. Šest ranih transkripcijskih jedinica (E1A, E1B, E2A, E2B, E3 i E4) čine geni koji su esencijalni za uspješnu ekspresiju viralnih gena. Svaka rana regija kodira za primarni mRNA transkript koji može proći kroz alternativno procesiranje i time povećati broj finalnih proteinskih produkata ekspresije viralnog genoma.

Kratko nakon infekcije, aktivira se transkripcija regije E1. Produkti te regije reguliraju stanične gene i aktiviraju transkripciju drugih viralnih regija. To su proteini koji se mogu vezati na tumor supresor protein Rb i time aktivirati transkripcijski faktor E2F te stanicu uvesti u S fazu staničnog ciklusa. Dodatno, djeluju antiapoptotički kako bi spriječili da stanica domaćin pokrene apoptozu dok viralne čestice još nisu umnožene. E2 regija kodira za proteine uključene

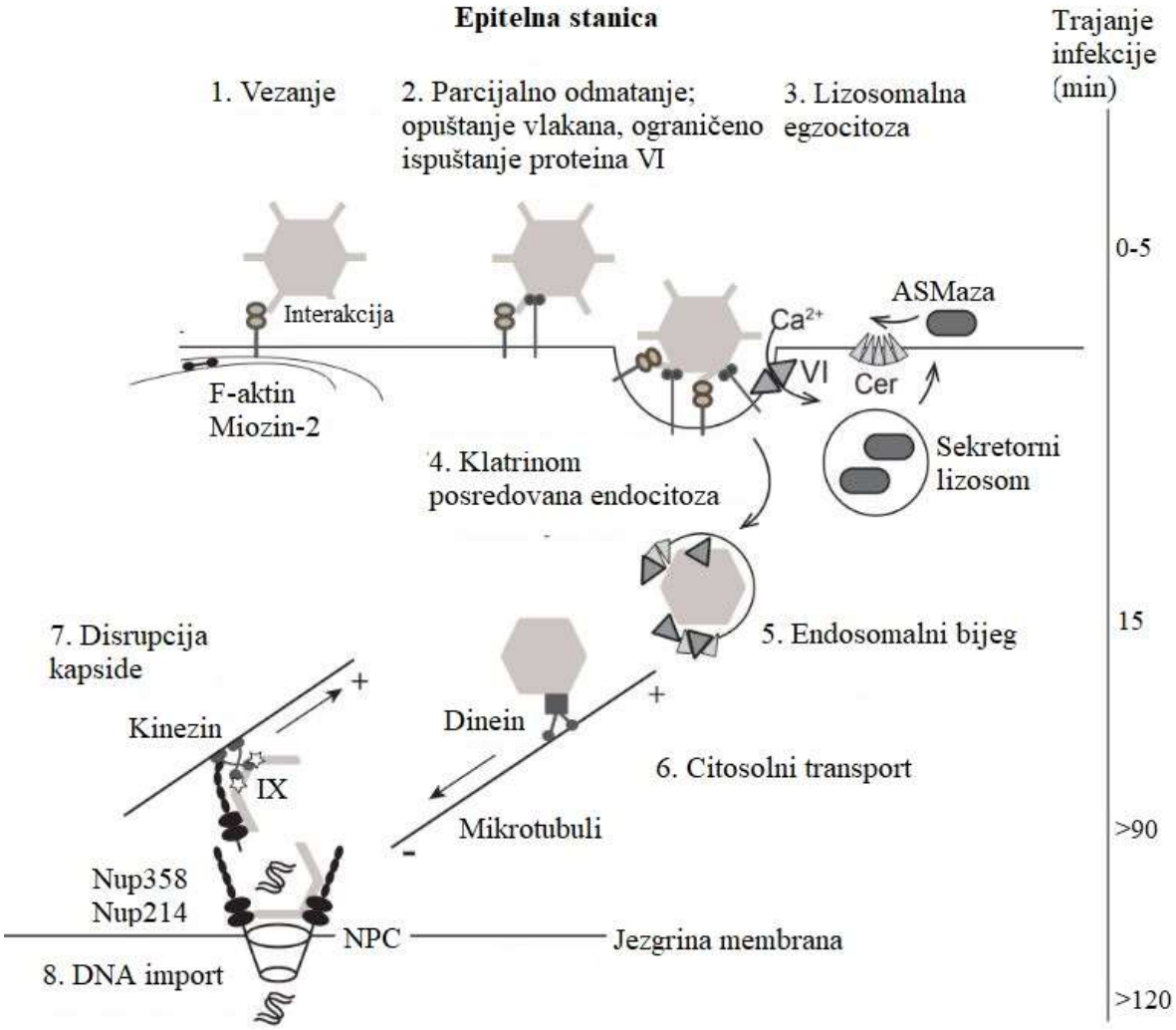
u DNA replikaciju, E3 za utišavanje imunosnog odgovora domaćina, a E4 pomaže transport viralne mRNA iz jezgre u citoplazmu istovremeno blokirajući transport staničnih mRNA što posljedično potpuno utišava sintezu proteina stanice domaćina. Nakon ranih, aktiviraju se intermedijarni geni čija je zadaća osigurati da imunosni odgovor domaćina bude utišan, a na kraju i regija kasnih gena koja mora omogućiti izlazak sklopljene viralne čestice iz stanice. Shema genoma adenovirusa prikazana je na slici 2.



Slika 2. Općeniti prikaz genoma adenovirusa i njegove transkripcije (Goncalves i Vries, 2006).

2.1. Životni ciklus adenovirusa

Put infekcije adenovirusom može se promatrati kroz nekoliko koraka: vezanje, ulazak, oslobađanje iz endosoma, putovanje kroz citoplazmu i unos genoma u jezgru stanice domaćina. Ovi događaju se odvijaju istovremeno u populaciji virusnih čestica te je svaki od tih koraka neophodan za funkcionalnost adenovirusne infekcije. Shema infekcije ciljne stanice adenovirusom prikazana je na slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz infekcije stanice domaćina adenovirusnom česticom (prilagođeno iz Luisoni i Greber, 2016).

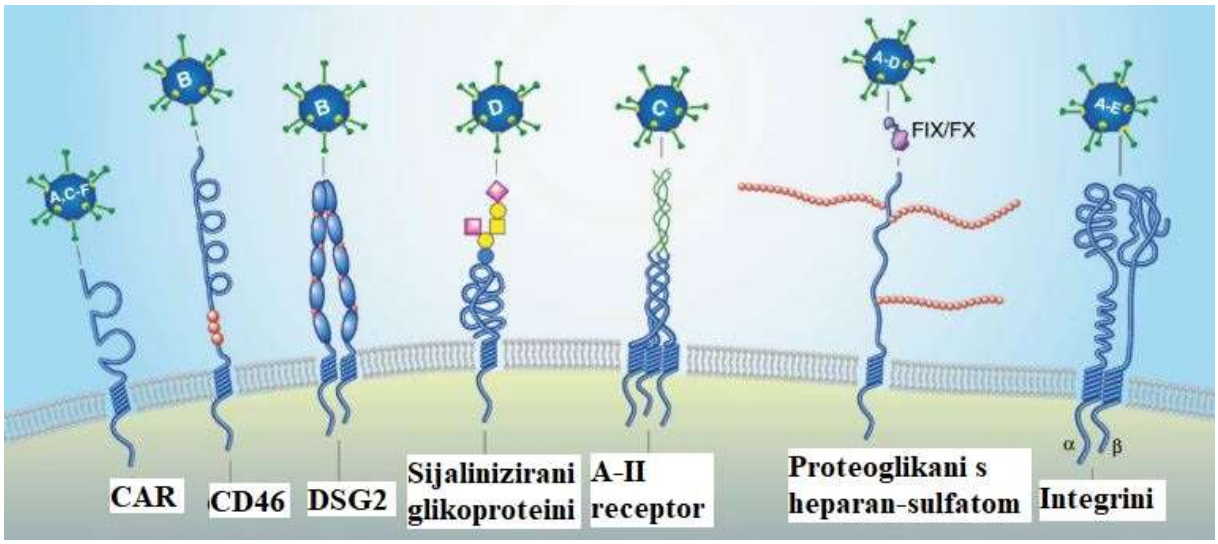
2.1.1. Receptori uključeni u vezanje adenovirusne čestice

Vezanje adenovirusa na površinu stanice posljedica je vezanja glave vlakna s primarnim receptorom na površini stanice. Različiti serotipovi adenovirusa koriste različite molekule kao receptore (Slika 4). Vlakna svih adenovirusa, osim onih iz grupe B, vrlo se uspješno vežu na *coxsackie* adenovirus receptor (CAR), iako CAR nije primarno izložen na površini stanica. Adenovirus tipa 5, jedan od najistraživanijih adenovirusa, koristi CAR kao primarni receptor (Bergelson i sur., 1997). CAR pripada imunoglobulinskoj obitelji proteina koja je uključena u staničnu adheziju, migraciju i rast. Visoko je eksprimiran u stanicama miokarda, pluća, jetre ili bubrega. CAR povezuje susjedne stanice homofilnim interakcijama na lateralnim i bazalnim površinama polariziranih stanica (Walters i sur., 2002; Coyne i sur., 2005). Predložena su tri mehanizma koja opisuju interakciju između adenovirusa i CAR. Prvi pretpostavlja da, uslijed fizičkog ili kemijskog stresa, čvrste veze između stanica budu oslabljene te adenovirus izaziva njihovo razaranje čime izaziva ispoljavanje CAR na površinu stanice (Hayashi i Hogg, 2007). Drugi je baziran na adenovirusu tipa 2 (Ad2) i Ad5 koji izazivaju otpuštanje proupalnih kemokina i citokina poput interleukina-8 što dovodi do translokacije CAR i integrinskih koreceptora na površinu polarizirane epitelne stanice (Lutschg i sur., 2011). Treći je vezan uz interleukin-8 koji može izazvati alternativno procesiranje koje dovodi do sinteze CAR izoforme, CAR^{ex8}, kojom adenovirusi mogu ući u stanicu (Kotha i sur., 2015).

Grupa B adenovirusa, pa tako i adenovirus tipa 35 (Ad35), koristi CD46 kao primarni receptor za ulazak u stanicu, neovisno o visokom ili niskom afinitetu za vezanje (Gaggar i sur., 2003). Pokazano je da adenovirusni vektori temeljeni na Ad5 pseudotipizirani s vlaknom Ad35 transduciraju metastaze jetre *in vivo* ovisno o afinitetu prema CD46 (Wang i sur., 2008) te da mogu usporiti rast tumora dojke efikasnije od uobičajenih Ad5-baziranih vektora (He i sur., 2011). CD46 je dio obitelji proteina regulatora aktivacije komplementa i prisutan je u svim stanicama s jezgrom. Osnovna uloga mu je očuvati zdrave, neinficirane stanice od degradacije uzrokovane aktivnim komplementom. Lokaliziran je apikalno u polariziranim epitelnim stanicama pluća (Sinn i sur., 2002). To je protein koji održava homeostazu epitelnih barijera, kao i stvaranje staničnog citoskeleta. Vlakno Ad35 veže se na kratko konsenzus ponavljanje (engl. *short consensus repeat*, SCR) u izvanstaničnoj petlji CD46.

Za većinu adenovirusa integrini predstavljaju internalizacijske i signalizacijske koreceptore, pri čemu interakciju s integrinima adenovirus ostvaruje putem RGD (Arg-Gly-Asp) motiva u bazi pentona (Byron i sur., 2010). Integrini postoje u formi heterodimera građenog od α i β podjedinica, a uloga im je učvrstiti stanicu vezanjem na izvanstanični matriks, provoditi signale

iz okoline u samu stanicu, regulirati stanično preživljavanje, migraciju i diferencijaciju. Lokalizirani su bazolateralno kod epitelnih stanica, ali se uslijed infekcije ispoljavaju apikalno. Pokazano je da u ulasku adenovirusa u stanicu domaćina *in vitro* (Arnberg i sur., 2009) sudjeluju integrini $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$. Dobro je poznato da Ad5 infekciju započinje vezanjem na CAR nakon čega slijedi interakcija RGD motiva s α_v integrinima na površini stanice što omogućuje internalizaciju virusne čestice (Meier i Greber, 2003). Svi adenovirusi, osim tipova 40 i 41, posjeduju RGD slijed u bazi pentona te koriste integrine kao koreceptore. Vlakno Ad26 puno je kraće od vlakna Ad5 (Yu i sur., 2017). Osim integrina, pokazano je da Ad26 kao primarni receptor može koristiti i CD46 (Li i sur., 2012; Abbink i sur., 2007), ali i CAR (Chen i sur., 2010). Međutim, da bi infekcija Ad26 bila efikasna, nužno je potreban integrin $\alpha_v\beta_3$ (Nestić i sur., 2019).



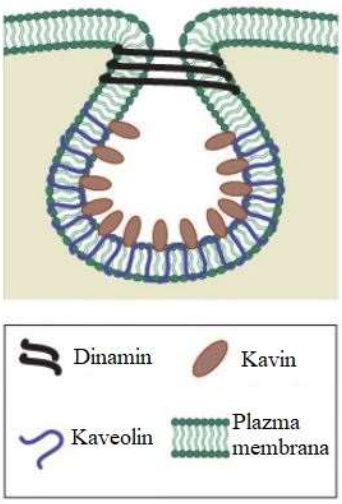
Slika 4. Shematski prikaz osnovnih receptora za adenovirusne čestice (prilagođeno iz Arnberg, 2012).

2.1.2. Ulazak i internalizacija virusne čestice u stanici

Adenovirusi za ulazak u stanicu koriste endocitozu. Endocitoza je mehanizam kojim se molekule iz izvanstaničnog okoliša unose u stanicu, a povezana je i s regulacijom aktivnosti površinskih staničnih receptora. Postoji nekoliko tipova endocitoze kojima patogeni mogu ući u stanicu domaćina, kao što su fagocitoza, makropinocitoza, klatrinom posredovana te kaveolinom posredovana endocitoza.

Klatrinom posredovana endocitoza bazira se na specifičnim dijelovima plazma membrane bogatim fosfatidil-inozitol-4,5-bifosfatom gdje adaptorski protein kompleks 2 (AP2) prepoznaje materijal koji će ući u stanicu, veže receptore endocitoze i, zajedno s ostalim citosolnim proteinima, sudjeluje u nastanku klatrinom obavijenih mjehurića (engl. *coats*) (Pearse i sur., 2000). Vezanje adenovirusa na receptor okida polimerizaciju klatrina koji će uz pomoć adaptina i dinamina oformiti klatrinom obavijeni mjehurić i tako unijeti virusnu česticu u citosol stanice. Cijeli ovaj proces troši energiju koju osiguravaju GTP-aze. Isto tako, promjene u morfologiji membrane mogu zahtijevati i prisutnost aktina, ovisno o tipu stanice (Boulant i sur., 2011). Klatrinom posredovana endocitoza se smatra glavnim mehanizmom ulaska adenovirusnih čestica u stanicu domaćina.

Kaveolinom posredovana endocitoza temeljena je na lipidnim domenama membrana koje su hidrofobne, bogate kolesterolom i sfingolipidima. U takvim mikrodomenama membrane mogu se definirati kaveole, odnosno, invaginacije membrane koje imaju specifičan oblik boce, a gradi ih kaveolin koji postoji u tri forme (kaveolin-1, kaveolin-2 i kaveolin-3). Kaveolin-1 je intermembranski protein s formom ukosnice i vezan je sa staničnim citoskeletom. Kaveolarna endocitoza uključena je u mnoge fiziološke procese poput endocitoze, regulacije lipida, signalizacije i slično (Razani i sur., 2002; Hayer i sur., 2010). Shematski prikaz kaveole prikazan je na slici 5. Jedna kaveola može sadržavati 140 do 150 molekula kaveolina-1 (Pelkamans i sur., 2005).



Slika 5. Shematski prikaz kaveole (prilagođeno iz Hayer i sur., 2010).

Makropinocitoza je primjer endocitoze bez receptora i pomoćnih proteina u formiranju vezikule. Može biti reciklirajuća ili procesivna, ovisno o tome da li se nastali makropinosomi dodatno obrađuju kako bi im se smanjila veličina i kako bi se izazvala njihova fuzija s kasnim endosomima ili lizosomima. Smatra se da ju okidaju lektini, receptori manoze i integrini $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ i $\alpha_5\beta_1$ (Aderem i Underhill, 1999). Fagocitoza je uglavnom proces kojim se patogeni neutraliziraju opsonizacijom. Imunoglobulini oblažu adenoviruse i izazivaju fagocitozu ostvarenjem interakcije s Fc-receptorima antigen prezentirajućih stanica, makrogafa ili dendritičkih stanica (Bidgood i sur., 2014). Na primjer, pokazano je da čestice Ad5 mogu biti internalizirane u dendritičke stanice putem FcγR2 i FcγR3 receptora (Mercier i sur., 2004).

Kako bi izbjegao razgradnju, adenovirus se, nakon što se endosom u kojem se nalazi odvoji od plazmatske membrane, mora osloboditi iz endosoma. Oslobađanje iz endosoma ključan je korak u adenovirusnoj infekciji o kojem se još uvijek malo zna. Poznato je da Ad2 i Ad5 bijeg iz endosoma ostvaruju vrlo brzo nakon same endocitoze, da postoje agensi koji inhibiraju razaranje membrane endosoma te da takvo razaranje u *in vitro* uvjetima zahtijeva kiseli pH (Pastan i sur., 1986; Greber i sur., 1993; Blumenthal i sur., 1986). To bi značilo da sama prisutnost adenovirusne čestice i niski endosomalni pH nisu dovoljni za uspješno razaranje membrane endosoma te da je to korak koji zahtijeva i dodatne elemente. Pokazano je da je jedan od takvih dodatnih faktora integrin $\alpha_v\beta_5$ (Wang i sur., 2000). Smatra se da adenovirusna čestica precizno aktivira integrine i priprema stanicu domaćina na njezin ulazak nekoliko koraka unaprijed. Adenovirusna čestica se potom veže na motorne proteine pomoću kojih po komponenti citoskeleta, mikrotubulima, putuje do jezgre.

2.2. Adenovirusi kao viralni vektori

Značajnim napretkom u poznavanju molekularne biologije adenovirusa te razvoju metoda za manipulaciju virusnog genoma, adenovirusi se ističu kao glavni kandidati za razvoj vektora namijenjenih prijenosu gena, vakcinaciji ili onkolitičkoj terapiji te zauzimaju najveći udio u korištenju viralnih vektora za klinička ispitivanja genske terapije.

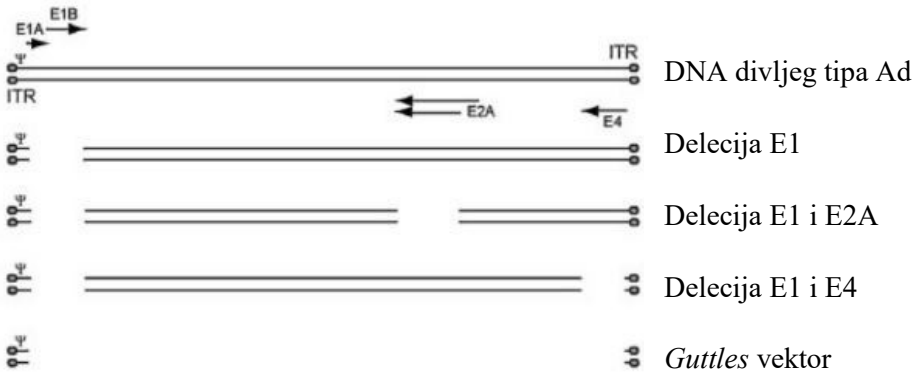
Adenovirusi mogu inficirati širok spektar različitih tipova stanica i tkiva, neovisno o tome jesu li to stanice koje se dijele ili ne. Da bi se koristili kao vektori, potrebno je ukloniti određene dijelove njihovog genoma čime se povećava kapacitet ugradnje stranog genetskog materijala, ali i onemogućava replikacija, odnosno, smanjuje imunosni odgovor domaćina. Adenoviralni vektori se relativno lako umnažaju, pročišćavaju i koriste, te nisu opasni za ljudsko zdravlje.

Imaju mogućnost ugradnje od oko 2 kb strane DNA bez značajnih učinaka na njihovu stabilnost i infektivnost. Pri konstrukciji replikacijski defektnih Ad vektora strana DNA se može ugraditi u barem tri područja Ad genoma: E1, E3 i kratko područje između E4 i kraja genoma (Slika 5).

Prvu generaciju viralnih vektora obilježava delecija E1 i/ili E3 genskih kazeta što je povećalo količinu strane DNA na 5-6 kb koja se stavlja pod kontrolu heterolognog promotora. Takva delecija sprječava replikaciju adenovirusa u ciljanoj stanici bez da remeti Ad-posredovan prijenos gena. Takvi virusi umnažaju se u E1-komplementirajućim stanicama koje omogućuju njihovu replikaciju i umnažanje, kao što su HEK293a stanice sa stabilnom ekspresijom E1A gena (Graham i sur., 1977). Iako su prvi rezultati bili obećavajući, pokazano je da je takva ekspresija transgena vrlo kratkotrajna i smanjena zbog povećanog imunosnog odgovora i na kapsidne antigene i na uneseni transgen. Smatra se da je razlog tome bio što većina stanica ima E1 nalik proteine koji, iako u manjoj mjeri, kao i viralni E1 geni omogućuju aktivaciju ekspresije E2 gena što dovodi početka replikacije DNA virusa, sklapanja viralnih kapsida i, naposljetku, nastanka replikacijski kompetentnih adenovirusa (Hehir i sur., 1996; Gao i sur., 2000).

Kao odgovor na nedostatke prve generacije konstruirani su adenoviralni vektori druge generacije. Ovi vektori su, osim delecija u E1 regijama, imali delecije i u E2 regijama (djelomične ili potpune). Takav pristup potpuno je onemogućio replikaciju DNA virusa i nastanak replikacijski kompetentnih virusa (Fallaux i sur., 1998, 1999). Unatoč tome, imunosni odgovor domaćina je i dalje bio jak te je onemogućavao trajnu ekspresiju transgena.

Treća generacija adenoviralnih vektora bazirana je na deleciji svih viralnih gena osim ITR s obje strane i pakirajućeg signala. To su tzv. *gutless* vektori koji imaju izniman kapacitet ugradnje strane DNA (do 37 kb), ne izazivaju jak imunološki odgovor te omogućuju produženo trajanje ekspresije transgena. Međutim, zahtijevaju *helper* viruse kako bi se uspješno umnažali u komplementirajućim stanicama (Hardy i sur., 1997; Kumar-Singh i Chamberlain, 1996; Lieber i sur., 1999; Morsy i sur., 1998; Stenwaerder i sur., 1999). Postoji mogućnost nestabilnosti takvih vektora, kontaminacije *helper* virusa, a pročišćavanje vektora mora biti jako pažljivo.



Slika 6. Shematski prikaz različitih generacija adenoviralnih vektora (prilagođeno iz Goncalves i Vries, 2006).

2.2.1. Primjena adenoviralnih vektora

Nakon ulaska u jezgru stanice, adenovirus ostaje episomalno i ne ugrađuje se u genom domaćina zbog čega ne postoji opasnost od insercijske mutageneze (Lieber i sur., 1999). Iz istog razloga Ad vektori omogućuju samo prolaznu ekspresiju unesenog gena, međutim, to ne predstavlja ograničenje u genskoj terapiji tumora ili vakcinaciji.

S obzirom da je svatko od nas u jednom trenutku života bio inficiran adenovirusom, većina populacije posjeduje neutralizacijska protutijela prema uobičajenim serotipovima adenovirusa, kao što je Ad5. Neutralizacijska protutijela se proizvode prema proteinima heksona i vlakna, no odgovor na heksone je dominantan (Curiel, 2016). Protutijela specifična za vektor mogu ograničiti djelotvornost vektora čime takav vektor postaje nefunkcionalan. Stoga je potreban razvoj novih strategija za izbjegavanje neželjenog imunosnog odgovora domaćina protiv vektora. Jedan od pristupa je korištenje rijetkih adenovirusnih tipova kao što su Ad26 i Ad35.

Na primjer, adenoviralni vektor baziran na Ad26, iskoristili su Cox i suradnici kako bi konstruirali cjepivo za Zika virus koji je postao problematičan u Brazilu još 2015. godine. Vektor je sadržavao transgen za M-Env antigen Zika virusa te je pokazao povoljne rezultate na miševima i primatima. Cjepivo se pokazalo kao vrlo imunogenično u predkliničkim pokusima te je postignuta imunizacija trajanja minimalno 12 tjedana za miševe te 52 tjedna za primate koji su postali otporni na infekciju Zika virusom (Cox i sur., 2018).

Pokazano je i da Ad26 i Ad35 mogu imati značajnu ulogu u vakcinaciji humanog papiloma virusa (HPV). Naime, HPV pseudovirioni, korišteni za intravaginalnu imunizaciju, teško prolaze cervikovaginalni epitel koji mora biti ili permeabiliziran ili djelomično razoren kako bi čestice doprijele do bazalnih stanica. Vlakna adenovirusa, prilikom vezanja na adenoviralne receptore, osim što izazivaju ispoljavanje receptora na površinu stanice, kidaju i čvrste međustanične veze i na taj način adenovirus lakše inficira i širi se prema lumenu (Walters i sur., 2002). Tu su činjenicu Cuburu i suradnici primijenili prilikom imunizacije protiv HPV-a i pokazali da primjena adenoviralnih vektora koji eksprimiraju fuzionirani protein građen od proteina E6 i E7 HPV-a pomaže imunizaciju protiv HPV-a više nego vektori bazirani na HPV-u (Cuburu i sur., 2018).

Navedeni primjeri samo su neki od mnogobrojnih koji pokazuju značaj adenovirusa u području genske terapije koji je velik zbog čega je potrebno nastaviti istraživati njihovu molekularnu biologiju kako bi se nova znanja iskoristila u vidu konstrukcije vektora za prijenos transgena u ciljane stanice te, u konačnici, kako bi genska terapija napredovala i bila uspješnija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Tablica 1. Popis korištenih kemikalija

Naziv	**Proizvođač**
Alexa Fluor 488	Thermo Scientific, USA
Amonijev klorid (NH_4Cl)	Sigma-Aldrich, USA
Amonijev persulfat, APS 10 % ($(NH_4)_2S_2O_8$)	Serva, Njemačka
Bisakrilamid ($C_7H_{10}N_2O_2$)	Serva, Njemačka
Bromfenol-plavo (engl. *Bromphenol blue*)	Sigma-Aldrich, USA
DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindol)	Invitrogen, SAD
Dimetil sulfoksid, DMSO (C_2H_6OS)	Gram Mol, Hrvatska
Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM)	Lonza, Švicarska
Etanol	Gram Mol, Hrvatska
Faloidin	Invitrogen, SAD
Geneticin, G418	Calbiochem, SAD
Glicerol	Kemika, Hrvatska
Goveđi serumski albumin (engl. *Bovine Serum Albumine*, BSA)	Macherey-Nagel, Njemačka
IsoFlow tekućina (engl. *IsoFlow Sheath Fluid*)	Beckman Coulter Inc., SAD
Lipofektamin	Invitrogen, SAD
Natrij-dodecil sulfat, SDS ($NaC_{12}H_{25}SO_4$)	Sigma-Aldrich, SAD
Nemasno mlijeko u prahu	Roth, Njemačka
Optimem	Gibco, SAD
Paraformaldehid, PFA 4%	Sigma, Njemačka
Proteinski marker za SDS-elektroforezu	Thermo Scientific, SAD
Serum fetusa goveda (engl. *fetal bovine serum*, FBS)	Invitrogen, SAD
Standard za elektroforezu	Thermo Scientific, SAD
Tris	Sigma, Njemačka
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, USA

Virocid 1 %	Genera, Hrvatska
Western Lighteningâ Plus ECL Enhanced Luminol Reagent Plus	PerkinElmer®, SAD
Western Lighteningâ Plus ECL Oxidizing Reagent Plus	PerkinElmer®, SAD
N, N, N', N'-tetrametiletilenediamin, TEMED ($C_4H_{11}NO_3$)	Sigma-Aldrich, SAD
2-merkaptoetanol (C_2H_6OS)	Serva, Njemačka

Tablica 2. Priprema pufera i otopina

Naziv	**Priprema**
Amidocrno boja 0,1 %	45 mL metanola, 10 mL octene kiseline, 45 mL vode, 0,1 g amido black otopine u 100 mL
Otopina CsCl gustoće 1,25 g mL^{-1}	36,16 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera
Otopina CsCl gustoće 1,34 g mL^{-1}	51,20 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera
Otopina CsCl gustoće 1,40 g mL^{-1}	62,00 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera
Otopina za odbojavanje	40 mL metanola, 7 mL octene kiseline, 53 mL vode
Pufer TAE (50x)	242 g Tris baza, 57,1 mL ledene octene kiselina, 100 mL 0,5 M, pH 8.0, otopiti u 1 L diH2O
Pufer TD	8 g NaCl i 0,38 g KCl otopi se u 150 mL diH_2O, doda se 0,1 g Na_2HPO_4 i 3 g Tris baze, nadopuni se do 500 mL s diH_2O, podesi pH 7.4-7.5, nadopuni do 1 L s diH_2O;
Sterilni fosfatni pufer (PBS)	2 g 2,7 mM KCl; 0,2 g 1,5 mM KH_2PO_4; 8,0 g 137 mM NaCl; 1,15 g 8 mM Na_2HPO_4 u 1000 ml deH_2O
TBS pufer	0,6 g 10 mM Tris; 4,38 g 150 mM NaCl u 500 ml biH_20
Transfer pufer	50 ml Tris-glicinski pufer pH 8,3; 350 ml biH_2O; 100 ml etanol

6x koncentrirani pufer za uzorke	2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 6,8; 1,2 g SDS; 3 ml glicerol; 20 mg bromfenol-plavo; 1,2 ml 2-merkaptoetanol u 10 ml biH20

Tablica 3. Popis korištenih antitijela

Protutijelo	**Specifičnost**	**Proizvođač**	**Kataloški broj**
Primarna	Kaveolin-1	AbCam, UK	ab2910
	LDH	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc133123
	CAR	EMD Millipore, SAD	05-644
	CD46	BioRad, SAD	MCA2113
	$\alpha_v\beta_3$	EMD Millipore, SAD	MAB1976
	$\alpha_v\beta_5$	EMD Millipore, SAD	MAB1961
	IgG	Sigma-Aldrich, SAD	M5284
Sekundarna	Anti-miš	BD, SAD	554001
	Anti-zec	Invitrogen, SAD	31466

3.1.2. Stanične linije

U ovom radu korištene su adherentne stanice bubrega embrija čovjeka (engl. *human embryonal kidney*, HEK-293, ATCC® CRL-1573TM) te stanice adenokarcinoma pluća čovjeka (engl. *adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells*, A549, ATCC® CCL-185).

3.1.3. Replikativno defektni adenovirusi

U ovom radu korišteni su replikativno defektni adenovirusi Ad5, Ad26 i Ad35 s transgenom GFP pod CMV promotorom. Korišteni vektori prethodno su konstruirani i opisani (Abbink i sur., 2007).

3.1.4. Plazmidi sh (CAV1)

Korišteni plazmidi za utišanje kaveolina dobiveni su od dr. sc. Yong Keun Jung (opisano u Nah i sur., 2013).

3.1.5. Ostalo

Za pročišćavanje virusa centrifugiranjem na jastučiću i u gradijentu CsCl korištene su epruvete za centrifugiranje Ultra-Clear 344059 (Beckman, SAD). Za uklanjanje CsCl nakon pročišćavanja virusa centrifugiranjem u gradijentu CsCl korištena je kolona Sephadex G25M (GE Healtcare Life Sciences, Velika Britanija), a za uklanjanje boje Alexa Flour 488 Zeba Spin desalinizirajuća kolona (Thermo Scientific, USA).

3.1.6. Uređaji i pomagala pri radu

Tablica 4. Popis korištenih uređaja i pomagala

Naziv	**Proizvođač**
Brojač stanica	Beckman Coulter, UK
Centrifuga do 50 mL	Heraeus, Njemačka
Centrifuga MSE Harrier 18/80	Camlab, UK
Epruvete Ultra-Clear 344059	Beckmann, SAD
Mikroskop Evos Cell Imaging	Thermo Scientific, SAD
Gumena strugalica	Falton Becton Dickinson, SAD
Hamilton igla	Hamilton, Švicarska

Igla za pročišćavanje virusa	Merck, Švicarska
Inkubator za uzgoj stanica	Thermo Scientific, SAD
Invertni svjetlosni mikroskop	Opton, Njemačka
Izvor napona za gel elektroforezu	Pharmacia LKB, Njemačka
Kabinet za sterilan rad	Klimaoprema, Hrvatska
Konfokalni mikroskop (Leica SP8 X FLIM)	Leica, Njemačka
Mikroepruvete	Eppendorf, Njemačka
Nanodrop	Thermo Scientific, SAD
Nitrocelulozna membrana (pore 0,45 µm)	Sigma-Aldrich, Njemačka
Petrijevka	Falton Becton Dickinson, SAD
Pločice za uzgoj s 6, 12, 24 i 96 bunarića	Falton Becton Dickinson, SAD
Protočni citometar	FACSCalibur, Becton Dickinson, SAD
Uređaj za ultrazvučno razbijanje stanica	Cole Palmer, SAD
Stakalca za konfokalni mikroskop	Vitrognost, Hrvatska
Stolna centrifuga	Eppendorf, Njemačka
Sustav za vertikalnu elektroforezu	Bio-Rad, Njemačka
Termoblok	Eppendorf, Njemačka
Tresilica	Tehtnica, Slovenija
Ultracentrifuga	Beckman, SAD
Vodena kupelj	Tehtnica, Slovenija
Vorteks	Tehtnica, Slovenija

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj stanica

Stanica se uzgajaju u monosloju u *in vitro* uvjetima u Petrijevkama promjera 10 cm u inkubatoru za uzgoj stanične kulture koji ima konstantnu temperaturu zraka od 37 ˚C uz atmosferu od 95 % kisika i 5 % CO_2 zasićenu vlagom. Za stanični uzgoj koristi se medij DMEM-FBS koji sadrži DMEM (Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge) uz dodatak 10 % seruma fetusa goveda (prema engl. *Fetal Bovine Serum,* FBS). Stanice su adherentnog tipa što znači da rastu pričvršćene za dno Petrijevke sve dok ne ispune dostupnu površinu, iscrpe hranjive sastojke ili prestanu rasti zbog nakupljenih toksičnih metabolita.

3.2.2. Održavanje stanica

Prije nego stanice prerastu dostupnu površinu za rast ili iscrpe dostupne hranjive sastojke, presađuju se u novu Petrijevku. Uklanja se medij, ispiru se dva puta s 1 mL prethodno zagrijanog PBS pufera (na 37 ˚C) te se dodaje 1 mL tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge za rast. Nakon što se stanice odvoje od podloge dodaje se 9 mL medija (zagrijanog na 37 ˚C) kako bi se inhibiralo djelovanje tripsina (serum je inhibitor tripsina). Dobiva se ukupni volumen od 10 mL suspenzije stanica koji se raspoređuje na željeni broj Petrijevki promjera 10 cm u koje se potom, ovisno o volumenu suspenzije stanica, dodaje medij do ukupnog volumena od 10 mL. Petrijevke se čuvaju u inkubatoru za uzgoj kulture stanica.

3.2.3. Odmrzavanje i zamrzavanje stanica

Stanice su pohranjene u zamrznutom obliku u ampulama u spremniku s tekućim dušikom. Odmrzavaju se tako da se ampula uroni u vodenu kupelj zagrijanu na 37 ˚C nakon čega se sadržaj resuspendira u finalno 10 mL medija i prebacuje u Petrijevku promjera 10 cm koja se čuva u inkubatoru za uzgoj kulture stanica. Stanice se pohranjuju tako da se tripsiniziraju s 400 µL tripsina uz dodatak 1,6 mL medija do konačnog volumena od 2 mL. Slijedi centrifuga od 1100 x *g* 10 minuta nakon koje se dodaje 1 mL medija s dodanih 5 % DMSO. Označava se format iz kojeg su pohranjene, datum i pasaža, kratko se inkubiraju u ledenom bloku (oko 30 min), a zatim se premještaju prvo u prsten tekućeg dušika (1 dan kako bi se uzorci smrznuli u parama tekućeg dušika), te finalno u spremnik s tekućim dušikom.

3.2.4. Transfekcija stanica i izdvajanje stabilno transficiranih stanica

Transfekcija je metoda unosa strane DNA u stanice eukariota. Najčešće korišteni oblici transfekcije koriste kalcijev fosfat ili lipofektamin (liposom). Stanice se prvo rasađuju u pločicu s 6 bunarića (volumen 2 mL) tako da u trenutku transfekcije broj stanica po bunariću bude $3 \cdot 10^5$. Za samu transfekciju je potrebno pripremiti reakcijsku smjesu A koju čine otopina plazmidne DNA i Optimema te reakcijsku smjesu B koju čini otopina lipofektamina i Optimema. Primjer proračuna za pripremu reakcijskih smjesa prikazan je u tablici 5. Reakcijske smjese A i B se pomiješaju, inkubiraju 5 minuta pri sobnoj temperaturi, a potom se 500 µL dobivene smjese nakapava na stanice koje sadrže 1 mL svježeg medija. Slijedi inkubacija u inkubatoru za uzgoj kulture stanica od 2 – 3 dana do trenutka kada su, prema empirijskoj procjeni, stanice spremne za rasađivanje u veći volumen, to jest, Petrijevku promjera 10 cm.

Tablica 5. Primjer proračuna za pripremu reakcijskih smjesa za transfekciju stanica

Reakcijska smjesa	**Komponente**	**Količina**
Reakcijska smjesa A, 250 µL	sh(CAV-1) plazmidna DNA, konc. 317 ng μl^{-1}	7,88 µL
	Optimem	242,12 µL
Reakcijska smjesa B, 250 µL	Lipofektamin	8 µL
	Optimem	242 µL
Ukupna reakcijska smjesa	A + B	500 µL

Plazmidni vektori obično sadrže gen za rezistenciju na neki antibiotik. To je selekcijski marker prema kojemu je moguće izdvojiti klonove stanica u koje je stabilno ugrađen plazmidni vektor koji će im prilikom uzgoja s prikladnim antibiotikom omogućiti normalan rast, dok će svi ostali transfektanti odumrijeti. U ovom je eksperimentu korišten geneticin, G418, aminoglikozidni anbitibotik koji je topiv u vodi te blokira sintezu proteina u fazi elongacije i u prokariotskim i u eukariotskim stanicama. Plazmid sh(CAV-1) ima gen za rezistenciju na geneticin. Geneticin je dodan u medij u koncentraciji od 800 µg mL^{-1} i takav medij koristi se kao medij za uzgoj stanica nakon transfekcije. Medij se mijenja u redovnim intervalima (svaka 2-3 dana) do pojave prvih kolonija stanica. Svaka od tih kolonija se zagrebe vrškom nastavka za pipetu i prenosi u pločicu s 96 bunarića (MW96) uz prethodno dodano 200 µL svježeg medija s antibiotikom. Na

taj se način dobiva određena populacija transfektanata s različitom uspješnošću transfekcije koja će biti analizirana u svrhu identifikacije najboljih transfektanata. Stanice se, kad prerastu dostupnu površinu, rasađuju u sve veći format (iz MW96 u MW24, pa u MW6) sve do konačnog formata koji će omogućiti dovoljan broj stanica za analizu.

3.2.5. Razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE

SDS-PAGE elektroforeza metoda se koristi za razdvajanje proteina u električnom polju. Natrijev dodecil-sulfat (SDS) je anionski detergent koji će, nakon vezanja na proteine, akumulirati na njima negativan naboj te na taj način ujednačiti populaciju proteina s obzirom na omjer naboja i mase (proteini će vezati količine SDS-a proporcionalno njihovoj relativnoj molekulskoj masi) čime se razdvajanje proteina bazira isključivo na razlici u masi.

Uzorci za analizu se pripreme tako da se stanice nasade u format od 6 bunarića, $5 \cdot 10^5$ stanica po bunariću, i inkubiraju preko noći u inkubatoru za uzgoj kulture stanica. Stanice se idući dan odvoje od podloge i centrifugiraju pri 1100 x *g* 10 minuta. Supernatant, kojeg čini medij, se ukloni tako da ostane samo talog stanica. Na talog stanica direktno se dodaje 200 µL 1x razrjeđenog vrućeg SB pufera (zagrijanog na 96 ˚C). SB pufer čuva se kao *stock* koji je 6x koncentriran u miliqH_2O.

Kako bi uzorak bio homogen te kako bi se razbile molekule DNA koje čine uzorak viskoznim, potrebno ga je sonificirati. Sondu je potrebno obrisati alkoholom, namjestiti amplitudu na 30 Hz, a uzorke prethodno zagrijati na 96 ˚C. Uzorci se sonificiraju u intervalima od 3 puta po 5 sekundi. Između tih intervala hlade se 5 sekundi na ledenom bloku. Između svakog uzorka sonda se briše alkoholom. Uzorci se nakon sonifikacije ponovno zagriju na 96 ˚C i tada su spremni za nanošenje na gel.

Proteini iz uzorka razdvajaju se diskontinuiranom elektroforezom korištenjem dva gela: gela za sabijanje i gela za razdvajanje, puferiranih pri različitim pH. Sastav gela za razdvajanje proteina (ukupni volumen 10 mL) prikazan je u tablici 6.

Ovako pripremljen gel izlije se u kalup te se ravnomjerno nadsvodi vodom ili etanolom. Gel se ostavlja kako bi polimerizirao tijekom jednog sata, a nakon polimerizacije, izlijeva se gel za sabijanje proteina. Sastav gela za sabijanje proteina (ukupni volumen 3 mL) je prikazan u tablici 6. Nakon izlijevanja u gel za sabijanje se uroni češljić te ostavi da polimerizira tijekom jednog sata.

Tablica 6. Priprema gelova za diskontinuiranu SDS-PAGE elektroforezu

Komponente	**Količina**	
	Gel za razdvajanje, pH 6,8	**Gel za sabijanje, pH 8,8**
diH_2O	4 mL	2,1 mL
AA/Bis (30 % otopina AA)	3,3 mL	0,5 mL
Tris-HCl, pH 6,8	2,5 mL	-
Tris-HCl, pH 8,8	-	0,38 mL
SDS (10 % w/v)	0,1 mL	0,03 mL
APS (10 % w/v)	0,1 mL	0,03 mL
TEMED	0,006 mL	0,003 mL
Ukupno	~ 10 mL	3 mL

Nakon završetka polimerizacije, češljić se izvadi iz gornjeg gela te se složi aparatura za elektroforezu. Elektroforetski pufer ulijeva se u kadicu sustava za elektroforezu nakon čega se stavlja kalup s gelovima. U prostor između gelova ulijeva se pufer do vrha. Uzorci prije nanošenja moraju biti zagrijani na 96 ˚C. Nanosi se 25 µL uzorka te u jednu jažicu 1,5 µL standarda za određivanje molekulske mase proteina dok se u prazne jažice dodaje 25 µL 1x razrjeđenog SB pufera. Elektroforeza se provodi u početku pri 80 V, a kasnije na 100 V otprilike 1 sat i 30 min do 2 sata i 30 minuta. Nakon provedene elektroforeze, slijedi Western blot, odnosno, transfer proteina iz gela na membranu.

3.2.6. Western blot

Western blot je analitička metoda za detekciju i analizu proteina kojom se omogućava identifikacija ciljanog proteina u smjesi proteina temeljem vezanja specifičnog antitijela na protein od interesa.

Nakon završetka SDS-PAGE elektroforeze, slijedi priprema Western „sendviča“ kojeg čine gel, nitrocelulozna membrana te *Whatman* papiri i spužvice oko njih ukalupljeni u okviru s rupama. Električni transfer odvija se pri 400 mA tokom 90 minuta pri čemu se proteini s gela prenose na nitroceluloznu membranu. Nakon provedenog transfera, membrana se prvo ispire u TBST puferu 5 minuta i boji u Amidocrno otopini za bojenje 1 minutu. Membrana se potom odbojava

ispiranjem 3 puta po 2 minute u otopini za ispiranje. Potrebno je ispirati tako dugo dok se ne vizualiziraju vrpce proteina. Nakon toga slijedi 30 minuta ispiranja u TBST puferu te sat vremena blokiranja membrane u 5 % otopini mlijeka u prahu u puferu TBST čime se sprečava nespecifično vezanje protutijela na membranu. Nakon blokiranja membrana se preko noći na +4 ˚C inkubira s primarnim protutijelom koje se razrjeđuje u 5% otopini mlijeka u prahu u puferu TBST.

Nakon inkubacije s primarnim protutijelom membrana se ispire 30 minuta u TBST puferu (jednom kratko ispiranje, jednom ispiranje od 10 minuta na tresilici, te tri puta po 5 minuta na tresilici), nakon čega slijedi inkubacija sa sekundarnim protutijelom. Sekundarno protutijelo priprema se u 5 % -tnoj otopini mlijeka u prahu u TBST, dodaje se na membranu i inkubira 2 sata. Ponovno slijedi ispiranje u TBST puferu u trajanju od 30 minuta.

Sekundarno protutijelo ima vezan enzim peroksidazu dobivenu iz hrena. Ona će omogućiti vizualizaciju proteina koja je bazirana na kemiluminiscenciji. Nakon ispiranja, membrana se prenosi na foliju i blago osuši papirom. Folija s membranom prenosi se na uređaj za snimanje membrana (u ovom slučaju Uvitec) gdje se nakapava prethodno pripremljena otopina detekcijskog reagensa inkubirana 1 minutu u mraku (reagens čini luminol supstrat i vodikov peroksid). Peroksidaza vezana na sekundarno protutijelo će provesti katalizu luminola čime nastaje signal kojeg će uređaj očitati i na temelju takvih signala detektirati željeni protein.

3.2.7. Umnažanje i pročišćavanje adenovirusa centrifugiranjem u cezijevom kloridu

Kako bi se umnožili replikacijski defektni adenovirusi, potrebno je koristiti komplementirajuće stanice koje će omogućiti njihovu replikaciju. To su, u ovom slučaju, HEK-293a stanice koje u svom genomu imaju stabilno ugrađeno E1 područje adenovirusnog genoma kojim će komplementirati defekt adenovirusa. Za svaku preparaciju virusa HEK-293a stanice pripremaju se u znatnim količinama (do 120 Petrijevki promjera 10 cm) te se inficiraju suspenzijom virusa tako da multiplicitet infekcije bude 5 – 10 infektivnih virusa po stanici. Inficirane stanice stavljaju se u inkubator za uzgoj stanica dok se ne postigne potpuni citopageni efekt koji obično slijedi 48 do 72 sata nakon infekcije. Infekcija je praćena vizualno na EVOS *Cell Imaging* sustavu.

Kada se uoči citopatogeni efekt, stanice se odvajaju od podloge pipetiranjem s pipetom koja sadrži filter i zbirno skupljaju u *Falcon* epruvetu. Slijedi centrifuga na 1100 x *g* 10 minuta. Ukupni talog stanica resuspendira se u 10 mL medija nakon čega se tri puta smrzava (na -20

˚C) i odmrzava (37 ˚C) kako bi se virusi oslobodili iz stanice. Centrifugiranjem pri 3600 x *g* 10 minuta dobiva se talog kojeg čine stanični fragmenti i supernatant u kojem su sadržane virusne čestice. Virusne čestice iz supernatanta pročišćavaju se ultracentrifugiranjem u dva koraka. Prvi korak je pročišćavanje na jastučiću CsCl. U epruvetu za centrifugiranje dodaje se 2,4 mL CsCl gustoće 1,4 g mL^{-1}. Na njega se, u kapima, nadslojava 2,4 mL CsCl gustoće 1,25 g mL^{-1} tako da se ni u jednom momentu ta dva sloja ne pomiješaju. Na nadslojene otopine cezijeva klorida dodaje se supernatant lizata stanica s oslobođenim virusnim česticama na kojeg se do vrha dodaje medij. Slijedi ultracentrifugiranje u Beckman ultracentrifugi tijekom 1 sata i 45 minuta na 20 ˚C i 60 000 x g. Rezultat ultracentrifugiranja je bijela zona ukoncentriranih adenovirusnih čestica koja se nalazi na granici dva sloja cezijeva klorida. Iznad prve zone nalazi se nešto manje intenzivna druga bijela zona koju čine prazne virusne kapside zajedno s nečistoćama. Sloj funkcionalnih virusnih čestica pažljivo se sakuplja špricom s iglom u što manjem volumenu, idealno do 1,5 mL. Drugi korak pročišćavanja odvija se ultracentrifugiranjem u gradijentu cezijeva klorida. Dobiveni volumen suspenzije virusnih čestica pomiješa se u novoj epruveti za ultracentrifugiranje s dodanim CsCl gustoće 1,34 g mL^{-1} do vrha epruvete. Takav uzorak centrifugira se u Beckman ultracentrifugi preko noći (otprilike 16 do 20 sati) pri 20 ˚C i 60 000 x *g*. Virusne čestice će tijekom ultracentrifugiranja prolaziti kroz gradijent cezijeva klorida i zaustaviti se u dijelu epruvete u kojoj je gustoća CsCl jednaka gustoći virusnih čestica. Dobiva se oštar bijeli sloj virusnih čestica koji se skuplja špricom s iglom u što manjem volumenu iz kojeg je potrebno ukloniti cezijev klorid za što se koristi gel-filtracija pomoću kolone Sephadex-G25M (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Kolona se pričvrsti na stalak, odreže joj se vrh i potom se odčepi s gornje strane kako bi tekućina u kojoj je prezervirana iscurila. Kolona se šest puta ispire s po 5 mL PBS pufera nakon čega se na kolonu dodaje pročišćeni virus (do 1 mL uzorka). Sakuplja se prvi eluat koji se obilježava kao frakcija 0. U intervalima se dodaje po 0,5 mL pufera PBS na kolonu uz istovremeno sakupljanje frakcija u mikroepruvete. Frakcije u kojima se nalazi virus se skupe te se doda glicerol do 10 % konačnog volumena. Dobivena suspenzija virusa se alikvotira i smrzava pri -80 ˚C.

3.2.8. Određivanje koncentracije virusnih čestica u suspenziji pročišćenih virusa

Koncentracija virusnih čestica određuje se metodom koju su opisali Mittereder i suradnici 1996. godine. Suspenzija pročišćenih virusa prvo se 3x razrijedi u PBS puferu i 0,1 % natrij dodecil-sulfata (SDS) te se inkubira 10 min pri 56 ˚C što će izazvati oslobađanje viralne DNA iz čestica. Mikroepruvete se kratko centrifugiraju (30-tak sekundi) pri 10 000 x *g* te se potom mjeri

apsorbancija pri 260 nm prema puferu koji je korišten za razrjeđivanje virusa, a koncentracija virusnih čestica računa se po navedenoj formuli.

$$N = A_{260} \cdot r \cdot 1{,}1 \cdot 10^{12}\ [\text{pp mL}^{-1}]$$

gdje je N broj virusnih čestica u mL, A_{260} izmjerena apsorbancija pri 260 nm,

r razrjeđenje suspenzije adenovirusa

Primjer proračuna:

$$A_{260} = 0{,}358$$

$$N = 0{,}358 \cdot 1{,}1 \cdot 3 \cdot 10^{12}\ [\text{pp mL}^{-1}] = 1{,}1814 \cdot 10^{12}\ \text{pp mL}^{-1}$$

3.2.9. Fluorescentno obilježavanje adenovirusa

Za fluorescentno obilježavanje adenovirusa koristi se boja Alexa Fluor 488 5-TFP koja se veže na primarne amine proteina. Alexa Fluor 488 5-TFP dodaje se u 20 puta molarnom suvišku u odnosu na količinu adenovirusa. Obilježavanje adenovirusa odvija se u 100 mM natrij bikarbonatnom puferu uz prisustvo 10 % glicerola. Primjer reakcijske smjese prikazan je u Tablici 7. Reakcijska smjesa inkubirana je 75 minuta pri sobnoj temperaturi u mraku. Ostatak boje koji se nije vezao na adenoviruse uklonjen je korištenjem Zeba Spin desalinizirajuće kolone prema uputama proizvođača. Nakon obilježavanja mjeri se koncentracija obilježenih virusnih čestica.

Tablica 7. Primjer reakcijske smjese za obilježavanje virusa

Komponenta	**Količina, u µL**
Alexa Flour 488 boja 10 µg µL^{-1}	5,29
Suspenzija virusnih čestica 10^{11} pp ukupno	100
100 mM natrij bikarbonatni pufer	394,71

3.2.10. Određivanje uspješnosti transdukcije adenovirusom

Uspješnost transdukcije adenovirusima određivana je u A549 stanicama i stabilnim transfektanatima sa smanjenom ekspresijom kaveolina-1. U pločicu s 12 bunarića nasadi se $5 \cdot 10^4$ stanica po bunariću. Idući dan stanice se prvo broje kako bi se odredila točna količina stanica pojedinog uzorka. Korištena su tri adenoviralna razrjeđenja virusa Ad5, Ad26 i Ad35. MOI vrijednosti (engl. *multiplicity of infection*) navedene su u Tablici 8. Prema MOI vrijednosti i koncentraciji virusne preparacije (*N*) određuje se koji je točno volumen virusnog razrjeđenja potreban za infekciju stanica. Dodaje se medij do konačnog volumena od 500 µL po uzorku. Slijedi inkubacija 2 sata nakon čega se virusno razrjeđenje makne, a doda 1 mL svježeg medija. Nakon 48 sati inkubacije u inkubatoru za uzgoj kulture stanica, uspješnost transdukcije određuje se protočnim citometrom. Ad korišteni u ovom radu kao gen dojavljivač imaju ugrađen gen koji kodira zeleni fluorescentni protein na osnovu čije ekspresije se protočnom citometrijom može odrediti postotak transduciranih stanica.

Tablica 8. MOI vrijednosti korištenih adenovirusa

Serotip virusa	**MOI vrijednost [pp stanica^{-1}]**
Ad5	$1 \cdot 10^3$
Ad26	$1 \cdot 10^4$
Ad35	$1 \cdot 10^3$

Stanice se za analizu uspješnosti transdukcije protočnom citometrijom pripremaju tako da se prvo tripsiniziraju (dva puta ispiranje s 400 µL PBS-a, 350 µL tripsina pa 1,4 mL PBS-a do konačnog volumena). Cijeli volumen prenosi se u mikroepruvetu od 2 mL. Slijedi centrifuga pri 1100 x *g* 10 minuta. Supernatant se baca, a stanice ostaju kao talog. Kako bi se stanice fiksirale dodaje se 100 µL 1 % -tnog PFA i inkubira 10 minuta. Na taj se volumen dodaje 600 µL PBS-a i opet slijedi centrifuga. Ispiranje s PBS-om ponavlja se dva puta. Na kraju se dodaje 250 µL PBS-a i takav je uzorak spreman za analizu. Potrebno je omotati ga folijom i držati u mraku zbog fluorescentnog proteina kojim je virus obilježen.

3.2.11. Analiza površinskih receptora stanica protočnom citometrijom

Protočna citometrija (engl. *flow cytometry*) je metoda kojom se mogu analizirati različite molekule u stanici ako one same fluoresciraju ili ih se prethodno obilježi fluorescencijskom bojom. Omogućuje istovremenu multiparametarsku analizu pojedinačne stanice ili čestica koje

prolaze pored optičkog i/ili elektroničkog detektora, u tekućini, pomoću snopa laserske svjetlosti. Obilježavanje staničnih proteina može biti izravno ili neizravno. Kod izravnog obilježavanja protutijelo na određeni protein je vezano za flourokrom, dok je kod neizravnog obilježavanja karakteristično prvo vezanje neobilježenog protutijela 1 za specifični protein, koje slijedi vezanje fluorokromom obilježenog protutijela 2 koje prepoznaje protutijelo 1.

Metoda neizravne protočne citometrije korištena je za određivanje ekspresije adenovirusnih receptora na površini stanica. Uzgojene stanice prvo je potrebno odvojiti od podloge i isprati jednom u PBS-u uz centrifugu pri 1200 x *g* 5 minuta. Talog stanica resuspendira se u 5 mL PBS-a. Od toga se uzme 200 µL za određivanje koncentracije stanica na brojaču stanica. U pojedinu epruvetu potrebno je dodati volumen stanične suspenzije tako da broj stanica u njoj bude $5 \cdot 10^5$. Stanice su centrifugirane pri 1200 x *g* 5 minuta. Supernatant je uklonjen i dodaje se 50 µL razrjeđenja primarnog protutijela (5 µL protutijela u 45 µL PBS-a) te se inkubira sat vremena. Potom se stanice ispiru dva puta s 500 µL hladnog PBS-a. Dodaje se 50 µL razrjeđenja sekundarnog protutijela. Slijedi inkubacija u mraku sat vremena te se od ovog trenutka nadalje uzorci moraju držati u mraku. Nakon inkubacije, stanice se ispiru dva puta s 500 µL hladnog PBS-a. Konačno, stanice se resuspendiraju u 250 µL hladnog PBS-a i analiziraju na protočnom citometru.

U ovom je eksperimentu bitna niska temperatura rada kako bi se inhibirao aktivni transport molekula kroz staničnu membranu. Antigen specifična protutijela dodaju se u volumenu od 1 µL (anti-CAR, sekundarno, IgG), odnosno, 0,5 µL po uzorku (anti-CD45, anti-$\alpha_v\beta_3$, anti-$\alpha_v\beta_5$).

3.2.12. Internalizacija fluorescentno obilježenih adenovirusa praćena konfokalnom mikroskopijom

Konfokalna laserska pretražna mikroskopija (*confocal laser scanning microscopy*) metoda je svjetlosne mikroskopije pomoću koje je moguće detektirati svjetlost emitiranu iz vrlo tankog sloja u uzorku. U ovoj tehnici, uzorak se osvjetljava točku po točku, a emitirana ili reflektirana svjetlost se detektira i tvori sliku u memoriji digitalnog računala. Glavna prednost konfokalne mikroskopije, u usporedbi s klasičnom svjetlosnom mikroskopijom, je mogućnost optičkog seciranja, tj. dobivanja oštre slike tankog sloja pri snimanju debelog uzorka.

Za analizu stanica konfokalnim mikroskopom stanice se nasađuju na staklaca i to $3 \cdot 10^4$ stanica po stakalcu prethodno smještenom u bunarić pločice sa 24 bunarića (MW24). Nakon 48 sati, određena je koncentracija stanica u jednom bunariću i određen volumen virusa koji se dodaje

po pojedinom uzorku kako bi MOI za Ad5 i Ad35 bio $5 \cdot 10^3$, a za Ad26 $3 \cdot 10^4$. Na stakalce se dodaje 300 µL virusnog razrjeđenja u mediju ohlađenog na ledu. Pločica sa stanicama prvo se inkubira 30 minuta na ledu, a potom 60 minuta pri 37 ˚C. Inkubacijom stanica i virusa na ledu se postiže uniformno započinjanje ulaska adenovirusa u stanicu za sve promatrane uzorke. Nakon inkubacije, slijedi ispiranje dva puta s PBS-om. Stakalca se potom premještaju u nove pločice i slijedi fiksacija stanica dodatkom 100 µL 1 % -tnog PFA tijekom 12 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon fiksacije, stanice se ponovno ispiru dva puta s PBS-om. Fluorescencija virusnih čestica koje su ostale na stakalcu ili nisu ušle u stanicu uklanja se inkubacijom stakalaca u amonijevom kloridu (25 mM u PBS-u) tijekom 10 minuta nakon čega slijedi ispiranje dva puta s PBS-om. Sljedeći korak je inkubacija stakalaca u 0,1 % Triton-X-100 u PBS-u pri sobnoj temperaturi 2 minute. Nakon ispiranja dva puta s PBS-om dodaje se 70 µL faloidina (1:50 razrjeđenje) tijekom 15 minuta pri sobnoj temperaturi. Slijedi ponovno ispiranje dva puta s PBS-om. Na kraju se stakalca uklapaju u medij za uklapanje s DAPI bojom. Stakalca se suše 10 minuta i uzorak je spreman za analizu.

Prilikom analize, na stakalca se dodaje imerzno ulje i slijedi mikroskopiranje. Mikroskopiranje je provedeno uz rezoluciju 1024 x 1024, povećanje objektiva 63x i digitalni zoom 1,3x. Ekscitaciju izazivaju redom DAPI (405 nm), Alexa Fluor (488 nm) i faloidin (555 nm). To su boje koje omogućavaju vizualizaciju dvostruke DNA - DAPI (jezgra), aktina - faloidin (stanični citoskelet) te virusa koji je obilježen Alexom 488. Na temelju mikroskopskih slika, programski je u ImageJ izbrojena količina virusnih čestica u pojedinoj stanici na uzorku od 20-ak stanica te je izrađen pripadajući graf uz primjenu student t-testa za statističku analizu značajnosti.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada bio je izdvojiti i okarakterizirati A549 stanice sa stabilno utišanom ekspresijom kaveolina-1, ispitati kakav utjecaj utišavanje kaveolina ima na transdukciju adenovirusima tipa 5, 26 i 35 te na temelju toga definirati ima li kaveolin-1, i u kojoj mjeri, ulogu u endocitozi navedena tri tipa adenovirusa. Dobiveni rezultati uspoređeni su s literaturnim podacima, odnosno, dosadašnjim saznanjima o ulasku adenovirusa u stanicu. Kao model odabrana je stanična linija A549 u kojoj je transfekcijom plazmidom, koji kodira za specifičnu *short hairpin* RNA, smanjena ekspresija kaveolina-1. Nakon što se funkcionalnost plazmida koji kodira za sh(CAV1) provjerila prolaznom transfekcijom A549 stanica, izdvojena su tri stabilno transfecirana klona A549 stanica sa smanjenom ekspresijom kaveolina-1 u odnosu na roditeljske stanice. Uspješnost utišavanja provjerena je Western blot analizom. Adenovirusi su umnoženi u HEK293a stanicama i pročišćeni na jastučiću i gradijentu CsCl te im je određena koncentracija. Nakon pročišćavanja, adenovirusi su fluorescentno obilježeni vezanjem Alexa Fluor 488 boje na površinu kapside virusa. Na roditeljskim stanicama A549 i izdvojenim klonovima sa smanjenom ekspresijom kaveolina-1 određena je uspješnost transdukcije Ad5, Ad26 i Ad35. Uspješnost transdukcije određena je protočnom citometrijom. Na površini roditeljskih stanica A549 i izdvojenih klonova sa smanjenom ekspresijom kaveolina-1 također je određena ekspresija poznatih adenovirusnih receptora. Ekspresija poznatih adenovirusnih receptora mjerena je protočnom citometrijom. Internalizacija fluorescentno obilježenih Ad5, Ad26 i Ad35 u A549 stanicama i odabranom klonu s najviše utišanom ekspresijom kaveolina-1 praćena je konfokalnom mikroskopijom.

U radu je istraživan značaj endocitoze posredovane kaveolama u internalizaciji Ad5, Ad26 i Ad35. Kaveolin-1 glavni je protein ovog tipa endocitoze stoga je utišan u A549 stanicama kao modelnom sustavu eksperimenata. Nakon ispitivanja uspješnosti transdukcije adenovirusa, pokazano je da se smanjena razina kaveolina-1 najviše odražava na Ad5 čija uspješnost transdukcije znatno pada dok utjecaj na Ad26 i Ad35 nije značajan. Analiza adenoviralnih receptora protočnom citometrijom pokazala je značajno smanjenje površinske ekspresije receptora CAR, CD46 i koreceptora $\alpha_v\beta_5$ integrina, dok je razina ekpresije $\alpha_v\beta_3$ integrina porasla. Ispitivanje internalizacije adenovirusa u klonu s najmanjom razinom kaveolina potvrdilo je rezultate ispitivanja uspješnosti transdukcije te promijenjene ekspresije adenoviralnih receptora. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju ukazuju da bi endocitoza posredovana kaveolama, odnosno, kaveolin-1 mogli imati značajniju ulogu u internalizaciji adenovirusa nego što se u to dosadašnjoj literaturi pretpostavlja.

4.1. IZDVAJANJE KLONOVA A549 STANICA SA SMANJENOM EKSPRESIJOM KAVEOLINA-1 NAKON STABILNE TRANSFEKCIJE PLAZMIDOM KOJI SADRŽI shRNA ZA KAVEOLIN-1

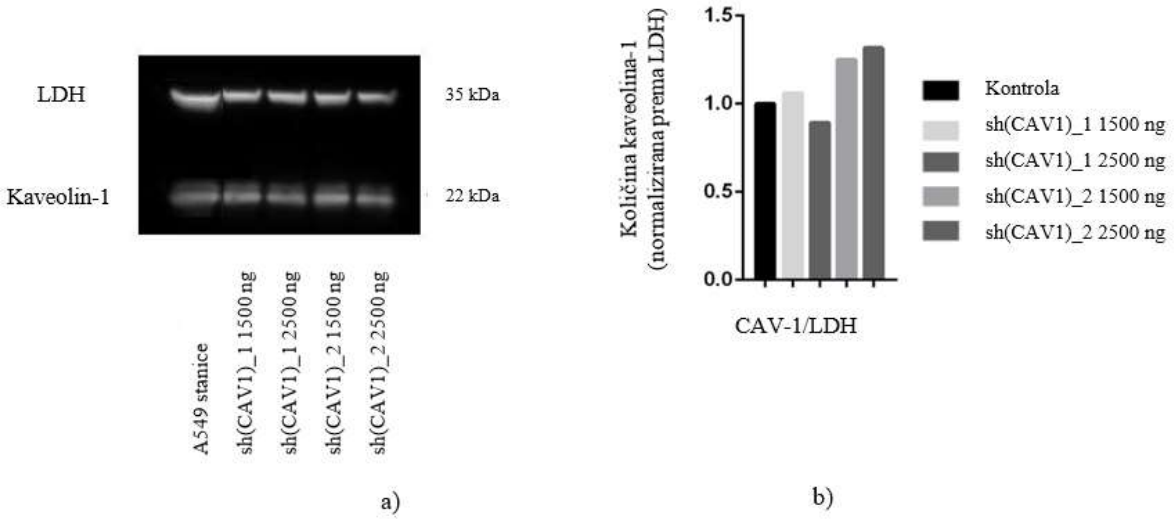
Adenovirusi za ulazak u stanicu koriste endocitozu pri čemu se klatrinom posredovana endocitoza smatra glavnim putem internalizacije adenovirusa. Osim klatrinom posredovane endocitoze, endocitoza putem kaveola važna je za ulazak nekih virusa. Do sad nije poznato koja je uloga kaveola u uspješnosti transdukcije Ad5, Ad26 i Ad35. Kaveolin-1 je transmembranski protein koji oblikuje kaveolu i omogućuje nastanak endosoma odvajanjem od stanične membrane (Richter i sur., 2008).

Da bi se ispitala uloga kaveolina-1 u uspješnosti transdukcije Ad5, Ad26 i Ad35 izdvojeni su klonovi A549 stanica sa smanjenom ekspresijom kaveolina-1. Prije izdvajanja stabilno transficiranih klonova bilo je potrebno provesti prolaznu transfekciju u svrhu provjere funkcionalnosti plazmida koji kodira za shRNA kaveolina-1. U ovom radu korištena su dva plazmida koji kodiraju za shRNA molekulu koja će interferirati s mRNA molekulom koja nosi informaciju za sintezu kaveolina-1, sh(CAV1)_1 i sh(CAV1)_2. Korišteni plazmidi dobiveni su od dr. sc. Yong Keun Jung (opisano u Nah i sur., 2013). S obzirom da je prolazna transfekcija korištena i s ciljem utvrđivanja koncentracije plazmida koja će se koristiti za stabilnu transfekciju, A549 stanice su transficirane s dvije količine plazmida: 1500 ng i 2500 ng.

Uspješnost utišavanja provjerena je Western blot analizom. Osim detekcije specifične vrpce kaveolina-1 veličine 22 kDa, detektirala se i vrpca specifična za laktat-dehidrogenazu (LDH) veličine 35 kDa koja je korištena kao standard za normalizaciju količine proteina kaveolina-1. Protein LDH je citoplazmatski enzim čija ekspresija nije ovisna o količini kaveolina-1 te je zbog toga odabran kao standard s pretpostavkom da smanjenje ekspresije kaveolina-1 neće promijeniti količinu LDH. Kao što je vidljivo na slici 7 intenzitet vrpci LDH jednak je u svim promatranim uzorcima što potvrđuje da je na SDS gel nanesena ista količina proteina u svim promatranim uvjetima.

Iz slike 7 je vidljivo da vrpce koje odgovaraju kaveolinu-1 za različite uzorke pokazuju razliku u intenzitetu, iako ona nije toliko značajna. Na osnovu denzitometrije vrpci specifičnih za kaveolin-1 može se zaključiti da transfekcija s 2500 ng plazmida sh(CAV1)_1 smanjuje količinu proteina kaveolin-1 za 20 % u odnosu na netransficirane A549 stanice. Transfekcija plazmidom sh(CAV1)_2 nije smanjila ekspresiju kaveolina-1 nego je naprotiv povećala

količini kaveolina-1 u usporedbi s A549 stanicama. Temeljem dobivenih rezultata, za stabilnu transfekciju A549 stanica odabran je plazmid sh(CAV1)_1 (u nastavku teksta obilježen kao sh(CAV1)).

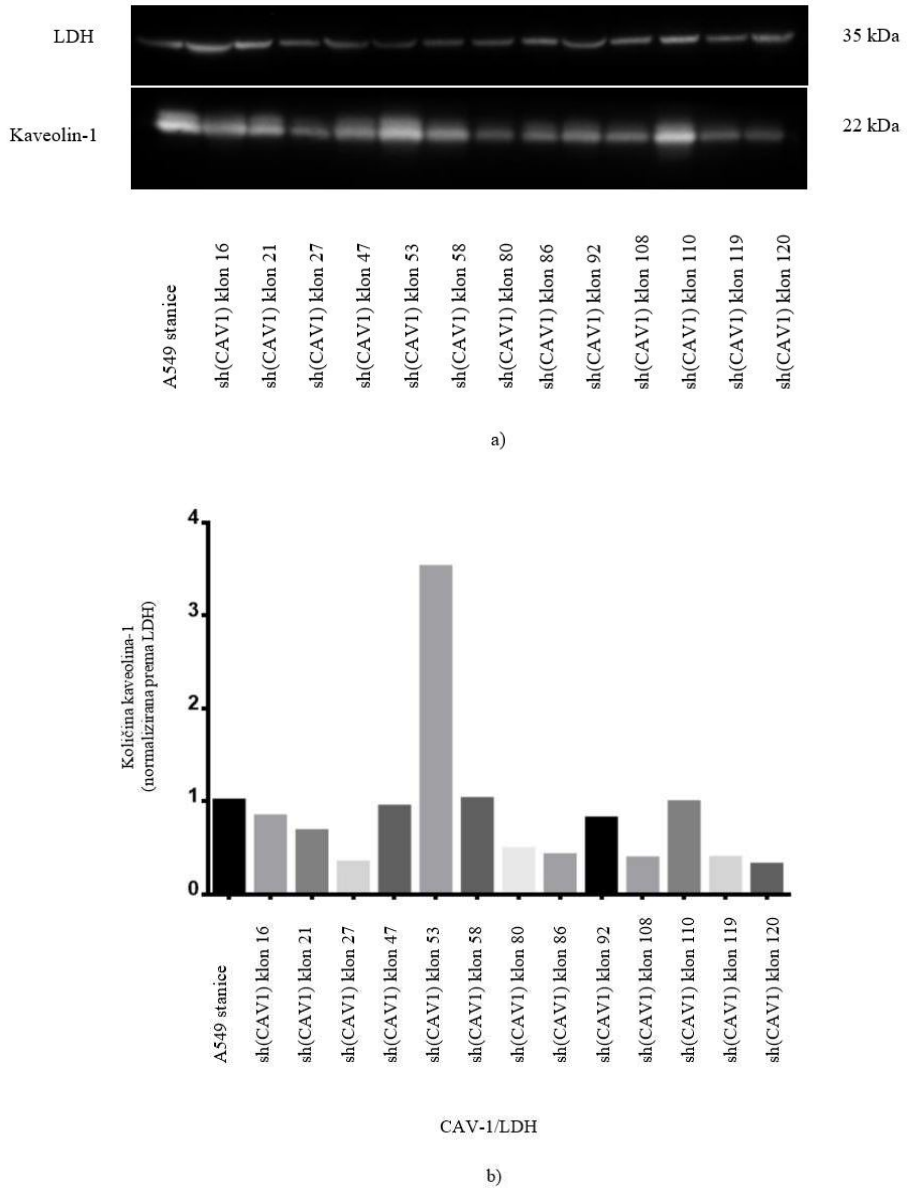


Slika 7. Ekspresija kaveolina-1 u A549 stanicama nakon prolazne transfekcije s različitom količinom plazmida sh(CAV1)_1 ili sh(CAV1)_2 koji sadrže *short hairpin* RNA za utišanje kaveolina-1. A549 stanice nasađene su u pločice sa 6 bunarića tako da u trenutku transfekcije bude $3 \cdot 10^5$ stanica po bunariću. Nakon 24 sata, stanice su transficirane plazmidima sh(CAV1)_1 ili sh(CAV1)_2. Četrdeset osam sati nakon transfekcije uzorci su prikupljeni metodom vrućeg pufera, a uspješnost utišavanja je provjerena Western blot analizom. Na slici 7.a) prikazane su specifične vrpce u transficiranim i netransficiranim stanicama za protein kaveolin-1 veličine 22 kDa i LDH veličine 35 kDa. Na slici 7.b) prikazane su vrijednosti za kaveolin-1 normalizirane prema proteinu LDH, a rezultati su prikazani relativno u odnosu na netransficirane A549 stanice.

Za razliku od prolazne transfekcije, stabilna transfekcija omogućava ekspresiju unesenog gena kroz dulji vremenski period. Stabilna transfekcija postiže se izlaganjem transficiranih stanica selektivnom pritisku prema markeru za koji kodira plazmid kojim su stanice transficirane. Najčešće korišteni selektivni markeri su antibiotici pri čemu plazmidi za transfekciju sadrže gen za rezistenciju na iste antibiotike. U ovom je radu korišten geneticin G148 u koncentraciji od 800 $\mu g\ mL^{-1}$ (koncentracija odabrana na temelju prethodnog iskustva) koji se dodaje u medij za uzgoj stanica.

U postupku stabilne transfekcije izdvojeno je 13 klonova koji su pokazali otpornost na G418 te je u njima određena ekspresija kaveolina-1. Količina kaveolina-1 u izdvojenim klonovima određena je kao i u slučaju prolazne transfekcije metodom Western blot, a kao protein za normalizaciju odabran je LDH. Kao što se može vidjeti na slici 8, 9 od 13 klonova (klonovi 16, 21, 27, 80, 86, 92, 108, 119, 120) pokazuje smanjenu ekspresiju kaveolina-1 u odnosu na kontrolne A549 stanice. Jedan klon (53) u usporedbi s A549 stanicama ima značajno povećanu ekspresiju kaveolina-1, dok 3 klona (klonovi 47, 58, 110) pokazuju ekspresiju kaveolina-1 vrlo sličnu onoj u kontrolnim stanicama.

Prilikom stabilne transfekcije plazmidna DNA se u genom domaćina ugrađuje nasumično u nepoznatom broju kopija. Stoga smo se za nastavak istraživanja odlučili izdvojiti tri stabilna transfektanta s različito smanjenom ekspresijom kaveolina-1 kako bi na temelju toga bili sigurni da će rezultati koje ćemo dobiti u nastavku istraživanja biti uistinu posljedica smanjene količine kaveolina-1. Metodom denzitometrije utvrđeno je da razine kaveolina-1 u klonovima 27, 86 i 120 predstavljaju samo 30 – 40 % u odnosu na razinu kaveolina-1 u kontrolnim stanicama što znači da je postignuto utišavanje od 60 do 70 % (Tablica 9). Upravo su klonovi 27, 86 i 120 odabrani za daljni rad.



Slika 8. Ekspresija kaveolina-1 u klonovima A549 stanica izdvojenim nakon stabilne transfekcije plazmidom sh(CAV1). A549 stanice nasađene su u pločice sa 6 bunarića tako da u trenutku transfekcije bude $3 \cdot 10^5$ stanica po bunariću te su transficirane plazmidom sh(CAV1). Selekcijom s G418 izdvojeni su stabilno transficirani klonovi kojima je ekspresija kaveolina-1 analizirana Western blotom. Na slici 8.a) prikazane su specifične vrpce za protein kaveolin-1 veličine 22 kDa i LDH veličine 35 kDa. Na slici 8.b) su prikazane vrijednosti za kaveolin-1 normalizirane prema proteinu LDH, a rezultati su prikazani relativno u odnosu na netransficirane A549 stanice.

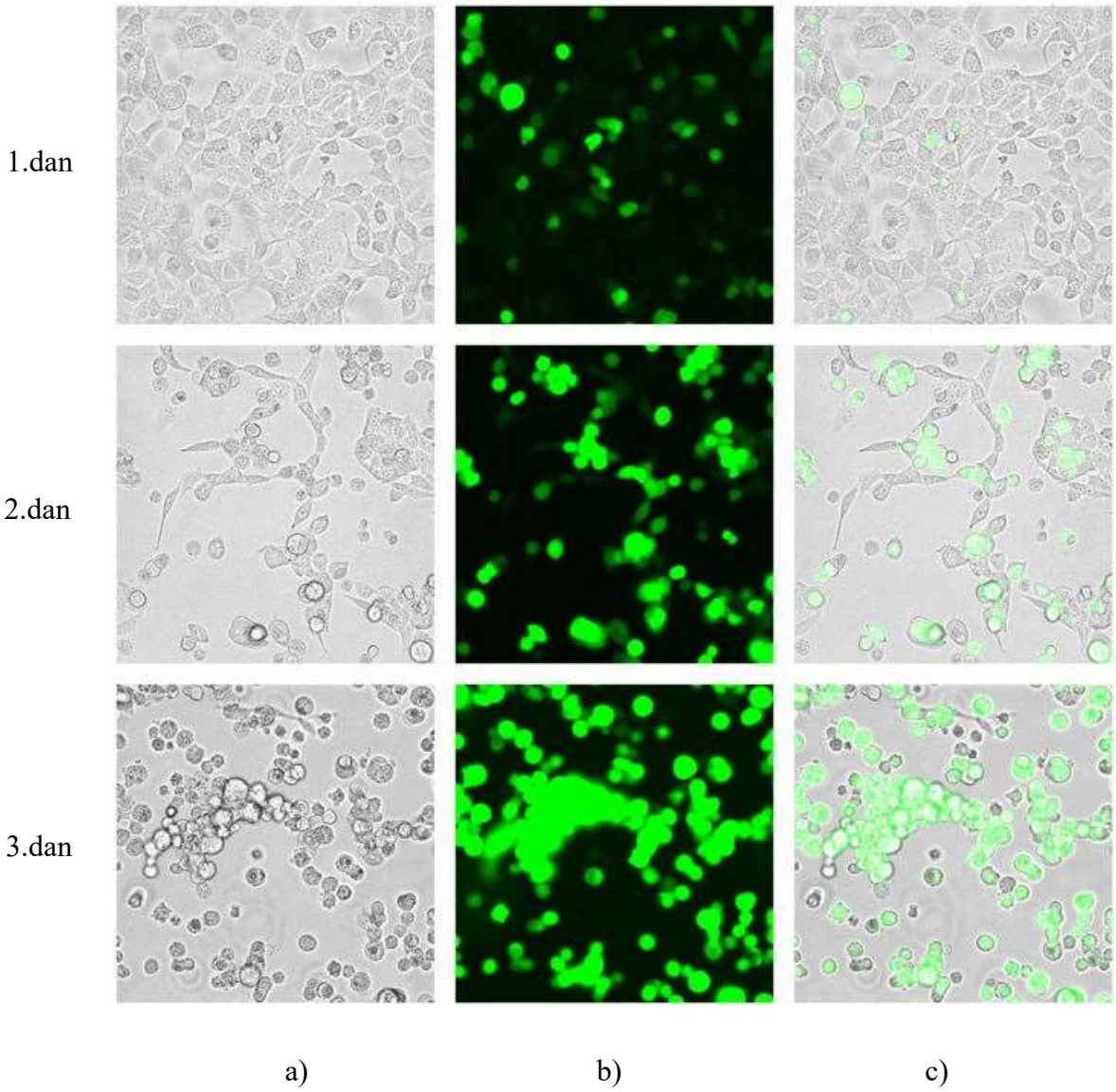
Tablica 9. Odabrani transfektanti s pripadajućim vrijednostima količine kaveolina-1 u usporedbi s A549 stanicama.

A549 transfektanti	Klon 27	Klon 86	Klon 120
Razina kaveolina u odnosu na kontrolne A549 stanice	33 %	41 %	30 %

4.2 UMNAŽANJE ADENOVIRUSNIH ČESTICA U HEK293a STANICAMA I PROČIŠĆAVANJE NA JASTUČIĆU I U GRADIJENTU CsCl

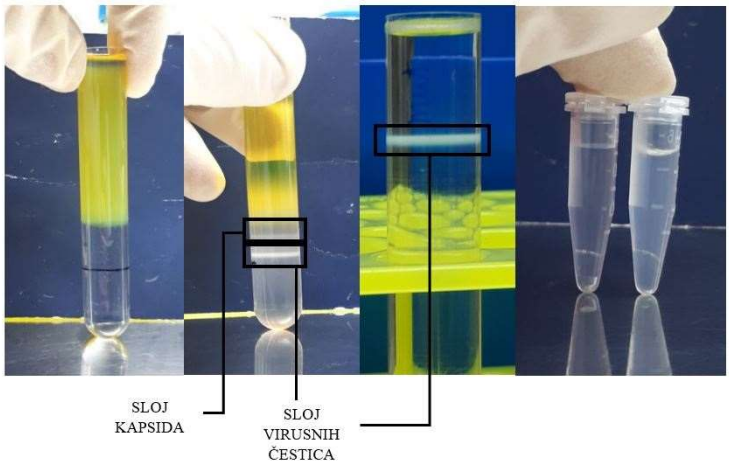
U ovom radu korišteni su prethodno konstruirani replikacijski defektni adenovirusni vektori Ad5, Ad26 i Ad35, koji kao gen dojavljivač imaju ugrađen gen koji kodira za zeleni fluorescentni protein (GFP, engl. *green fluorescent protein*). Adenovirusni vektori umnoženi su u komplementirajućim HEK293a stanicama koje u svom genomu imaju stabilno ugrađeno E1 područje adenovirusnog genoma te na taj način omogućavaju replikaciju Ad vektora.

Replikacijski defektni Ad vektori umnažani su do trenutka pojave citopatogenog učinka, odvajanja inficiranih stanica od podloge, nakon čega je skupljen talog stanica. Na slici 9 prikazane su inficirane stanice tijekom 3 dana infekcije. Intenzitet fluorescencije korelira s danima trajanja infekcije, odnosno, raste s vremenom te ukazuje na uspješnu replikaciju Ad i širenje infekcije u okolne stanice. Skupljeni talog stanica korišten je za pročišćavanje virusnih čestica.



Slika 9. Praćenje infekcije HEK293a stanica virusnim česticama pomoću EVOS *Cell Imaging* sustava kroz tri dana bijelom (a) i zelenom svjetlosti (b) te kombiniranim (c) prikazom. HEK293a stanice uzgajane su u Petrijevkama promjera 10 cm do 90 – 95 % konfluentnosti nakon čega su inficirane Ad. Infekcija je praćena do pojave potpunog citopatogenog učinka.

Nakon umnažanja, adenovirusne čestice pročišćene su centrifugiranjem na jastučiću i u gradijentu CsCl kao što je opisano u poglavlju 3.2.7. Na slici 10. a) prikazane su epruvete za centrifugiranje nakon centrifugiranja na jastučiću CsCl (Slika 10. b), te nakon centrifugiranja u gradijentu CsCl (Slika 10. c). Rezultat centrifuge pokazuje dva oštra, tanka i jasna bjeličasta sloja ukoncentriranih adenovirusnih čestica. Gornji sloj odgovara praznim kapsidama, kao i drugim viralnim komponentama i nečistoćama dok donji sloj odgovara funkcionalnim virusnim česticama. Zelenožuta boja vidljiva okom rezultat je zelenog fluorescentnog proteina (GFP) čiji je gen ugrađen u genom virusa. Nakon ultracentrifugiranja potrebno je iz pročišćenog virusa ukloniti CsCl što je učinjeno metodom gel-filtracije pomoću kolone Sephadex G-25M. Na slici 10. d) vidljiva je razlika frakcija eluata koje sadrže, odnosno, ne sadrže virusne čestice. Epruveta koja sadrži frakcije s adenovirusnim česticama (desno) iskazuje jasnu konkavnost i opalescenciju što je potvrda prisustva virusa. U ukupni volumen sakupljenog eluata dodan je glicerol do 10 % konačnog volumena te su virusi alikvotirani i pohranjeni pri – 80 ˚C.



a) b) c) d)

Slika 10. Pročišćavanje adenovirusa. a) Nadslojavanje uzorka spremnog za ultracentrifugiranje. b) Slojevi adenovirusa dobiveni nakon centrifugiranja na jastučiću CsCl. Sloj ukoncentriranog adenovirusa se nalazi na granici različitih gustoća CsCl. Osim sloja virusnih čestica, označeni su slojevi koji predstavljaju prazne kapside. c) Sloj adenovirusa nakon centrifugiranja u gradijentu CsCl u području koje odgovara gustoći adenovirusne čestice, 1,34 g mL^{-1}. d) Eluat nakon propuštanja izoliranog sloja virusnih čestica kroz kolone za pročišćavanje. Eluat bez virusnih čestica prikazan je lijevo, a eluat s virusnim česticama desno. Frakcija bez virusa je prozirna, ravne površine, a frakcija s virusima je bjeličaste boje s konkavnom površinom.

4.3. TRANSDUKCIJA A549 STANICA I STANIČNIH KLONOVA SA SMANJENOM EKSPRESIJOM KAVEOLINA-1 ADENOVIRUSIMA Ad5, Ad26 i Ad35

Iz literature je poznato da Ad5 za svoj ulazak u ciljne stanice koristi klatrinom posredovanu endocitozu (Meier i sur., 2004) dok Ad35 za internalizaciju podjednako koristi i klatrinom posredovanu endocitozu i makropinocitozu (Meier i sur., 2002). Način ulaska Ad26 u stanicu trenutno nije opisan. Također, nije poznato da li kaveolin-1 ima ulogu u endocitozi Ad5, Ad26 i Ad35. Da bi se ispitala uloga kaveolina-1 u uspješnosti transdukcije Ad5, Ad26 i Ad35, stanice A549 stanice i klonovi 27, 86 i 120, inficirani su gore navedenim Ad. S obzirom da ovi adenovirusi imaju ugrađen gen za GPF, uspješnost transdukcije neposredno se određuje razinom ekspresije tog transgena pa su nakon transdukcije stanice analizirane protočnim citometrom. Rezultati uspješnosti transdukcije prikazani su na slici 11.

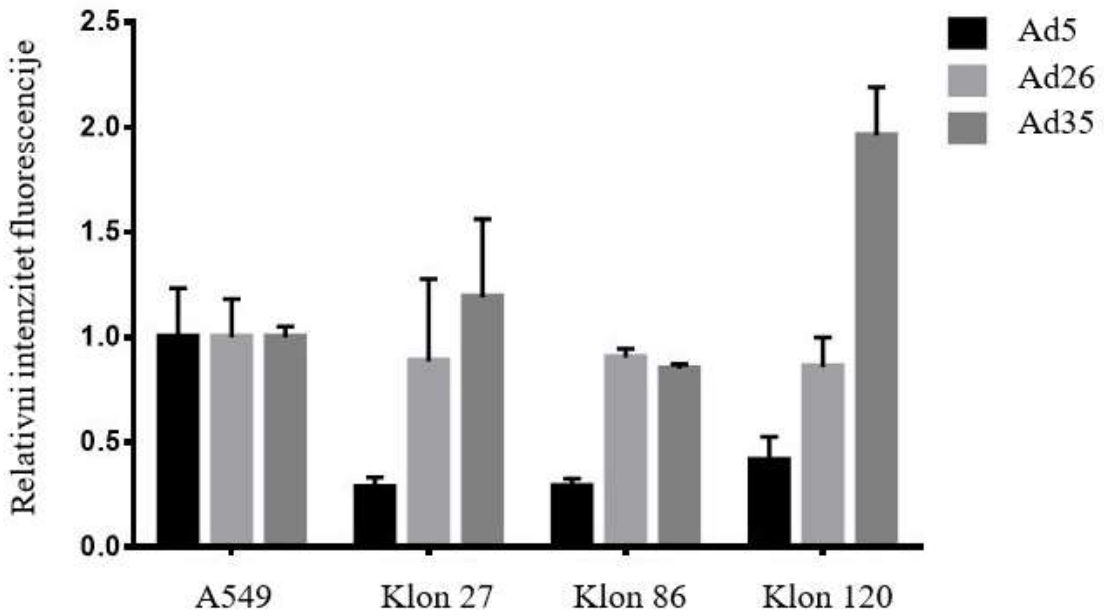
Ad5 u sva tri klona sa smanjenom ekspresijom kaveolina-1 u odnosu na kontrolne A549 stanice pokazuje značajan pad uspješnosti transdukcije prema čemu se može zaključiti da utišanje kaveolina-1 ima utjecaja na infekciju ovim serotipom adenovirusa. Naime, pokazano je da Ad5, u određenim uvjetima poput nedostatka primarnog receptora CAR, može koristiti i druge neklatrinske mehanizme endocitoze, pa tako i endocitozu putem kaveola, no internalizacija takvim putem je, osim što je sporija, manje preferirana od klatrinske (Rogee i sur., 2007; Thomsen i sur., 2002). Dobiveni rezultat znatnog pada uspješnosti transdukcije Ad5 zbog utišanja kaveolina-1 u skladu je s literaturnim navodima.

Ad26 u sva tri klona sa smanjenom ekspresijom kaveolina-1 u odnosu na kontrolne A549 stanice pokazuje blagi, gotovo neznatan pad uspješnosti transdukcije. Može se zaključiti da utišanje kaveolina-1 nema značajan utjecaj na infekciju ovim tipom adenovirusa. Iz literature je poznata samo jedna studija koja opisuje ulogu kaveolina u uspješnosti transdukcije adenovirusa i to adenovirusa tip 37 (Ad37). Pokazano je da Ad37, koji spada u grupu D adenovirusa kao i Ad26, za ulazak u stanice rožnice koristi kaveolinom posredovanu endocitozu, te je nedostatak kaveolina-1 značajno smanjio uspješnost transdukcije Ad37 (Yousuf i sur., 2013). S obzirom da Ad37 kao receptor koristi sialinsku kiselinu (Arnberg i sur., 2000), a Ad26 $\alpha_v\beta_3$ integrin (Nestić i sur., 2019) moguće je da im je i put ulaska u stanicu različit.

Ad35 u dva klona (27 i 86) pokazuje relativnu uspješnost transdukcije usporedivu s onom u A549, dok je kod klona 120 uspješnost transdukcije 2 puta veća u usporedbi s A549 stanicama.

Do sada iz literature nije poznato da kaveolin-1 može imati ulogu u uspješnosti transdukcije Ad35.

S obzirom da je jedan od ključnih faktora u uspješnosti transdukcije prisustvo odnosno dostupnost receptora, a s ciljem dodatne potvrde dobivenih rezultata, u nastavku ovog istraživanja, provedeno je ispitivanje ekspresije adenovirusnih receptora na površini stanica. Željelo se utvrditi da li je možda usljed smanjene ekspresije kaveolina-1 došlo do promjena u ispoljavanju adenovirusnih receptora što bi dalo objašnjenje za rezultate određivanja uspješnosti transdukcije. Naime, endocitoza, pa tako i kaveolinom posredovana endocitoza, uključena je u proces recikliranja receptora (Grant i sur., 2009) pa na taj način može utjecati na količinu receptora koji se nalazi na površini stanice.



Slika 11. Određivanje uspješnosti transdukcije adenovirusima Ad5, Ad26 i Ad35 u A549 stanicama i klonovima sa smanjenom ekspresijom kaveolina. $5 \cdot 10^5$ stanica po bunariću nasađeno je u pločicu s 12 bunarića. Sljedeći dan stanice su inficirane adenovirusima i to u MOI vrijednosti od $1 \cdot 10^3$ virusnih čestica po stanici za Ad5 i Ad35, odnosno, $1 \cdot 10^4$ virusnih čestica po stanici za Ad26 uz trajanje transdukcije od 2 sata. Nakon 48 sati inkubacije u inkubatoru za uzgoj kulture stanica, uspješnost transdukcije određena je protočnim citometrom. Uspješnost transdukcije prikazana je relativno prema kontrolnim stanicama. Napravljene su tri replike eksperimenta.

4.4. ANALIZA EKSPRESIJE ADENOVIRUSNIH RECEPTORA NA POVRŠINI A549 STANICA I STANIČNIH KLONOVA SA SMANJENOM EKSPRESIJOM KAVEOLINA-1

S obzirom na rezultate dobivene analizom uspješnosti transdukcije adenovirusa 5, 26 i 35 koji su pokazali da utišanje kaveolina-1 znatno utječe na uspješnost transdukcije Ad5, odnosno relativno neznatno na uspješnost transdukcije Ad26 i Ad35, provedeno je ispitivanje ekspresije adenovirusnih receptora kako bi se ispitalo je li promjena uspješnosti transdukcije navedenih adenovirusa možda povezana s promjenom ekspresije odgovarajućih adenovirusnih receptora na površini stanica.

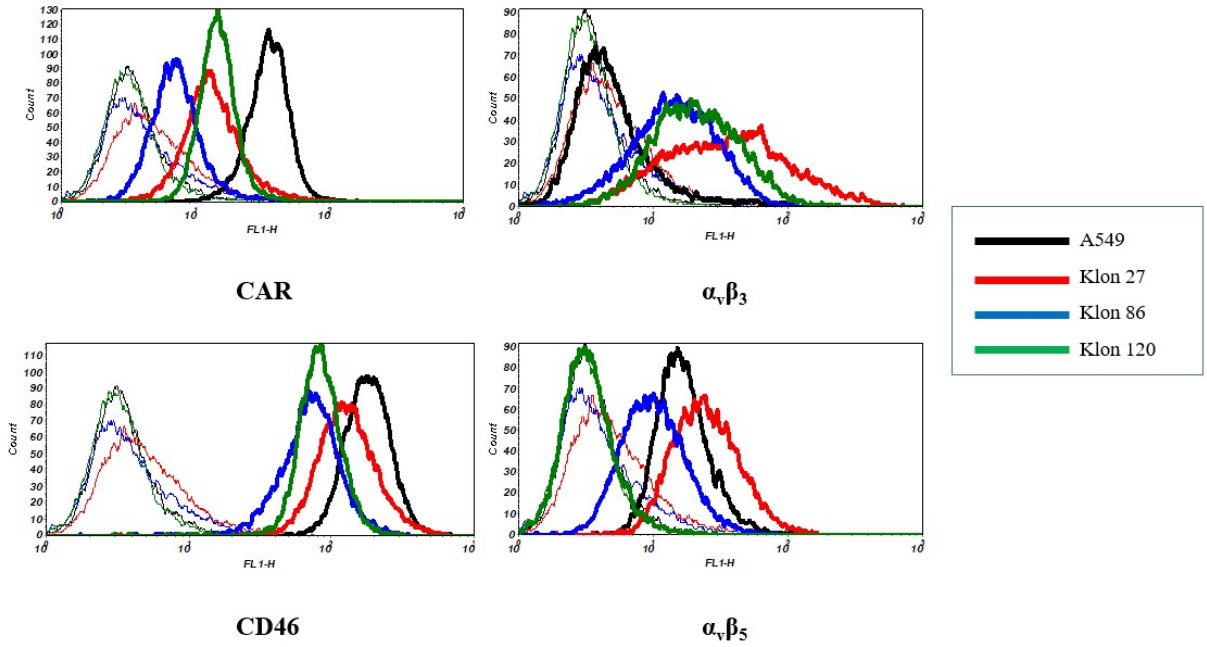
U sva tri klona sa smanjenom ekspresijom kaveolina-1 došlo je do značajnog smanjenja količine receptora CAR na površini stanica (Slika 12). Pad CAR potpuno jasno objašnjava zašto je uspješnost transdukcije Ad5 na klonovima sa smanjenom ekspresijom kaveolina-1 toliko niska. Naime, CAR je primarni receptor za ovaj serotip virusa i njegov izostanak, odnosno, značajan količinski pad na površini stanice rezultira time da se virus u manjoj mjeri veže na stanicu, a samim time smanjeno ulazi u stanicu. Iako je poznato da se CAR može naći u masnim uklopinama koje ne sadrže kaveolin (Excoffon i sur., 2003), moguće je da je u A549 stanicama smanjena ekspresija kaveolina-1 promijenila smještaj CAR u membrani stanice, a samim time i njegovu dostupnost adenovirusu.

Utišavanje kaveolina-1 smanjilo je također i količinu receptora CD46 na površini stanice (Slika 12). CD46 je primarni receptor za Ad35. Ovaj rezultat nije u korelaciji s rezultatom ispitivanja uspješnosti transdukcije Ad35 koja je u klonovima 27 i 86 usporediva s kontrolnim A549 stanicama, dok je u klonu 120 čak i veća nego u A549. Do sada nije bilo poznato da utišavanje kaveolina-1 može mijenjati ekspresiju CD46.

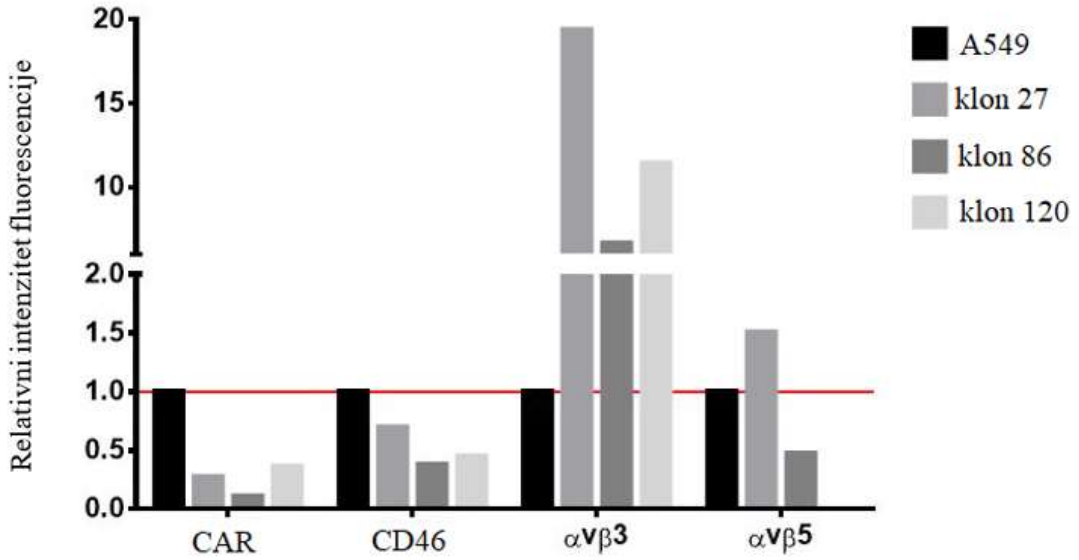
Ad26 kao bitan receptor koristi integrin $\alpha_v\beta_3$ što su utvrdile kolege iz laboratorija u svom radu iz 2019. godine (Nestić i sur., 2019). Navedeni integrin pokazuje značajan porast površinske ekspresije u svim klonovima sa smanjenom ekspresijom kaveolina-1 te bi bilo za očekivati da će i infekcija Ad26 znatno porasti. Međutim, rezultati uspješnosti transdukcije pokazuju da tome nije tako. Hipotetski, može se pretpostaviti da utišavanje kaveolina-1 potiče porast količine $\alpha_v\beta_3$, no sumarno taj porast receptora ne potiče porast uspješnosti transdukcije Ad26 zato što je vidljiv značajan pad količine integrina $\alpha_v\beta_5$ koji je bitan za bijeg virusa iz endosoma

(Wang i sur., 2000) te, prema tome, virus ne može zaokružiti životni ciklus već je zaustavljen i vjerojatno degradiran u endosomu.

Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da kaveolin-1 ima utjecaja na ekspresiju receptora za vezanje adenovirusnih čestica na površini stanica. Utišavanje kaveolina-1 dovodi do pada količine CAR i CD46 na površini stanica te do značajnog porasta količine integrina $\alpha_v\beta_3$ koja nema efekta na uspješnost transdukcije Ad26 jer paralelno količina integrina $\alpha_v\beta_5$ pada.



a)



b)

Slika 12. Ekspresija adenoviralnih receptora na površini A549 stanica i klonova 27, 86 i 120 koji pokazuju smanjenu ekspresiju kaveolina-1. Četrdeset osam sati nakon nasađivanja stanice su tripsiniziranjem odvojene od podloge te je ekspresija CAR, CD46, integrina $\alpha_v\beta_3$ i integrina $\alpha_v\beta_5$ određena obilježavanjem specifičnim protutijelima i mjerenjem protočnim citometrom. Slika 12.a) prikazuje histograme za pojedine receptore prema rezultatima dobivenim protočnom citometrijom. Crna boja odgovara A549 stanicama, crvena klonu 27, plava klonu 86 i zelena klonu 120. Na slici 12.b) prikazana je kvantifikacija podataka iz histograma dobivenih mjerenjem intenziteta fluorescencije.

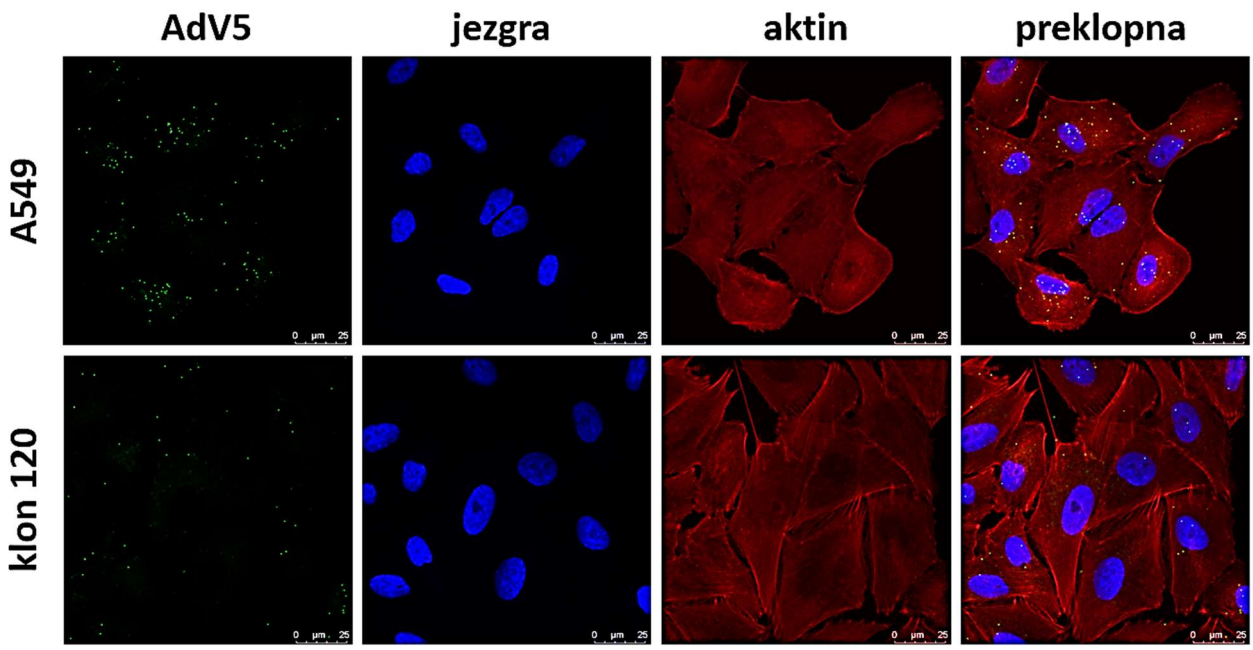
4.5. INTERNALIZACIJA ADENOVIRUSA Ad5, Ad26 i Ad35 U A549 STANICE I STANIČNI KLON 120 S UTIŠANOM EKSPRESIJOM KAVEOLINA-1

Za razliku od analize uspješnosti transdukcije protočnom citometrijom koja daje informaciju o uspješnosti dopreme i transkripcije viralnog genoma u stanicu domaćina o čemu neposredno govori količina eksprimiranog GFP-a, analiza internalizacije virusa konfokalnim mikroskopom daje uvid u broj virusnih čestica koje su uspješno ušle u stanice te položaj virusnih čestica unutar stanica, a ne dobije se informacija je li genom virusa uspješno dopremljen u jezgru i tamo transkribiran. Ovaj eksperiment je preliminarna indikacija za daljnji smjer istraživanja te svojevrstan dodatan argument vezan za prethodno dobivene eksperimentalne rezultate. Na slici 13 prikazani su rezultati internalizacije fluorescentno obilježenih Ad5, Ad26 i Ad35.

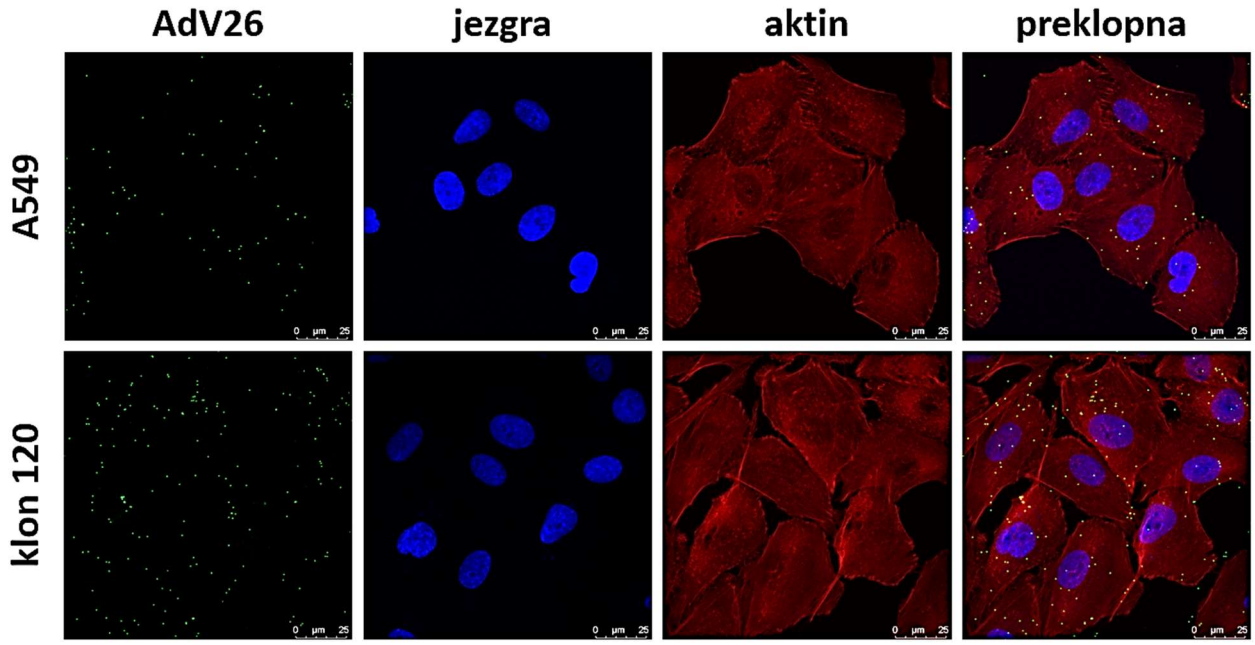
Rezultati dobiveni promatranjem internalizacije fluorescentno obilježenih Ad5, Ad26 i Ad35 korištenjem konfokalne mikroskopije dodatno su potvrdili rezultate mjerenja uspješnosti transdukcije. Prosječan broj virusnih čestica Ad5 manji je u klonu 120 s utišanim kaveolinom-1 u usporedbi s kontrolnim A549 stanicama. Ovakav rezultat slaže se sa smanjenom uspješnosti transdukcije Ad5 kao i smanjenom ekspresijom CAR u klonu 120 u odnosu na A549.

Prosječan broj internaliziranih Ad26 u klonu 120 relativno je manji u odnosu na A549. Količina internaliziranih Ad26 ne korelira u potpunosti s prethodno dobivenim rezultatima određivanja uspješnosti transdukcije. Uspješnost transdukcije Ad26 blago pada s utišavanjem kaveolina-1, količina integrina $\alpha_v\beta_3$ intenzivno raste, no pad količine $\alpha_v\beta_5$ ne dopušta Ad26 dolazak do jezgre i replikaciju genoma. Pretpostavljamo da je u klonu 120 došlo do poništavanja doprinosa povećane ekspresije integrina $\alpha_v\beta_3$ i smanjene ekspresije integrina $\alpha_v\beta_5$. Razumijevanje uočenog efekta bit će predmet budućih istraživanja.

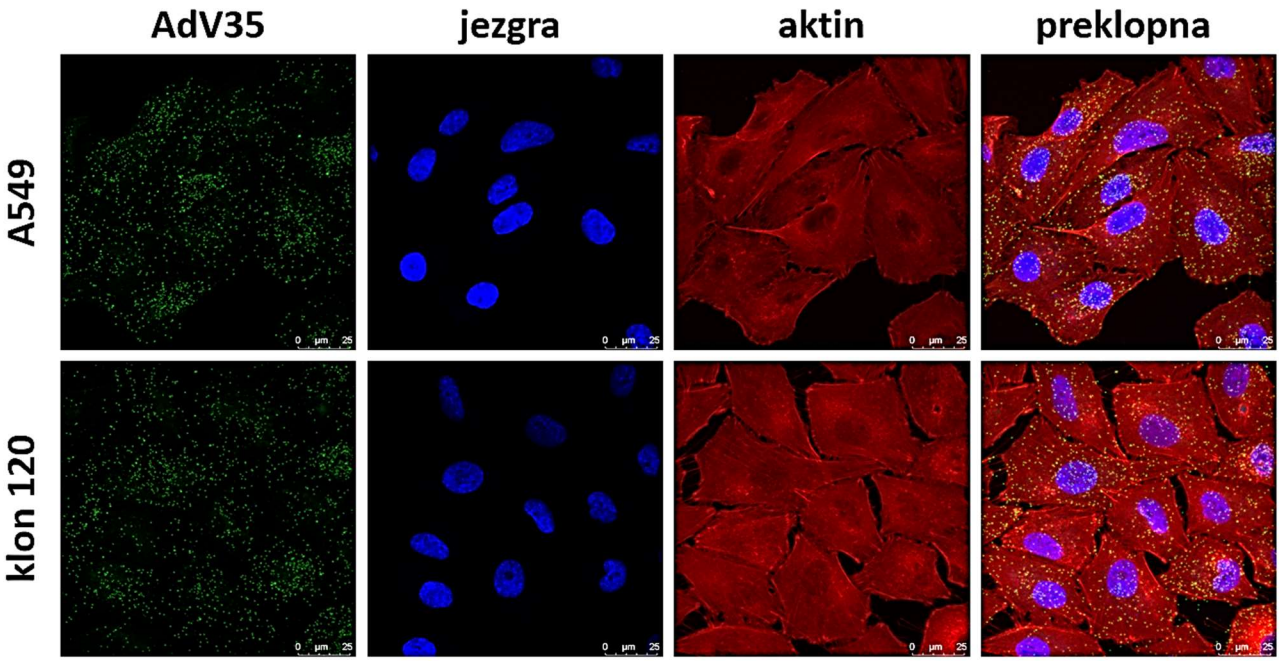
Prosječan broj virusnih čestica Ad35 raste u klonu 120, što je u skladu s prethodno dobivenim rezultatima koji pokazuju da bi njegova brojnost i trebala biti veća s obzirom da je razina infekcije u klonovima nešto veća s obzirom na kontrolu. Povećana internalizacija Ad35 nije u korelaciji s analizom površinskih receptora gdje je pokazano da je količina njegovog primarnog receptora CD46 u padu. Uočena odstupanja bit će predmet budućih istraživanja.


AdV5
jezgra
aktin
preklopna
A549
klon 120

a)

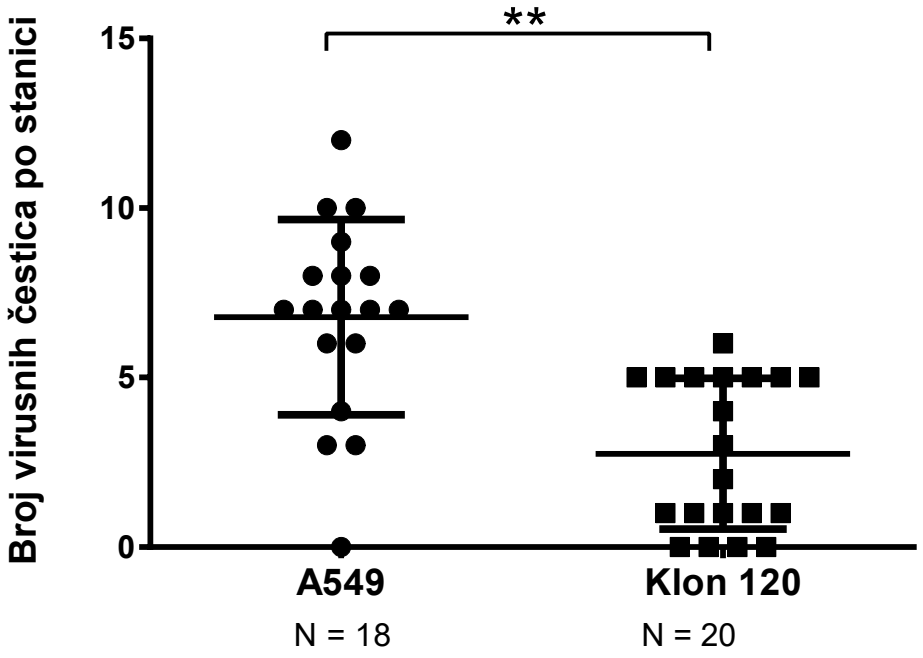

AdV26
jezgra
aktin
preklopna
A549
klon 120

b)

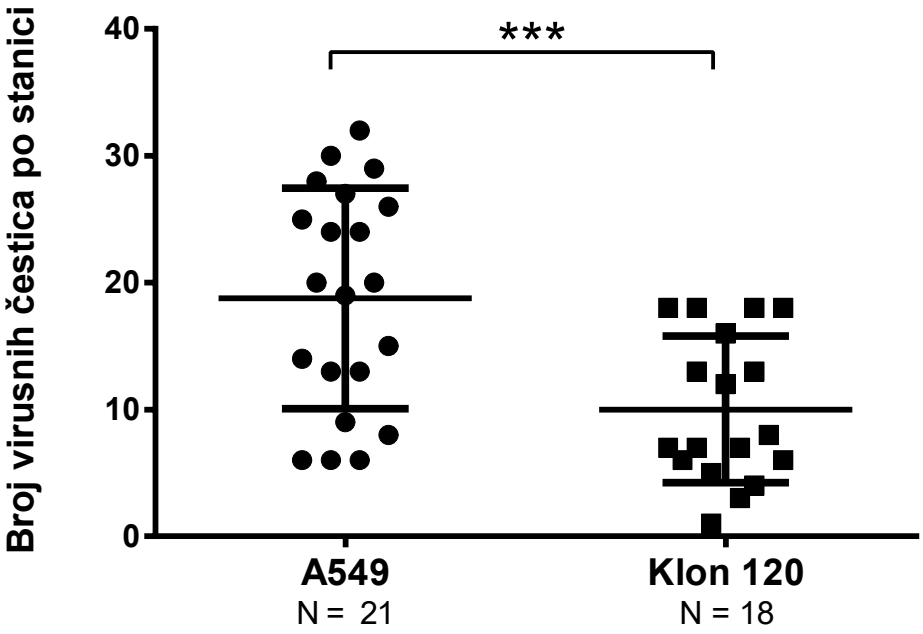


c)

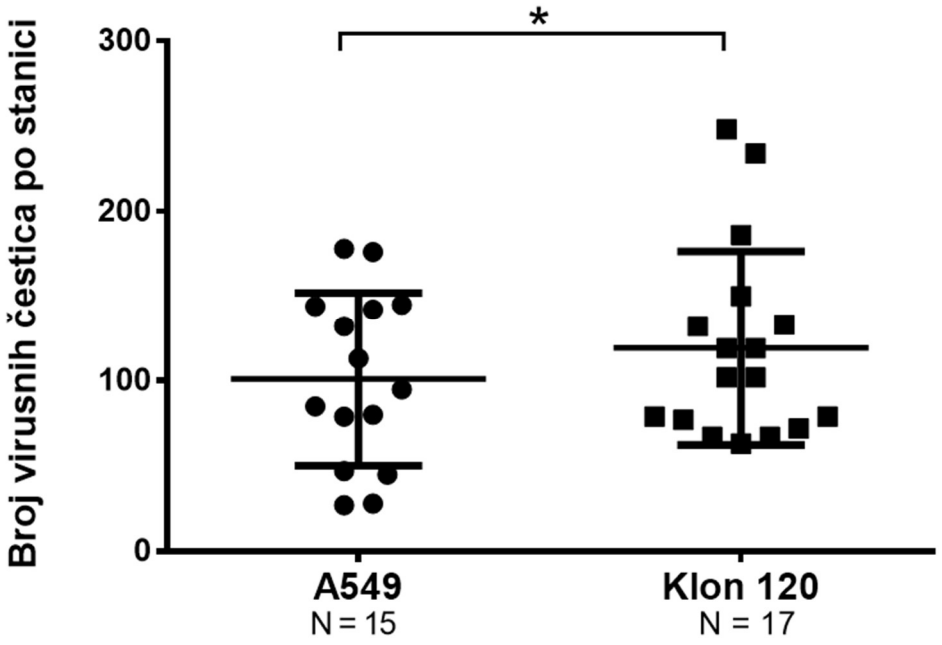
Slika 13. Internalizacija fluorescentno obilježenih Ad5 (a), Ad26 (b) i Ad35 (c) u A549 stanice i klon 120 promatrana konfokalnom mikroskopijom. Stanice su nasađene u pločicu s 24 bunarića na stakalca u količini od 3 $\cdot 10^4$ st/bunarić te inficirane Alexa-Fluor 488 obilježenim adenovirusima Ad5, Ad26 i Ad35 tijekom 2 sata pri 37 ˚C. MOI vrijednosti za Ad5 i Ad35 je 1 $\cdot$ 10^4 pp/st, te 3 $\cdot$ 10^4 pp/st za Ad26. Neinternalizirani virusi su isprani, a stanice fiksirane 2%-tnim PFA. Mikroskopiranje je provedeno uz rezoluciju 1024x1024, povećanje objektiva 63x i digitalni zoom 1,3x. Plavom bojom je prikazana jezgra (DAPI), crvenom stanični citoskelet (faloidin) te zeleno virusi.


**
Broj virusnih čestica po stanici
15
10
5
0
A549
N = 18
Klon 120
N = 20

a)


***
Broj virusnih čestica po stanici
40
30
20
10
0
A549
N = 21
Klon 120
N = 18

b)



(c)

Slika 14. Kvantifikacija efikasnosti internalizacije Ad5 (a), Ad26 (b) i Ad35 (c) prikazana kao broj virusnih čestica po stanici. Kvantifikacija je napravljena na osnovu rezultata internalizacije dobivenih konfokalnom mikroskopijom. Količina virusnih čestica u pojedinoj stanici izbrojana je koristeći ImageJ program te je izrađen pripadajući graf. Navedene N vrijednosti predstavljaju broj stanica koje su analizirane. *, $p < 0,276$; **, $p < 0,0035$; ***, $p < 0,008$.

5. ZAKLJUČCI

1. Transfekcijom A549 stanica plazmidom koji sadrži shRNA za kaveolin-1 i selektivnim pritiskom primjenom geneticina izdvojeni su stabilni stanični klonovi koji u usporedbi s roditeljskim A549 stanicama pokazuju smanjenu ekspresiju kaveolina-1.

2. Smanjenje ekspresije kaveolina-1 dovodi do znatnog pada količine CAR, CD46 i $\alpha_v\beta_5$ integrina, te značajnog povećanja količine $\alpha_v\beta_3$ integrina na površini stanice.

3. Smanjenje ekspresije kaveolina-1 značajno smanjuje uspješnost transdukcije u Ad5, čemu je razlog smanjena ekspresija CAR.

4. Na temelju dobivenih rezultata nije moguće jednoznačno opisati učinak smanjenja ekspresije kaveolina-1 na uspješnost transdukcije Ad26 i Ad35 te su nužna daljnja istraživanja.

6. LITERATURA

Abbink, P., Lemckert, A., A., C., Ewald, B., A., Lynch, D., M., Denholtz, M., Smits, S., Holterman, L., Damen, I., Vogels, R., Thorner, A., R., O'Brien, K., L., Carville, A., Mansfield, K., G., Goudsmit, J., Menzo J. E. Havenga, M., J., E., Barouch, D., H. (2007) Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J Virol*. **81**, 4654-4663.

Aderem, A., Underhill, D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. **17**, 593-623.

Arnberg, N. (2009) Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends Pharmacol Sci.* **33**, 442-448.

Arnberg N., Edlund K., Kidd A.H., Wadell G. (2000) Adenovirus Type 37 Uses Sialic Acid as a Cellular Receptor. *J Virol.* **74**, 42-48.

Arnberg, N. (2012) Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends in Pharmacol Sci*. **33**, 443-444.

Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., KurtJones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., Finberg, R.W. (1997) Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. **275**, 1320-1323.

Bidgood, S.R., Tam, J.C., McEwan, W.A., Mallery, D.L., James, L.C. (2014) Translocalized IgAmediates neutralization and stimulates innate immunity inside infected cells. *Proc Natl AcadSci U S A.* **111**, 13463-13468.

Blumenthal, R., Seth, P., Willingham, M.C., Pastan, I. (1986) pH-dependent lysis of liposomes by adenovirus. *Biochemistry.* **25**, 2231–2237.

Boulant, S., Kural, C., Zeeh, J.C., Ubelmann, F., Kirchhausen, T. (2011) Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* **13,** 1124–1131.

Burnett, R.M. (1997) The structure of adenovirus. U: Structural biology of viruses (Chiu, W., Burnett, R.M., Garcea, R.L., ured.), Oxford University Press, Oxford, str. 209-238.

Byron, A., Morgan, M.R., Humphries, M.J. (2010) Adhesion signalling complexes. *Curr Biol.* **20**, 1063-1067.

Cann A. J. (2005) Principles of molecular virology, 6. izdanje, Elsevier, Oxford.

Chen, H., Xiang, Z.Q., Li, Y., Kurupati, R.K., Jia, B., Bian, A., Zhou, D.M., Hutnick N., Yuan, S., Gray, C., Serwanga, J., Auma, B., Kaleebu, P. Zhou, X., Betts, M.R., Ertl, H.C.J. (2010) Adenovirus-based vaccines: comparison of vectors from three species of Adenoviridae. *J Virol.* **84,** 10522-10532.

Cheng, C., Gall, J.G., Nason, M., King, C.R., Koup, R.A., Roederer, M., McElrath, M.J., Morgan, C.A., Churchyard, G., Baden, L.R., Duerr, A.C., Keefer, M.C., Graham, B.S., Nabel, G.J. (2010) Differential specificity and immunogenicity of adenovirus type 5 neutralizing antibodies elicited by natural infection or immunization. *J Virol.* **84**, 630–638.

Cox, F., van der Fits, L., Abbink, P., Larocca, R.A., van Huizen, E., Saeland, E., Verhagen, J., Peterson, R., Tolboom, J., Kaufmann B., Schuitemaker, H., Barouch, D.H., Zahn, R. (2018) Adenoviral vector type 26 encoding Zika virus (ZIKV) M-Env antigen induces humoral and cellular immune responses and protects mice and nonhuman primates against ZIKV challenge. *PLoS ONE.* **13**, e0202820.

Coyne, C.B., Bergelson, J.M. (2005) CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev.* **57**, 869-882.

Çuburu, N., Khan, S., Thompson, C. D., Kim, R., Vellinga, J., Zahn, R., Schiller, J. T. (2018) Adenovirus vector-based prime-boost vaccination via heterologous routes induces cervicovaginal $CD8^+$ T cell responses against HPV16 oncoproteins. *Int J Cancer*. **142**, 1467–1479.

Curiel, D., T. (2016) Adenoviral vectors for gene therapy, 2. izd, Elsevier Inc., London, str. 1-6, 27-29, 31, 37-38, 40, 42, 60, 87, 349-350, 391, 392-395.

Excoffon, K.J.A., Moninger T., Zabner J. (2003) The coxsackie B virus and adenovirus receptor resides in a distinct membrane microdomain. *J Virol.* **77,** 2559-2567.

Fallaux, F. J., Van der Eb, A. J., Hoeben, R. C. (1999). Who's afraid of replication-competent adenoviruses? *Gene Therapy*. **6**, 709–712.

Fallaux, F.J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D.J., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S.J., van Ormondt, H., van der Eb, A.J., Valerio, D., Hoeben, R.C.

(1998) New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther.* **9**, 1909–1917

Gaggar, A., Shayakhmetov, D.M., Lieber, A. (2003) CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat. Med.* **9**, 1408–1412.

Gao, G. P., Engdahl, R. K., Wilson, J. M. (2000). A cell line for highyieldproduction of E1-deleted adenovirus vectors without the emergence of replication-competent virus. *Hum Gene Ther.* **11**, 213-219.

Ginsberg H.S., ed. (1984). The Adenoviruses. Plenum Press, New York.

Gonçalves, M.A.F.V., de Vries, A.A.F. (2006) Adenovirus: from foe to friend. *Rev Med Virol* **16**, 167–186.

Graham, F.L. Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* **36**, 59-74.

Grant, B.D., Donaldson, J.G. (2009) Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Mol Cel Biol.* **10**, 597-608.

Greber, U.F., Willetts, M., Webster, P., Helenius, A. (1993) Stepwise dismantling of Ad 2 during entry into cells. *Cell* **75**, 477-486.

Hardy, S., Kitamura, M., Harris-Stansil, T., Dai, Y., Phipps, M.L. (1997) Construction of adenovirus vectors through Cre-*lox* recombination. *J Virol.* **71**, 1842–1849.

Hayashi, S., Hogg, J.C. (2007) Adenovirus infection and lung disease. *Curr Opin Pharmacol.* **7**, 237-243.

Hayer, A., Stoeber, M., Ritz, D., Engel, S., Meyer, H.H., Helenius, A. (2010) Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intralumenal vesicles in endolysosomes for degradation. *J. Cell Biol.* **191**, 615-29

He, X., Liu, J., Yang, C., Su, C., Zhou, C., Zhang, O., Li, L., Wu, H., Liu, X., Wu, M., Qian, Q. (2011) 5/35 fiber-modified conditionally replicative adenovirus armed with p53 shows increased tumor-suppressing capacity to breast cancer cells. *Hum Gene Ther.* **22**, 283-292.

Hehir, K.M., Armentano, D., Cardoza, L.M., Choquette, T.L., Berthelette, P.B., White, G.A., Couture, L.A., Everton, M.B., Keegan, J., Martin, J.M., Pratt, D.A., Smith, M.P., Smith, A.E., Wadsworth, S.C. (1996) Molecular characterization of replication-competent variants of

adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence. *J Virol.* **70**, 8459–8467.

Hilleman, M.R., Werner, J.R. (1954) Recovery of a new agent from patients with acute respiratoy illness. *Proc Soc Exp Biol Med.* **85,** 183-188.

Kojaoghlanian, T., Flomenberg, P. Horwitz, M.S. (2003) The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol.* **13,** 155-171.

Kotha, P.L., Sharma, P., Kolawole, A.O., Yan, R., Alghamri, M.S., Brockman, T.L., Gomez-Cambronero, J., Excoffon, K.J. (2015) Adenovirus entry from the apical surface of polarized epithelia is facilitated by the host innateimmune response. *PLoS Pathog.* **11,** e1004696.

Kumar-Singh, R., Chamberlain, J. S. (1996) Encapsidated adenovirus minichromosomes allow delivery and expression of a 14 kb dystrophin cDNA to muscle cells. *Hum Mol Genet.* **5**, 913-921.

Li, H., Rhee, E., G., Masek-Hammerman, K., Teigler, J., E., Abbink, P., Barouch, D., H. (2012) Adenovirus serotype 26 utilizes CD46 as a primary cellular receptor and only transiently activates T lymphocytes following vaccination of rhesus monkeys. *J Virol*. **86**, 10862-10865.

Lieber, A., Steinwaerder, D.S., Carlson, C.A., Kay, M.A. (1999) Integrating adenovirus adeno-associated virus hybrid vectors devoid of all viral genes. *J Virol.* **73**, 9314-9324.

Luisoni, S., Greber, U. (2016) Biology of Adenovirus Cell Entry: Receptors, Pathways, Mechanisms. U: Adenoviral Vectors for Gene Therapy (Curiel, D.T., Douglas, J.T., ured.), Academic Press, NewYork/London, str. 27-58.

Lutschg, V., Boucke, K., Hemmi, S., Greber, U.F. (2011) Chemotactic antiviral cytokines promote infectious apical entry of human adenovirus into polarized epithel cells. *Nat Commun.* **2**, 391.

Madisch, I., Harste, G., Pommer, H., Heim, A. (2005) Phylogenetic analysis of the main neutralization and hemagglutination determinants of all human adenovirus prototypes as a basis for molecular classification and taxonomy. *J Virol.* **79**, 15265-15276.

Meier O., Greber U.F. (2003) Adenovirus endocytosis. *J Gene Med.* **5**, 451-462.

Meier O., Greber U.F. (2004) Adenovirus endocytosis. *J Gene Med.* **6**, 152-163.

Meier, O., Boucke, K., Hammers, S.V., Keller, S., Stidwill, R.P., Hemmi, S., Greber, U.F. (2002) Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol.* **158**,1119-1131.

Mercier, S., Rouard, H., Delfau-Larue, M.H., Eloit, M. (2004) Specific antibodies modulate the interactions of adenovirus type 5 with dendritic cells. *Virology.* **322**, 308-17.

Morsy, M. A., Gu, M., Motzel, S., Zhao, J., Lin, J., Su, Q., Allen, H., Franlin, L., Parks, R. J., Graham, F. L., Kochanek, S., Bett, A. J., Caskey, C. T. (1998) An adenoviral vector deleted for all viral codingsequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl AcadSci U S A.* **95**, 7866-7871.

Nah, J., Py, J.O., Jung, S., Yoo, S.M., Kam, T.I., Chang, J.W., Han, J., An, S.S.A., Onodera, T., Jung, Y.K. (2013) BECN1/Beclin1 is recruited into lipid rafts by prion to activate autophagy in response to amyloid β 42. *Autophagy*. **9**, 2009-2021.

Nestic, D., Uil, T.G., Ma, J., Roy, S., Vellinga, J.,Baker, A.H., Custers, J, Majhen, D. (2019) $\alpha_v\beta_3$ integrin is required for efficient infection of epithelial cells with human adenovirus type 26. *J Virol.* **93**, e01474-18.

Pastan, I., Seth, P., Smith, C.J., Owen, D.J. (1986) Adenovirus entry into cells: some new observations on an old problems. U: Concepts in Viral Pathogenesis II. (Notkins, A.L. Oldstone M.B.A., ured.), Springer-Verlag New York, Inc., New York, str. 141-146.

Pearse, B.M., Smith, C.J., Owen, D.J. (2000) Clathrin coat construction in endocytosis. *Curr Opin Struct Biol.* **10**, 220-228.

Pelkmans, L, Zerial, M. (2005) Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature*. **436**, 128– 133.

Razani, B., Woodman, S.E., Lisanti, M. (2002) Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev.* **54**, 431–6.

Richter, T., Floetenmeyer, M., Ferguson, C., Galea, J., Goh, J., Lindsay, M. R., Morgan, G. P., Marsh, B. J., Parton, R. G. (2008) High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions. *Traffic.* **9**, 893-909.

Rogee, S., Grellier, E., Bernard, C., Loyens, A., Beauvillain, J.C., D'halluin, J.C., Colin, M. (2007) Intracellular Trafficking of a Fiber-modified Adenovirus Using Lipid Raft/Caveolae Endocytosis. *Mol Ther*. **15**,1963-1972.

Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., Ward, T.G. (1953) Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* **84**, 570–573.

Russell, W. C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol.* **81**, 2573–2604.

San Martin, C., Burnett, R.M. (2003). Structural studies on adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. **272,** 57–94.

Seth, P., Landes, R.G., Austin, T.X. (1999) Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy, R.G. Landes Company, Austin, str. 1-314.

Sinn, P.L., Williams, G., Vongpunsawad, S., Cattaneo, R., McCray, P.B. (2002) Measles virus preferentially transduces the basolateral surface of well-differentiated human airway epithelia. *J Virol.* **76**, 2403-2409.

Steinwaerder, D. S., Carlson, C. A., Lieber, A. (1999) Generation of adenovirus vectors devoid of all viral genes by recombination between inverted repeats. *J Virol.* **73**, 9303-9313.

Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M. (2002) Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell.* **13**, 238-250.

Vogels, R., Zuijdgeest, D., van Rijnsoever, R., Hartkoorn, E., Damen, I., de Béthune, M.P., Kostense, S., Penders, G., Helmus, N., Koudstaal, W., Cecchini, M., Wetterwald, A., Sprangers, M., Lemckert, A., Ophorst, O., Koel, B., van Meerendonk, M., Quax, P., Panitti, L., Grimbergen, J., Bout, A., Goudsmit, J., Havenga, M. (2003) Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. *J Virol.* **77**, 8263-8271.

Von Oostrum, J., Burnett, R.M. (1985). Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. *J Virol.* **56**, 439-448.

Walters, R.W., Freimuth, P., Moninger, T.O., Ganske, I., Zabner, J., Welsh, M.J. (2002) Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell.* **110**, 789-799.

Wang, H., Liu, Y., Li, Z.Y., Tuve, S., Stone, D., Kalyushniy, O., Shayakhmetov, D., Verlinde, C.LM., Stehle, T.,McVey, J., Baker, A., Peng, K.W., Roffler, S., Lieber, A.

(2008) *In vitro* and *in vivo* properties of adenovirus vectors with increased affinity to CD46. *J Virol.* **82**, 10567-10579.

Wang, K., Guan, T., Cheresh, D.A., Nemerow, G.R. (2000) Regulation of Adenovirus Membrane Penetration by the Cytoplasmic Tail of Integrin β5. *J Virol.* **74**, 2731-2739.

Yousuf, MA, Zhou, X, Mukherjee, S, Chintakuntlawar, AV, Lee, JY, Ramke, M, Chodosh, J., Rajaiya, J. (2013) Caveolin-1 associated adenovirus entry into human corneal cells. *PLoS One.* **8**, e77462.

Yu, X.D., Veesler, D., Campbell, M.G., Barry, M.E., Asturias, F.J., Barry, M.A., Reddy, V.S. (2017) Cryo-EM structure of human adenovirus D26 reveals conservation of structural organization among human adenoviruses. *Sci Adv.* **3**, e1602670.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Danijel Švec

Danijel Švec