

Usporedba aktivacije urođenog imunosnog odgovora u stanicama monocita i mišića čovjeka nakon infekcije adenovirusima tipa 5, 26 i 35

Radić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:159:959265>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

Ivana Radić
886/MB

**USPOREDBA AKTIVACIJE
UROĐENOG IMUNOSNOG
ODGOVORA U STANICAMA
MONOCITA I MIŠIĆA ČOVJEKA
NAKON INFEKCIJE
ADENOVIRUSIMA TIPA 5, 26 I 35**

Rad je izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala u Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr.sc. Andreje Ambriović Ristov, docentice PBF-a i znanstvene savjetnice IRB-a, voditeljstvom dr.sc. Dragomire Majhen, više znanstvene suradnice IRB-a, te uz pomoć Davora Nestića, mag. ing. mol. biotech. koji je pri izradi diplomskog rada bio neposredni voditelj.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za Molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković
Laboratorij za Staničnu biologiju i prijenos signala

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

USPOREDBA AKTIVACIJE UROĐENOG IMUNOSNOG ODGOVORA U STANICAMA MONOCITA I MIŠIĆA ČOVJEKA NAKON INFEKCIJE ADENOVIRUSIMA TIP 5, 26 I 35

Ivana Radić, 886/MB

Sažetak: Adenovirus tipa 5 (AdV5) najkorišteniji je viralni vektor u genskoj terapiji pri čemu je jedan od nedostataka njegova velika seroprevalencija u populaciji što smanjuje mogućnost njegove uporabe te imunogenost vektora. Iz tog razloga, priseže se korištenju vektora koji u populaciji imaju nisku seroprevalenciju, kao što su adenovirus tipa 26 (AdV26) i adenovirus tipa 35 (AdV35). Urođeni imunوسي odgovor čini prvu liniju obrane organizma od patogena, pa tako i adenovirusa. Infekcija adenovirusima potiče proizvodnju brojnih citokina i kemokina koji djeluju protuupalno te eliminiraju strane antigene. Adenovirusi različitih serotipova izazivaju urođeni imunوسي odgovor različitog intenziteta. U ovom radu uspoređena je aktivacija urođenog imunوسي odgovora u stanicama monocita i mišića čovjeka nakon infekcije AdV5, AdV26 i AdV35. Uočeno je da AdV35 u stanicama monocita i mišića čovjeka izaziva najsnažniji urođeni imunوسي odgovor i to poticanjem ekspresije gena koji kodiraju za IL-6, IL-8, IL-1 β i TNF α odnosno povećanim lučenjem IL-6 i IL-8. Urođeni imunوسي odgovor koji AdV26 potiče u RD i THP-1 stanicama sličan je odgovoru koji potiče infekcija s AdV5. Poticanje urođenog imunوسي odgovora infekcijom AdV5, AdV26 i AdV35 posredovano je s pIRF-3 i NF- κ B. Ovi rezultati upućuju na potencijal AdV26 i AdV35 kao povoljnih vektora za prijenos gena i vakcinaciju.

Gljučne riječi: adenovirus, urođeni imunوسي odgovor, seroprevalencija, genska terapija

Rad sadrži: 55 stranica, 17 slika, 11 tablica, 75 literaturnih navoda, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: dr.sc. Andreja Ambriović Ristov

Pomoć pri izradi: Dragomira Majhen, dr.sc., Davor Nestić, mag.ing.mol.biotechn.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Višnja Bačun-Družina
2. Doc.dr.sc. Andreja Ambriović Ristov
3. Dr.sc. Dragomira Majhen
4. Doc.dr.sc. Kristina Radošević (zamjena)

Datum obrane: 20. srpanj 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute
Laboratory for Cell biology and signalling

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

THE COMPARISON OF THE INDUCTION OF INNATE IMMUNE RESPONSE IN HUMAN MONOCYTES AND MUSCLE CELLS AFTER AN INFECTION WITH THE ADENOVIRUS TYPE 5, 26 AND 35

Ivana Radić, 886/MB

Abstract: Adenovirus type 5 (AdV5) is the most widely used viral vector in gene therapy, however its immunogenicity and high seroprevalence in the population reduces the possibility of usage of this vector. For those reasons, vectors with low seroprevalence in the population such as adenovirus type 26 (AdV26) and adenovirus type 35 (AdV35), are used as an alternative approach. The innate immune response is the first line of defense of the organism from pathogens, thus also adenoviruses. Adenoviral infection triggers the production of numerous anti-inflammatory cytokines and chemokines that eliminate foreign antigens. Different serotypes of adenoviruses cause innate immune responses of varying intensity. This thesis compares the induction of innate immune responses in human monocytes and muscle cells after AdV5, AdV26 and AdV35 infection. It was observed that AdV35 in human monocytes and muscle cells induces the most powerful innate immune response by stimulating expression of genes encoding IL-6, IL-8, IL-1 β and TNF α , thus increasing IL-6 and IL-8 secretion. The innate immune response triggered by AdV26 in human monocytes and muscle cells is similar to the response triggered by AdV5 infection. The induction of the innate immune response by AdV5, AdV26 and AdV35 infection is mediated by pIRF-3 and NF- κ B. These findings point to the potential of AdV26 and AdV35 as favorable vectors for gene transfer and vaccination.

Keywords: adenovirus, innate immune response, seroprevalence, gene therapy

Thesis contains: 55 pages, 17 figures, 11 tables, 75 references, 2 supplements

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: *Andreja, Ambriović Ristov, PhD*

Technical support and assistance: *Dragomira Majhen, PhD, Davor Nestić, MSc*

Reviewers:

1. PhD. *Višnja, Bačun-Družina*, Full professor
2. PhD. *Andreja, Ambriović Ristov*, Assistant professor
3. PhD. *Dragomira, Majhen*
4. PhD. *Kristina, Radošević*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 20. July 2018.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ADENOVIRUSI: STRUKTURA I GENOM	2
2.2. ULAZAK ADENOVIRUSA U STANICU I INFEKCIJA	5
2.3. POTICANJE IMUNOSNOG ODGOVORA ADENOVIRUSIMA	8
2.4. ADENOVIRUSNI VEKTORI	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. Kemikalije	13
3.1.2. Uređaji i pomagala	16
3.1.3. Stanične linije	17
3.1.4. Replikacijski defektni adenovirusi	17
3.2. METODE	18
3.2.1. Uzgoj stanica	18
3.2.2. Odmrzavanje i zamrzavanje stanica	18
3.2.3. Namnažanje i pročišćavanje adenovirusa	19
3.2.4. Određivanje koncentracije adenovirusnih čestica u suspenziji pročišćenih adenovirusa	20
3.2.5. Transdukcija	20
3.2.6. Analiza stanica protočnim citometrom	21
3.2.7. Izdvajanje ukupne RNA iz kulture stanica	21
3.2.8. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije RNA	21
3.2.9. Elektroforeza RNA u agaroznom gelu	22
3.2.10. Obrnuto prepisivanje (engl. <i>reverse transcription</i>) izdvojene RNA	22
3.2.11. Određivanje razine ekspresije gena metodom lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja (Real-Time PCR)	23
3.2.12. Razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE	25
3.2.13. Western Blot analiza	26
3.2.14. ELISA metoda	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. NAMNOŽAVANJE I PROČIŠĆAVANJE AdV5, AdV26 i AdV35	29
4.2. USPOREDBA USPJEŠNOSTI TRANDUKCIJE AdV5, AdV26 i AdV35 u THP-1 i RD STANICAMA	31
4.3. USPOREDBA EKSPRESIJE GENA UKLJUČENIH U IMUNOSNI ODGOVOR NAKON INFEKCIJE RD i THP-1 STANICA S AdV5, AdV26 i AdV35	33
4.4. DETEKCIJA IL-6, IL-8 I TNF α U STANIČNOM MEDIJU RD i THP-1 STANICA NAKON INFEKCIJE S AdV5, AdV26 i AdV35	40
4.5. DETEKCIJA PROTEINA UKLJUČENIH U ODGOVOR STANICE NA VIRALNU INFEKCIJU U STANIČNOM LIZATU RD i THP-1 STANICA NAKON INFEKCIJE S AdV5, AdV26 i AdV35	44
5. ZAKLJUČCI	48
6. LITERATURA	49
7. PRILOZI	
7.1. REZULTATI USPJEŠNOSTI TRANDUKCIJE AdV5, AdV26 i AdV35 u THP-1 i RD STANICAMA	
7.2. REZULTATI DETEKCIJE PROTEINA U LIZATU RD i THP-1 STANICA NAKON INFEKCIJE S AdV5, AdV26 i AdV35	

1. UVOD

Genska terapija je proces unošenja gena u organizam u svrhu zamjene oštećenog ili nefunkcionalnog gena koristeći prikladni vektorski sustav koji će omogućiti prijenos i ekspresiju gena kroz određeni vremenski period. Liječenje genskih bolesti na ovaj način započelo je uspješnim liječenjem imunodeficijencija krajem dvadesetog stoljeća, no ubrzo se prijenos gena počeo istraživati i kao pristup u liječenju negenskih bolesti.

Poznavajući biologiju te životni ciklus virusa, upravo su oni odabrani kao jedni od potencijalnih vektora za prijenos gena, budući da u svrhu produkcije vlastitog potomstva i širenja u prirodi vlastiti genom unose u stanicu domaćina. No, kao i u slučaju svakog unošenja stranog antigena u organizam, javlja se odgovor stanice tj. imunski odgovor na virus koji sprečava provedbu prvobitne ideje o prijenosu i ekspresiji novog gena u stanici. Osim imunološkog odgovora, novouneseni gen, ukoliko je riječ o vektoru koji svoj genom ugrađuje u genom domaćina, nespecifično se insertira u kromosom čovjeka što povećava rizik od nastajanja mutacije. Danas se kao vektor u genskoj terapiji najčešće koristi humani adenovirus tipa 5, i to zbog vrlo dobrog poznavanja njegove biologije, neuzrokovanja teških bolesti u ljudi te ugradnje genoma kao episomalnog materijala u jezgru stanice čime se smanjuje rizik od insercijske mutageneze.

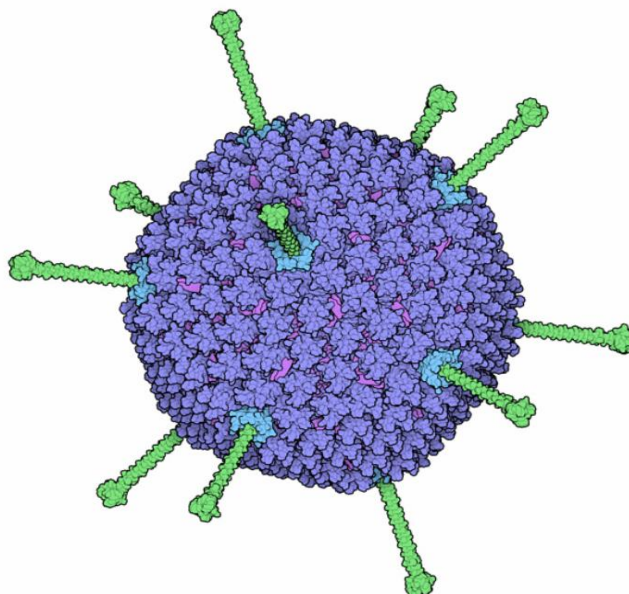
Rekombinantni adenovirusni vektori koriste se u svrhu liječenja genskih bolesti, tumora, infekcija te kao vakcine. Poznavanjem imunološkog odgovora koji je u stanici potaknut doticajem s viralnim vektorom te korištenjem viralnih vektora s niskom seroprevalencijom u populaciji, kao što je adenovirus tipa 26, moguće je predvidjeti nuspojave, povećati sigurnost i efikasnost u liječenju do sada neizlječivih stanja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ADENOVIRUSI: STRUKTURA I GENOM

Adenovirusi su DNA virusi, prvi puta izolirani 1950. godine, a danas su najpoznatiji po keratokonjunktivitisu i infekcijama dišnih putova koje uzrokuju te kao vektori za prijenos gena i vakcinaciju. Adenovirusi nemaju ovojnicu (envelopu), sadrže linearnu dvolančanu DNA veličine 36 kDa koja se ne ugrađuje u genom domaćina te su ikozaedralne strukture, ukupne molekulske mase oko 150 kDa. Ikozaedralna kapsida veličine je od 90 do 100 nanometara. Kapsidu adenovirusa čini 240 heksona i 12 pentona, po jedan penton na svakom od vrhova ikozaedra. Svaki hekson sastoji se od polipeptidnog trimera važnog u sklapanju virusne čestice. Penton čine baza pentona i homotrimerno vlakno (engl. *fiber*) čija uloga je prepoznavanje i interakcija s receptorima na staničnoj membrani domaćina. Vlakno je građeno od tri regije (Viswanathan i sur., 2015): distalne globularne domene (engl. *knob domain*) koja prepoznaje receptore stanične membrane, N-terminalne regije čime se vlakno povezuje s bazom pentona te drške (engl. *shaft*) (Curiel, 2016). Centralna domena vlakna ima važnu ulogu u tropizmu virusa. Sastavljena je od varijabilnog broja ponavljajućih motiva (Chroboczek i sur., 1995), odmiće *knob*-domenu vlakna od površine virusne kapside prema površini stanice domaćina te tako olakšava interakciju s receptorom. Struktura kapside, prikazana na slici 1., određena je *cryo*-elektronskom mikroskopijom i kristalografskim analizama (RCSB PDB-101, 2010).

Adenovirusi pripadaju porodici *Adenoviridae* te je do sada poznato više od 50 serotipova adenovirusa (tablica 1), a broj novoopisanih stalno raste. Tradicionalno su adenovirusi identificirani i sistematizirani pomoću seroloških metoda i na temelju patogenosti, dok se novootkrivene vrste danas klasificiraju pomoću metoda sekvencioniranja genoma (Ghebremedhin, 2014). Trenutno je najistraženiji i najkorišteniji adenovirus tipa 5 (AdV5).

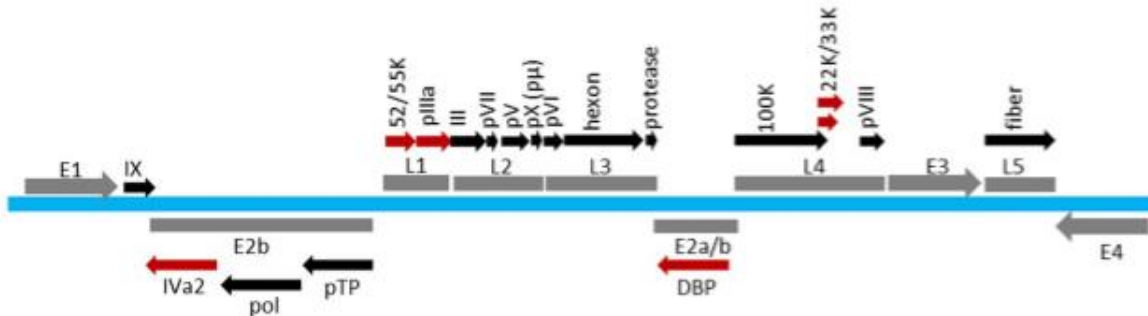


Slika 1. Struktura kapside adenovirusa. Tamnoplavo su označeni heksoni, svjetloplavo baze pentona, a zeleno vlakna (RCSB PDB-101, 2010).

Tablica 1. Serotipovi adenovirusa podijeljeni u podgrupe i najčešće vrste infekcija koje uzrokuju (Ghebremedhin, 2014).

AdV podgrupa	Serotip	Vrsta infekcije
A	12, 18, 31	gastrointestinalna, respiratorna, urinalna
B, tip 1	3, 7, 16, 21	keratokonjuktivitis, gastrointestinalna, respiratorna, urinalna
B, tip 2	11, 14, 34, 35	gastrointestinalna, respiratorna, urinalna
C	1, 2, 5, 6	respiratorna, gastrointestinalna uključujući hepatitis, urinarna
D	8–10,13,15,17,19,20,22–30,32,33,36–39,42–49	keratokonjuktivitis, gastrointestinalna
E	4	keratokonjuktivitis, respiratorna
F	40, 41	gastrointestinalna
G	52	gastrointestinalna

Genom adenovirusa sastoji se od linearne, nesegmentirane dvolančane DNA. Genom je značajno veći nego kod drugih virusa (36 kB), iako se virus smatra jednostavnim zbog ovisnosti o stanici domaćina u procesu replikacije DNA. Na krajevima linearne DNA nalazi se terminalni 5' protein mase 55 kDa koji ima funkciju primera kod replikacije viralnog genoma. Terminalne sekvence prisutne na 5' i 3' kraju invertne su ponavljanja od oko 100 kB (Medscape, 2018). Genom se sastoji od pet ranih (E1A, E1B, E2, E3, E4), četiri intermedijarnih (IVa2, IX, VAI, VAI1) i jedne kasne transkripcijske jedinice. Prva regija, čija transkripcija se odvija po ulasku genoma virusa u jezgru domaćina, jest E1A, a proteinski produkt transkripcije aktivira ostale viralne gene koji reguliraju viralnu transkripciju (Sundararajan i sur., 2001). E1B proteini omogućavaju preživljenje inficiranoj stanici, inhibirajući proteine odgovorne za apoptozu stanice. E2A regija kodira virusnu DNA polimerazu te druge proteine odgovorne za replikaciju viralnog genoma. E3 regija kodira za proteine čija je funkcija utišavanje imunskog odgovora domaćina. Produkti E4 regije reguliraju stanični ciklus domaćina. Kasni geni kodiraju proteine kapside te su transkribirani s kasnog promotora, engl. *major late promoter* (Majhen i sur., 2014) (slika 2).



Slika 2. Transkripcijska mapa adenovirusa. Viralni genom obojan je plavo. Rane (E, eng. *early*) i kasne (L, eng. *late*) regije prikazane su sivo. Eksprimirani proteini navedeni su ispod ili iznad kodirajućih regija (crno). Faktori uključeni u pakiranje virusnih čestica prikazani su crveno (Ahi i Mittal, 2016).

2.2. ULAZAK ADENOVIRUSA U STANICU I INFEKCIJA

Put infekcije adenovirusom sastoji se od nekoliko događaja: vezanje adenovirusa za receptor na površini ciljne stanice, internalizacija adenovirusne čestice u stanicu, unutarstanično putovanje adenovirusa i konačno ulazak adenovirusnog genoma u jezgru stanice domaćina (Nemerow i sur., 2009). Shema ulaska adenovirusa u ciljnu stanicu prikazana je na slici 3.

Adenovirus se za receptor na površini stanice veže putem vlakna. Visoko afinitetni receptor do sad najbolje opisanog AdV5 je *coxsackie adenovirus receptor* (CAR) koji je odgovoran za vezanje svih adenovirusnih serotipova osim serotipa podgrupe B (Bergelson i sur., 1997). CAR je eksprimiran na površini većine stanica čovjeka, no smanjene je ekspresije na stanicama tumora (Sachs i sur., 2002; Fuxe i sur., 2003), zrelih stanicama skeletalnih mišića (Nalbantoglu i sur., 1999), te na apikalnoj površini polariziranih epitelnih stanica (Walters i sur., 1999; Majhen i sur., 2014). Osim CAR, adenovirusi mogu koristiti i druge molekule kao receptore za vezanje i ulazak u stanicu, kao što su: integrini, CD46, desmogelin-2 (DSG2) i sialična kiselina (Curiel, 2016). Tako npr. adenovirusi podgrupe B mogu za vezanje koristiti CD46 ili desmogelin-2. Molekule koje za vezanje koriste adenovirusi podgrupe D slabije su opisane i uključuju CAR, CD46 i sialičnu kiselinu. CD46 inhibira aktivaciju komplementa i prisutan je na svim stanicama s jezgrom (Cole i sur., 1985).

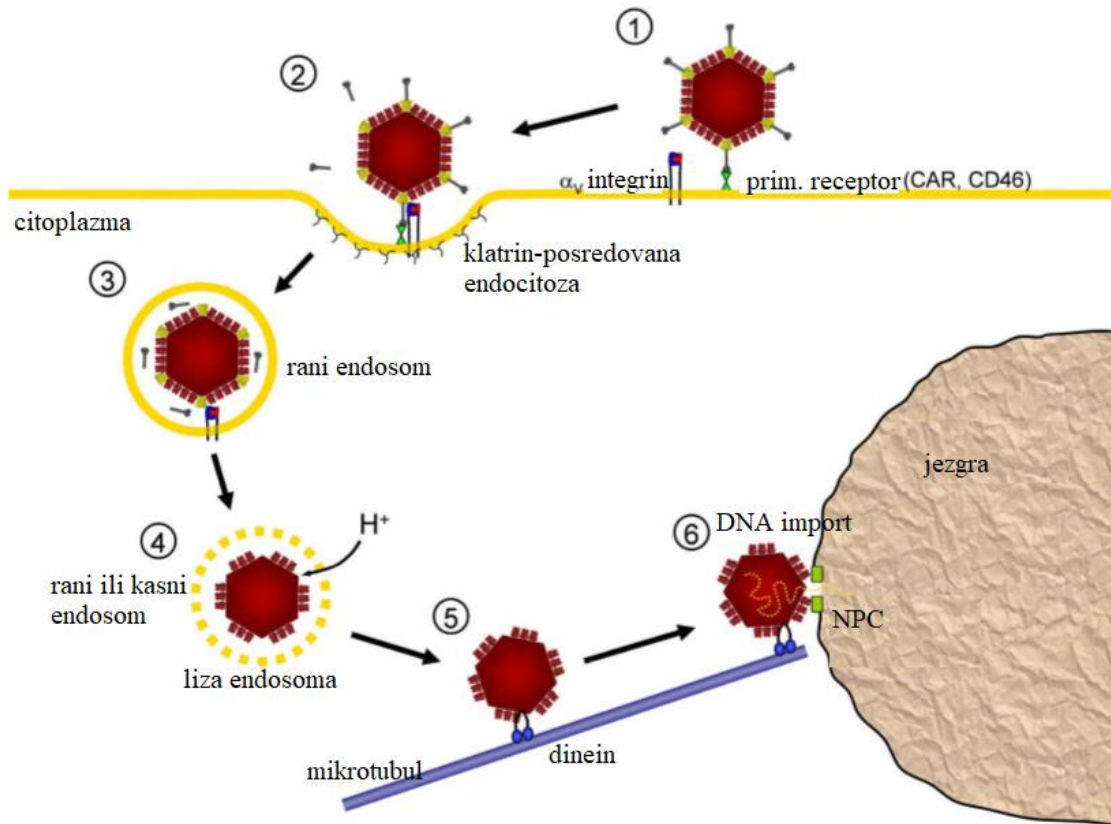
Nakon početnog vezanja na primarni receptor slijedi internalizacija adenovirusne čestice potaknuta vezanjem RGD slijeda iz baze pentona i αv integrina na površini stanice. Integrini su internalizacijski i signalni koreceptori većini adenovirusa, osim serotipovima 40 i 41 kojima nedostaje RGD slijed u bazi pentona (Wolfrum i Greber, 2012; Arnberg 2012). Integrini prenose signale između stanica, reguliraju preživljenje stanica, migraciju i diferencijaciju (Byron i sur., 2010). Najbolje proučene interakcije adenovirusa s integrinima odnose se na integrine $\alpha v\beta 3$ i $\alpha v\beta 5$. Čak i u nedostatku CAR receptora, integrini mogu poslužiti kao receptori za vezanje virusa na stanicu (Huang, 1996; Roelvink, 1996; Curiel, 2016).

Za ulazak u stanicu adenovirusi koriste endocitozu stanice i to klatrinom-posredovanu endocitozu, makropinocitozu ili endocitozu posredovanu masnim uklopinama. Klatrinom-posredovana endocitoza inicirana je na specijaliziranim domenama stanične membrane bogate fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfatima. U oblikovanje membrane za proces endocitoze u polariziranim stanicama uključen je aktin, međutim aktin ne sudjeluje u endocitozi nepolariziranih stanica.

Adenovirusi podgrupe C serotipa 2 i 5 ulaze u stanice endotela klatrinom- i dinaminom-posredovanom endocitozom (Curiel, 2016). Makropinocitoza je proces uzimanja velikih količina izvanstanične tekućine u obliku velike unutarstanične vakuole (makropinosoma) koja može sazrijeti u kasni endosom (Swanson, 2008). Konstitutivna makropinocitoza pridonosi prezentaciji antigena u makrofagima i dendritičkim stanicama. Adenovirusi podgrupe B, serotipa 3 te 35 koriste makropinocitozu prilikom infekcije hematopoetskih i nepolariziranih epitelnih stanica (Amstutz i sur., 2008; Kalin i sur., 2010; Curiel, 2016). Za AdV37 koji pripada podgrupi D je pokazano da za ulazak u stanicu može koristiti i kaveolin-1 pozitivne masne uklopine (Yousuf i sur., 2013). Procesom endocitoze, stanična membrana ostaje nenarušena te na površini stanice nema naznake o viralnoj infekciji (Curiel, 2016).

Da bi mogao doći do jezgre, adenovirus se mora osloboditi iz endosoma. Uslijed promjene pH vrijednosti endosoma dolazi do djelomične razgradnje kapside adenovirusa. Tijekom procesa rasklapanja virusne čestice (engl. *uncoating*), protein kapside, protein VI, narušava membranu endosoma te se virus oslobađa u citoplazmu stanice. Nakon oslobađanja iz endosoma adenovirus susreće složenu mrežu organela i proteina u citoplazmi koja onemogućava slobodno difuzno kretanje virusa. Stoga se citoplazmatski transport adenovirusa odvija mikrotubulima, polariziranim filamentima građenima od α - β heterodimera. Adenovirusi iskorištavaju motorni kompleks dinein-dinaktin kako bi dosegli jezgru.

Na jezgrinim porama, NPC (eng. *nuclear pore complex*) adenovirusna DNA u kompleksu s proteinom VIII ulazi u jezgru (Wolfrum i Greber, 2012). Životni ciklus adenovirusa u prosjeku traje 24 do 36 sati, dok infekcija jedne stanice jednom virusnom česticom rezultira proizvodnjom novih 10^4 viriona (Curiel, 2016).



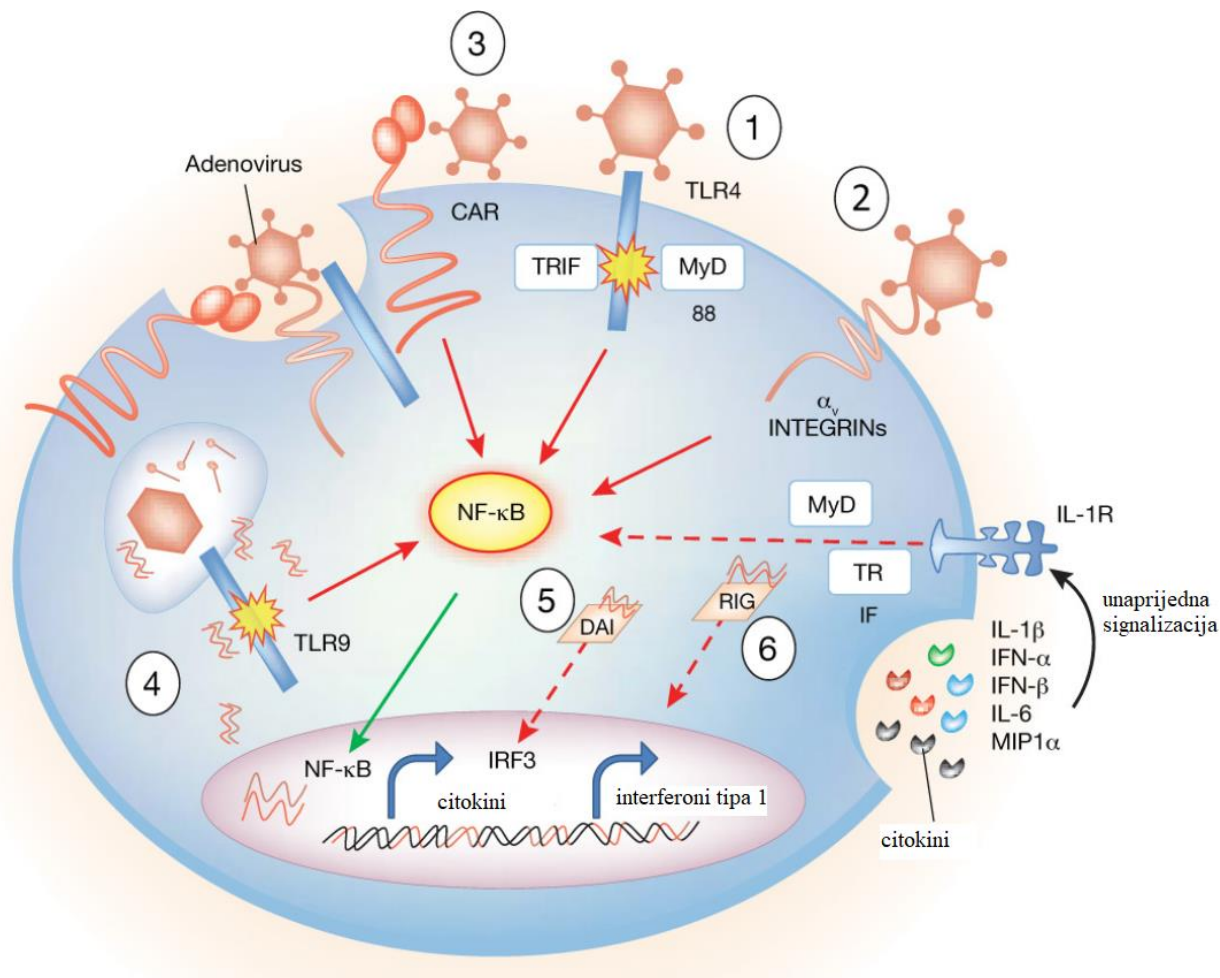
Slika 3. Put ulaska adenovirusa u stanicu. Prvi korak uključuje vezanje vlakna na primarni receptor, koji je za većinu adenovirusa CAR ili CD46. U slučaju CAR vezujućih adenovirusa slijedi klatrinom-posredovana endocitoza, potaknuta interakcijom baze pentona s α_v integrinima.

Koraci 3 i 4 prikazuju smanjivanje pH vrijednosti u endosomima čiji rezultat je oslobađanje proteina VI koji uzrokuje pucanje endosomalne membrane te oslobađanje viriona iz endosoma. Virion se kroz citoplazmu transportira mikrotubulskim motorom dineinom, dok ne dosegne NPC u koraku 5. Virusna DNA se u sljedećem koraku unosi u jezgru (Nemerow i sur., 2009).

2.3 POTICANJE IMUNOSNOG ODGOVORA ADENOVIRUSIMA

Urođeni ili nespecifični imunosni odgovor skup je stanica i mehanizama koji čine prvu liniju obrane organizma od patogena od trenutka doticaja patogena s organizmom. Nespecifični imunosni odgovor, za razliku od stečenog ili humoralnog, ne „pamti“ antigene s kojima je došlo do doticaja.

Infekcija adenovirusima potiče urođeni imunosni odgovor u stanicama sisavaca. Infekcija inducira produkciju brojnih kemokina i citokina koji moduliraju početak upale. Adenovirusi aktiviraju citokine kao što su faktor nekroze tumora α (TNF α), interleukine (IL) 6, 1, 12, interferone (IFN) tipa 1 te kemokine (npr. IL-8). Imunosni odgovor izazvan adenovirusom induciran je samim prisustvom virusa, prepoznavanjem putem PRR-a (engl. *pattern recognition receptors*) na površini stanice ili interakcijom virusa s receptorima na površini stanice. Interakcija vlakna s CAR aktivira kaskadu signala koja dovodi do povećane ekspresije određenih proteina uključenih u imunosni odgovor (npr. IL-8) (Tamanini i sur., 2006). Po internalizaciji u endosome, viralna DNA može biti prepoznata od strane TLR (engl. *tool like receptors*), čija aktivacija opet rezultira prijenosom signala koji će potaknuti imunosni odgovor, konkretno lučenje interferona (Basner-Tschakarjan i sur., 2006; Zhu i sur., 2007). Zbog penetracije membrane endosoma, adenovirus aktivira otpuštanje IL-1 β (Barlan i sur., 2011), a „bijeg“ adenovirusa u citoplazmu uzrokuje aktivaciju IFN tipa 1 koji može biti IRF3 (interferon regulatorni faktor 3) (Nociari i sur., 2007) ili IRF7 (Fejer i sur., 2008) ovisan. Shema aktivacije urođenog imunosnog odgovora prikazana je na slici 4.

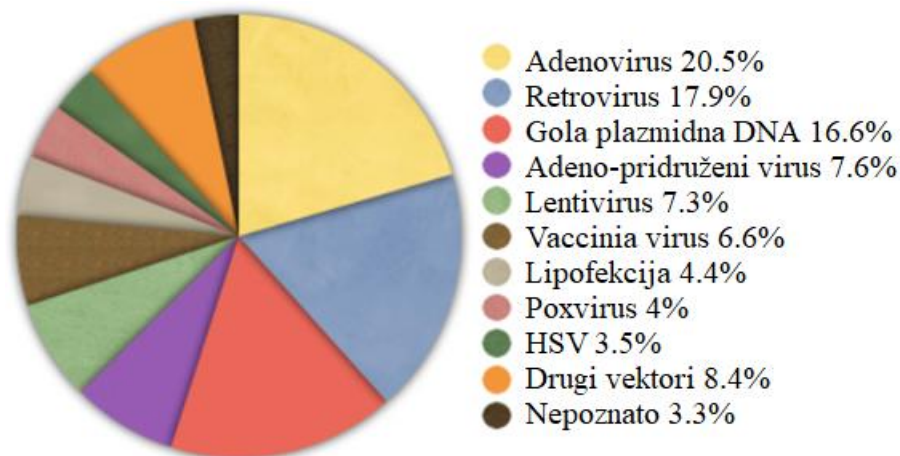


Slika 4. Aktivacija PRR adenovirusom podgrupe C. Vezanje adenovirusa na različite receptore na površini stanice (1, 2 i 3), prepoznavanje viralne DNA (4), DNA-ovisna aktivacija IFN-regulatornih faktora, RIG-1 i PRR posredovan prijenos signala što rezultira aktivacijom NF-κB i produkcijom interferona, citokina i kemokina koji dodatno aktiviraju imunski odgovor (5, 6) (Suzuki i Rooney, 2012).

Osim urođenog, adenovirusi potiču i stečeni imunski odgovor koji uključuje limfocite, T- i B-stanice koje proizvode visokospecifična protutijela protiv patogena s kojim je organizam bio u doticaju te zbog kojih organizam „pamti“ antigene i sprečava ponovnu infekciju istima. T-stanice aktivirane su ubrzo po infekciji. CD4+ i CD8+ receptori na T-stanicama prepoznaju epitope heksona adenovirusa i njihovo koordinirano djelovanje kontrolira adenovirusnu infekciju (Zandvliet i sur., 2010; Majhen i sur., 2014).

2.4. ADENOVIRUSNI VEKTORI

Vektori za prijenos gena mogu biti viralni i neviralni. Najčešći viralni vektori su adenovirusi, retrovirusi i lentivirusi, od kojih su najučestaliji adenovirusi koji se koriste kao vektori za prijenos gena u genskoj terapiji i vakcinaciji te u više od 20% kliničkih ispitivanja genske terapije (slika 5).



Slika 5. Vektori korišteni u kliničkim pokusima genske terapije (The Journal of Gene Medicine, 2017).

Adenovirusni vektori inficiraju stanice koje se aktivno dijele te stanice u mirovanju, moguće ih je uzgojiti do visokog titra te imaju veliki kapacitet za ugradnju transgena. Genom adenovirusa se ne ugrađuju u genom domaćina, već se replicira kao ekstrakromosomski element što smanjuje rizik od insercijske mutageneze, no iz istog razloga ekspresija transgena je kratkoročna. Postoji nekoliko načina konstrukcije adenovirusnih vektora. Rekombinantni adenovirusni vektori prve i druge generacije konstruiraju se na način da se željeni fragment DNA ugrađuje na mjesto jedne od postojećih regija prisutnih u genomu adenovirusa (E1, E3 ili kratke regije između E4 i desnog invertnog terminalnog ponavljanja). Delecijom E1 regije, odgovorne za replikaciju adenovirusnog genoma, konstruira se replikacijski defektan adenovirusni vektor te je veličina strane DNA koju je moguće ugraditi do 6.5 kB, dok virus bez tih regija i dalje može ostvariti vektorsku ulogu. Produkcija takovih adenovirusnih vektora odvija se u komplementirajućim staničnim linijama u čiji genom je ugrađen virusni transgen, u ovome slučaju E1 regija adenovirusa. Primjer komplementirajuće stanične linije su stanice embrionalnog bubrega čovjeka

(HEK-293) (Graham i sur., 1977). Delecija većeg dijela adenovirusnog genoma znači mogućnost ugradnje većeg fragmenta strane DNA (transgena). Adenovirusni vektori ovisni o pomoćničkom adenovirusu od adenovirusnog genoma sadrže samo terminalna obrnuta ponavljanja u kojima je sadržan signal za pakiranje virusne čestice. Pomoćni virus sadrži ostatak virusnog genoma, izuzev obrnutih terminalnih ponavljanja. Uvjetno replikacijski ili onkolitički adenovirusni vektori imaju sposobnost replikacije samo u stanicama tumora (Majhen i sur., 2014).

Jedan od problema prijenosa gena korištenjem adenovirusnih vektora je postojanje neutralizacijskih protutijela po infekciji adenovirusom, što sprečava korištenje istog vektora u više navrata. Činjenica je da je veliki udio populacije barem jednom tijekom života bio u doticaju s AdV5, najčešće korištenim adenovirusom u kliničkim pokusima, čime je došlo do stvaranja neutralizacijskih protutijela usmjerenih protiv AdV5, tj. seroprevalencija za AdV5 je u populaciji vrlo visoka. Međutim, seroprevalencija za neučestale adenoviruse kao što su AdV26 i AdV35 je vrlo niska na sjevernoj hemisferi.

Prethodno korištenju adenovirusa kao vektora za prijenos gena ili vakcinaciju potrebno je prevladati probleme vezane uz imunogenost. Adenoviralni proteini procesiraju se u citoplazmi stanice te se prezentiraju na njenoj površini, što pak prepoznaju citotoksični T-limfociti. Zbog navedenog procesa, adenovirusni vektori uvelike su korisni u slučaju kad je potrebna kratkotrajna ekspresija transgena, ili kada je cilj potaknuti imunosni odgovor kao što je to u slučaju vakcinacije. Potencijalna rješenja problema su imunosupresivni lijekovi ili unos imunomodulatornih gena kao transgena, no iako bi takav pristup produžio ekspresiju transgena, cilj je ipak modulirati vektor, a ne domaćina tj. pacijenta (Verma i Somia, 1997). Rana indukcija citokina nakon primjene adenovirusnog vektora *in vivo* sugerira da urođeni imunosni odgovor pridonosi regulaciji ekspresije transgena unesenog adenovirusnim vektorom (Sung i sur., 2001). Rekombinantni adenovirusni vektori konstruirani iz različitih serotipova adenovirusa induciraju međusobno različite puteve imunosnog odgovora (Majhen i sur., 2014). Za rješavanje problema visoke seroprevalencije koriste se neučestali serotipovi adenovirusa, AdV26 i AdV35 koji se od AdV5 razlikuju prema duljini (AdV5 ima najduže vlakno od navedenih), 3D strukturi te fleksibilnosti vlakna. AdV26 i AdV35 trenutno se ispituju u kliničkih pokusima.

Prva *in vivo* primjena adenovirusa u genskoj terapiji zabilježena je 1992. godine, uspješnim transferom i ekspresijom cDNA A1AT gena (α_1 -antitripsin) u hepatocitima pacijenta s α_1 -

antitripsin deficijencijom (Jaffe i sur., 1992). Danas se oni koriste na različite načine u genskim terapijama za monogenetske bolesti, kao antitumorski agensi te kao vakcine. Neki od primjera navedeni su u nastavku.

Replikacijski defektni adenovirusni vektori, zbog svojih imunogenih svojstva, mogu se koristiti za prijenos gena ili epitopa u stanice tumora koji će inducirati lokalni antitumorski imunosni odgovor. Onkolitički adenovirusni vektori repliciraju se u tumorskim stanicama i time liziraju tj. uništavaju tumorsku stanicu. Replikacijski defektni i kompetentni vektori također se koriste i za prijenos i povećanu ekspresiju tumor-supresora ili gena koji induciraju citotoksičnu kaskadu i izazvaju apoptozu (Lee i sur., 2017).

Za razliku od tradicionalnih vakcina, imunizacijske tehnike pomoću rekombinantnih viralnih vektora izazivaju i humoralni i citotoksični stanični imunosni odgovor. Citotoksični T-limfociti efikasniji su u uništavanju inficiranih stanica, intracelularnih patogena i tumorskih stanica te također pružaju zaštitu od sličnih patogena koji ekspimiraju homologne epitope (Wei i sur., 2010). Posljednjih godina, razvijanje vakcine protiv ebole postalo je prioritet zbog pojava epidemije 2014. godine. Među trima ključnim vakcinama, određenima od strane Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), dva su temeljena na adenovirusnim vektorima (Mennechet, 2015; Lee i sur., 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Tablica 2. Popis korištenih kemikalija i pufera

Naziv	Proizvođač
Agaroz	Sigma-Aldrich, Njemačka
Akrlamid smjesa 30%	Serva, Njemačka
APS, Amonijev persulfat 10%, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Serva, Njemačka
Bisakrilamid, $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$	Serva, Njemačka
BSA, Goveđi serumski albumin (engl. <i>Bovine Serum Albumine</i>)	Macherey-Nagel, Njemačka
Cezijev klorid (CsCl)	Sigma-Aldrich, Njemačka
CsCl otopina gustoće 1,25 g/mL	36,16 g CsCl u 100 mL TD pufera
CsCl otopina gustoće 1,34 g/mL	51,20 g CsCl u 100 mL TD pufera
CsCl otopina gustoće 1,40 g/mL	62,00 g CsCl u 100 mL TD pufera
DMEM, Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Invitrogen, SAD
DMSO, Dimetil sulfoksid, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	Gram Mol, Hrvatska
Etidij bromid, EtBr	Serva, Njemačka
FBS, Serum fetusa goveda (engl. <i>fetal bovine serum</i>)	Invitrogen, SAD
Fiksir	Fotokemika, Hrvatska
Glicerol	Kemika, Hrvatska
IsoFlow tekućina (engl. <i>IsoFlow Sheath Fluid</i>)	Beckman Coulter Inc., SAD
Marker za gel-elektroforezu 1 kB	Thermo Scientific, SAD
Mlijeko u prahu	Roth, Njemačka
Orange G boja	Merck, Njemačka
Paraformaldehid, PFA	Invitrogen, SAD
PBS, Fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)	Lonza, Švicarska
Proteinski marker za SDS-ef.	Thermo Scientific, SAD
Pufer za nanošenje uzoraka DNA u agarozni gel, 6x	50% glicerol, 20 mM EDTA, 0,25% Orange G

Razvijatelj	Fotokemika, Hrvatska
RPMI 1640 medij s L-glutaminom BioWhittaker™ (engl. <i>RPMI 1640 Medium with L-glutamine</i>)	Lonza, Švicarska
SB (engl. <i>sample buffer</i>), 6x	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-merkaptetanol u 10 ml diH ₂ O
SDS, Natrij-dodecil sulfat, NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	Sigma-Aldrich, SAD
SYBR™ Green PCR Master Mix	Thermo Fischer Scientific, SAD
TAE pufer, 50x	242 g Tris baza, 57,1 mL ledene octene kis., 100 mL 0,5 M, pH 8,0, otopiti u 1 L diH ₂ O
TBS pufer	0,6 g 10 mM Tris; 4,38 g 150 mM NaCl u 500 ml diH ₂ O
TD pufer	8 g NaCl i 0,38 g KCl u 150 mL diH ₂ O, doda se 0,1 g Na ₂ HPO ₄ i 3 g Tris baze, u 500 mL diH ₂ O, pH 7.4-7.5, do 1 L s diH ₂ O
TEMED, N, N, N', N'-tetrametiletilenediamin, C ₆ H ₁₆ N ₂	Sigma-Aldrich, SAD
Transfer pufer	50 ml Tris-glicinski pufer pH 8,3; 350 ml biH ₂ O; 100 ml etanol
Tripsin	Invitrogen, SAD
Tris-glicinski pufer	10x pufer: 15,1 g Tris; 72,1 g glicin; 5 g SDS u 500 ml biH ₂ O
Tris-HCl, Tris-klorovodična kiselina	Merck, SAD
Tween-20®, C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Sigma-Aldrich, SAD
Virocid 1%	Genera, Hrvatska
<i>Western Lightening Plus ECL Enhanced Luminol Reagent Plus</i>	PerkinElmer®, SAD
<i>Western Lightening Plus ECL Oxidizing Reagent Plus</i>	PerkinElmer®, SAD
β-merkaptetanol	Serva, Njemačka

Tablica 3. Popis korištenih protutijela

Protutijelo	Specifičnost	Proizvođač	Kat.broj i razrjeđenje
Primarna Protutijela	Kaspaza-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-56036, 1:200
	α tubulin	Santa Cruz Biotechnology	sc-5286, 1:250
	I κ b- α	Santa Cruz Biotechnology	sc-1643, 1:200
	IL-1 β	Santa Cruz Biotechnology	sc-32294, 1:200
	IRF-3	Cell Signaling Technology	#11904, 1:1000
	pIRF-3	Cell Signaling Technology	#29047, 1:1000
	IRF-7	Cell Signaling Technology	#13014, 1:1000
	pIRF-7	Cell Signaling Technology	#12390, 1:1000
Sekundarna Protutijela	ECL™ Anti-miš IgG	GE Healthcare Life Sciences	NA931V, 1:5000
	Anti-zec IgG	Invitrogen	#31466, 1:5000

Tablica 4. Popis korištenih početnica

GEN	Forward	Reverse
IL-6	CAATGAGGAGACTTGCCTGG	GCACAGCTCTGGCTTGTTC
IL-8	GTTTTTGAAGAGGGCTGAGAATTC	GTTTTTGAAGAGGGCTGAGAATTC
IL-1β	AAACAGATGAAGTGCTCCTTCC	AAGATGAAGGGAAAGAAGGTGC
TNFα	TTGACCTCAGCGCTGAGTTG	CCTGTAGCCCACGTCGTAGC

3.1.2. Uređaji i pomagala

Tablica 5. Korišteni uređaji i pomagala

Naziv	Proizvođač
Bočice za uzgoj stanica, T-25 i T-75	Falcon Becton Dickinson, SAD
Brojač stanica	Beckman Coulter, Ujedinjeno Kraljevstvo
Centrifuga do 50 mL	Heraeus, Njemačka
Epruvete Ultra-Clear 344059	Beckman, SAD
Fotografski film	GE Healthcare Limited, UK
Gumena strugalica	Falcon Becton Dickinson, SAD
Igla za nanošenje uzoraka u gel	Hamilton, Švicarska
Igla za pročišćavanje virusa	Merck, Švicarska
Inkubator za uzgoj stanica	Thermo Scientific, SAD
Invertni svjetlosni mikroskop	Opton, Njemačka
Kabinet za sterilan rad	Klimaoprema, Hrvatska
Kolona Sephadex G25M	GE Healthcare Life Sciences, Velika Britanija
Mikroepruvete	Eppendorf, Njemačka
Mikrovalna pećnica	Končar, Hrvatska
Nitrocelulozna membrana s porama 0,45 µm	Sigma-Aldrich, Njemačka
Pločice s 96 bunarića	Thermo Scientific, SAD
Pločice za uzgoj stanica sa 6 i 12 bunarića	Falcon Becton Dickinson, SAD
Rotamix 560 MMH, magnetska mješalica	Tehtnica, Slovenija
Sonifikator	Cole Palmer, SAD
Spektrofotometar Nanodrop	Thermo Scientific, SAD
StepOnePlus RT-PCR <i>Applied biosystems</i>	Thermo Fischer Scientific, USA
Stolna centrifuga	Eppendorf, Njemačka
Sustav za horizontalnu elektroforezu	Bio-Rad, SAD
Termoblok	Eppendorf, Njemačka
Transiluminator	Vilber Lourmat, Njemačka
Transiluminator Uvitec	Cleaver Scientific, UK

Ultracentrifuga	Beckman, SAD
Vaga	Tehtnica, Slovenija
Vodena kupelj	Tehtnica, Slovenija
Vrtložna mješalica	Tehtnica, Slovenija

3.1.3. Stanične linije

Korištene stanice u ovome radu su stanice bubrega embrija čovjeka (engl. *human embryonal kidney*, HEK-293, ATCC® CRL-1573™), stanice rabdomyosarkoma čovjeka (engl. *rhabdomyosarcoma*, RD, ATCC® CCL-136™), monociti periferne krvi čovjeka (engl. *monocytes*, THP-1, ATCC® TIB-202™).

3.1.4. Replikacijski defektni adenovirusi

U ovom radu korišteni su replikacijski defektni adenovirusi serotipa 5, 26 i 35 s transgenom eGFP pod CMV promotorom. Korišteni vektori prethodno su konstruirani i opisani (Abbink i sur., 2007; Vogels i sur., 2003).

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj stanica

Adherentne stanice korištene u ovom radu (HEK-293 i RD) uzgajane su u monosloju u Petrijevim zdjelicama promjera 10 cm, u DMEM podlogi za uzgoj stanica uz dodatak 10% seruma fetusa goveda, u inkubatoru za uzgoj stanica pri stalno održavanoj temperaturi od 37 °C, u atmosferi s 5% CO₂ u smjesi zraka uz održavajnje vlažnih uvjeta. Nakon što stanice prerastu podlogu za rast, presađuju se u novu Petrijevu zdjelicu. Sa stanica se uklanja medij te se dva puta ispiru sa po 1 mL PBS-a, nakon čega se dodaje 1 mL tripsina. Stanice se inkubiraju u inkubatoru za uzgoj stanica sve dok do odlijepljivanja od podloge, što je vidljivo svjetlosnim mikroskopom (stanice se djelovanjem tripsina “zaokruže” i odvoje od podloge tj. “plivaju” u tripsinu). Dodaje se 9 mL medija za uzgoj stanica i sastav Petrijeve zdjelice razdjeli se na željeni broj novih Petrijevih zdjelica, te se u svakoj volumen nadopuni do 10 mL medijem za uzgoj stanica.

Suspenzijska stanična linija THP-1 uzgajana je u T-25 Falcon boci u 5 do 20 mL RPMI medija uz dodatak 10% seruma fetusa goveda i 1 μL 0,05 M β-merkaptotetanolu po mililitru medija, u inkubatoru za uzgoj stanica na stalno održavanoj temperaturi od 37 °C, u atmosferi s 5% CO₂ u smjesi zraka uz održavajnje vlažnih uvjeta. Prije nego što broj stanica dosegne 8×10^5 stanica mL⁻¹ (određivano brojačem stanica), dodaje se svježi medij za uzgoj stanica. Jednom tjedno medij za uzgoj stanica zamjenjuje se centrifugiranjem 10 min pri $1100 \times g$ te resuspendiranjem taloga stanica u svježem mediju. Koncentracija ne smije prijeći 1×10^6 stanica mL⁻¹.

3.2.2. Odmrzavanje i zamrzavanje stanica

Stanice se čuvaju u ampulama u tekućem dušiku. Pri odmrzavanju, ampula se zagrije pri 37 °C te se stanice resuspendiraju u ukupnom volumenu od 10 mL u Petrijevoj zdjelici i uzgajaju u inkubatoru za uzgoj stanica pri 37 °C.

Suspenzijske stanice se pri odmrzavanju zagriju pri 37 °C i resuspendiraju u 5 mL odgovarajućeg medija za uzgoj stanica. Stanice se centrifugiraju pri $1100 \times g$ 10 min te se talog resuspendira u konačnom volumenu medija za uzgoj stanica i prebaci u T-bocu.

Suspenzijske i adherentne stanice zamrzavaju se na isti način. Suspenzija stanica, u slučaju adherentnih stanica nakon odvajanja od podloge prema prethodno opisanom protokolu,

centrifugira se u plastičnoj epruveti pri $1100 \times g$ te se talog resuspendira u $950 \mu\text{L}$ odgovarajućeg medija za uzgoj stanica i $50 \mu\text{L}$ DMSO-a. Stanice se prebace u ampulu za smrzavanje, koja se stavlja 30 minuta na led te se potom smrzavaju u parama tekućeg dušika. Sljedeći dan ampule se spremaju u spremnik s tekućim dušikom.

3.2.3. Namnažanje i pročišćavanje adenovirusa

Za umnažanje replikacijski defektnih adenovirusnih vektora koriste se HEK-293a stanice koje u svom genomu imaju stabilno ugrađeno E1 područje adenovirusnog genoma. Za svaku preparaciju virusa HEK-293a stanice namnožene su u 40 Petrijevih zdjelica promjera 10 cm i inficirane suspenzijom virusa tako da je multiplicitet infekcije 5-10 BFU (engl. *blue forming unit*) po stanici. Inficirane stanice inkubiraju se u inkubatoru za uzgoj stanica do postizanja potpunog citopatogenog učinka tj. odvajanja stanica od podloge kao posljedica infekcije virusom (najčešće 48 do 72 sata nakon infekcije). Stanice se skupljaju pipetom te se u epruveti centrifugiraju tijekom 10 min pri $1100 \times g$. Ukupni talog stanica resuspendira se u što manje mogućem volumenu medija DMEM-FBS i tri se puta smrzava (-20°C) i odmrzava (37°C) u svrhu lize stanica kako bi se virusi oslobodili iz stanica. Centrifugiranjem tijekom 10 min pri $3600 \times g$ odvajaju se grubi raspadnuti ostaci stanica (talog) i oslobođene virusne čestice (supernatant). Adenovirusni vektori iz supernatanta se dalje pročišćavaju u dva koraka: prvo na jastučiću CsCl, a potom u gradijentu CsCl. Pročišćavanje na jastučiću CsCl započinje tako da se u epruvetu za centrifugiranje dodaje $2,4 \text{ mL}$ CsCl gustoće $1,4 \text{ g mL}^{-1}$ i na njega nježno uz stijenku nadsloji $2,4 \text{ mL}$ CsCl gustoće $1,25 \text{ g mL}^{-1}$ pazeći da ne dođe do miješanja slojeva. Nadalje se u epruvetu za centrifugiranje dodaje supernatant lizata stanica s oslobođenim virusnim česticama i potom se do vrha epruvete dodaje DMEM-FBS medija za uzgoj stanica. Uzorci se centrifugiraju u Beckman ultracentrifugi u rotoru SW41Ti tijekom jednog sata i 45 minuta pri 20°C i $60\,000 \times g$. Nakon centrifugiranja vidljiv je sloj virusa kao bijela zona na granici između dva sloja CsCl, a moguća je i pojava drugog sloja s nepotpunim virusnim česticama (npr. prazna kapsida). Sloj virusa se pažljivo pomoću šprice s iglom pokupi u što manjem volumenu (idealno do $1,5 \text{ mL}$) i pomiješa u novoj epruveti za centrifugiranje s cezijevim kloridom gustoće $1,34 \text{ g mL}^{-1}$ do vrha epruvete za centrifugiranje. Uzorci se centrifugiraju u Beckman centrifugi u rotoru SW41Ti preko noći pri 20°C i $60\,000 \times g$. Tijekom centrifugiranja stvara se gradijent gustoće CsCl i virusi se zaustavljaju u području koje je

jednake gustoće kao i gustoća virusa. Pomoću šprice s iglom virusi se skupljaju u novu epruvetu, a potom se CsCl uklanja tehnikom gel-filtracije u koloni Sephadex G-25M. Kolona se pričvrsti za stalak, vrh joj se odreže škarama i potom se odčepi s gornje strane kako bi tekućina sama iscurila iz kolone. Potom se kolona 6 puta ispiru s po 5 mL pufera PBS nakon čega se na kolonu dodaje pročišćeni virus (ne više od 1 mL) i u mikroeprevetu se skupi eluat (frakcija 0). Nadalje se dodaje po 0,5 mL pufera PBS na kolonu, pritom skupljajući frakcije u brojem obilježene mikroeprevete. Frakcije u kojima se nalazi virus se skupe te im se dodaje glicerol tako da mu konačan volumni udio bude 10%. Suspenzija virusa se razdijeli u alikvote i smrzava pri -80 °C.

3.2.4. Određivanje koncentracije adenovirusnih čestica u suspenziji pročišćenih adenovirusa

Za određivanje koncentracije virusnih čestica u suspenziji pročišćenih adenovirusa koristi se metoda Mitteredera i sur. (1996). Pripremljeno 10× razrjeđenje pročišćenih virusa u PBS puferu i 0,1% natrij dodecilsulfata (SDS) inkubira se 10 min pri 56 °C da bi se oslobodila virusna DNA iz kapsida. Mikroeprevete s uzorcima kratko se centrifugiraju (30 s) pri 10000 × g te se mjeri apsorbanacija supernatanta pri 260 nm prema PBS puferu.

Koncentracija virusnih čestica se računa prema formuli:

$$N = A_{260} \cdot r \cdot 1,1 \cdot 10^{12}$$

N – broj virusnih čestica u mL

A₂₆₀ – izmjerena apsorbanacija pri 260 nm

r – razrjeđenje suspenzije adenovirusa

3.2.5. Transdukcija

Za utvrđivanje uspješnosti transdukcije RD stanica različitim serotipovima adenovirusa, korišteni su virusni vektori koji kao transgen eksprimiraju zeleni fluorescentni protein (GFP), te su stanice po infekciji analizirane protočnom citometrijom. 1 × 10⁵ stanica nasađeno je po jednom bunariću pločice sa 6 bunarića u ukupnom volumenu od 2 mL. Sljedećeg dana stanice se inficiraju s 1 × 10⁴ viralnih čestica po stanici u ukupnom volumenu od 2 mL i inkubiraju u inkubatoru za uzgoj stanica. Nakon dva dana, stanice se fiksiraju prema sljedećem protokolu: stanice se ispiru

PBS-om, odvajaju od podloge te centrifugiraju 10 minuta pri $1200 \times g$. Talog stanica resuspendira se u 1% paraformaldehidu (PFA) u PBS-u te inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon dodanih 500 μL PBS-a stanice se ponovno centrifugiraju 10 minuta pri $1200 \times g$, a talog se resuspendira u 250 μL PBS-a i analizira protočnim citometrom. THP-1 stanice se za analizu protočnim citometrom pripremaju prema istome protokolu uz razliku da stanice prije fiksiranja nije potrebno tripsinizirati.

3.2.6. Analiza stanica protočnim citometrom

Stanice se analiziraju korištenjem protočnog citometra Becton-Dickinson (FACScan ili FACSCalibur) i popratnog upravljačkog programa (Cell Quest). Protočni citometar omogućuje detekciju morfologije i veličine stanica. U ovom radu detektiran je GFP (engl. *green fluorescent protein*) prolaskom stanica kroz snop laserskih zraka te mjerenjem emitirane fluorescencije, što je prikazano FL1 histogramom.

3.2.7. Izdvajanje ukupne RNA iz kulture stanica

Za izdvajanje ukupne RNA iz stanica korišten je *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche). Postupak je proveden prema uputama proizvođača. Uzorcima se dodaje pufer za lizu koji omogućava razgradnju staničnih komponenti i inaktivaciju RNAza. Dobiveni lizat nanosi se na kolonu te se centrifugiranjem odvaja stanični debris od nukleinskih kiselina koje ostaju vezane za filter kolone. DNA prisutna u uzorku razgrađuje se direktnim dodavanjem DNaze I na filter kolone. Slijedeći korak je ispiranje razgrađene DNA odnosno ostalih onečišćenja. Konačno, RNA se eluira s kolone u puferu i pohranjuje pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.8. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije RNA

Koncentracija RNA određuje se spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri 260 nm na Nanodrop uređaju pri čemu se kao slijepa proba koristi pufer za eluciju iz kita za izdvajanje RNA. Izmjerena se apsorbancija pri valnim duljinama od 260 i 280 nm nanošenjem 2 μL slijepa probe ili uzorka.

Koncentracija RNA se računa prema formuli:

$$[\text{RNA}]_{\mu\text{g/mL}} = A_{260} \times 44.19,$$

pri čemu je A_{260} apsorbancija u jedinicama optičke gustoće pri valnoj duljini od 260 nm, a 44.19 je ekstincijski koeficijent RNA. Kako bi se odredila čistoća RNA izračunat je omjer apsorbancija A_{260}/A_{280} koji za čistu RNA iznosi 2,0. Kvaliteta RNA dodatno je provjerena nanošenjem na agarozni gel.

3.2.9. Elektroforeza RNA u agaroznom gelu

Pripremi se 1%-tni gel u TAE puferu. Agaroz se otapa zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici uzastopnim ponavljanjima do vrenja i hlađenja uz miješanje dok se agaroz u potpunosti ne otopi, nakon čega se gel hladi. U još tekući gel dodaje se etidijev bromid, gel se promiješa i izlije u kadicu za izradu gelova. Nakon skrutnjavanja, gel se postavi u kadicu za elektroforezu koja je ispunjena TAE puferom tako da je gel potpuno uronjen u TAE pufer te se pažljivo makne češljic. U tako pripremljeni gel nanose se uzorci u koje je prethodno dodan pufer za nanošenje uzoraka. Po završetku elektroforeze gel se položi na transiluminator kako bi se provjerila cjelovitost molekula RNA i efikasnost razdvajanja.

3.2.10. Obrnuto prepisivanje (engl. *reverse transcription*) izdvojene RNA

U svrhu siteze jednolančane cDNA iz ukupne RNA provodi se obrnuto prepisivanje. Za obrnuto prepisivanje (reverznu transkripciju, RT) ukupne RNA izdvojene iz kulture stanica koristi se komplet *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems™) te se postupak provodi prema uputama proizvođača. Komponente korištene za sintezu jednolančane komplementarne DNA (cDNA) iz ukupne RNA navedene su u tablici 6.

Tablica 6. Komponente i sastav reakcijske smjese RT

Komponenta	Volumen po reakciji (μL)
10 \times RT pufer	2,0
25 \times dNTP Miks (100 mM)	0,8
10 \times RT Nasumične Početnice (engl. <i>Random Primers</i>)	2,0
Reverzna Transkriptaza (engl. <i>Reverse Transcriptase</i>)	1,0
Voda bez nukleaza	4,2
Ukupno po reakciji	10,0

Uzorci se pripremaju razrjeđivanjem 600 ng RNA u mqH₂O do ukupnog volumena od 10 μL i miješanjem s 10 μL reakcijske smjese iz tablice 6. Mikroeprovete s uzorcima kratko se centrifugiraju kako bi se uklonili mjehurići zraka. Do početka procesa reverzne transkripcije, uzorci se drže na ledu. Uvjeti reakcije su prikazani u tablici 7.

Tablica 7. Uvjeti reakcije obrnutog prepisivanja

	1. korak	2. korak	3. korak	4. korak
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25	37	85	4
Vrijeme	10 minuta	120 minuta	5 minuta	∞

3.2.11. Određivanje razine ekspresije gena metodom lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja (Real-Time PCR)

Real Time PCR (engl. *Real-Time polymerase chain reaction*) metoda koristi se za kvantifikaciju gena te služi za detekciju produkata PCR reakcije u realnom vremenu. Lančana reakcija polimerazom eksponencijalno umnožava željene fragmente DNA koristeći specifične početnice i polimerazu koja je funkcionalna u datum uvjetima, najčešće Taq-polimerazu (enzim je aktivan na visokim temperaturama koje PCR zahtjeva). Real Time PCR metoda razlikuje se u tome što svrha nije umnažanje fragmenta za daljnje korištenje, već praćenje umnažanja fragmenta u

realnome vremenu za što se koriste fluorescentne boje, u ovome slučaju SYBR green. Zahvaljujući fluorescentnoj boji koja interkalira u novonastale fragmente te je detektibilna po interkalaciji (dolazi do promjene u njenoj fluorescenciji), moguće je praćenje količine PCR produkata nakon svakog ciklusa, što također omogućava vrlo precizno izračunavanje početne količine željenog fragmenta (gena) kojim je reakcija započela.

Kao uzorak koristi se komplementarna DNA (cDNA) dobivena obrnutim prepisivanjem. Sastav reakcijske smjese Real Time PCR-a prikazan je u tablici 8. Volumen reakcije iznosi 15 μ L.

Tablica 8. Sastav reakcijske smjese Real Time RT-PCR.

Sastojak	Volumen
SYBR green	7,5 μ L
Početnica 1	0,6 μ L
Početnica 2	0,6 μ L
Mq H ₂ O	0,3 μ L
Ukupno	9 μL

6 μ L uzorka (cDNA) te 9 μ L reakcijske smjese raspoređi se u bunariće pločice sa 96 bunarića te je ukupni volumen reakcije 15 μ L. Svaka reakcija provodi se u triplikatu. Prije stavljanja u uređaj, potrebno je provesti kratko centrifugiranje kako bi se uzorci spustili na dno. Uvjeti reakcije navedeni su u tablici 9.

Tablica 9. Uvjeti reakcije Real Time RT-PCR.

Uvjeti reakcije PCR	Temperatura (°C)	Vrijeme
Aktivacija	50	2 min
Denaturacija	95	10 min
40 ciklusa: Denaturacija	95	15 s
Sparivanje početnica i elongacija	60	1 min

3.2.12. Razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE

5×10^4 stanica nasadi se po jednom bunariću pločice sa 6 bunarića u ukupnom volumenu od 2 mL. Sljedećeg dana stanice se inficiraju s 1×10^4 viralnih čestica po stanici u ukupnom volumenu od 2 mL i inkubiraju u inkubatoru za uzgoj stanica. U slučaju adherentnih stanica, makne se virusno razrjeđenje, stanice se isperu s 500 μ L PBS pufera i skupljaju metodom vrućeg pufera tako da se na stanice doda 200 μ L pufera za skupljanje uzorka, SB (engl. *sample buffer*) prethodno zagrijanog pri 96 °C. Stanice se sastružu plastičnom strugalicom, skupe u mikroeprevetu i zagrijavaju 3 minute pri 96°C, nakon čega se spremaju pri -20°C. U slučaju suspenzijskih stanica, stanice se centrifugiraju 10 minuta pri $1100 \times g$, te se talog resuspendira u SB puferu zagrijanom pri 96 °C.

Prethodno SDS-elektroforezi, uzorci se soniciraju. Sonda ultrazvuka prebriše se etanolom i na uređaju se namjesti frekvencija na 30 Hz. Uzorak se zagrije pri 96 °C te se nakon zagrijavanja sonda zaroni u uzorak te sonicira 5 sekundi, nakon čega slijedi 5 sekundi stavljanja na led. Taj postupak se ponovi još 2 puta. Uzorci se mogu smrzavaju pri -20 °C ili koristiti za analizu. SDS-PAGE elektroforeza koristi dva gela (gel za sabijanje i gel za razdvajanje, tablica 10) puferirana kod različitog pH. Po dodatku TEMED-a u gel za razdvajanje, smjesa se izlije u kalup te se ravnomjerno nadsvodi vodom ili etanolom. Gel se ostavi da polimerizira tijekom jednog sata. Na gel za razdvajanje izljeva se gel za sabijanje i odmah se uroni češljic te se ostavi da polimerizira tijekom jednog sata. Nakon završetka polimerizacije, češljic se izvadi.

Tablica 10. Priprema gelova za SDS-PAGE.

Gel za razdvajanje i sabijanje	12%-tni (razdvajanje)	5%-tni (sabijanje)
di H ₂ O (mL)	3,3	2,1
AA/Bis (30% otopina akrilamida) (mL)	4,0	0,5
Tris-HCl pH 6,8 (mL)	2,5	0,38
10% (w/v) SDS (mL)	0,1	0,03
10% (w/v) APS (mL)	0,1	0,03
TEMED (mL)	0,004	0,003
Ukupni volumen	10 mL	3 mL

Proteinski uzorci, prethodno sonicirani, zagriju se pri 96 °C te se nanosi 30 µL uzorka po jažici gela pomoću igle "Hamilton", odnosno 5 µL markera za procjenu molekularne težine proteinskih uzoraka, praćenje elektroforeze i transfer proteina na nitroceluloznu membranu. Pufer za elektroforezu dodaje se do ruba gornjeg spremnika i priključe se elektrode na izvor napajanja. Napon je tijekom cijele elektroforeze konstantan te iznosi 100 V, a elektroforeza traje od 1 sat i 40 minuta do 2 sata i 30 minuta.

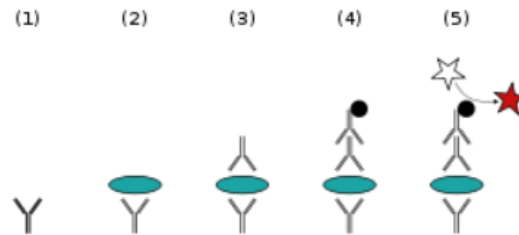
3.2.13. Western Blot analiza

Nakon završene SDS-elektroforeze, proteini se prenose električnim transferom u transfer puferu pri 400 mA tijekom 90 minuta na nitroceluloznu membranu. Membrana se nakon toga ispiru 30 minuta u TBS-T puferu te blokira 1 sat u 5%-tnom nemasnom mlijeku u prahu u TBS-T puferu kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela. Nakon blokiranja, membrana se inkubira u primarnom protutijelu za detekciju specifičnog proteina u trajanju od 2 sata na sobnoj temperaturi ili preko noći pri 4 °C, prema uputama proizvođača. Membrana se potom ispiru 30 minuta u TBS-T puferu te se dodaje sekundarno protutijelo. Inkubacija se provodi 2 sata na sobnoj temperaturi te slijedi ispiranje u TBS-T puferu 30 minuta. Proteini su vizualizirani ECL reagensom, osvjetljavanjem fotografskog filma signalima s membrane te razvijanjem u tamnoj komori ili na uređaju Uvitec.

3.2.14. ELISA metoda

ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) je test pomoću kojeg se uz protutijela i promjenu boje identificira željena supstanca. Sandwich ELISA kvantificira antigene između dva protutijela - *capture* i *detection*. Na *detection* antitijelo veže se avidin-HRP reagens, tj. enzim koji dodani nebojeni substrat konvertira u obojeni. Intenzitet obojenja je izmjeren na čitaču mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini od 570 nm i 450 nm i odgovara količini početne supstance. Za detekciju korišten je odgovarajući komplet IL-6, IL-8 ili TNF α *Human Uncoated ELISA Kit with Plates* (Invitrogen). Metoda je shematski prikazana na slici 6. ELISA testom određena je koncentracija promatranih citokina i kemokina u supernatantu stanica nakon infekcije adenovirusima. 5×10^4 stanica nasadi se po jednom bunariću pločice sa 6 bunarića u ukupnom volumenu od 2 mL. Sljedećeg dana stanice se inficiraju s 1×10^4 viralnih čestica po stanici u

ukupnom volumenu od 2 mL i inkubiraju u inkubatoru za uzgoj stanica. Supernatant adherentnih stanica skuplja se i sprema pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, dok je suspenzijske stanice potrebno centrifugirati 10 minuta pri $1100 \times g$ i sakupiti supernatant.



Slika 6. Shema sandwich ELISE. (1) Na pločicu je nanoseno *coating* antitijelo. (2) Dodavanje uzorka, svi prisutni antigeni vežu se na *coating* antitijelo. (3) Dodavanje detekcijskog antitijela i vezanje na antitijelo od interesa. (4) Dodano sekundarno antitijelo s enzimom (avidin-HRP) i veže se na detekcijsko antitijelo. (5) Dodavanje substrata koji je enzimom konvertiran u detektirajuću formu (Sino Biological Inc., 2018).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome radu korišteni su replikacijski defektni adenovirusi tipa 5 (AdV5), 26 (AdV26) i 35 (AdV35) koji u svom genomu sadrže transgen eGFP pod CMV promotrom, umnoženi u HEK-293 E1-komplementirajućim stanicama. AdV26 i AdV35 pripadaju neučestalim serotipovima adenovirusa te im je seroprevalencija u populaciji niska što im daje prednost u korištenju kao vektora za prijenos gena i vakcinaciju, budući da je seroprevalencija trenutno najviše korištenog vektora AdV5 u populaciji visoka.

Cilj ovog diplomskog rada bio je usporediti aktivaciju urođenog imunskog odgovora u monocitima i stanicama mišića čovjeka izazvanog infekcijom AdV5 s imunskim odgovorom izazvanim infekcijom AdV26 i AdV35, skupljanjem uzoraka u određenim vremenskim intervalima nakon infekcije i praćenjem promjena u ekspresiji relevantnih gena, staničnih i izvanstaničnih proteina.

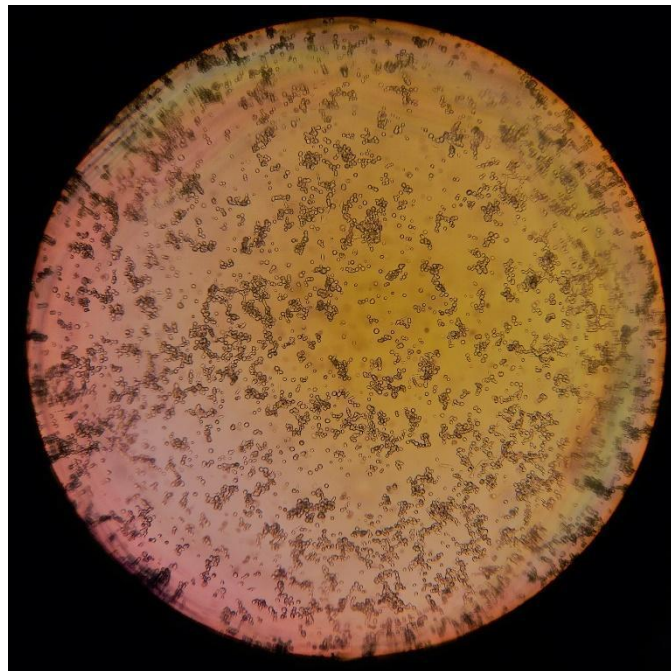
Stanične linije monocita (THP-1) i mišića čovjeka (RD) inficirane su s AdV5, AdV26 i AdV35 prema opisanim postupcima u potpoglavlju „metode“. Protočnom citometrijom određena je uspješnost transdukcije za obje stanične linije te je određen broj virusa po stanici (MOI) koji je dalje korišten za infekciju staničnih linija u svrhu skupljanja uzoraka za daljnje analize. Real Time PCR (eng. *Real-time polymerase chain reaction*) metodom nakon izdvajanja RNA iz inficiranih uzoraka određivan je nivo ekspresije gena koji kodiraju za citokine i kemokine koji sudjeluju u urođenom imunskom odgovoru. Western blot analizom određivana je ekspresija proteina I κ B, kaspaze-1, pIRF-3, pIRF-7 i IL-1 β , koji sudjeluju u odgovoru stanice na infekciju virusima kao transkripcijski faktori ili u procesiranju drugih molekula čija produkcija je izazvana interakcijom stanice sa stranim antigenom. Određivanje količine sekretornih proteina uključenih u imunski odgovor tj. citokina i kemokina u staničnom mediju korištenih stanica nakon infekcije adenovirusima provođeno je ELISA metodom.

Dobiveni rezultati pokazuju da AdV35 najuspješnije inficira RD i THP-1 stanice, a uspješnost transdukcije AdV26 je najmanja. AdV35 također izaziva najsnažniji urođeni imunski odgovor u stanica monocita i mišića čovjeka dok je imunski odgovor AdV5 i AdV26 usporedivog intenziteta. Promatrani imunski odgovori su pIRF-3 (AdV26 i AdV35) i NF- κ B ovisni (AdV5 i AdV26), a pIRF-7 neovisni.

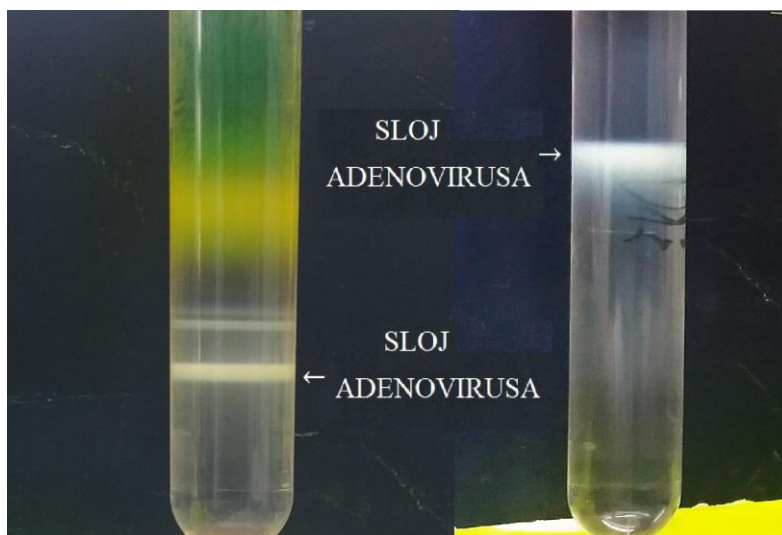
Svi rezultati su u ovome poglavlju zbog preglednosti prikazani grafički, dok su neki dodatno prikazani u poglavlju „prilozi“.

4.1. NAMNOŽAVANJE I PROČIŠĆAVANJE AdV5, AdV26 i AdV35

Replikacijski defektni virusni vektori umnoženi su u komplementirajućim stanicama koje su skupljane nakon citopatogenog učinka (slika 7). Talog skupljenih stanica u tri navrata je zamrzavan i odmrzavan kako bi se stanice lizirale, a virus oslobodio u supernatant. Nakon kratkog centrifugiranja, supernatant u kojem se nalazi virus centrifugiran je na jastučiću CsCl kako bi se virusi odvojili od nečistoća i praznih kapsida te ukoncentrirali. Sloj virusa nalazio se između dva sloja CsCl različite gustoće, prikazano na slici 8, lijevo, a iznad njega su prazne virusne kapside, druge viralne komponente i nečistoće. Virusi su skupljeni iglom te je slijedilo centrifugiranje u gradijentu CsCl nakon čega su se virusne čestice nalazile u području koje odgovara njihovoj gustoći od 1,34 g/mL (slika 8, desno).

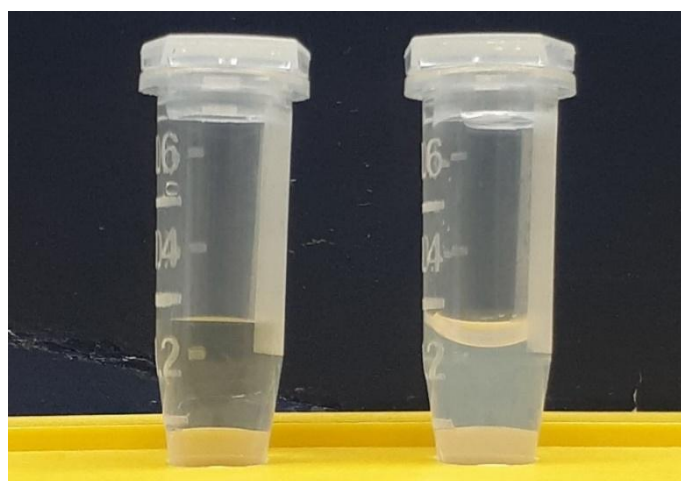


Slika 7. Citopatogeni učinak kod HEK-293 stanica tri dana po infekciji adenovirusom. Vidljivo je zaokruživanje stanice te njihovo odvajanje od podloge kao posljedica infekcije.



Slika 8. Slojevi adenovirusa nakon centrifugiranja u cezijeveom kloridu. Lijevo: sloj adenovirusa nakon centrifugiranja na jastučiću CsCl, površ kojeg se nalazi sloj praznih virusnih čestica i drugih nečistoća. Desno: sloj adenovirusa nakon centrifugiranja u gradijentu CsCl.

Nakon pročišćavanja adenovirusa uklanja se CsCl iz pročišćenih adenovirusa. CsCl se uklanja gel filtracijom. Frakcije u kojima se nalazi virus bjeličastog su, opalescentnog izgleda, bitno različite od frakcija koje ne sadrže virus (slika 9). Virusu je dodan glicerol do konačno 10 % volumena te je određena koncentracija (Tablica 11).



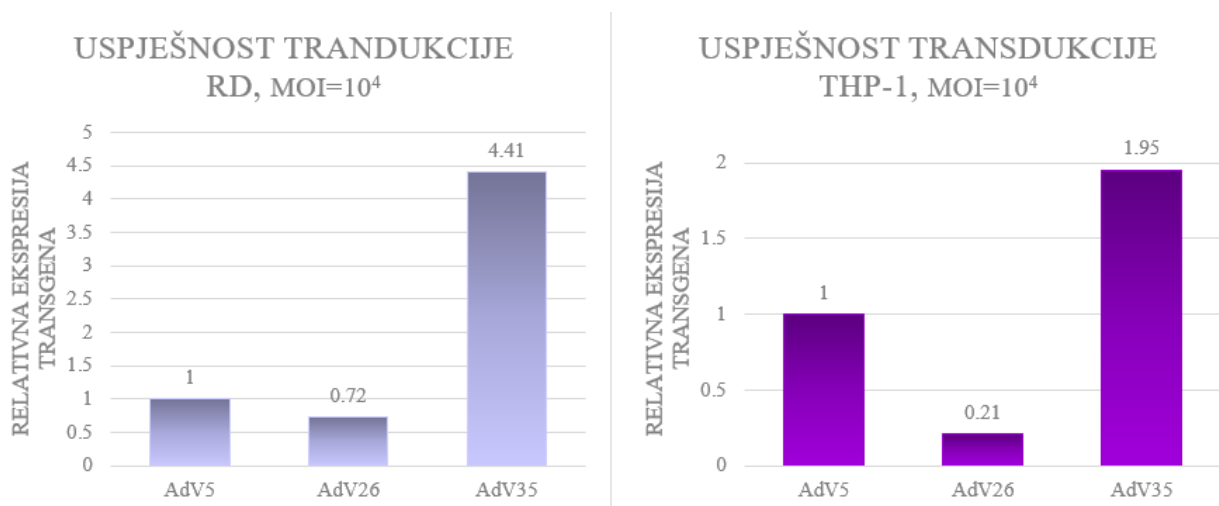
Slika 9. Frakcija koja ne sadrži virus (lijevo) u odnosu na virusnu frakciju (desno) nakon pročišćavanja adenovirusa pomoću Sephadex G-25M kolone.

Tablica 11. Koncentracija pročišćenih virusa.

Virus	AdV5	AdV26	AdV35
Virusnih čestica / mL	2×10^{12}	$2,3 \times 10^{12}$	$2,17 \times 10^{12}$

4.2. USPOREDBA USPJEŠNOSTI TRANDUKCIJE AdV5, AdV26 i AdV35 u THP-1 i RD STANICAMA

AdV5, AdV26 i AdV35 korišteni u ovom radu eksprimiraju eGFP što omogućuje praćenje uspješnosti transdukcije, tj. ekspresiju transgena, ekscitacijom pri 488 nm i očitavanjem fluorescencije u inficiranim stanicama pri 510 nanometara. Uspješnost transdukcije AdV5, AdV26 i AdV35 prikazana je na slici 10. Stanice su inficirane dvjema različitim MOI vrijednostima: 10^4 i 10^3 . Stanice inficirane s nižim brojem virusnih čestica po stanici (MOI: 10^3) pokazuju isti trend, no postotak transdukcije je niži (rezultati nisu prikazani).



Slika 10. Uspješnost transdukcije AdV5, AdV26 i AdV35 u stanicama RD i THP-1. Stanice su nasađene u pločice sa 6 bunarića, 1×10^5 stanica po bunariću i inficirane s AdV5, AdV26 i AdV35 (MOI: 10^4). Dva dana nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj stanica, uspješnost transdukcije određena je mjerenjem fluorescencije protočnim citometrom. Pokus je ponovljen najmanje 3 puta, a prikazani su rezultati jednog eksperimenta. Rezultati su normalizirani u odnosu na stanice inficirane s AdV5.

Primarni receptor AdV5 je CAR, dok je za AdV35 CD46. Put ulaska AdV26 u stanicu nije u potpunosti razjašnjen (Abbink i sur., 2007). Obje stanične linije korištene u ovom radu, RD i THP-1 na svojim površinama ne ekspimiraju CAR, ali pokazuju ekspresiju CD46 i α v integrina, zbog čega je obje stanične linije moguće inficirati spomenutim virusima, ali s različitom uspješnosti. Adenovirusna vlakna (engl. *fiber*) različitih podgrupa sadrže varijabilne aminokiselinske sekvence i struktura proteina vlakna različita je u različitim virusa. Najočitiya razlika je duljina vlakna. Unutar pojedine podgrupe adenovirusi sadrže sličan broj aminokiselina u vlaknu i prema tome podjednaku duljinu mjerenu elektronskim mikroskopom. Od triju promatranih virusa AdV35 posjeduje najkraće vlakno, a slijedi AdV26. Osim duljine vlakna, utjecaj na uspješnost infekcije ima i fleksibilnost te 3D struktura distalne globularne domene (Nicklin i sur., 2005).

Dobiveni rezultati pokazuju da je ekspresija transgena najviša pri infekciji s AdV35, a u slučaju stanica mišića taj broj je višestruko puta veći u odnosu na broj stanica inficiran AdV5 pri istom multiplicitetu infekcije. Iz literature je poznato da pri korištenju rekombinantnog AdV5 vektora s vlaknom AdV35 virusa (AdV5/F35-GFP), količina ekspresije transgena je u usporedbi s AdV5 vektorom više od šest puta veća u stanicama retinoblastoma (Mallam i sur., 2004).

Ekspresija transgena najniža je u slučaju infekcije s AdV26. U stanicama monocita, uspješnost transdukcije je pet puta manja u odnosu na infekciju s AdV5, a čak deset puta manja u odnosu na infekciju s AdV35 u istim uvjetima. Budući da infektivnost virusa ovisi o njegovom vlaknu, te da AdV26 i AdV35 imaju nisku seroprevalenciju, konstrukcijom rekombinantnog adenovirusa AdV26 s kraćim vlaknom AdV35 problem niske infektivnosti AdV26 bi vrlo vjerojatno bio prevladan, kao u gornjem primjeru s rekombinantnim AdV5 virusom.

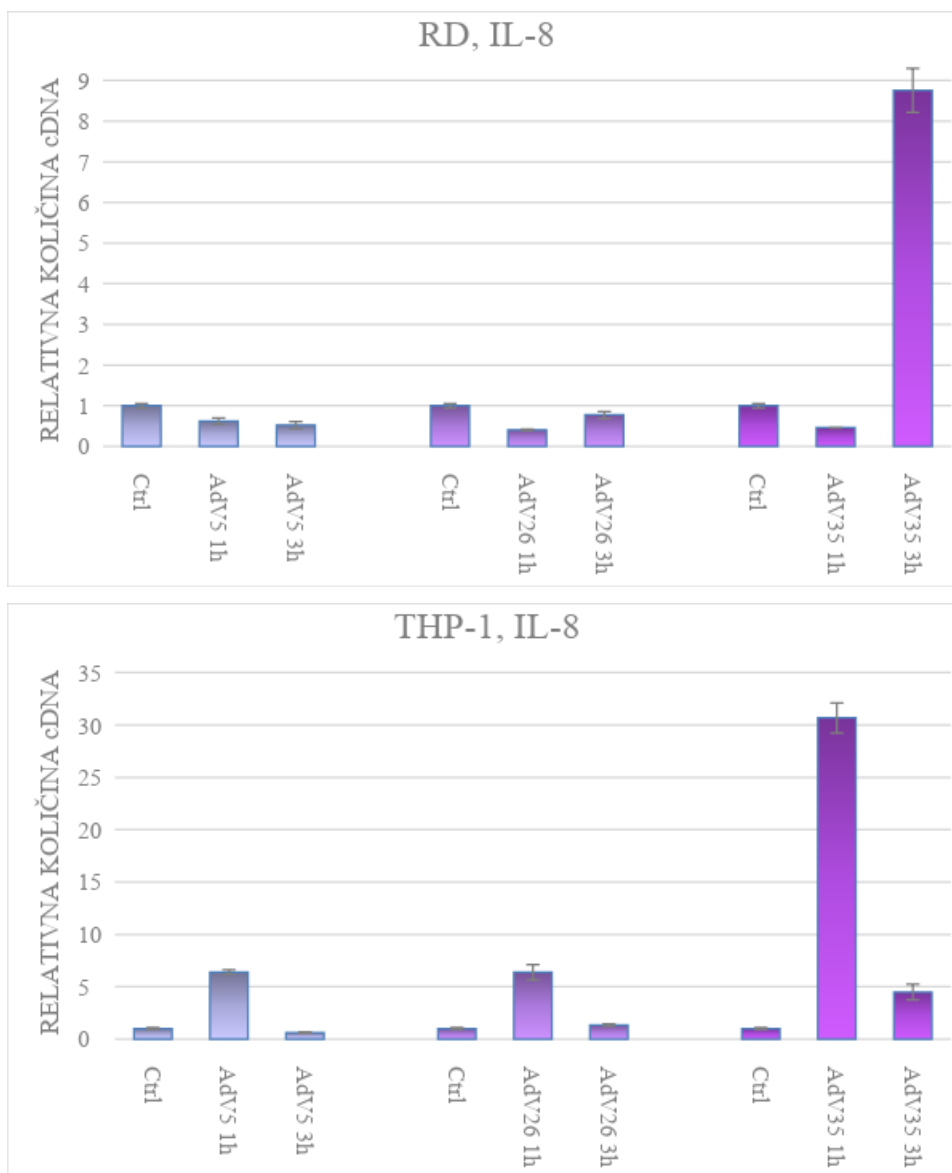
Rezultati apsolutne transdukcije za obe stanične linije prikazani su u prilogu (slika 18). Provjerom učinkovitosti transdukcije utvrđena je MOI vrijednost koja se koristi u daljnjim eksperimentima (10^4).

4.3. USPOREDBA EKSPRESIJE GENA UKLJUČENIH U IMUNOSNI ODGOVOR NAKON INFEKCIJE RD i THP-1 STANICA S AdV5, AdV26 i AdV35

RD i THP-1 stanice inficirane su s AdV5, AdV26 i AdV35 te su uzorci u svrhu izolacije RNA i analizu Real Time PCR metodom skupljeni jedan i tri sata po infekciji. Nakon izolacije RNA slijedi obrnuto prepisivanje opisano u poglavlju „metode“ te provjera učinkovitosti reakcije Real Time PCR koristeći početnice *housekeeping* gena (GAPDH, podjednako je eksprimiran u svim stanicama) i različitih koncentracija cDNA kontrolnog uzorka. Učinkovitost je za stanice mišića iznosila u prosjeku 77%, a za stanice monocita 74% što je zadovoljavajuće.

Iz literature je poznato da infekcija adenovirusom potiče ekspresiju niza različitih citokina i kemokina. Citokini su proteini koje izlučuju stanice imunološkog sustava, većinom su produkti leukocita i sudjeluju u međustaničnoj signalizaciji te kao imunomodulatori. Citokini su uključeni u odgovor stanice na virusnu infekciju. Kemokini su citokini važni za migraciju stanica, male su molekulske mase i imaju sposobnost inducirati kemotaksiju obližnjih stanica. Poticanje urođenog imunskog odgovora uslijed infekcije adenovirusom može biti posljedica prepoznavanja samog adenovirusa ili posljedica vezanja adenovirusa na receptor. U ovom radu praćena je promjena u ekspresiji gena za IL-6, IL-8, IL-1 β i TNF α .

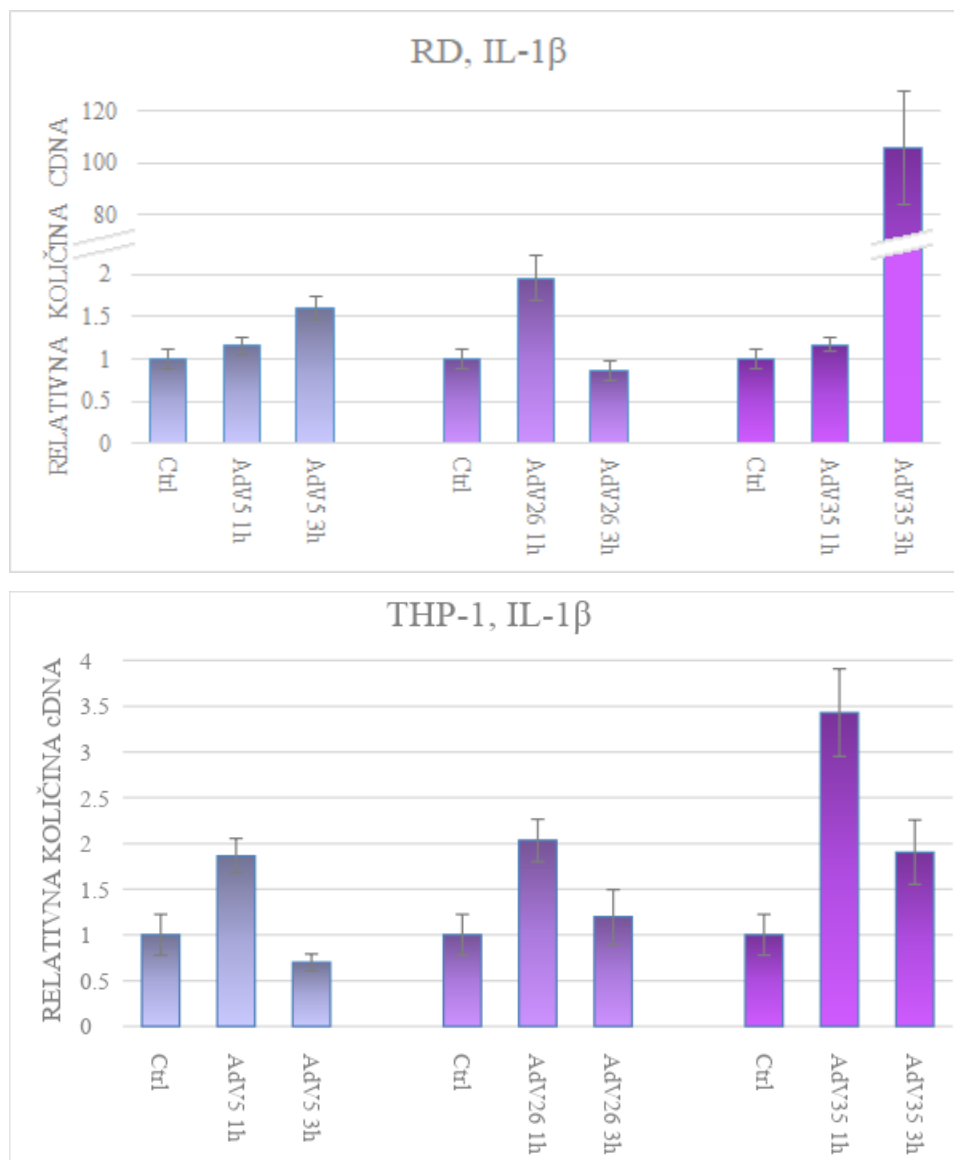
Interleukin-8 (IL-8) je kemokin koji pripada u CXC obitelj citokina i jedan od glavnih medijatora upalnog imunološkog odgovora. IL-8 kao kemokin djeluje na neutrofile i nazvan je neutrofil-aktivacijski protein-1 (NAP-1) budući da stimulira oslobađanje neutrofilnih granula (Palomino i Marti, 2015). Na slici 11 prikazana je ekspresija IL-8 u RD i THP-1 stanicama 1 i 3 sata nakon infekcije s AdV5, AdV26 i AdV35.



Slika 11. Ekspresija gena IL-8 u RD i THP-1 stanicama praćena Real Time PCR metodom 1 i 3 sata nakon infekcije s AdV5, AdV26 i AdV35. Stanice su nasađene u pločice sa 6 bunarića, 4×10^5 stanica po bunariću i inficirane s AdV5, AdV26 i AdV35 (MOI: 10^4). 1 i 3 sata nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj stanica, stanice se ispiru te se provodi izolacija RNA, obrnuto prepisivanje i Real Time PCR. Pokus je ponovljen najmanje 3 puta, a prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta. Rezultati su normalizirani u odnosu na stanice inficirane s AdV5.

U slučaju RD stanične linije, ekspresija IL-8 jedan sat nakon infekcije s AdV5 i AdV26 je niža od razine ekspresije u kontrolnim stanicama. Iz literature je poznato da infekcija epitelnih stanica pluća s AdV5 ne potiče ekspresiju IL-8 (Booth, 1999), a smanjena ekspresija IL-8 primjećena je nakon infekcije stanica štitne žlijezde onkolitičkim AdV5 (Passaro, 2016). Tri sata nakon infekcije s AdV35 razina ekspresije IL-8 je visoka. U THP-1 stanicama razina ekspresije jedan sat nakon infekcije raste, a najveći rast ekspresije gena IL-8 zabilježen je u slučaju infekcije s AdV35 jedan sat nakon infekcije. U literaturi trenutno nema podataka koji bi povezali ekspresiju IL-8 i infekciju AdV35.

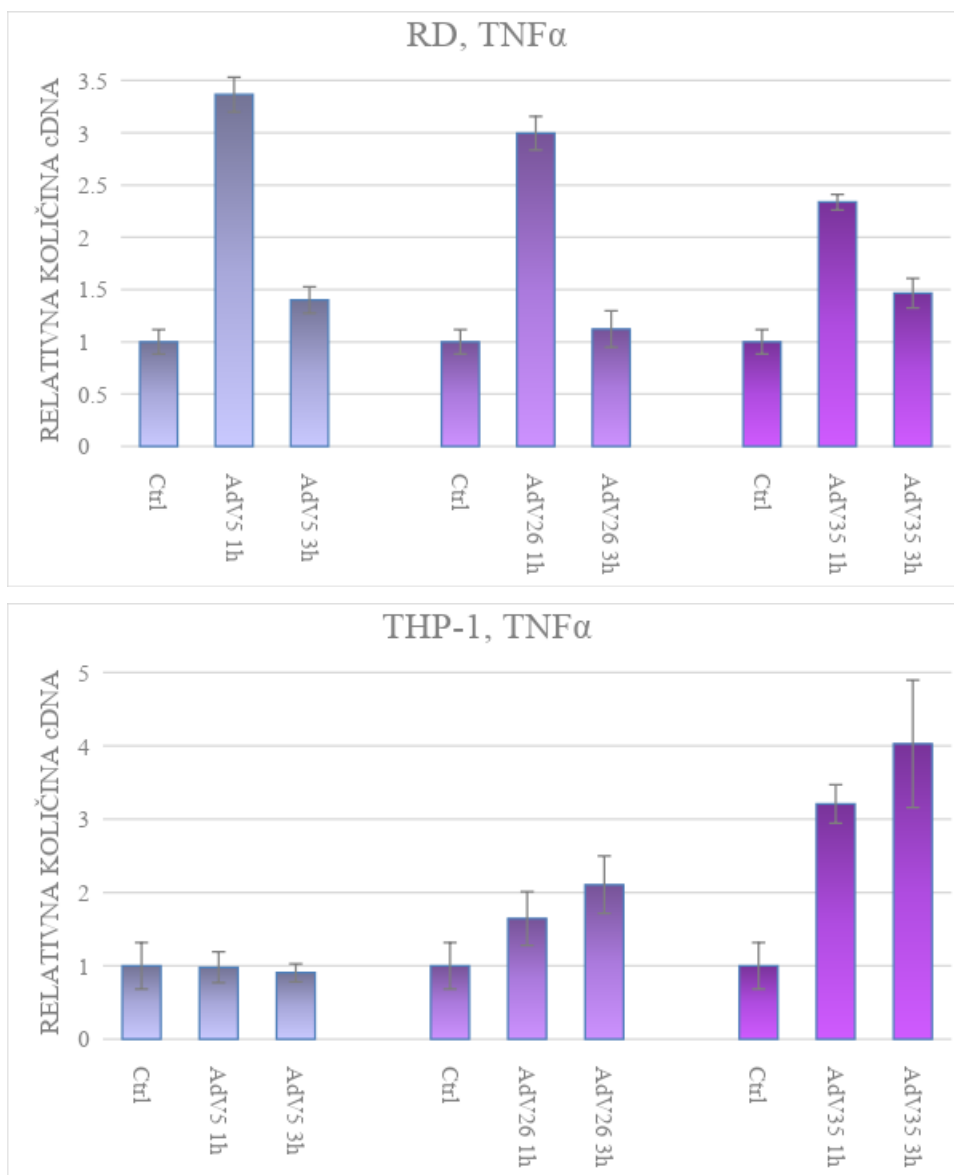
Interleukin-1 β je proinflamatorni citokin važan u odgovoru organizma na infekciju ili ozljedu (Dinarello, 1996). Proizvode ga mnoge stanice, no najveći broj istraživanja fokusiran je na stanice nativnog imunološkog sustava, monocite i makrofage. Inaktivni prekursor (31 kDa) proizveden je kao odgovor na doticaj PRR-a sa specifičnim epitopima patogena (PAMP) na površini stanica što pokreće signalnu kaskadu i ekspresiju gena (Takeuchi i Akira, 2010). Pro-interleukin-1 β procesiran je cijepanjem proteazom kaspaza-1 (Thornberry i sur., 1992), tj. potreban je drugi signal da bi se pro-interleukin procesirao u aktivni oblik. Po cijepanju, IL-1 β ubrzo se izlučuje iz stanice do sada nepoznatim putevima (Lopez-Castejon i Brough, 2011). Slika 12 prikazuje ekspresiju IL-1 β u RD i THP-1 stanicama 1 i 3 sata nakon infekcije s AdV5, AdV26 i AdV35.



Slika 12. Ekspresija gena IL-1 β u RD i THP-1 stanicama praćena Real Time PCR metodom 1 i 3 sata nakon infekcije s AdV5, AdV26 i AdV35. Stanice su nasade u ploćice sa 6 bunarića, 4×10^5 stanica po bunariću i inficirane s AdV5, AdV26 i AdV35 (MOI: 10^4). 1 i 3 sata nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj stanica, stanice se ispiru te se provodi izolacija RNA, obrnuto prepisivanje i Real Time PCR. Pokus je ponovljen najmanje 3 puta, a prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta. Rezultati su normalizirani u odnosu na stanice inficirane s AdV5.

Ekspresija IL-1 β raste jedan sat nakon infekcije svim trima korištenim vektorima u obje stanične linije. Najveći rast ekspresije IL-1 β zabilježen je u slučaju infekcije s AdV35. Stanice inficirane AdV5 i AdV26 pokazuju vrlo slične rezultate. U staničnom lizatu western blot metodom u obje stanične linije pokazano je da se koncentracija proteina IL-1 β nakon infekcije povećava u odnosu na kontrolne (neinficirane) stanice što je u skladu s rezultatima ekspresije gena. Rezultati ekspresije IL-1 β u RD i THP-1 stanicama nakon infekcije s AdV5, AdV26 i AdV35 određivane metodom western blot prikazani su u prilogu (slika 20). Iz literature je poznato da je IL-1 β posrednik brzog upalnog odgovora nakon infekcije s adenovirusnim vektorima. Nakon injekcije u moždanu ventrikulu, razina IL-1 β raste do tri stotine puta (Cartmell i sur., 1999).

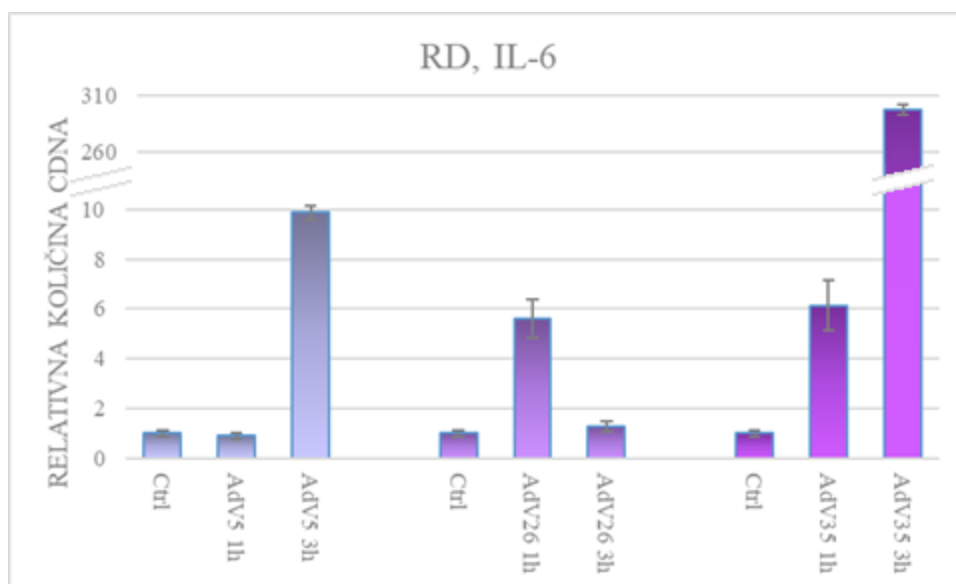
Faktor nekroze tumora α (engl. *tumor necrosis factor*), TNF α je multifunkcionalni citokin kojeg primarno izlučuju makrofagi, NK (engl. *natural killer*) stanice i limfociti. TNF α centralni je regulator upale (Esposito i Cuzzocrea, 2009). Jedna od najvažnijih bioloških uloga je obrana organizma od bakterijskih, virusnih i parazitskih infekcija (Bradley, 2008). Iz literature je poznato da TNF α inhibira ekspresiju transgena adenovirusnog vektora *in vitro* te rana indukcija *in vivo* sugerira da postoji doprinos urođenog imunskog odgovora u regulaciji ekspresije transgena (Sung i sur., 2001). Slika 13 prikazuje ekspresiju TNF α u RD i THP-1 stanicama nakon infekcije s AdV5, AdV26 i AdV35.



Slika 13. Ekspresija gena TNF α u RD i THP-1 stanicama praćena Real Time PCR metodom 1 i 3 sata nakon infekcije s AdV5, AdV26 i AdV35. Stanice su nasađene u pločice sa 6 bunarića, 4×10^5 stanica po bunariću i inficirane s AdV5, AdV26 i AdV35 (MOI: 10^4). 1 i 3 sata nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj stanica, stanice se ispiru te se provodi izolacija RNA, obrnuto prepisivanje i Real Time PCR. Pokus je ponovljen najmanje 3 puta, a prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta. Rezultati su normalizirani u odnosu na stanice inficirane s AdV5.

Ekspresija TNF α u RD stanicama raste po infekciji adenovirusnim vektorima i smanjuje se s vremenom. Infekcija svima trima virusima pokazuje isti trend. Najveći rast, iako ne i značajno veći u usporedbi s infekcijom Adv26 i Adv35, izaziva infekcija s Adv5, kao što je grafički prikazano. U THP-1 stanicama infekcija s Adv5 ne uzrokuje povećanu razinu ekspresije TNF α , dok Adv26 i Adv35 pokazuju isti trend povećanja razine ekspresije s time da Adv35 uzrokuje veći porast ekspresije.

Interleukin-6 je citokin koji se pojavljuje u odgovoru organizma na infekciju i ozljede tkiva, doprinosi obrani organizma stimulacijom hematopoeze i imunoloških reakcija (Tanaka i sur., 2014). U ovom radu ekspresija IL-6 nije detektirana u THP-1 stanicama. Iz literature je poznato da se IL-6 ne eksprimira konstitutivno u stanicama ljudskih makrofaga (Baqui i sur., 1998) što je u skladu s rezultatima dobivenima u ovom istraživanju. Slika 14 prikazuje ekspresiju IL-6 u RD stanicama nakon infekcije s Adv5, Adv26 i Adv35.



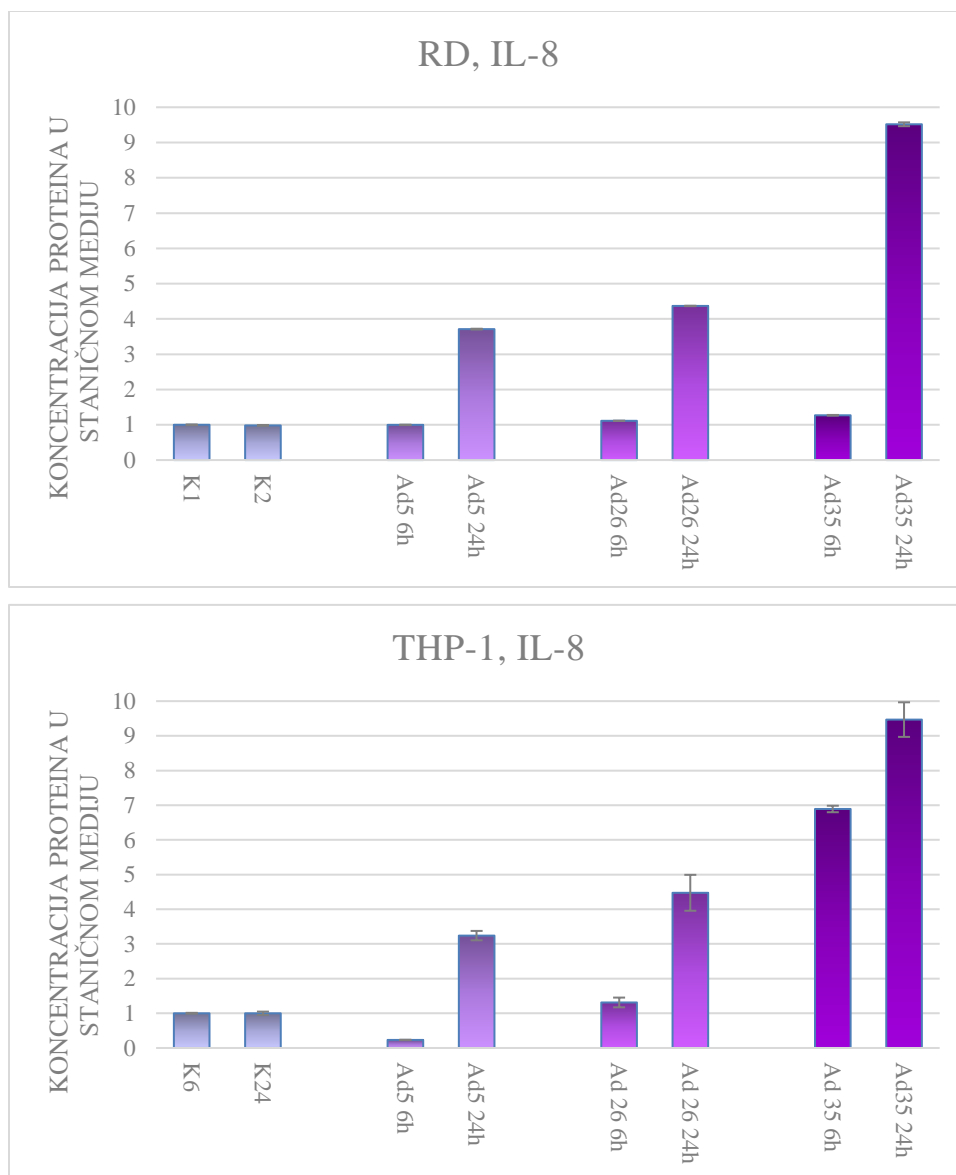
Slika 14. Ekspresija gena IL-6 u RD i THP-1 stanicama praćena Real Time PCR metodom 1 i 3 sata nakon infekcije s Adv5, Adv26 i Adv35. Stanice su nasađene u pločice sa 6 bunarića, 4×10^5 stanica po bunariću i inficirane s Adv5, Adv26 i Adv35 (MOI: 10^4). 1 i 3 sata nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj stanica, stanice se ispiru te se provodi izolacija RNA, obrnuto prepisivanje i Real Time PCR. Pokus je ponovljen najmanje 3 puta, a prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta. Rezultati su normalizirani u odnosu na stanice inficirane s Adv5.

Infekcija AdV35 potiče najveći rast razine ekspresije IL-6, a slijedi AdV5 i to tek tri sata nakon infekcije. U slučaju infekcije s AdV26, rast ekspresije vidljiv je jedan sat nakon infekcije, ali ne i nakon tri sata.

Dobiveni rezultati usporedbe ekspresije gena uključenih u imunosni odgovor nakon infekcije RD i THP-1 stanica s AdV5, AdV26 i AdV35 usporedivi su s dostupnim literaturnim podacima (Booth, 1999; Passaro, 2016; Cartmell i sur., 1999; Sung i sur., 2001; Baqui i sur., 1998). IL-1 β jedan je od glavnih medijatora upale te dobiveni rezultat rasta ekspresije podržava literaturne podatke. Ekspresija IL-8 nije znatno povećana, osim u slučaju infekcije s AdV35, no ne postoje relevantna literatura koja bi podržala rezultat. Ekspresija TNF α u porastu je u svim uzorcima, osim u slučaju infekcije AdV5 u THP-1 stanicama. IL-6 u THP-1 stanicama nije detektiran, sukladno s očekivanjima.

4.4. DETEKCIJA IL-6, IL-8 I TNF α U STANIČNOM MEDIJU RD I THP-1 STANICA NAKON INFEKCIJE S AdV5, AdV26 i AdV35

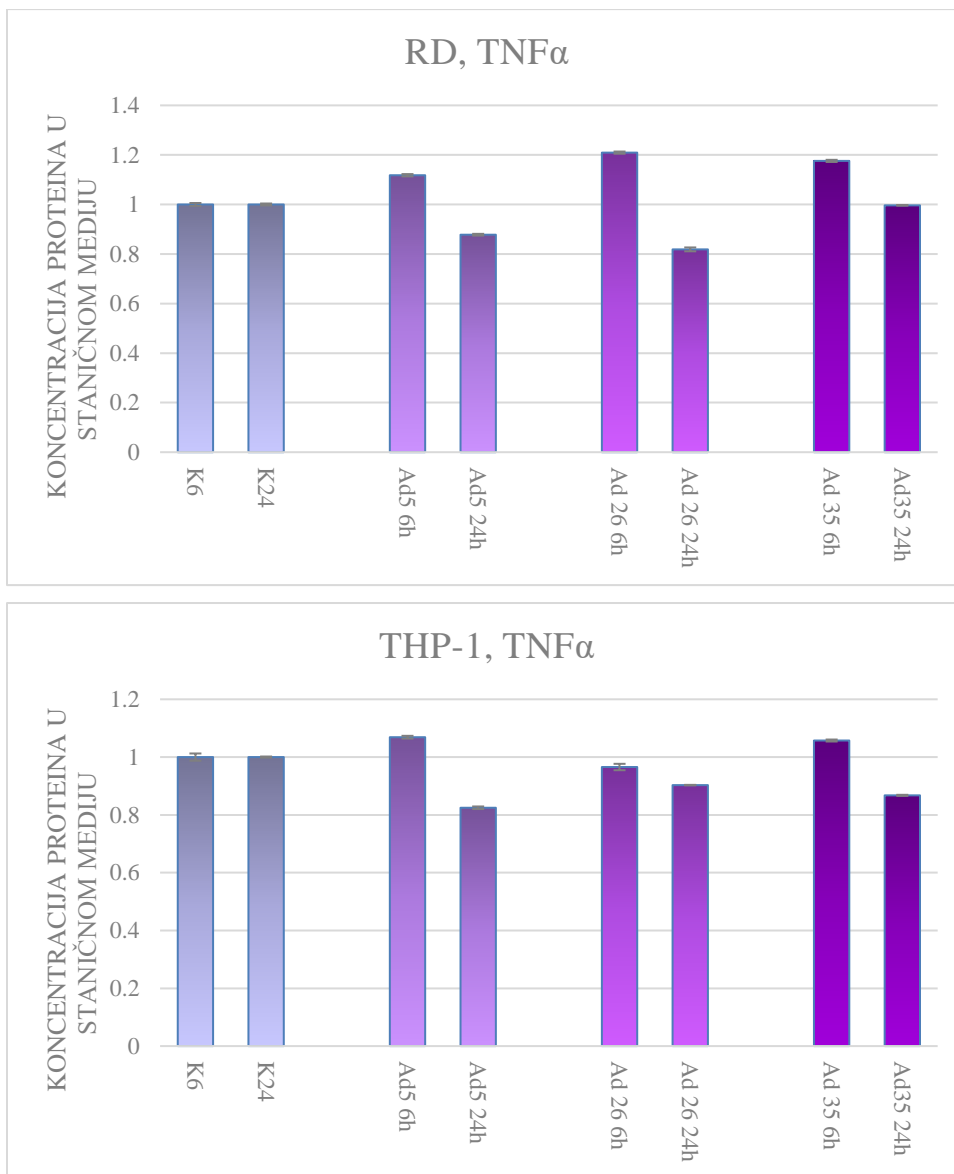
Epitelne stanice i stanice urođenog imunosnog odgovora posjeduju mogućnost komunikacije, tj. obavještanja imunosnog sustava o promjenama ili opasnostima putem otpuštanja velikog broja proupalnih i imunoregulacijskih citokina i kemokina. Neki od najpotentnijih proupalnih citokina i kemokina urođenog imunosnog odgovora su TNF te IL-6 i IL-1 (Gordon, 2003; Hogan i sur., 2008). Sekrecija citokina služi kao poveznica za komunikaciju s drugim stanicama urođenog, ali i stečenog imunološkog sustava kako bi se regulirala upala, ekspanzija T- i B-stanica te produkcija protutijela i citotoksični odgovor (Stanley i Lacy, 2010). U ovom su istraživanju citokini izlučeni u stanični medij nakon infekcije adenovirusnim vektorima detektirani sendvič-ELISA metodom. Na slikama 15 i 16 prikazani su rezultati detekcije IL-8 i TNF α u staničnom mediju 6 i 24 sata nakon infekcije RD i THP-1 s AdV5, AdV26 i AdV35. IL-6 u THP-1 stanicama te IL-1 β u obje stanične linije ovom metodom nisu detektirani.



Slika 15. IL-8 u staničnom mediju u RD i THP-1 stanica određivano sendvič-ELISA metodom, 6 i 24 sata nakon infekcije adenovirusima. Stanice su nasadene u pločice sa 6 bunarića, 4×10^5 stanica po bunariću i inficirane s AdV5, AdV26 i AdV35 (MOI: 10^4). 6 i 24 sata nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj stanica, skuplja se supernatant u svrhu provođenja ELISA metode. Pokus je ponovljen dva puta, a prikazani su rezultati jednog eksperimenta. Rezultati su normalizirani u odnosu na stanice inficirane s AdV5.

Iz rezultata prikazanih na slici 15 vidljivo je da je koncentracija IL-8 u izvanstaničnom mediju višestruko veća s vremenom u obje stanične linije, kao što je i očekivano, budući da se nakon

sekrecije proteina u izvanstanični medij on skuplja te svako sljedeće mjerenje mora pokazivati veću koncentraciju u ovakvim eksperimentalnim uvjetima. Najveća koncentracija tj. najjači odgovor stanice na infekciju prisutan je u slučaju infekcije s Adv35, što se slaže i s rezultatima prikazanim na slici 11 odnosno povećanjem razine ekspresije gena IL-8.

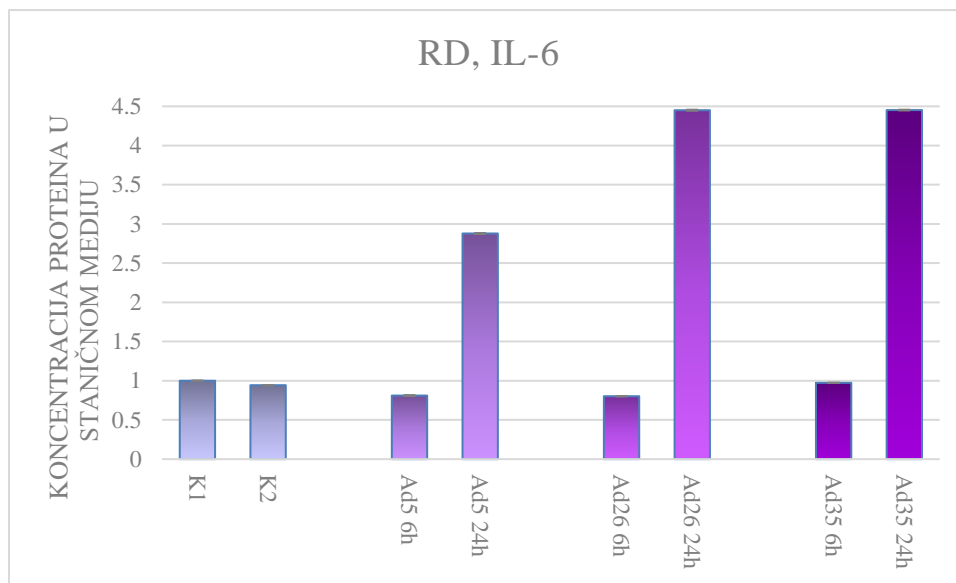


Slika 16. TNFα u staničnom mediju u RD i THP-1 stanica određivano sendvič-ELISA metodom, 6 i 24 sata nakon infekcije adenovirusima. Stanice su nasađene u pločice sa 6 bunarića, 4×10^5 stanica po bunariću i inficirane s Adv5, Adv26 i Adv35 (MOI: 10^4). 6 i 24 sata nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj stanica, skuplja se supernatant u svrhu provođenja ELISA

metode. Pokus je ponovljen jednom. Rezultati su normalizirani u odnosu na stanice inficirane s AdV5.

Slika 16 pokazuje da koncentracija TNF α neznatno raste u RD stanicama 6 sati nakon infekcije sa sva tri promatrana virusna vektora. U usporedbi s ranije prikazanim rezultatima (slika 13), gdje razina ekspresije gena TNF α raste sat vremena nakon infekcije te potom pada na početnu bazalnu razinu, rast je očekivan. Količina TNF α izlučena 24 sata nakon infekcije manja je od one zabilježene 6 sati nakon infekcije što je neočekivano. Ovo može biti posljedica razgradnje proteina ili greške u mjerenju. Rezultati su slični za THP-1 staničnu liniju, što se ne slaže s rezultatima prikazanim na slici 10 jer razina ekspresije TNF α gena raste s vremenom nakon infekcije s AdV26 i AdV35.

Količina IL-6 izmjerena u supernatantu RD stanica inficiranih s AdV5, AdV26 i AdV35 prikazani su na slici 17. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je količina izlučenog IL-6 značajno povećana 24 sata nakon infekcije.



Slika 17. IL-6 u staničnom mediju u RD i THP-1 stanica određivano sendvič-ELISA metodom, 6 i 24 sata nakon infekcije adenovirusima. Stanice su nasadene u pločice sa 6 bunarića, 4×10^5 stanica po bunariću i inficirane s AdV5, AdV26 i AdV35 (MOI: 10^4). 6 i 24 sata nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj stanica, skuplja se supernatant u svrhu provođenja ELISA

metode. Pokus je ponovljen dva puta, a prikazani su rezultati jednog eksperimenta. Rezultati su normalizirani u odnosu na stanice inficirane s AdV5.

Koncentracija IL-6 u staničnom mediju RD stanica nakon infekcije AdV26 i AdV35 dosegla je plato detekcije, što je očekivano i slaže se s od prije prikazanim rezultatima povećane ekspresije gena koji kodira za IL-6.

Dobiveni rezultati detekcije citokina u staničnome mediju 6 i 24 sata nakon infekcije s AdV5, AdV26 i AdV35 slažu se s prethodno prikazanim rezultatima promjena u ekspresiji gena po infekciji te s literaturno dostupnim podacima. Koncentracija IL-8 u mediju stanica raste, prema očekivanjima i to najviše u slučaju infekcije s AdV35, a isto vrijedi i za IL-6. IL-6 nije detektiran u staničnom mediju THP-1 stanica, prema očekivanom. Rezultate detekcije TNF α potrebno je dodatno eksperimentalno uvrstiti.

4.5. DETEKCIJA PROTEINA UKLJUČENIH U ODGOVOR STANICE NA VIRALNU INFEKCIJU U STANIČNOM LIZATU RD i THP-1 STANICA NAKON INFEKCIJE S AdV5, AdV26 i AdV35

Kaspaza-1 ili interleukin-1-konvertirajući enzim (ICE) je intracelularna cistein proteaza nužna za procesiranje citokina koji ne posjeduju signalni peptid koji im omogućuje sekreciju u izvanstanični prostor (Gu i sur., 1997). Jedan od substrata kaspaze-1 je interleukin-1 β . Kaspaza-1 je sintetizirana kao zimogen s prodomenom varijabilne dužine, malom i velikom katalitičkom podjedinicom. Inflamasomi, veliki multiproteinski kompleksi kontroliraju aktivaciju inflamatornih kaspaza (Lamkanfi i sur., 2007).

Kaspaza-1 detektirana je u RD i THP-1 stanicama 0,5, 1, 3 i 6 sati nakon infekcije s AdV5, AdV26 i AdV35. U RD stanicama kaspaza-1 je detektirana u svim uzorcima, no koncentracija se ne razlikuje značajno od koncentracije detektirane u kontrolnim stanicama koje nisu inficirane virusima. Koncentracija kaspaze-1 u svim uzorcima THP-1 stanica višestruko je veća od koncentracije u kontrolnim stanicama što je i očekivano budući da su stanice monocita stanice urođenog imunskog sustava koji sudjeluje u odgovoru na infekciju i u produkciji citokina. Rezultati su grafički prikazani u prilogu (slika 19).

Nuklearni faktor (NF) κ B esencijalni je regulator ekspresije brojnih gena uključenih u funkciju i razvoj imunološkog sustava, regrutaciju leukocita, inflamaciju i akutni odgovor (Tran i sur., 1997). Za razliku od mnogih drugih transkripcijskih faktora, NF- κ B nalazi se u citoplazmi stanice te se mora translocirati u jezgru kako bi obavljao svoju funkciju. Lokacija u stanici regulirana je I κ B proteinima (I κ B α i I κ B β) koji su u citoplazmi kompleksirani s NF- κ B (Baeuerle i Baltimore, 1988). Ove interakcije za posljedicu imaju zadržavanje NF- κ B u citoplazmi. Izlaganjem stanice različitim podražajima, I κ B proteini uslijed konformacijskih promjena disociraju iz kompleksa i razgrađuju se u proteasomu te je nuklearni faktor κ B translociran u jezgru, gdje aktivira transkripciju brojnih gena odgovornih za obranu stanice od infekcija i stresnih uvjeta (Tran i sur., 1997).

Western blot metodom u staničnom lizatu RD i THP-1 stanica određivana je prisutnost I κ B proteina 0,5, 1, 3 i 6 sati nakon infekcije AdV5, AdV26 i AdV35. U RD stanicama, I κ Ba detektiran je u svim uzorcima. Koncentracije ovog proteina naglo rastu jedan sat nakon infekcije AdV5 i AdV26, te se ponovno spuštaju na razinu kontrolnih stanica. Povećanje koncentracije ovog proteina znači inaktivaciju NF- κ B tj. prekid ekspresije gena uključenih u odgovor stanice na stresne uvjete. U slučaju THP-1 stanične linije, koncentracije su usporedive sa onima kontrolnih stanica, osim u slučaju infekcije s AdV35 i to 6 sati nakon infekcije stanica. Povećanje koncentracije I κ Ba sat vremena nakon infekcije s AdV5 i AdV26 u RD stanicama u korelaciji je s nižim stupnjem aktivacije urođenog imunogenog odgovora detektiranog RT-PCR i ELISA metodom. Rezultati određivanja I κ Ba western blot metodom su grafički prikazani u prilogu (slika 21).

Brza ekspresija interferona tipa I centralni je događaj u uspostavi urođenog imunogenog odgovora protiv virusne infekcije i zahtijeva aktivaciju mnogih transkripcijskih faktora kroz TLR ovisne i neovisne signalne kaskade. Transkripcijski faktor interferon regulatorni faktor-3 (IRF-3) konstitutivno se eksprimira u svim tkivima i doprinosi prvoj liniji obrane od virusne infekcije inducirajući produkciju IFN- β (Hiscott, 2007). C-terminalna fosforilacija izazvana infekcijom inducira konformacijske promjene koje dopuštaju homodimerizaciju i heterodimerizaciju, nuklearnu lokalizaciju i interakcije s ko-aktivatorom CBP/p300 (Lin i sur., 1999). Inaktivni protein kreće se u i van jezgre, a vezanje s ko-aktivatorom zadržava IRF-3 u jezgri i inducira transkripciju gena (Kumar i sur., 2000). IRF-7 multifunkcionalni je protein s transkripcijskom aktivnosti čija aktivnost također ovisi o C-terminalnoj fosforilaciji (Sato i sur., 1998; Lin i sur., 2000). IRF-7 se

konstitutivno eksprimira samo u B-stanicama i dendritičkim stanicama, dok je ekspresija u drugim stanicama inducirana infekcijom (Hiscott, 2007).

Iz literature je poznato da infekcija RAW 264.7 stanica rekombinantnim Ad5CiG potiče rani odgovor, 2 do 6 sati nakon infekcije, koji uključuje fosforilaciju IRF-3 transkripcijskog faktora (Stein i Falck-Pedersen, 2012). U ovom je radu fosfo-IRF-3 detektiran u obje stanične linije. U RD stanicama je porast koncentracije uočen pri infekciji s AdV26 i AdV35 što sugerira da vektori temeljeni na adenovirusima tipa 26 i 35 potiču drugačiji imunogeni odgovor u odnosu na AdV5, a tome zaključku pridonosi i podjednaka koncentracija detektiranog pIRF-3 pri infekciji s AdV26 i AdV35, iako AdV35, prema ranije prikazanim rezultatima, potiče znatno jači imunološki odgovor. Rezultati su prikazani u prilogu (slika 22). Grafički rezultat detekcije pIRF-3 western blot metodom u THP-1 stanicama nije prikazan.

U ranoj fazi virusne infekcije, mala količina endogenog IRF-7 je fosforilirana i aktivirana signalnom kaskadom pokrenutom PRR te zajedno s pIRF-3 i NF- κ B koji su aktivirani istim signalnim putem djeluju kao regulatori transkripcije. U kasnijoj fazi, nosintetizirani pIRF-7 inducira proizvodnju interferona koji pak posljedično pojačava aktivaciju IRF-7, dok se IRF-3 u kasnijim fazama infekcije razgrađuje (Ning i sur., 2011).

Fosfo-IRF-7 nije detektiran u THP-1 staničnoj liniji. Detektirana koncentracija u RD staničnoj liniji u inficiranim uzorcima ne razlikuje se bitno od kontrolnih uzoraka što može značiti da je aktivacija urođenog imunogenog odgovora nakon infekcije s AdV5, AdV26 i AdV35 neovisna o pIRF-7 (slika 23).

Iz literature je poznato da adenovirusni vektori induciraju ekspresiju kemokina u neimunološkim stanicama neovisno o transkripciji viralnih gena (Borgland i sur., 2000; Zsengeller i sur., 2000).

Ranija istraživanja na miševima i rhesus majmunima pokazala su da u odsutstvu anti-AdV5 imuniteta AdV5 vektor pokazuje najvišu imunogenost među promatranim rekombinantnim vektorima (rAd5, rAd11, rAd26, rAd35, rAd48, rAd49 i rAd50). Razlog tako snažnog imunološkog odgovora nije u potpunosti razjašnjen, iako se spekulira da može bit posljedica korištenja CAR receptora za internalizaciju virusa ili efektivnog izazivanja urođenog imunološkog odgovora koji pojačava stečeni imunološki odgovor. Među serotipovima s niskom seroprevalencijom, rekombinantni AdV26 vektor pokazao se najimunogeničniji. U prisutstvu anti-

AdV5 protutijela, promatrani virusi s niskom seroprevalencijom pokazuju se značajno imunogeničniji od AdV5 vektora (Abbink i sur., 2007).

Uzevši u obzir rezultate dobivene u ovome radu može se zaključiti kako od sva tri korištena adenovirusna vektora, AdV35 u RD i THP-1 stanicama izaziva najsnažniji urođeni imunološki odgovor. Općenito gledajući AdV5 i AdV26 u istim stanicama izazivaju urođeni imunski odgovor vrlo slične razine, prema dobivenim brojčanim vrijednostima, bitno manjeg intenziteta od AdV35. Iako velike brojčane vrijednosti prikazane u rezultatima za uzorke koji su bili inficirani s AdV35 mogu biti rezultat pogrešaka u mjerenju jer su mnogostruko veće od rezultata infekcije s AdV5 i AdV26, prema rezultatima provjere transdukcije, najveća razina ekspresije viralnih gena (eGFP) izmjerena je u stanicama inficiranim s AdV35, a najniža u slučaju infekcije s AdV26. Prema tome, dobivene visoke vrijednosti ekspresije gena izazvane infekcijom i koncentracije citokina u uzorcima inficiranim s AdV35 su opravdane.

AdV26 se može uzgojiti do visokog titra u HEK-293 komplementirajućim stanicama, što je pokazano i u sklopu ovog rada. Razina indukcije urođenog imunskog odgovora u RD i THP-1 stanicama, prema dobivenim rezultatima, može se mjeriti s odgovorom na vektor AdV5, iako je za detaljniju usporedbu potrebno provesti dodatne eksperimente i utvrditi provedene, jer se urođeni imunski odgovor sastoji od brojnih stanica, procesa te nebrojeno mnogo izvršnih molekula od kojih svaka ima svoju funkciju. Također, većina dostupne literatura o temi bazira se na praćenju humoralnog imunološkog odgovora na adenovirusne vektore, što je također potrebno uzeti u obzir kod odabira vektora za gensku terapiju budući da se obje vrste imunološkog odgovora nadopunjavaju te ne postoje neovisno jedan od drugog.

Dobiveni rezultati u ovome radu pridonose ukupnome znanju o indukciji imunskog odgovora adenovirusa s niskom seroprevalencijom u populaciji te su mali korak prema zamjeni trenutno najkorištenijeg rekombinantnog vektora AdV5 s rekombinantnim vektorima temeljenim na virusima s niskom seroprevalencijom u populaciji.

5. ZAKLJUČCI

1. AdV35 inficira RD i THP-1 stanice bolje od AdV5 i AdV26. Uspješnost transdukcije s AdV26 manja je od uspješnosti transdukcije s AdV5 u obje promatrane stanične linije.
2. U usporedbi s AdV5 i AdV26, AdV35 u stanicama monocita i mišića čovjeka izaziva najsnažniji urođeni imunski odgovor i to poticanjem ekspresije gena koji kodiraju za IL-6, IL-8, IL-1 β i TNF α odnosno povećanim lučenjem IL-6 i IL-8. Urođeni imunski odgovor koji AdV26 potiče u RD i THP-1 stanicama sličan je odgovoru koji potiče infekcija s AdV5, jer je povećanje ekspresije gena te koncentracija sekretornih proteina podjednake vrijednosti za oba virusa.
3. Poticanje urođenog imunskog odgovora u RD stanicama ovisno je o pIRF-3 u slučaju infekcije s AdV26 i AdV35, te o NF- κ B u slučaju infekcije s AdV5 i AdV26. Poticanje urođenog imunskog odgovora u THP-1 staničnoj liniji ovisno je o NF- κ B u slučaju aktivacije s AdV35. Aktivacija imunskog odgovora je pIRF-7 neovisna u obje stanične linije.

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., 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.
- Ahi, Y., Mittal, S. (2016) Components of Adenovirus Genome Packaging. *Front. Microbiol.* **7**, 1503.
- Amstutz, B., Gastaldelli, M., Kälin, S., Imelli, N., Boucke, K., Wandeler, E. (2008) Subversion of CtBP1 controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *EMBO J.* **27**, 956-966.
- Arnberg, N. (2012) Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 442-448.
- Baeuerle, P.A., Baltimore, D. (1988) I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science* **242**, 540-546.
- Baqui, A., Meiller, T., Chon, J., Turng, B., Falkler, W. (1998) Interleukin-6 production by human monocytes treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the presence of lipopolysaccharide of oral microorganisms. *Oral Microbiol. Immunol.* **13**, 173-180.
- Barlan, A.U., Griffin, T.M., Mcguire, K.A., Wiethoff, C.M. (2011) Adenovirus membrane penetration activates the NLRP3 inflammasome. *J. Virol.* **85**, 146-155.
- Basner-Tschakarjan, E., Gaffal, E., O'keeffe, M. (2006) Adenovirus efficiently transduces plasmacytoid dendritic cells resulting in TLR9-dependent maturation and IFN- α production. *J. Gene Med.* **8**, 1300-1306.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G. (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320-1323.
- Booth, L.J., Metcalf, J. (1999) Type-Specific Induction of Interleukin-8 by Adenovirus. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **21**, 521-527.

- Borgland, S.L., Bowen, G.P., Wong, N.C., Libermann, T.A., Muruve, D.A. (2000) Adenovirus vector-induced expression of the C-X-C chemokine IP-10 is mediated through capsid-dependent activation of NF- κ B. *J. Virol.* **74**, 3941-3947.
- Bradley, J. (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology* **214**, 149-160.
- Byron, A., Morgan, M.R., Humphries, M.J. (2010) Adhesion signalling complexes. *Curr. Biol.* **20**, 1063-1067.
- Cartmell, T., Southgate, T., Rees, G.S., Castro, M.G., Lowenstein P.R., Luheshi G.N. (1999) Interleukin-1 Mediates a Rapid Inflammatory Response After Injection of Adenoviral Vectors into the Brain. *J. Neurosci.* **19**, 1517-1523.
- Chroboczek J., Ruigrok R.W., Cusack S. (1995) Adenovirus fiber. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **199**, 163-200.
- Cole, J. L., Housley, G. A., Dykman, T. R., MacDermott, R. P., Atkinson, J. P. (1985) Identification of an additional class of C3-binding membrane proteins of human peripheral blood leukocytes and cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **82**, 859-863.
- Curiel, D.T. (2016) Adenoviral Vectors for Gene Therapy, 2. izd., Academic Press, London.
- Dinarello, C.A. (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**, 2095-2147.
- Esposito, E., Cuzzocrea, S. (2009) TNF-Alpha as a Therapeutic Target in Inflammatory Diseases, Ischemia- Reperfusion Injury and Trauma. *Curr. Med. Chem.* **16**, 3152-3167.
- Fejer, G., Drechsel, L., Liese, J. (2008) Key role of splenic myeloid DCs in the IFN- α response to adenoviruses in vivo. *PLoS Pathog.* **4**, 1000208. doi:10.1371/journal.ppat.1000208
- Fuxe, J., Liu, L., Malin, S. (2003) Expression of the coxsackie and adenovirus receptor in human astrocytic tumors and xenografts. *Int. J. Cancer* **103**, 723-729.
- Ghebremedhin, B. (2014) Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* **4**, 26-33.
- Gordon S. (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 23-35.
- 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.

Gu, Y., Kuida, K., Tsutsui, H., Ku, G., Hsiao, K., Fleming, M. A., Hayashi, N., Higashino, K., Okamura, H., Nakanishi, K. (1997) Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* **275**, 206-209.

Hiscott, J. (2007) Triggering the Innate Antiviral Response through IRF-3 Activation. *J. Biol. Chem.* **282**, 15325-15329.

Hogan, S.P., Rosenberg, H.F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster, P.S., Lacy, P., Kay, A.B., Rothenberg, M.E. (2008) Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 709-750.

Huang, S., Kamata, T., Takada, Y., Ruggeri, Z.M., Nemerow, G.R. (1996) Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells. *J. Virol.* **70**, 4502-4508.

Jaffe, H., Danel, C., Longenecker, G., Metzger, M., Setoguchi, Y., Rosenfeld, M., Gant, T., Thorgeirsson, S., Stratford-Perricaudet, L., Perricaudet, M., Pavirani, A., Lecocq, J., Crystal, R. (1992) Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nat. Genet.* **1**, 372-378.

Kalin, S., Amstutz, B., Gastaldelli, M., Wolfrum, N., Boucke, K., Havenga, M. (2010) Macropinocytotic uptake and infection of human epithelial cells with species B2 adenovirus type 35. *J. Virol.* **84**, 5336-5350.

Kumar, K.P., McBride, K.M., Weaver, B.K., Dingwall, C., Reich, N.C. (2000) Regulated Nuclear-Cytoplasmic Localization of Interferon Regulatory Factor 3, a Subunit of Double-Stranded RNA-Activated Factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4159-4168.

Lamkanfi, M., Kanneganti, T., Franchi, L., Núñez, G. (2007) Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 220-225.

Lee, C., Bishop, E., Zhang, R., Yu, X., Farina, E., Yan, S., Zhao, C., Zeng, Z., Shu, Y., Wu, X., Lei, J., Li, Y., Zhang, W., Yang, C., Wu, K., Wu, Y., Ho, S., Athiviraham, A., Lee, M., Wolf, J., Reid, R., He, T. (2017) Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes & Diseases* **4**, 43-63.

- Lin, R., Mamane, Y., Hiscott, J. (1999) Structural and Functional Analysis of Interferon Regulatory Factor 3: Localization of the Transactivation and Autoinhibitory Domains. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2465-2474.
- Lin, R., Mamane, Y., Hiscott, J. (2000) Multiple Regulatory Domains Control IRF-7 Activity in Response to Virus Infection. *J. Biol. Chem.* **275**, 34320-34327.
- Lopez-Castejon, G., Brough, D. (2011) Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth F. R.* **22**, 189-195.
- Majhen, D., Calderon, H., Chandra, N., Fajardo, C., Rajan, A., Alemany, R., Custers, J. (2014) Adenovirus-Based Vaccines for Fighting Infectious Diseases and Cancer: Progress in the Field. *Hum. Gene Ther.* **25**, 301-317.
- Mallam, J., Hurwitz, M., Mahoney, T., Che´vez-Barrios, P., Hurwitz, R. (2004) Efficient Gene Transfer into Retinal Cells Using Adenoviral Vectors: Dependence on Receptor Expression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 1680. doi:10.1167/iovs.03-0730
- Medscape (2018) Adenovirus, < <https://emedicine.medscape.com/article/211738-overview>>. Pristupljeno 17. lipnja 2018.
- Mennechet, F.J.D., Tran, T.T.P., Eichholz, K., Van Kremer, E.J., de Perre, P. (2015) Ebola virus vaccine: benefit and risks of adenovirus-based vectors. *Expert Rev. Vaccines* **14**, 1471-1478.
- Mittereder, N., March, K.L., Trapnell, B.C. (1996) Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J. Virol.* **70**, 7498-7509.
- Nalbantoglu, J., Pari, G., Karpati, G., Holland, P.C. (1999) Expression of the primary coxsackie and adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation and limits the efficacy of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells. *Hum. Gene Ther.* **10**, 1009-1019.
- Nemerow, G., Pache, L., Reddy, V., Stewart, P. (2009) Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology*, **384**, 380-388.
- Nicklin, S., Wu, E., Nemerow, G., Baker, A. (2005) The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy. *Mol. Ther.* **12**, 384-393.
- Ning, S., Pagano, J., Barber, G. (2011) IRF7: activation, regulation, modification and function. *Genes Immun.* **12**, 399-414.

Nociari, M., Ocheretina, O., Schoggins, J.W., Falck Pedersen, E. (2007) Sensing infection by adenovirus: Toll like receptor-independent viral DNA recognition signals activation of the interferon regulatory factor 3 master regulator. *J. Virol.* **81**, 4145-4157.

Palomino, D., Marti, L. (2015) Chemokines and immunity. *Einstein (São Paulo)* **13**, 469-473.

Passaro, C., Borriello, F., Vastolo, V., Di Somma, S., Scamardella, E., Gigantino, V., Franco, R., Marone, G., Portella, G. (2016) The oncolytic virus dl922-947 reduces IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 expression and impairs angiogenesis and macrophage infiltration in anaplastic thyroid carcinoma. *Oncotarget* **7**, 1500-1515.

RCSB PDB-101 (2010) Protein data bank, Molecule of the month, <<http://pdb101.rcsb.org/motm/132>>. Pristupljeno 17. lipnja 2018.

Roelvink, P.W., Kovesdi, I., Wickham, T.J. (1996) Comparative analysis of adenovirus fiber-cell interaction: adenovirus type 2 (Ad2) and Ad9 utilize the same cellular fiber receptor but use different binding strategies for attachment. *J. Virol.* **70**, 7614-7621.

Sachs, M.D., Rauen, K.A., Ramamurthy, M. (2002) Integrin alpha(v) and coxsackie adenovirus receptor expression in clinical bladder cancer. *Urology* **60**, 531-536.

Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Nakaya, T., Taniguchi, T., Tanaka, N. (1998) Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett.* **441**, 106-110.

Sino Biological Inc. (2018) Sandwich ELISA, <<http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/sandwich-elisa>>. Pristupljeno 18. lipnja 2018.

Stanley, A., Lacy, P. (2010) Pathways for Cytokine Secretion. *Physiology* **25**, 218-229.

Stein, S., Falck-Pedersen, E. (2012) Sensing Adenovirus Infection: Activation of Interferon Regulatory Factor 3 in RAW 264.7 Cells. *J. Virol.* **86**, 4527-4537.

Sundararajan, R., Cuconati, A., Nelson, D., White, E. (2001) Tumor necrosis factor-alpha induces Bax-Bak interaction and apoptosis, which is inhibited by adenovirus E1B 19K. *J. Biol. Chem.* **276**, 45120-45127.

- Sung, R.S., Qin, L., Bromberg, J.S. (2001) TNFalpha and IFNgamma induced by innate anti-adenoviral immune responses inhibit adenovirus-mediated transgene expression. *Mol. Ther.* **3**, 757-767.
- Suzuki, M., Rooney, C. (2012) Adenovirus Immunity: X Marks the Spot. *Mol. Ther.* **20**, 2197-2198.
- Swanson, J.A. (2008) Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 639-649.
- Takeuchi, O., Akira, S. (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820.
- Tamanini, A., Nicolis, E., Bonizzato, A. (2006) Interaction of adenovirus type 5 fiber with the coxsackievirus and adenovirus receptor activates inflammatory response in human respiratory cells. *J. Virol.* **80**, 11241-11254.
- Tanaka, T., Narazaki, M. and Kishimoto, T. (2014) IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, 16295. doi:10.1101/cshperspect.a016295
- The Journal of Gene Medicine (2017) The Journal of Gene Medicine Clinical Trial site, <<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>>. Pristupljeno 18. lipnja 2018.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**, 768-774.
- Tran, K., Merika, M., Thanos, D. (1997) Distinct functional properties of IkappaB alpha and IkappaB beta. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5386-5399.
- Verma, I., Somia, N. (1997) Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature* **389**, 239-242.
- Viswanathan. S., Prathiba S., Prabhu S. (2015) Adenoviruses in Gene Therapy- A Review. *J. Biosci. Bioeng.* **3**, 1-5.
- Vogels, R., Zuijdgeest, D., van Rijnsoever, R., Hartkoorn, E., Damen, I., de Bethune, 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.

Walters, R.W., Grunst, T., Bergelson, J.M. (1999) Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J. Biol. Chem.* **274**, 10219-10226.

Wei, C.J., Boyington, J.C., McTamney, P.M., Kong, W.P., Pearce, M.B., Xu, L., Andersen, H., Rao, S., Tumpey, T.M., Yang, Z.Y., Nabel, G.J. (2010) Induction of broadly neutralizing H1N1 influenza antibodies by vaccination. *Science* **329**, 1060-1064.

Wolfrum, N., Greber, U. (2012) Adenovirus signalling in entry. *Cell. Microbiol.* **15**, 53-62.

Yousuf, M.A., Zhou, X., Mukherjee, S., Chintakuntlawar, A.V., Lee, J.Y., Ramke, M. (2013) Caveolin-1 Associated Adenovirus Entry into Human Corneal Cells. *PLoS ONE* **8**, 77462. doi:10.1371/journal.pone.0077462

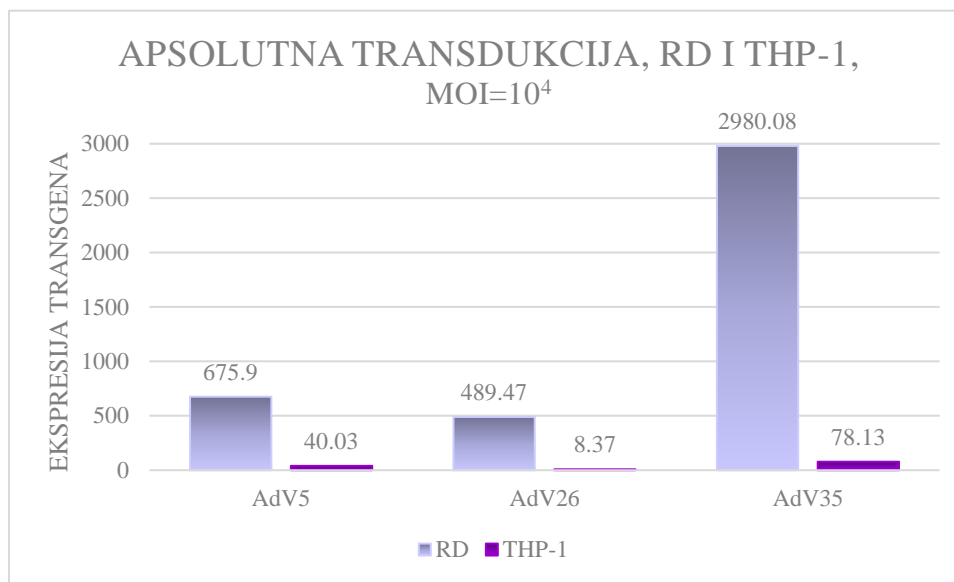
Zandvliet, M.L., Falkenburg, J.H., Van Liempt, E. (2010) Combined CD8+ and CD4+ adenovirus hexonspecific T cells associated with viral clearance after stem cell transplantation as treatment for adenovirus infection. *Haematologica* **95**, 1943-1951.

Zhu, J., Huang, X., Yang, Y. (2007) Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptordependent and -independent pathways. *J. Virol.* **81**, 3170-3180.

Zsengeller, Z., Otake, K., Hossain, S.A., Berclaz, P.Y., Trapnell, B.C. (2000) Internalization of adenovirus by alveolar macrophages initiates early proinflammatory signaling during acute respiratory tract infection. *J. Virol.* **74**, 9655-9667.

7. PRILOZI

7.1. REZULTATI USPJEŠNOSTI TRANDUKCIJE AdV5, AdV26 i AdV35 u THP-1 i RD STANICAMA

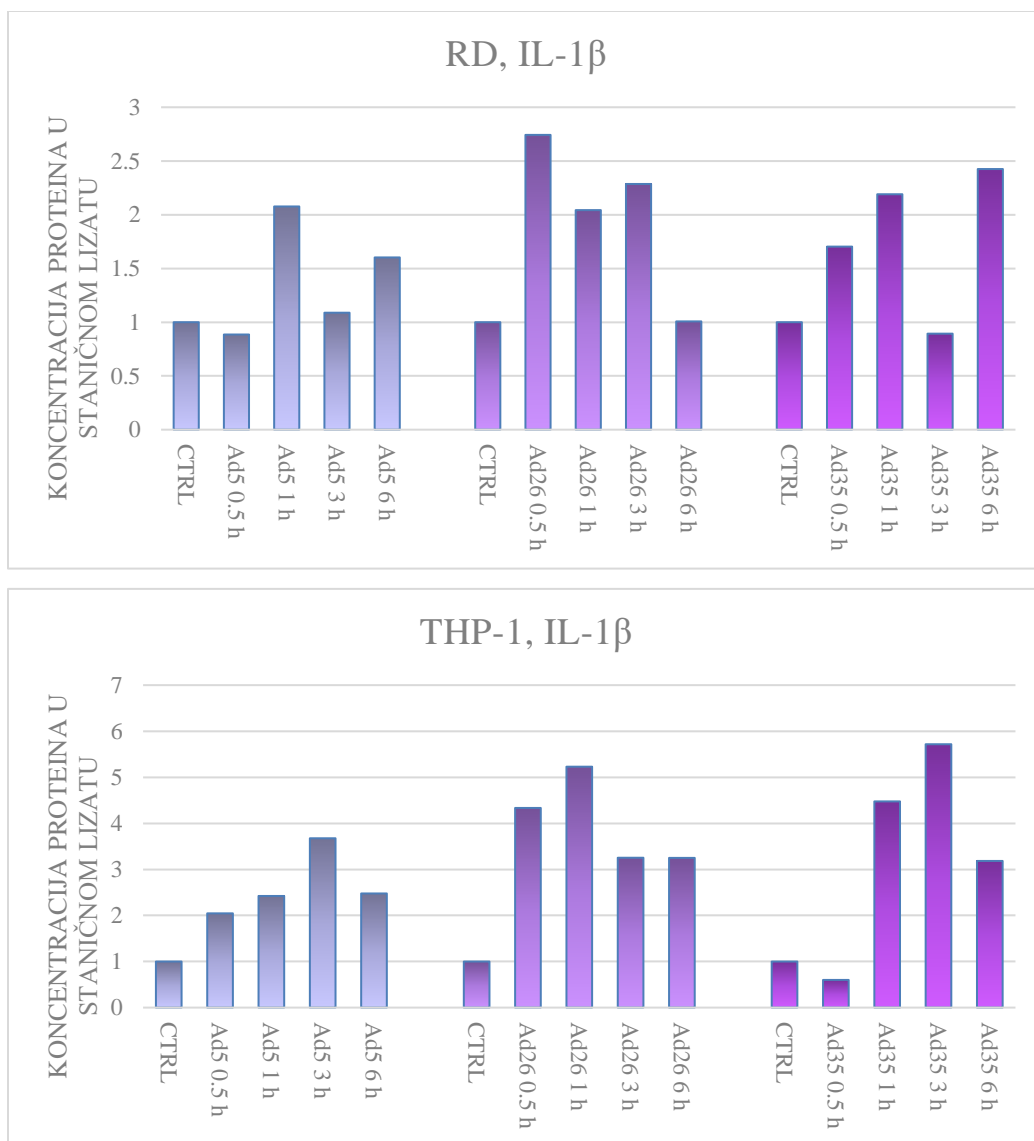


Slika 18. Uspješnost transdukcije AdV5, AdV26 i AdV35 u stanicama RD i THP-1. Stanice su nasadene u pločice sa 6 bunarića, 1×10^5 stanica po bunariću i inficirane s AdV5, AdV26 i AdV35 (MOI: 10^4). Dva dana nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj stanica, uspješnost transdukcije određena je mjerenjem fluorescencije protočnim citometrom. Pokus je ponavljen najmanje 3 puta, a prikazani su rezultati jednog eksperimenta.

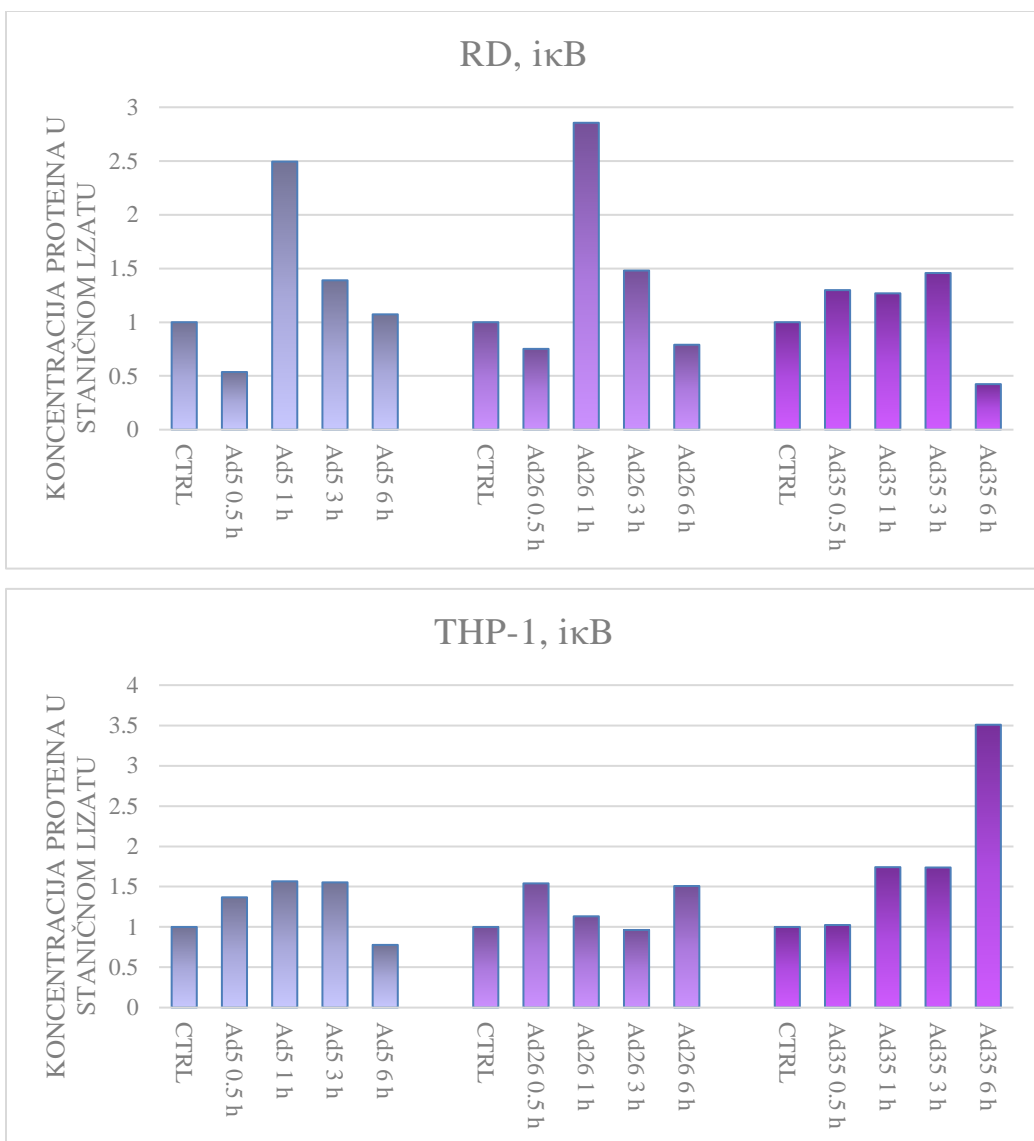
7.2. REZULTATI DETEKCIJE PROTEINA U LIZATU RD i THP-1 STANICA NAKON INFEKCIJE S AdV5, AdV26 i AdV35



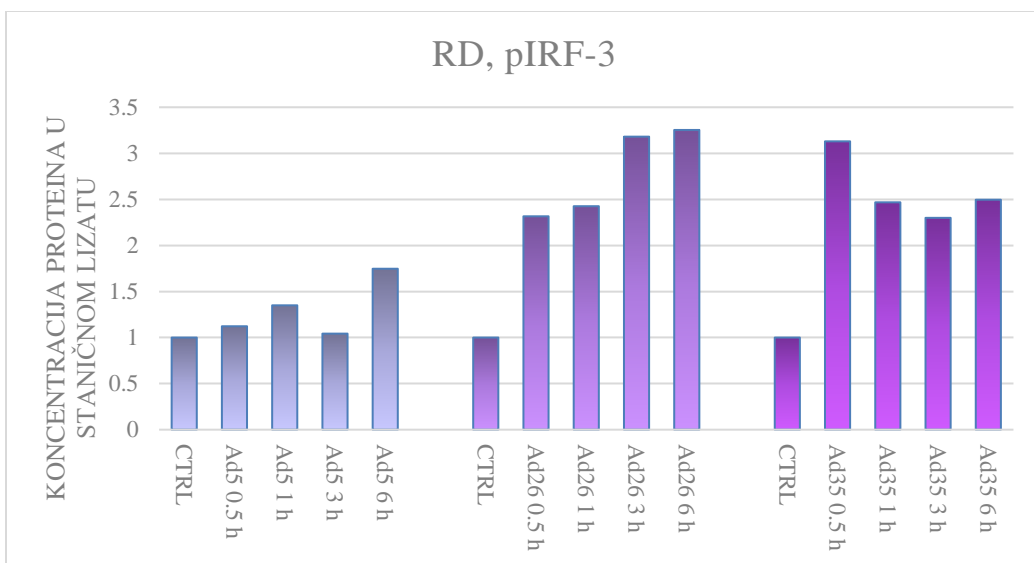
Slika 19. Kaspaza-1 u RD i THP-1 stanicama nakon infekcije s AdV5, AdV26 i AdV35 određivano metodom western blot. 0,5, 1, 3 i 6 sata nakon infekcije adenovirusnim vektorima. Stanice su nasade u pločice sa 6 bunarića, 4×10^5 stanica po bunariću i inficirane s AdV5, AdV26 i AdV35 (MOI: 10^4). 0,5, 1, 3 i 6 sata nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj stanica, stanice se liziraju metodom vrućeg pufera te se lizat skupi za analizu. Pokus je ponovljen dva puta za RD, a jednom za THP-1 stanice. Prikazani su rezultati jednog eksperimenta. Rezultati su normalizirani u odnosu na stanice inficirane s AdV5.



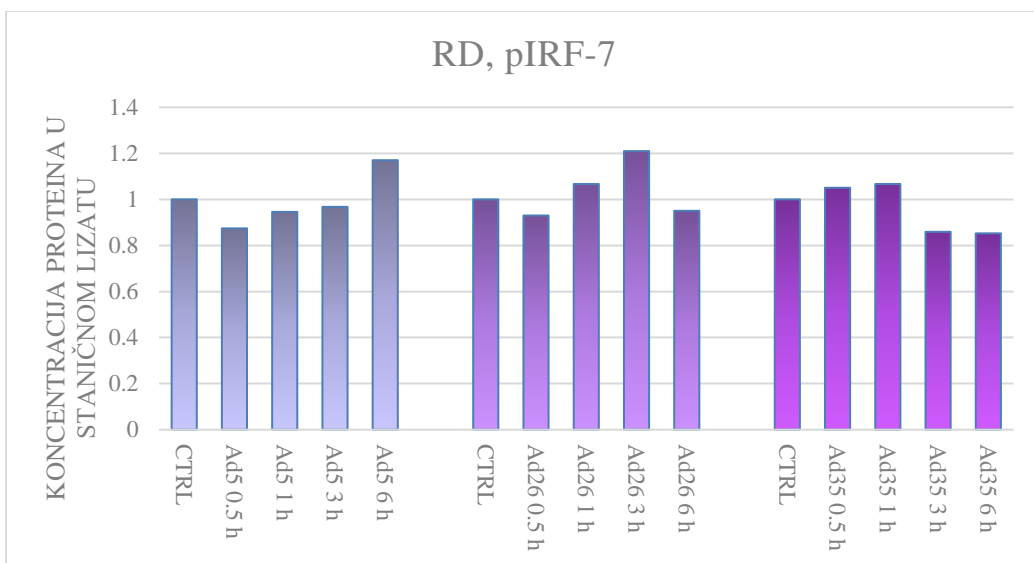
Slika 20. IL-1 β u RD i THP-1 stanicama nakon infekcije s AdV5, AdV26 i AdV35 određivano metodom western blot. 0,5, 1, 3 i 6 sata nakon infekcije adenovirusnim vektorima. Stanice su nasadene u pločice sa 6 bunarića, 4×10^5 stanica po bunariću i inficirane s AdV5, AdV26 i AdV35 (MOI: 10^4). 0,5, 1, 3 i 6 sata nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj stanica, stanice se liziraju metodom vrućeg pufera te se lizat skupi za analizu. Pokus je ponovljen dva puta za RD, a jednom za THP-1 stanice. Prikazani su rezultati jednog eksperimenta. Rezultati su normalizirani u odnosu na stanice inficirane s AdV5.



Slika 21. IκB u RD i THP-1 stanicama nakon infekcije s AdV5, AdV26 i AdV35 određivano metodom western blot. 0,5, 1, 3 i 6 sata nakon infekcije adenovirusnim vektorima. Stanice su nasadene u pločice sa 6 bunarića, 4×10^5 stanica po bunariću i inficirane s AdV5, AdV26 i AdV35 (MOI: 10^4). 0,5, 1, 3 i 6 sata nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj stanica, stanice se liziraju metodom vrućeg pufera te se lizat skupi za analizu. Pokus je ponovljen dva puta za RD, a jednom za THP-1 stanice. Prikazani su rezultati jednog eksperimenta. Rezultati su normalizirani u odnosu na stanice inficirane s AdV5.



Slika 22. pIRF-3 u RD stanicama nakon infekcije s AdV5, AdV26 i AdV35 određivano metodom western blot. 0,5, 1, 3 i 6 sata nakon infekcije adenovirusnim vektorima. Stanice su nasadene u pločice sa 6 bunarića, 4×10^5 stanica po bunariću i inficirane s AdV5, AdV26 i AdV35 (MOI: 10^4). 0,5, 1, 3 i 6 sata nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj stanica, stanice se liziraju metodom vrućeg pufera te se lizat skupi za analizu. Pokus je ponovljen dva puta za RD. Prikazani su rezultati jednog eksperimenta. Rezultati su normalizirani u odnosu na stanice inficirane s AdV5.



Slika 23. pIRF-7 u RD stanicama nakon infekcije s AdV5, AdV26 i AdV35 određivano metodom western blot. 0,5, 1, 3 i 6 sata nakon infekcije adenovirusnim vektorima. Stanice su nasadene u pločice sa 6 bunarića, 4×10^5 stanica po bunariću i inficirane s AdV5, AdV26 i AdV35 (MOI: 10^4). 0,5, 1, 3 i 6 sata nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj stanica, stanice se liziraju metodom vrućeg pufera te se lizat skupi za analizu. Pokus je ponovljen dva puta za RD. Prikazani su rezultati jednog eksperimenta. Rezultati su normalizirani u odnosu na stanice inficirane s AdV5.

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

Ivana Radić

Ivana Radić